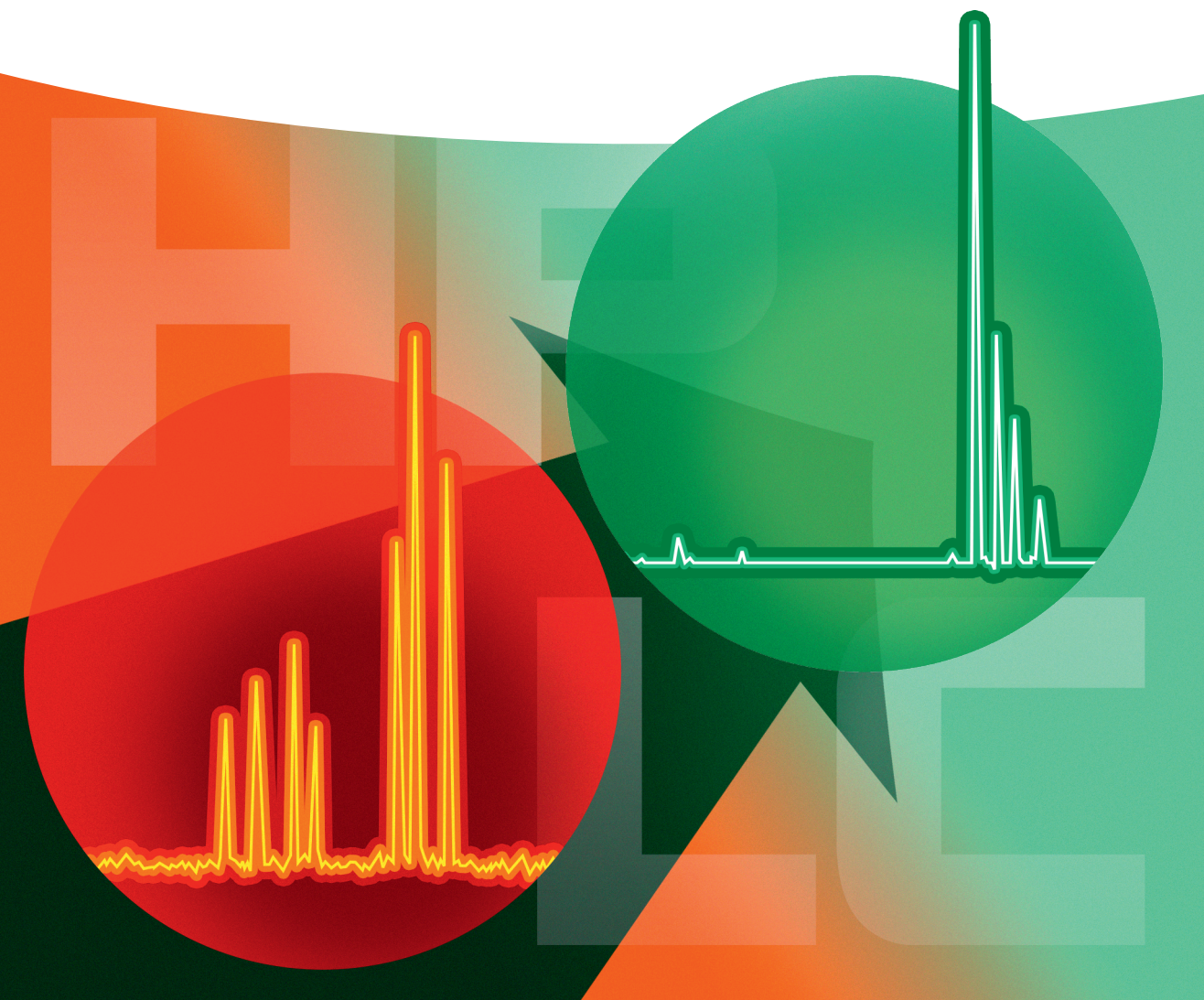


Herausgegeben von Stavros Kromidas



# HPLC optimal einsetzen

Konzepte und Strategien für Methodenentwicklung und -optimierung





*Stavros Kromidas*

**HPLC optimal einsetzen**





*Herausgegeben von  
Stavros Kromidas*

## **HPLC optimal einsetzen**

Konzepte und Strategien für Methodenentwicklung  
und -optimierung

**WILEY-VCH**

Herausgegeben von

**Stavros Kromidas**

Consultant  
Breslauer Str. 3  
66440 Blieskastel  
Deutschland

Alle Bücher von WILEY-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung.

**Bibliografische Information der  
Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2022 WILEY-VCH GmbH, Boschstr. 12, 69469  
Weinheim, Germany

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

**Print ISBN** 978-3-527-34788-9

**ePDF ISBN** 978-3-527-82853-1

**ePub ISBN** 978-3-527-82852-4

**Satz** le-tex publishing services GmbH, Leipzig

Gedruckt auf säurefreiem Papier.

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

## Vorwort

Die „HPLC-Welt“ ist eine vielfältige – Glücksfall und Herausforderung zugleich. Erfolgreiche Strategien für ein „gutes“ Ergebnis können demnach gänzlich anders aussehen.

Das Ziel des Buches ist es, interessierten Kolleg:innen erprobte Strategien und bewährte Wege für die Methodenentwicklung und Optimierung für alle wichtigen Anwendungsbereiche der HPLC und UHPLC näherzubringen. Dazu wurden erfahrene Fachleute eingeladen, Wissen und Erfahrungen praxisnah und möglichst kompakt vorzustellen.

Dabei war es wichtig, beides zu berücksichtigen: unterschiedliche Herausforderungen chromatografischer Natur, aber auch unterschiedliche Rahmenbedingungen im Alltag. Erst dies ermöglicht einen differenzierten Blickwinkel und folglich eine zielgerechte Vorgehensweise. Die Autoren kommen daher aus der Forschung, sind Dienstleister in Industrieunternehmen oder privaten Laboren, haben selbst Tools entwickelt oder sind Mitarbeiter von bekannten Herstellern.

Die Leser:innen mögen im Buch Anregungen finden, um *ihre* Optimierungsstrategie zu entwickeln.

Mein Dank gilt meinen Autorenkolleg:innen für ihre Zeit und ihr Engagement sowie Wiley-VCH, der die Realisierung dieses Vorhabens ermöglicht hat.

Blieskastel, im November 2021

*Stavros Kromidas*



## Zum Aufbau des Buches

Das Buch besteht aus vier Teilen:

### **Teil I: Optimierungsstrategien für einzelne Fragestellungen**

Im ersten Teil werden Optimierungsstrategien für unterschiedliche Analyte besprochen, von Kleinmolekülen und chiralen Substanzen bis hin zu Biomolekülen. Auch unterschiedliche Betriebsarten werden behandelt: LC-MS, 2D-HPLC, HILIC, SFC. Schließlich werden Optimierungsstrategien basierend auf Strukturinfos der Analyte vorgestellt, es wird ferner auf Optimierungsmöglichkeiten im regulierten Umfeld eingegangen.

### **Teil II: Computergestützte Strategien (in-silico-Anwendungen)**

In Teil II werden anhand konkreter Fragestellungen Konzepte für die computergestützte Methodenentwicklung für Kleinmoleküle und Biomoleküle vorgestellt.

### **Teil III: Anwender berichten**

Dienstleister aus zwei Industrieunternehmen und zwei Privatlaboren stellen in Teil III anhand der Vorgaben und Wünsche von internen und/oder externen Kunden ihre Konzepte zur Methodenentwicklung vor.

### **Teil IV: Hersteller berichten**

Mitarbeiter von fünf bekannten HPLC-Herstellern zeigen, wie durch die Konzeption von HPLC-Geräten, durch unterschiedliche Tools sowie die dahinterstehende Philosophie HPLC-Anwender:innen unterstützt werden, eine möglichst effiziente, der Fragestellung angepasste HPLC-Methode zu etablieren.

Das Buch ist als Leitfaden konzipiert und muss nicht linear gelesen werden. Die einzelnen Kapitel stellen abgeschlossene Module dar, ein „Springen“ ist jederzeit möglich. Damit haben wir versucht, dem Charakter des Buches als Nachschlagewerk gerecht zu werden. Die Leser:innen mögen davon profitieren.



# Inhaltsverzeichnis

**Vorwort** [V](#)

**Zum Aufbau des Buches** [VII](#)

**Teil I Optimierungsstrategien für einzelne Fragestellungen** [1](#)

- 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen** [3](#)  
*Dwight R. Stoll*
- 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**  
*Thomas Letzel*
- 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**  
*Markus M. Martin*
- 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 unbekannteren Verunreinigung – Lösemittelwechsel mittels Single-/Multi-Heartcut-Technologien 53
- 3.4 Abkürzungen 55  
Literatur 56
  
- 4 Strategien für die erfolgreiche Charakterisierung von Proteinbiopharmazeutika 57**  
*Szabolcs Fekete, Valentina D'Atri und Davy Guillaume*
- 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**  
*Lisa Strasser, Florian Füssl und Jonathan Bones*
- 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 Optimierungstrategien in der Supercritical Fluid Chromatography (SFC) mit gepackten Säulen 87**  
*Caroline West*
- 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 Optimierungstrategien für chirale Trennungen 107**  
*Markus Juza*
- 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 Optimierungstrategien 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<sup>®</sup> 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

	<b>Teil III Anwender berichten</b>	<b>229</b>
<b>12</b>	<b>Moderne HPLC-Methodenentwicklung</b>	<b>231</b>
	<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
<b>13</b>	<b>Optimierungsstrategien in der HPLC aus Sicht eines Industriedienstleisters</b>	<b>243</b>
	<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
<b>14</b>	<b>Optimierungsstrategien in der HPLC aus Sicht eines Dienstleisters – der UNTIE<sup>®</sup>-Prozess der CUP-Laboratorien</b>	<b>249</b>
	<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 <sup>®</sup> -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
<b>15</b>	<b>Optimierungsstrategien in der HPLC</b>	<b>259</b>
	<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 <sub>s</sub> )	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 Peaktailing 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

- 17 Den Anwender starkmachen – Optimierung durch Individualisierung 329**  
*Kristin Folmert und Kathryn Monks*
- 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 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
- 18 (U)HPLC-Grundlagen und darüber hinaus 345**  
*Gesa Chad, Brigitte Bollig und Kyoko Watanabe*
- 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-Laboratorien 357**  
*Frank Steiner und Soo Hyun Park*
- 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](#)**
  - Falk-Thilo Ferse, Detlev Kurth, Tran N. Pham, Fadi L. Alkhateeb und Paul Rainville*
  - Literatur [392](#)
  
- Stichwortverzeichnis [393](#)**





## Teil I

### Optimierungsstrategien für einzelne Fragestellungen



# 1

## 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen

Dwight R. Stoll <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gustavus Adolphus College, St. Peter, USA

### 1.1 Motivationen für zweidimensionale Trennung

In der Vergangenheit war ein Großteil der Forschung, die sich mit mehrdimensionalen Trennungen und ihrer Anwendung auf reale analytische Probleme befasst hat, auf den Umgang mit komplexen Proben ausgerichtet. Diese werden traditionell als Proben mit Hunderten oder Tausenden von Substanzen beschrieben und stammen oft aus natürlichen Quellen wie Pflanzenextrakten oder Körperflüssigkeiten (z. B. Blut oder Urin). Es hat sich jedoch gezeigt, dass die mehrdimensionale Trennung auch für Proben, die schwer zu trennende, aber – nach der traditionellen Definition – nicht komplexe Analyten enthalten, äußerst effektiv sein kann. Da diese Unterscheidung einen großen Einfluss darauf haben kann, wie man an die Methodenentwicklung herangeht, beginnen wir hier mit einer Gegenüberstellung der beiden Fälle.

#### 1.1.1 Schwierig zu trennende Proben

Die Schwierigkeit, die mit der Trennung einer bestimmten Probe verbunden ist, kann von ihrer schieren Komplexität (d. h. Tausende von darin enthaltenden Substanzen) herrühren. In diesem Fall reicht es nicht aus, sich auf die chromatographische Trennung allein zu verlassen, um das Gemisch vollständig zu trennen, sondern es ist ein zusätzliches Momentum für Selektivität erforderlich (z. B. Probenvorbereitung und/oder selektive Detektion mittels Massenspektrometrie). Es kommt jedoch häufig vor, dass Proben, die nur wenige Substanzen enthalten, aufgrund des hohen Ähnlichkeitsgrades der Substanzen in der Mischung schwer zu trennen sind. So kann ein Gemisch beispielsweise nur sechs Substanzen enthalten, aber wenn zwei dieser sechs Substanzen Enantiomere sind (1a und 1b), dann kann die vollständige Trennung des Gemisches mit einer einzigen Säule schwierig sein, selbst wenn die Trennung der Substanzen 2–5 von 1a/1b einfach ist. Solche Situationen treten heute häufiger auf als früher, zum Teil aufgrund der Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe mit mehreren chiralen Zentren [1] und der zunehmenden Bedeutung

des Nachweises sowohl der D- als auch der L-Enantiomere von Aminosäuren ([2], siehe dazu auch Kap. 6 und 7).

### 1.1.2 Komplexe Proben

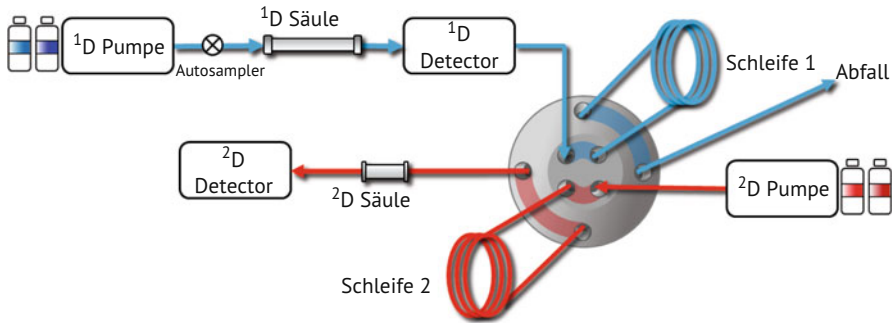
Wie oben erwähnt, wird traditionell davon ausgegangen, dass komplexe Proben Hunderte oder Tausende von unterschiedlichen Substanzen enthalten. Diese Proben stammen oft, aber nicht immer, aus der Natur. So können beispielsweise chemisch synthetisierte Tenside und Polymere zu sehr heterogenen Mischungen aus Tausenden von verschiedenen Substanzen führen. In der Vergangenheit konzentrierte sich die Analyse solcher Proben durch mehrdimensionale Chromatographie hauptsächlich auf sogenannte umfassende Trennmethode, die eine Art globales Profil oder „Fingerprint“ der Probe liefern. In solchen Fällen, in denen nur ein einziges oder wenige Moleküle in der Probe für die Analyse von Bedeutung sind, können einfachere mehrdimensionale Trennmethode wie z. B. das Schneiden eines Peaks ausreichend sein, ja sogar bevorzugt werden.

### 1.1.3 Ziel der Trennung

Wie in der Literatur zur mehrdimensionalen Trennung und weiter unten oft diskutiert wird, ist der Prozess der Entwicklung einer mehrdimensionalen Trennmethode ein kompromissbehaftetes Verfahren. Beispielsweise beeinträchtigen Bedingungen, die kürzere Analysezeiten begünstigen, die Nachweisempfindlichkeit und umgekehrt. Daher ist es für den Analytiker wichtig, gleich zu Beginn der Methodenentwicklung zu erkennen und zu definieren, welche Leistungsmerkmale der Methode für ihn am wichtigsten sind. Wenn zum Beispiel das Erreichen einer vollständigen Auflösung von sechs kritischen Analytenpaaren für die Anwendung der Methode von entscheidender Bedeutung ist, dann sollten Entscheidungen zur Methodenentwicklung dieses Ziel unterstützen, auch wenn dies auf Kosten der Analysezeit und/oder der Nachweisempfindlichkeit geht.

## 1.2 Auswahl des zweidimensionalen Trennungsmodus

Alle zweidimensionalen Trennungen können entweder „offline“ oder „online“ durchgeführt werden. Im Offline-Modus werden eine oder mehrere Fraktionen des 1D-Eluats in einem Zwischenspeicher, wie z. B. einem Satz von Vials oder einer Mikrotiterplatte, gesammelt. Diese Fraktionen werden dann zu einem späteren Zeitpunkt (Minuten bis Jahre) in ein anderes LC-System (entweder dasselbe LC-System, das unter anderen Bedingungen als für die 1D-Trennung betrieben wird, oder ein ganz anderes LC-System) injiziert, entweder mit oder ohne Zwischenverarbeitung dieser Fraktionen. Bei Proteomik-Anwendungen der 2D-LC ist es beispielsweise üblich, die Fraktionen vor der Analyse durch die 2D-Trennung zu entsalzen oder durch Verdunstung zu trocknen, um organisches Lösungsmittel zu entfernen [3]. Im Online-Modus werden die von der 1D-Säule gesammelten Fraktionen entweder



**Abb. 1.1** Instrumentenkonfiguration, die typischerweise für 2D-LC verwendet wird (Quelle: Dr. Gabriel Leme).

sofort durch direkte Injektion in die 2D-Säule weiterverarbeitet oder für eine kurze Zeit (Sekunden bis Stunden) im Gerät selbst gespeichert (normalerweise in Kapillarschleifen oder an der Oberfläche von Sorbentien „Sorbensfallen“). Ein Beispiel für eine Instrumentenkonfiguration, die üblicherweise für diesen Zweck verwendet wird, ist in Abb. 1.1 dargestellt. In diesem Fall hat das Schnittstellenventil zwischen der 1D- und der 2D-Säule zwei Positionen. Durch Umschalten zwischen den beiden Stellungen ändert sich die Rolle der Schleifen 1 und 2 zwischen dem Sammeln des 1D-Eluats und dem Einleiten des 1D-Eluats in den 2D-Zustrom, wodurch dann das Eluat in die 2D-Säule injiziert wird.

Da kommerziell erhältliche Geräte für die 2D-LC-Trennung immer ausgefeilter und zuverlässiger geworden sind, geht der Trend in der Industrie weg von der Offline-Trennung, da die Durchführung von Offline-Trennungen für eine große Anzahl von Proben unpraktisch ist und das Risiko der Degradation und Kontamination der 1D-Fractionen besteht, wenn sie außerhalb des Geräts gehandhabt werden müssen [4]. Angesichts dieses Trends habe ich mich für den Rest dieses Kapitels ganz auf die Online-2D-LC konzentriert. Leser, die mehr über Offline-2D-LC erfahren möchten, werden auf Übersichtsartikel verwiesen, die sich diesem Thema widmen [5, 6].

### 1.2.1 Das Analyseziel bestimmt den Modus

Ab Ende der 1970er-Jahre begannen verschiedene Gruppen, die Modi der 2D-LC-Trennung zu entwickeln, die allgemein als *Heartcut-Modus* und *umfassender Modus* bezeichnet werden [7, 8]. In den letzten zehn Jahren wurden zwei weitere Modi für 2D-Trennungen entwickelt, die als *mehrfacher Heartcut* und *selektiv umfassend* bezeichnet werden. Jeder dieser vier Modi wird in Abschn. 1.2.2 ausführlich besprochen. An dieser Stelle möchte ich jedoch betonen, dass die Wahl des Trennmodus immer vom Analyseziel bestimmt werden sollte. Wenn Sie zum Beispiel eine komplexe Probe haben und so viel wie möglich über diese Probe erfahren möchten (d. h. Hunderte von Substanzen identifizieren), dann wird der umfassende Modus der 2D-Trennung fast immer die beste Wahl sein. Wenn Sie jedoch nur an einigen wenigen Zielsubstanzen in der Probe interessiert sind – auch wenn die Probenmatrix hochkomplex ist –, dann ist ein gezielterer Modus der 2D-Trennung wie einfacher oder

mehrfacher Heartcut wahrscheinlich der beste Ansatz. In der Praxis ist die Zeit, die für jede 2D-Trennung benötigt wird, der entscheidende Parameter für eine effiziente Nutzung des 2D-LC-Instruments. Jede 2D-Trennung, die nicht notwendig für das Erreichen des Analyseziels ist, verursacht unnötige Kosten sowohl in Bezug auf Zeit als auch auf Material und macht die Methode unnötig komplex.

### 1.2.2 Gegenüberstellung der vier Modi für 2D-Trennungen

Die überwiegende Mehrheit der heute entwickelten 2D-LC-Anwendungen gehört zu einer der vier in Abb. 1.2 dargestellten 2D-Trennungsarten. Beim einzelnen Heartcut (A; LC-LC) wird eine einzelne Fraktion des 1D-Eluats, die die interessierenden Analyten enthält, am Ausgang der 1D-Säule aufgefangen und zur 2D-Säule transferiert, wo diese Fraktion der ursprünglichen Probe weiter getrennt wird, sofern die in der ersten und zweiten Dimension verwendeten Trennmechanismen komplementär sind. Der vielleicht größte Vorteil des LC-LC-Modus besteht darin, dass die Zeit, die für die Trennung des 1D-Eluats in der zweiten Dimension zur Verfügung steht, nicht begrenzt ist. Dies bietet eine enorme Flexibilität bei der Wahl der Parameter für die 2D-Trennung, einschließlich der Flussrate, der Säulenabmessungen und des Injektionsvolumens. Der größte Nachteil von LC-LC ist jedoch, dass diese Technik auf die Analyse von Substanzen begrenzt ist, die in einer einzigen Fraktion des 1D-Eluats erfasst werden können. Dennoch wurde der LC-LC-Ansatz mit großem Erfolg in diversen Anwendungsbereichen eingesetzt, die

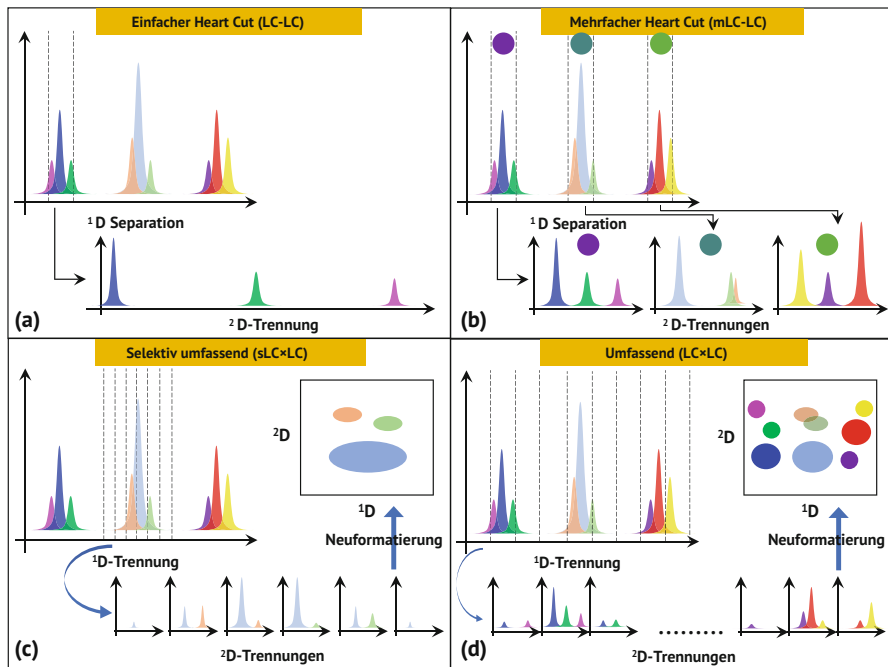


Abb. 1.2 Die vier verschiedenen Modi der 2D-LC-Trennung.

von der Identifizierung niedermolekularer pharmazeutischer Verunreinigungen [9] bis zum Nachweis von Arzneimittelmetaboliten im Plasma reichen [10].

Das genaue Gegenteil von LC-LC in Bezug auf die analytische Bandbreite ist der umfassende Modus der 2D-Trennung (D; LC  $\times$  LC). Wie die Abbildung zeigt, werden in diesem Fall Fraktionen des 1D-Eluats gesammelt und nacheinander einzeln in die 2D-Trennung überführt. Typischerweise ergibt dies eine lange Reihe von vielen (zehn bis hundert) 2D-Chromatogrammen, die in einem einzigen Detektionsdatensatz gesammelt werden. Dieser lange Datensatz kann dann in Abschnitte zerlegt werden, die den einzelnen 2D-Trennungen entsprechen, und dann neu formatiert werden, sodass ein zweidimensionales Datenfeld entsteht, das dann entweder als Konturkarte oder als 3D-Oberflächendarstellung visualisiert werden kann. Die Vor- und Nachteile des LC  $\times$  LC-Ansatzes sind im Grunde genommen umgekehrt wie beim LC-LC-Ansatz. Der Hauptvorteil besteht darin, dass die Bandbreite der 2D-Trennung genauso groß ist wie die Bandbreite der 1D-Trennung. Der größte Nachteil besteht darin, dass die Zeit, die für jede einzelne der 2D-Trennungen zur Verfügung steht, stark eingeschränkt ist aufgrund der großen Zahl der Fraktionen des 1D-Eluats, die von der zweiten Dimension verarbeitet werden müssen.

Die beiden anderen in Abb. 1.2 dargestellten Modi sind Hybride der LC-LC- und LC  $\times$  LC-Modi. Im Falle des mehrfachen Heartcut (B; mLc-LC) wird eine Fraktion des 1D-Eluats je Abschnitt der 1D-Trennung gesammelt, die für eine weitere Trennung vorgesehen ist. Dies entspricht dem Vorgehen bei der LC-LC, wird im Verlauf der 2D-Trennung aber zwei- oder mehrmals wiederholt. Schließlich werden bei selektiven umfassenden Trennungen (C; sLC  $\times$  LC) mehrere Fraktionen des 1D-Eluats über eine bestimmte Zone der 1D-Trennung gesammelt, in Schleifen oder „Fallen“ gespeichert, und dann wie bei LC  $\times$  LC-Trennungen einzeln in die 2D-Säule injiziert. Diese Hybridmodi sind in vielen Fällen deshalb interessant, weil sie die Stärken von LC-LC und LC  $\times$  LC ausnutzen und gleichzeitig deren Schwächen mildern. Insbesondere bieten mLc-LC und sLC  $\times$  LC dem Analytiker eine große Flexibilität bei der Entwicklung und Implementierung einer 2D-LC-Methode, da sie die Entkopplung des Sammelns von 1D-Eluatfraktionen von deren weiteren Trennung in der zweiten Dimension ermöglichen [11].

### 1.2.3 Hybride Modi bieten Flexibilität

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, wie die zusätzliche Flexibilität, die mLc-LC und sLC  $\times$  LC sich bieten, genutzt werden kann, und ich möchte im Folgenden zwei Beispiele zeigen. Erstens ist sLC  $\times$  LC hilfreich, um das sogenannte Untererfassungsproblem (Undersampling) bei 2D-Trennungen zu vermeiden. Undersampling bezieht sich auf den unerwünschten Effekt beim Sammeln von 1D-Eluatfraktionen, die breiter als etwa die Hälfte einer 1D-Peakbreite sind. In diesem Fall können Analyten, die nahe beieinander von der 1D-Säule eluieren, bei der Probenahme wieder vermischt werden, und die Trennleistung der ersten Dimension einer 2D-Trennung wird effektiv vermindert [12–14]. Dieses Problem tritt im LC  $\times$  LC-Modus besonders dann auf, wenn die 1D-Peaks schmal sind (z. B. < 5 s breit). Zur Bewältigung dieser Herausforderung können mehrere schmale (< 1 s) Fraktionen über eine be-

stimmte Region gesammelt werden, die für die 1D-Trennung von Interesse ist. Zweitens kann der  $sLC \times LC$ -Modus auch dazu verwendet werden, das Volumen des 1D-Eluats zu steuern, welches für jede interessierende Region der 1D-Trennung in die 2D-Säule injiziert wird. Ein konkretes Beispiel soll diesen Vorteil deutlicher machen. Angenommen, wir haben eine bestehende 1D-LC-Trennung und möchten einen bestimmten Peak auf eine 2D-Säule zur weiteren Trennung und/oder Charakterisierung durch Massenspektrometrie übertragen. Wenn der 1D-Peak 15 s breit ist, dann beträgt das Volumen des zu übertragenden Peaks  $250 \mu\text{l}$ . Obwohl es sicherlich möglich ist, dieses Volumen in einer einzigen Fraktion zu übertragen, gibt es viele Fälle, in denen die Injektion eines solch großen Volumens in die 2D-Säule die Trennleistung der 2D-Trennung beeinträchtigt, insbesondere wenn ein Unterschied zwischen den mobilen Phasen der 1D- und der 2D-Trennung vorliegt [15]. Mit  $sLC \times LC$  kann man nun vier Fraktionen anstelle einer einzigen des interessierenden 1D-Peaks sammeln, wobei jede der Fraktionen etwa  $60 \mu\text{l}$  beträgt. Diese vier Fraktionen können dann einzeln in die 2D-Säule injiziert werden [16]. Dies wird zwar die Analysezeit erhöhen und erfordert eine komplexere Schnittstelle, aber diese Art von Flexibilität kann bei der Methodenentwicklung sehr wertvoll sein.

## 1.3 Wahl der Trennmodi

Nachdem man sich für den Modus der 2D-Trennung entschieden hat, besteht die nächste wichtige Entscheidung darin, welche zwei Trennmodi in der ersten und zweiten Dimension des 2D-Systems verwendet werden.

### 1.3.1 Komplementarität als Leitmotiv

In der Literatur über 2D-Trennungen wird viel über das Prinzip der „Orthogonalität“ diskutiert, in Bezug auf die Auswahl der Trennmodi, die in einer 2D-Trennung verwendet werden sollten. Der Grund für die Forderung nach Orthogonalität ist, dass es von einem rein theoretischen Standpunkt aus gesehen am besten ist, wenn die aus den 1D- und 2D-Trennungen erhaltenen Retentionsmuster nicht korrelieren [17]. Ich denke jedoch, dass es von größerer praktischer Relevanz ist, über die Komplementarität der beiden in der 2D-Trennung verwendeten Trennmodi nachzudenken. Inwieweit ergänzt der in der zweiten Dimension verwendete Trennmodus die bereits in der ersten Dimension verwendete Trennung? Ein konkretes Beispiel soll helfen, diesen Punkt zu verdeutlichen. Nehmen wir an, wir trennen eine Mischung von Peptiden, die sowohl in der Gesamtzahl der Aminosäurereste als auch in der Anzahl der Lysinreste variieren, sodass deren positive Ladung in Lösung ebenfalls variiert (bei niedrigem pH-Wert). Wenn wir ein 2D-LC-System aus RP-C18-Säulen und mobilen Phasen mit niedrigem pH-Wert in beiden Dimensionen vorsehen würden, wird dies keine effektive 2D-Trennung ergeben, da die zweite Trennung keine neue Trennselektivität hinzufügt. Nehmen wir nun an, wir ändern die 1D-Trennung in Kationenaustausch (CEX), wo die Peptide hauptsächlich nach ihrem Grad der positiven Ladung eluiert werden



(niedrige Ladung eluiert zuerst, hohe Ladung eluiert zuletzt). Wenn wir nun eine 2D-Trennung mit einer RP C18-Säule hinzufügen, wird diese die 1D-Trennung gut ergänzen, da sie sich hauptsächlich nach der Wasserlöslichkeit der Peptide trennt (die am besten löslichen eluieren zuerst, die am wenigsten löslichen zuletzt). In diesem Fall können wir zwei Peptide haben, die die gleiche Ladung tragen – und somit in der CEX-Trennung koeluieren – aber aufgrund von Unterschieden in der Anzahl und/oder der Art der Aminosäuren sehr unterschiedliche Wasserlöslichkeiten (und somit unterschiedliche Hydrophobizität) haben, die sich durch die 2D-RP-Säule leicht trennen lassen.

In der Vergangenheit wurde viel Mühe darauf verwendet, herauszufinden, welche Trennmodi für verschiedene Probenotypen und Anwendungen am besten geeignet sind. Heutige Anwender können diese Ergebnisse als Grundlage für ihre eigene Arbeit verwenden. Für einige Anwendungsbereiche gibt es gute Veröffentlichungen, die die Komplementarität verschiedener Trennungen für bestimmte Molekültypen wie z. B. Peptide veranschaulichen [18]. Ich empfehle den Lesern, auch 2D-LC-Datenbanken zu konsultieren, um die jeweils besten Trennungen für ihre Anwendung herauszufinden.<sup>1)</sup>

### 1.3.2 Die Pirok-Kompatibilitätstabelle

Leider müssen wir mehr als nur die Komplementarität der Selektivitäten der unterschiedlichen Trennmodi berücksichtigen, die bei einer 2D-LC-Trennung verwendet werden. Andere Faktoren wie die Kompatibilität der mobilen Phasen mit den einzelnen Trennmodi sind ebenso wichtig und können die Kombination von Trennmodi, die unter dem Gesichtspunkt der Selektivität recht attraktiv aussieht, in der Praxis unbrauchbar machen. Zum Beispiel ist die Kombination einer Normalphasen-(NP)-Trennung (d. h. nicht modifiziertes Kieselgel als stationäre Phase, Hexan als mobile Phase) mit einer RP-Trennung für einige Anwendungen attraktiv, weil die NP-Trennung von adsorptiven Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase dominiert wird, während die RP-Trennung von der Verteilung der Analyten in eine gebundene stationäre Phase dominiert wird. Dieser Unterschied in den Retentionsmechanismen kann zu hochgradig komplementären Selektivitäten führen. Allerdings stoßen wir in diesem Fall auf eine größere praktische Schwierigkeit, da die unpolaren mobilen Phasen mit einem hohen Anteil organischer Lösungsmittel, die für NP-Trennungen verwendet werden, mit den wasserreichen mobilen Phasen, die für RP-Trennungen verwendet werden, nicht mischbar sind – zumindest nicht über einen breiten Mischungsbereich. Dieser Umstand schränkt die Verwendung einiger Kombinationen von Trennmodi wie NP-RP ein, obwohl selbst in diesem Fall das Mischbarkeitsproblem durch die Injektion sehr kleiner Mengen von 1D-Eluat in große 2D-Säulen beherrscht werden kann [19]. Pirok und Schoenmakers haben die Kenntnisse über die Kompatibilität diverser Trennungen in der 2D-LC gesammelt und in der in Abb. 1.3 dargestellten Tabelle zusammengefasst. Grau schattierte Kombinationen sollten gut funktionieren, während hellgrau schattierte Kombina-

1) <http://www.multidlc.org/literature/2DLC-Applications>.

	<sup>2</sup> RP	<sup>2</sup> NP	<sup>2</sup> HILIC	<sup>2</sup> HIC	<sup>2</sup> IEX	<sup>2</sup> SEC-Aq	<sup>2</sup> SEC-Or	<sup>2</sup> Ag	<sup>2</sup> Chiral	<sup>2</sup> Affinity	<sup>2</sup> SFC
	F <sup>+</sup> H <sup>+</sup> Q <sup>+</sup> M <sup>+</sup> E <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> Q <sup>-</sup> B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> Q <sup>-</sup> B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> H <sup>+</sup> M <sup>+</sup> Q <sup>-</sup> B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> Q <sup>-</sup> S <sup>+</sup> O <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> H <sup>+</sup> I <sup>+</sup> A <sup>+</sup> E <sup>+</sup> O <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> H <sup>+</sup> I <sup>+</sup> A <sup>+</sup> E <sup>+</sup> O <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> Q <sup>-</sup> S <sup>+</sup> B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> I <sup>+</sup> S <sup>+</sup> O <sup>+</sup>	H <sup>+</sup> Q <sup>+</sup> S <sup>+</sup> O <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> H <sup>+</sup> M <sup>+</sup> B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> RP H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	A <sup>+</sup> E <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	A <sup>+</sup> E <sup>+</sup> O <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> NP H <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> HILIC H <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	A <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	X <sup>+</sup>	X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> HIC H <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	A <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> IEX H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	A <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> SEC-Aq H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	A <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> SEC-Or H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> Ag H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> Chiral I <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>
<sup>1</sup> Affinity H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	A <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B <sup>+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> SFC H <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	E <sup>+</sup> O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	E <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>

Abb. 1.3 Matrix zur Kompatibilität der verschiedenen Trennungsmodi bei der Verwendung in der ersten oder zweiten Dimension von 2D-LC-Systemen. Abdruck mit Genehmigung aus [20].