

Inhaltsverzeichnis

Vorwort *V*

Zum Aufbau des Buches *VII*

Teil I Optimierungsstrategien für einzelne Fragestellungen *1*

1	2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen	3
	<i>Dwight R. Stoll</i>	
1.1	Motivationen für zweidimensionale Trennung	3
1.1.1	Schwierig zu trennende Proben	3
1.1.2	Komplexe Proben	4
1.1.3	Ziel der Trennung	4
1.2	Auswahl des zweidimensionalen Trennungsmodus	4
1.2.1	Das Analyseziel bestimmt den Modus	5
1.2.2	Gegenüberstellung der vier Modi für 2D-Trennungen	6
1.2.3	Hybride Modi bieten Flexibilität	7
1.3	Wahl der Trennmodi	8
1.3.1	Komplementarität als Leitmotiv	8
1.3.2	Die Pirok-Kompatibilitätstabelle	9
1.3.3	Bestimmung der Komplementarität von Trennungen	11
1.4	Auswahl der Trennungsbedingungen	12
1.4.1	Mit Vorgabe feststehende Bedingungen in der ersten Dimension	12
1.4.2	Bei null anfangen – flexible Bedingungen in der ersten Dimension	14
1.4.3	Besonderheiten bei umfassenden 2D-LC-Methoden	14
1.4.4	Faustregeln	14
1.5	Beispiele für die Methodenentwicklung	15
1.5.1	Beispiel Nr. 1 – Verwendung von LC-LC zur Identifizierung einer Verunreinigung in einem synthetischen Oligonukleotid	15
1.5.2	Beispiel Nr. 2 – umfassende 2D-LC-Trennung von Tensiden	16
1.6	Ausblick	18
	Literatur	19

2	Do you HILIC? Mit Massenspektrometrie? Dann bitte systematisch	23
	<i>Thomas Letzel</i>	
2.1	Ausgangssituation und optimale Nutzung von stationären HILIC-Phasen	26
2.2	Ausgangssituation und optimale Nutzung von mobiler HILIC-Phase	28
2.3	Weitere Einstellungen bzw. Bedingungen speziell für massenspektrometrische Detektion (siehe auch Kap. 3)	35
	Literatur	36
3	Optimierungsstrategien in der LC-MS-Methodenentwicklung	39
	<i>Markus M. Martin</i>	
3.1	Einführung	39
3.2	Methodenentwicklung für HPLC-MS-Trennungen	39
3.2.1	Optimierung der LC-Trennung	40
3.2.2	Optimierung der Ionenquellenbedingungen	45
3.2.3	Optimierung der MS-Detektion	47
3.2.4	Überprüfung der Komplettmethode	48
3.2.5	Unterstützung bei der Methodenentwicklung durch softwaregestützte Parametervariation	50
3.3	Übertragen von HPLC-Bestandsmethoden an die Massenspektrometrie	51
3.3.1	Übertragung einer vollständigen HPLC-Methode an ein Massenspektrometer	52
3.3.2	Selektierte Analyse einer unbekannten Verunreinigung – Lösemittelwechsel mittels Single-/Multi-Heartcut-Technologien	53
3.4	Abkürzungen	55
	Literatur	56
4	Strategien für die erfolgreiche Charakterisierung von Protein-biopharmazeutika	57
	<i>Szabolcs Fekete, Valentina D'Atri und Davy Guillarme</i>	
4.1	Einführung in Proteinbiopharmazeutika	57
4.2	Von der Standard- zur Hochleistungschromatographie von Proteinbiopharmazeutika	58
4.3	Online-Kopplung von nicht denaturierenden LC-Modi mit MS	62
4.4	Mehrdimensionale LC-Ansätze für Proteinbiopharmazeutika	63
4.5	Schlussfolgerung und Zukunftstrends in der Analyse von Proteinbiopharmazeutika	66
	Literatur	68
5	Optimierungsstrategien für die HPLC-Trennung von Biomolekülen	73
	<i>Lisa Strasser, Florian Füssl und Jonathan Bones</i>	
5.1	Einleitung	73
5.2	Optimierung der chromatographischen Trennung	73
5.3	Optimierung der Geschwindigkeit einer HPLC-Trennung	78
5.4	Optimierung der Sensitivität einer HPLC-Trennung	80

5.5	Multidimensionale Trennungen (siehe auch Kap. 1) 81
5.6	Überlegungen bezüglich MS-Detektion (siehe auch Kap. 3) 82
5.7	Schlussfolgerungen und Ausblick 84
	Literatur 85
6	Optimierungsstrategien in der Supercritical Fluid Chromatography (SFC) mit gepackten Säulen 87
	<i>Caroline West</i>
6.1	Auswahl einer stationären Phase, die eine angemessene Retention und gewünschte Selektivität ermöglicht 88
6.1.1	Auswahl einer stationären Phase für chirale Trennungen (siehe auch Kap. 7) 88
6.1.2	Auswahl einer stationären Phase für achirale Trennungen 90
6.2	Optimierung der mobilen Phase zur Elution aller Analyten 93
6.2.1	Art des Co-Lösungsmittels 93
6.2.2	Anteil an Co-Lösungsmittel 94
6.2.3	Verwendung von Additiven 97
6.2.4	Probenverdünner 98
6.3	Optimierung von Temperatur, Druck und Flussrate 98
6.3.1	Auswirkungen von Temperatur, Druck und Flussrate auf das Chromatogramm 98
6.3.2	Gleichzeitige Optimierung von Temperatur, Druck und Flussrate 100
6.4	Überlegungen zur SFC-MS-Kopplung 101
6.5	Zusammenfassung der Methodenoptimierung 102
6.6	SFC als zweite Dimension in der zweidimensionalen Chromatographie 104
6.7	Weiterführende Literatur 104
	Literatur 104
7	Optimierungsstrategien für chirale Trennungen 107
	<i>Markus Juza</i>
7.1	Enantioselektive (Chirale) Trennungen 107
7.2	Wie fängt man an? 109
7.2.1	Partikelgröße 109
7.2.2	Chirale Polysaccharid-stationäre Phasen als erste Wahl 110
7.2.3	Screening von gecoateten und immobilisierten Polysaccharid-CSPs im Normalphasen- und polar organischen Modus 114
7.2.4	Screening von gecoateten und immobilisierten Polysaccharid-CSPs im Umkehrphasenmodus 118
7.2.5	Screening von immobilisierten Polysaccharid-CSPs im mittleren Polaritäts-modus 120
7.2.6	Screening von gecoateten und immobilisierten Polysaccharid-CSPs unter polaren organischen SFC-Bedingungen 122
7.2.7	Screening von immobilisierten Polysaccharid CSPs unter mittelpolaren SFC Bedingungen 125
7.3	SFC zuerst? 129

7.4	Gibt es Regeln, wie man die vorhersagen kann, welche CSP für mein Trennproblem geeignet ist? 129
7.5	Welches sind die am erfolgversprechendsten CSPs? 129
7.6	Kann man CSPs miteinander vergleichen? 131
7.7	„No-Gos“, Fallstricke und Besonderheiten bei der chiralen HPLC und SFC 134
7.8	Gradienten in der chiralen Chromatographie 135
7.9	Alternative Strategien zur chiralen HPLC und SFC auf Polysaccharid-CSPs 135
7.10	Wie löse ich Trennprobleme für Enantiomere, ohne ins Labor zu gehen? 138
7.11	Die Zukunft der chiralen Trennung – schnelle chirale Trennung (cUHPLC und cSFC)? 139
	Literatur 141
8	Optimierungsstrategien basierend auf der chemischen Struktur der Analyte 145
	<i>Christoph A. Fleckenstein</i>
8.1	Einleitung 145
8.2	Der Einfluss funktioneller Gruppen 147
8.3	Wasserstoffbrückenbindungen 149
8.4	Einfluss der Wasserlöslichkeit durch Hydratbildung bei Aldehyden und Ketonen 151
8.5	Bedeutet polar gleich hydrophil? 152
8.6	Peroxidbildung bei Ethern 154
8.7	Der pH-Wert in der HPLC 156
8.7.1	Saure funktionelle Gruppen 157
8.7.2	Basische funktionelle Gruppen 158
8.8	Betrachtungen und Löslichkeitsabschätzungen in komplexeren Molekülen 159
8.9	Der Octanol-Wasser-Koeffizient 161
8.10	Hansen-Löslichkeitsparameter 165
8.11	Fazit und Ausblick 167
	Literatur 168
9	Optierungsmöglichkeiten im regulierten Umfeld 171
	<i>Stavros Kromidas</i>
9.1	Einführung 171
9.2	Vorbemerkung 171
9.3	Auflösung 173
9.3.1	Hardwareänderungen 174
9.3.2	Verbesserung der Peakform 175
9.4	Peak/Rauschen-Verhältnis 178
9.4.1	Verringerung des Rauschens 178
9.5	Variationskoeffizient, V_k 178
	Literatur 182

Teil II Computergestützte Strategien (in-silico-Anwendungen) 183

- 10 Strategie zur automatisierten Entwicklung von RP-HPLC-Methoden für die domänen spezifische Charakterisierung monoklonaler Antikörper 185**
Jennifer La, Mark Condina, Leexin Chong, Craig Kyngdon, Matthias Zimmermann und Sergey Galushko
- 10.1 Zielsetzung 185
10.2 Einführung 185
10.3 Automatisierte Methodenentwicklung und Software-Tools 187
10.4 Wechselwirkung mit Instrumenten 188
10.5 Säulen 189
10.6 Probenvorbereitung und HPLC-Analyse 190
10.7 Automatisierte Methodenentwicklung 191
10.8 Säulen-Screening 193
10.9 Schnelle Optimierung 193
10.10 Feinoptimierung und Proben-Profilung 195
10.11 Robustheitstests 196
10.11.1 Auswahl der Variablen 197
10.11.2 Auswahl des Versuchsplans 198
10.11.3 Festlegung der Bereiche für die verschiedenen Faktoren 198
10.11.4 Erstellung der Versuchsanordnung 199
10.11.5 Durchführung von Experimenten 199
10.11.6 Berechnung von Effekten und Auswirkung sowie numerische und grafische Analyse der Effekte 200
10.12 Verbesserung der Methode 203
10.13 Schlussfolgerungen 203
Literatur 204
- 11 Fusion QbD® Software: ICH-konformes Lebenszyklus-Management für analytische Methoden: Entwicklung, Validierung, Transfer 207**
Richard Verseput und Ingo Green
- 11.1 Einführung 207
11.2 Übersicht – experimentelles Design und Datenmodellierung in Fusion QbD 209
11.3 Zielprofil einer analytischen Methode 210
11.4 APLM-Stadium 1 – Entwurf und Entwicklung des Verfahrens 211
11.4.1 Voruntersuchung 211
11.4.2 Screening des chemischen Systems 213
11.4.3 Methodenoptimierung 217
11.5 APLM-Stadium-2 – Verifizierung der Methodenleistung 224
11.5.1 Replikationsstrategie 224
11.5.2 USP (1210) Toleranzintervall zur Unterstützung von Methodentransfers 224
11.6 Was folgt? – Erwartungen für 2020 und darüber hinaus 226
Literatur 228

	Teil III Anwender berichten 229
12	Moderne HPLC-Methodenentwicklung 231 <i>Stefan Lamotte</i>
12.1	Robuste Ansätze für die Praxis 233
12.1.1	Die maximale Peakkapazität 240
12.2	Ausblick 241
	Literatur 241
13	Optimierungsstrategien in der HPLC aus Sicht eines Industriedienstleisters 243 <i>Juri Leonhardt und Michael Haustein</i>
13.1	Einleitung 243
13.2	Forschung und Entwicklung 244
13.3	Qualitätskontrolle 244
13.4	Prozessbegleitende Analytik 245
13.5	Entscheidungsbaum zur Optimierungsstrategie in Abhängigkeit vom späteren Einsatzgebiet 248
14	Optimierungsstrategien in der HPLC aus Sicht eines Dienstleisters – der UNTIE®-Prozess der CUP-Labatorien 249 <i>Dirk Freitag-Stechl und Melanie Janich</i>
14.1	Übliche Herausforderungen für einen Dienstleister 249
14.2	Ein typisches, langwieriges Projekt – wie es meistens läuft und wie man es nicht machen sollte! 250
14.3	Wie machen wir es besser? – Der UNTIE®-Prozess der CUP-Labatorien 251
14.3.1	Die Kundenbedürfnisse verstehen 251
14.3.2	Der Test einer existierenden Methode 252
14.3.3	Methodenentwicklung und -optimierung 253
14.3.4	Durchführung der Validierung 255
14.3.5	Zusammenfassung 256
	Literatur 257
15	Optimierungsstrategien in der HPLC 259 <i>Bernhard Burn</i>
15.1	Definition der Aufgabestellung 260
15.2	Relevante Daten für die HPLC-Analyse einer Substanz 262
15.2.1	Löslichkeit 262
15.2.2	Säure Konstanten (pK_S) 265
15.2.3	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient 273
15.2.4	UV-Absorption 275
15.2.5	Stabilität des gelösten Analyten 277
15.3	Generische Methoden 282
15.3.1	Generelle Methode für die Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe 282

15.3.2	Erweiterungen des Einsatzbereiches	284
15.3.3	Grenzen dieser generellen Methode	284
15.3.4	Beispiel, Bestimmung von Butamiratdihydrogencitrat in einem Hustensirup	286
15.4	Generelle Tipps zum Optimieren von HPLC-Methoden	288
15.4.1	Herstellen von mobilen Phasen	288
15.4.2	Blankproben	290
15.4.3	Festlegen von Messwellenlängen für die UV-Detektion	291
15.4.4	UV-Detektion bei niedrigen Wellenlängen	293
15.4.5	Vermeidung von Peak tailing	298
15.4.6	Messunsicherheit und Methodendesign	303
15.5	Säulendimension und Partikelgrößen	306
	Literatur	308

Teil IV Hersteller berichten 309

16	Optimierungsstrategien für Ihre HPLC – Agilent Technologies	311
	<i>Jens Trafkowski</i>	
16.1	Erhöhung der Trennleistung: Zero Dead Volume Fittings	312
16.2	Trennleistung: Minimierung der Dispersion	312
16.3	Erhöhung des Durchsatzes – verschiedene Wege zur Senkung der Analysenlaufzeit	313
16.4	Minimale Verschleppung für die Spurenanalytik: Multiwash	315
16.5	Steigern Sie die Leistung Ihrer vorhandenen Systeme – modular oder schrittweise Aufrüstung bestehender Systeme	315
16.6	Erhöhen Sie Automatisierung, Benutzerfreundlichkeit und Reproduzierbarkeit mit den Merkmalen einer quaternären High-End-UHPLC-Pumpe	317
16.7	Automatisierung erhöhen: Lassen Sie Ihren Autosampler die Arbeit machen	319
16.8	System für mehrere Anwendungen: Multimethoden- und Methodenentwicklungssysteme	320
16.9	Kombinieren Sie Probenvorbereitung mit LC-Analyse: Online SPE	321
16.10	Leistungssteigerung mit einer zweiten chromatographischen Dimension: 2D-LC (siehe auch Kap. 1)	322
16.11	Think different! Verwenden Sie überkritisches CO ₂ als Eluent: SFC – Supercritical Fluid Chromatography (siehe auch Kap. 6)	323
16.12	Bestimmen Sie verschiedene Konzentrationsbereiche in einem System: hochauflösende Bereichs-HPLC (HDR)	324
16.13	Automatisieren Sie sogar Ihren Methodentransfer von anderen LC-Systemen: Intelligent System Emulation Technology (ISET)	325
16.14	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	326
	Literatur	327

17	Den Anwender starkmachen – Optimierung durch Individualisierung	329
	<i>Kristin Foltmert und Kathryn Monks</i>	
17.1	Einleitung	329
17.2	Die eigenen Anforderungen definieren	329
17.2.1	Lastenheft, Zeitplan oder Maßnahmenkatalog	329
17.2.2	Personaloptimierungen helfen, die HPLC besser zu nutzen	331
17.2.3	Zeitintensive Methodenoptimierungen planvoll meistern	332
17.2.4	Optimierungen auf Geräteebene müssen nicht immer eine Investition bedeuten	332
17.3	Ein Assistent eröffnet viele neue Möglichkeiten	333
17.3.1	Wenn das HPLC-System zukünftig einfacher mehr können muss	333
17.3.2	Individuelle Optimierungen mit einem Assistenten	334
17.4	Die verbauten Materialien im Fokus der Optimierung	338
17.4.1	Benetzte vs. trockene Bauteile	338
17.5	Softwareoptimierung erfordert Offenheit	341
17.6	Ausblick	342
18	(U)HPLC-Grundlagen und darüber hinaus	345
	<i>Gesa Schad, Brigitte Bollig und Kyoko Watanabe</i>	
18.1	Typische (U)HPLC-Betriebsparameter und ihre Auswirkung auf die chromatographische Leistung	345
18.1.1	Kompressibilität	345
18.1.2	Lösungsmittelzusammensetzung und Injektionsvolumina	348
18.1.3	Diodenarray-Detektor: Spaltbreite	349
18.2	„Analytical Intelligence“ – AI, M2M, IoT – wie moderne Technologie die Praxis in der Routine erleichtern kann	352
18.2.1	Automatische Selbstdiagnose und Wiederherstellung erhöhen die Zuverlässigkeit	352
18.2.2	Innovative Datenverarbeitung für bessere Auflösung, was Anwender in der Chromatographie von der Spektroskopie lernen können	352
18.2.3	Wartungsintervalle gezielter planen und Stillstandzeiten vermeiden	356
	Literatur	356
19	Herausforderungen in modernen HPLC-Laboren	357
	<i>Frank Steiner und Soo Hyun Park</i>	
19.1	Vanquish Core, Flex und Horizon – drei Performance-Level für spezifische Herausforderungen unserer Zeit	358
19.2	Intelligente und eigenständige HPLC-Geräte	365
19.3	2D-LC zur Analyse komplexer Proben und für weitere Automatisierungsmöglichkeiten (siehe auch Kap. 1)	366
19.3.1	Schleifenbasierte Single-Heartcut 2D-LC	368
19.3.2	Schleifenbasierte Multi-Heartcut-2D-LC	369

19.3.3	Trapbasierte Single-Heartcut 2D-LC zur Modulation der Elutionskraft der übertragenen Fraktion	370
19.3.4	Trapbasierte Single-Heartcut 2D-LC mit dem Dual Split Sampler	371
19.4	Software-assistierte automatisierte Methodenentwicklung	373
	Literatur	378
20	Systematische Methodenentwicklung mit einem analytischen Quality-by-Design-Ansatz unter Verwendung von Fusions-QbD und UPLC	381
	<i>Falk-Thilo Ferse, Detlev Kurth, Tran N. Pham, Fadi L. Alkhateeb und Paul Rainville</i>	
	Literatur	392
	Stichwortverzeichnis	393