

Inhaltsverzeichnis

Vorwort *XIII*

Zum Aufbau des Buches *XV*

Beitragsautoren *XVII*

1	Wann sollte ich meine UHPLC als UHPLC betreiben?	<i>1</i>
	<i>S. Kromidas</i>	
1.1	Was möchte ich erreichen und was „kann“ die UHPLC?	<i>1</i>
1.2	Anforderungen an eine HPLC-Methode	<i>3</i>
1.2.1	Gut trennen	<i>3</i>
1.2.2	Schnell trennen	<i>13</i>
1.2.3	Massenempfindlichkeit verbessern (konstantes Injektionsvolumen)	<i>15</i>
1.2.4	Robuste Trennungen gewährleisten	<i>17</i>
1.3	Die UHPLC im Alltag	<i>19</i>
1.4	Wie kann das Potenzial der UHPLC tatsächlich ausgeschöpft werden?	<i>23</i>
1.5	Zusammenfassung und Ausblick	<i>26</i>
	Literatur	<i>29</i>

Teil 1 Hardware/Software Spezifika, Trennmodi, Materialien *31*

2	Die moderne HPLC-/UHPLC-Anlage	<i>33</i>
2.1	Heutige Anforderungen an die einzelnen Module	<i>33</i>
	<i>S. Wiese</i>	
2.1.1	Überblick	<i>33</i>
2.1.2	UHPLC-Pumpentechnik	<i>34</i>
2.1.3	Autosampler	<i>41</i>
2.1.4	Säulenofen	<i>47</i>
2.1.5	Detektoren	<i>50</i>
2.1.6	Kapillaren/Verschraubungen	<i>53</i>
	Literatur	<i>57</i>

2.2	Der Säulenofen – eine einfache Angelegenheit? 59 <i>M. Heidorn und F. Steiner</i>
2.2.1	Thermische Betriebsweisen von Säulenöfen 62
2.2.2	Temperaturunterschiede zwischen mobiler Phase und LC-Säule 64
2.2.3	Reibungswärme – nur ein Phänomen der UHPLC? 69
2.2.4	Thermostatisierung in der Methodenübertragung 76
	Literatur 79
3	Das Problem der externen Bandenverbreiterung in einer HPLC-/UHPLC-Anlage 81 <i>M. Dittmann</i>
3.1	Theoretischer Hintergrund 83
3.1.1	Effizienz und Peakauflösung moderner UHPLC-Säulen 83
3.1.2	Bestimmung der Peakvolumina 85
3.2	Externe Bandenverbreiterung in UHPLC-Systemen 87
3.2.1	Die Ursachen externer Bandenverbreiterung in HPLC-/UHPLC-Systemen 87
3.2.2	Experimentelle Bestimmung der externen Bandenverbreiterung 97
3.3	Auswirkung externer Bandenverbreiterung in verschiedenen Applikationsbereichen 100
3.3.1	Einfluss auf isokratische Trennungen 100
3.3.2	Auswirkungen auf Gradiententrennungen 100
3.4	Optimierung des HPLC-/UHPLC-Systems 104
3.4.1	Test der Säuleneffizienz 105
3.4.2	Andere isokratische Trennungen 105
3.4.3	Hochauflösende Gradiententrennungen 106
3.4.4	Schnelle Gradiententrennungen 106
3.5	Zusammenfassung 107
	Literatur 108
4	Der Gradient – Anforderungen, optimaler Einsatz, Tricks und Fallstricke 111 <i>F. Steiner und M. Heidorn</i>
4.1	Apparative Einflüsse bei der Gradientenelution – ein Überblick 111
4.1.1	Gradientenverweilvolumen oder Gradientenverzögerungs- volumen 111
4.1.2	Rolle des Gradientenmischers 113
4.1.3	Auf physikalisch-chemischen Phänomenen beruhende Unterschiede zwischen Gradientenpumpentypen 115
4.1.4	Apparative Einflüsse außerhalb der Pumpe 121
4.1.5	Belastung und Abnutzung von Säulen bei Gradientenmethoden 124
4.2	Technische Umsetzung und Charakterisierung von Gradienten- HPLC 125
4.2.1	Wissenswertes und Grundlegendes zum Einfluss der bei Gradientenpumpen angewandten Förder- und Dosierungstechniken 126

4.2.2	Notwendigkeit der Entgasung der Laufmittelkomponenten	128
4.2.3	Verschiedene Pumpentypen (seriell, parallel, Nockenantrieb, Spindelantrieb) und ihre Spezifika	130
4.2.4	Auswirkungen der Pumpenbauart auf die Anwendung im Gradienten	134
4.2.5	Auswirkungen der Arbeitszyklen auf die Chromatographie und notwendige Abstimmungen bei HPG-Anlagen	135
4.2.6	Auswirkungen der Arbeitszyklen auf die Chromatographie und notwendige Abstimmungen bei LPG-Anlagen – eine gänzlich verschiedene Problematik	139
4.2.7	Thermische Effekte in einer Gradientenpumpe und ihre Auswirkungen	141
4.2.8	Methoden mit besonders steilen (ballistischen) Gradienten	142
4.2.9	Grundsätzliches zur Bestimmung des Gradientenverweilvolumens einer Apparatur	149
4.2.10	Die Markerpulsmethode als eine quick-and-dirty Lösung	150
4.2.11	Die Dolan-Methode – ein Klassiker und seine Varianten	152
4.2.12	Wie eine effektive Mischung bei einem angemessenen GDV technisch erreicht werden kann	154
4.2.13	Charakterisierung der Mischungseffizienz und Gradientenformung einer Apparatur	160
4.2.14	Richtiges Mischervolumen in Abhängigkeit von Pumpentyp, Flussrate und Applikation am Beispiel von TFA-Gradienten	166
4.2.15	Gradientenmischung und die Besonderheiten bei der Elution von Proteinen	173
	Literatur	174
5	Anforderungen bei der (U)HPLC-Kopplung mit unterschiedlichen Massenspektrometern	175
	<i>T. Teutenberg, T. Hetzel, C. Portner und J. Türk</i>	
5.1	Einleitung	175
5.2	Von der Target-Analytik zu Screeninguntersuchungen	176
5.2.1	Target-Analytik	176
5.2.2	Suspected-Target Screening	176
5.2.3	Non-Target Screening	177
5.3	Was ist bei der Kopplung von UHPLC und MS zu beachten?	178
5.3.1	Das Interface und die optimale Flussrate	178
5.3.2	Optimierung der massenspektrometrischen Parameter	179
5.3.3	Optimierung der chromatographischen Parameter	179
5.3.4	Auswahl der geeigneten Säule und Säulengeometrie	181
5.4	Target-Analytik mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie	184
5.5	Screening mittels LC-MS	192
5.6	Miniaturisierung – LC-MS quo vadis?	197
	Literatur	201

6	2D-Chromatographie – Möglichkeiten und Grenzen	203
	<i>Ti Teutenberg</i>	
6.1	Einführung – warum zweidimensionale HPLC?	203
6.2	Peakkapazität ein- und zweidimensionaler HPLC-Verfahren	205
6.2.1	Peakkapazität eindimensionaler Trennverfahren	205
6.2.2	Peakkapazität zweidimensionaler Trennverfahren	206
6.3	Modulation	210
6.3.1	Online Heart-Cut 2D LC	210
6.3.2	Umfassende Online 2D LC	211
6.3.3	Stop-Flow und Offline LC \times LC	213
6.4	Praktische Probleme der online LC \times LC	214
6.4.1	Kompatibilität der Lösemittelsysteme	214
6.4.2	Verdünnung	214
6.4.3	Hohe Flussraten	214
6.4.4	Kompatibilität mit Massenspektrometrie	215
6.5	Realisierung eines miniaturisierten LC \times LC-Systemaufbaus	215
6.5.1	Technische Plattform	215
6.5.2	Auswahl der stationären Phasen	216
6.5.3	Auswahl der mobilen Phase und Temperatur	217
6.5.4	Säulengeometrie und Modulation	217
6.5.5	Gradientenprogrammierung und Gesamtanalysenzeit	218
6.5.6	Kopplung mit Massenspektrometer	218
6.6	Applikationsbeispiel	219
6.6.1	Messung eines Referenzstandards	219
6.6.2	Messung einer Realprobe	221
6.7	Vorteile der MS/MS-Funktionalität	222
6.8	Offline LC \times LC versus Online LC \times LC	223
6.9	Lösungen der Gerätehersteller (in alphabetischer Reihenfolge)	226
6.9.1	Kommerziell verfügbare Gesamtlösungen für die LC \times LC	227
6.9.2	Weitere Systemlösungen	228
6.10	2D-LC – quo vadis?	228
6.10.1	Software	228
6.10.2	Systemkonfektionierung	229
6.10.3	Peakkapazität versus Realprobe	229
6.11	Abschließende Bemerkungen	230
	Literatur	231
7	Materialien in HPLC und UHPLC – was für welchen Zweck?	233
	<i>Tobias Fehrenbach und Steffen Wiese</i>	
7.1	Abkürzungsverzeichnis	233
7.2	Überblick	234
7.3	Anforderungen an Materialien einer UHPLC	235
7.3.1	Mechanische Beständigkeit	236
7.3.2	Chemische Beständigkeit	236
7.3.3	Kompatibilität zum Analyten/Biokompatibilität	237

7.4	Flusswege in einem UHPLC-System	238
7.4.1	Niederdruck- und Hochdruckflussweg	238
7.4.2	Flussweg der mobilen Phase und der Probe	239
7.5	Niederdruckflussweg	240
7.6	Hochdruckflussweg	242
7.6.1	Pumpe	242
7.6.2	Autosampler	249
7.6.3	Kapillaren und Verschraubungen	255
7.7	Wann und warum kann ein inertes UHPLC-System erforderlich sein?	260
7.7.1	Begriff der Inertheit	261
7.7.2	Natur der Passivschicht	262
7.7.3	Anforderungen und Wechselwirkungen	266
7.7.4	Passivierungsstrategien und -methoden	272
	Literatur	275

Teil 2 Erfahrungsberichte, Trends 281

8	Was muss die Software können, damit die Hardware optimal genutzt werden kann?	283
	<i>A. Simon</i>	
8.1	Einführung	283
8.2	Funktionalität und Bedienung	284
8.3	Integration	284
8.4	Gerätesteuerung	285
8.5	Bedienung	286
8.6	Ease of Use	287
8.7	Bedienoberflächen	288
8.8	Multilingual	289
8.9	Austausch von Daten	290
8.10	Datenimport und -export	291
8.11	Skalierbarkeit vom PC bis zur globalen Installation	292
9	Aspekte der modernen HPLC – Erfahrungsbericht eines Anwenders	295
	<i>Steffen Wiese</i>	
9.1	Einführung	295
9.2	Bestimmung des Gradientenverweilvolumens	295
9.3	Hochdurchsatztrennung (High Throughput Separations)	299
9.4	Methodentransfer zwischen UHPLC-Systemen unterschiedlicher Hersteller	302
9.5	Anwendung höherer Temperaturen	305
9.6	Injektion großer Volumina (Large Volume Injection, LVI)	307
9.7	UHPLC-Trennungen mit 1 mm Innendurchmesser Säulen	312
	Literatur	315

10	Erfahrungsbericht eines unabhängigen Serviceingenieurs – Tipps und Empfehlungen für einen optimalen Betrieb von Agilent- und Waters-Anlagen im Alltag	317
	<i>S. Chroustovsky</i>	
10.1	Einleitung	317
10.2	Der Degasser, Prinzipien	317
10.2.1	Verschiedene Hersteller, verschiedene Typen	318
10.3	Die Pumpe, Prinzipien	319
10.3.1	Verschiedene Hersteller, verschiedene Typen	321
10.4	Autosampler, Prinzipien	322
10.4.1	Verschiedene Hersteller, verschiedene Typen	324
10.5	Die UV-Detektoren, Prinzipien	325
10.5.1	Verschiedene Hersteller, verschiedene Typen	326
11	Der Analyt, die Fragestellung und die UHPLC – der Einsatz von UHPLC in der Praxis	329
	<i>S. Lamotte</i>	
11.1	Einleitung	329
11.2	Wann ist der Einsatz von UHPLC sinnvoll und wann eher nicht?	329
11.3	Freisetzungstests in der pharmazeutischen Industrie	331
11.4	Methodenentwicklung und -optimierung	331
11.5	Klassische flüssigchromatographische Analytik	332
11.6	Schnelle (meist zweite) Dimension der multidimensionalen Chromatographie	332
11.7	Trennung von (Bio)polymeren	333
11.8	Prozessanalysentechnik (PAT)	334
	Literatur	334
12	Gerätehersteller berichten	335
12.1	Agilent Technologies, Waldbronn	335
	<i>J. Trafkowski</i>	
	Literatur	345
12.2	Shimadzu, Duisburg	346
	<i>B.-T. Erxleben</i>	
12.3	Thermo Fisher Scientific, Germering	352
	<i>F. Steiner</i>	
12.3.1	Anforderungen an das gesamte System und wie die Erfahrung gelehrt hat diese zu meistern	352
12.3.2	Die Eluentenförderungseinheit, weit mehr als eine Hochdruckpumpe	357
12.3.3	Der Probengeber für das robuste Ausführen ultrapräziser Analysen, auch im Hochdurchsatz	358
12.3.4	Neue Wege der Säulenthalmostatisierung für die beste Trennleistung und Methodenübertragbarkeit	360

- 12.3.5 Auch eine exzellente ultraschnelle Trennung muss von einem Detektor aufgezeichnet werden 361
- 12.3.6 2D-LC zur Steigerung der Peakkapazität und andere Wege zu diesem Ziel sowie zur Steigerung der Produktivität 364

Über die Autoren 367

Index 371