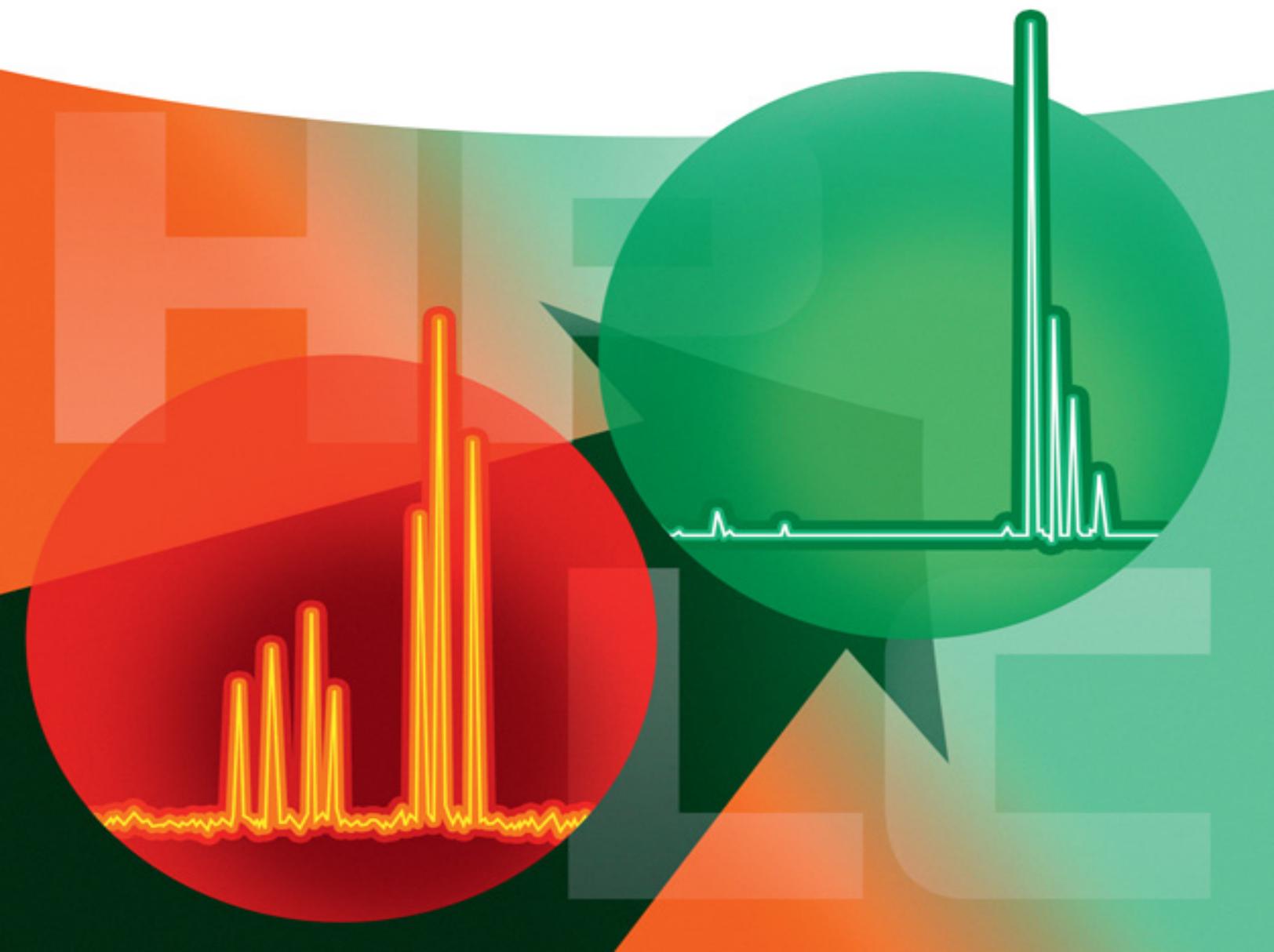


Herausgegeben von Stavros Kromidas

# HPLC optimal einsetzen

Konzepte und Strategien für Methodenentwicklung und -optimierung



# Inhaltsverzeichnis

[Cover](#)

[Titelseite](#)

[Impressum](#)

[Vorwort](#)

[Zum Aufbau des Buches](#)

[Teil I: Optimierungsstrategien für einzelne Fragestellungen](#)

[1 2D-HPLC - Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen](#)

[1.1 Motivationen für zweidimensionale Trennung](#)

[1.2 Auswahl des zweidimensionalen Trennungsmodus](#)

[1.3 Wahl der Trennmodi](#)

[1.4 Auswahl der Trennungsbedingungen](#)

[1.5 Beispiele für die Methodenentwicklung](#)

[1.6 Ausblick](#)

[Literatur](#)

[2 Do you HILIC? Mit Massenspektrometrie? Dann bitte systematisch](#)

[2.1 Ausgangssituation und optimale Nutzung von stationären HILIC-Phasen](#)

[2.2 Ausgangssituation und optimale Nutzung von mobiler HILIC-Phase](#)

[2.3 Weitere Einstellungen bzw. Bedingungen speziell für massenspektrometrische Detektion \(siehe auch Kap. 3\).](#)

## Literatur

### 3 Optimierungsstrategien in der LC-MS-Methodenentwicklung

#### 3.1 Einführung

#### 3.2 Methodenentwicklung für HPLC-MS-Trennungen

#### 3.3 Übertragen von HPLC-Bestandsmethoden an die Massenspektrometrie

#### 3.4 Abkürzungen

## Literatur

### 4 Strategien für die erfolgreiche Charakterisierung von Proteinbiopharmazeutika

#### 4.1 Einführung in Proteinbiopharmazeutika

#### 4.2 Von der Standard- zur Hochleistungschromatographie von Proteinbiopharmazeutika

#### 4.3 Online-Kopplung von nicht denaturierenden LC-Modi mit MS

#### 4.4 Mehrdimensionale LC-Ansätze für Proteinbiopharmazeutika

#### 4.5 Schlussfolgerung und Zukunftstrends in der Analyse von Proteinbiopharmazeutika

## Literatur

### 5 Optimierungsstrategien für die HPLC-Trennung von Biomolekülen

#### 5.1 Einleitung

#### 5.2 Optimierung der chromatographischen Trennung

#### 5.3 Optimierung der Geschwindigkeit einer HPLC-Trennung

5.4 Optimierung der Sensitivität einer HPLC-Trennung

5.5 Multidimensionale Trennungen (siehe auch Kap. 1)

5.6 Überlegungen bezüglich MS-Detektion (siehe auch Kap. 3)

5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Literatur

6 Optimierungsstrategien in der Supercritical Fluid Chromatography (SFC) mit gepackten Säulen

6.1 Auswahl einer stationären Phase, die eine angemessene Retention *und* gewünschte Selektivität ermöglicht

6.2 Optimierung der mobilen Phase zur Elution aller Analyten

6.3 Optimierung von Temperatur, Druck und Flussrate

6.4 Überlegungen zur SFC-MS-Kopplung

6.5 Zusammenfassung der Methodenoptimierung

6.6 SFC als zweite Dimension in der zweidimensionalen Chromatographie

6.7 Weiterführende Literatur

Literatur

7 Optimierungsstrategien für chirale Trennungen

7.1 Enantioselektive (Chirale) Trennungen

7.2 Wie fängt man an?

7.3 SFC zuerst?

7.4 Gibt es Regeln, wie man die vorhersagen kann, welche CSP für mein Trennproblem geeignet ist?

7.5 Welches sind die am  
erfolgsversprechendsten CSPs?

7.6 Kann man CSPs miteinander vergleichen?

7.7 „No-Gos“, Fallstricke und Besonderheiten  
bei der chiralen HPLC und SFC

7.8 Gradienten in der chiralen  
Chromatographie

7.9 Alternative Strategien zur chiralen HPLC  
und SFC auf Polysaccharid-CSPs

7.10 Wie löse ich Trennprobleme für  
Enantiomere, ohne ins Labor zu gehen?

7.11 Die Zukunft der chiralen Trennung –  
schnelle chirale Trennung (cUHPLC und  
cSFC)?

Literatur

8 Optimierungsstrategien basierend auf der  
chemischen Struktur der Analyte

8.1 Einleitung

8.2 Der Einfluss funktioneller Gruppen

8.3 Wasserstoffbrückenbindungen

8.4 Einfluss der Wasserlöslichkeit durch  
Hydratbildung bei Aldehyden und Ketonen

8.5 Bedeutet polar gleich hydrophil?

8.6 Peroxidbildung bei Ethern

8.7 Der pH-Wert in der HPLC

8.8 Betrachtungen und  
Löslichkeitsabschätzungen in 8.9 komplexeren  
Molekülen

8.9 Der Octanol-Wasser-Koeffizient

8.10 Hansen-Löslichkeitsparameter

8.11 Fazit und Ausblick

## Literatur

### 9 Optimierungsmöglichkeiten im regulierten Umfeld

#### 9.1 Einführung

#### 9.2 Vorbemerkung

#### 9.3 Auflösung

#### 9.4 Peak/Rauschen-Verhältnis

#### 9.5 Variationskoeffizient, $V_k$

## Literatur

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

#### 10 Strategie zur automatisierten Entwicklung von RP-HPLC-Methoden für die domänenspezifische Charakterisierung monoklonaler Antikörper

##### 10.1 Zielsetzung

##### 10.2 Einführung

##### 10.3 Automatisierte Methodenentwicklung und Software-Tools

##### 10.4 Wechselwirkung mit Instrumenten

##### 10.5 Säulen

##### 10.6 Probenvorbereitung und HPLC-Analyse

##### 10.7 Automatisierte Methodenentwicklung

##### 10.8 Säulen-Screening

##### 10.9 Schnelle Optimierung

##### 10.10 Feinoptimierung und Proben-Profiling

##### 10.11 Robustheitstests

##### 10.12 Verbesserung der Methode

##### 10.13 Schlussfolgerungen

## Literatur

11 Fusion QbD® Software: ICH-konformes  
Lebenszyklus-Management für analytische  
Methoden: Entwicklung, Validierung, Transfer

11.1 Einführung

11.2 Übersicht - experimentelles Design und  
Datenmodellierung in Fusion QbD

11.3 Zielprofil einer analytischen Methode

11.4 APLM-Stadium 1 - Entwurf und  
Entwicklung des Verfahrens

11.5 APLM-Stadium-2 - Verifizierung der  
Methodenleistung

11.6 Was folgt? - Erwartungen für 2020 und  
darüber hinaus

Literatur

Teil III: Anwender berichten

12 Moderne HPLC-Methodenentwicklung

12.1 Robuste Ansätze für die Praxis

12.2 Ausblick

Literatur

13 Optimierungsstrategien in der HPLC aus Sicht  
eines Industriedienstleisters

13.1 Einleitung

13.2 Forschung und Entwicklung

13.3 Qualitätskontrolle

13.4 Prozessbegleitende Analytik

13.5 Entscheidungsbaum zur  
Optimierungsstrategie in Abhängigkeit vom  
späteren Einsatzgebiet

14 Optimierungsstrategien in der HPLC aus Sicht  
eines Dienstleisters - der UNTIE®-Prozess der  
CUP-Laboratorien

14.1 Übliche Herausforderungen für einen Dienstleister

14.2 Ein typisches, langwieriges Projekt – wie es meistens läuft und wie man es nicht machen sollte!

14.3 Wie machen wir es besser? – Der UNTIE®-Prozess der CUP-Laboratorien

Literatur

15 Optimierungsstrategien in der HPLC

15.1 Definition der Aufgabestellung

15.2 Relevante Daten für die HPLC-Analyse einer Substanz (siehe auch Kap. 8)

15.3 Generische Methoden

15.4 Generelle Tipps zum Optimieren von HPLC-Methoden

15.5 Säulendimension und Partikelgrößen

Literatur

Teil IV: Hersteller berichten

16 Optimierungsstrategien für Ihre HPLC – Agilent Technologies

16.1 Erhöhung der Trennleistung: Zero Dead Volume Fittings

16.2 Trennleistung: Minimierung der Dispersion

16.3 Erhöhung des Durchsatzes – verschiedene Wege zur Senkung der Analysenlaufzeit

16.4 Minimale Verschleppung für die Spurenanalytik: Multiwash

16.5 Steigern Sie die Leistung Ihrer vorhandenen Systeme – modular oder schrittweise Aufrüstung bestehender Systeme

16.6 Erhöhen Sie Automatisierung, Benutzerfreundlichkeit und Reproduzierbarkeit mit den Merkmalen einer quaternären High-End-UHPLC-Pumpe

16.7 Automatisierung erhöhen: Lassen Sie Ihren Autosampler die Arbeit machen

16.8 System für mehrere Anwendungen: Multimethoden- und Methodenentwicklungssysteme

16.9 Kombinieren Sie Probenvorbereitung mit LC-Analyse: Online SPE

16.10 Leistungssteigerung mit einer zweiten chromatographischen Dimension: 2D-LC (siehe auch Kap. 1)

16.11 Think different! Verwenden Sie überkritisches CO<sub>2</sub> als Eluent: SFC - Supercritical Fluid Chromatography (siehe auch Kap. 6)

16.12 Bestimmen Sie verschiedene Konzentrationsbereiche in einem System: hochauflösende Bereichs-HPLC (HDR)

16.13 Automatisieren Sie sogar Ihren Methodentransfer von anderen LC-Systemen: Intelligent System Emulation Technology (ISET)

16.14 Zusammenfassung und Schlussfolgerung  
Literatur

17 Den Anwender starkmachen - Optimierung durch Individualisierung

17.1 Einleitung

17.2 Die eigenen Anforderungen definieren

17.3 Ein Assistent eröffnet viele neue Möglichkeiten

[17.4 Die verbauten Materialien im Fokus der Optimierung](#)

[17.5 Softwareoptimierung erfordert Offenheit](#)

[17.6 Ausblick](#)

[18 \(U\)HPLC-Grundlagen und darüber hinaus](#)

[18.1 Typische \(U\)HPLC-Betriebsparameter und ihre Auswirkung auf die chromatographische Leistung](#)

[18.2 „Analytical Intelligence“ – AI, M2M, IoT – wie moderne Technologie die Praxis in der Routine erleichtern kann](#)

[Literatur](#)

[19 Herausforderungen in modernen HPLC-Laboratorien](#)

[19.1 Vanquish Core, Flex und Horizon – drei Performance-Level für spezifische Herausforderungen unserer Zeit](#)

[19.2 Intelligente und eigenständige HPLC-Geräte](#)

[19.3 2D-LC zur Analyse komplexer Proben und für weitere Automatisierungsmöglichkeiten \(siehe auch Kap. 1\)](#)

[19.4 Software-assistierte automatisierte Methodenentwicklung](#)

[Literatur](#)

[20 Systematische Methodenentwicklung mit einem analytischen Quality-by-Design-Ansatz unter Verwendung von Fusions-QbD und UPLC](#)

[Literatur](#)

[Stichwortverzeichnis](#)

[Endbenutzer-Lizenzvereinbarung](#)

# Tabellenverzeichnis

## Kapitel 1

[Tab. 1.1 Zusammenfassung der Bedingungen für die IPRP-IPRP-Trennung von Farbstoffen...](#)

[Tab. 1.2 Zusammenfassung der Bedingungen für die HILICxRP-Trennung von PS20.](#)

## Kapitel 2

[Tab. 2.1 Einteilung der funktionellen HILIC-Phasen und Wechselwirkungsmöglichkeiten...](#)

## Kapitel 5

[Tab. 5.1 Häufig angewandte Kombinationen von chromatographischen Trennmethoden m...](#)

## Kapitel 7

[Tab. 7.1 Vergleich gecoateter und immobilisierter Polysaccharid CSPs.](#)

[Tab. 7.2 Empfohlene CSPs für ein Screening](#)

## Kapitel 8

[Tab. 8.1 Wechselwirkungskräfte zwischen Molekülen.](#)

[Tab. 8.2 Einfluss funktioneller Gruppen.](#)

[Tab. 8.3 Übersicht über ausgewählte funktionelle Gruppen und deren Eigenschaften...](#)

[Tab. 8.4 Vergleich der Lösemittel Ethylacetat und 1,4-Dioxan.](#)

[Tab. 8.5 pK<sub>s</sub>-Werte ausgewählter Carbonsäuren.](#)

[Tab. 8.6 pK<sub>s</sub>-Werte ausgewählter Amine \(pK<sub>s</sub>-Werte der korrespondierenden Säuren\).](#)

[Tab. 8.7 Log-P-Werte ausgewählter \(Amino-\)Alkohole.](#)

[Tab. 8.8 Hansen-Parameter von 1,4-Dioxan und ausgewählten Lösemitteln sowie die ...](#)

## Kapitel 10

[Tab. 10.1 RP-Säulen](#)

## Kapitel 11

[Tab. 11.1 Zeitbereiche für den Gradienten in einer Voruntersuchung.](#)

[Tab. 11.2 Trend-Response-Ziele für eine Studie zum chemischen System.](#)

[Tab. 11.3 Ziele für die mittlere Methodenleistung bei einer Optimierungsstudie.](#)

[Tab. 11.4 Maximale zu erwartende Variationsbreite für die Studienfaktoren, die b...](#)

[Tab. 11.5 Koordinierte Robustheitsziele in einer Optimierungsstudie.](#)

[Tab. 11.6 Toleranzintervall Analyseergebnisse - empfangendes Labor.](#)

## Kapitel 15

[Tab. 15.1 Wichtige Punkte zur Definition der Aufgabenstellung.](#)

[Tab. 15.2 Für die HPLC-Analyse relevante Daten einer Substanz.](#)

[Tab. 15.3 Bodenzahl und USP-Tailing zweier unterschiedlich starker Basen.](#)

[Tab. 15.4 Säurekonstanten typischer organischer Säuren.](#)

[Tab. 15.5 Säurekonstanten typischer organischer Basen.](#)

[Tab. 15.6 Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient einiger Verbindungen und Anteil ...](#)

[Tab. 15.7 Typische Zersetzungsreaktionen von gelösten Substanzen.](#)

[Tab. 15.8 Typische Zersetzungsreaktionen von gelösten Substanzen.](#)

[Tab. 15.9 Parameter und Rationale der generellen Methode.](#)

[Tab. 15.10 Erweiterungen der generischen Methode.](#)

[Tab. 15.11 Basisdaten zur Analyse von Butamirat in Hustensirup.](#)

[Tab. 15.12 Mögliche Schwierigkeiten bei der HPLC-Analyse von Butamirat in Husten...](#)

[Tab. 15.13 HPLC-Parameter für die Analyse von Butamirat in Hustensirup.](#)

[Tab. 15.14 UV-Cutoff einiger Lösungsmittel \(Quelle: Burdick & Jackson\).](#)

[Tab. 15.15 HPLC-Parameter für Gradientenmethode mit Trifluoressigsäure.](#)

[Tab. 15.16 Schrittweises Vorgehen zur Verminderung von Peaktailing.](#)

[Tab. 15.17 Ergebnisse Bodenzahl und USP-Tailing mit verschiedenen mobilen Phasen...](#)

[Tab. 15.18 Bedingungen Cannabinoid-Analyse.](#)

Kapitel 16

[Tab. 16.1 Zur Reproduzierbarkeit von manuellen und automatischen Pipettierschrit...](#)

## Kapitel 17

[Tab. 17.1 Beispielhaftes Lastenheft für Optimierungsmaßnahmen an der HPLC-Anlage...](#)

## Kapitel 18

[Tab. 18.1 Kompressibilität typischer Lösungsmittel für die \(U\)HPLC.](#)

[Tab. 18.2 Analysebedingungen für das Applikationsbeispiel in Abb. 18.3.](#)

[Tab. 18.3 Signal/Rausch-Verhältnisse bei 1 nm im Vergleich zu 8 nm Spaltbreite.](#)

## Kapitel 20

[Tab. 20.1 Allgemeine Aspekte zur Methodenentwicklung.](#)

# Abbildungsverzeichnis

## Kapitel 1

[Abb. 1.1 Instrumentenkonfiguration, die typischerweise für 2D-LC verwendet wird ...](#)

[Abb. 1.2 Die vier verschiedenen Modi der 2D-LC-Trennung.](#)

[Abb. 1.3 Matrix zur Kompatibilität der verschiedenen Trennungsmodi bei der Verwe...](#)

[Abb. 1.4 Darstellung des häufig verwendeten Ansatzes zur Schätzung des Anteils d...](#)

[Abb. 1.5 Identifizierung einer Verunreinigung in einem synthetischen farbstoffma...](#)

[Abb. 1.6 Trennung der Bestandteile von kommerziellem PS20 mittels LC × LC mit HI...](#)

## Kapitel 2

[Abb. 2.1 Schema der Polaritätsbereiche von Trenntechniken. Reversed-Phase-Flüssi...](#)

[Abb. 2.2 Toluol und 4-Hydroxybenzoesäure als prominentes Beispiel \[2\] zum Vergle...](#)

[Abb. 2.3 Einordnung der stationären HILIC-Phasen \(analog wie zu \[2\]\).](#)

[Abb. 2.4 Typischer HILIC-Gradient mit Verlauf und Zusammensetzung der mobilen Ph...](#)

[Abb. 2.5 Trennung von 2-Hydroxy- und 4-Hydroxybenzoesäure \(Molekül 1 bzw. 2\) in ...](#)

[Abb. 2.6 Trennung von 2-Hydroxy- und 4-Hydroxybenzoesäure \(Molekül 1 bzw. 2\) in ...](#)

## Kapitel 3

[Abb. 3.1 Peakkapazität in Abhängigkeit des Gradientenvolumens, ausgedrückt als Vie...](#)

[Abb. 3.2 Beispiel einer automatisiert erstellten Sequenztafel zur automatisier...](#)

[Abb. 3.3 \(a\) Single-Heartcut-Aufbau zur gezielten Isolierung eines unbekanntes P...](#)

## Kapitel 4

[Abb. 4.1 Häufige Modifikationen bei therapeutischen Proteinen und chromatographi...](#)

[Abb. 4.2 Analyse von zehn repräsentativen mAb unter Verwendung eines allgemeinen...](#)

[Abb. 4.3 Glykananalyse der verdauten/reduzierten Trastuzumab-Untereinheiten unte...](#)

[Abb. 4.4 IEX-MS-Analyse verschiedener mAb-Proben mit pI-Werten von 6,3 bis 9,2. ...](#)

[Abb. 4.5 Mögliche Kombinationen von chromatographischen Ansätzen in der ersten u...](#)

[Abb. 4.6 CEX×RPLC-MS- und HILIC×RPLC-MS-Profile von Cetuximab nach Reduktion und...](#)

[Abb. 4.7 Mehrdimensionaler LC-MS/MS-Aufbau, bestehend aus IEX in der ersten Dime...](#)

## Kapitel 5

[Abb. 5.1 Trennung von abgespaltenen und fluoreszenzmarkierten N-Glykanen eines m...](#)

[Abb. 5.2 Trennung von intaktem NIST mAb mittels pH-Gradienten-basierter CEX-Chro...](#)

[Abb. 5.3 Trennung intakter Infliximab-Ladungsvarianten mittels pH-Gradienten-bas...](#)

[Abb. 5.4 Ionenpaar-RP-LC von Trastuzumab und Infliximab nach IdeS-Verdau und Red...](#)

[Abb. 5.5 HILIC-Trennung von abgespaltenen und fluoreszenzmarkierten N-Glykanen e...](#)

[Abb. 5.6 pH-Gradiententrennung von Trastuzumab-Ladungsvarianten über eine Gradie...](#)

[Abb. 5.7 SEC-Trennung eines auf monoklonalem Antikörper basierten Wirkstoffes mi...](#)

[Abb. 5.8 Wichtige Schritte bei der Entwicklung einer HPLC-Methode. Gezeigt sind ...](#)

## Kapitel 6

[Abb. 6.1 SFC-Instrument mit gepackter Säule mit den verschiedenen im Zuge einer ...](#)

[Abb. 6.2 Enantioselektive stationäre Phasen, die hauptsächlich in der chiralen S...](#)

[Abb. 6.3 Typische stationäre Phasen, die bei der achiralen SFC eingesetzt werden...](#)

[Abb. 6.4 Merkmale der in der SFC verwendeten mobilen Phasen: Zusammensetzung gem...](#)

[Abb. 6.5 Die Auswirkungen des Gegendrucks, der Ofentemperatur und der Flussrate ...](#)

[Abb. 6.6 Empfohlener Methodenentwicklungsprozess für achirale und chirale SFC.](#)

## Kapitel 7

[Abb. 7.1 Anwendungsgebiete der enantioselektiven Chromatographie.](#)

[Abb. 7.2 Struktur von rac-Norketotifen.](#)

[Abb. 7.3 Enantiomerentrennung von AHC 2102224 und AHC 2082728 auf Chiralpak AD-H...](#)

[Abb. 7.4 Systematisches Screening von Polysaccharid-CSPs im Normalphasenmodus un...](#)

[Abb. 7.5 Enantiomerentrennung eines Nicotinoly-Derivats auf Chiralcel OD-H. Elue...](#)

[Abb. 7.6 Systematisches Screening für Polysaccharid CSPs im Umkehrphasenmodus.](#)

[Abb. 7.7 Enantiomerentrennung von Cyproconazol auf Chiral Art Cellulose-SC. Elue...](#)

[Abb. 7.8 Systematisches Screening immobilisierter Polysaccharid CSPs im mittlere...](#)

[Abb. 7.9 Basislinientrennung von HCO-Enantiomeren kann im ersten Screening unter...](#)

[Abb. 7.10 Enantiomerentrennung von D- und L-ABGA auf Chiralcel OJ-3 RtD-ABGA 0,2...](#)

[Abb. 7.11 Systematisches Screening von Polysaccharid CSPs im polar-organischen S...](#)

[Abb. 7.12 Systematisches Screening immobilisierter Polysaccharid CSPs im mittelp...](#)

[Abb. 7.13 Enantiomerentrennung von OTL38 auf Chiralpak ZWIX\(+\): 150 × 3,0 mm, 3μ...](#)

[Abb. 7.14 Wie kann man Enantiomerentrennungen für rac Fenoxaprop-P-ethyl finden?](#)

[Abb. 7.15 Trennung von gespiktem Plasma \(0,5 mg/ml racemisches Ketorolac und 2,5...](#)

## Kapitel 8

[Abb. 8.1 Beispiele für Wasserstoffbrückenbindungen. \(a\) zwischen Wasser und Etha...](#)

[Abb. 8.2 Hydratbildung von Carbonylverbindungen.](#)

[Abb. 8.3 Radikalische Chlorierung von Acetylpyridin.](#)

[Abb. 8.4 Dimethylformamid.](#)

[Abb. 8.5 Bildung von Etherhydroperoxiden.](#)

[Abb. 8.6 Abhängigkeit der RP-Retention bei Säuren und Basen vom pH-Wert \(aus \[10...](#)

[Abb. 8.7 Lincomycin.](#)

[Abb. 8.8 Streptomycin.](#)

[Abb. 8.9 \(Amino-\)Alkohole.](#)

[Abb. 8.10 Paracetamol.](#)

[Abb. 8.11 3D-Darstellung der Hansen-Löslichkeitsparameter von Paracetamol sowie ...](#)

## Kapitel 9

[Abb. 9.1 Die Trennung kann beim Einsatz unterschiedlicher Luftöfen schlechter od...](#)

[Abb. 9.2 Durch Umdrehen der Säule werden Doppelpeaks/Buckel verhindert, häufig e...](#)

[Abb. 9.3 Durch Herabsetzen der Zeitkonstante von 1 s auf 50 ms, untere Chromatog...](#)

[Abb. 9.4 Variationskoeffizienten bei der Auswertung über die Peakhöhe und über d...](#)

[Abb. 9.5 Der Variationskoeffizient der Peakhöhe und der Peakfläche in Abhängigke...](#)

[Abb. 9.6 Der Variationskoeffizient der Peakhöhe und der Peakfläche in Abhängigke...](#)

[Abb. 9.7 Der Variationskoeffizient der Peakhöhe und der Peakfläche in Abhängigke...](#)

[Abb. 9.8 Vk abhängig von der verwendeten Datenrateaufnahme \(„Sample Rate“\)\(Deta...](#)

## Kapitel 10

[Abb. 10.1 Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage zur automatischen Methodene...](#)

[Abb. 10.2 Begrenzte Proteolyse von IgG1 durch IdeS.](#)

[Abb. 10.3 Ein Methodenentwicklungs-Workflow für frühe Stadien der Arzneimittelen...](#)

[Abb. 10.4 Ein Methodenentwicklungs-Workflow für späte Stadien der Arzneimittelen...](#)

[Abb. 10.5 Chromatogramm nach dem Screening.  
\(a\) Trennsäule Agilent Advanced Bio ...](#)

[Abb. 10.6 Ergebnisse der schnellen Optimierung.](#)

[Abb. 10.7 Chromatogramm nach der  
Feinoptimierung. Temperatur 70 °C; Flussrate 0,...](#)

[Abb. 10.8 Einfluss der Temperatur auf die  
Auflösung des kritischen Paares.](#)

[Abb. 10.9 Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit  
auf die Auflösung des kritischen...](#)

[Abb. 10.10 Temperatur - Auswirkung der Auflösung  
des kritischen Paares auf die D...](#)

[Abb. 10.11 Einfluss von Temperatur und  
Gradientendauer auf die Auflösung des kri...](#)

[Abb. 10.12 Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit  
und Temperatur bei erhöhter Gra...](#)

[Abb. 10.13 Chromatogramm der endgültigen  
Methode. Temperatur 68 °C, Flussrate 0,...](#)

## Kapitel 11

[Abb. 11.1 Beispielhaftes Chromatogramm als  
Startpunkt für ein Screening des chem...](#)

[Abb. 11.2 Screening-Trellis-Diagramm-Serie - drei  
stationäre Phasen.](#)

[Abb. 11.3 2D- und 3D-Resolution-Map-Diagramme.](#)

[Abb. 11.4 2D-Overlay-Diagramm.](#)

[Abb. 11.5 Beispiel für eine Methode mit dem  
mittleren Kennwert \(Auflösung\) = 2,0...](#)

[Abb. 11.6 MODR hinsichtlich mittlerer  
Methodenfähigkeit und Robustheit \(nicht sc...](#)

[Abb. 11.7 \(a,b\) Beispielhafte Replikationsstrategie und damit verbundene Toleran...](#)

## Kapitel 12

[Abb. 12.1 POPLC-Schema.](#)

[Abb. 12.2 Auflösungsgleichung: RS: Auflösung, N: Bodenzahl, k: Retentionsfaktor,...](#)

[Abb. 12.3 Übersicht über die Selektivität der einzelnen Trennsysteme.](#)

[Abb. 12.4 Schematische Darstellung des HILIC-Retentionsmechanismus](#)

## Kapitel 13

[Abb. 13.1 Entscheidungsbaum für die Entwicklung einer optimierten Methode](#)

## Kapitel 14

[Abb. 14.1 Die UNTIE-Pyramide \(Quelle: Dr. Stavros Kromidas\).](#)

[Abb. 14.2 Schematischer Ablauf eines automatisierten „Method Scouting“.](#)

[Abb. 14.3 Schematischer Aufbau des Shimadzu-Nexera-Method-Scouting-Systems.](#)

[Abb. 14.4 Einfache Erstellung eines Analysenplanes mit dem „Shimadzu-Scouting-Sy...](#)

[Abb. 14.5 Automatisierte Auswertung der „Scouting“-Läufe und grafische Darstellu...](#)

[Abb. 14.6 Der UNTIE-Prozess der CUP-Laboratorien \(Quelle: Dr. Stavros Kromidas\).](#)

## Kapitel 15

[Abb. 15.1 Protonierungsgleichgewicht von Anilin in Wasser.](#)

[Abb. 15.2 Anteil der beiden Anilin-Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert \(berechne...](#)

[Abb. 15.3 Chromatogramme von Anilin und Phenol bei verschiedenen pH-Werten.](#)

[Abb. 15.4 UV-Spektren von Anilin bei verschiedenen pH-Werten.](#)

[Abb. 15.5 Chromatogramme von Anilin und Benzylamin bei pH 2,3.](#)

[Abb. 15.6 Säurekonstanten von Cetirizin, berechnet mit MarvinSketch.](#)

[Abb. 15.7 Anteil Acetonitril in der mobilen Phase, um  \$k'\$  von 2 zu erhalten \(Nucl...](#)

[Abb. 15.8 Retentionszeiten in Abhängigkeit vom  \$\log POW\$  \(Säule: Nucleosil 120-3 C...](#)

[Abb. 15.9 UV-Spektren von Ameisen- und Essigsäure.](#)

[Abb. 15.10 Strukturformel von Prednisolon.](#)

[Abb. 15.11 Chromatogramm einer Probe zur Analyse von Butamirat.](#)

[Abb. 15.12 \(a\) reines Lösungsmittel \(Methanol\), \(b\) Blankprobe](#)

[Abb. 15.13 Strukturformel und UV-Spektrum von Pendimethalin.](#)

[Abb. 15.14 Chromatogramm von Pendimethalin bei 238 nm \(a\) und 430 nm \(b\).](#)

[Abb. 15.15 UV-Spektren einiger Lösungsmittel \(gegen Wasser gemessen\).](#)

[Abb. 15.16 UV-Spektren von Phosphorsäure](#)

[Abb. 15.17 UV-Spektren von Ameisensäure und Ammoniumformiat.](#)

[Abb. 15.18 UV-Spektren von Essigsäure und Ammoniumacetat.](#)

[Abb. 15.19 UV-Spektrum Trifluoressigsäure.](#)

[Abb. 15.20 Chromatogramm einer Blankinjektion bei verschiedenen Wellenlängen.](#)

[Abb. 15.21 Chromatogramme von Benzylamin mit verschiedenen mobilen Phasen.](#)

[Abb. 15.22 Chromatogramme von Benzylamin mit alkalischen mobilen Phasen.](#)

[Abb. 15.23 Chromatographisches Profil HPLC-DAD.](#)

[Abb. 15.24 Chromatographisches Profil UHPLC-HRMS \(BPI, ESI positiv\).](#)

## Kapitel 16

[Abb. 16.1 Die „Zero-dead-volume“-Fittings \(blau/dunkelgrau\) gewährleisten gegen...](#)

[Abb. 16.2 Mithilfe eines „Ultra Low Dispersion Kit“ werden Kapillarovolumina mini...](#)

[Abb. 16.3 Ventil zur Rekonditionierung einer zweiten Säule während die erste in G...](#)

[Abb. 16.4 Die Reinigung der Injektionsnadel während eine zweite die Injektion du...](#)

[Abb. 16.5 Multisampler mit 8 Schubladen, Details siehe Text.](#)

[Abb. 16.6 „Multiwash“-Technologie für die Nadelspülung zur Vermeidung von Versch...](#)

[Abb. 16.7 Zur richtigen und präzisen Mischung auch geringer Mengen von Eluenten-...](#)

[Abb. 16.8 Software-Tool „BlendAssist“ für die Bildung von Gradienten inkl. Addit...](#)

[Abb. 16.9 Zur Effektivität von pumpengemischten und manuell \(vorgemischten\) mobi...](#)

[Abb. 16.10 Software-Tool zum Finden einer guten Kombination bei Optimierungsvers...](#)

[Abb. 16.11 Design einer automatischen \(Online\)SPE.](#)

[Abb. 16.12 Zum Prinzip der 2D-HPLC.](#)

[Abb. 16.13 Chirale Trennung von Propanolol-Enantiomeren mittels SFC.](#)

[Abb. 16.14 Zum Prinzip der hochauflösenden Bereichs-HPLC, Details siehe Text.](#)

[Abb. 16.15 Über die unterschiedlichen Verweilvolumina von Gradientensystemen, De...](#)

## Kapitel 17

[Abb. 17.1 Das Mindset des Anwenders bestimmt, welche Ergebnisse aus einer Optimi...](#)

[Abb. 17.2 Optimierungsebenen, welche beachtet werden sollten.](#)

[Abb. 17.3 Der Assistent AZURA ASM 2.2L von KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH ...](#)

[Abb. 17.4 AZURA HPLC-System mit Assistenten mit zwei Säulenschaltventilen und ei...](#)

[Abb. 17.5 Schaltschemata über das Fraktionierventil \(a\) und kontinuierliches Chr...](#)

[Abb. 17.6 Durch die rythmische Schaltung von Ventilen wird die Trennung in zwei ...](#)

[Abb. 17.7 Gezeigt werden die möglichen Materialien für die Rotordichtung\\_\(a\)\\_und...](#)

## Kapitel 18

[Abb. 18.1 Auswirkung der Kompressibilitätseinstellung auf die Pumpendruckpulsati...](#)

[Abb. 18.2 Empfehlung zur Einstellung der Kompressibilität bei vorgemischter mobi...](#)

[Abb. 18.3 Effekt des Lösungsmittels und Injektionsvolumens auf die Signalform.](#)

[Abb. 18.4 Einstellung der „Co-Injection“ in der Chromatographie-Software.](#)

[Abb. 18.5 Effekt der Co-Injektion von Wasser auf die Signalform von Koffein gelö...](#)

[Abb. 18.6 Grafische Darstellung des Effekts der Spaltbreite auf das UV-Spektrum ...](#)

[Abb. 18.7 Illustration der Autodiagnose und Gegenmaßnahme.](#)

[Abb. 18.8 Darstellung der Echtzeitmessung von mobiler Phase und Anzeige in der S...](#)

[Abb. 18.9 Integrationsbeispiel überlappender Peaks mit Tal-zu-Tal-Integration \(a...](#)

[Abb. 18.10 Datenmatrix \(D\) aus den Spektraldaten \(S\) und dem Peakprofil auf der ...](#)

[Abb. 18.11 Veranschaulichung der i-PDeA-Funktion für die separate Quantifizierun...](#)

[Abb. 18.12 Nutzung von IoT für die Ressourcenoptimierung im analytischen Labor.](#)

## Kapitel 19

[Abb. 19.1 Das auf Vanquish Duo basierende Dual-LC-Prinzip: \(a\) Schema der fluidi...](#)

[Abb. 19.2 Vanquish-Core-Funktionalitäten zur stufenlosen Anpassung des System-GD...](#)

[Abb. 19.3 Schleifenbasiertes 2D-LC-Setup mit Single-Heartcut. Das im Säulentherm...](#)

[Abb. 19.4 Schleifenbasiertes 2D-LC-Setup für den Multi-Heartcut mit der Vanquish...](#)

[Abb. 19.5 Trapbasiertes 2D-LC-Setup für den Single-Heartcut mit der Möglichkeit ...](#)

[Abb. 19.6 Trapbasiertes Single-Heartcut-2D-LC-Setup zur Reduzierung der Elutions...](#)

[Abb. 19.7 Beispiel für die Verwendung des Setups aus Abb. 19.6 in zwei verschied...](#)

[Abb. 19.8 Fluidische Setups für Automated Method Scouting mit \(a\) einem Säulenth...](#)

[Abb. 19.9 ChromSwordAutoR®-basierter Workflow zur Methodenentwicklung für Catech...](#)

## Kapitel 20

[Abb. 20.1 Die chemischen Strukturen von Budesonid \(a\) und Formoterolfumarat \(b\)....](#)

[Abb. 20.2 Aus diesem Diagramm lassen sich die Selektivitätsunterschiede von RP-S...](#)

[Abb. 20.3 Das „am besten aussehende“ Chromatogramm des ersten Screening-Experime...](#)

[Abb. 20.4 Der Einfluss auf die Retention ionisierbarer Verbindungen durch den pH...](#)

[Abb. 20.5 Fusions-QbD-Plot des Design Space und der aus dem Optimierungsexperime...](#)

[Abb. 20.6 Vier Mehrfachinjektionen von Formoterol, Budesonid und verwandten Verb...](#)

## Liste der Boxen

Kapitel 7

[Box 1: Polarität achiraler stationärer Phasen, Polysaccharid-CSPs und Elutionsmi...](#)

[Box 2: Polaritätsmodule für das Screening – NP-Modul, PO-Modul, MP-Modul, RP-Mod...](#)

[Box 3: Übersicht der Polysaccharid-CSPs basieren auf Grundgerüst und Derivatisie...](#)

*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*