

# Inhaltsverzeichnis

**Vorwort** V

**Zum Aufbau des Buches** VII

**Teil I Optimierungsstrategien für einzelne Fragestellungen** 1

<b>1</b>	<b>2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen</b>	<b>3</b>
	<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

<b>2</b>	<b>Do you HILIC? Mit Massenspektrometrie? Dann bitte systematisch</b>	<b>23</b>
	<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
<b>3</b>	<b>Optimierungsstrategien in der LC-MS-Methodenentwicklung</b>	<b>39</b>
	<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
<b>4</b>	<b>Strategien für die erfolgreiche Charakterisierung von Proteinbiopharmazeutika</b>	<b>57</b>
	<i>Szabolcs Fekete, Valentina D'Atri und Davy Guilleme</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
<b>5</b>	<b>Optimierungsstrategien für die HPLC-Trennung von Biomolekülen</b>	<b>73</b>
	<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
<b>6</b>	<b>Optimierungsstrategien in der Supercritical Fluid Chromatography (SFC) mit gepackten Säulen</b>	<b>87</b>
	<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
<b>7</b>	<b>Optimierungsstrategien für chirale Trennungen</b>	<b>107</b>
	<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 organischem Modus	114
7.2.4	Screening von gecoateten und immobilisierten Polysaccharid-CSPs im Umkehrphasenmodus	118
7.2.5	Screening von immobilisierten Polysaccharid-CSPs im mittlerer 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**

*Christoph A. Fleckenstein*

- 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 Optimierungsmöglichkeiten im regulierten Umfeld 171**

*Stavros Kromidas*

- 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 domänenspezifische 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**  
*Stefan Lamotte*
  - 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**  
*Juri Leonhardt und Michael Haustein*
  - 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-Laboratorien 249**  
*Dirk Freitag-Stechl und Melanie Janich*
  - 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-Laboratorien 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**  
*Bernhard Burn*
  - 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**  
*Jens Trafkowski*
- 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<sub>2</sub> 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

<b>17</b>	<b>Den Anwender starkmachen – Optimierung durch Individualisierung</b>	<b>329</b>
	<i>Kristin Folmert 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	Personalsoptimierungen 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 einfach 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
<b>18</b>	<b>(U)HPLC-Grundlagen und darüber hinaus</b>	<b>345</b>
	<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
<b>19</b>	<b>Herausforderungen in modernen HPLC-Laboratorien</b>	<b>357</b>
	<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
<b>20</b>	<b>Systematische Methodenentwicklung mit einem analytischen Quality-by-Design-Ansatz unter Verwendung von Fusions-QbD und UPLC</b>	<b>381</b>
	<i>Falk-Thilo Ferse, Detlev Kurth, Tran N. Pham, Fadi L. Alkhateeb und Paul Rainville</i>	
	Literatur	392
	<b>Stichwortverzeichnis</b>	<b>393</b>