



(10) **DE 10 2004 041 806 B4** 2014.10.16

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2004 041 806.3**  
(22) Anmeldetag: **25.08.2004**  
(43) Offenlegungstag: **02.03.2006**  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **16.10.2014**

(51) Int Cl.: **B01D 15/08** (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**Analyticon Discovery GmbH, 14473 Potsdam, DE**

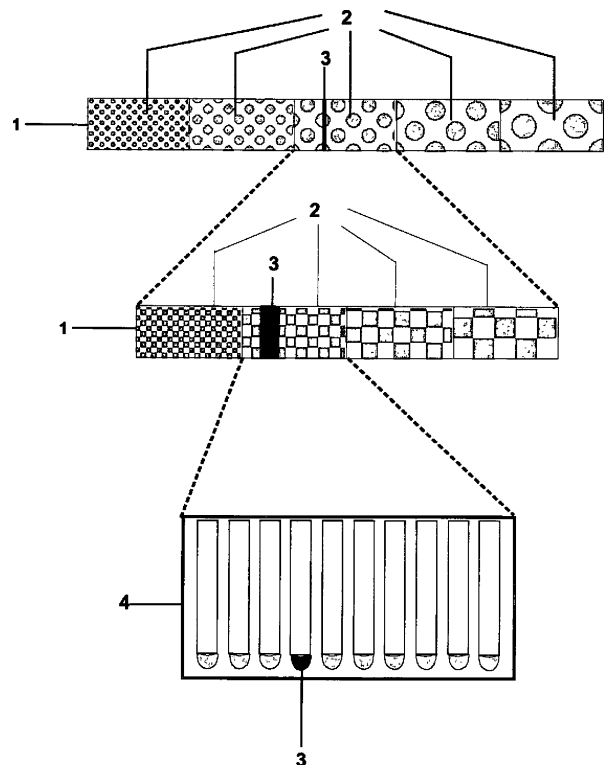
(74) Vertreter:  
**Schubert, Klemens, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 10629  
Berlin, DE**

(72) Erfinder:  
**Müller, Jens-Peter, Dr., 10115 Berlin, DE; Wolf,  
Dietmar, Dr., 10557 Berlin, DE; Jakupovic, Jasmin,  
Dr., 10707 Berlin, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

<b>DE</b>	<b>38 36 343</b>	<b>A1</b>
<b>US</b>	<b>4 719 011</b>	<b>A</b>
<b>WO</b>	<b>2004/ 047 948</b>	<b>A1</b>

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtung zur Auftrennung von Stoffgemischen**



(57) Hauptanspruch: Vorrichtung zur Auftrennung von Stoffgemischen mittels HPLC-Technik, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung Trennsäulen (1) umfasst, die aus Säulensegmenten (2) bestehen, wobei die Säulensegmente (2) lösbar und beweglich über eine konische Dichtung (6) und einen Innenkonus (7) miteinander verbunden sind.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen sowie eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

**[0002]** Zur Auftrennung von Stoffgemischen, insbesondere von komplexen Stoffgemischen organischer Verbindungen, hat sich die Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) über Jahre bewährt. Vorteilhaft ist, dass durch den Einsatz klassischer HPLC-Verfahren die Auftrennung von Substanzgemischen mit großen Durchsatzvolumina durchgeführt werden kann.

**[0003]** Nachteilig ist jedoch, dass bei allen bisher bekannten HPLC-Techniken die Trennung erst abgeschlossen ist, wenn die letzte Substanz von Interesse, die unpolarste im Fall der Umkehrphasenchromatographie, die Trennvorrichtung verlassen hat. Bei diesen HPLC-Techniken kann man von einer zeitlichen Fraktionierung (Zeitfraktionierung) des über die Trennvorrichtung (im Fall der HPLC eine HPLC-Säule) gegebenen Gemisches sprechen. Diese Stoffgemische sind charakterisiert durch unterschiedliche Polarität.

**[0004]** Dadurch ergibt sich, dass die Auftrennung eines Substanzgemischs viel Zeit in Anspruch nehmen und damit auch die Verweildauer der Substanzen auf der Säule groß sein kann. Bei empfindlichen Substanzen ist gerade ein zeitlich ausgedehnter Kontakt mit dem Säulenmaterial nicht erwünscht. Darüber hinaus sind zur Aufreinigung von Substanzen hin zur Analysereinheit häufig mehrere Trenngänge notwendig, was bei der Zeitfraktionierung wiederum viel Zeit in Anspruch nehmen und empfindlichen Substanzen schaden kann.

**[0005]** Weiterhin ist im Stand der Technik ein chromatographisches Verfahren bekannt, bei dem so genannte "Säulenschläuche" verwendet werden, um Substanzgemische aufzutrennen. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass das Chromatographieverfahren nach der erfolgten Auftrennung des Substanzgemischs in seine Komponenten abgebrochen wird und es erfolgt keine Elution der Substanzen. In dem Moment, in dem die Auftrennung auf dem Säulenmaterial stattgefunden hat, liegen die Komponenten örtlich fixiert auf der Chromatographiesäule vor und werden durch Extraktion aus dem Säulenmaterial isoliert. Dieses Chromatographieverfahren kann als "Ortsfraktionierung" bezeichnet werden. Vorteilhaft ist bei diesem Ansatz, dass die Komponenten des Substanzgemischs sofort nach ihrer Auftrennung in der Chromatographiesäule isoliert werden und die Verweildauer der Substanzen auf dem Chromatographiematerial deshalb im Vergleich zu Verfahren der Zeitfraktionierung wesentlich geringer ist.

**[0006]** Nachteilig ist bei diesem im Stand der Technik bekannten Verfahren, dass die Isolierung der Substanzkomponenten sehr unkomfortabel ist. So muss nach Abschluss der Auftrennung der Säulenschlauch mit äußerster Vorsicht manuell zerschnitten werden, um Substanzverluste und das erneute Vermischen der auf dem Säulenmaterial fixierten Substanzen zu verhindern. Anschließend werden die Substanzen durch im Stand der Technik bekannte Verfahren aus dem Säulenmaterial isoliert.

**[0007]** Da die verwendeten Säulenschläuche im Anschluss an die Auftrennung zerschnitten werden müssen, besitzen die eingesetzten Materialien nur eine bedingte Stabilität. Eine Übertragung dieses Verfahrens auf Hochdruckchromatographieverfahren ist deshalb nicht möglich. Weiterhin ist aufgrund der Tatsache, dass bei der Verwendung dieser Säulenschläuche auch unbedingt manuelle Tätigkeiten, wie das Zerschneiden der Schläuche, durchgeführt werden müssen, eine automatisierte Durchführung von Trennungen nicht möglich. Damit verbunden ist, dass die Durchführung dieses Verfahrens mit großen Durchsatzmengen äußerst zeitaufwendig und arbeitsintensiv wäre.

**[0008]** Ein Einsatz dieses Chromatographie-Verfahrens ist bisher bei Trennungen mit großen Durchsatzmengen, in Kombination mit HPLC-Verfahren und in automatisierten Verfahren noch nicht gelungen.

**[0009]** Die automatisierbare Durchführung des Verfahrens der Ortsfraktionierung im Rahmen von Hochdruckflüssigchromatographieverfahren erfordert eine völlig neue Gestaltung der Chromatographiesäulen. Zwingend erforderlich ist hierbei, dass die Chromatographiesäulen aus einzelnen Segmenten bestehen, die auch in einem automatisierten Verfahren bewegt, voneinander getrennt und wieder miteinander verbunden werden können.

**[0010]** Zwar sind im Stand der Technik aus der DE 2008354 A1 segmentierbare Kombinationssäulen bekannt, jedoch wurden diese nicht für Ortsfraktionierungen gestaltet. Sie entsprechen aufgrund ihres Aufbaus auch nicht den Anforderungen der Ortsfraktionierung mit großen Durchsatzmengen und in automatisierbaren Verfahren. Weiterhin können diese Kombinationssäulen auch nicht in Kombination mit Hochdruckflüssigchromatographieverfahren eingesetzt werden.

**[0011]** Als eine bevorzugte Verwendung dieser Segmentsäulen wird der Einsatz bei Verfahren unter Verwendung trägergebundener Reagenzien wie Proteine und Enzyme offenbart. Erfindungsgemäß sollen innerhalb einer Kombinationssäule mehrere chemische Tren- und Umsetzungsvorgänge ermöglicht werden. Zusammengesetzt wird die offenbarte Kombinationssäule aus zylindrischen Säulensegmenten,

die an beiden Enden Gewinde tragen, wie auch aus ebenfalls beidseitig Gewinde tragenden Trennstücken, die mit Fritten versehen sind. Die Verbindung der Säulensegmente erfolgt dann über dies Gewinde, durch welche die Einzelteile fest miteinander verschraubt werden. Eine, auch in einem automatisierten Verfahren, leicht lösbare Verbindung der Säulensegmente, wie sie eine automatisierte Ortsfraktionierung erforderlich macht, ist nicht offenbart. Die Trennung der Säulenfragmente voneinander muss hier manuell erfolgen.

**[0012]** Entsprechend der Offenbarung der DE 2008354 A1 ist ein segmentartiger Aufbau der Kombinationssäule insbesondere vorteilhaft, um Säulen beliebiger aber genau definierter Länge und Säulenvolumina zu erhalten.

**[0013]** Durch den Einsatz von den mit Sieben versehenen Trennstücken an beiden Seiten eines Säulensegments, sind die Kombinationssäulen als Siebkäfige einsetzbar.

**[0014]** Eine Verwendung zur Ortsfraktionierung wird nicht offenbart und diese würde aufgrund der festen Verschraubung der Säulensegmente über die Trennstücke in ihrer Handhabbarkeit keine Verbesserung gegenüber den oben beschriebenen Säulenschläuchen bedeuten.

**[0015]** Darüber hinaus bestehen die offenbarten Kombinationssäulen bevorzugt aus Kunststoff und ihre Verwendung in Hochdruckflüssigchromatographieverfahren ist nicht offenbart.

**[0016]** In der DE 38 36 343 A1 wird ein Säulenchromatograph beschrieben, in welchem die Säule aus Segmenten zusammengesetzt ist. Diese Säulen sind nicht für die HPLC geeignet.

**[0017]** Die US-A 4,719,011 beschreibt HPLC-Säulen, welche segmentiert sind. Die Segmente lassen sich jedoch nicht leicht lösen und sind nicht beweglich.

**[0018]** WO 2004/047948 A1 offenbart ein Verfahren zum Auftrennen von Stoffgemischen sowie eine Vorrichtung. Die Vorrichtung wird jedoch aus einzelnen Säulensegmenten durch Verschrauben der Segmente gebildet.

**[0019]** Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

**[0020]** Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Hauptanspruchs gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den abhängigen Unteransprüchen gekennzeichnet.

**[0021]** Bevorzugt ist es dabei, dass die Säulensegmente **2** lösbar und beweglich miteinander verbunden sind. Weiterhin bevorzugt ist, dass die Säulensegmente **2** verschraubungsfrei miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist auch, dass die Säulensegmente **2** schnellverschlussfrei miteinander verbunden sind.

**[0022]** Bevorzugt ist auch, dass sich die konische Dichtung **6** auf einer Kapillare **5** befindet. Dabei ist vorteilhaft, dass die Kapillare **5** am Ausgang des Säulensegments **2** befestigt ist. Vorteilhaft ist weiterhin, dass sich der Innenkonus **7** am Eingang des Säulensegments **2** befindet.

**[0023]** Eine vorteilhafte Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist ferner, dass die Säulensegmente **2** über die auf der Kapillare **5** befindliche konische Dichtung **6** des einen Säulensegments **2** mit dem am Eingang des anderen Säulensegments **2** befindlichen Innenkonus **7** miteinander verbunden sind.

**[0024]** Bevorzugt ist dabei, dass die Verbindung der Säulensegmente **2** mittels eines äußeren Drucks abgedichtet ist. Erfindungsgemäß bevorzugt geschieht dies durch ein pneumatisches, mechanisches oder hydraulisches Element **13**.

**[0025]** Vorteilhaft ist auch, dass die aus Säulensegmenten **2** bestehenden Trennsäulen **1** auf Schlitten **20** angeordnet sind. Dabei ist erfindungsgemäß besonders bevorzugt, dass die Schlitten **20** innerhalb der Vorrichtung horizontal und vertikal bewegbar sind. Vorteilhaft ist aber auch, dass die Schlitten **20** über Lineartechnik mit Antrieb bewegbar sind. Weiterhin bevorzugt ist, dass in einer Vorrichtung mehrere Schlitten **20** angeordnet sind und dass die Schlitten gegeneinander gefedert sind.

**[0026]** Bevorzugt ist bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung auch, dass die Säulensegmente **2** über Leitungen mit Laufmittel versorgt werden. Besonders bevorzugt ist dabei, dass das Laufmittel über Pumpen in die Säulensegmente **2** gefördert wird.

**[0027]** Weiterhin bevorzugt ist es, dass der Laufmittelstrom innerhalb der Vorrichtung über Ventile gesteuert wird.

**[0028]** Besonders bevorzugt ist es, dass die erfindungsgemäße Vorrichtung automatisiert betrieben werden kann. Dabei ist ganz besonders bevorzugt, dass das Auftragen des Substanzgemischs auf die Säulensegmente **2** automatisiert gesteuert ist. Bevorzugt ist aber auch, dass die Versorgung der Säulensegmente **2** mit Laufmittel automatisiert gesteuert ist. Besonders bevorzugt ist auch, dass die Ventile zur Leitung der Laufmittelströme automatisiert gesteuert werden.

**[0029]** Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass das Zusammenpressen der Säulensegmente **2** mittels der pneumatischen Elemente automatisiert gesteuert sind. Bevorzugt ist hierbei, dass das Bewegen der Schlitten **20** automatisiert erfolgt.

**[0030]** Ganz besonders bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Vorrichtung, welche Vorrichtung computergesteuert betrieben wird.

**[0031]** Weiterhin ist bevorzugt, dass in der Vorrichtung ein Industrieroboter integriert ist. Besonders bevorzugt ist dabei, dass der Industrieroboter die Segmentsäulen in der Vorrichtung bewegt.

**[0032]** Überraschenderweise wurde gefunden, dass es möglich ist, die Vorzüge von HPLC-Verfahren mit den Vorteilen des Verfahrens der Ortsfraktionierung zu kombinieren.

**[0033]** Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen, wobei man die Auftrennung als Ortsfraktionierung mittels HPLC-Technik durchführt.

**[0034]** Erfindungsgemäß führt man das Verfahren derart aus, dass

- a) man ein Substanzgemisch auf eine segmentierte Chromatographiesäule aufbringt,
- b) man das Substanzgemisch mittels HPLC-Technik auf der segmentierten Säule derart auftrennt, dass die erste interessierende Substanz die Säule noch nicht verlassen hat und sich die letzte interessierende Substanz schon auf der Säule befindet,
- c) man die Auftrennung vor der Elution der ersten Substanz abbricht,
- d) man die auf dem Trennmaterial innerhalb der segmentierten Säule örtlich fixierten Substanzen nicht aus der Säule entnimmt, sondern diese, wenn erforderlich, mit weiteren Segmenten koppelt und eine oder mehrere weitere Ortsverteilung(en) durchführt
- e) man die Substanzen in einem letzten Schritt durch fraktionierte Elution vom Säulenmaterial eines einzelnen Segments abtrennt und isoliert.

**[0035]** Vorteilhaft ist es auch, dass man vor der Ortsfraktionierung eine Beurteilung des Substanzgemischs durchführt, um Aufschluss über die Polarität der Substanzen und damit der wahrscheinlichen örtlichen Fixierung während der Ortsfraktionierung zu erhalten.

**[0036]** Erfindungsgemäß führt man die Beurteilung mittels analytischer HPLC durch.

**[0037]** Weiterhin bevorzugt ist es, dass man ein Detektionsverfahren einsetzt, um Aufschluss über die räumliche Auftrennung des Substanzgemischs in der

Trennsäule zu erhalten. Dabei ist bevorzugt, dass man zur Detektion einen in der HPLC gängigen Detektor einsetzt.

**[0038]** Bevorzugt ist auch, dass man die Detektion nach einer erfolgten Auftrennung des Substanzgemischs und vor der Wiederholung der Auftrennung auf einer weiteren Trennsäule durchführt.

**[0039]** Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei man einen oder mehrere Verfahrensschritte automatisiert durchführt. Dabei ist bevorzugt, dass man die Automatisierung mittels eines Industrieroboters durchführt. Weiterhin ist bevorzugt, dass man das Verfahren computergestützt durchführt.

**[0040]** Durch das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung können große Durchsatzmengen, auch empfindlicher Stoffgemische aufgetrennt werden, ohne das bei jedem Trenngang eine Elution der Substanzen erforderlich ist. Es ist sogar möglich mehrdimensionale Ortsfraktionierungen, das heißt hintereinander geschaltete Trennungen, durchzuführen, die im Vergleich zu bekannten HPLC-Verfahren wesentlich weniger Zeit in Anspruch nehmen und wesentlich schonender sind. Und darüber hinaus ist eine automatisierte Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung, auch unter Einsatz kommerzieller Industrieroboter, möglich.

#### Verfahren

**[0041]** Bei erfindungsgemäßen Verfahren ist im Gegensatz zu den Verfahren der Zeitfraktionierung die Ortsfraktionierung bereits abgeschlossen, kurz bevor die erste Substanz von Interesse die Trennvorrichtung verlässt und die letzte Substanz von Interesse auf die Trennvorrichtung gelangt ist. Diese zwingend erforderliche Auftrennung des Substanzgemischs, wird im erfindungsgemäßen Verfahren durch die Wahl des Materials in der Trennvorrichtung, der Wahl des Laufmittels und seiner Zusammensetzung, der Bestimmung der Zeit bis zur Beendigung der Ortsfraktionierung und der Wahl von Gradienten oder Isokraten, erfüllt. Vorteilhaft ist hierbei, dass sämtliches im Stand der Technik bekannte Säulenmaterial, Normalphasenmaterial wie auch Umkehrphasenmaterial eingesetzt werden kann. Auch die Auswahl des Laufmittels oder der Laufmittelmischung ist im erfindungsgemäßen Verfahren keinen besonderen Anforderungen unterworfen und richtet sich nur nach den individuellen Eigenschaften des Substanzgemischs. Dadurch unterliegt das Verfahren keinen besonderen Beschränkungen und ist nahezu unbegrenzt einsetzbar.

**[0042]** Nach Beendigung der Fraktionierung liegen die einzelnen Substanzen des Stoffgemischs entsprechend ihrer Polarität auf abgegrenzten Berei-

chen (Orten) der Trennvorrichtung. Die Fraktionierung hat zu einer Verteilung der Substanzen des Gemischs auf unterschiedliche Orte im eingesetzten Trennmaterial entlang der Raumachse in Richtung des Ausgangs aus der Trennvorrichtung (Trennsäule) geführt. Diese erste Auftrennung des Substanzgemischs wird im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung als Trennung in der 1. Dimension bezeichnet. Im ersten Schritt des Verfahrens findet also eine Trennung entlang der Flussrichtung statt und die Substanzen sind in der Trennsäule räumlich fixiert, ohne das Trennmaterial verlassen zu haben. Das erfindungsgemäße Verfahren kann dann durch eine weitere Auftrennung der räumlich fixierten Substanzen fortgesetzt werden oder die fixierten Substanzen können nach der Auftrennung in der 1. Dimension aus der Trennsäule separiert und aus dem Trennmaterial isoliert werden. Zur Isolierung aus den Säulenmaterial sind verschiedene, im Stand der Technik bekannte, Verfahren einsetzbar. Beispielsweise können die Substanzen durch gängige Extraktionsverfahren vom Säulenmaterial abgetrennt werden, sie können in Fraktionen aus dem Material herausgespült werden oder durch Überführung auf gängige Chromatographiesäulen in Fraktionen isoliert werden.

**[0043]** Wenn eine weitere Ortsfraktionierung der auf der segmentierten Trennsäule örtlich fixierten Substanzen entsprechend des erfindungsgemäßen Verfahrens durchgeführt werden soll, werden die in der 1. Dimension auf der Phase fixierten Substanzen selektiv vom Laufmittel vom jeweiligen Segment auf nachgeschaltete Trennvorrichtungen überführt. Die Substanzfraktionen werden dann einer zweiten Ortsfraktionierung unterworfen, die als Ortsfraktionierung der 2. Dimension bezeichnet wird. Analog zur Ortsfraktionierung der 1. Dimension werden Komponenten der überführten Substanzfraktion auf der zweiten Trennvorrichtung entsprechend ihrer Polarität verteilt und liegen nach erfolgter Auftrennung räumlich fixiert auf der zweiten Trennvorrichtung vor. Auch in der 2. Dimension ist die Trennung abgeschlossen, bevor die erste Fraktion des Stoffgemischs die Trennsäule verlässt.

**[0044]** Analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen der Trennung der 1. Dimension können nun die separierten Substanzen isoliert werden oder es können die oben beschriebenen Verfahrensschritte wiederholt werden, bis die Substanzen in erwünschter Reinheit vorliegen. Die Ortsfraktionierung kann beliebig oft, bis zur n-ten Dimension, wiederholt werden. Nach Abschluss der Trennung werden die Substanzen, wie oben beschrieben, isoliert.

**[0045]** Die erfindungsgemäße Ortsfraktionierung kann unter Einsatz von Hochdruckflüssigchromatographie durchgeführt werden. Darüber hinaus ist auch eine automatisierte Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, mit hohem Durchsatz-

mengen möglich. Hierbei können die Schritte der Substanzaufgabe, der Auftrennung, der Überführung der örtlich fixierten Substanzen in eine weitere Trennvorrichtung zur Ortsfraktionierung in der nächsten Dimension, die Detektion und das Freispülen der Substanzen automatisiert erfolgen. Darüber hinaus kann das Verfahren auch computer- und/oder roboterassistiert durchgeführt werden.

**[0046]** Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens muss eine Vorrichtung eingesetzt werden, die sich, insbesondere bei der automatisierten Verfahrensführung, in wesentlichen Merkmalen von im Stand der Technik bekannten Vorrichtungen zur Chromatographie unterscheidet.

**[0047]** So erfordert beispielsweise das automatisierte Überführen der ortsfixierten Substanzen in die nächste Dimension eine besondere Ausgestaltung der Chromatographie-Säulen, um auf ein manuelles Isolieren der Substanz und Einbringen auf die Trennsäulen der nächsten Dimension verzichten zu können.

**[0048]** Um das erfindungsgemäße Verfahren mit hohem Durchsatz und vorzugsweise automatisiert durchzuführen, kann die erfindungsgemäße Vorrichtung eingesetzt werden, die nachfolgend ausführlich beschrieben wird.

**[0049]** Ein Bestandteil der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist eine Kombination von separierbaren Segmentsäulen, welche die im Stand der Technik bekannten Chromatographiesäulen ersetzen. Diese erfindungsgemäßen Chromatographiesäulen bestehen aus Säulensegmenten, die miteinander gekoppelt sind. Bevorzugt werden die Säulensegmente derart kombiniert, dass eine Chromatographiesäule zum Einsatz kommt, die in ihrer Länge einer herkömmlichen langen HPLC-Säule gleicht. Durch den Aufbau aus gekoppelten Säulensegmenten kann die mit Trennmaterial gefüllte Chromatographiesäule nach Durchführung eines Trennvorgangs in die Segmente zerlegt werden und diese Segmente, die mit Substanz beladenes Trennmaterial enthalten, können dann zur gezielten Überführung der Substanz in die nächste Dimension der Ortsfraktionierung oder zum Freispülen der Substanz verwendet werden.

**[0050]** Um eine einfache Kopplung und auch wieder Trennung der Säulensegmente zu ermöglichen, werden diese beweglich miteinander verbunden. Besondere Anforderungen an die Kopplung der Säulensegmente werden insbesondere dann gestellt, wenn das erfindungsgemäße Verfahren automatisiert durchgeführt wird. Zum einen muss die Kopplung der Säulensegmente leicht lösbar sein, sie muss jedoch zum anderen so erfolgen, dass die Dichtigkeit den Anforderungen der Hochdruckflüssigkeitschromatographie genügt. Aus diesem Grund kommen in der erfin-

dungsgemäßen Vorrichtung neuartigen HPLC-Segmentsäulen und Kopplungstechniken zum Einsatz.

**[0051]** Bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung, sowie die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit dieser Vorrichtung, werden anhand der beigegefügt Figuren ausführlich erläutert.

**[0052]** So zeigt **Fig. 1** das Prinzip der erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Ortsfraktionierung. Der Aufbau eines Säulensegments wird in **Fig. 2** illustriert. Die Kopplung der Säulensegmente wird in **Fig. 3** dargestellt. **Fig. 4** zeigt eine Anordnung von 25 Segmenten für eine Verteilung in der 1. und 2. Dimension und **Fig. 5** veranschaulicht einen Ausschnitt aus der Segmentanordnung. Der mechanische Aufbau einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur mehrdimensionalen Ortsfraktionierung wird in **Fig. 6** dargestellt. **Fig. 7** zeigt die Laufmittelströme bei einer Verteilung in der 3. Dimension und **Fig. 8** illustriert ein Aufgabesystem mit automatisierter Festbettinjektion. Durch **Fig. 9** wird die Verknüpfung von Probenaufgabe und Laufmittelströmen bei Verteilungen veranschaulicht. Die Online-Detektion in der 2. Dimension der erfindungsgemäßen Ortsfraktionierung wird in **Fig. 10** gezeigt und in **Fig. 11** wird beispielhaft der Einsatz von Industrierobotern zur weiteren Automatisierung der erfindungsgemäßen Vorrichtung dargestellt. **Fig. 12** zeigt das Prinzip der bekannten Zeitfraktionierung. Ein Gemisch wird im Probenaufgeber **12.1** injiziert und über die Trennsäule **12.2** aufgetrennt. Die Trennung läuft von  $T_{\text{Anfang}}$  bis  $T_{\text{Ende}}$  (**12.3**), bis die letzte Substanz von Interesse die Trennsäule verlassen hat.

Fig. 1

**[0053]** **Fig. 1** zeigt die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens als Trennung in der 2. Dimension.

**[0054]** Gezeigt wird ein Ausschnitt einer Trennsäule **1**, die aus 5 Säulensegmenten **2** besteht. Als Muster wird die Verteilung eines komplexen Substanzgemischs auf diesen Säulensegmenten **2** veranschaulicht. Die schwarze Bande symbolisiert eine Substanzfraktion **3** dieses Substanzgemischs, die nach einer ersten chromatographischen Auftrennung räumlich im dritten Säulensegment fixiert ist. Es hat die Ortsfraktionierung in der 1. Dimension stattgefunden. Durch die senkrechte gestrichelte Linie wird die Überführung einer Substanzfraktion **3** des Säulensegments **3** der ersten Trennsäule **1** auf die darunter dargestellte Trennsäule der 2. Dimension symbolisiert. Die unter der Trennsäule **1** der 1. Dimension dargestellte Trennsäule der 2. Dimension besitzt 4 Säulensegmente **2**. Die Substanz **3** ist nun, nach einer weiteren Ortsfraktionierung im Säulensegment **2** der Trennsäule **1** der 2. Dimension örtlich fixiert. Die

Ortsfraktionierung wird an dieser Stelle des Verfahrens beendet und es erfolgt das Freispülen der Substanz **3** aus dem zweiten Säulenfragment der Trennsäule **1** der 2. Dimension. Dieses Überführen der Substanzen aus dem Säulensegment in die Fraktioniergefäße wird durch die gestrichelten Linien dargestellt. Die aus dem Segment freigespülten Substanzen werden in den mit **4** gekennzeichneten Fraktioniergefäßen gesammelt und die Substanz **3** befindet sich nun in einem der Fraktioniergefäße.

Fig. 2

**[0055]** **Fig. 2** zeigt die erfindungsgemäße Ausgestaltung der Säulensegmente. Um ein schnelles und gegebenenfalls automatisiertes Umgruppieren der Segmentsäulen von einer Dimension der Ortsfraktionierung auf die nächste zu ermöglichen, kommen verschraubungs- und schnellverschlußfreien Verbindungen zu Einsatz. Hierzu wird eine konische Dichtung auf einer kurzen, am Ausgang einer Segmentsäule fixierten, Kapillare in einen Innenkonus am Eingang einer weiteren Segmentsäule geführt und beides durch äußeren mechanischen Druck gegen den Flüssigkeitsdruck des durchströmenden Laufmittels abgedichtet. In **Fig. 2** wird ein Säulensegment **2** dargestellt, wobei **5** die Kapillare zeigt, die mit der konischen Dichtung **6** versehen ist. Am unteren Ende des Säulensegments **2** befindet sich der Innenkonus **7**. Die Kopplung von Säulensegmenten **2** erfolgt dann, wie oben beschrieben, über die konische Dichtung **6** des einen Segments mit dem Innenkonus **7** des anderen Segments. Detaillierter wird diese Kopplung auf **Fig. 3** dargestellt. Im unteren Teil der **Fig. 2** wird eine Draufsicht auf ein Säulensegment **2** gezeigt.

Fig. 3

**[0056]** In **Fig. 3** wird die Kopplung dreier Säulensegmente **2** gezeigt. Ein Adapter **8**, der zur Abdichtung mit einer konischen Dichtung **9** versehen ist, führt den Laufmittelstrom in die gekoppelten Segmentsäulen. In dem dargestellten Beispiel sind die drei Säulensegmente **2** durch eine konische Dichtung **9** und Innenkonus **7** miteinander gekoppelt. Den Abschluss dieser Anordnung bildet ein weiterer Adapter **8.1** mit einem Innenkonus **7**, der das austretende Laufmittel z. B. in ein Abfallgefäß führt. Die beschriebene, erfindungsgemäße Konstruktion der einzelnen Segmente und ihrer Verbindung miteinander gewährleistet eine Minimierung des Totvolumens zwischen den einzelnen Segmenten. Dies verringert die Verbreiterung der Substanzbanden während der Trennung und die Verluste an Substanzen in den Kapillaren zwischen den einzelnen Segmenten bei Entkopplung.

Schematischer Aufbau einer  
automatisierten Trennvorrichtung zur  
erfindungsgemäßen Ortsfraktionierung

**[0057]** Als eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird nachfolgend eine automatisierte Vorrichtung erläutert. Die Vorrichtung kann individuell auf die verschiedensten Erfordernisse der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angepasst werden. Stellvertretend für erfindungsgemäße Ausgestaltungen sollen hier einige wenige Ausführungsbeispiele behandelt werden, um die Flexibilität der Vorrichtung zum Einsatz im erfindungsgemäßen Verfahren zu verdeutlichen.

Fig. 4

**[0058]** Zentrales Element der automatisierten Trennvorrichtung ist eine Gruppierung der Segmente, die ein schnelles Verbinden und Umgruppieren der einzelnen Segmente ermöglicht. Hier sind mehrere räumliche Anordnungen der Segmente und ebenso mehrere mechanische Vorrichtungen möglich. **Fig. 4** zeigt die beispielhafte Anordnung von 5 Ausschnitten aus Trennsäulen **1**. Die 5 Trennsäulen **1** sind jeweils in 5 Säulensegmente unterteilt. Die Beweglichkeit der Säulensegmente wird in der oberen Trennsäule **1** dargestellt. Hierbei symbolisieren die um die Säulensegmente gelegten Kreise die Drehbarkeit der Segmente. Dargestellt wird der Schritt im erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem die Auftrennung des Substanzgemischs in der ersten Dimension erfolgt. Der Laufmittelstrom zur Auftrennung in der 1. Dimension wird durch den Pfeil **10** dargestellt. Nach erfolgter Auftrennung in der ersten Dimension werden die Säulensegmente der ersten Trennsäule **1** um 90° gedreht. Die auf der ersten Trennsäule **1** ortsfixierten Substanzen können dann durch den als Pfeil **11** gekennzeichneten Laufmittelstrom in die 2. Dimension, also die unter der ersten Trennsäule **1** befindlichen Segmente der zweiten Trennsäule **1**, überführt werden.

Fig. 5

**[0059]** Ein Ausschnitt der in **Fig. 4** dargestellten Anordnung wird in **Fig. 5** detaillierter gezeigt. Die drehbaren Segmente **2** sind jetzt in der Richtung für eine Verteilung in der 2. Dimension gezeigt. Die Verteilung in der 1. Dimension fand mit dem als Pfeil **12** dargestellten Laufmittelstrom durch einen Adapter **8.2** statt, der zugleich der Anschlag für die durch ein pneumatisches (wahlweise auch hydraulisches oder mechanisches) Element **13** ineinander gepressten Segmente **2** dient. Der als Pfeil **14** dargestellte Auslass des Laufmittelstroms befindet sich in einem auf die Vortriebstange **15** des Pneumatikelements **13** montierten Adapter **8.3**. Nachdem die Verteilung in der 1. Dimension stattfand, kann 5-fach parallel mit den als Pfeile **16** dargestellten Laufmittelströmen die Verteilung in der 2. Dimension erfolgen. Als gestrichelte Pfeile **69**

sind die Laufmittelströme zur Fraktionierung in der 3. Dimension angedeutet.

Fig. 6

**[0060]** **Fig. 6** zeigt den Zusammenhang von 1., 2. und 3. Dimension für einen ebenen Aufbau einer erfindungsgemäßen Vorrichtung. Das Zusammenpressen der Segmente geschieht je nach Dimension an unterschiedlichen Positionen, mit folgenden Elementen: 1. Dimension, Element **17**, 2. Dimension, Elemente **18** und 3. Dimension, Elemente **19**. Die Segmente sind in Gruppen auf Schlitten **20** zusammengefasst. Eine Gruppe umfasst die 5 Segmente der 1. Dimension, vier weitere Gruppen bestehen aus je 5 Segmenten der 2. Dimension (grau unterlegt). Dies ermöglicht ein 5-fach paralleles Eluieren, Spülen und Konditionieren der Segmente. Mit **21** ist eine Einheit zum Umleiten der Laufmittelströme zu den Detektoren gekennzeichnet. Auf einer Grundplatte sind die Schlitten zwischen den Positionen 1. und 2. Dimension und der 3. Dimension beweglich. Die Bewegung der Schlitten kann sowohl horizontal als auch vertikal erfolgen. Zum Einsatz gelangt bei diesem Ausführungsbeispiel Lineartechnik mit Antrieb. Die Schlitten **20** sind gegeneinander gefedert, so dass nach Lösen des pneumatischen Andrucks ein ausreichender Abstand zwischen den einzelnen Schlitten gewährleistet ist und diese zu anderen Positionen transportiert werden können. Pfeil **22** kennzeichnet die Bewegungsrichtung, Transport eines Schlittens mit 5 Segmenten von der Position 1. + 2. Dimension zur Position 3. Dimension; Pfeil **23** kennzeichnet die Transportrichtung eines Schlittens **20** mit 5 Segmenten innerhalb der Position 3. Dimension zur Elution; Pfeil **24** kennzeichnet die Richtung, in der der Block der Pneumatikelemente **19** an die Säulensegmente herangeführt wird. Mit **25** ist beispielhaft eine der fünf dargestellten kurzen präparativen Säulen gekennzeichnet, über welche mit einer hohen Flussrate die parallele Elution der Segmente erfolgt.

**[0061]** Auch hier erfolgt die Verbindung über die eingangs beschriebenen verschraubungs- und schnellverschlussfreien Verbindungen mittels Adaptern. Unter den präparativen Säulen werden die zu den Fraktionssammlern führenden Kapillaren **26** gezeigt.

**[0062]** Dieser graphisch dargestellte Aufbau in einer Ebene ist nur eine von mehreren Ausführungsformen. Eine weitere beispielhafte Ausführungsform ist die Anordnung der Position 3. Dimension direkt über der Position 1. + 2. Dimension, wobei der Transport der Segmente 2 in Fünfergruppen durch Portaltechnik erfolgt.

Laufmittelströme und  
Hochdurchsatzaufgabesystem mit Festbettinjektion

**[0063]** Nachfolgend werden bevorzugte Ausführungsformen der Laufmittelströme und Hochdurchsatzaufgabesysteme mit Festbettinjektion erläutert.

Fig. 7

**[0064]** Fig. 7 illustriert das System der Pumpen und Laufmittelströme innerhalb der erfindungsgemäßen Vorrichtung für die Ortsfraktionierungen über zwei Dimensionen mit Elution der Substanzen über kurze HPLC-Säulen in einer 3. Dimension. Mit **27** sind fünf präparative Hochdruckgradientenpumpen gekennzeichnet. Diese Anzahl ermöglicht ein paralleles Arbeiten mit fünf verschiedenen Isokraten oder Gradienten in der 2. und 3. Dimension. Eine der Hochdruckgradientenpumpen **27**, durch Schraffur gekennzeichnet, versorgt über ein elektrisch oder pneumatisch gesteuertes 4-Positions-4-Wegeventil **28** die Verteilung in der 1. Dimension mit Laufmittel. Diese Verteilung wird durch den gepunkteten Pfeil **30** dargestellt. Weiterhin wird ein Kanal der Verteilung in der 2. Dimension (Pfeil **31**) und einen Kanal der Elution in der 3. Dimension (Pfeil **32**) mit Laufmittel versorgt. Die weiteren vier Hochdruckgradientenpumpen **27** versorgen über elektrisch oder pneumatisch gesteuerte 3-Positions-3-Wegeventile **29** je einen Kanal der Verteilung in der 2. Dimension (als gestrichelte Linie gekennzeichnet) und einen Kanal der Elution in der 3. Dimension mit Laufmittel. Diese Kanäle der Elution in der 3. Dimension sind durch die von den Ventilen **28** und **29** nach rechts abgehenden durchgezogenen Linien dargestellt. Unter den Pumpen **27** angeordnet sind die 25 Segmente **33** zur Verteilung in 1. + 2. Dimension dargestellt. Mit **34** werden die HPLC-Säulen zur Elution in der 3. Dimension gekennzeichnet. Nach erfolgter Ortsfraktionierung und Elution werden die fünf Hochdruckgradientenpumpen **27** zum Spülen und Konditionieren aller Segmente und HPLC-Säulen eingesetzt.

Fig. 8

**[0065]** Fig. 8 zeigt ein beispielhaftes Aufgabesystem, dargestellt am Beispiel der Festbettinjektion. **35** stellt die 25 Segmente zur Verteilung in 1. + 2. Dimension dar. Mit **36** sind die von den Aufgabesäulen der Festbettinjektion kommenden Kapillaren gekennzeichnet, die in einem Mehrfachmotorschaltventil **37** enden. Dieses ist mit einem weiteren Motorschaltventil **38** verbunden, das den Laufmittelstrom auf den gewünschten Kanal der 1. oder 2. Dimension der Verteilung lenkt. Eine der Verbindungen, als gestrichelte Linie dargestellt, führt zur Verteilung in der ersten Dimension. Hiermit werden Extrakte über die 1. und 2. Dimension verteilt. Teilextrakte oder Extrakte eines sehr beschränkten Polaritätsbereichs können über die weiteren, vom Mehrfachmotorschaltven-

til **37**, abgehenden Kanäle gezielt auf eine Segmentgruppe der 2. Dimension geführt werden und dort vor einer anschließenden Elution in nur einer Dimension ortsfractioniert werden. Dadurch ist auch ein paralleles Eluieren von bis zu fünf vorher einzeln verteilten Teilextrakten möglich. Zum Spülen und Konditionieren der Segmente kann über die Umschaltventile **39** die Aufgabereinheit ausgekoppelt und eine direkte Verbindung zu den Pumpen hergestellt werden. Die Verbindungen zu den Hochdruckgradientenpumpen sind mit **40** gekennzeichnet.

Fig. 9

**[0066]** Die vollständige Verknüpfung von Aufgabesystem und Laufmittelströmen wird in Fig. 9 dargestellt. Hier werden die verschiedenen Wege der Laufmittelströme im Zusammenhang gezeigt. Die Festbettinjektion wird mit Pumpe **41** durchgeführt. Über Ventil **42** werden die Mehrfachschaltventile **43** und **44** angesteuert, welche die Aufgabesäulen **45** nacheinander zur Elution freischalten. Über das Motorschaltventil **46** erfolgt die Zuführung der Extrakte entweder über Ventil **47** in die 1. Dimension oder über die Ventile **48** in die 2. Dimension. Mit einem weiteren Kanal des Motorschaltventils **46** können die Aufgabesäulen mit Pumpe **49** luftfrei gespült werden. Die weiteren Einsatzmöglichkeiten von Pumpe **49** liegen in der Elution von Segmenten in einem Kanal der 3. Dimension **50**, ebenfalls angesteuert über Ventil **42**. Die Pumpen **51** werden nur zur Verteilung in der 2. Dimension und der Elution in der 3. Dimension eingesetzt. Die zu den einzelnen Pumpen zugehörigen Ventile **53**, **54**, **55** und **56** leiten den Laufmittelstrom in die entsprechende Dimension. Wird in der 2. Dimension verteilt, gelangt der Laufmittelstrom durch die Ventile **48** in die Segmente **52**. Wird in der 3. Dimension eluiert, erfolgt die Zuführung des Laufmittelstroms direkt.

#### Online-Detektion

**[0067]** Als weitere Ausführungsform kann ein zur Verteilung bestimmter Extrakt durch eine Beurteilung mit der HPLC im analytischen Maßstab auf die Polarität und Verteilung seiner Inhaltsstoffe untersucht werden. Dabei wird die Information erhalten, auf welchen Segmenten der 1. Dimension sich Substanzen befinden werden und ob einzelne Segmente gar nicht belegt werden. Diese Informationen stehen zur Entscheidung zur Verfügung, ob alle oder nur ein Teil der Segmente aus der 1. Dimension in die 2. Dimension weiter verteilt werden müssen. Für die Verteilung dieser Teilextrakte aus der 1. Dimension kann eine Beurteilung des Ausgangsextraktes nicht mehr sicher eingesetzt werden. Hier muss eine Onlinedetektion erfolgen, die eine Beurteilung der Belegung der Segmente der 2. Dimension mit Substanzen erlaubt. Dadurch wird es ermöglicht, eventuell auftretende, nicht mit Substanzen belegte Segmente zu erkennen und



von der Fraktionierung in Fraktionierungsgefäße auszunehmen.

Fig. 10

**[0068]** Fig. 10 gibt den Aufbau einer Online-Detektion wieder. **57** zeigt ein Segment aus der Verteilung in der 1. Dimension, **58** die vier Segmente der anschließenden Verteilung in der 2. Dimension. Dazwischen befindet sich ein Bauteil **59** mit möglichst geringem Totvolumen, das über Kapillaren, je nach eingesetztem Detektor, den gesamten Laufmittelstrom oder einen geringen Teil davon (Split) durch den Detektor und zurück zu den nachfolgenden Segmenten führt. Der mit **62** gekennzeichnete Pfeil zeigt den Laufmittelstrom durch das Segment der 1. Dimension in den Detektor gezeigt, der Pfeil **63** kennzeichnet den Laufmittelstrom aus dem Detektor weiter durch die Segmente der 2. Dimension der Verteilung. Der Detektor **60** kann je nach Anforderung ein UV-Detektor, ein Brechungsindexdetektor, ein Lichtstreuungsdetektor oder jeder in der HPLC gebräuchliche Detektor sein. Über einen Rechner **61** erfolgt eine Datenaufzeichnung, deren Ergebnisse für den weiteren Prozess der Ortsfraktionierung und die Elution der Segmente verwendet werden soll.

Automatisierung durch den Einsatz  
kommerzieller Industrieroboter

**[0069]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird ein Industrieroboter zur Automatisierung eingesetzt. Wird ein kommerziell erhältlicher Industrieroboter an Stelle von Lineartechnik oder Portaltechnik eingesetzt, lässt sich der Aufbau der erfindungsgemäßen automatisierten Vorrichtung zur mehrdimensionalen Ortsfraktionierung vereinfachen und der Automatisierungsgrad erhöhen.

Fig. 11

**[0070]** Fig. 11 zeigt das Aufbauschema einer automatisierten Vorrichtung unter Einsatz eines kommerziellen Industrieroboters. Der Arm des Industrieroboters **64** greift die einzelnen Segmente und positioniert sie an den vorgesehenen Stellen. Auf der grau unterlegten Fläche finden die Verteilungen in 1. und 2. Dimension statt. Auf der gestrichelten Fläche finden die Verteilungen in der 3. Dimension statt. **65** bezeichnet das Bauteil, das den Detektoren der Online-Detektion den Laufmittelstrom zuführt. Wird hierüber eine Verteilung in der 1. Dimension durchgeführt, gelangt das Laufmittel durch eine direkte totvolumenarme Kapillare zu den folgenden Segmenten. Ein separates pneumatisch, hydraulisch oder mechanisch wirkendes Element zum Zusammenpressen der Segmente bei einer Verteilung in der 1. Dimension entfällt, da in der ersten Reihe der Segmente sowohl Verteilungen 1. wie 2. Dimension erfolgen können. Die pneu-

matischen Einheiten **66** dichten die Segmente während der Verteilungen in 1. und 2. Dimension gegeneinander ab und die pneumatischen Einheiten in **67** dichten die Segmente während der Verteilungen in der 3. Dimension gegeneinander ab. Mit **68** sind die kurzen HPLC-Säulen zur Elution der Segmente in der 3. Dimension gekennzeichnet und die von **68** abgehenden Linien kennzeichnen die Laufmittelströme mit den eluierten Substanzen in die Fraktionssammler.

Fig. 12

**[0071]** Fig. 12 zeigt das Prinzip der bekannten Zeitfraktionierung. Ein Gemisch wird im Probenaufgeber **70** injiziert und über die Trennsäule **71** aufgetrennt. Die Trennung **72** läuft von  $T_{\text{Anfang}}$  bis  $T_{\text{Ende}}$ , bis die letzte Substanz von Interesse die Trennsäule verlassen hat

Online-Datenverarbeitung zur Automatisierung  
der Ortsfraktionierung und Steuerung  
der Elution in Fraktionssammler

**[0072]** Als weitere bevorzugte Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Vorrichtung mit einem Online-Datenverarbeitungssystem zur Automatisierung der Ortsfraktionierung und Steuerung der Elution in einem Fraktionssammler kombiniert. Eine Online-Detektion bei der Verteilung mit einer Online-Datenverarbeitung stellt ein effektives Fraktionieren der auf bis zu 20 Segmente verteilten Inhaltsstoffe eines Substanzgemischs sicher. Während der Verteilung in der 2. Dimension werden softwaregesteuert durch Peakdetektion Daten gewonnen, die automatisch zur Fraktionierung der einzelnen Segmente aus der 2. Dimension eingesetzt werden. Diese Daten werden kombiniert mit den aus dem Profiling für die Verteilung in der 1. Dimension gewonnenen Informationen, die in eine Steuerungssoftware eingegeben werden können. So werden mit Substanzen belegte Segmente von leeren unterschieden. In der Folge werden nur noch diejenigen Segmente in den Fraktionssammler fraktioniert, die Substanzen erwarten lassen. Alle weiteren Segmente können sofort freigespült und erneut konditioniert werden. Die Datenverarbeitung besteht folglich aus drei Komponenten:

1. Eingabe der Bedingungen für die Verteilung in der 1. Dimension mit den aus dem Profiling gewonnenen Daten.
2. Online-Aufzeichnung der Verteilung in der 2. Dimension durch einen Bypass zwischen Aufgabesegment und Zielsegmenten mit automatischer Peakdetektion mittels Chromatographiesoftware.
3. Automatische Auswertung der in Punkt 1 und 2 erhaltenen Daten zur gezielten Elution ausschließlich beladener Segmente.

## Bezugszeichenliste

1	Trennsäule(n)
2	Säulensegment(e)
3	Substanz/Substanzfraktion
4	Fraktioniergefäße
5	Kapillare(n)
6	konische Dichtung
7	Innenkonus
8	Adapter
8.1	Adapter
8.2	Adapter
8.3	Adapter
9	konische Dichtung
10	Laufmittelstrom
11	Laufmittelstrom
12	Laufmittelstrom
13	mechanisches/hydraulisches/pneumatisches Element
14	Laufmittelstrom
15	Vortriebstange
16	Laufmittelstrom
17	mechanisches/hydraulisches/pneumatisches Element
18	Laufmittelstrom
19	mechanisches/hydraulisches/pneumatisches Element
20	Schlitten
21	Einheit zur Umleitung des Laufmittelstroms
22	Bewegungsrichtung
23	Transportweg
24	Bewegungsrichtung
25	präparative Säule
26	Kapillaren
27	Hochdruckgradientenpumpen
28	4-Positions-4-Wegventil
29	3-Positions-3-Wegventil
30	Verteilung 1. Dimension
31	Kanal Verteilung 2. Dimension
32	Kanal Elution 3. Dimension
33	Säulensegmente
34	HPLC-Säulen
35	Säulensegmente
36	Kapillaren
37	Mehrfachmotorschaltventil
38	Mehrfachmotorschaltventil
39	Umschaltventile
40	Verbindung zu Hochdruckgradientenpumpe
41	Pumpe
42	Ventil
43	Mehrfachschatventil
44	Mehrfachschatventil
45	Aufgabesäulen
46	Motorschaltventil
47	Ventil
48	Ventile
49	Pumpe
50	Kanal 3. Dimension

51	Pumpen
52	Segmente
53	Ventil
54	Ventil
55	Ventil
56	Ventil
57	Segment
58	Segmente
59	Bauteil Laufmitteltransport
60	Detektor
61	Rechner
62	Laufmittelstrom
63	Laufmittelstrom
64	Arm von Industrieroboter
65	Bauteil Laufmittelzufuhr
66	mechanisches/hydraulisches/pneumatisches Element
67	mechanisches/hydraulisches/pneumatisches Element
68	HPLC-Säulen
69	Laufmittelstrom
70	Probenaufgabe
71	Trennsäule
72	Trennung

## Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Auftrennung von Stoffgemischen mittels HPLC-Technik, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vorrichtung Trennsäulen (1) umfasst, die aus Säulensegmenten (2) bestehen, wobei die Säulensegmente (2) lösbar und beweglich über eine konische Dichtung (6) und einen Innenkonus (7) miteinander verbunden sind.

2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Säulensegmente (2) verschraubungsfrei miteinander verbunden sind.

3. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Säulensegmente (2) schnellverschlussfrei miteinander verbunden sind.

4. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich die konische Dichtung (6) auf einer Kapillare (5) befindet.

5. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Kapillare (5) am Ausgang des Säulensegments (2) befestigt ist.

6. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich der Innenkonus (7) am Eingang des Säulensegments (2) befindet.

7. Vorrichtung gemäß der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Säulensegmente (2) über die auf der Kapillare (5) befindliche konische Dichtung (6) des einen Säulensegments (2) mit dem

am Eingang des anderen Säulensegments (2) befindlichen Innenkonus (7) miteinander verbunden sind.

8. Vorrichtung gemäß einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verbindung der Säulensegmente (2) mittels eines äußeren Drucks abgedichtet ist.

9. Vorrichtung gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der äußere Druck durch ein pneumatisches Element (13) ausgeübt wird.

10. Vorrichtung gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der äußere Druck durch ein hydraulisches Element (13) ausgeübt wird.

11. Vorrichtung gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der äußere Druck durch ein mechanisches Element (13) ausgeübt wird.

12. Vorrichtung gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die aus Säulensegmenten (2) bestehenden Trennsäulen (1) auf Schlitten (20) angeordnet sind.

13. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Schlitten (20) innerhalb der Vorrichtung horizontal und vertikal bewegbar sind.

14. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Schlitten (20) über Lineartechnik mit Antrieb bewegbar sind.

15. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Vorrichtung mehrere Schlitten (20) angeordnet sind.

16. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Schlitten gegeneinander gefedert sind.

17. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Säulensegmente (2) über Leitungen mit Laufmittel versorgt werden.

18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Laufmittel über Pumpen in die Säulensegmente (2) gefördert wird.

19. Vorrichtung gemäß Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Laufmittelstrom innerhalb der Vorrichtung über Ventile gesteuert wird.

20. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vorrichtung automatisiert betrieben werden kann.

21. Vorrichtung gemäß Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Auftragen des Substanzgemischs auf die Säulensegmente (2) automatisiert gesteuert ist.

22. Vorrichtung gemäß Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Versorgung der Säulensegmente (2) mit Laufmittel automatisiert gesteuert ist.

23. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Ventile zur Leitung der Laufmittelströme automatisiert gesteuert werden.

24. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Zusammenpressen der Säulensegmente (2) mittels der pneumatischen Elemente automatisiert gesteuert wird.

25. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 24, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bewegen der Schlitten (20) automatisiert erfolgt.

26. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vorrichtung computergesteuert betrieben wird.

27. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 26, **dadurch gekennzeichnet**, dass in der Vorrichtung ein Industrieroboter integriert ist.

28. Vorrichtung gemäß Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Industrieroboter die Segmentsäulen in der Vorrichtung bewegt.

29. Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen mit einer Vorrichtung gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Auftrennung als Ortsfraktionierung mittels HPLC-Technik durchführt.

30. Verfahren gemäß Anspruch 29, **dadurch gekennzeichnet**, dass

a) man ein Substanzgemisch auf eine segmentierte Chromatographiesäule aufbringt,

b) man das Substanzgemisch mittels HPLC-Technik auf der segmentierten Säule derart auftrennt, dass die erste interessierende Substanz die Säule noch nicht verlassen hat und sich die letzte interessierende Substanz schon auf der Säule befindet,

c) man die Auftrennung vor der Elution der ersten Substanz abbricht,

d) man die auf dem Trennmittel innerhalb der segmentierten Säule örtlich fixierten Substanzen nicht aus der Säule entnimmt, sondern diese, wenn erforderlich, mit weiteren Segmenten koppelt und eine oder mehrere weitere Ortsverteilung(en) durchführt

e) man die Substanzen in einem letzten Schritt durch fraktionierte Elution vom Säulenmaterial eines einzelnen Segments abtrennt und isoliert.

31. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche 29 oder 30, **dadurch gekennzeichnet**, dass man vor der Ortsfraktionierung eine Beurteilung des Substanzgemischs durchführt, um Aufschluss über die Polarität der Substanzen und damit der wahrscheinlichen örtlichen Fixierung während der Ortsfraktionierung zu erhalten.

32. Verfahren gemäß Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Beurteilung mittels analytischer HPLC durchführt.

33. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche 29 bis 32, **dadurch gekennzeichnet**, dass man ein Detektionsverfahren einsetzt, um Aufschluss über die räumliche Auftrennung des Substanzgemischs in der Trennsäule zu erhalten.

34. Verfahren gemäß Anspruch 33, **dadurch gekennzeichnet**, dass man zur Detektion einen in der HPLC gängigen Detektor einsetzt.

35. Verfahren gemäß Anspruch 33, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Detektion nach einer erfolgten Auftrennung des Substanzgemischs und vor der Wiederholung der Auftrennung auf einer weiteren Trennsäule durchführt.

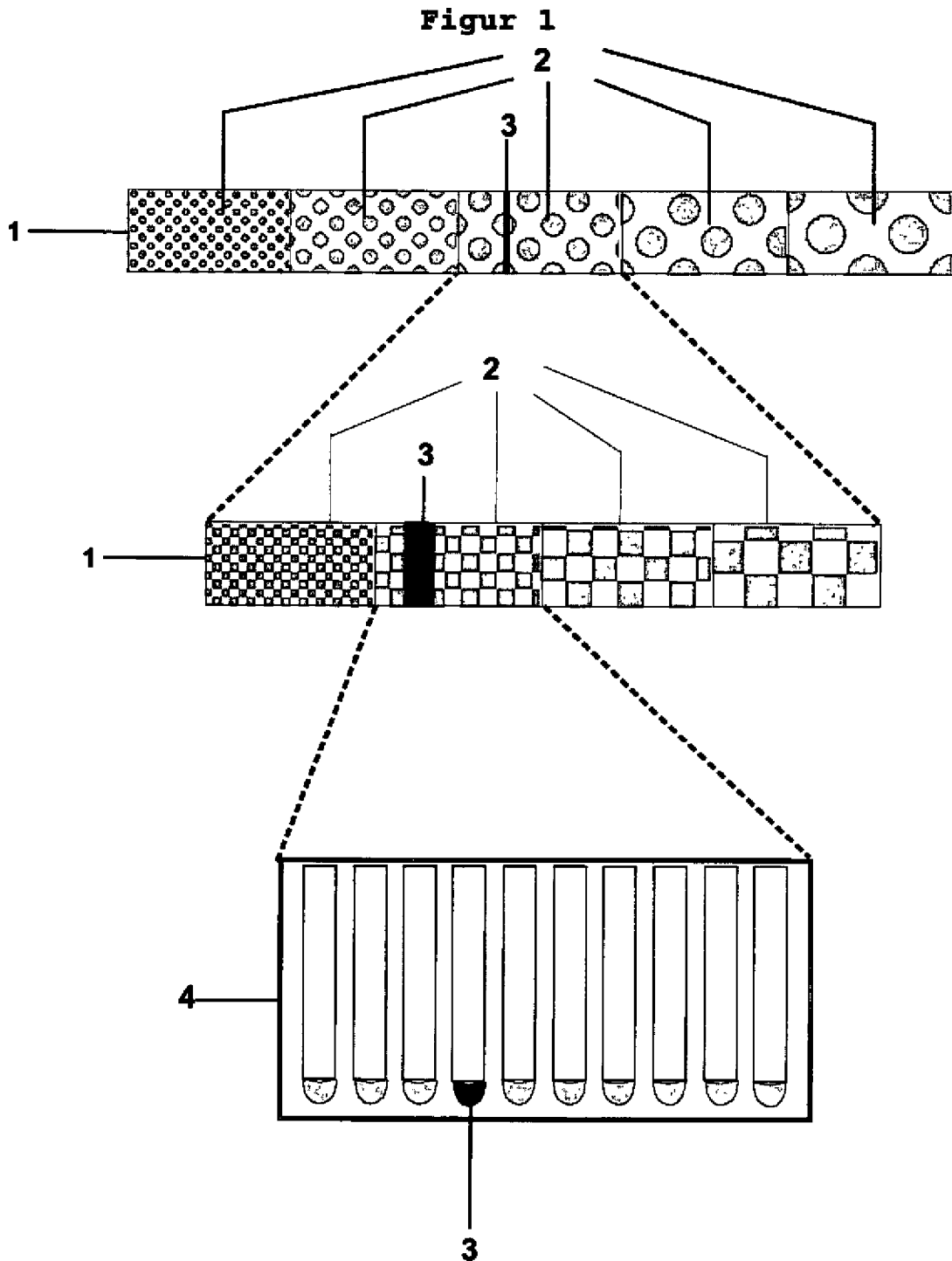
36. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche 29 bis 35, **dadurch gekennzeichnet**, dass man einen oder mehrere Verfahrensschritte automatisiert durchführt.

37. Verfahren gemäß Anspruch 36, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Automatisierung mittels eines Industrieroboters durchführt.

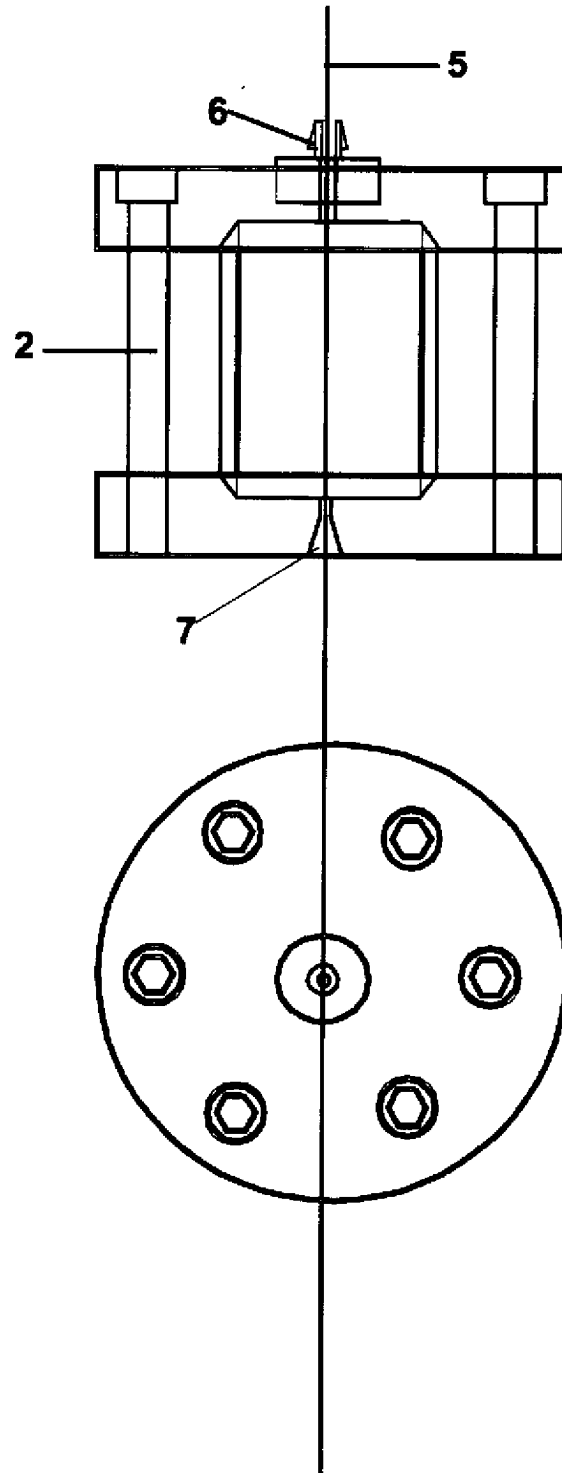
38. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche 29 bis 37, **dadurch gekennzeichnet**, dass man das Verfahren computergestützt durchführt.

Es folgen 12 Seiten Zeichnungen

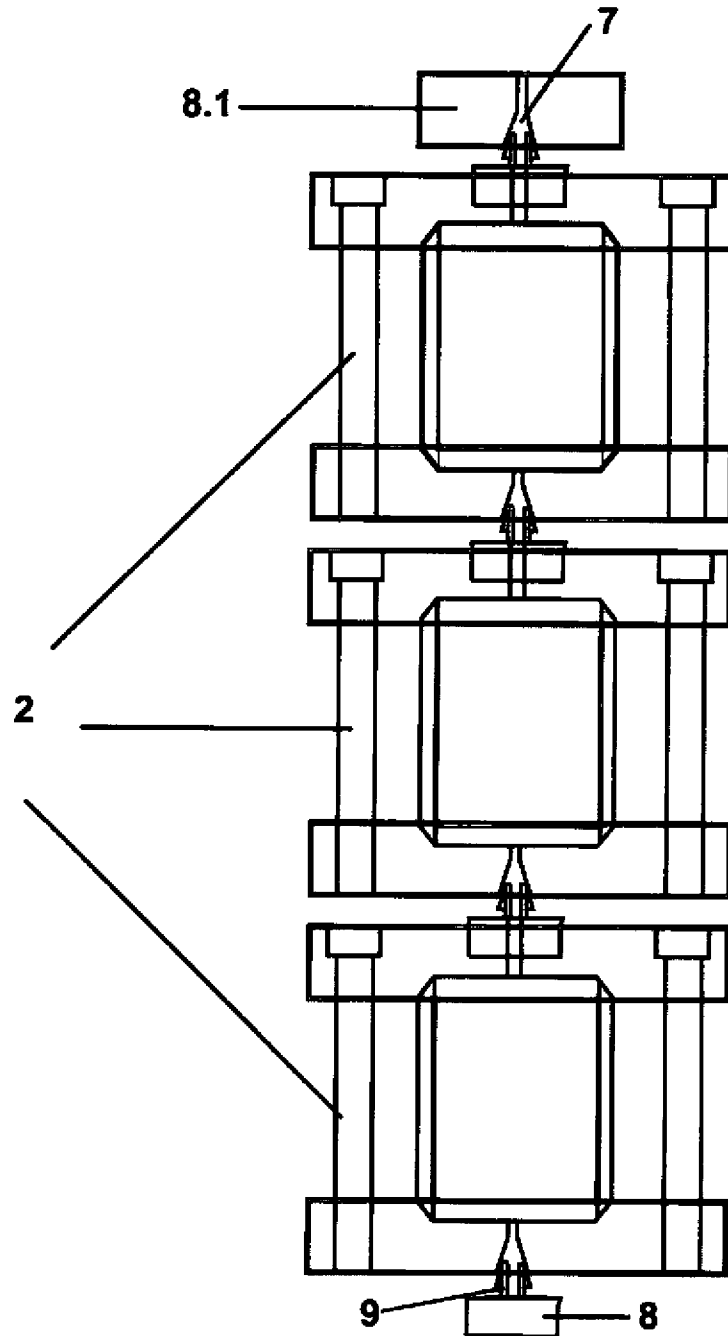
Anhängende Zeichnungen



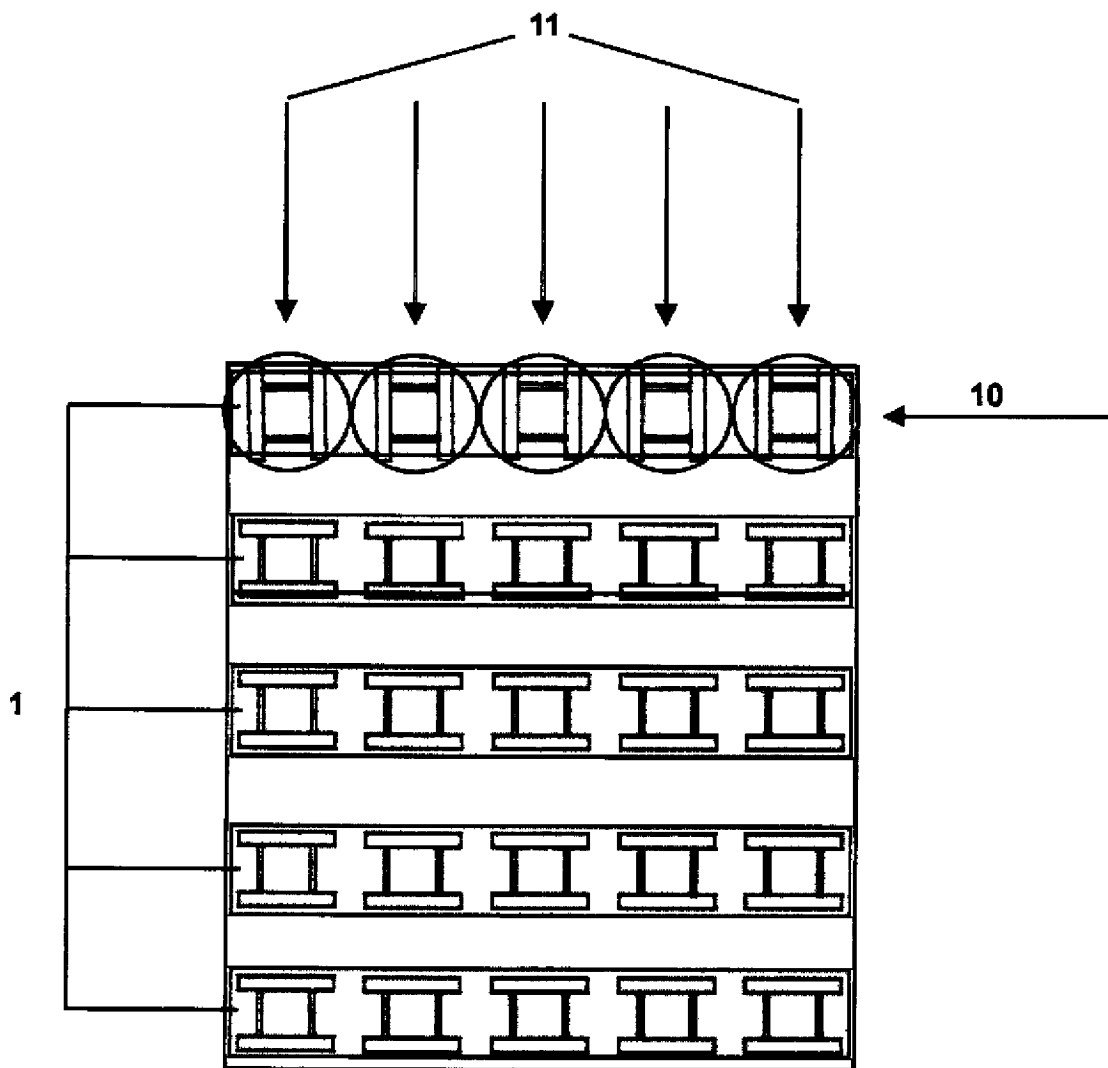
Figur 2



Figur 3

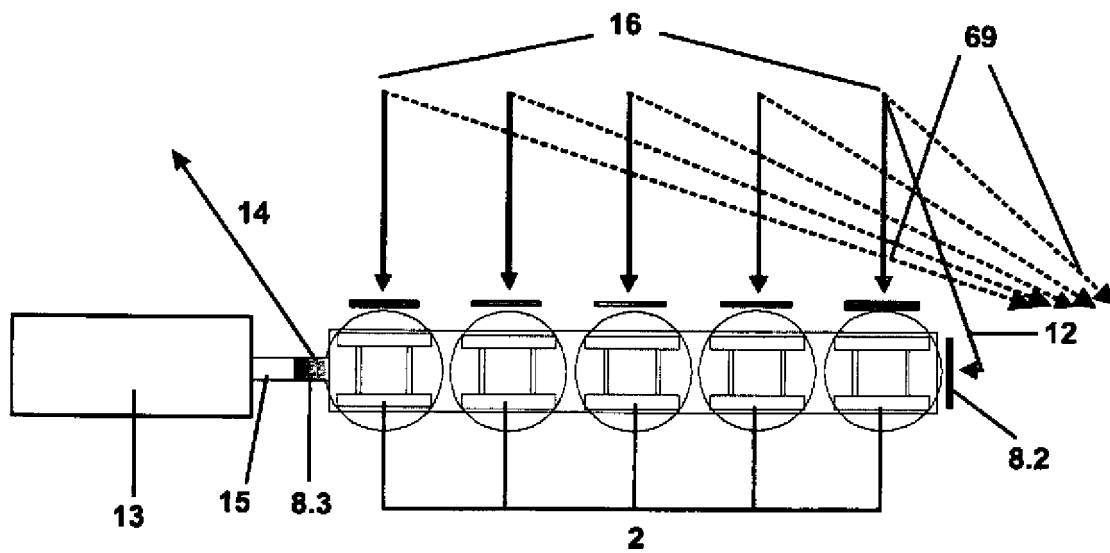


Figur 4

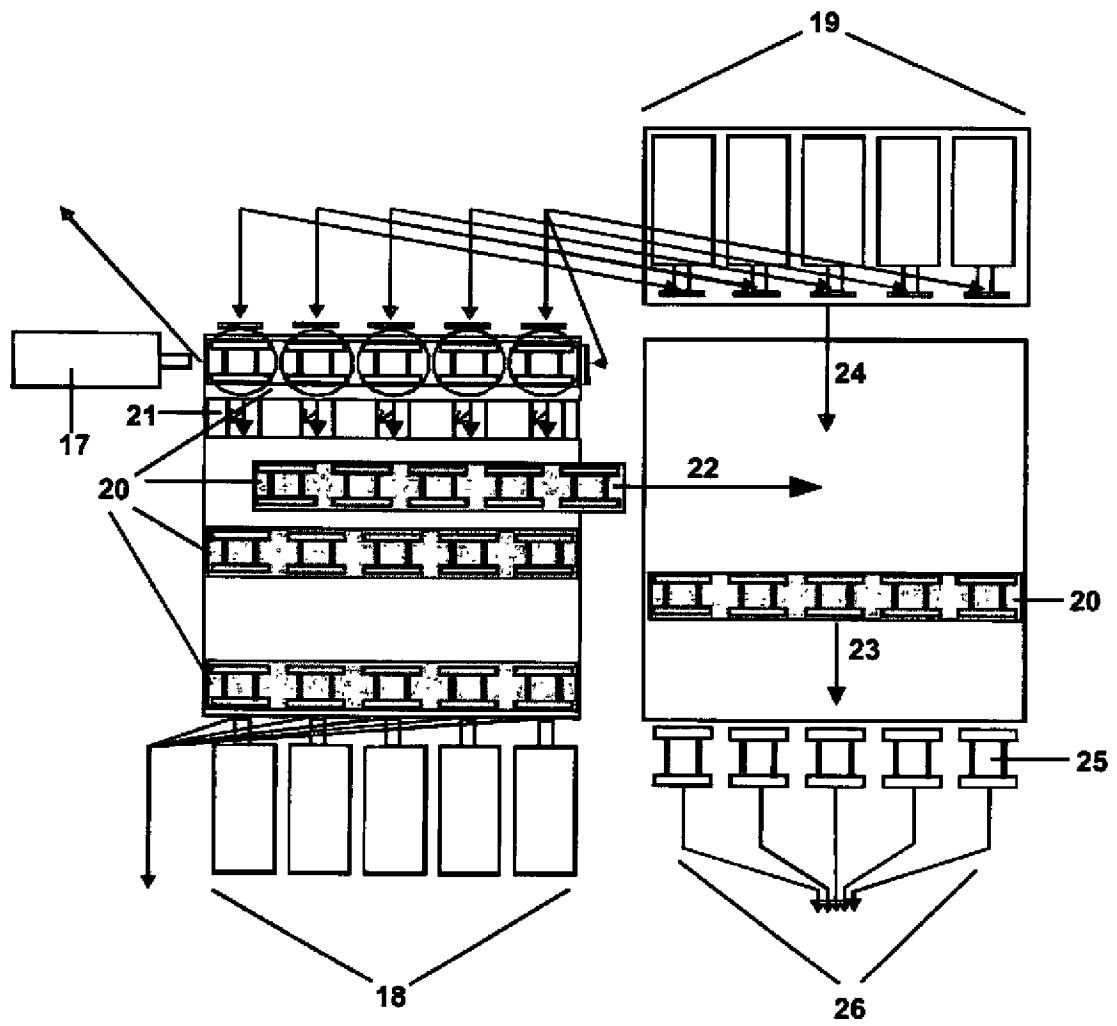




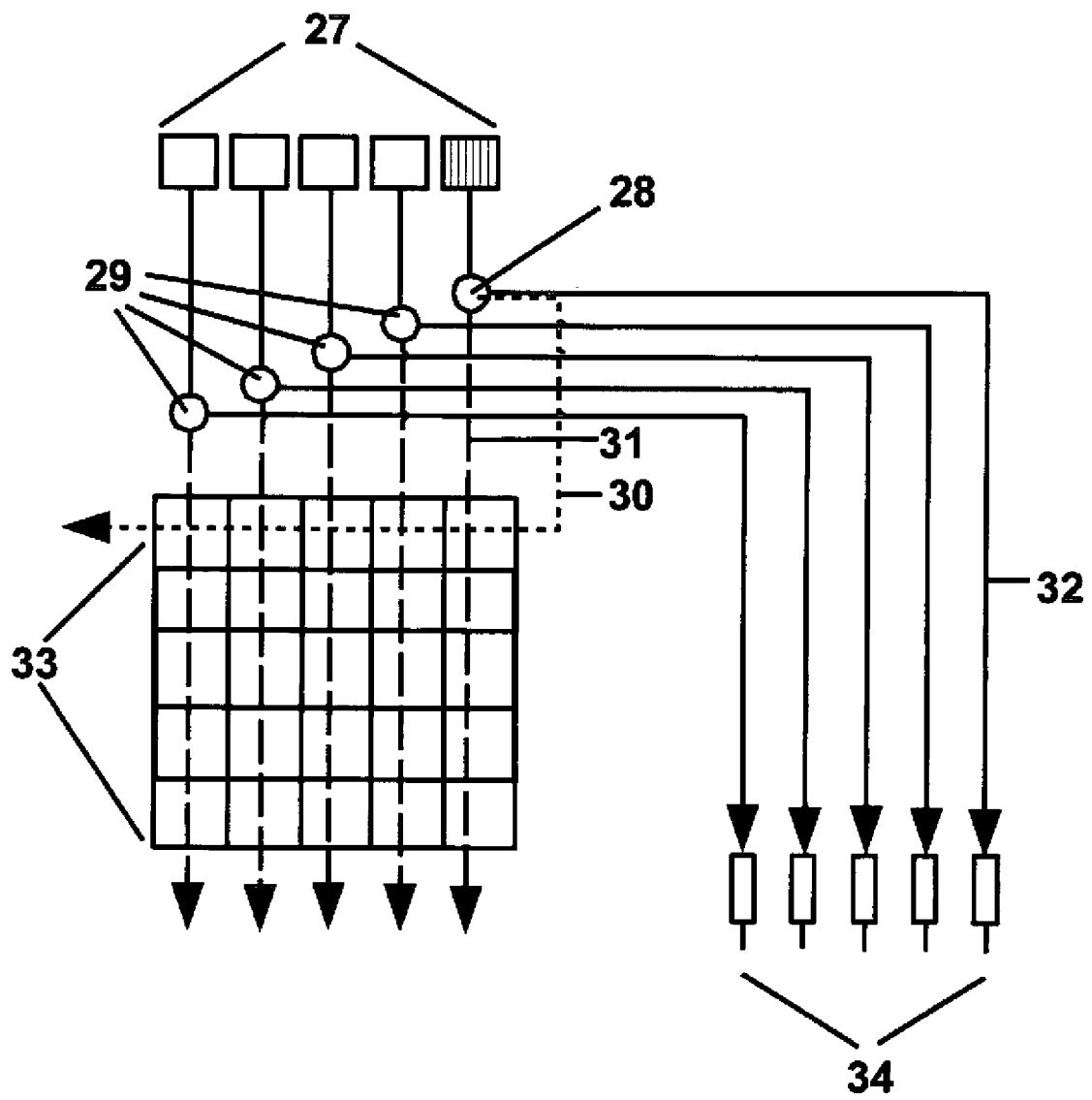
**Figur 5**



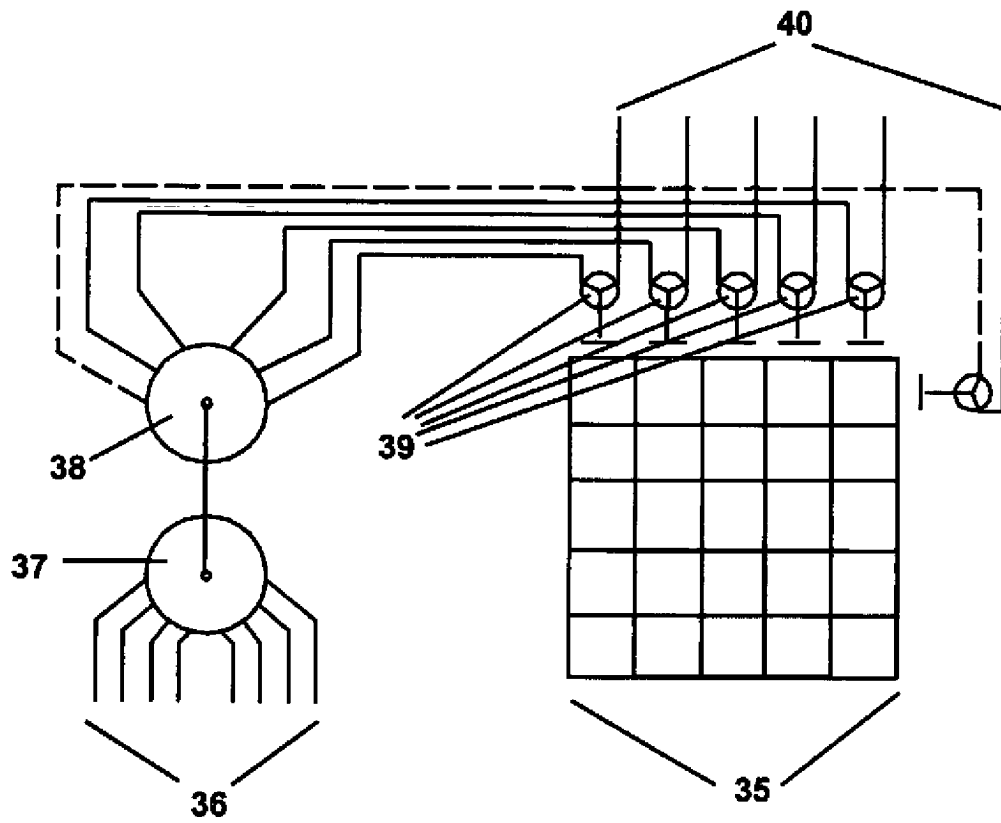
Figur 6



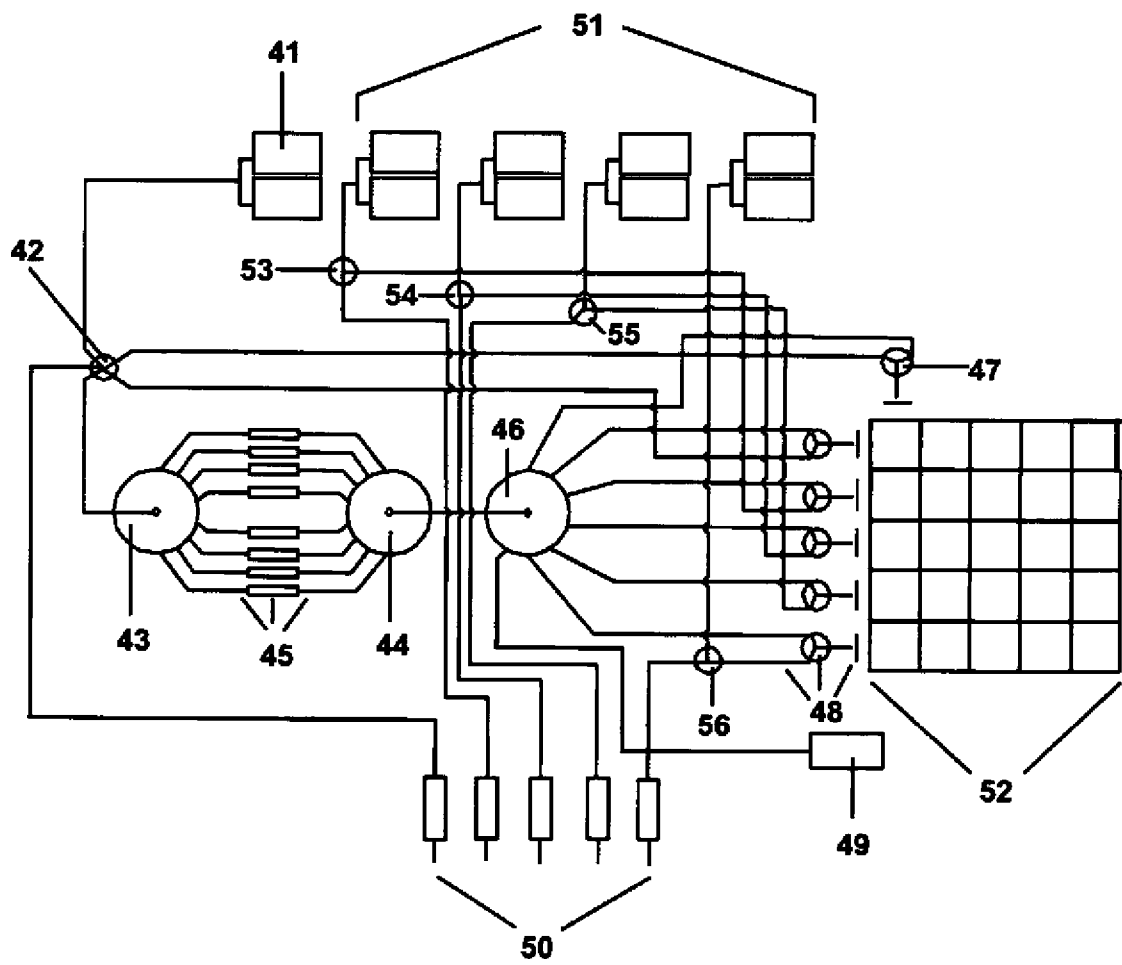
Figur 7



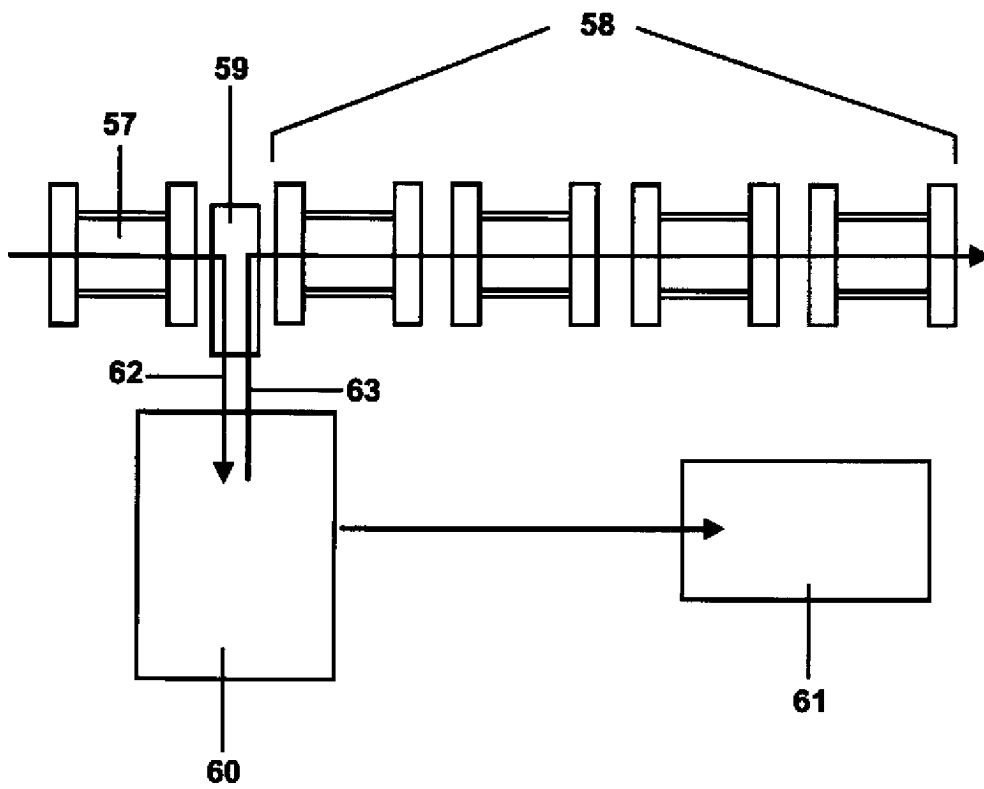
Figur 8



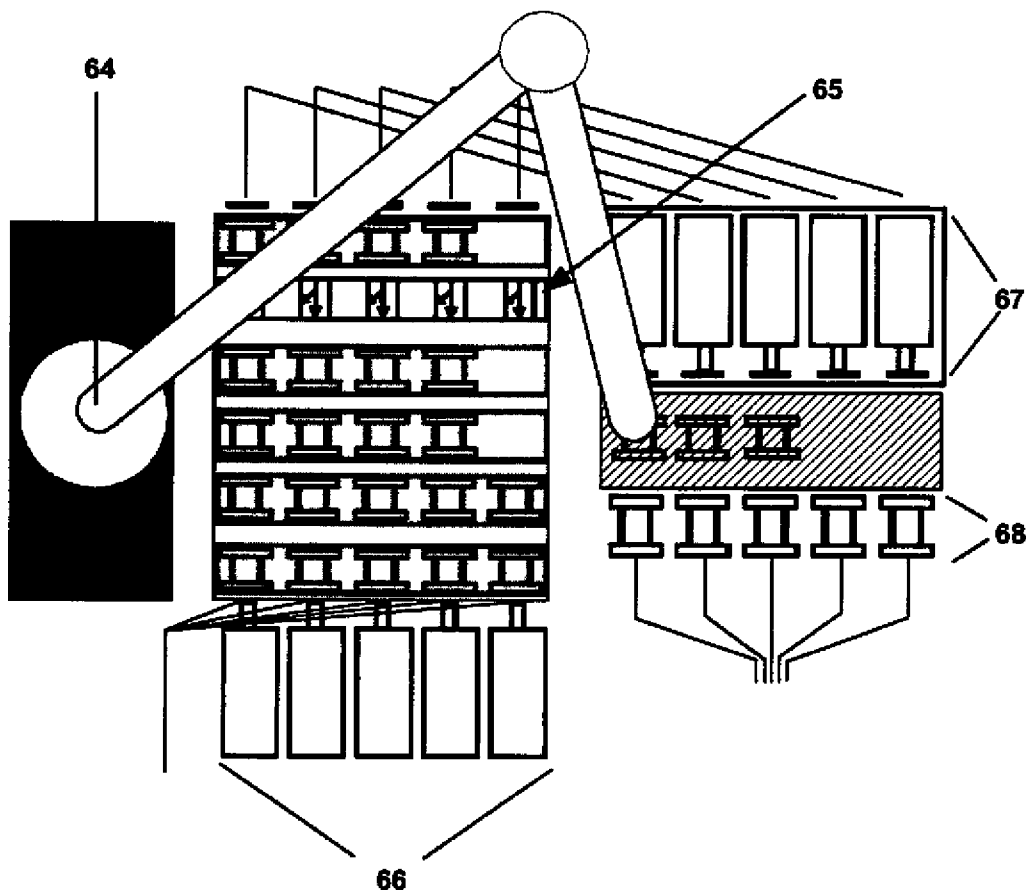
Figur 9



Figur 10



Figur 11



Figur 12

