



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 31 903 T2** 2004.08.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 877 936 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 31 903.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP96/04937**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 939 008.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/20206**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.11.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.06.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.11.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **17.03.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.08.2004**

(51) Int Cl.⁷: **G01N 30/44**
B01D 15/08

(30) Unionspriorität:
566425 30.11.1995 US

(73) Patentinhaber:
Novasep, Pompey, FR

(74) Vertreter:
PRÜFER & PARTNER GbR, 81545 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB

(72) Erfinder:
GRILL, Charles, M., East Greenwich, US;
HAMPTON, Thomas, W., West Kingston, US

(54) Bezeichnung: **DISKRETER GEGENSTROMCHROMATOGRAPHIEPROZESS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren der Ausführung einer präparativen Chromatographie auf eine wirksame, repetitive Weise.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Unter zahlreichen vorgeschlagenen und verwendeten chromatographischen Techniken gibt es: (1) die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit äußerem Recykeln und (2) die simulierte Fließbett (SMB)-Chromatographie. Das äußere HPLC-Recykeln ist mindestens seit 1974 bekannt (R. A. Henry, S. H. Byrne, und D. R. Hudson, J. Chromatographic Sci. 12, 197 (1974)). Beim äußeren Recykeln werden Chromatographiepeaks dazu veranlaßt, durch zwei Säulen in einem Achter-Ziffer-Muster zu zyklisieren, um die Anzahl der theoretischen Böden zu erhöhen. Während des Recykelprozesses durchlaufen die Peaks keine Pumpe. Somit ist diese Technik wirksamer als ein Recykeln mit geschlossener Schleife, bei dem Peaks in jedem Zyklus durch eine Pumpe laufen, was dazu führt, daß einiges an in der Säule auftretender Trennung vermischt und beseitigt wird. Die SMB-Chromatographie, die in den frühen 1960'igern durch Mitarbeiter von UOP erfunden wurden (D. B. Broughton, R. W. Neuzil, J. M. Pharis, C. S. Brearley, Chem Eng. Progress, 66(9), 70 (1970)), ist ein kontinuierlicher Prozeß. Der Zulauf wird fortlaufend in das Innere des SMB-Profiles injiziert; Extrakt und Raffinat werden kontinuierlich gesammelt; und frische mobile Phase wird ebenfalls kontinuierlich zugegeben. Das gesamte Profil wandert im System herum. In einem möglichen Aufbau eines 16-Säulen-Arrays zum Beispiel wird der Zulauf zwischen den Säulen **7** und **8** injiziert; die mobile Phase wird zwischen den Säule **16** und **1** injiziert; das Raffinat wird zwischen den Säulen **11** und **12** gesammelt; und der Extrakt wird zwischen den Säulen **3** und **4** gesammelt. Indem das Profil sich nach rechts bewegt, werden alle Injektions- und Sammel-punkte gleichzeitig um eine Säule nach rechts versetzt. Der Zulaufpunkt ist zum Beispiel zwischen den Säulen **9** und **10**; der Punkt der mobilen Phase zwischen den Säulen **1** und **2**; der Raffinatpunkt zwischen den Säulen **12** und **13**; und der Extraktpunkt zwischen den Säulen **4** und **5**. Der Wechsel tritt periodisch bei den geeigneten Zeitpunkten auf. Da die über die Punkte des Zulaufs und der mobilen Phasen injizierten Fluide bei den Raffinat- und Extrakt-punkten gesammelt werden, entwickelt sich ein Gleichgewichtszustand. Eine weitere Charakteristik der SMB-Chromatographie besteht darin, daß es über das Profil vier Fließraten gibt. Es ist ebenfalls wichtig hervorzuheben, daß die klassische SMB-Chromatographie wirklich kontinuierlich ist: die Pumpen der mobilen Phase und des Zulaufs hören niemals auf, Material in das System zu pumpen; und die Extrakt- und Raffinat-leitungen hören niemals auf, gesammeltes gereinigtes Material zu liefern.

[0003] Der Stand der Technik weist auch drei Patente auf, die relevant sind: USP 4,267,054, USP 4,379,751, und USP 4,970,002. Die Prozesse dieser Patente verwenden jedoch ein Recykeln mit geschlossener Schleife.

[0004] Das Dokument US-A-S 071 547 beschreibt ein Chromatographieverfahren, das zur Trennung von überlappenden Peaks der Chromatographie nützlich ist, die aus dem zu trennenden Material erzeugt werden. Das Verfahren umfaßt die Schritte des Passierens einer Probe durch eine erste Säule und eine zweite Säule, um die interessierenden Komponenten mit überlappenden Peaks zu trennen.

[0005] Das Dokument JP-A-59 222 764 offenbart eine Vorrichtung zum Trennen einer Vielzahl von zu analysierenden Komponenten über einen weiten Siedepunktsbereich mit guter Effizienz innerhalb einer guten Zeit, indem Komponenten niedrigen Siedepunkts viele Male durch eine Säule passieren gelassen werden durch die Wechselmanipulation eines Wechselventils.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Eine Aufgabe der Erfindung ist es, ökonomische und effiziente HPLC-Prozesse bereitzustellen.

[0007] Nach weiterem Studium der Spezifikation und der beigefügten Ansprüche werden dem Fachmann weitere Aufgaben und Vorteile dieser Erfindung deutlich werden.

[0008] Um diese Aufgaben zu erzielen, besteht ein Gegenstand der Erfindung darin, Recycling-Techniken anzuwenden, die mit der periodischen Injektion von frischen Proben gekoppelt sind.

[0009] Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung beruht auf der Verwendung einer zweiten Lösungsmittelpumpe (in den beigefügten Zeichnungen als "Pumpe **2**" bezeichnet), die das Chromatographieprofil während des Sammelns bestimmter Fraktionen vor dem Stillstand bewahrt. Dieses Merkmal erhöht die Produktivität des Prozesses stark. Somit ist die Verwendung von zwei Pumpen für zwei Säulen an sich bereits eine neue und nützliche Unterkombination.

[0010] In einer bevorzugten Modifikation der Erfindung wird ein Detektor angewandt, obgleich ein Detektor für die Ausführung der Erfindung nicht wesentlich ist. Mit Hilfe der bevorzugten Verwendung des Detektors wird der gesamte Prozeß sichtbar und intuitiv, wodurch die Methodenentwicklung stark vereinfacht wird. Noch wich-

tiger ist, daß der Detektor die Verwendung von Software bei der Initiierung aller Sammel- und Steuervorgänge ermöglicht, wie der Sammlung von Fraktionen, der Injektion einer frischen Probe, dem Wechseln der Säule, der Pumpensteuerung, etc.. Durch Meßparameter wie die Anstiegs- oder Abfallneigung, die charakteristische Absorption, das Verhältnis von zwei Absorptionen, die Funktionen von Absorptionen, der Brechungsindex, die Leitfähigkeit, der pH, die charakteristische optische Aktivität, etc., bestimmt eine solche Software den richtigen Punkt des Chromatographieprofils, um einen gegebenen Vorgang zu initiieren. Die Software ermöglicht auch, daß die Sammlungs- und Steuervorgänge zeitlich bestimmte Vorgänge sind. Zum Beispiel führt die Detektion der Anstiegsneigung, gekoppelt mit einem Timer, zu einem sehr zufriedenstellenden Prozeß.

[0011] Gemäß einem weiteren Gegenstand der Erfindung kann die Pumpe der mobilen Phase während der Injektion abgeschaltet werden. Dies verhindert das Vermischen der frischen Probe mit dem teilweise getrennten Profil und führt zu einer stark verbesserten Trennung. Diese Technik ist besonders nützlich bei schwierigen Trennungen. Natürlich kann, falls passend, die Pumpe der mobilen Phase während der Injektion angelassen werden.

[0012] In einem weiteren Gegenstand der Erfindung ist ein Mechanismus vorgesehen, um einen Puls starken Lösungsmittels zu erzeugen zum schnelleren Eluieren von späteren Eluierfraktionen und zum Konzentrieren dieser Fraktionen.

[0013] Zum Ausführen des Verfahrens der Erfindung umfassen die Merkmale der Vorrichtung: zwei präperative Chromatographiesäulen, zwei für die Säulenumschaltung verwendete 4-Wegeventile, mindestens eine und vorzugsweise zwei Lösungsmittelpumpen (Pumpen **1** und **2**), eine Injektionspumpe (oder -system), und ein vorzugsweise 3-Wege-Recykelventil, welches verwendet wird, um die mobile Phase zum Abfall oder zum Recykeln zur Pumpe **1** zu schicken. Es kann irgendeine Art einer präperativen Chromatographiesäule verwendet werden. Jede Säule ist vorzugsweise mit demselben Typ und derselben Menge an stationärer Phase oder einem Äquivalent davon gepackt. Für die besten Ergebnisse sollten die Säulen nahezu die gleiche Effizienz aufweisen, die durch die Zahl an theoretischen Böden bestimmt ist.

[0014] Es ist ebenfalls bevorzugt, einen Detektor, einen Computer und eine Automationssoftware bereitzustellen. Es ist bevorzugt, daß einige, wenn nicht sogar alle Steuervorgänge, einschließlich – jedoch nicht begrenzt auf – die Ventilumschaltung, das An- und Auskippen von Pumpen, und die Einstellung von Pumpenfließraten, durch die Software allein auf der Grundlage der Zeit initiiert werden. Wenn umgekehrt kein Detektor verwendet wird, ist es bevorzugt, daß der Fortgang und der Erfolg der Trennung durch das periodische und/oder Online-Auffangen von Fraktionen, gefolgt von einer Analyse der Fraktionen durch analytische Instrumente, die nicht mit dem präperativen Chromatographieverfahren verbunden sind, zu bestimmen.

[0015] Das Verfahren kann verwendet werden, um irgendeine Art von chromatographischer Trennung auszuführen, einschließlich – jedoch nicht begrenzt auf – Normalphasen-Chromatographietrennungen, Umkehrphasen-Chromatographietrennungen, chiralachromatographische Trennungen, Ionenaustauscher-Chromatographietrennungen, Affinitätschromatographietrennungen sowie Gel- bzw. Größenausschluß-Chromatographietrennungen.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0016] Zum besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung wird eine detaillierte Beschreibung des Verfahrens der chromatographischen Trennung von Fluidmischungen in Fraktionen und von Beispielen, die die Chromatographieausführungsformen veranschaulichen, unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen gegeben, wobei:

[0017] **Fig. 1** ist ein allgemeines schematisches Fließschema der Erfindung;

[0018] **Fig. 2** ist ein weiteres Fließschema der Erfindung, das sich von der **Fig. 1** durch die Verwendung eines 6-Wege-Sequenzventils unterscheidet;

[0019] **Fig. 3** ist ein Chromatogramm von Beispiel **1**;

[0020] **Fig. 4** ist eine Grafik des Zyklus **6** von Beispiel **1**;

[0021] **Fig. 5** ist ein Chromatogramm von Beispiel **2**;

[0022] **Fig. 6** ist ein Chromatogramm von Beispiel **3**;

[0023] **Fig. 7** ist eine Grafik des Zyklus **3** von Beispiel **3**;

[0024] **Fig. 8** ist ein Chromatogramm von Beispiel **4**;

[0025] **Fig. 9** ist ein schematisches Fließschema des in Beispiel **5** verwendeten Systems, mit einem dritten 4-Wegeventil anstelle des 6-Wege-Sequenzventils von **Fig. 2**; und das ferner mit einem ausgereifteren Fraktionensammelsystem versehen ist;

[0026] **Fig. 10** ist ein Chromatogramm von Beispiel **5**;

[0027] **Fig. 11** ist eine Grafik des Zyklus **4** von Beispiel **5**;

[0028] **Fig. 12** ist ein schematisches Fließschema der Erfindung, ähnlich zur **Fig. 1**, jedoch ein 3-Wegeventil und ein allgemeines Fraktionensammelsystem zeigend;

[0029] **Fig. 13** ist ähnlich zur **Fig. 1**, wobei jedoch das Fraktionensammelsystem ein 2-Wege-Sammel-Ventil-

system ist;

[0030] **Fig. 14** ist ein schematisches Fließschema, ähnlich zur **Fig. 1**, wobei das Fraktionensammelsystem eine Serie von Hochdruck-3-Wegeventilen ist;

[0031] **Fig. 15** ist ein schematisches Fließschema einer Modifikation von **Fig. 1**, wobei die Pumpe **2** zur Injektion der Probe angewandt wird, wodurch die Injektionspumpe entfällt;

[0032] **Fig. 16** ist ein schematisches Fließschema, ähnlich zur **Fig. 1**, jedoch eine kalibrierte Injektionsschleife anwendend;

[0033] **Fig. 17** ist ähnlich zur **Fig. 2**, wobei jedoch das Fraktionensammelsystem von **Fig. 9** angewandt wird.

Detaillierte Beschreibung der Zeichnungen

[0034] Zunächst steht die Abkürzung "PT" in **Fig. 1** und den anderen Figuren für "unter Druck gesetzten Transducer". Die Abkürzungen "P1... P5" stehen für eine Ventileinstellung, die das Einführen von Luft gestattet, und die Abkürzungen "V1... V5" stehen für eine Ventileinstellung zum Sammeln der Fraktion.

[0035] **Fig. 1** zeigt ein allgemeines schematisches Diagramm der Erfindung. So gut wie jede Art von Fraktionensammelsystem, das in der präoperativen Chromatographie verwendet wird, kann zum Sammeln des gereinigten Produkts verwendet werden. Methoden zur automatischen Probeninjektion, die sich von der gezeigten, einfachen Injektionspumpe unterscheiden, sind ebenfalls möglich. Die zwei 4-Wegeventile dienen zum Umschalten des Profils auf die geeignete Säule. Sie schalten gleichzeitig. Dieser Vorgang ist ein zeitlich gesteuerter Vorgang.

[0036] Pumpen **1** und **2** sind Mobilphasenpumpen. Die Fließrate der Pumpe **1** wird zu Beginn des Laufs in das Programm eingegeben. Pumpe **1** kann während der Injektion abgeschaltet werden. Dies ist nützlich, da es das Mischen der frischen Probe mit dem teilweise getrennten Profil verhindert, was zu einer besseren Trennung führt. Dieses Abschalten der Pumpe **1** während der Injektion könnte ein zeitlich gesteuerter Vorgang sein, oder könnte durch die relevanten Parameter getriggert sein, die durch das System und die Software bestimmt werden.

[0037] Es ist zu beachten, daß die Pumpe **1** entweder Lösungsmittel A oder Lösungsmittel B pumpen kann. Lösungsmittel A ist das Trennungslösungsmittel und stellt die mobile Phase dar, die daraufhin ermittelt wurde, die beste Trennung zu ergeben. Das Lösungsmittel B ist ein stärkeres Lösungsmittel, z. B. 100% Methanol verglichen zu einer Methanol : Wasser-Lösung von 80 : 20 Volumen. Ein kurzer Puls des Lösungsmittels B kann verwendet werden, um die stärker zurückgehaltenen Komponenten von der relevanten Säule abzuwaschen, um durch das Fraktionensammelsystem gesammelt oder zum Abfall entfernt zu werden (durch "Puls" ist eine momentane Injektion des Lösungsmittels B gemeint, die etwa 1–10% der Dauer eines vollständigen Zyklus für das Beispiel dauert). Dieser Puls eines stärkeren Lösungsmittels vermindert die Dauer, die zum Sammeln dieser Fraktionen erforderlich ist, und erhöht auch beträchtlich die Konzentration dieser Fraktionen. Nachdem das gewünschte Volumen des Lösungsmittels B auf die relevante Säule gepumpt worden ist, wird abermals das Lösungsmittel A für die Pumpe **1** ausgewählt. Sobald das Profil auf diese Säule geschaltet wird, ist die Säule mit diesem Lösungsmittel A equilibriert worden. Das Umschalten zwischen den Lösungsmitteln A und B könnte ein zeitlich gesteuerter Vorgang sein, oder es könnte durch die relevanten Parameter getriggert werden, die durch das System und die Software bestimmt sind.

[0038] Während des Sammelns der Fraktionen, das nach der Injektion von frischen Portionen der Probe auftritt, steht das Profil still. Der Zweck der Pumpe **2** ist es, den Stillstand des Profils zu verhindern. Während dieser Sammelvorgänge kann die Pumpe **2** angeschaltet werden, was das Profil zum Voranschreiten durch die Säule veranlaßt. Der Durchsatz (Menge des pro Zeiteinheit gesammelten Produkts) wird durch die Verwendung der Pumpe **2** zum Verhindern des Stillstands des Profils beträchtlich erhöht.

[0039] Das 3-Wege-Recykelventil wird typischerweise so eingestellt, daß die mobile Phase während des Betriebs der Pumpe **2** zur Einlaßseite der Pumpe **1** recykelt wird. Dies minimiert beträchtlich die verwendete Menge der mobilen Phase, da ansonsten die mobile Phase von der Pumpe **2** zum Abfall wandern würde. Um zu verhindern, daß das durch die Pumpe **2** erzeugte Lösungsmittel A das Reservoir des Lösungsmittels A der Pumpe **1** kontaminiert, wird die Pumpe **2** bei einer etwas geringeren Fließrate als Pumpe **1** laufen gelassen. Die Pumpe **1** nimmt die von ihr benötigte zusätzliche Menge an Lösungsmittel A auf, indem sie direkt aus dem Reservoir gezogen wird.

[0040] Das 3-Wege-Recykelventil kann auch so eingestellt werden, daß reine mobile Phase zur Einlaßseite der Pumpe **1** recykelt wird, wenn die Pumpe **2** abgeschaltet ist und keine Fraktionen gesammelt werden. Die Säulen sind dann in Reihe verbunden, und Pumpe **1** liefert den vollständigen Antrieb, um das Profil durch die Säulen zu bewegen. Die in Reihe geschaltete, zweite Säule verlassende mobile Phase kann zum Abfall oder zum Recykeln zum Einlaß der Pumpe **1** aufgeteilt werden.

[0041] Das 3-Wege-Recykelventil ist während der Injektion auf Abfall eingestellt. Dies stellt sicher, daß das System während der Injektion keinen "toten Kopf" bekommt.

[0042] Die vorliegende Erfindung ist ein repetitives Verfahren, welches für Stunden oder Tage bis zum Ende

laufen kann. Es ist deshalb erforderlich, daß sie über Computersteuerung automatisiert wird. Die Turbo-Prep®-Steuersoftware, eine der EM Separations Technology gehörende Software, wurde in allen in den Beispielen diskutierten Läufen verwendet.

[0043] **Fig. 2** zeigt eine Vorrichtung, bei der das Sammelsystem ein 6-Wege-Sequenzventil ist. Diese Vorrichtung wurde verwendet, um alle in den Beispielen 1–4 dargestellten Ergebnisse zu erhalten. Andere Vorrichtungen, die verschiedene Fraktionssammelsysteme und verschiedene Injektionssysteme verwenden, werden danach diskutiert.

[0044] Das Folgende ist eine Beschreibung des Betriebs der in **Fig. 2** gezeigten Vorrichtung. Die Betriebsweise aller Ausführungsformen ist grundsätzlich die gleiche, unabhängig vom verwendeten Fraktionssammelsystem oder Injektionssystem.

[0045] Unter Verwendung der in **Fig. 2** gezeigten Vorrichtung wird die folgende Abfolge von Vorgängen ablaufen, wenn ein Gleichgewichtszustand erreicht ist

1. Die 4-Wegeventile werden geschaltet, daß das Profil auf die geeignete Säule gerichtet wird (das 6-Wegeventil ist bereits in Position **1**). Das Recykelventil kann so eingestellt werden, daß die mobile Phase zum Einlaß der Pumpe **1** recykelt wird, oder daß der Strom zum Abfall geschickt wird.
2. Das 6-Wegeventil wird auf Position **2** geschaltet, um den Strom in Erwartung der Annäherung des Profils zum Abfall zu lenken.
3. Das 6-Wegeventil wird auf Position **3** geschaltet, um Fraktion **1** zu sammeln.
4. Das 6-Wegeventil wird auf Position **4** geschaltet. Dies stoppt das Sammeln der Fraktion **1** ab und zwingt das Profil, zur nächsten Säule zu laufen. Die zwei Säulen sind nun in Reihe verbunden, und Pumpe **1** liefert den gesamten Antrieb, um das Profil durch das 2-Säulensystem zu bewegen. Das Recykelventil wird so eingestellt, um entweder die mobile Phase zum Einlaß der Pumpe **1** zu recykeln, oder den Strom zum Abfall zu schicken.
5. Die Injektionspumpe wird angeschaltet, um frische Probe in das Innere des Profils zu pumpen. Während der Injektion wird das 3-Wege-Recykelventil auf Abfall geschaltet. Dies stellt sicher, daß das System während der Injektion keinen "toten Kopf" bekommt. Während der Injektion kann auch die Pumpe **1**, falls gewünscht, abgeschaltet werden.
6. Die Injektionspumpe wird abgeschaltet. Wenn die Pumpe **1** während der Injektion abgeschaltet worden war, beginnt sie erneut, wenn die Injektionspumpe abgeschaltet wird. Das Recykelventil kann so eingestellt werden, daß die mobile Phase zum Einlaß der Pumpe **1** recykelt wird, oder daß der Strom zum Abfall geschickt wird.
7. Das 6-Wegeventil wird auf Position **5** geschaltet, um Fraktion **2** zu sammeln. Während dieses Zeitpunkts kann die Pumpe **2** auch angeschaltet werden, um den Stillstand des Profils zu verhindern.
8. Das 6-Wegeventil wird auf Position **6** geschaltet. Dies beendet das Sammeln der Fraktion **2** und lenkt den Strom zum Abfall, um die Zirkulation von ungesammeltem Produkt und Verunreinigungen zu verhindern. Während dieser Zeit kann die Pumpe **2** auch angeschaltet sein, um den Stillstand des Profils zu verhindern.
9. Das 6-Wegeventil wird auf Position **1** geschaltet, und die Pumpe **2** wird ausgeschaltet. Die zwei Säulen sind nun in Reihe verbunden, und Pumpe **1** liefert den gesamten Antrieb, um das Profil durch das 2-Säulensystem zu bewegen. Das Recykelventil kann so eingestellt werden, daß die mobile Phase zum Einlaß der Pumpe **1** recykelt wird, oder daß der Strom zum Abfall geschickt wird.

[0046] Bei der vorliegenden Erfindung treten alle Ventilumschaltungen nacheinander auf, nicht gleichzeitig wie beim SMB. Beim Gleichgewichtszustand ist die Zeit zwischen dem gleichen Vorgang in aufeinanderfolgenden Zyklen konstant und wird als Zykluszeit bezeichnet.

[0047] Es sei zum Beispiel angenommen, daß die Zykluszeit **7** Minuten beträgt. In einem bestimmten Zyklus, sagen wir Zyklus **20**, werden die 4-Wegeventile bei einem bestimmten Zeitpunkt umschalten. Sieben Minuten später werden die 4-Wegeventile erneut schalten, um den nächsten Zyklus zu beginnen; sieben Minuten später werden sie wiederum umschalten, etc.. Entsprechend wird bei einem späteren Zeitpunkt im Zyklus **20** die Position **2** des 6-Wegeventils ausgewählt; 7 Minuten später wird die Position **2** wieder ausgewählt; etc.. Dies passiert in jedem Zyklus für alle Vorgänge. Sie treten wieder und wieder auf, wobei das Intervall zwischen dem gleichen Auftreten der Zykluszeit entspricht.

[0048] Bei **Fig. 1** und **2** ist das manuelle Injektionsventil kein wesentliches Merkmal der vorliegenden Erfindung. Sein Zweck besteht darin, das Testen der Säulen durch die Injektion von geringen Mengen an Standardlösungen zu ermöglichen.

[0049] Die **Fig. 3** bis **11** werden im einzelnen in Verbindung mit den folgenden Beispielen diskutiert.

[0050] **Fig. 12** zeigt ein verallgemeinertes Schema eines Fraktionssammelsystems, das über ein Hochdruck-3-Wegeventil mit dem Rest des Systems verbunden ist. Irgendeine Art von Fraktionssammelsystem, welches bei der präparativen Chromatographie verwendet wird, kann auf diese Weise verbunden werden. Ein Beispiel ist ein Sequenzfraktionssammler, bei dem die die Fraktion leitende Verrohrung sequentiell mit jedem

Fraktionsauffanggefäß kombiniert ist. Ein weiteres Beispiel ist ein Array von Ventilen, die mit einem zentralen Hohlraum niedrigen Totvolumens verbunden sind, in den die Fraktion geleitet wird; zum Weiterleiten der Fraktion zum Sammelgefäß nach Wahl kann irgendeines der Ventile in irgendeiner Reihenfolge gewählt werden.

[0051] **Fig. 13** zeigt eine andere Methode zum Sammeln von Fraktionen, bei der ein lineares Array von Hochdruck-2-Wegeventilen mit dem System über eine Reihe von nah beieinanderliegenden, überkreuzten Anschlüssen verbunden ist.

[0052] **Fig. 14** zeigt eine andere Methode zum Sammeln von Fraktionen, bei der eine Serie von Hochdruck-3-Wegeventilen mit dem System in Reihe verbunden ist.

[0053] Eine viel größere Zahl von Fraktionen kann mit irgendeinem der oben diskutierten und in den **Fig. 12, 13 und 14** gezeigten Beispielen dann gesammelt werden, wenn ein 6-Wege-Sequenzventil (wie in **Fig. 2** gezeigt) verwendet wird. Dies macht den Trennprozeß flexibler. Die Grundbetriebsordnung ist jedoch die gleiche, egal welcher Typ des Fraktionssammelsystems verwendet wird: die 4-Wegeventile werden geschaltet, um die Säulenreihenfolge auszuwählen, die Fraktionen werden am vorderen Teil des Profils gesammelt, die frische Probe wird in das Innere des Profils injiziert, die Fraktionen werden auf der Rückseite des Profils gesammelt.

[0054] Es ist nicht beabsichtigt, daß diese Erläuterungen des Fraktionssammelsystems erschöpfend ist, da es möglich ist, die vorliegende Erfindung mit anderen Arten von Fraktionssammelsystemen zu verknüpfen. Es kann irgendeine Art von Fraktionssammelsystem, das bei der präperativen Chromatographie verwendet wird, verwendet werden.

[0055] **Fig. 15** zeigt eine Methode des Injizierens einer Probe unter Verwendung der Pumpe **2**. Unter Verwendung des 3-Wegenventils können entweder das Lösungsmittel A oder die Probenlösung durch die Pumpe **2** gepumpt werden. Ein weiteres 3-Wegeventil ist nötig, um die Auslaßleitung der Pumpe **2** entweder mit Lösungsmittel A oder mit der Probe zu spülen. Da während einer Spülung Probe verloren gehen kann, besteht eine bevorzugte Methode darin, eine getrennte Injektionspumpe zu verwenden, wie in den **Fig. 1 und 2** gezeigt.

[0056] **Fig. 16** zeigt eine Methode zum Injizieren einer Probe durch Verwendung eines 6-Wegeventils und einer kalibrierten Schleife. Diese Injektionsmethode ist nicht so flexible wie in den **Fig. 1 und 2** gezeigt, insbesondere während der Methodenentwicklung.

[0057] Es ist nicht beabsichtigt, daß diese Erläuterungen des Probeninjektionssystems erschöpfend sind, da bei der vorliegenden Erfindung andere automatische Injektionssysteme möglich sind.

[0058] Ohne weitere Erarbeitung wird angenommen, daß der Fachmann unter Verwendung der vorangehenden Beschreibung die vorliegende Erfindung in ihrem vollen Ausmaß nutzen kann. Die nachfolgenden bevorzugten, speziellen Ausführungsformen sind daher bloß als veranschaulichend anzusehen und keinesfalls auf irgendeine Weise einschränkend für den Rest der Offenbarung.

[0059] In den vorangehenden und folgenden Beispielen sind alle Temperaturen unkorrigiert in °C angegeben, und, falls nicht anders angezeigt, beziehen sich alle Teile und Prozente auf Gewicht.

[0060] Die gesamte Offenbarung aller Anmeldungen, Patente und Publikationen, die oben und unten zitiert werden, werden hiermit durch Bezugnahme eingeschlossen.

[0061] In den Beispielen waren die Pumpe **1** und die Pumpe **2** die präperativen HPLC-Pumpen ST 140 von EM Separations Technology. Die Fließrate der Pumpe **1** wurde mit der Software festgelegt, und die Fließrate der Pumpe **2** wurde mit dem Daumenrad vorne an der Pumpe manuell eingestellt. Die Injektionspumpe war die Dosierpumpe Eldex Modell B-100-S-4. Die Fließrate für diese Pumpe wurde manuell mit einem Mikrometer eingestellt. Die Steuerung der Pumpe **1**, der Pumpe **2** und der Eldex-Pumpe wurde über eine Opto 22-Schnittstelle über die Software bewerkstelligt.

[0062] Die zwei 4-Wegeventile, das 6-Wege-Sequenzventil und ihre Luft-angetriebenen Stellantriebe wurden von Rheodyne erhalten. Die zwei 3-Wegeventile wurden von Mace erhalten. Alle Ventile wurden mit Luft in Gang gesetzt und wurden über die Opto 22-Schnittstelle über die Software gesteuert.

[0063] Der Detektor wurde von Knauer erhalten. Es war ein UV HPLC-Detektor mit variabler Wellenlänge, der mit einer Hochdruck-Fließzelle ausgestattet war.

[0064] Die geschützte TurboPrep[®]-Software von EM Separations Technology wurde zum Steuern aller Pumpen und Ventile verwendet. Die Software lief auf einem 486-Computer der Dell Computer Corporation.

[0065] Der Computer wurde mittels einer Schnittstelle von Opto **22** mit dem System verbunden.

[0066] In allen Beispielen wurden die nachfolgenden Bedingungen verwendet. Die zwei Säulen waren ringförmige Expansionssäulen von EM Separations Technology. Die Ausmaße der Säulen waren: 50 mm Durchmesser × 200 mm Länge. Jede Säule wurde mit ungefähr 244 g von RP Select B, Teilchengröße 12 µm, gepackt. RP Select B ist eine C8-Oktanphase, die an Siliziumdioxid gebunden ist, und ist ein Produkt von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.

[0067] Die mobile Phase war Methanol-Wasser 80 : 20. Sowohl das Methanol als auch das Wasser waren vom HPLC-Grad und wurden von EM Science erhalten. Die nominale Fließrate für die Pumpe **1** betrug 70 ml/min. Die nominale Fließrate für Pumpe **2**, falls verwendet, betrug 65 ml/min.

[0068] Die der Trennung unterworfenen Mischung war eine Lösung von Methyl- und Propyl-p-hydroxybenzoa-

ten. Die Methyl- und Propyl-phydroxybenzoate wurden von Aldrich erhalten. Die Probenlösung wurde hergestellt durch Auflösen von 30 mg/ml von sowohl Methyl- als auch Propyl-p-hydroxybenzoat in Methanol : Wasser 80 : 20. Das Methyl-p-hydroxybenzoat wird weniger zurückgehalten. und zuerst eluiert; das Propyl-p-hydroxybenzoat wird als zweites eluiert.

[0069] Die Fließrate der Eldex-Injektionspumpe wurde auf 20 ml/min eingestellt. Jede Injektion lief für 1,0 Minute ab, was ein Injektionsvolumen von 20 ml ergab. Somit wurden jedes Mal 600 mg von jeweils Methyl- und Propyl-p-hydroxybenzoat injiziert.

Beispiel 1

[0070] Die in **Fig. 2** gezeigte Vorrichtung wurde in diesem Beispiel verwendet.

[0071] In diesem Beispiel wurde die Pumpe **1** während der Injektion abgeschaltet, um eine maximale Trennung zu erhalten. Um auch den Durchsatz zu erhöhen, wurde die Pumpe **2** während des Sammelns der Fraktion **2** und dem darauffolgenden Abfallschritt angeschaltet.

[0072] **Fig. 3** zeigt ein Chromatogramm, welches alle Stufen des Prozesses veranschaulicht. Das Ende der ersten 20 ml-Injektion trat bei 0 Minuten auf. Die zweite Injektion begann bei etwa 5,8 Minuten; anschließende Injektionen traten danach bei 6,95-Minutenintervallen auf. Der flache Teil in der Mitte der Profile beruht auf dem Abschalten der Pumpe **1** während der Injektion: der Strom durch den Detektor nahm ab, was zu einem konstanten Signal vom Detektor führte.

[0073] Das Verringern der Dauer zum Injizieren derselben Probenmenge würde den Durchsatz erhöhen. Die könnte durch Erhöhen der Fließrate der Injektionspumpe und/oder Erhöhung der Konzentration der Probenlösung erfolgen. Wenn das Zeitintervall genug reduziert werden könnte, könnte Pumpe **1** während der Injektion angelassen werden, wodurch der Durchsatz maximiert würde.

[0074] In **Fig. 3** wurde Methyl-p-hydroxybenzoat vom vorderen Teil von jedem Profil gesammelt, und Propyl-p-hydroxybenzoat wurde vom hinteren Teil gesammelt. Beim dritten Zyklus wurde der Gleichgewichtszustand erreicht: vom Zyklus **3** bis zum Zyklus **7** wurden jeweils 600 mg von Methyl- und Propyl-p-hydroxybenzoat pro Zyklus injiziert und gesammelt. Während des Zyklus **8** wurde keine Probe injiziert oder gesammelt. Beim Zyklus **9** wurde eine Grundlinientrennung erhalten, was die Sammlung von jeder Komponente in reiner Form erlaubte.

[0075] Somit gibt es beim veranschaulichten Prozeß drei Stufen.

1. Frühe Zyklen, bei denen das System sich zum Gleichgewichtszustand entwickelte. Während dieser Zyklen wird jedes Mal dieselbe Menge an Probe injiziert (in diesem Fall 600 mg von jeweils Methyl- und Propyl-p-hydroxybenzoat). Jedoch werden unterschiedliche Mengen von jedem Produkt gesammelt.
2. Gleichgewichtszustand. Die Profile von jedem Zyklus des Gleichgewichtszustands sind identisch, da dieselbe Menge an Material injiziert und gesammelt wird. Die Position von jedem Vorgang im Verhältnis zum Profil ist in jedem Zyklus die gleiche. Das System kann unter den Gleichgewichtszustandsbedingungen unendlich laufen.
3. Abschließende Zyklen. Die Injektion entfällt und das im System noch zurückgebliebene Produkt wird wie bei der gewöhnlichen präoperativen HPLC gesammelt.

[0076] **Fig. 4** zeigt den Zyklus **6** detaillierter, in dem der Gleichgewichtszustand erzielt worden ist.

- Die 4-Wegeventile wurden bei 38,30 Minuten umgeschaltet, um den Chromatographiestrom von der Säule **1** zur Säule **2** zu richten.
- Bei 38, 40 Minuten wurde das 6-Wegenventil auf Position **2** gedreht, wodurch der Strom in Erwartung des sich nähernden Profils zum Abfall gelenkt wurde.
- Bei 39, 33 Minuten, wo die Software eine ansteigende Neigung von 10% des maximalen Detektorsignals pro Sekunde detektierte, wurde das 6-Wegenventil auf Position **2** gedreht, wodurch Fraktion **1** (Methyl-p-hydroxybenzoat) gesammelt wurde.
- Bei 40, 15 Minuten wurde das 6-Wegenventil auf Position **4** gedreht, wodurch das Sammeln der Fraktion **1** beendet und das vordere Teil des Profils auf die Säule **1** geschickt wurde. Das 3-Wege-Recykelventil wurde so gesetzt, daß die mobile Phase zum Einlaß der Pumpe **1** recykelt wurde.
- Bei 40, 55 Minuten wurde die Injektionspumpe angeschaltet, und die Pumpe **1** wurde abgeschaltet.
- Bei 41, 55 Minuten wurde die Injektionspumpe ausgeschaltet, und die Pumpe **1** wurde angeschaltet.
- Bei 41, 85 Minuten wurde das 6-Wegeventil auf Position **5** gedreht, was die Fraktion **2** (Propyl-p-hydroxybenzoat) sammelte; Pumpe **2** wurde angeschaltet, was den Stillstand des Profils verhinderte.
- Bei 43, 30 Minuten wurde das 6-Wegeventil auf Position **6** gedreht, was den Strom zum Abfall lenkte. Pumpe **2** blieb an.
- Bei 45, 20 Minuten wurde das 6-Wegeventil auf Position **1** gedreht, und die Pumpe **2** wurde ausgeschaltet.
- Bei 45, 25 Minuten wurde das 4-Wegeventil umgeschaltet, um den Chromatographiestrom von der Säule **2** auf Säule **1** zu lenken, wodurch Zyklus **7** begann.

[0077] Die Zykluszeit für die Trennung betrug 6,95 Minuten, wie durch Vergleich der 4-Wege-Umschaltzeiten der Zyklen **6** und **7** verifiziert werden kann: 45,25 min – 38,30 min = 6,95 min. Ein ähnlicher Vergleich zwischen den Zyklen aller anderer Vorgänge ergibt ebenfalls eine Zykluszeit von 6,95 min. Die Zykluszeit ist zuvor bestimmt worden und wurde, beginnend im Zyklus **2**, als gesteuerter Vorgang allen Vorgängen auferlegt. Somit wurde der Gleichgewichtszustand schnell beim dritten Zyklus erreicht.

[0078] Die Fraktionen **1** (Methyl-p-hydroxybenzoat) und **2** (Propyl-p-hydroxybenzoat) wurden unter Verwendung einer Hitachi L-6000-Pumpe mittels analytischer HPLC analysiert. Die mobile Phase war Methanol : Wasser 60 : 40, und die Fließrate betrug 2,0 ml/min. Die Säule mit Dimensionen von 4 mm ID × 125 mm wurde mit Merck LiChrospher RP18 (12 µm Teilchengröße) gepackt. Ein Rheodyne-6-Wegeventil (Modell 700L), das mit einer 20 µl-Schleife ausgestattet war, wurde als Injektionsventil verwendet. Der Detektor war ein Detektor mit variabler UV-Wellenlänge von Knauer. Die Wellenlänge wurde zur Analyse der Fraktion auf 280 nm eingestellt; für die Analyse von Fraktion **2** auf 275 nm.

[0079] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Fraktion **1** war bezüglich Methyl-p-hydroxybenzoat mit 99,9 Flächenprozent sehr rein. Die Fraktion **2** ist bezüglich Propyl-p-hydroxybenzoat mit 98,7 Flächenprozent etwas weniger rein. Wenn für Fraktion **2** eine höhere Reinheit erforderlich war, konnte bei jedem Zyklus weniger Propyl- und Methyl-p-hydroxybenzoat gesammelt werden mit einer entsprechend geringeren Injektion der Probe. Wie immer bei der Chromatographie besteht ein Kompromiß zwischen Reinheit und Durchsatz.

Tabelle 1

Reinheit der Fraktionen, ausgedrückt als Flächenprozent			
Fraktion	Methyl-p-hydroxybenzoat	Propyl-p-hydroxybenzoat	Andere
1	99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %
2	1,3 %	98,7 %	< 0,1 %

Beispiel 2

[0080] Die in **Fig. 2** gezeigte Vorrichtung wurde in diesem Beispiel verwendet.

[0081] In diesem Beispiel wurde die Pumpe **1** während der Injektion abgeschaltet, um eine maximale Trennung zu erhalten. Die Pumpe **2** wurde jedoch während des Sammelns der Fraktion **2** und dem anschließenden Abfallschritt nicht angeschaltet. Dieses Beispiel zeigt, daß die Trennung mit nur einer Mobilphasenpumpe (Pumpe **1**) durchgeführt werden kann, jedoch auf Kosten einer längeren Zykluszeit und einem geringeren Durchsatz.

[0082] **Fig. 5** zeigt ein Chromatogramm, das dieses Beispiel veranschaulicht. Wie bei Beispiel **1** trat das Ende der ersten 20 ml-Injektion bei 0 Minuten auf, und die zweite Injektion begann etwa 5,8 Minuten. Vom Zyklus **2** an wurden auf irgendwelche Vorgänge keine speziellen Zeiten auferlegt, mit Ausnahme des Umschaltens der 4-Wegeventile und der Drehung des 6-Wegenventils auf Position **2**. Diese beiden Vorgänge traten alle 10,1 Minuten auf, beginnend mit dem zweiten Zyklus.

[0083] Die anderen Vorgänge, beginnend mit dem zweiten Zyklus, wurden durch die Detektion des anfänglichen Anstiegs in der Steigung des Profils getriggert. Wenn eine ansteigende Steigung von 10% des maximalen Detektorsignals pro Sekunde durch die Software detektiert wurde, wurde das 6-Wegenventil auf Position **3** gedreht, wodurch Fraktion **1** (Methyl-p-hydroxybenzoat) gesammelt wurde. Dieser Vorgang wird als Triggervorgang bezeichnet. Die anderen Vorgänge treten im Vergleich zueinander bei exakten Zeitintervallen auf, treten jedoch nicht bei irgendwelchen vorbestimmten Zeiten auf. Ihre Absolutzeiten des Auftretens hängen vom Zeitpunkt des Triggervorgangs ab. Die korrekten Intervalle zwischen diesen Vorgängen wurden zuvor experimentell bestimmt.

- Bei 0,8 min nach dem Triggervorgang wurde das 6-Wegeventil auf Position **4** gedreht, wodurch das Sammeln der Fraktion **1** beendet und der nicht gesammelte Teil des Profils zur Säule **1** geschickt wurde. Das 3-Wege-Recykventil wurde zum Recykeln der mobilen Phase zum Einlaß der Pumpe **1** gestellt.
- Bei 1,2 min nach dem Triggervorgang wurde die Injektionspumpe angeschaltet, und die Pumpe **1** wurde ausgeschaltet.
- Bei 2,2 min nach dem Triggervorgang wurde die Injektionspumpe ausgeschaltet, und Pumpe **1** wurde angeschaltet.
- Bei 2,5 min nach dem Triggervorgang wurde das 6-Wegeventil auf Position **5** gedreht, wodurch Fraktion **2** (Propyl-p-hydroxybenzoat) gesammelt wurde; Pumpe **2** wurde nicht angeschaltet.
- Bei 3,95 min nach dem Triggervorgang wurde das 6-Wegeventil auf Position **6** gedreht, wodurch der

Strom zum Abfall gelenkt wurde. Pumpe 2 wurde nicht angeschaltet.

– Bei 5,85 min nach dem Triggervorgang wurde das 6-Wegeventil auf Position 1 gedreht.

[0084] Wie bei Beispiel 1 beruht der flache Teil im Zentrum der Profile auf dem Ausschalten der Pumpe 1 während der Injektion: der Strom durch den Detektor fiel ab, was zu einem konstanten Signal vom Detektor führte. Es scheint, daß mit dem fünften Zyklus ein Gleichgewichtszustand erreicht worden war. Im Zyklus 8 wurde keine Probe injiziert oder gesammelt, was wie im Beispiel 1 das Sammeln von jeder Komponente in reiner Form im Zyklus 9 (nicht gezeigt) gestattete.

[0085] Da den oben zusammengefaßten Vorgängen keine spezielle Zeiten auferlegt wurden, erreichte das System einen Gleichgewichtszustand im Zyklus 5 – zwei Zyklen mehr, als es im Beispiel 1 erforderlich war. Tabelle 2 zeigt die Zeitintervalle zwischen den gleichen Vorgängen in aufeinanderfolgenden Zyklen. Es sei angemerkt, daß, beginnend mit dem Zyklus 4, sich diese Zeitintervalle mit etwa 10,07 Minuten glichen. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß die wahre Zykluszeit in der Nähe von 10,07 Minuten liegt. Somit ist diese Prozedur (was das Triggern von korrekt beabstandeten Vorgängen durch die Detektion des Beginns des Profils gestattet) nützlich zum Bestimmen der Zykluszeit während der Methodenentwicklung.

Tabelle 2

	Zeitintervalle zwischen Vorgängen von Zyklus zu Zyklus, Minuten					
Vorgang	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4	Zyklus 5	Zyklus 6	Zyklus 7
6-Wege-ventil Position 3	8,80	9,94	10,06	10,07	10,07	10,06
6-Wege-ventil Position 4	9,33	9,94	10,06	10,07	10,07	10,06
Injektionspumpe An	9,13	9,94	10,06	10,07	10,07	10,06
Injektionspumpe Aus	9,13	10,06	10,07	10,07	10,07	10,06
6-Wege-ventil Position 5	9,00	10,00	10,07	10,00	10,06	10,07
6-Wege-ventil Position 6	9,14	10,00	10,00	10,06	10,07	10,07
6-Wege-ventil Position 1	9,60	10,00	10,07	10,00	10,13	10,07

Beispiel 3

[0086] Die in Fig. 2 gezeigte Vorrichtung wurde in diesem Beispiel verwendet.

[0087] In diesem Beispiel wird die Pumpe 1 während der Injektion nicht abgeschaltet. Dieses Beispiel ist ein Extremfall insofern, als das Zeitintervall, während dem die Injektionspumpe angeschaltet ist, einen beträchtlichen Teil des gesamten Profils ausmacht. Somit ist die Auflösung der Komponentenverbindungen geringer als in den Beispielen 1 und 2. Um einen Gleichgewichtszustand aufrecht zu erhalten, ist die Reinheit der beiden Fraktionen geringer als in den Beispielen 1 und 2.

[0088] Die Zeit, die zur Injektion derselben Menge (in diesem Fall 600 mg jeweils von Methyl- und Propyl-p-hydroxybenzoat) erforderlich ist, kann durch Erhöhen der Fließrate der Injektionspumpe und/oder durch Erhöhen der Konzentration der Probenlösung reduziert werden. Eines von beidem oder eine Kombination davon würde die Reinheit der Fraktionen verbessern, ohne den Durchsatz zu verringern. Die Trennung könnte natürlich auch verbessert werden durch Injizieren von weniger Probe bei derselben Injektionspumpenfließrate. Dies würde jedoch zu einem verringerten Durchsatz führen.

[0089] Fig. 6 zeigt ein Teilchromatogramm dieses Beispiels, und Fig. 7 zeigt Zyklus 3 detaillierter. Es ist zu beachten, daß, weil die Pumpe 1 niemals abgeschaltet wird, es im Zentrum der Profile keinen flachen Bereich gibt wie in den Beispielen 1 und 2. Es ist jedoch offensichtlich, daß mit Beginn des Zyklus 2 die Auflösung schlechter ist als in den Beispielen 1 und 2. Die Auflösung könnte durch Verwendung von irgendwelchen oben

diskutierten Techniken verbessert werden.

[0090] Auch in diesem Beispiel wird die Pumpe **2** während des Sammelns der Fraktion **2** und während des anschließenden Abfallschritts nicht angeschaltet. Der Durchsatz könnte durch Verwendung der Pumpe **2** wie im nächsten Beispiel gezeigt beträchtlich verbessert werden.

Beispiel 4

[0091] In diesem Beispiel wird, wie in Beispiel **3**, die Pumpe **1** während der Injektion nicht abgeschaltet. Pumpe **2** wird jedoch während des Sammelns der Fraktion **2** und des anschließenden Abfallschritts angeschaltet.

[0092] Die ersten drei Zyklen sind in **Fig. 8** gezeigt. Ihre Profile sind quasi identisch zu denen des Beispiels **3**, außer daß sie näher beieinander liegen. Die Pumpe **2** verhinderte durch Anschalten während des Sammelns der Fraktion **2** und des anschließenden Abfallschritts den Stillstand des Profils.

Beispiel 5

[0093] **Fig. 9** zeigt ein schematisches Diagramm des in diesem Beispiel verwendeten Systems.

[0094] Das 6-Wege-Sequenzventil von **Fig. 2** wurde durch das 4-Wegeventil #3 ersetzt, welches zu einem Array von Fraktionssammelventilen führte. Durch diesen Aufbau kann irgendein Sammelventil in irgendeiner Ordnung ausgewählt werden. Es ist deshalb flexibler als der in **Fig. 2** gezeigte Aufbau, wo man gezwungen ist, Sammelleitungen in einer speziellen Reihenfolge zu wählen. In seiner Standardposition umgeht das 4-Wegeventil #3 das Sammelventil-Array und kommuniziert direkt mit dem 4-Wegeventil #1.

[0095] In **Fig. 9** ist zu beachten, daß das 4-Wegeventil #3 die Pumpe **2** mit dem System verbindet. Während des Sammelns von Fraktionen, das nach dem Probeninjektionsschritt abläuft, kann die Pumpe **2** angeschaltet werden, um den Stillstand des Chromatographieprofils zu verhindern. Wenn das 4-Wegeventil #3 auf die Standardposition zurückgeschaltet wurde, kann die Pumpe **2** angeschaltet werden, um die Probe aus der gemeinsamen, zum Fraktionssammeln-Array führenden Leitung zu waschen, wodurch die Kontamination von Fraktionen verhindert wird.

[0096] **Fig. 10** zeigt ein Chromatogramm, welches die Verwendung dieses Aufbaus beim Trennungsprozeß veranschaulicht. Es sei beachtet, daß es sehr ähnlich zur **Fig. 3** ist, dem Chromatogramm für Beispiel **1**. Das ist zu erwarten, da der Trennprozeß der gleiche ist: wir verwenden lediglich eine andere Methode zum Sammeln der Fraktionen in diesem Beispiel 5. Wie bei Beispiel **1** betrug die Zyklusdauer für das vorliegende Beispiel 6, 95 Minuten.

[0097] **Fig. 11** zeigt detaillierter Zyklus **4**, bei dem der Gleichgewichtszustand erreicht worden ist.

- Bei 24,35 Minuten wurde das 4-Wegeventil #3 umgeschaltet, wodurch der Strom zur Säule **2** gelenkt wurde. Pumpe **2** blieb an, um die gemeinsame Sammelleitung zu waschen.
- Bei 24,37 Minuten wurde die Pumpe **2** ausgeschaltet.
- Bei 24,40 Minuten wurden die 4-Wegeventile #1 und #2 umgeschaltet, um die Ausgabe von Pumpe **2** zur Säule **2** und die Ausgabe der Säule **2** zur Säule **1** zu lenken.
- Bei 24,50 Minuten wurde das 4-Wegeventil #3 umgeschaltet, um den Strom zum Abfall (dessen Ventil normalerweise offen ist) zu lenken, in Erwartung des Annäherns des Chromatographieprofils.
- Bei 25,47 Minuten, wo die Software eine ansteigende Steigung von 10% des maximalen Detektorsignals pro Sekunde detektierte, wurde das Sammelventil 1 zum Sammeln von 1 geöffnet.
- Bei 26,25 Minuten wurde das 4-Wegeventil #3 umgeschaltet, was das Sammeln der Fraktion **1** abschloß und den vorderen Teil des Profils auf die Säule **1** schickte. Das 3-Wege-Recykelventil wurde zum Recykeln der mobilen Phase zum Einlaß der Pumpe **1** gestellt.
- Bei 26,30 Minuten wurde das Abfallventil im 6-Ventil-Sammelarray geöffnet.
- Bei 26,40 Minuten wurde die Pumpe **2** angeschaltet, um die gemeinsame Fraktionssammelleitung zur Verhinderung von Kreuzkontamination zu waschen.
- Bei 26,60 Minuten wurde die Pumpe **2** ausgeschaltet.
- Bei 26,65 Minuten wurde die Injektionspumpe angeschaltet, und die Pumpe **1** wurde ausgeschaltet, und das Recykelventil wurde auf Abfall gestellt.
- Bei 27,65 Minuten wurde die Injektionspumpe ausgeschaltet, und Pumpe **1** wurde angeschaltet, und das Recykelventil wurde zum Recykeln der mobilen Phase zum Einlaß der Pumpe **1** gestellt.
- Bei 27,90 Minuten wurde das Sammelventil #2 in Erwartung der Sammelfraktion **2** geöffnet.
- Bei 27,95 Minuten wurde das 4-Wegeventil #3 umgeschaltet, was zum Sammeln der Fraktion **2** führte. Gleichzeitig wurde Pumpe **2** angeschaltet, was den Stillstand des Chromatographieprofils verhinderte.
- Bei 29,40 Minuten wurde das Abfallventil im 6-Ventil-Sammelarray geöffnet, was den Strom zum Abfall lenkte. Pumpe **2** blieb an.
- Bei 31,30 Minuten wurde das 4-Wegeventil #3 umgeschaltet, um den Strom zur Säule **1** zu lenken. Pumpe **2** blieb an, um die gemeinsame Sammelleitung zu waschen.

- Bei 31,32 Minuten wurde die Pumpe **2** ausgeschaltet.
- Bei 31,35 Minuten wurden die 4-Wegeventile #1. und #2 umgeschaltet, um die Ausgabe von Pumpe **1** zur Säule **1** und die Ausgabe von Säule **1** zur Säule **2** zu lenken.

[0098] Die Methode des Sammelns von Fraktionen im vorliegenden Beispiel erfordert mehr Schritte als die in Beispiel 1 verwendete. Zum Sammeln einer Fraktion muß das 4-Wegeventil #3 geöffnet sein, und die Sammelventile von Interesse müssen geöffnet sein. Auch muß die gemeinsame Sammelleitung zwischen den Fraktionen gewaschen werden, um eine Kreuzkontamination zu verhindern. Da die Sammelventile jedoch in irgendeiner Reihenfolge geöffnet werden können und da leicht weitere Sammelventile hinzugefügt werden können, ist die im vorliegenden Beispiel verwendete Fraktionssammelmethode flexibler als diejenige, die nur in den Beispielen **1–4** verwendet wurde.

[0099] Die vorangehenden Beispiele können mit ähnlichem Erfolg wiederholt werden, indem die allgemein oder speziell beschriebenen Reaktanden und/oder Betriebsbedingungen dieser Erfindung anstelle jener, die in den vorangehenden Beispielen verwendet wurden, treten.

[0100] Aus der vorangehenden Beschreibung kann der Fachmann leicht die wesentlichen Kennzeichen dieser Erfindung feststellen und kann, ohne vom Umfang abzuweichen, verschiedentliche Veränderungen und Modifikationen der Erfindung machen, um sie auf unterschiedliche Anwendungen und Bedingungen anzupassen.

Patentansprüche

1. Präparatives zyklisches Chromatographieverfahren, umfassend unter Fließgleichgewicht:

- (a) Bilden eines Achter-Ziffer-zirkulierenden Chromatographieprofils zwischen zwei Chromatographiesäulen, mit der Maßgabe, dass das Chromatographieprofil niemals durch eine Pumpe läuft;
- (b) diskontinuierliches und periodisches Injizieren einer Probe, die mindestens zwei Komponenten umfasst, in das zirkulierende Profil; und
- (c) diskontinuierliches und periodisches Sammeln von mindestens zwei angereicherten Fraktionen aus dem zirkulierenden Profil.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, ferner umfassend:

- (d) Pumpen von Lösungsmittel als einer mobilen Phase durch eine erste Lösungsmittelpumpe im Wesentlichen kontinuierlich in eine der Chromatographiesäulen während eines einzelnen Zyklusses.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, ferner umfassend das Pumpen von Lösungsmittel durch eine zweite Lösungsmittelpumpe in eine Säule, um den Stillstand des Chromatographieprofils während des Sammelns der Fraktionen zu verhindern, das später als das Injizieren der Probe in einen Zyklus vorkommt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2, ferner umfassend das Abschalten der ersten Lösungsmittelpumpe während des Injizierens der Probe.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3, ferner umfassend das Abschalten der ersten Lösungsmittelpumpe während des Injizierens der Probe.

6. Chromatographieverfahren gemäß Anspruch 2, ferner umfassend das periodische Beenden des Pumpens der mobilen Phase, während sofort ein Lösungsmittelpuls in eine der Säulen geschickt wird, um Fraktionen schneller zu eluieren, was in einem Zyklus später als das besagte Injizieren vorkommt, wobei der Puls des Lösungsmittels stärker ist als die mobile Phase des Lösungsmittels, und dann das Wiedereinsetzen des Pumpens der mobilen Phase durch die besagte Pumpe.

7. Chromatographieverfahren gemäß Anspruch 3, ferner umfassend das periodische Beenden des Pumpens der mobilen Phase, während sofort ein Lösungsmittelpuls in eine der Säulen geschickt wird, um Fraktionen schneller zu eluieren, was in einem Zyklus später als das Injizieren vorkommt, wobei der Puls des Lösungsmittels stärker ist als die mobile Phase des Lösungsmittels.

8. Chromatographieverfahren gemäß Anspruch 4, ferner umfassend das periodische Beenden des Pumpens der mobilen Phase, während sofort ein Lösungsmittelpuls in eine der Säulen geschickt wird, um Fraktionen schneller zu eluieren, was in einem Zyklus später als das Injizieren vorkommt, wobei der Puls des Lösungsmittels stärker ist als die mobile Phase des Lösungsmittels.

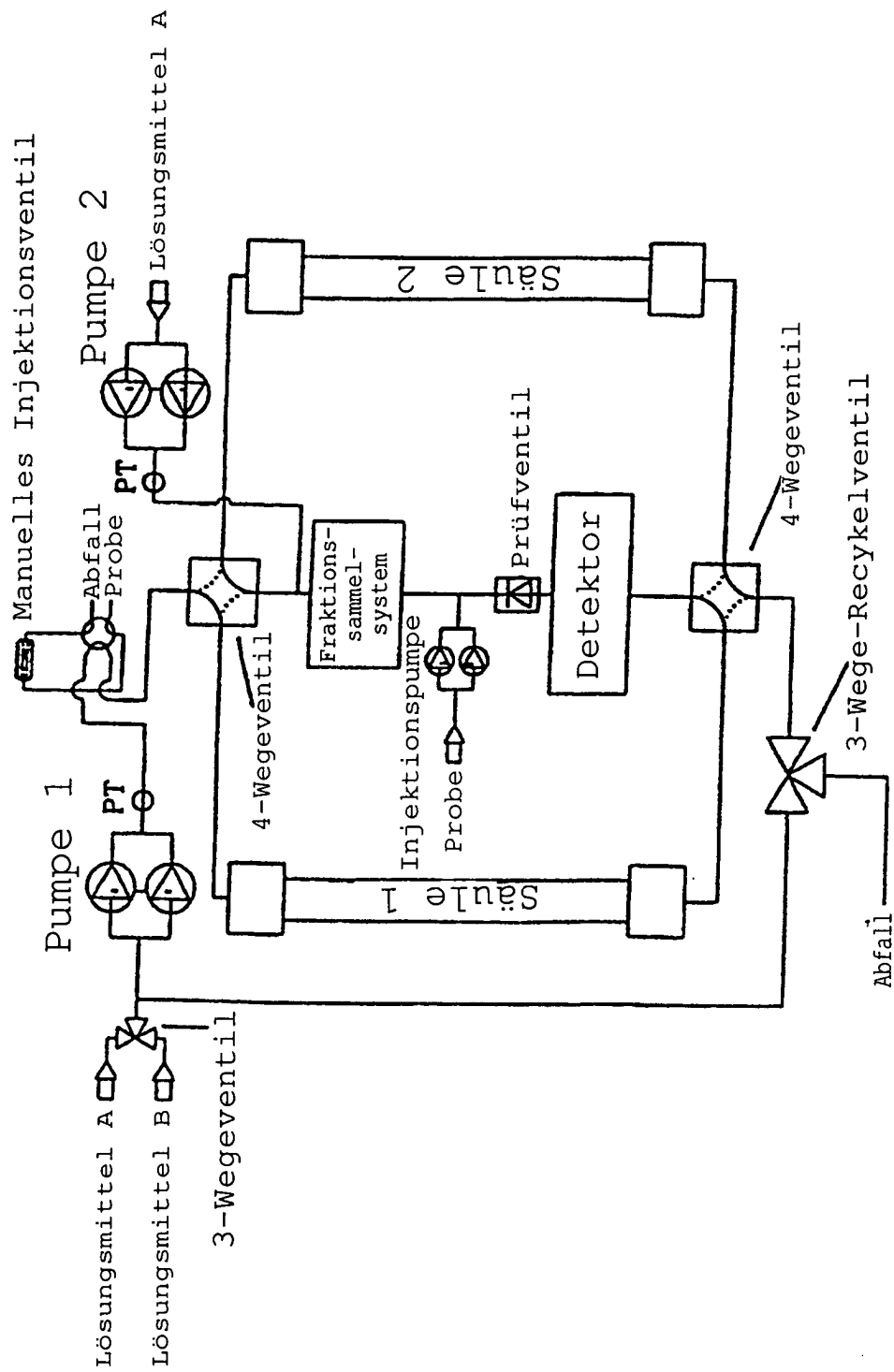
9. Chromatographieverfahren gemäß Anspruch 5, ferner umfassend das periodische Beenden des Pum-

pens der mobilen Phase, während sofort ein Lösungsmittelpuls in eine der Säulen geschickt wird, um Fraktionen schneller zu eluieren, was in einem Zyklus später als das Injizieren vorkommt, wobei der Puls des Lösungsmittels stärker ist als die mobile Phase des Lösungsmittels.

10. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Achter-Ziffer-Chromatographieprofil kontinuierlich zirkuliert.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

Fig. 1



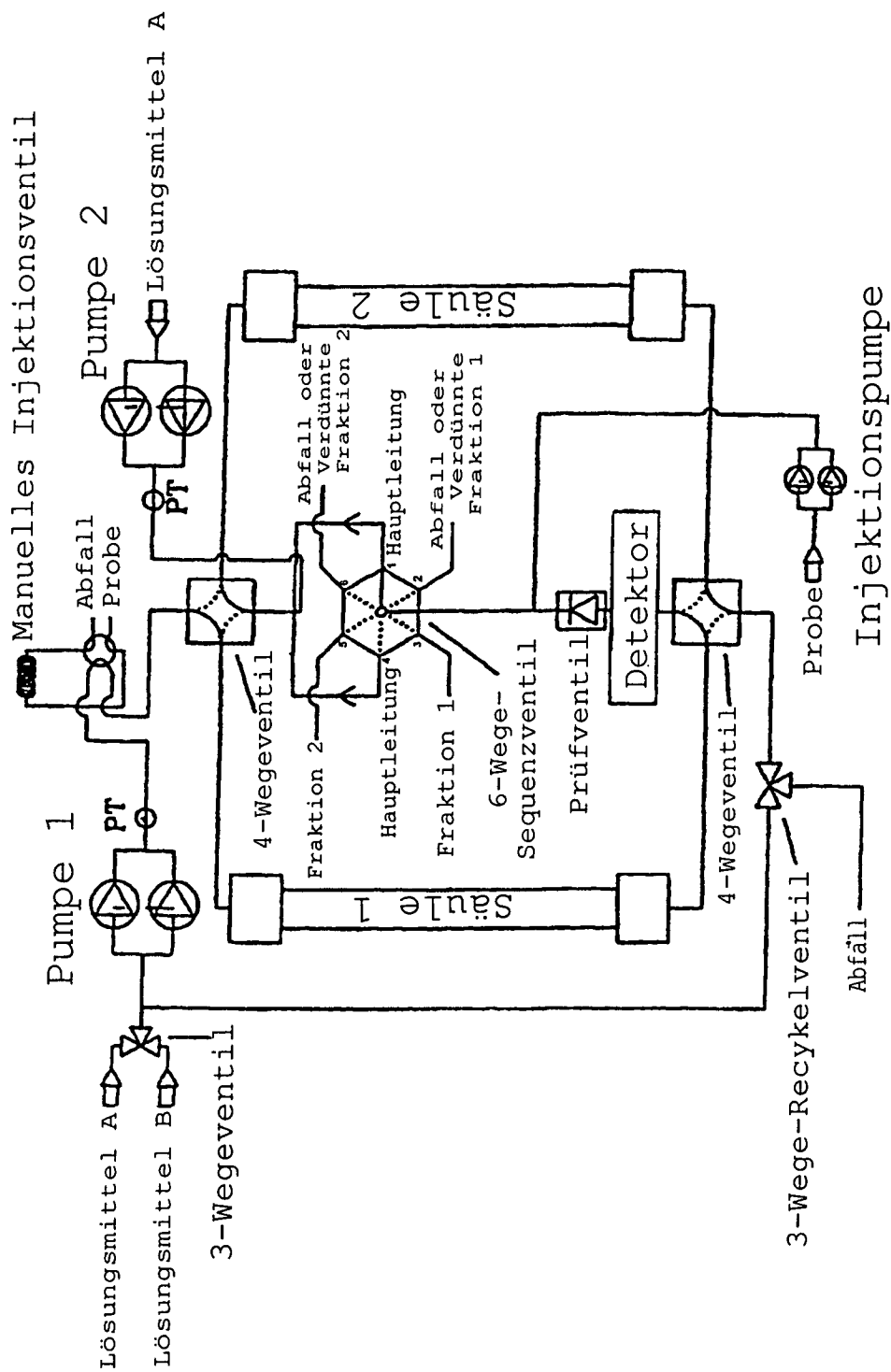
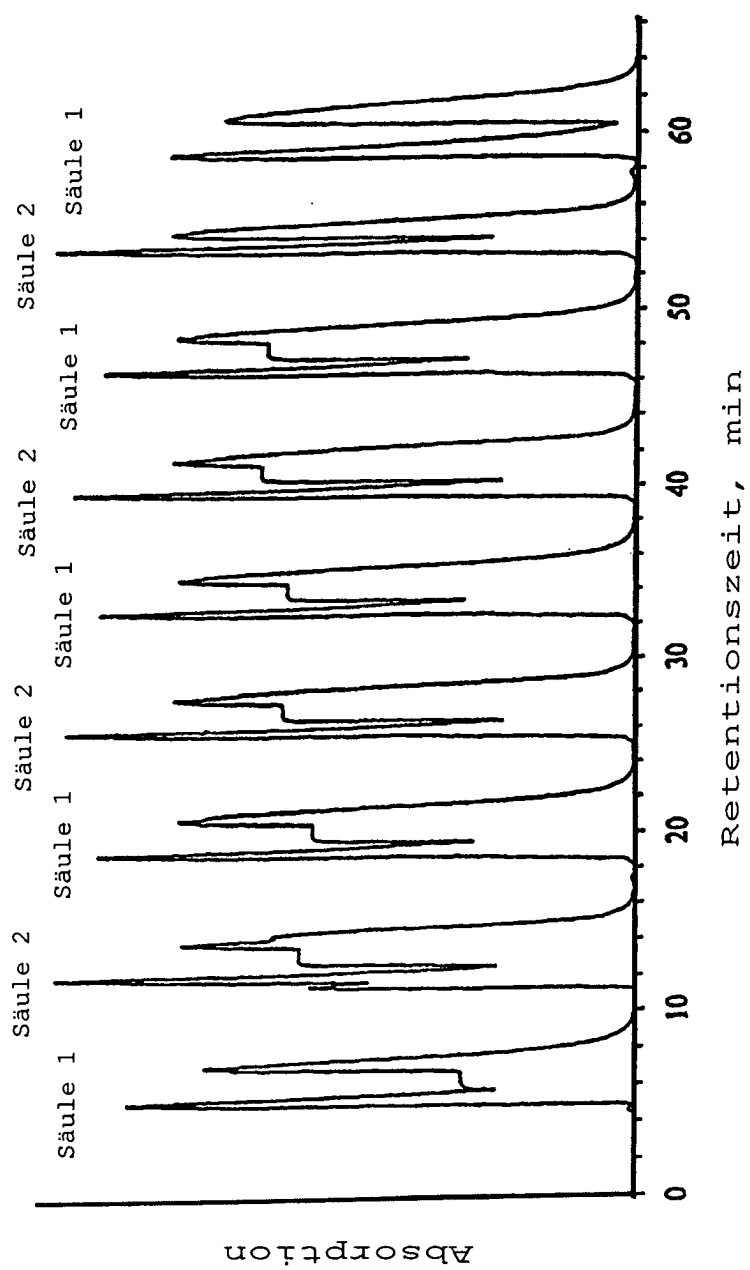


Fig. 2

Fig. 3



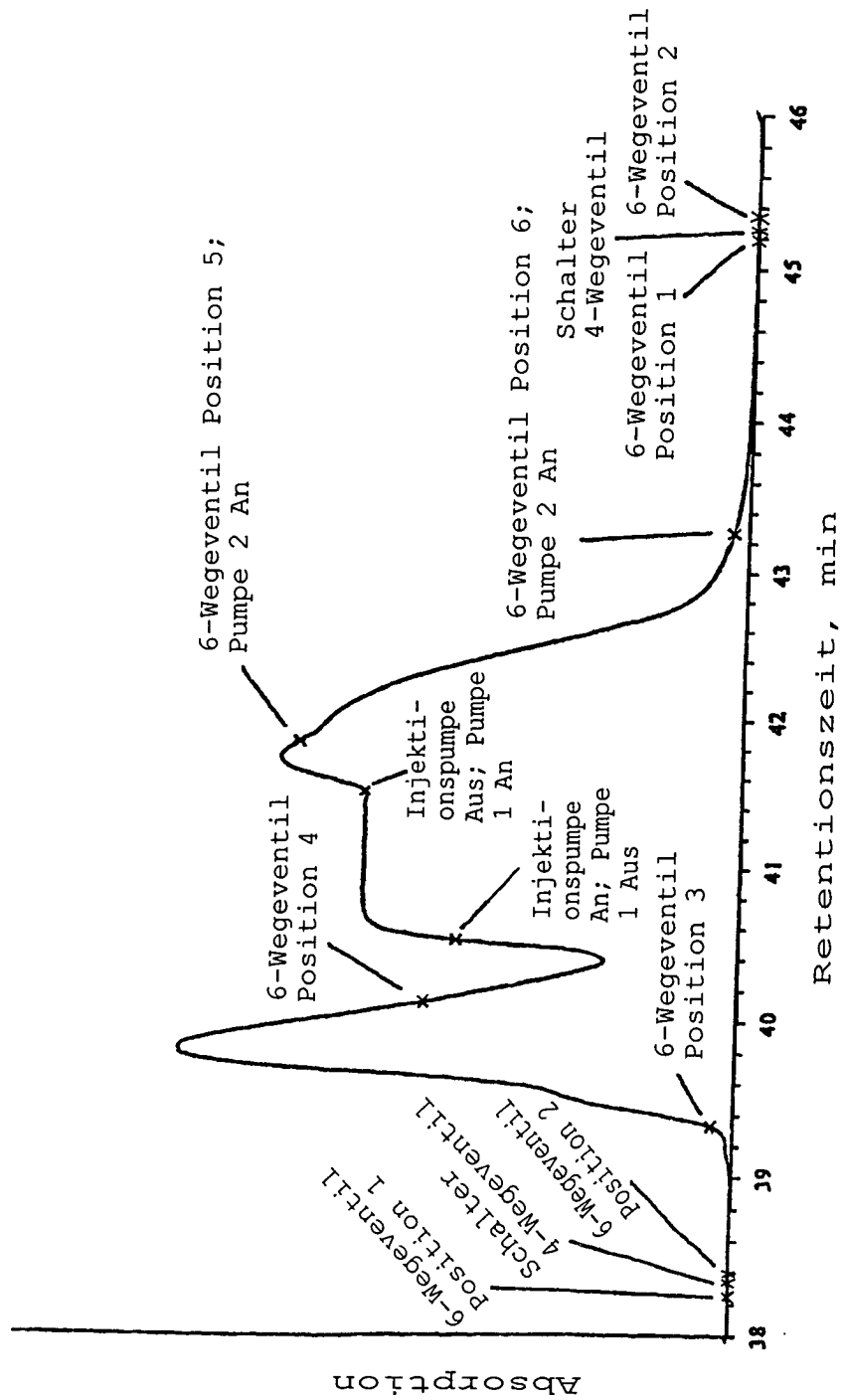


Fig. 4

Fig. 5

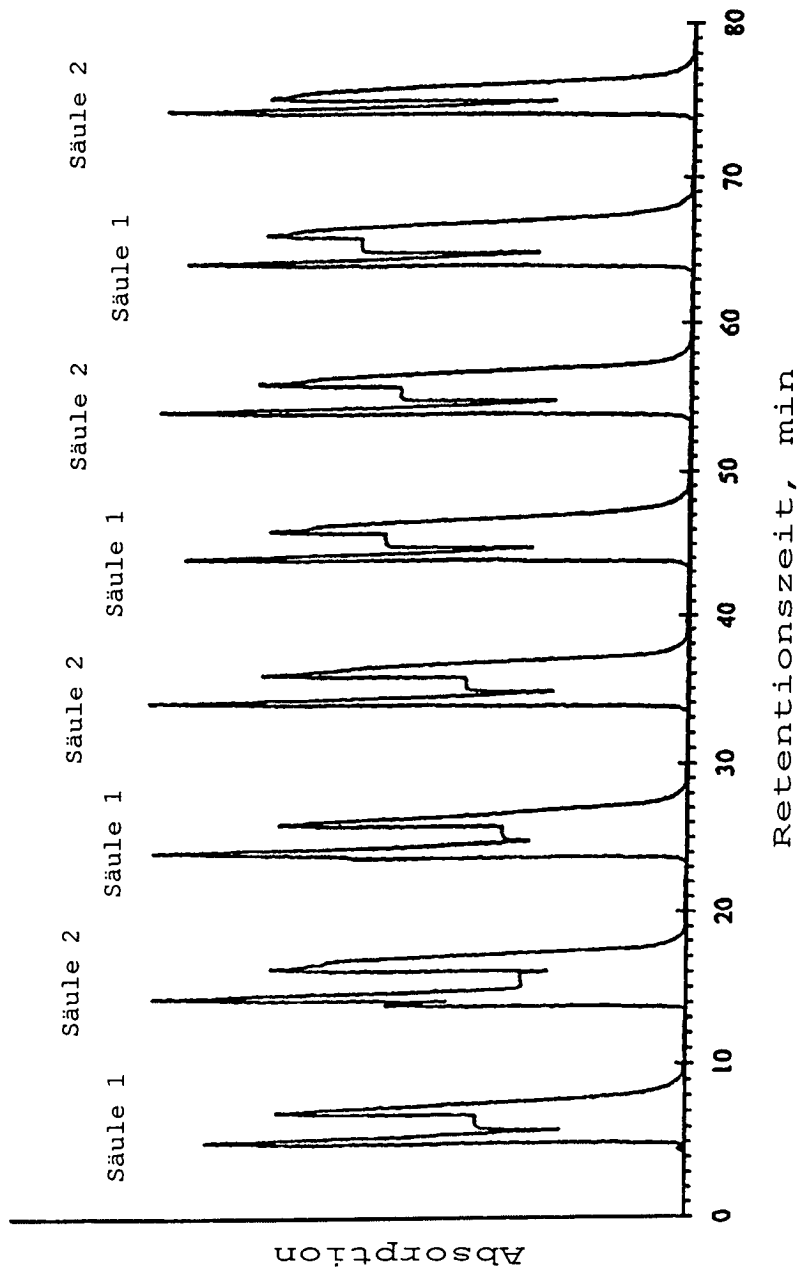


Fig. 6

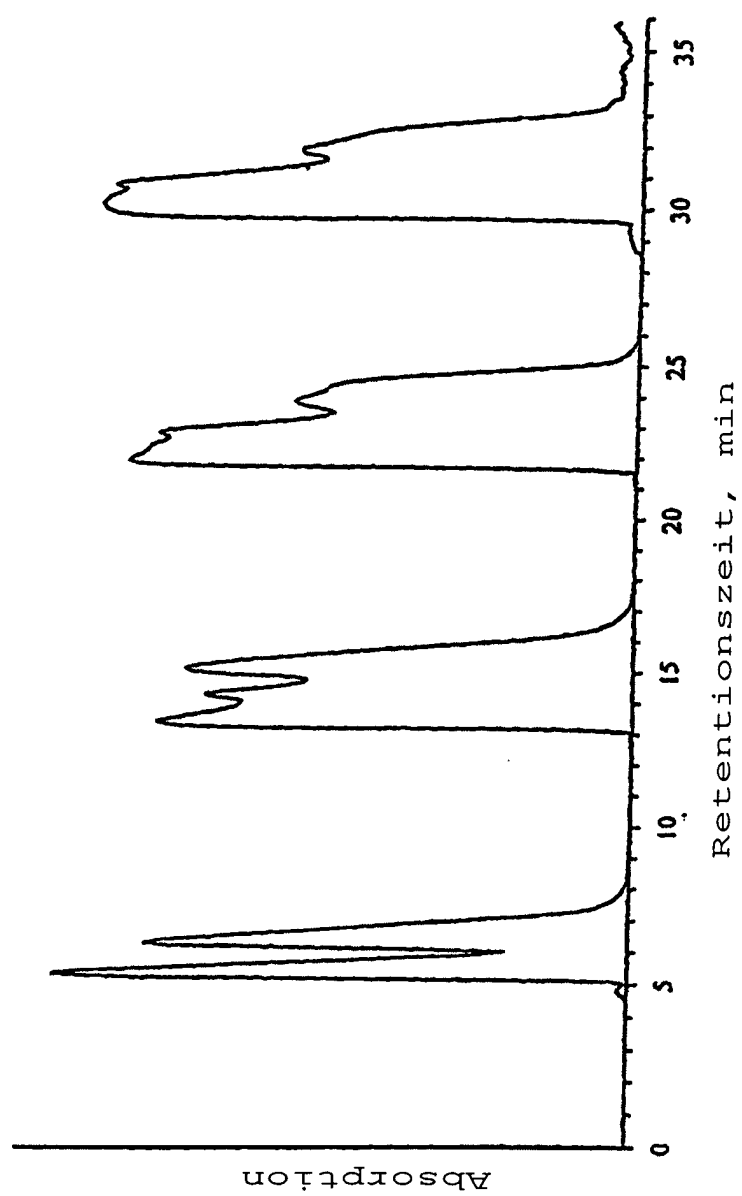


Fig. 7

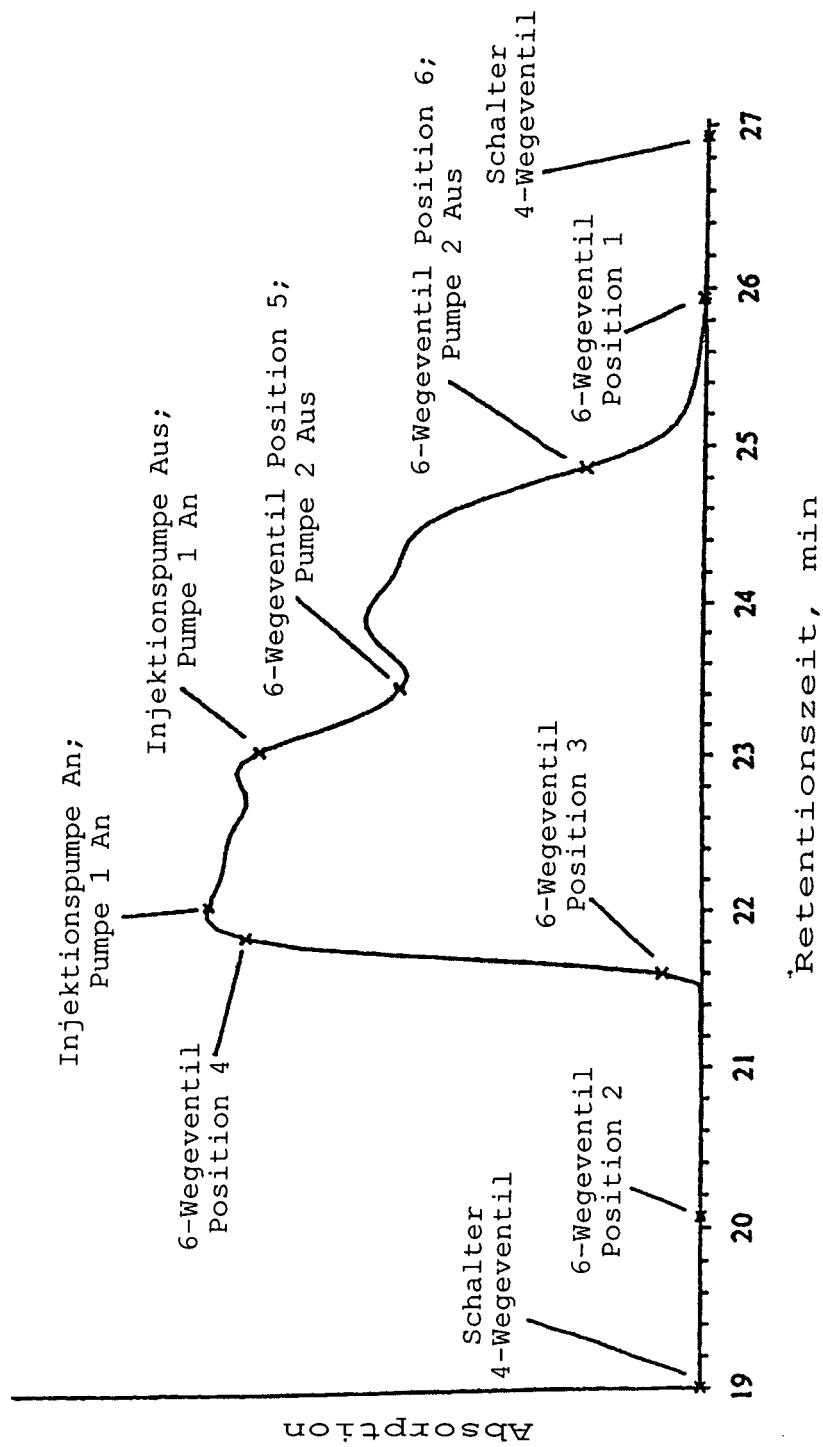


Fig. 8

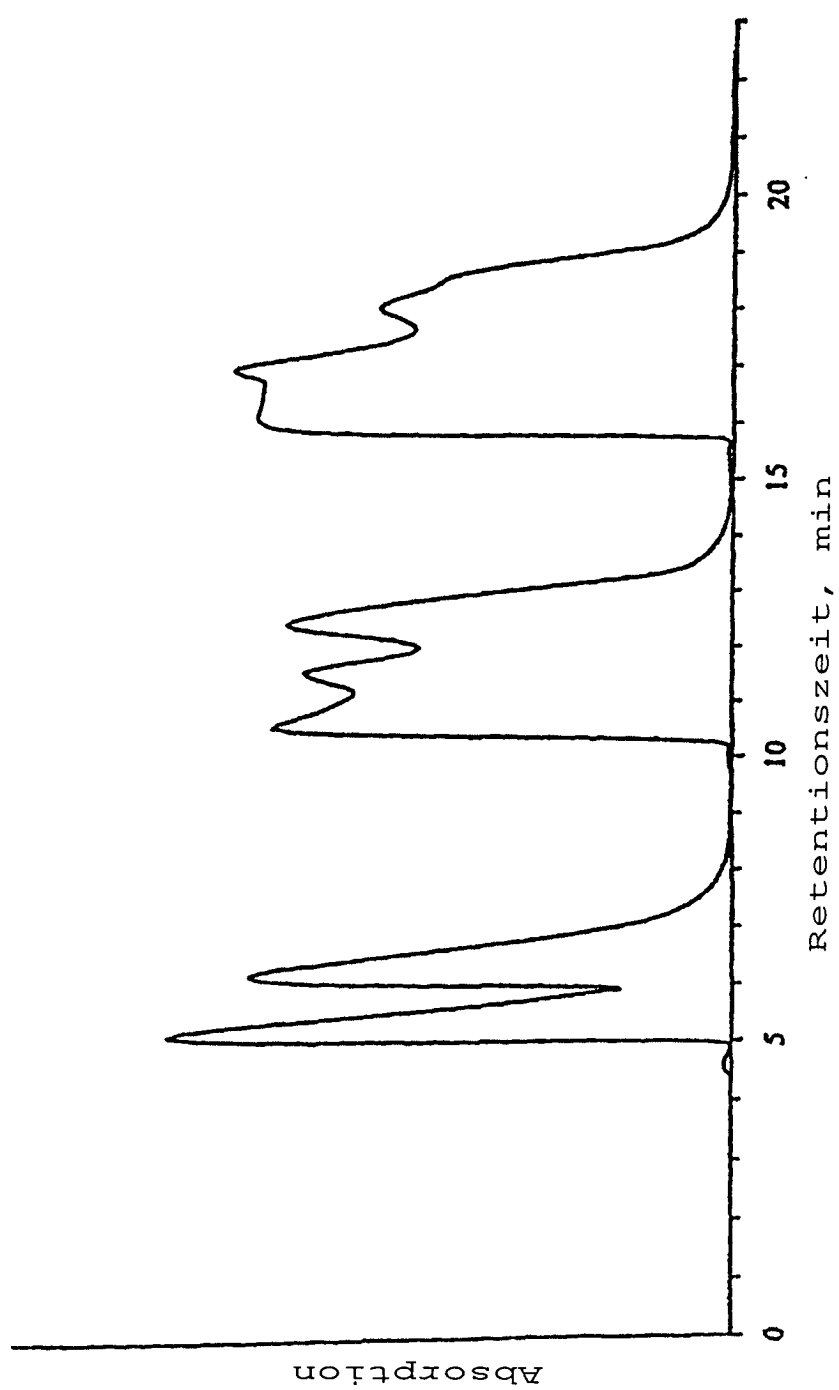


Fig. 9

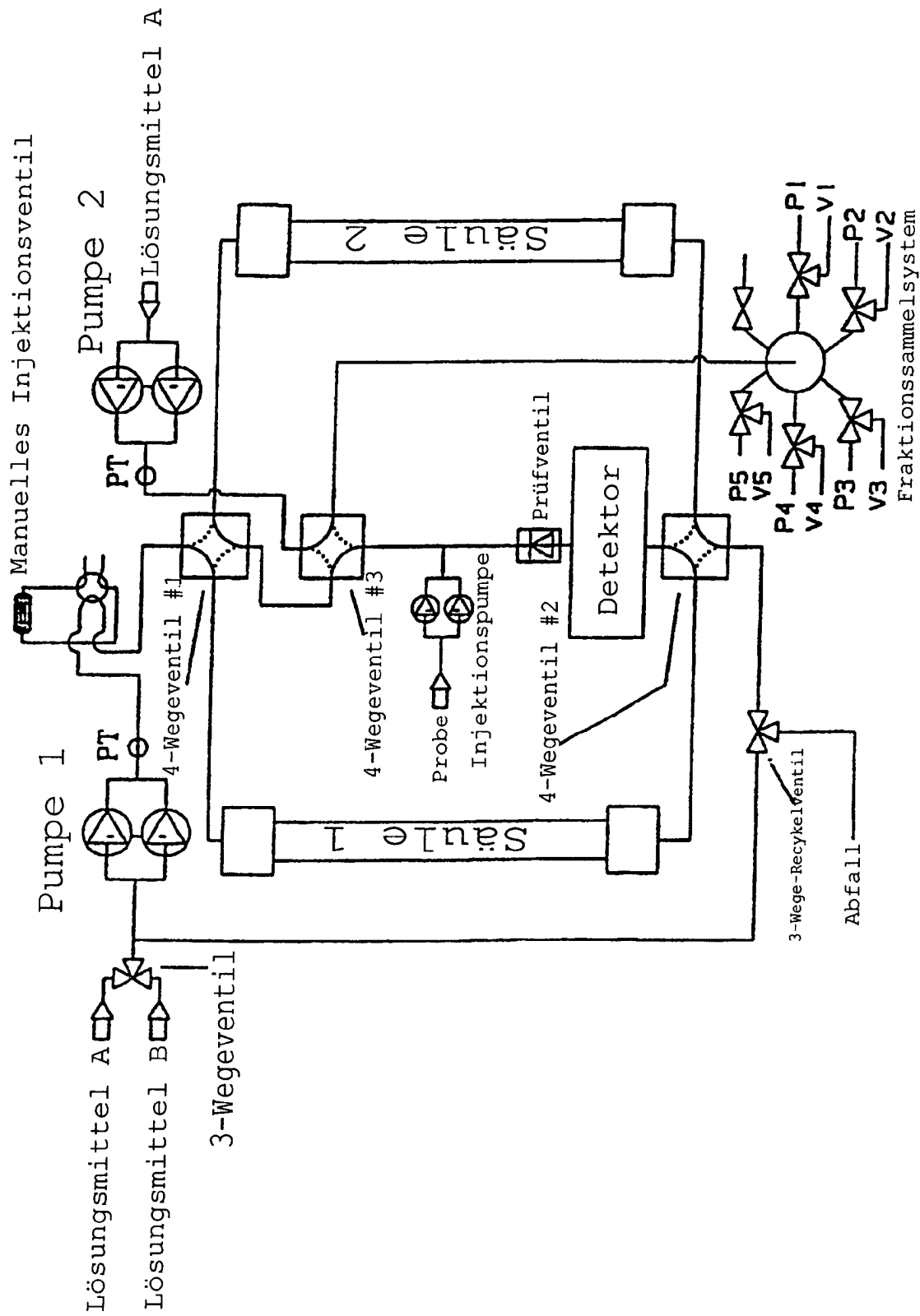
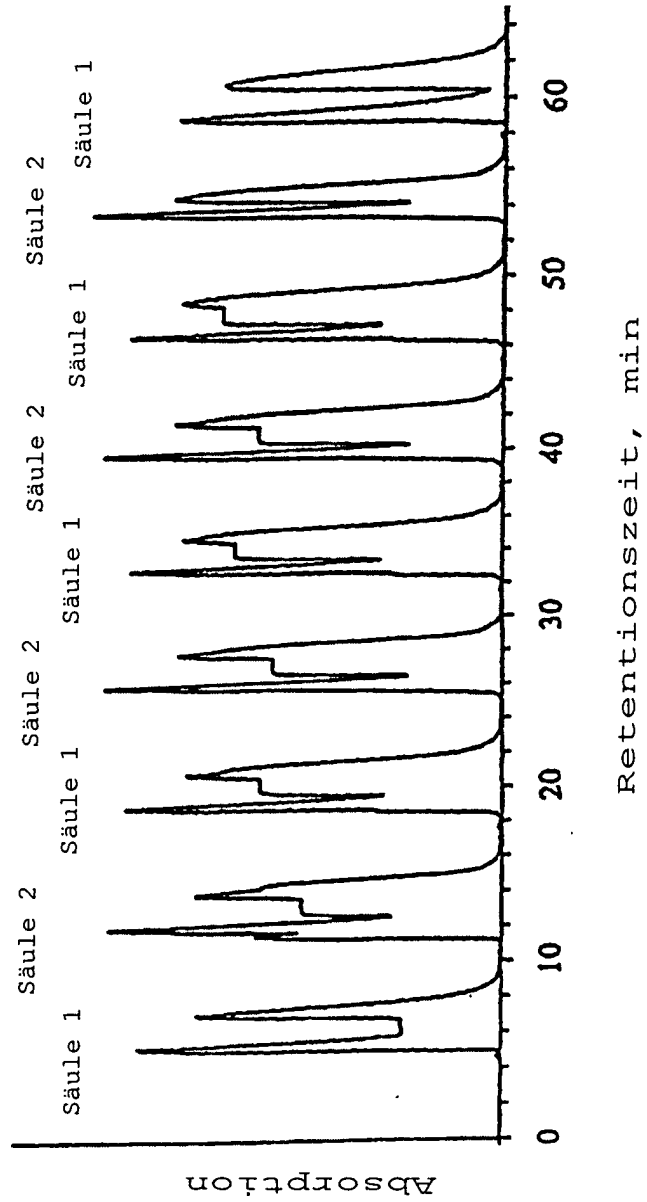


Fig. 10



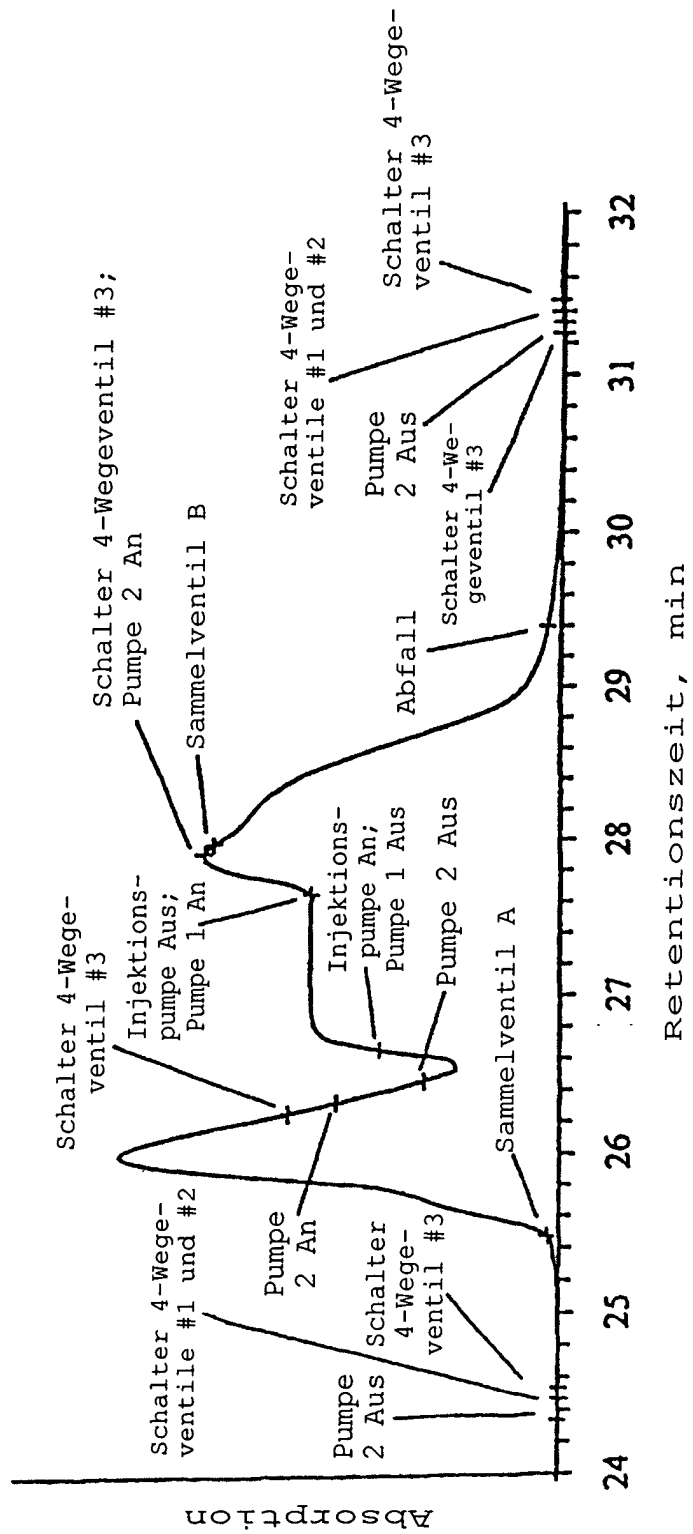
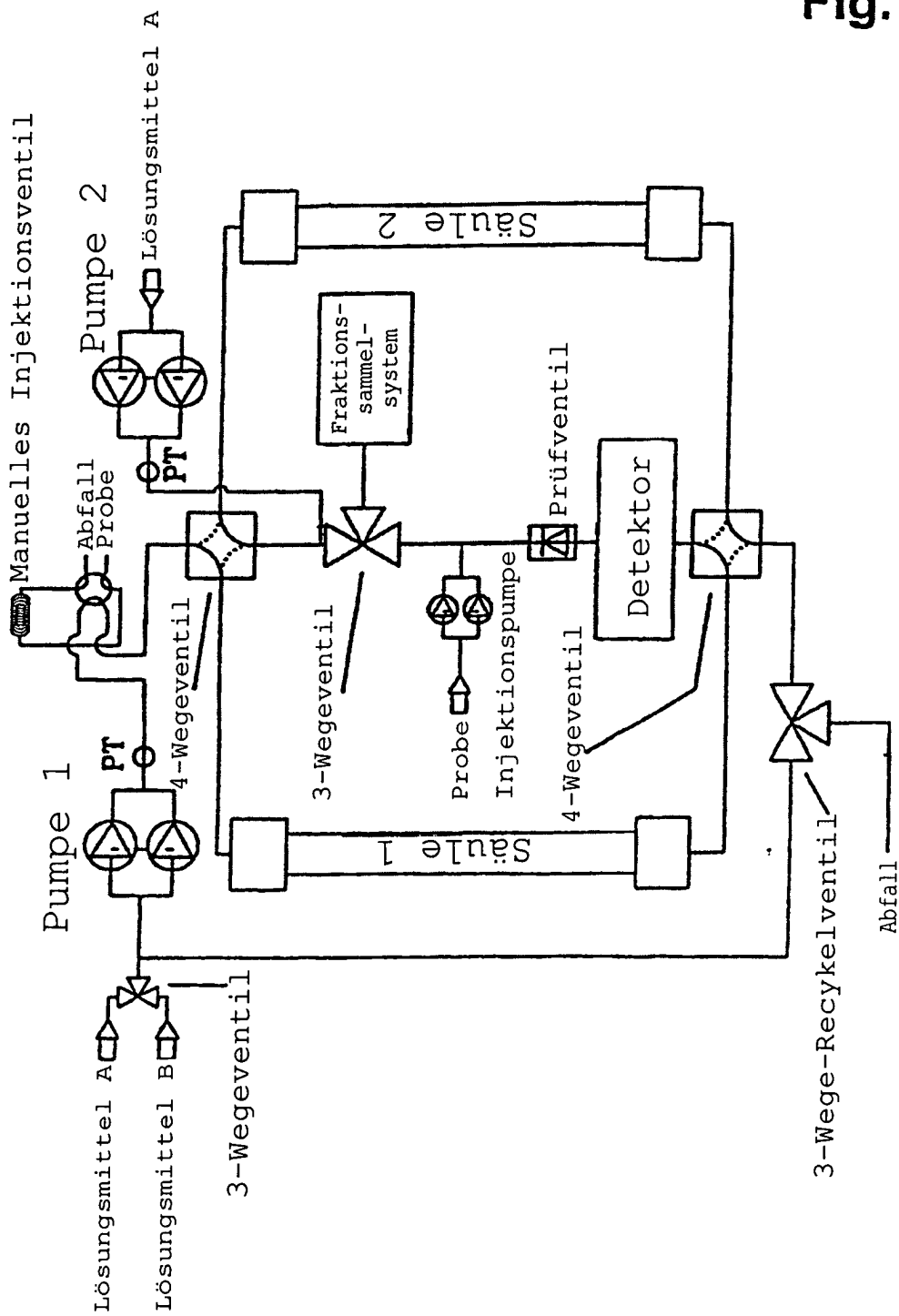


Fig. 11

Fig. 12



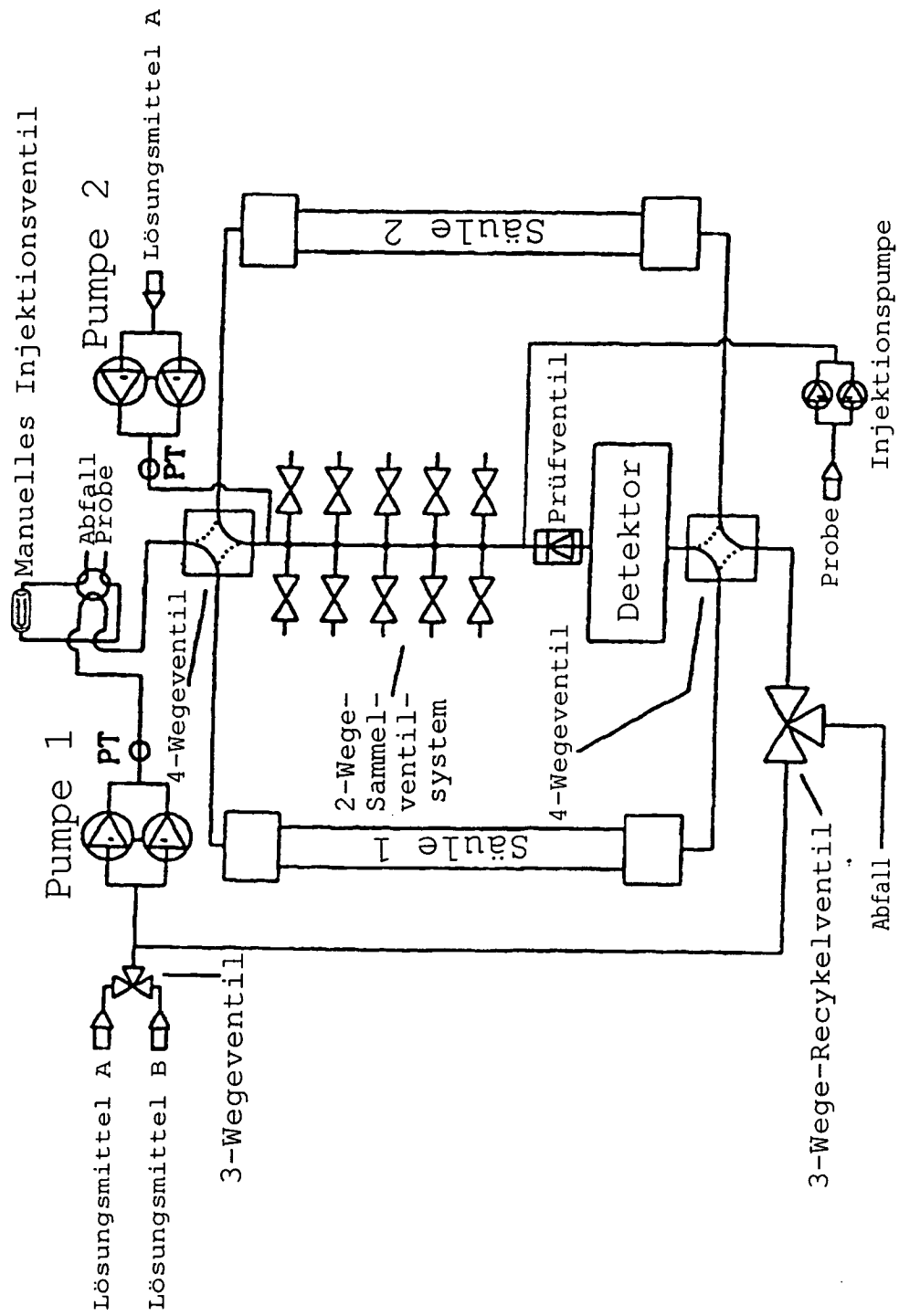


Fig. 13

Fig. 14

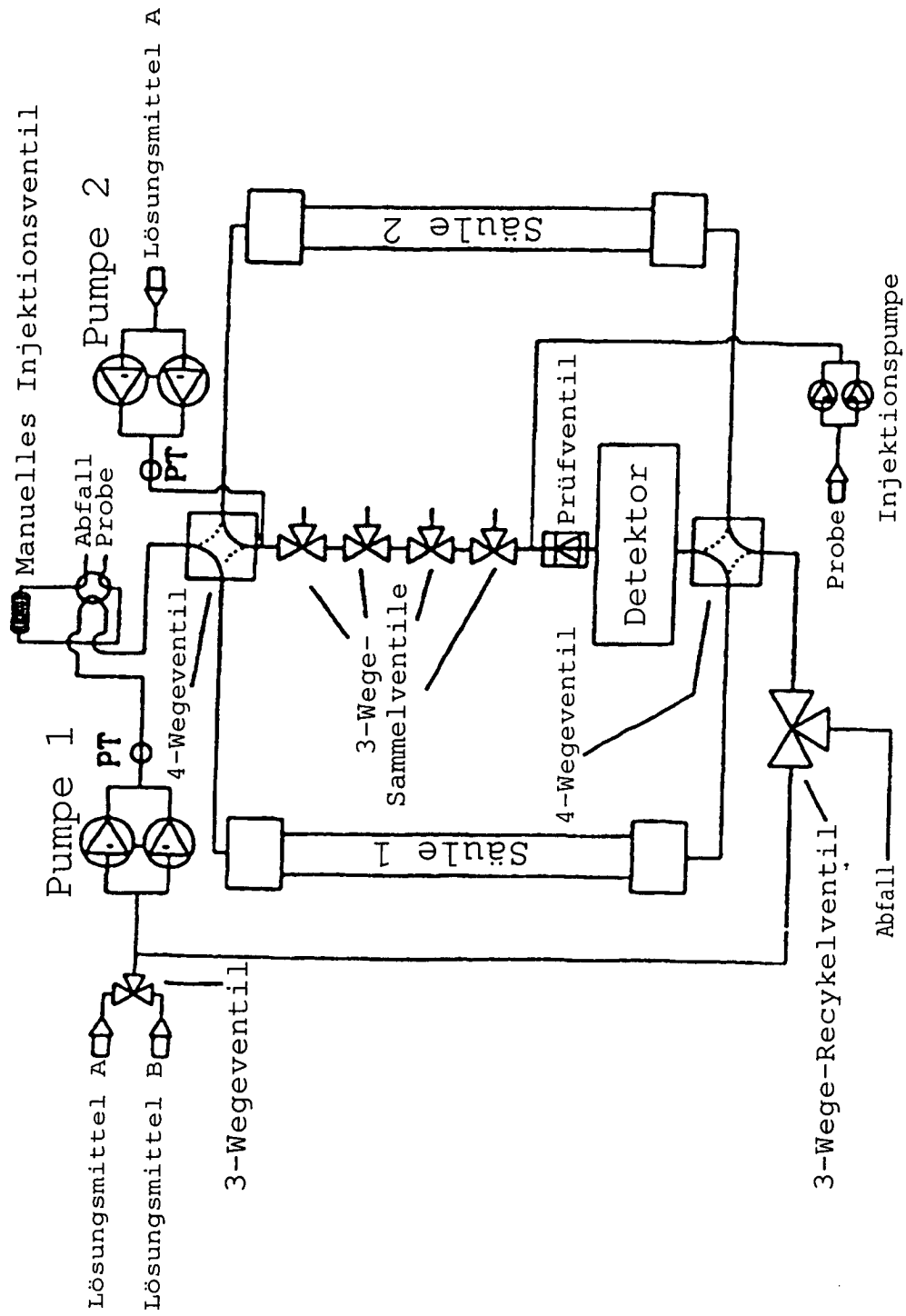


Fig. 15

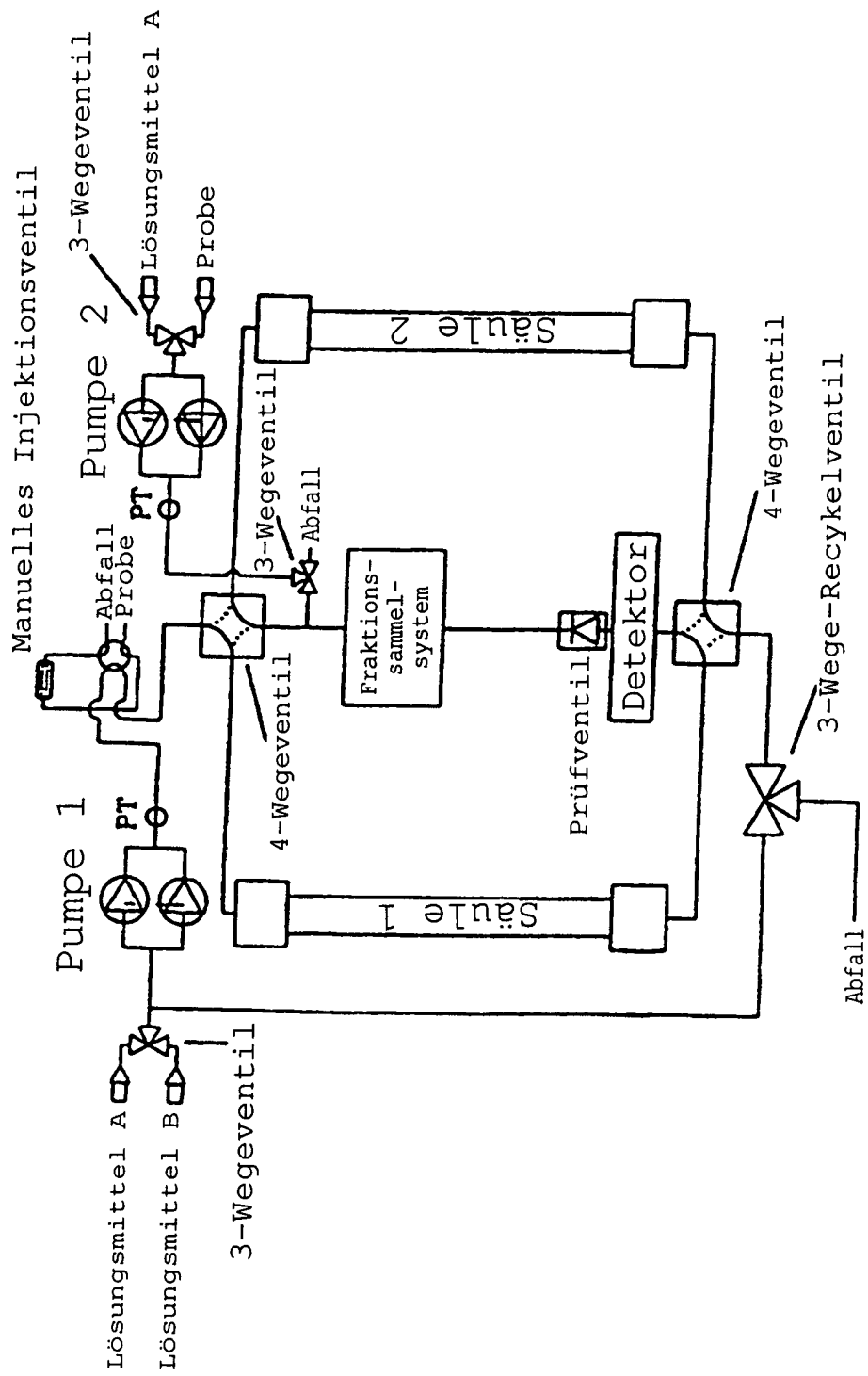


Fig. 16

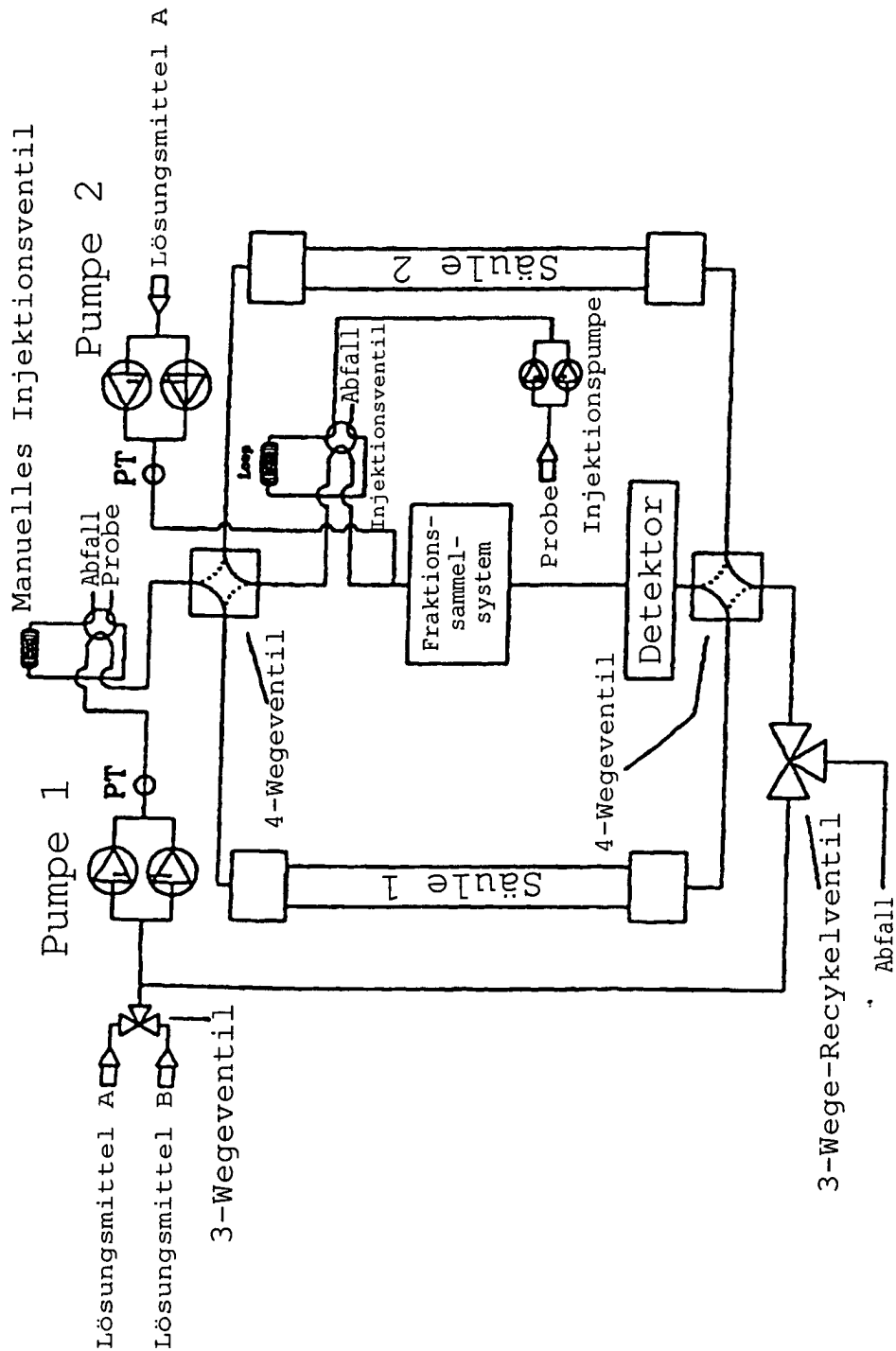


Fig. 17

