

Inhaltsverzeichnis

Vorwort V

Autorenverzeichnis XXII

Zum Aufbau des Buches XXVII

1	Grundsätzliches zur Optimierung	1
1.1	Grundsätze der Optimierung in der HPLC am Beispiel der RP-Chromatographie	3
	<i>Stavros Kromidas</i>	
1.1.1	Vor den ersten Optimierungsschritten	3
1.1.2	Was heißt eigentlich „Optimierung“?	6
1.1.3	Verbesserung der Auflösung („besser trennen“)	6
1.1.3.1	Prinzipielle Möglichkeiten zur Verbesserung der Auflösung	8
1.1.3.2	Was „bringt“ das meiste?	10
1.1.3.3	Welche Reihenfolge der Maßnahmen ist bei Optimierungsversuchen sinnvoll?	12
1.1.3.4	Wie ändere ich k , α und N ?	18
1.1.3.4.1	Isokratischer Modus	18
1.1.3.4.2	Gradientenmodus	19
1.1.3.4.3	Acetonitril oder Methanol?	20
1.1.4	Überprüfung der Peakhomogenität – das Drei-Stufen-Modell	22
1.1.5	Unbekannte Probe – wie soll ich anfangen? Strategien und Konzepte	36
1.1.5.1	Die „2-Tage-Methode“	37
1.1.5.2	„Das 5-Schritte-Modell“	41
1.1.6	Verkürzung der Analysendauer („schneller trennen“)	50
1.1.7	Empfindlichkeit erhöhen („mehr sehen“, d. h. Nachweisgrenze erniedrigen)	51
1.1.8	Ökonomie in der HPLC („billiger trennen“)	52
1.1.9	Abschlussbemerkungen und Ausblick	54
	<i>Literatur</i>	61

1.2	Schnelle Gradienten	63
	<i>Uwe Dieter Neue, Yung-Fong Cheng und Ziling Lu</i>	
1.2.1	Einleitung	63
1.2.2	Hauptteil	63
1.2.2.1	Theorie	63
1.2.2.2	Ergebnisse	65
1.2.2.2.1	Generelles	65
1.2.2.2.2	Kurze Säulen, kleine Teilchen	67
1.2.2.2.3	Ein konkretes Beispiel	69
1.2.2.3	Optimale Flussraten und Grenzen der heutigen Technologie	70
1.2.2.4	Apparative Schwierigkeiten und Lösungen	71
1.2.2.4.1	Umgehung des Gradientenverweilvolumens	71
1.2.2.4.2	Zeitkonstante und Datenaufnahmerate	73
1.2.2.4.3	Messung der Ionenunterdrückung mithilfe der Nachsäuleninfusion	73
	<i>Literatur</i>	75
1.3	Selektivitätsänderung in der RP-HPLC mithilfe des pH-Wertes	77
	<i>Uwe Dieter Neue, Alberto Méndez, KimVan Tran und Diane M. Diehl</i>	
1.3.1	Einleitung	77
1.3.2	Hauptteil	77
1.3.2.1	Ionisierung und pH	77
1.3.2.2	Mobile Phase und pH-Wert	79
1.3.2.2.1	Pufferkapazität	81
1.3.2.2.2	Änderung von pK- und pH-Werten durch den Zusatz des organischen Lösungsmittels	82
1.3.2.3	Puffer	85
1.3.2.3.1	Klassische Puffer	85
1.3.2.3.2	MS-kompatible pH-Wert-Kontrolle	85
1.3.2.4	Einfluss der Proben auf die Retention	86
1.3.2.4.1	Der Probentyp: Säuren, Basen, Zwitterionen	86
1.3.2.4.2	Der Einfluss des organischen Lösungsmittels auf die Ionisierung der Proben	87
1.3.3	Anwendungsbeispiel	88
1.3.4	Troubleshooting	92
1.3.4.1	Reproduzierbarkeitsprobleme	92
1.3.4.2	Pufferstärke und Löslichkeit	92
1.3.4.3	Konstante Pufferkonzentration	93
1.3.5	Ausblick	93
	<i>Literatur</i>	94

1.4	Auswahl des richtigen pH-Wertes in der HPLC	95
	<i>Michael McBrien</i>	
	<i>(Übersetzung aus dem Englischen von Sven Fischer)</i>	
1.4.1	Einleitung	95
1.4.2	Typische Vorgehensweisen zur Wahl des pH-Wertes	96
1.4.3	Auswahl des Anfangs-pH-Wertes	97
1.4.4	Grundlage für die Vorhersage/Berechnung eines pK_S -Wertes	98
1.4.5	Korrektur des pH-Wertes aufgrund des organischen Anteils im Eluenten	99
1.4.6	Optimierung des pH-Wertes der mobilen Phase ohne Kenntnis der chemischen Struktur der Analyte	102
1.4.7	Eine systematische Vorgehensweise zur Auswahl des pH-Wertes	103
1.4.8	Beispiel: Trennung von 1,4-Bis[(2-pyriden-2-ylethyl)thio]butan-2,3-diol von seinen Verunreinigungen	104
1.4.9	Fehlersuche beim pH-Wert der mobilen Phase	109
1.4.10	Ein Blick in die Zukunft	110
1.4.11	Zusammenfassung	110
	<i>Literatur</i>	111
1.5	Optimierung der Auswertung in der Chromatographie	113
	<i>Hans-Joachim Kuss</i>	
1.5.1	Auswertung und Bewertung chromatographischer Daten – eine Einführung	113
1.5.2	Arbeitsbereich	113
1.5.3	Interner Standard	114
1.5.4	Kalibrierung	115
1.5.5	Lineare Regression	116
1.5.6	Wichtungsexponent	118
1.5.7	In der Praxis	120
1.5.8	Pharmaanalytik	120
1.5.9	Messunsicherheit	121
1.5.10	Nullpunktsgerade	123
	<i>Literatur</i>	124
1.6	Gütekennwerte der Kalibration und Messunsicherheit als Indikatoren für Optimierungspotenzial	125
	<i>Stefan Schörner</i>	
1.6.1	Optimierung der Kalibration – was ist das Ziel?	125
1.6.2	Der zentrale Gütekennwert einer Kalibration	126
1.6.3	Beispiele	126
1.6.3.1	Bedeutet eine höhere Empfindlichkeit auch eine bessere Methode?	126
1.6.3.2	Ist ein konstanter Variationskoeffizient gut oder schlecht – oder einfach unvermeidbar?	130

1.6.3.3	Matrixeffekte nachweisen – ist die Wiederfindungsfunktion ersetzbar?	140
1.6.3.4	Matrixeffekte nachgewiesen – ist ein Aufstockverfahren immer notwendig?	143
1.6.3.5	Der Linearitätstest – muss eine Kalibration denn linear sein?	146
1.6.3.6	Richtigkeit optimieren – robuste Kalibrationsfunktion mit Gewichtung ermitteln	150
	<i>Literatur</i>	154
2	Die Charakteristika der Optimierung in einzelnen HPLC-Modi	155
2.1	RP-HPLC	157
2.1.1	Säulenvergleich und -auswahl in der RP-HPLC	157
	<i>Stavros Kromidas</i>	
2.1.1.1	Einleitung	157
2.1.1.2	Gründe für die Vielfalt von kommerziellen RP-Säulen – erste Konsequenzen	157
2.1.1.2.1	Über polare Wechselwirkungen	162
2.1.1.2.2	Erste Konsequenzen	162
2.1.1.3	Kriterien zum Vergleich von RP-Phasen	181
2.1.1.3.1	Ähnlichkeit über die physikalisch-chemischen Eigenschaften	181
2.1.1.3.2	Ähnlichkeit über das chromatographische Verhalten, Aussagekraft von Retentions- und Selektivitätsfaktoren	181
2.1.1.3.3	Tests zum Vergleich von Säulen und deren Aussagekraft	188
2.1.1.4	Ähnlichkeit von RP-Phasen	202
2.1.1.4.1	Selektivitätskarten	203
2.1.1.4.2	Selektivitätsplots	207
2.1.1.4.3	Selektivitätshexagone	212
2.1.1.4.4	Chemometrische Analyse der chromatographischen Daten	236
2.1.1.5	Eignung von RP-Phasen für bestimmte Analyttypen und Vorschläge zur Säulenauswahl	241
2.1.1.5.1	Polare und hydrophobe RP-Phasen	241
2.1.1.5.2	Eignung von RP-Phasen für bestimmte Substanzklassen	245
2.1.1.5.3	Vorschläge zur Säulenauswahl	256
	<i>Literatur</i>	261
2.1.2	Grundlagen der Selektivität von RP-Säulen	262
	<i>Uwe Dieter Neue, Bonnie A. Alden und Pamela C. Iraneta</i>	
2.1.2.1	Einleitung	262
2.1.2.2	Hauptteil	263
2.1.2.2.1	Hydrophobie und Silanolgruppenaktivität (Ionenaustausch)	263
2.1.2.2.2	Polare Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindung)	268
2.1.2.2.3	Reproduzierbarkeit der Selektivität	269
	<i>Literatur</i>	271

- 2.1.3 Charakterisierung von Umkehrphasen in der Flüssigkeitschromatographie mittels Hauptkomponentenanalyse 272
Melvin R. Euerby und Patrik Petersson
(Übersetzung aus dem Englischen von Ulrich Panne)
- 2.1.3.1 Einleitung 272
- 2.1.3.2 Theorie der Hauptkomponentenanalyse 273
- 2.1.3.3 PCA der Datenbank mit RP-Kieselgel-Materialien 275
- 2.1.3.3.1 PCA von „polar embedded“-Phasen, „AQ“-Phasen und Phasen mit erhöhter polarer Selektivität 277
- 2.1.3.3.2 PCA von perfluorierten Phasen 278
- 2.1.3.4 PCA zur Identifizierung der Ähnlichkeit/Äquivalenz von Säulen und Phasen 279
- 2.1.3.5 PCA für eine systematische Auswahl von stationären Phasen für die Methodenentwicklung 286
- 2.1.3.5.1 Optimierungsstrategie für Eluent und stationäre Phase 287
Literatur 288
- 2.1.4 Chemometrie – ein geeignetes Werkzeug für die Verarbeitung von großen Datensätzen 289
Cinzia Stella und Jean-Luc Veuthey
(Übersetzung aus dem Englischen von Ulrich Panne)
- 2.1.4.1 Einleitung 289
- 2.1.4.2 Chromatographische Tests und ihre Bedeutung für die Auswahl der Trennsäule 289
- 2.1.4.3 Der Einsatz der Hauptkomponentenanalyse (PCA) für die Bewertung und Auswahl von Testverbindungen 290
- 2.1.4.3.1 Physikochemische Eigenschaften der Testverbindungen 290
- 2.1.4.3.2 Chromatographische Eigenschaften der Testverbindungen 293
- 2.1.4.4 Der Einsatz der Hauptkomponentenanalyse (PCA) für die Beurteilung von chromatographischen Trägermaterialien 294
- 2.1.4.4.1 Bewertung der stationären Phasen mit Phosphatpuffer bei pH 7,0 als mobiler Phase 296
- 2.1.4.4.2 Bewertung der chromatographischen Phasen mit Phosphatpuffer bei pH 3,0 als mobiler Phase 298
- 2.1.4.5 Optimierung eines chromatographischen Verfahrens durch Chemometrie 300
- 2.1.4.5.1 Testverbindungen 300
- 2.1.4.5.2 Mobile Phasen 301
- 2.1.4.5.3 Chromatographische Parameter und Vergleichspräzision der Chargen und Trennsäulen 302
- 2.1.4.6 Zusammenfassung und Ausblick 304
Literatur 305

2.1.5	Lineare Freie Enthalpiebeziehungen (LFER) – Werkzeuge zur Säulencharakterisierung und Methodenoptimierung?	306
	<i>Frank Steiner</i>	
2.1.5.1	Charakterisierung und Auswahl stationärer Phasen für die HPLC	306
2.1.5.2	Was sind LFER und warum sind sie für die HPLC von Bedeutung?	307
2.1.5.3	Der Weg zu molekularen Deskriptoren für die multivariate Regression	310
2.1.5.4	Beispiel für eine LFER-Prozedur mittels der Solvatationsgleichung	311
2.1.5.4.1	Vergleich stationärer Phasen basierend auf LFER-Parametern	311
2.1.5.4.2	Beschreibung des Einflusses der mobilen Phase mit LFER-Regressionsparametern	318
2.1.5.4.3	Die Vorhersagbarkeit von Selektivitäten mittels LFER-Parametern	320
2.1.5.5	Empirischer Ansatz zur Bestimmung von Analytdeskriptoren (und Phasenparametern) mittels HPLC	322
2.1.5.5.1	Das Prinzip im Unterschied zur Strategie mit vorgegebenen Deskriptoren	322
2.1.5.5.2	Die experimentelle Durchführung	323
2.1.5.5.3	Bestimmung der fünf LFER-Parameter – eine Strategie in acht Schritten	324
2.1.5.5.4	Variation der Elutionsbedingungen	327
2.1.5.5.5	Phasencharakterisierung mittels empirischer LFER-Parameter	330
2.1.5.6	Abschließende Betrachtung zur LFER-Anwendung in der HPLC	332
	<i>Literatur</i>	333
2.1.6	Säulenselektivität von RP-Säulen	334
	<i>L. R. Snyder und J. W. Dolan</i>	
	<i>(Übersetzung aus dem Englischen von Hans-Joachim Kuss)</i>	
2.1.6.1	Einleitung	334
2.1.6.2	Das „Subtraktions-Modell“ für die Selektivität in der RP-LC	336
2.1.6.3	Anwendungen	340
2.1.6.3.1	Auswahl äquivalenter Säulen [18]	340
2.1.6.3.2	Auswahl von Säulen mit sehr unterschiedlicher Selektivität	344
2.1.6.4	Fazit	345
	<i>Nomenklatur</i>	346
	<i>Literatur</i>	347
2.1.7	Selektivität verstehen durch Suspended-State-High-Resolution-Magic-Angle-Spinning NMR-Spektroskopie	348
	<i>Urban Skogsberg, Heidi Händel, Norbert Welsch und Klaus Albert</i>	
2.1.7.1	Einführung	348
2.1.7.2	Ist der Vergleich zwischen NMR und HPLC zulässig?	352
2.1.7.3	Der transfer-Nuclear-Overhauser-Effekt (trNOE)	355

2.1.7.4	Suspensions- ¹ H HR/MAS-T ₁ -Relaxations-Messungen	357
2.1.7.5	Wo finden die Wechselwirkungen statt?	359
2.1.7.6	Wasserstoffbrückenbindungen	360
2.1.7.7	Einige praktische Gesichtspunkte	360
2.1.7.8	Ausblick	362
	<i>Literatur</i>	362
2.2	Optimierung in der Normalphasen-Chromatographie	363
	<i>Veronika R. Meyer</i>	
2.2.1	Einleitung	363
2.2.2	Eluenten in der NP-HPLC	364
2.2.3	Stationäre Phasen in der NP-HPLC	368
2.2.4	Troubleshooting in der Normalphasen-Chromatographie	370
	<i>Weiterführende Literatur</i>	371
2.3	Optimierung von GPC-Analysen durch geeignete Wahl von stationärer Phase und Detektionsverfahren	373
	<i>Peter Kilz</i>	
2.3.1	Einleitung	373
2.3.2	Grundlagen der GPC-Trennung	374
2.3.2.1	Trennmechanismen in der Säule	376
2.3.2.2	Kriterien zur Auswahl von GPC-Säulen und Optimierung von GPC-Trennungen	378
2.3.2.2.1	Auswahl von Porengröße und Trennbereich	379
2.3.2.2.2	Vor- und Nachteile von Linearsäulen	380
2.3.2.3	Hochgeschwindigkeits (HighSpeed)-GPC-Trennungen	381
2.3.3	Umfassende Detektionsmöglichkeiten zur Aufklärung makromolekularer Materialien	383
2.3.3.1	Anwendung informationsreicher Detektoren in der Flüssigchromatographie	385
2.3.3.2	Analyse von Copolymeren mit Multidetektions-GPC	386
2.3.3.3	Simultane Trennung und Identifizierung durch GPC-FTIR-Kopplung	390
2.3.3.4	Anwendung molmassensensitiver Detektoren in der GPC	392
2.3.3.4.1	Lichtstreuendetektoren	392
2.3.3.4.2	GPC-Viskosimetrie-Kopplung	394
2.3.4	Zusammenfassung	395
	<i>Literatur</i>	396
2.4	Gelfiltration – Größenausschluss-Chromatographie von Biopolymeren – Optimierungsstrategien und Fehlersuche	397
	<i>M. Quaglia, E. Machtejevas, T. Hennessy und K. K. Unger</i>	
2.4.1	Ausgangssituation und gegenwärtige Trends	397
2.4.2	Spezifische, grundlegende Aspekte der SEC von Biopolymeren	399

2.4.3	Vergleich der SEC mit anderen HPLC Varianten	402
2.4.4	Aspekte bei der Optimierung der SEC	403
2.4.4.1	Säulenauswahl und optimale Flussrate	403
2.4.4.2	Optimierung der Fließmittelzusammensetzung	408
2.4.4.3	Probenvorbehandlung	410
2.4.4.4	Viskosität und Volumen der Probenlösung – zwei kritische Parameter bei der Dosierung	410
2.4.4.5	Detektionsmethoden	411
2.4.5	Anwendungsfelder der SEC von Biopolymeren	412
2.4.5.1	High Performance SEC	412
2.4.5.2	Bestimmung des Molekulargewichtes	412
2.4.5.3	Die Gelfiltration als ein Werkzeug zum Studium von Konformationsänderungen von Proteinen	413
2.4.5.4	Die Gelfiltration in der präparativen und Prozesschromatographie (Down Stream Processing)	414
2.4.5.5	SEC-Säulen basierend auf dem Prinzip der eingeschränkten Zugänglichkeit (Restricted Access Principle) und ihr Einsatz in der Proteomanalyse	415
	<i>Literatur</i>	418
2.5	Optimierung in der Affinitätschromatographie	419
	<i>Egbert Müller</i>	
2.5.1	Einführung und Grundlagen der Affinitätschromatographie	419
2.5.2	Auswahl der Basismaterialien	423
2.5.3	Immobilisierungsmethoden	424
2.5.4	Aktivierungsmethoden	425
2.5.5	Spacer	429
2.5.6	Gerichtete Immobilisierung	432
2.5.7	Nicht-partikuläre Affinitätsträger	433
2.5.8	Durchführung einer Affinitätsreinigung	434
2.5.9	Anwendung von mathematischen Optimierungsmethoden	436
2.5.10	Empfehlungen zur Immobilisierung in Kurzform	441
	<i>Literatur</i>	442
2.6	Optimierung von Enantiomerentrennungen in der HPLC*	445
	<i>Markus Juza</i>	
2.6.1	Einleitung	445
2.6.2	Grundlegende Prinzipien der enantioselektiven HPLC	445
2.6.2.1	Thermodynamische Grundlagen der enantioselektiven HPLC	448
2.6.2.2	Adsorption und chirale Erkennung	449
2.6.2.3	Unterschiede zur RP- und NP-HPLC	451
2.6.2.4	Grundsätzliches zur Optimierung enantioselektiver HPLC-Trennungen	452
2.6.3	Selektoren und stationäre Phasen	452

2.6.4	Methodenwahl und Optimierung	460
2.6.4.1	Cellulose- und Amyloserverivate	460
2.6.4.2	Immobilisierte Cellulose- und Amyloserverivate	462
2.6.4.3	Tartratphasen	464
2.6.4.4	π -Acide und π -basische stationäre Phasen	464
2.6.4.5	Makrocyclische Selektoren, Cyclodextrine und Antibiotika	466
2.6.4.6	Proteine und Peptide	470
2.6.4.7	Rutheniumkomplexe	470
2.6.4.8	Synthetische und „imprinted“ Polymere	470
2.6.4.9	Metallkomplexierungs- und Ligandenaustauschphasen	471
2.6.4.10	Chirale Ionentauscher	471
2.6.5	Fehlervermeidung und Troubleshooting	472
2.6.5.1	Geräte und Säulen – praktische Tipps	472
2.6.5.2	Detektion	473
2.6.5.3	Fehlerquellen aus dem Analyten	473
2.6.6	Präparative enantioselektive HPLC	475
2.6.6.1	Bestimmung der Beladung	476
2.6.6.2	Bestimmung der Elutionsvolumina und der Flussrate	476
2.6.6.3	Enantiomerentrennungen mittels Simulated Moving Bed Chromatography (SMB)	478
2.6.6.3.1	Prinzip der Simulated Moving Bed Chromatography	479
2.6.6.3.2	Kommerzielle Wirkstoffe, die mittels SMB getrennt werden	480
2.6.7	Enantioselektive Chromatographie mittels chiraler Additive in der mobilen Phase in HPLC und Kapillarelektrophorese	480
2.6.8	Bestimmung der Enantiomerenreinheit durch Bildung von Diastereomeren	482
2.6.9	Indirekte Enantiomerentrennung im präparativen Maßstab	483
2.6.10	Enantiomerentrennung unter superkritischen chromatographischen Bedingungen (SFC)	483
2.6.11	Neue chirale stationäre Phasen und Informationssysteme	484
2.6.12	Fazit	484
	<i>Literatur</i>	485
2.7	Miniaturisierung	487
2.7.1	μ LC/Nano-LC – Optimierungsmöglichkeiten und Fehlervermeidung aus Anwendersicht	487
	<i>Jürgen Maier-Rosenkranz</i>	
2.7.1.1	Einleitung	487
2.7.1.2	Empfindlichkeit – wie kann ich sie erhöhen?	487
2.7.1.2.1	Einfluss der Säulenlänge	487
2.7.1.2.2	Einfluss des Säuleninnendurchmessers	487
2.7.1.2.3	Einfluss der stationären Phase	489
2.7.1.3	Robustheit	489
2.7.1.3.1	Systemauswahl	489

2.7.1.3.2	Kapillarverbindungen	492
2.7.1.3.3	Maßnahmen gegen Verstopfen	497
2.7.1.3.4	Lecksuche	498
2.7.1.3.5	Vorsäulenschaltungen – Probenauftragsstrategien	499
2.7.1.4	Empfindlichkeit/Auflösung	504
2.7.1.4.1	Säulendimensionierung	504
2.7.1.4.2	Packmaterial/Belegungstypen	505
2.7.1.4.3	Detektoren	505
	<i>Literatur</i>	507
2.7.2	Mikrochip-basierte Flüssigchromatographie – Techniken und Möglichkeiten	508
	<i>Jörg P. Kutter</i>	
2.7.2.1	Einführung in die Thematik	508
2.7.2.2	Verschiedene Techniken	509
2.7.2.2.1	Druckgetriebene Flüssigchromatographie (LC)	509
2.7.2.2.2	Open Channel-Elektrochromatographie (OCEC)	509
2.7.2.2.3	Elektrochromatographie in gepackten Kanälen	510
2.7.2.2.4	Labyrinth-artige Mikrostrukturen zur Formgestaltung der stationären Phase („Pillar Arrays“)	510
2.7.2.2.5	In situ polymerisierte monolithische stationäre Phasen	511
2.7.2.3	Optimierung der Systeme und ihre Potenziale	511
2.7.2.3.1	Trennleistung	511
2.7.2.3.2	Isokratische- und Gradientelution	512
2.7.2.3.3	Maßgeschneiderte stationäre Phasen	513
2.7.2.3.4	Kopplung auf dem Mikrochip zur integrierten Probenvorbereitung und mehrdimensionalen Trennung	514
2.7.2.3.5	Schwierigkeiten und Herausforderungen	514
2.7.2.4	Anwendungsbeispiele	515
2.7.2.5	Abschließende Bewertung und Ausblick	518
	<i>Literatur</i>	519
2.7.3	UPLC: Ultra-Performance Liquid Chromatography	520
	<i>Uwe D. Neue, Eric S. Grumbach, Marianna Kele, Jeffrey R. Mazzeo und Dirk Sievers</i>	
2.7.3.1	Einführung	520
2.7.3.2	Isokratische Trennungen	521
2.7.3.3	Gradiententrennungen	524
2.7.3.4	Fazit	528
	<i>Literatur</i>	528

3 **Kopplungstechniken** 529

3.1 **Immunchromatographische Kopplungen** 531

Michael G. Weller

- 3.1.1 Einführung 531
- 3.1.2 Bindungsmoleküle 531
- 3.1.3 Immunoassays 533
- 3.1.4 Immunchromatographische Techniken 533
 - 3.1.4.1 Affinitätsanreicherung (Affinity SPE) 535
 - 3.1.4.2 Echte Affinitätschromatographie
 („Weak Affinity Chromatography“) 542
 - 3.1.4.3 Biochemische Detektoren 543
- 3.1.5 Beispiele 545
 - 3.1.5.1 Beispiel 1: Affinitätsextraktion („Affinity SPE“) 545
 - 3.1.5.2 Beispiel 2: „Weak Affinity Chromatography“ (WAC) 546
 - 3.1.5.3 Beispiel 3: Biochemische Detektion 547

Literatur 548

3.2 **Erweiterte Charakterisierungs- und Analysemöglichkeiten durch 2-dimensionale Chromatographie** 549

Peter Kilz

- 3.2.1 Einleitung 549
- 3.2.2 Anwendung der 2D-Chromatographie – experimentelle Aspekte 551
- 3.2.3 Auswertung von 2D-Daten und Ergebnisdarstellung 557
- 3.2.4 Stand der Technik in der 2D-Chromatographie 558
- 3.2.5 Zusammenfassung 562

Literatur 562

3.3 **LC-MS – Hinweise zur Optimierung und Fehlersuche** 563

Friedrich Mandel

- 3.3.1 Optimieren des Ionisationsprozesses 563
- 3.3.2 Verschwundene LC/MS-Peaks 565
 - 3.3.2.1 Grenzwertiger pH-Wert der mobilen Phase 565
 - 3.3.2.2 Ionenpaarbildner im HPLC-System 565
 - 3.3.2.3 Ionensuppression (Ionisationsunterdrückung) durch die
 Probenmatrix oder Kontaminantien 566
- 3.3.3 Wie sauber muss eine Ionenquelle sein? 566
- 3.3.4 Wie evaluiere ich die Ionensuppression? 568

Literatur 571

3.4	LC-NMR-Kopplung	573
	<i>Klaus Albert, Manfred Krucker, Marc David Grynbaum und Karsten Putzbach</i>	
3.4.1	Grundlagen der NMR-Spektroskopie	573
3.4.2	Empfindlichkeit des NMR-Experimentes	574
3.4.3	NMR-Spektroskopie in fließenden Systemen	575
3.4.4	NMR-Messköpfe zur LC-NMR-Kopplung	575
3.4.5	Praktische Durchführung der analytischen HPLC-NMR-Kopplung und der Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung	576
3.4.6	Durchfluss-Messungen	577
3.4.7	Stopped-Flow-Messverfahren	580
3.4.8	Kapillartrennungen	581
3.4.9	Ausblick	583
	<i>Literatur</i>	586
4	Computer-unterstützte Optimierung	587
4.1	Computer-unterstützte HPLC-Methodenentwicklung mit der DryLab®-Software	589
	<i>Lloyd R. Snyder und Loren Wrisley</i> <i>(Übersetzung aus dem Englischen von Christine Mladek)</i>	
4.1.1	Einleitung	589
4.1.1.1	Rückblick	591
4.1.1.2	Theorie	592
4.1.2	Die Möglichkeiten von DryLab	592
4.1.2.1	Die Funktionsweise von DryLab	592
4.1.2.2	Modus-Auswahl	593
4.1.3	Praktische Anwendungen von DryLab im Labor	594
4.1.4	Zusammenfassung und Ausblick	608
	<i>Literatur</i>	609
4.2	ChromSword®-Software für die automatische und Computer-unterstützte HPLC-Methodenentwicklung	611
	<i>S. Galushko, V. Tanchuk, I. Shishkina, O. Pylypchenko und W. D. Beinert</i>	
4.2.1	Einführung	611
4.2.1.1	Offline-Modus	611
4.2.1.2	Online-Modus	611
4.2.2	ChromSword®-Versionen	611
4.2.3	Anbindung eines HPLC-Systems im Online-Modus	612
4.2.4	Methodenentwicklung mit ChromSword®	613
4.2.4.1	Offline-Modus (Computer-unterstützte Methodenentwicklung)	613
4.2.4.2	Online-Modus – vollautomatische Optimierung von isokratischen und Gradienten-Trennungen	617

4.2.4.2.1	Software-Funktionen für die Automatisierung	622
4.2.4.2.2	Wie optimiert das System HPLC-Trennungen?	622
4.2.5	Fazit	625
	<i>Literatur</i>	626
4.3	Multifaktorielle systematische Methodenentwicklung und -optimierung in der Umkehrphasen-HPLC	627
	<i>Michael Pfeffer</i>	
4.3.1	Einleitung und faktorielle Betrachtungsweise	627
4.3.2	Strategie für teilautomatisierte Methodenentwicklungen	630
4.3.3	Vergleich kommerziell erhältlicher Software im Hinblick auf den Beitrag zur faktoriellen Methodenentwicklung	635
4.3.4	Entwicklung eines neuen Systems zur multifaktoriellen Methodenentwicklung	636
4.3.4.1	Auswahl stationärer Phasen	637
4.3.4.2	Methodenoptimierung mit HEUREKA	639
4.3.4.3	Auswertung der Daten mit HEUREKA	645
4.3.5	Fazit und Ausblick	650
	<i>Literatur</i>	650
5	„Anwender berichten“	651
5.1	Nano-LC-MS/MS in der Proteomforschung	653
	<i>Heike Schäfer, Christiane Lohaus, Helmut E. Meyer und Katrin Marcus</i>	
5.1.1	Proteomforschung – eine Einführung in die Thematik	653
5.1.2	Probenvorbereitung für die Nano-LC	654
5.1.3	Nano-LC	655
5.1.4	Online-LC-ESI-MS/MS-Kopplung	660
5.1.5	Offline-LC-MALDI-MS/MS-Kopplung	661
5.1.5.1	Probenfraktionierung	661
5.1.5.2	MALDI-TOF-MS/MS-Analysen	663
5.1.6	Datenanalyse	663
5.1.7	Anwendungsbeispiel: Analyse des α -Crystallin A in der Augenlinse der Maus	664
	<i>Literatur</i>	667
5.2	Wege zur Überprüfung der Robustheit in der RP-HPLC	669
	<i>Hans Bilke</i>	
5.2.1	Zur Überprüfung der Robustheit	669
5.2.2	Robustheitstest in der analytischen RP-HPLC mittels systematischer Methodenentwicklung	669
5.2.3	Robustheitstest in der analytischen RP-HPLC mittels statistischer Versuchsplanung (DoE)	679
	<i>Literatur</i>	693

5.3	Trennung komplexer Proben	695
	<i>Knut Wagner</i>	
5.3.1	Einleitung	695
5.3.2	Mehrdimensionale HPLC	695
5.3.3	Techniken der mehrdimensionalen Trennung	697
5.3.3.1	Offline-Technik	697
5.3.3.2	Online-Technik	698
5.3.4	Online Probenvorbereitung als Vorstufe der mehrdimensionalen HPLC	699
5.3.5	Anwendungsgebiet der mehrdimensionalen HPLC	701
5.3.5.1	Was ist realisierbar? – ein Beispiel aus der Praxis	702
5.3.6	Kritische Parameter der mehrdimensionalen HPLC	707
	<i>Literatur</i>	708
5.4	Evaluierung eines integrierten Verfahrens zur Charakterisierung von Chemikalienbibliotheken auf der Basis von HPLC-UV/MS/CLND	709
	<i>Mario Arangio, Federico Riccardi Sirtori, Katia Marcucci, Giuseppe Razzano, Maristella Colombo, Roberto Biancardi und Vincenzo Rizzo</i>	
5.4.1	Einführung in die Problematik	709
5.4.2	Material und Methoden	710
5.4.2.1	Instrumentierung	710
5.4.2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	710
5.4.2.3	Aufbau der Hochdurchsatz-Plattform (HTPl)	712
5.4.2.4	Chromatographische Einstellungen	713
5.4.2.5	Massenspektrometer- und CLND-Einstellungen	713
5.4.2.6	Datenverarbeitung und Registrierung	713
5.4.2.7	Multilineare Regressionsanalyse zur Ableitung des CLND-Response-Faktors	715
5.4.3	Ergebnisse und Diskussion	716
5.4.3.1	Flüssigkeitschromatographie und UV-Detektion	716
5.4.3.2	Entwicklung der Massenspektrometrie-Methode	717
5.4.3.3	CLND-Detektoreinstellung	717
5.4.3.4	Überprüfung mit kommerziellen Standards	717
5.4.3.5	Testen von eigenen Verbindungen	720
5.4.4	Zusammenfassung	724
	<i>Literatur</i>	725
	Anhang	727
	Stichwortverzeichnis	753