

Inhaltsverzeichnis

Vorwort XIII

Zum Aufbau des Buches XV

Autorenverzeichnis XVII

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

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	Ionenausschlussssäulen/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	Tangentiale 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

XII | Inhaltsverzeichnis

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