



Methoden-Kit für die HPLC auf Normalphase (NP)

Einleitung

Das NP Methoden-Kit von HPLConsult erlaubt die schnelle Methodenwahl für die Aufreinigung auf Normalphase (NP). Es beinhaltet 3 Referenzgemische und ein Set von etwa 12 säulenspezifischen Gradiententypen. Mittels Zuordnungssystem auf TLC mit zwei Referenzgemischen wird der Gradient für eine Trennung auf einer präparativen Säule ermittelt.

Die Methodik berücksichtigt die Nichtlinearität der Elutionsstärke bezüglich der Eluentenzusammensetzung auf NP [1], indem mit exponentiellen Gradienten gearbeitet wird. Dadurch werden über den gesamten Verlauf der chromatographischen Auftrennung eines Substanzgemisches Peaks mit steilen Signalfanken erhalten, was die Zuverlässigkeit der vollautomatischen Peakerkennung erhöht.

Das Standard-Methoden-Kit von HPLConsult für die präparative HPLC auf Normalphase mit einem ternären Hexan/Ethylacetat/Methanol Gradientensystem beinhaltet folgende Komponenten:

1. Zwei Referenzgemische (*Ref2* und *Ref3*) für die Dünnschichtchromatographie (TLC)
2. 1 Satz (12 Gradiententypen), von Gradientenprogrammen, vgl. Fig. 1
3. Ein Referenzgemisch (*Ref1*) für die „Schnellqualifizierung“ des Systems.

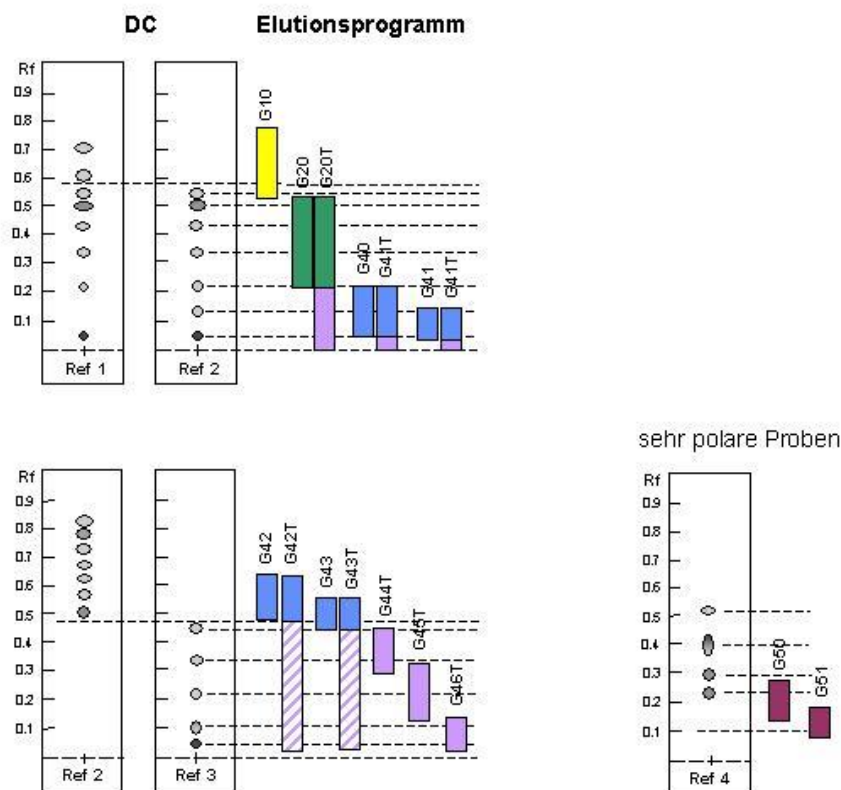


Fig. 1 TLC Zuordnungsschema

Referenzgemische

Standardzuordnung

Für Standardzuordnungen werden die Referenzgemische *Ref2* und *Ref3* benötigt. *Ref4* wird nicht gebraucht, da die Zuordnung in der Regel anhand des Referenzgemisches *Ref3* erfolgen kann, dessen polarste Komponente der zweitpolarsten in *Ref4* entspricht.



Testchromatogramm zur Qualifizierung

Das Referenzgemisch *Ref1* eignet sich besonders gut, um Testchromatogramme zu erstellen. Testchromatogramme mit einem Referenzgemisch stellen eine einfache Methode dar, um eine Schnellqualifizierung des HPLC-Systems einschliesslich der Säule durchzuführen, beispielsweise täglich vor Beginn der Arbeit mit dem System.

Zusammensetzung der Referenzgemische

Ref1 und *Ref2* enthalten käufliche Komponenten in einem definierten Mischungsverhältnis, derart, dass unterschiedliche Extinktionskoeffizienten kompensiert werden und über das ganze Chromatogramm Peaks mit etwa gleicher Fläche entstehen. Im Unterschied zur *Ref2* enthält das Referenzgemisch *Ref1* noch zwei sehr apolare Komponenten. *Ref3* enthält nichtkäufliche Komponenten. Die Gemische enthalten kein Lösungsmittel, da sich die festen Anteile jeweils in den flüssigen vollständig lösen, sodass damit leicht Proben mit einer definierten Konzentration hergestellt werden können.

Gradienten

Ein Gradienten-Set ist säulenspezifisch. D.h. dass die Gradienten eines Sets jeweils empirisch auf eine bestimmte Säule einer bestimmten Dimension ausgelegt sind. Es wurden Gradienten-Sets für folgende Säulentypen entwickelt:

- 21 x 100mm (Nucleosil)
- 30 x 150 mm (Nucleosil, Grom Saphir)
- 50 x 200mm (Nucleosil)

Bei guter Abstimmung eines Gradienten-Sets lässt sich in der Regel mit höchstens zwei TLC's mit unterschiedlichen Laufmitteln auf Anheb eine optimale Trennung auf Normalphase für ein bestimmtes Trennproblem erzielen.

Berechnung der Gradienten

Die Gradienten werden nach einer Exponentialformel berechnet [2], in welche jeweils folgende drei Parameter für den Verlauf des starken Eluenten, z.B. Ethylacetat oder Methanol eingehen: **T**: Zeit, während derer der Gradient abläuft, **K**: Anfangskonzentration des starken Eluenten, d.h. zu Beginn des Gradienten, **a**: Exponentialkoeffizient, welcher die Krümmung der Gradientenkurve beschreibt und welcher die Dauer der annähernd isokratischen Phase zu Beginn der Chromatographie bestimmt.

Beispiele

Aufreinigung von Substanzbibliotheken

Das NP Methoden-Kit eignet sich sehr gut für die Aufreinigung von Substanzbibliotheken, indem auf einer TLC-Platte gleich eine ganze Serie von Substanz-Spots aufgetragen wird mit den Referenzgemischen *Ref2* und *Ref 3* jeweils am linken und rechten Rand der TLC-Platte

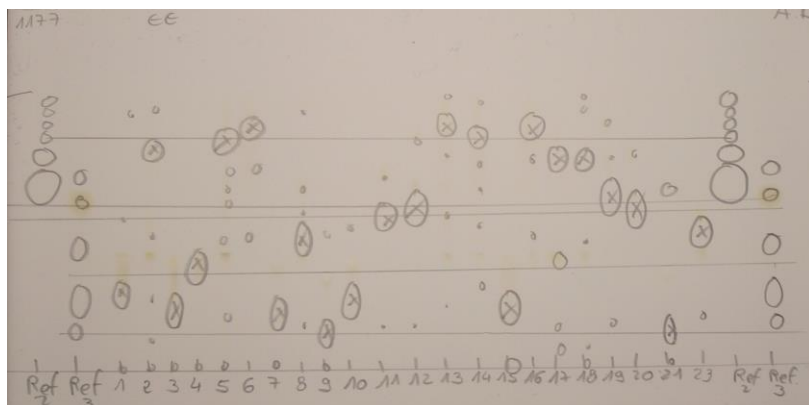


Fig. 1 TLC: Gradientenzuordnung für 23 Proben



Vergleich des Gradientenfokus anhand des Beispiels für die Ref 1

Aus den drei folgenden Chromatogrammen wird ersichtlich wie der Fokus einer Trennung auf eine bestimmte Komponente in einem Substanzgemisch gelegt werden kann, indem dort die Retentionszeitdifferenzen möglichst gross sind, bzw. die Basislinientrennung möglichst ausgeprägt ist.

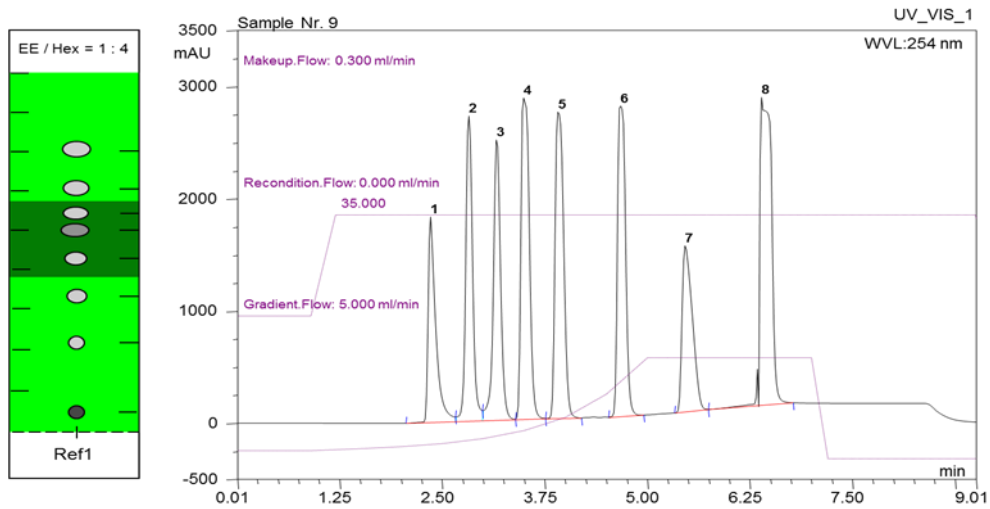


Fig. 3 Trennfokus für die Komponenten mittlerer Polarität der Ref1: Gradient G20

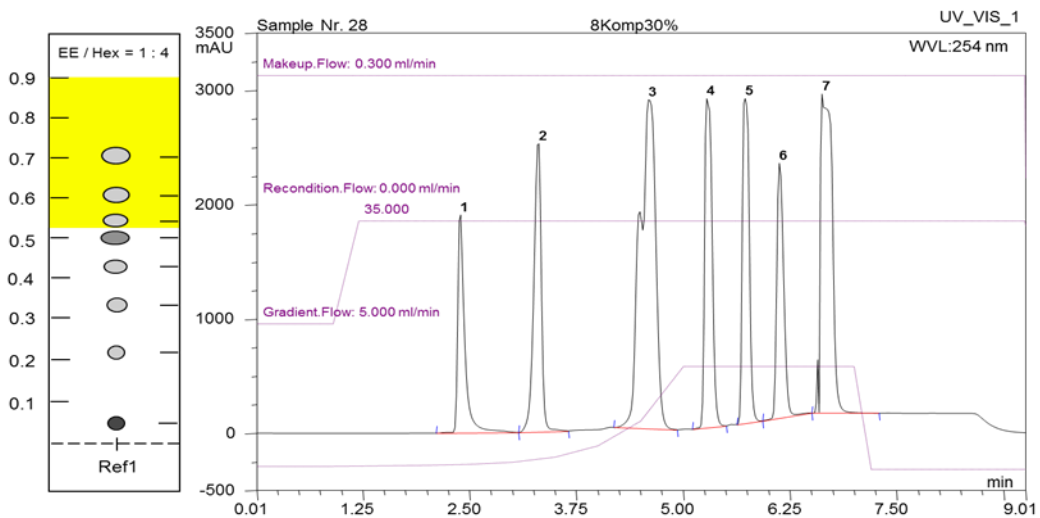


Fig. 4 Trennfokus für die apolaren Komponenten der Ref1: Gradient G10

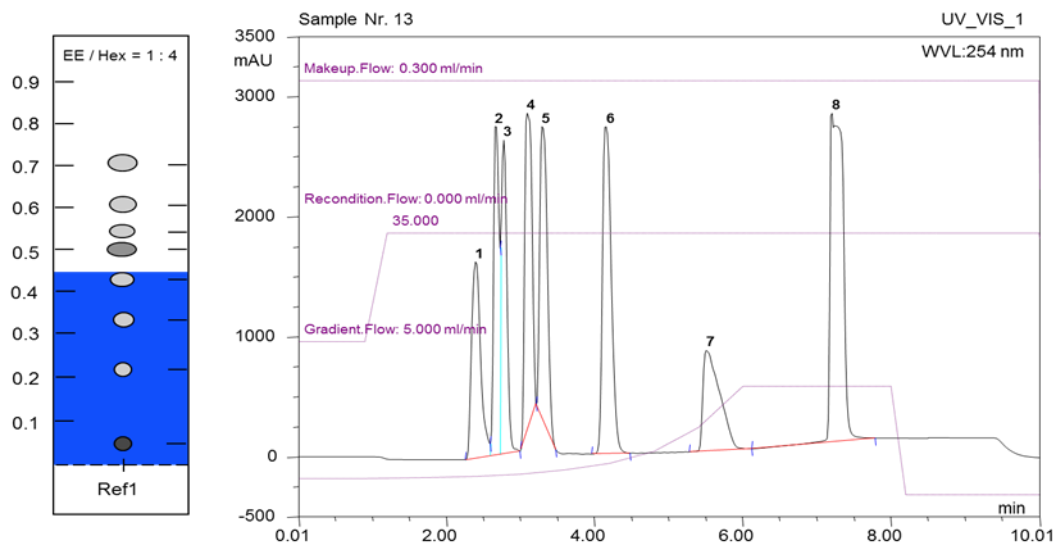


Fig. 5 Trennfokus für die polaren Komponenten der Ref1: Gradient G20

Systemvoraussetzungen

Für die präparative HPLC auf Normalphase sind folgende Systemvoraussetzungen erforderlich:

1. Ternäres Gradientensystem (mit Vorzug ein Hochdruckgradientensystem)
2. Flussraten: 35ml/min für Säulen 21mm ID, 50ml/min für Säulen 30mm ID, 100 - 150ml/min für Säulen 50mm ID
3. Drucklimite > 130bar

Hinweis

Bei der Chromatographie auf Normalphase wird mit leichtflüchtigen, leichtentzündlichen Lösungsmitteln bei höheren Flussraten gearbeitet. Es müssen deshalb alle Vorkehrungen getroffen werden, z.B. Füllstandsüberwachung des Waste-Tanks, Programmierung von Mechanismen zur Überwachung des Systemdrucks, um einen unkontrollierten Austritt leichtentzündlicher Lösungsmittel zu verhindern.

Lit.:

- [1] V. R. Meyer, 'Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie', Sauerländer, Aarau, 1999.
- [2] P. Renold, E. Madero, T. Maetzke, *J. Chromatography A*, 908, (2001), 143.