

## Inhaltsverzeichnis

Vorwort XIII

Autorenliste XV

Zum Aufbau des Buches XVII

### Teil I Auswertung in der Chromatographie – die Integration 1

#### 1 Das Chromatogramm 3

*Daniel Stauffer*

##### 1.1 Chromatographischer Prozess 3

##### 1.1.1 Selektivität und Effizienz – Maß für die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit 4

##### 1.2 Chromatographische Kenngrößen 5

##### 1.2.1 Retentionsgrößen 5

##### 1.2.1.1 Totzeit ( $t_m$ ; $t_0$ ) 5

##### 1.2.1.2 Bruttoretentionszeit ( $t_{ms}$ ; $t_R$ ) 5

##### 1.2.1.3 Nettoretentionszeit ( $t_s$ ) 6

##### 1.2.1.4 Retentionsfaktor oder Kapazitätsfaktor ( $k$ ; $k'$ ) 6

##### 1.2.2 Peak-Ausdehnung und Peakform 6

##### 1.2.2.1 Basispeakbreite ( $w_b$ ) 6

##### 1.2.2.2 Peakbreite in halber Höhe ( $w_h$ ) 7

##### 1.2.2.3 Peakhöhe ( $h$ ) 7

##### 1.2.2.4 Peaksymmetrie, Tailingfaktor ( $T$ ) 7

##### 1.2.3 Auflösungsgrößen 9

##### 1.2.3.1 Die Auflösung ( $R$ ) 9

##### 1.2.3.2 Quantitative Größe der Selektivität 10

##### 1.2.3.3 Quantitative Größen für die Effizienz der Trennsäule 11

##### 1.2.4 Bestimmung von kleinen Substanzmengen 12

##### 1.2.4.1 Ermitteln der Nachweis-, Erfassungs-, Entscheidungs- und Bestimmungsgrenze 13

*Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*

1.3	van Deemter- und Golay-Gleichung	15
1.4	Erzeugen von Chromatogrammen	18
1.4.1	Datenaufnahme, Erzeugen der Rohdaten	19
1.4.1.1	Bei der Datenaufnahme verwendete Parameter	22
1.4.1.2	Beispiele der unterschiedlichen Art der Datenaufnahme	24
1.4.1.3	Innere/äußere Chromatogramme	28
1.4.1.4	2-D-/3-D-Chromatogramme	28
1.4.2	Charakterisierung von Detektoren	30
1.4.2.1	Zerstörend/nicht zerstörend	31
1.4.2.2	Selektiv, spezifisch, universell	31
1.4.2.3	Konzentrations- und massenstromabhängige Detektoren	31
1.4.2.4	Detektorempfindlichkeit	33
1.4.2.5	Linearer und dynamischer Bereich	34
1.4.2.6	Ansprechzeit, Zeitkonstante	35
1.5	Integration	39
1.5.1	Integration anschaulich	39
1.5.1.1	Methoden zur Peakerkennung	41
1.5.2	Integration und Integrationsparameter, Beispiele	43
1.5.2.1	Datenaufnahme und -integration mit Empower 2	43
1.5.2.2	Datenaufnahme und -integration mit Chromeleon	45
1.5.2.3	Datenaufnahme und -integration mit EZChrom Elite	47
1.5.2.4	Datenaufnahme und -integration mit ChemStation	47
1.5.2.5	Vergleich der wichtigsten Integrationsparameter von vier unterschiedlichen Integrationsprogrammen	48
	Anhang: Experimente zur Optimierung der Zeitkonstante/ Datensammelrate	50
	Literatur	53
<b>2</b>	<b>Integrationsfehler und Auswertung</b>	<b>55</b>
	<i>Hans-Joachim Kuss</i>	
2.1	Was sagt die Literatur über Integrationsfehler?	55
2.2	Integration in der täglichen Praxis	58
2.2.1	Integration – einfach und immer gleich?	58
2.2.2	Vergleich von Integrationssystemen mit wenigen großen Peaks	61
2.2.3	Vergleich von Integrationssystemen mit vielen kleinen Peaks	64
2.3	Chromatogramm-Simulation	66
2.3.1	Simulation eines digitalen Chromatogramms	68
2.3.2	Ein Peak	69
2.3.3	Mehrere Peaks	71
2.3.4	Rauschen	72
2.3.5	Drift	72
2.3.6	Gaschromatogramm	75
2.3.7	Verschmolzene Peaks	77
2.3.8	Datenpunktabstand	81
2.3.9	Tailing	87

2.3.10	Peakfläche und Peakhöhe	87
2.3.11	Andere Kenngrößen	88
2.4	Anwendungen der Simulation	89
2.4.1	Simulation einer Kalibriergeraden	91
2.4.2	Zehnfache Simulation an der Bestimmungsgrenze	98
2.4.3	Simulation eines isokratischen Chromatogramms	103
2.4.4	Simulation eines Gradienten-Chromatogramms	107
2.4.5	Nebenproduktanalyse	113
2.4.6	Eigene Chromatogramme simulieren	123
2.4.7	Welche Konsequenz ist daraus zu ziehen?	127
2.5	Auswertung	128
2.5.1	Auswertemethoden	129
2.5.2	Kalibrierung	131
2.5.3	Lineare Regression	131
2.5.4	Gewichtete lineare Regression	136
2.5.5	Nullpunktsgerade	140
2.5.6	Chromatogrammserien überprüfen	140
	<i>Literatur</i>	142
<b>3</b>	<b>Allgemeine Beurteilung analytischer Daten</b>	<b>145</b>
	<i>Joachim Ermer</i>	
3.1	(Normal-)Verteilung von analytischen Daten	145
3.2	Probleme des Schließens	149
3.3	Analytische Variabilität	153
3.3.1	Variabilitätsbeiträge und Präzisionsebenen	153
3.3.2	Systempräzision	155
3.3.3	Wiederholpräzision	157
3.3.4	Vergleichspräzision	159
3.3.4.1	Varianzanalyse	160
3.3.4.2	Literaturangaben zur Vergleichspräzision	162
3.3.5	Konsequenzen für das Design eines Prüfverfahrens	163
3.3.6	Konzentrationsabhängigkeit der Präzision	165
3.3.7	Schlussfolgerungen	168
3.4	(Be)Merkenswertes	168
	<i>Literatur</i>	169
<b>4</b>	<b>Metrologische Aspekte der Beurteilung chromatographischer Daten</b>	<b>171</b>
	<i>Ulrich Panne</i>	
4.1	Einführung	171
4.2	Messunsicherheit	173
4.3	Rückführbarkeit von analytischen Messungen	186
	<i>Literatur</i>	189

## Teil II Die Charakteristika der Auswertung in einzelnen LC-Modi 191

<b>5</b>	<b>Auswertung von GC-Daten</b>	<b>193</b>
	<i>Werner Engewald</i>	
5.1	Einführung	193
5.2	Worin unterscheidet sich die GC von der HPLC?	194
5.2.1	Welche Konsequenzen ergeben sich aus diesen Unterschieden?	195
5.2.1.1	Anwendbarkeit der GC	195
5.2.1.2	Probeninjektion	199
5.2.1.3	Trennsäule	200
5.2.1.4	Detektor	201
5.2.1.5	Schnelle Gaschromatographie	203
5.3	Qualitative Analyse	204
5.3.1	Vorbemerkung	204
5.3.1.1	Fingerprint-Analyse	205
5.3.1.2	Peakreinheit	205
5.3.2	Vergleich von Retentionswerten	206
5.3.3	Relative Retentionswerte	206
5.3.4	Retention Time Locking (RTL)	207
5.4	GC/MS-Kopplung	208
5.4.1	MS als identifizierender Detektor (Scan-Modus)	209
5.4.2	Nutzung von Spektrenbibliotheken	210
5.4.3	Spektren-Deconvolution	213
5.4.4	MS als massenselektiver Detektor	215
5.4.4.1	Massenfragmentographie (Reconstructed oder Extracted Ion Chromatogramm)	215
5.4.4.2	SIM (Single Ion Monitoring) oder MID (Multiple Ion Recording)	216
5.4.5	Chemische Ionisation	217
5.5	Quantitative Analyse	218
5.5.1	Aufstellen einer Analysensequenz	219
5.6	Isotopenverdünnungsanalyse (IVA) oder Stabilisotopen-verdünnungsanalyse (SIVA)	219
5.7	Matrixeffekte bei der Spurenanalytik	220
5.8	Headspace-GC	221
5.9	Abschätzung von Korrekturfaktoren beim FID	222
	<i>Literatur</i>	224
<b>6</b>	<b>Bewertung chromatographischer Daten in der Ionenchromatographie (IC)</b>	<b>225</b>
	<i>Heiko Herrmann und Detlef Jensen</i>	
6.1	Einleitung	225
6.2	Eluenten	226
6.2.1	Der Wasserdip – Lösemittelpeak der Ionenchromatographie	227
6.3	Kontaminationen	230
6.4	Kalibrierfunktionen	232
	<i>Literatur</i>	233

<b>7</b>	<b>Qualifizierung von GPC/GFC/SEC-Daten und -Ergebnissen</b>	<b>235</b>
	<i>Daniela Held und Peter Kilz</i>	
7.1	Einleitung	235
7.2	Grundlagen der GPC-Datenverarbeitung in der Ausschlusschromatographie	236
7.2.1	Berechnung der Molekulargewichtsmittelwerte	238
7.3	Richtlinien, Normen und Anforderungen an GPC-Datenverarbeitungsprozesse	241
7.4	Bewertung und Tests der GPC-Datenbearbeitungsprozesse	243
7.4.1	Beschreibung eines allgemeinen Verifikationsverfahrens für GPC-Software	243
7.4.2	Überprüfung der Richtigkeit der Berechnung der Molmassenverteilung	245
7.5	Einfluss von Datenprozessen, Kalibrationsverfahren und Signalqualität auf Richtigkeit und Reproduzierbarkeit von GPC-Ergebnissen	248
7.5.1	Prüfung der GPC-Auswertung mit direkter Kalibration	248
7.5.2	Überprüfung der Ergebnisgenauigkeit einer GPC-Viskositätskopplung	249
7.5.3	Einfluss des Detektor-Rauschens auf die Genauigkeit von GPC-Ergebnissen	250
7.5.4	Einfluss der Detektordrift auf die Genauigkeit von GPC-Ergebnissen	252
7.5.5	Einfluss der Datendichte auf die Genauigkeit von GPC-Ergebnissen	253
7.6	Einfluss von GPC-spezifischen Größen auf Verlässlichkeit und Richtigkeit von GPC-Resultaten	254
7.6.1	Einflussgrößen für GPC mit direkter Kalibration	255
7.6.1.1	Einfluss der Kalibration	255
7.6.1.2	Einfluss der Geräteeigenschaften (Geräteperformance)	259
7.6.1.3	Einfluss der Auswerteparameter	260
7.6.2	Einflussgrößen für GPC mit Lichtstreuendetektion	262
7.6.3	Vergleichspräzision und Wiederholbarkeit von GPC-Analysen	265
7.7	Zusammenfassung	265
	<i>Literatur</i>	266
<b>8</b>	<b>Auswertung in der LC-MS-Kopplung</b>	<b>267</b>
	<i>Hartmut Kirchherr</i>	
8.1	Einleitung	267
8.2	Chromatographie und Matrixeinfluss	268
8.3	Interne Standards	276
8.4	Einstellungen Massenspektrometer	280
8.5	Auswertesoftware	282
	<i>Literatur</i>	283

### **Teil III Anforderungen an und Umgang mit chromatographischen Daten aus Sicht von Organisationen und Behörden 285**

#### **9 Beurteilung von analytischen Daten in der Lebensmittelanalytik 287** *Herbert Otteneder*

- 9.1 Aufgaben der Behörde 287
- 9.2 Problembereiche 287
  - 9.2.1 Pflanzenschutzmittelrückstände 289
    - 9.2.1.1 In-house-Qualitätskontrolle (= IQC: *Internal Quality Control*) 292
    - 9.2.1.2 Laborvergleichsuntersuchung (LVU), *Proficiency Test* 292
    - 9.2.1.3 Validierungsstudie (*Method Performance Study*) 293
  - 9.2.2 Schadstoffe, Kontaminanten und Mykotoxine 294
  - 9.2.3 Pharmakologisch wirksame Stoffe 295
- 9.3 Definition und Bestimmung der Messunsicherheit 297
  - 9.3.1 Analyse der Einzelkomponenten, „bottom-up“-Prinzip 297
  - 9.3.2 Berechnung aus der Vergleichsstandardabweichung, „top down“-Prinzip 298
  - 9.3.3 Berechnung mit der Horwitz-Gleichung 298
  - 9.3.4 Der „Tauglichkeits“-Ansatz 299
  - 9.3.5 Ergebnis-Interpretation mit Hilfe der Messunsicherheit 299
- 9.4 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze 300
- 9.5 Das Problem der Wiederfindung 303
- 9.6 Die Probennahme 306
- 9.7 Nationale und internationale Leitlinien und Gremien zur Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie 309  
*Literatur* 312

#### **10 Beurteilung von analytischen Daten aus Behördensicht – Regelarbeitsweise und AQS für selten angewandte und zeitaufwändige Analysenverfahren 315** *Günter Papke*

- 10.1 Einleitung 315
- 10.2 Werkzeuge und Definitionen für die AQS 316
  - 10.2.1 Kontrollproben 316
  - 10.2.2 Kontrollkarten/Zielwertkarten 316
  - 10.2.3 Objektbezogene AQS 320
  - 10.2.4 Stichproben-AQS 320
  - 10.2.5 Stellvertreterproben-AQS 320
  - 10.2.6 Validierung von Analysenverfahren 320
  - 10.2.7 Messunsicherheit 323
  - 10.2.8 Zusammengefasste AQS-Werkzeuge 324
- 10.3 Praxis der AQS 328
  - 10.3.1 Hierarchisch aufgebaute AQS 328
  - 10.3.2 Praxis bei selten angewandten und zeitaufwändigen Analysenverfahren 330

10.3.2.1	AQS-Vorgehensweise für selten angewandte Analysenverfahren	331
10.3.2.2	AQS-Vorgehensweise für zeitaufwändige Analysenverfahren	333
10.4	Beurteilung der Analysenergebnisse	336
10.5	Fazit und Ausblick	337
	<i>Literatur</i>	338
<b>11</b>	<b>Auswertung Chromatographischer Daten nach den Arzneibüchern – Kontrolle von Verunreinigungen</b>	<b>339</b>
	<i>Ulrich Rose</i>	
11.1	Problemstellung	339
11.2	Auswertung qualitativer Daten	340
11.2.1	Systemeignungstest	343
11.3	Auswertung quantitativer Daten	345
	<i>Literatur</i>	347
<b>12</b>	<b>Anforderungen an analytische Prüfverfahren im Rahmen der Arzneimittelzulassung</b>	<b>349</b>
	<i>Susanne Keitel</i>	
12.1	Einführung	349
12.2	Beschreibung chromatographischer Prüfverfahren im Zulassungsdossier	349
12.3	Arzneibuchverfahren	352
12.4	Anforderungen an die Validierung und Bewertung durch die Zulassungsbehörde	355
12.5	Anforderungen der Zulassungsbehörde im Rahmen von Anträgen auf Genehmigung klinischer Prüfungen	360
12.5.1	Häufige Mängel	361
12.5.2	Spezielle Mängel	361
12.5.3	Fallbeispiele	362
	<i>Literatur</i>	364
<b>13</b>	<b>Anforderungen an (chromatographische) Daten in der pharmazeutischen Analytik</b>	<b>365</b>
	<i>Joachim Ermer</i>	
13.1	Systemeignungstests	365
13.1.1	Europäisches Arzneibuch (EP)	367
13.1.1.1	Chromatographische Parameter	369
13.1.1.2	Signal/Rausch-Verhältnis	370
13.1.1.3	Systempräzision	371
13.1.2	US-Arzneibuch	373
13.1.3	FDA Reviewer Guidance	374
13.2	Spezifikationsgrenzen und Präzision	375
13.2.1	Gehaltsbestimmungen	375
13.2.1.1	Auf Grundlage des Methodenfähigkeitsindex	375
13.2.1.2	Auf Grundlage des 95-%-Prognosebereiches (DPHG-Verfahren)	376

13.2.2	Nebenproduktbestimmungen	377
13.2.3	(Be)Merkenwertes	378
13.3	Interpretation und Behandlung analytischer Daten	378
13.3.1	Voraussetzungen	378
13.3.2	Messprinzipien und Variabilität	378
13.3.3	Ausreißer	379
13.3.4	Vergleich von Analysenergebnissen	380
13.3.5	Präzision	380
13.3.6	Richtigkeit	382
13.3.7	(Be)Merkenwertes	383
	<i>Literatur</i>	384
<b>14</b>	<b>Über Bewertung und Wertung chromatographischer Daten</b>	<b>385</b>
	<i>Stavros Kromidas</i>	
14.1	Einleitung	385
14.2	Die Situation – oder warum ändert sich so wenig?	385
14.3	Wie kann sich etwas ändern und wann ist es überhaupt notwendig?	387
14.4	Wer kann etwas ändern?	390
	 <b>Stichwortverzeichnis</b>	 <b>393</b>