

Inhaltsverzeichnis

Vorwort *XIII*

Zum Aufbau des Buches *XV*

Autorenverzeichnis *XVII*

| | |
|----------|--|
| 1 | LC/MS-Kopplung <i>1</i> |
| 1.1 | Stand der Technik in der LC/MS-Kopplung <i>1</i> |
| 1.1.1 | Einleitung <i>1</i> |
| 1.1.2 | Ionisationsmethoden bei Atmosphärendruck-Massenspektrometern <i>2</i> |
| 1.1.2.1 | Übersicht API-Methoden <i>4</i> |
| 1.1.2.2 | ESI <i>5</i> |
| 1.1.2.3 | APCI <i>7</i> |
| 1.1.2.4 | APPI <i>8</i> |
| 1.1.2.5 | APLI <i>8</i> |
| 1.1.2.6 | Bestimmung der Ionensuppression <i>9</i> |
| 1.1.2.7 | Beste Ionisationsmethode für die jeweilige Fragestellung <i>10</i> |
| 1.1.3 | Massenanalysatoren <i>10</i> |
| 1.1.4 | Zukünftige Entwicklungen <i>13</i> |
| 1.1.5 | Worauf sollten Sie beim Kauf eines Massenspektrometers achten? <i>13</i> |
| 1.2 | Technische Aspekte und Fallstricke der LC/MS-Kopplung <i>14</i> |
| 1.2.1 | Apparative Gesichtspunkte <i>15</i> |
| 1.2.1.1 | Das passende Massenspektrometer zur analytischen Fragestellung <i>15</i> |
| 1.2.1.2 | (U)HPLC und Massenspektrometrie <i>19</i> |
| 1.2.2 | MS-Kompatibilität von LC-Methoden – die Trennchemie passt sich an <i>34</i> |
| 1.2.2.1 | Flussrate und Ionisationsprinzip <i>35</i> |
| 1.2.2.2 | Eluentenzusammensetzung <i>37</i> |
| 1.2.3 | Qualität der MS-Spektren und der LC/MS-Chromatogramme <i>39</i> |
| 1.2.3.1 | Kein Signal <i>39</i> |
| 1.2.3.2 | Schlecht angepasste Quellenbedingungen und ihre Auswirkung auf das Chromatogramm <i>40</i> |
| 1.2.3.3 | Ionensuppression <i>42</i> |

| | | |
|----------|--|------------|
| 1.2.3.4 | Unbekannte Massensignale im Massenspektrum | 43 |
| 1.2.3.5 | Apparative Gründe für Fehlinterpretation von Massenspektren | 48 |
| 1.2.4 | Fazit | 50 |
| 1.2.5 | Abkürzungen | 51 |
| 1.3 | LC/MS-Kopplung in der Praxis – Anwender berichten | 51 |
| 2 | HPLC-GC-Kopplung in der Praxis: Grundlagen, Applikationsbeispiele und Ausblick | 61 |
| 2.1 | Einleitung | 61 |
| 2.2 | Allgemeiner Aufbau | 63 |
| 2.3 | LC-GC oder LCxGC – Heartcut vs. Comprehensive | 64 |
| 2.4 | HPLC als Vortrennung für die GC | 66 |
| 2.5 | Instrumentelle Anforderungen an die HPLC | 68 |
| 2.6 | LC-GC-Transfer und Echtzeitverdampfung | 70 |
| 2.7 | PTV-Solvent-Split | 71 |
| 2.8 | Geschwindigkeitskontrollierte Injektion | 73 |
| 2.9 | At-Once-Injection/Rapid LV-Injection | 75 |
| 2.10 | On-Column-Techniken | 75 |
| 2.11 | Alternative On-Column-Transfertechniken | 77 |
| 2.12 | Solvent Trapping und Bandenverbreiterung | 78 |
| 2.13 | Der frühe Dampfausgang (SVE) | 80 |
| 2.14 | Simultane Lösungsmittelverdampfung (concurrent solvent evaporation) | 81 |
| 2.15 | Partiell simultane Lösungsmittelverdampfung (partially concurrent solvent evaporation) | 83 |
| 2.16 | Erfahrungen aus der Praxis und Fehlersuche | 85 |
| 2.17 | Anwendungsbeispiele | 91 |
| 2.18 | Fazit und Ausblick | 98 |
| 3 | Optimierungsstrategien in der RP-HPLC | 101 |
| 3.1 | Einführung | 101 |
| 3.1.1 | Geschwindigkeit der Analyse | 101 |
| 3.1.2 | Verbesserung der Auflösung, besonders bei komplexen Proben | 102 |
| 3.1.3 | Senkung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen | 102 |
| 3.1.4 | Senkung der Kosten einer Methode | 103 |
| 3.2 | Grundlagen | 104 |
| 3.2.1 | Auflösung der Peaks im Chromatogramm | 104 |
| 3.2.2 | Grundlagen der kinetischen Optimierung | 109 |
| 3.2.3 | Der Einfluss der Säulendimensionen | 113 |
| 3.3 | Methodik der Optimierung | 116 |
| 3.3.1 | Die Optimierung der Selektivität | 116 |
| 3.3.1.1 | Die praktische Methodenoptimierung und die Rolle der Selektivität | 117 |
| 3.3.1.2 | Wie steuern wir die Selektivität in der HPLC? | 118 |
| 3.3.2 | Die Rolle der Temperatur in der HPLC | 126 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.3.2.1 | Retention und Selektivitätskontrolle per Temperatur – Möglichkeiten und Grenzen | 126 |
| 3.3.2.2 | Methodenbeschleunigung durch Temperaturerhöhung | 130 |
| 3.3.3 | Zusammenhänge zwischen Eluentenzusammensetzung und Temperatur bei der Optimierung der HPLC | 138 |
| 3.3.4 | Methodenbeschleunigung durch Verbesserung der Trennleistung stationärer Phasen | 143 |
| 3.3.4.1 | Die systematische Geschwindigkeitsoptimierung über Teilchendurchmesser und Säulenlänge | 143 |
| 3.3.4.2 | Der Reiz von Monolithen und Solid-Core-Materialien | 152 |
| 3.3.5 | Optimierung der Auflösung über den Teilchendurchmesser und/oder die Säulenlänge | 155 |
| 3.3.6 | Hochauflösende HPLC in einer oder mehreren Dimensionen | 158 |
| 3.3.7 | Optimierung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen | 166 |
| 3.3.7.1 | Massendetektionslimit | 167 |
| 3.3.7.2 | Konzentrationsdetektionslimit | 168 |
| 3.3.8 | Optimierung in der Praxis | 170 |
| 3.3.8.1 | Prinzipielle Vorgehensweise | 170 |
| 3.3.9 | Formeln und Regeln im Überblick | 171 |
| 3.4 | Ausblick | 179 |
| 3.4 | Danksagung | 181 |
| 4 | Der Gradient in der RP-Chromatographie | 183 |
| 4.1 | Aspekte der Gradientenoptimierung | 183 |
| 4.1.1 | Einführung | 183 |
| 4.1.2 | Besonderheiten des Gradienten | 183 |
| 4.1.3 | Einige chromatographische Größen und Formeln | 185 |
| 4.1.3.1 | Bemerkungen zu Gl. 4.2, 4.3 und 4.4 oder isokratische vs. Gradiententrennungen | 187 |
| 4.1.4 | Nachweisgrenze, Peakkapazität, Auflösung – Möglichkeiten der Optimierung | 189 |
| 4.1.4.1 | Nachweisgrenze | 189 |
| 4.1.4.2 | Peakkapazität und Auflösung | 190 |
| 4.1.5 | Gradienten-„Mythen“ | 195 |
| 4.1.6 | Beispiele zur Optimierung von Gradientenläufen: ausreichende Auflösung in einer adäquaten Zeit | 196 |
| 4.1.7 | Gradienten-Aphorismen | 212 |
| 4.2 | Vorhersage von Gradienten | 214 |
| 4.2.1 | Lineares Modell – Vorhersage aus 2 Chromatogrammen | 214 |
| 4.2.1.1 | Was sagt der Retentionsfaktor k aus? | 214 |
| 4.2.1.2 | Was bedeuten die beiden Retentionsfaktoren k_g und k_e ? | 219 |
| 4.2.1.3 | Wie sieht das Integrations- und Steuersystem den Gradienten? | 221 |
| 4.2.1.4 | Wie sieht die HPLC-Säule den Gradienten? | 221 |
| 4.2.1.5 | Wie sehen die Analysesubstanzen den Gradienten? | 222 |
| 4.2.1.6 | Interpretation des $\ln(k)$ - zu % B-Diagramms | 222 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.2.1.7 | Die apparative Gradientenverzögerung (Dwell Time) | 226 |
| 4.2.1.8 | Verlängerung des Gradienten nach unten bei gleicher Steigung | 228 |
| 4.2.2 | Kurvilineares Modell – mehr als zwei Eingabechromatogramme | 230 |
| 4.2.2.1 | Die $\ln(k)$ -Geraden sind oft gar nicht gerade | 230 |
| 4.2.2.2 | Die $\ln(k)$ - zu % B-Anpassung nach Neue | 232 |
| 4.2.2.3 | Vorhersage mit Excel | 234 |
| 4.2.2.4 | Die Wechselwirkung ist temperaturabhängig | 237 |
| 4.2.2.5 | Optimierungsparameter | 237 |
| 4.2.2.6 | Kommerzielle Optimierungsprogramme | 239 |
| 4.2.2.7 | Wie genau muss die Vorhersage von k_g und k_e sein? | 241 |
| 4.2.3 | Wie gehe ich systematisch vor? | 242 |
| 4.2.4 | Abkürzungsverzeichnis | 243 |
| 5 | Vergleich und Auswahl von modernen HPLC-Säulen | 245 |
| 5.1 | Trägermaterialien | 245 |
| 5.1.1 | Warum Kieselgel? | 246 |
| 5.2 | Stationäre Phasen für die HPLC – die geschichtliche Entwicklung | 247 |
| 5.3 | pH-Stabilität und Restriktionen beim Einsatz von Kieselgel | 250 |
| 5.4 | Die Kerneigenschaften von Umkehrphasen | 252 |
| 5.4.1 | Die Hydrophobie der Umkehrphasen | 252 |
| 5.4.2 | Die hydrophobe Selektivität | 252 |
| 5.4.3 | Die silanophile Aktivität | 253 |
| 5.4.4 | Die molekulare Formerkennung (shape selectivity) | 253 |
| 5.4.5 | Die polare Selektivität | 254 |
| 5.4.6 | Der Metallgehalt | 254 |
| 5.5 | Charakterisierung und Klassifizierung von Umkehrphasen | 255 |
| 5.5.1 | Über die Aussagekraft von Retentions- und Selektivitätsfaktoren bei Säulentests | 256 |
| 5.5.1.1 | Vorbemerkung | 256 |
| 5.5.1.2 | Kriterien zum Vergleich von Säulen | 259 |
| 5.5.2 | Säulenvergleich, Vergleichskriterium: Ähnlichkeit von Selektivitäten | 262 |
| 5.5.3 | Zwei einfache Tests zur Charakterisierung von RP-Phasen | 265 |
| 5.6 | Vorgehensweise bei der Methodenentwicklung in der Praxis | 266 |
| 5.6.1 | Das Zusammenspiel zwischen mobiler und stationärer Phase | 267 |
| 5.6.2 | Welche Trennsäulen sollten verwendet werden und wie setze ich diese ein? | 268 |
| 5.6.3 | Was tun, wenn die Analyten sehr polar sind und auf den genannten Säulen keine Retention aufweisen? | 271 |
| 5.6.3.1 | AQ-Säulen, polare RP-Säulen und Ionenpaarchromatographie | 271 |
| 5.6.3.2 | Mixed Mode Säulen | 273 |
| 5.6.3.3 | Ionenausschlussäulen/Ligandenaustauschchromatographie | 274 |
| 5.6.3.4 | HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) | 274 |
| 5.6.3.5 | Poröser Kohlenstoff | 276 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.7 | Säulenscreening | 276 |
| 5.8 | Säulendatenbanken | 281 |
| 6 | Trenntechniken in der Biochromatographie | 285 |
| 6.1 | Einleitung | 285 |
| 6.2 | Übersicht stationäre Phasen | 288 |
| 6.2.1 | Basismaterialien | 288 |
| 6.2.2 | Charakterisierung von stationären Phasen | 288 |
| 6.2.2.1 | Partikelform | 288 |
| 6.2.2.2 | Partikelgröße | 290 |
| 6.2.2.3 | Porengröße und Oberfläche | 291 |
| 6.2.2.4 | Beladungsdichte | 293 |
| 6.2.2.5 | Reinheit | 294 |
| 6.2.2.6 | Funktionelle Gruppe | 295 |
| 6.3 | Reversed Phase-Chromatographie von Peptiden und Proteinen | 295 |
| 6.3.1 | Retentionsverhalten von Peptiden und Proteinen | 295 |
| 6.3.2 | Gradientendesign | 295 |
| 6.3.3 | Organische Modifier | 297 |
| 6.3.4 | Ionenpaarreagenz | 298 |
| 6.3.5 | Einfluss des pH-Wertes | 299 |
| 6.3.6 | Porengröße | 300 |
| 6.3.7 | Belegung | 300 |
| 6.4 | IEX-Chromatographie von Peptiden und Proteinen | 300 |
| 6.4.1 | Parameter der IEC | 301 |
| 6.5 | Size-Exclusion-Chromatographie von Peptiden und Proteinen | 304 |
| 6.5.1 | Parameter der SEC | 305 |
| 6.6 | Weitere Chromatographiearten – Kurzbeschreibungen | 307 |
| 6.6.1 | Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) | 307 |
| 6.6.2 | Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) | 308 |
| 6.6.3 | Affinity Chromatography (AC) | 308 |
| 6.7 | Zusammenfassung und Ausblick | 309 |
| 7 | Vergleich moderner Chromatographie-Datensysteme | 311 |
| 7.1 | Einleitung | 311 |
| 7.2 | Die Vorläufer der CDS | 311 |
| 7.3 | Das CDS heute | 312 |
| 7.3.1 | Datenbank- oder filebasierendes System | 312 |
| 7.3.1.1 | Vor- und Nachteile filebasierender CDS | 312 |
| 7.3.1.2 | Vor- und Nachteile datenbankbasierender CDS | 313 |
| 7.3.2 | Das CDS im Netzwerk | 314 |
| 7.3.3 | Gerätesteuerung | 315 |
| 7.3.4 | Dokumentation und Compliance | 316 |
| 7.3.5 | Aktuelle Systeme im Überblick | 317 |
| 7.4 | Tabellarischer Vergleich von Empower und Chromeleon sowie OpenLAB CDS | 319 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 7.5 | Das CDS von morgen | 319 |
| 7.5.1 | MS-Integration | 319 |
| 7.5.2 | Große Installationen | 319 |
| 7.5.3 | Einfache und intuitive Bedienung | 322 |
| 7.5.4 | Spezielle Erweiterungen | 323 |
| 7.5.4.1 | Integrationsunterstützung | 323 |
| 7.5.4.2 | Säulenverwaltung | 324 |
| 7.5.4.3 | Geräteauslastung | 324 |
| 7.5.4.4 | Anbindung von Waagen | 324 |
| 7.5.5 | Offene Schnittstellen | 325 |
| 7.5.6 | Geräteintegration | 326 |
| 7.6 | Das CDS in 20 Jahren | 327 |
| | | |
| 8 | Möglichkeiten der Integration heute | 329 |
| 8.1 | Peaküberlagerung – Auswirkung auf das Chromatogramm | 329 |
| 8.2 | Abtrennmethoden für überlagerte Peaks | 330 |
| 8.2.1 | Lotmethode | 331 |
| 8.2.2 | Tangentielle und Valley-to-valley Abtrennmethode | 332 |
| 8.2.3 | Gauß- und exponentielle Abtrennmethode | 332 |
| 8.3 | Anwendung der Abtrennmethoden | 333 |
| 8.4 | Chromatogrammsimulation | 333 |
| 8.5 | Dekonvolution | 334 |
| 8.6 | Evaluierung von Abtrennmethoden | 337 |
| 8.7 | Praktische Anwendung der Dekonvolution | 339 |
| | | |
| 9 | HPLC im reglementierten Bereich | 345 |
| 9.1 | Intelligente Dokumentation | 345 |
| 9.1.1 | Einführung | 345 |
| 9.1.2 | Ziele der Dokumentation | 347 |
| 9.1.2.1 | Dokumentation aus Sicht der Organisation | 348 |
| 9.1.2.2 | Dokumentation aus Sicht der Prozesse | 349 |
| 9.1.2.3 | Dokumentation aus Sicht der Kommunikation | 352 |
| 9.1.2.4 | Dokumentation aus Sicht der Information | 354 |
| 9.1.2.5 | Dokumentation aus Sicht der Wissensspeicherung | 361 |
| 9.1.2.6 | Behördliche Vorgaben für die Dokumentation im Labor | 361 |
| 9.1.3 | Das Lebenszyklusmodell für regulierte Dokumente in der Praxis | 363 |
| 9.1.4 | Umgang mit Hybridsystemen aus Papier und elektronischen Aufzeichnungen | 365 |
| 9.1.4.1 | Vor- und Nachteile von Papier vs. elektronischen Dokumenten | 365 |
| 9.1.4.2 | Umsetzungsstrategie | 367 |
| 9.1.5 | Ausblick | 368 |
| 9.2 | Tipps für eine gelungene FDA-Inspektion | 369 |
| 9.2.1 | Einführung | 369 |
| 9.2.2 | Vorbereitung mit dem Inspektionsmodell | 371 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 9.2.2.1 | Materialien, Reagenzien, Referenzstandards | 371 |
| 9.2.2.2 | Räumlichkeiten und Ausrüstung | 372 |
| 9.2.2.3 | Laborkontrollen | 374 |
| 9.2.2.4 | Personal | 376 |
| 9.2.2.5 | Qualitätsmanagement | 377 |
| 9.2.2.6 | Dokumente und Aufzeichnungen | 378 |
| 9.2.3 | Typischer Ablauf einer FDA-Inspektion | 379 |
| 9.2.4 | Während der Inspektion | 382 |
| 9.2.4.1 | Verhalten in Inspektionen | 383 |
| 9.2.4.2 | Ablauf des Laborrundgangs (lab walk through) | 385 |
| 9.2.4.3 | Die Inspektion im Audit-Raum | 385 |
| 9.2.4.4 | Umgang mit offensichtlich schwerwiegenden Beobachtungen | 386 |
| 9.2.4.5 | Die Dokumentation von Beobachtungen auf dem Formblatt FDA 483 | 387 |
| 9.2.5 | Nachbereitung der Inspektion | 388 |
| 10 | Effiziente Informationsbeschaffung im Zeitalter von Web 2.0 am Beispiel der HPLC | 391 |
| 10.1 | Suchmaschinen: Möglichkeiten und Grenzen | 391 |
| 10.2 | Spezielle Suchdienste | 393 |
| 10.3 | Suche nach Fachinformationen | 394 |
| 10.3.1 | Stoffdaten | 394 |
| 10.3.2 | Applikationen/Methoden | 395 |
| 10.3.2.1 | Behörden und Institutionen | 395 |
| 10.3.2.2 | Hersteller von Analysengeräten und Zubehör | 395 |
| 10.3.2.3 | Zeitschriften und Portale | 397 |
| 10.3.3 | Troubleshooting | 397 |
| 10.3.4 | Hintergrundinfos und Theorie | 399 |
| 10.3.5 | Produktinformationen | 400 |
| 10.3.6 | Literatur | 401 |
| 10.3.6.1 | Fachzeitschriften | 401 |
| 10.3.6.2 | Fachbücher | 404 |
| 10.3.6.3 | Master-/Diplom- und Doktorarbeiten | 405 |
| 10.3.6.4 | Konferenzberichte | 405 |
| 10.4 | Welche Mehrwerte bieten Firmenseiten? | 405 |
| 10.5 | Kostenpflichtige Inhalte | 406 |
| 10.6 | Apps für Tablets und Mobiltelefone | 407 |
| 10.7 | Einsatzmöglichkeiten sozialer Netzwerke | 408 |
| 10.8 | Prognose: Wie werden sich soziale Netzwerke entwickeln? | 409 |
| 10.9 | Wie kann man sich über aktuelle Neuigkeiten auf dem Laufenden halten? | 409 |

| | | |
|-------------------------------------|---|------------|
| 11 | Trends in der Detektionstechnik | 411 |
| 11.1 | Einführung und Funktionsprinzip von Aerosoldetektoren | 411 |
| 11.2 | Gemeinsame Charakteristika, Vor- und Nachteile der einzelnen Detektoren | 412 |
| Stichwortverzeichnis 415 | | |