

HPLC richtig optimiert

Ein Handbuch für Praktiker

*Herausgegeben von
Stavros Kromidas*



WILEY-
VCH

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

HPLC richtig optimiert

*Herausgegeben von
Stavros Kromidas*

Weitere interessante Titel zur HPLC

V. R. Meyer

Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern

2006

ISBN 3-527-31268-4

V. R. Meyer

Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie

2004

ISBN 3-527-30726-5

S. Kromidas

More Practical Problem Solving in HPLC

2004

ISBN 3-527-31113-0

J. Weiß

Ionenchromatographie

2001

ISBN 3-527-28702-7

S. Kromidas

Practical Problem Solving in HPLC

2000

ISBN 3-527-29842-8

HPLC richtig optimiert

Ein Handbuch für Praktiker

*Herausgegeben von
Stavros Kromidas*



WILEY-
VCH

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Herausgeber

Dr. Stavros Kromidas
Rosenstraße 16
66125 Saarbrücken

■ 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 Bibliothek

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

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

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.

Printed in the Federal Republic of Germany
Gedruckt auf säurefreiem Papier

Einbandgestaltung G. Schulz, Fußgönheim
Satz Manuela Treindl, Laaber
Druck betz-druck GmbH, Darmstadt
Bindung Litges & Dopf Buchbinderei GmbH, Heppenheim

ISBN-13: 978-3-527-31470-6

ISBN-10: 3-527-31470-9

Vorwort

Das Optimieren von Verhaltensweisen und Prozessen stellt eine notwendige Voraussetzung für langfristigen Erfolg dar. Das Ziel und die Beweggründe können dabei recht unterschiedlich sein: Selbsterhaltung bei Lebewesen, „Leben retten“ beim Helfer in Afrika, Gewinnmaximierung beim Marketing-Strategen oder neue Erkenntnisse beim Wissenschaftler. Dieses Prinzip gilt natürlich auch in der Chemie und in der Analytik.

Das vorliegende Buch behandelt ausschließlich das Thema „Optimierung“ in der HPLC. Es wird versucht, diesen wichtigen Aspekt der HPLC auf vielfältige Art und Weise zu beleuchten. Zum einen haben wir uns mit grundsätzlichen Fragen und mit prinzipiellen Überlegungen und Hintergründen auseinander gesetzt. Im gleichen Maße haben wir uns bemüht, möglichst viele Praxisbeispiele, Anregungen und Vorschläge für den HPLC-Alltag vorzustellen und zu diskutieren. Die Ausführungen sollen beim Planen effektiver Strategien zur Methodenentwicklung ebenso unterstützen und helfen wie in der täglichen Praxis vor Ort, wenn es um Konzepte für eine schnelle Optimierung geht. Das Ziel des Buches ist, einen Beitrag für eine zweckgerichtete, bezahlbare Vorgehensweise bei Methodenentwicklung und Optimierung in der HPLC zu leisten.

Dazu haben international renommierte Fachleute ihr Wissen und ihre Erfahrungen zur Verfügung gestellt. Diesen Kollegen gilt mein herzlicher Dank. Dem Verlag WILEY-VCH und insbesondere Steffen Pauly danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Kooperationsbereitschaft.

Saarbrücken, Januar 2006

Stavros Kromidas

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
Uwe Dieter Neue, Yung-Fong Cheng und Ziling Lu
 - 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
 - 1.2.2.2.3 Optimale Flussraten und Grenzen der heutigen Technologie 70
 - 1.2.2.2.4 Apparative Schwierigkeiten und Lösungen 71
 - 1.2.2.2.4.1 Umgehung des Gradientenverweilvolumens 71
 - 1.2.2.2.4.2 Zeitkonstante und Datenaufnahmerate 73
 - 1.2.2.2.4.3 Messung der Ionenunterdrückung mithilfe der Nachsäuleninfusion 73
 - 1.2.2.2.4 Literatur 75
- 1.3 **Selektivitätsänderung in der RP-HPLC mithilfe des pH-Wertes** 77
Uwe Dieter Neue, Alberto Méndez, KimVan Tran und Diane M. Diehl
 - 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
 - 1.3.5 Literatur 94

- 1.4 Auswahl des richtigen pH-Wertes in der HPLC 95**
Michael McBrien
(Übersetzung aus dem Englischen von Sven Fischer)
- 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
Literatur 111
- 1.5 Optimierung der Auswertung in der Chromatographie 113**
Hans-Joachim Kuss
- 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
Literatur 124
- 1.6 Gütekennwerte der Kalibration und Messunsicherheit als Indikatoren für Optimierungspotenzial 125**
Stefan Schömer
- 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
Literatur 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
Stavros Kromidas
 - 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
Literatur 261
 - 2.1.2 Grundlagen der Selektivität von RP-Säulen 262
Uwe Dieter Neue, Bonnie A. Alden und Pamela C. Iraneta
 - 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
Literatur 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
Frank Steiner
- 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
Literatur 333

- 2.1.6 Säulenselektivität von RP-Säulen 334
L. R. Snyder und J. W. Dolan
(Übersetzung aus dem Englischen von Hans-Joachim Kuss)
- 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
Nomenklatur 346
Literatur 347

- 2.1.7 Selektivität verstehen durch Suspended-State-High-Resolution-Magic-Angle-Spinning NMR-Spektroskopie 348
Urban Skogsberg, Heidi Händel, Norbert Welsch und Klaus Albert
- 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-¹H HR/MAS-T₁-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
Literatur 362

- 2.2 **Optimierung in der Normalphasen-Chromatographie** 363
Veronika R. Meyer
- 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
Weiterführende Literatur 371

- 2.3 **Optimierung von GPC-Analysen durch geeignete Wahl von stationärer Phase und Detektionsverfahren** 373
Peter Kilz
- 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
Literatur 396

- 2.4 **Gelfiltration – Größenausschluss-Chromatographie von Biopolymeren – Optimierungsstrategien und Fehlersuche** 397
M. Quaglia, E. Machtejevas, T. Hennessy und K. K. Unger
- 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
- Literatur* 418

- 2.5 Optimierung in der Affinitätschromatographie 419**
Egbert Müller
- 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
Literatur 442

- 2.6 Optimierung von Enantiomerentrennungen in der HPLC* 445**
Markus Juza
- 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
 - Literatur* 485
- 2.7 Miniaturisierung 487**
 - 2.7.1 μ LC/Nano-LC – Optimierungsmöglichkeiten und Fehlervermeidung aus Anwendersicht 487
 - Jürgen Maier-Rosenkranz*
 - 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
 - Literatur* 507
- 2.7.2 Mikrochip-basierte Flüssigchromatographie – Techniken und Möglichkeiten 508
 - Jörg P. Kutter*
 - 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
 - Literatur* 519
- 2.7.3 UPLC: Ultra-Performance Liquid Chromatography 520
 - Uwe D. Neue, Eric S. Grumbach, Marianna Kele, Jeffrey R. Mazzeo und Dirk Sievers*
 - 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
 - Literatur* 528

3	Kopplungstechniken	529
3.1	Immunchromatographische Kopplungen	531
	<i>Michael G. Weller</i>	
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
	<i>Literatur</i>	548
3.2	Erweiterte Charakterisierungs- und Analysemöglichkeiten durch 2-dimensionale Chromatographie	549
	<i>Peter Kilz</i>	
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
	<i>Literatur</i>	562
3.3	LC-MS – Hinweise zur Optimierung und Fehlersuche	563
	<i>Friedrich Mandel</i>	
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
	<i>Literatur</i>	571

- 3.4 **LC-NMR-Kopplung** 573
Klaus Albert, Manfred Krucker, Marc David Grynbaum und Karsten Putzbach
- 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
Literatur 586

- 4 **Computer-unterstützte Optimierung** 587
- 4.1 **Computer-unterstützte HPLC-Methodenentwicklung mit der DryLab[®]-Software** 589
Lloyd R. Snyder und Loren Wisley
(Übersetzung aus dem Englischen von Christine Mladek)
- 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
Literatur 609

- 4.2 **ChromSword[®]-Software für die automatische und Computer-unterstützte HPLC-Methodenentwicklung** 611
S. Galushko, V. Tanchuk, I. Shishkina, O. Pylpchenko und W. D. Beinert
- 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
 - Literatur* 626

- 4.3 **Multifaktorielle systematische Methodenentwicklung und -optimierung in der Umkehrphasen-HPLC** 627
 - Michael Pfeffer*
 - 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
 - Literatur* 650

- 5 **„Anwender berichten“** 651

- 5.1 **Nano-LC-MS/MS in der Proteomforschung** 653
 - Heike Schäfer, Christiane Lohaus, Helmut E. Meyer und Katrin Marcus*
 - 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
 - Literatur* 667

- 5.2 **Wege zur Überprüfung der Robustheit in der RP-HPLC** 669
 - Hans Bilke*
 - 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
 - Literatur* 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

Autorenverzeichnis

Klaus Albert

Institut für Organische Chemie
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18
72076 Tübingen

Bonnie A. Alden

Waters Corporation, CRD
34 Maple Street
Milford, MA 01757
USA

Mario Arangio

CarboGen AG
Schachenallee 29
5001 Aarau
Schweiz

Wolf-Dieter Beinert

VWR International GmbH
Scientific Instruments
Hilpertstraße 20A
64295 Darmstadt

Roberto Biancardi

Solvay Solexis SpA
Viale Lombardia, 20
20021 Bollate (MI)
Italien

Hans Bilke

Sandoz GmbH
Biochemiestraße 10
6250 Kundl
Österreich

Yung-Fong Cheng

Cubist Pharmaceuticals
65 Hayden Ave.
Lexington, MA 02421
USA

Maristella Colombo

Oncology – Analytical Chemistry
Nerviano Medical Sciences
Viale le Pasteur, 10
20014 Nerviano (MI)
Italien

Diane M. Diehl

Waters Corporation, CAT
34 Maple Street
Milford, MA 01757
USA

John W. Dolan

BASi Northwest Laboratory
3138 NE Rivergate
Building 301C
McMinnville, OR 97128
USA

Melvin R. Euerby

AstraZeneca R&D Charnwood
Analytical Development,
Pharmaceutical and Analytical R&D
Charnwood/Lund
Bakewell Road
Loughborough, Leicestershire,
LE11 5RH
United Kingdom

Sergey Galushko

Dr. S. Galushko Software
Entwicklung
Im Wiesengrund 49b
64367 Mühltal

Eric S. Grumbach

Waters Corporation, CAT
34 Maple Street
Milford, MA 01757
USA

Marc D. Grynbaum

Institut für Organische Chemie
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18
72076 Tübingen

Heidi Händel

Institut für Organische Chemie
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18
72076 Tübingen

Tom Hennessy

Biopolis
Biomedical Science Group
20 Biopolis way
Singapore 1 38668
Singapur

Pamela C. Iraneta

Waters Corporation, CRD
34 Maple Street
Milford, MA 01757
USA

Markus Juza

Chiral Technologies Europe
Parc d'Innovation
Boulevard Gonthier d'Andernach
BP 80140
67404 Illkirch Cedex
Frankreich

Marianna Kele

Waters Corporation, CRD
34 Maple Street
Milford, MA 01757
USA

Peter Kilz

PSS Polymer Standards Service
GmbH
Postfach 3368
55023 Mainz

Stavros Kromidas

Rosenstraße 16
66125 Saarbrücken

Manfred Krucker

Institut für Organische Chemie
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18
72076 Tübingen

Hans-Joachim Kuss

Psychiatrische Klinik der
Ludwig-Maximilians-Universität
Nussbaumstraße 7
80336 München

Jörg P. Kutter

MIC – Department of Micro and
Nanotechnology
Technical University of Denmark
2800 Lyngby
Dänemark

Christiane Lohaus

Medizinisches Proteom-Center
Zentrum für Klinische Forschung
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150
44780 Bochum

Ziling Lu

Waters Corporation, CAT
34 Maple Street
Milford, MA 01757
USA

Egidijus Machtejevas

Institut für Anorganische Chemie
und Analytische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität
Duesbergweg 10–14
55099 Mainz

Jürgen Maier-Rosenkranz

GRACE Davison –
Alltech Grom GmbH
Discovery Sciences
Etzwiesenstraße 37
72108 Rottenburg-Hailfingen

Friedrich Mandel

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Straße 8
76337 Waldbronn

Katia Marcucci

Sienabiotech S.p.A.
Via Fiorentina, 1
53100 Siena
Italien

Katrin Marcus

Medizinisches Proteom-Center
Zentrum für Klinische Forschung
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150
44780 Bochum

Jeffrey R. Mazzeo

Waters Corporation, CAT
34 Maple Street
Milford, MA 01757
USA

Michael McBrien

Advanced Chemistry Development,
Inc.
110 Yonge Street, 14th Floor
Toronto, Ontario
Canada M5C 1T4

Alberto Méndez

Waters Cromatografia S.A.
Parc Tecnològic del Vallès
08290 Cerdanyola del Vallès
Barcelona
Spanien

Helmut E. Meyer

Medizinisches Proteom-Center
Zentrum für Klinische Forschung
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150
44780 Bochum

Veronika R. Meyer

EMPA St. Gallen
Materials Science and Technology
Lerchenfeldstraße 5
9014 St. Gallen
Schweiz

Egbert Müller

Tosoh Bioscience GmbH
Zettachring 6
70567 Stuttgart

Uwe D. Neue

Waters Corporation, CRD
34 Maple Street
Milford, MA 01757
USA

Patrik Petersson

AstraZeneca R&D Lund
Analytical Development
Pharmaceutical and Analytical R&D
Charnwood/Lund
Lund 22187
Schweden

Michael Pfeffer

Schering AG
In-Process-Control
13342 Berlin

Karsten Putzbach

Institut für Organische Chemie
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18
72076 Tübingen

Oleg Pylypchenko

Institute of Bioorganic Chemistry of
Ukrainian National Academy of
Sciences
Murmanskaja str., 1
02660 Kiev-94, MCP-600
Ukraine

Milena Quaglia

LGC
Analytical Technology
Queens Road
Teddington, Middlesex, TW11 OLY
United Kingdom

Giuseppe Razzano

Via D. Manin,18
Magenta (Cap. 20013)
Milano
Italien

Vincenzo Rizzo

CISI – University of Milan
Via Fantoli, 16/15
20138 Milano
Italien

Heike Schäfer

Medizinisches Proteom-Center
Zentrum für Klinische Forschung
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150
44780 Bochum

Stefan Schömer

pro-isomehr
Altenkesseler Straße 17
66115 Saarbrücken

Irina Shishkina

Institute of Bioorganic Chemistry of
Ukrainian National Academy of
Sciences
Murmanskaja str., 1
02660 Kiev-94, MCP-600
Ukraine

Dirk Sievers

Waters GmbH
Hauptstraße 87
65760 Eschborn

Federico R. Sirtori

Nerviano Medical Sciences
Oncology – Analytical Chemistry
Viale Pasteur 10
20014 Nerviano (MI)
Italien

Urban Skogsberg

Cambrex Karlskoga AB
R&D Analysis
69185 Karlskoga
Schweden

Lloyd R. Snyder

LC Resources Inc.
26 Silverwood Ct.
Orinda, CA 94563
USA

Frank Steiner

Dionex Softron GmbH
Dornierstraße 4
82110 Germering

Cinzia Stella

Imperial College
Biological Chemistry Department
Biomedical Sciences Division
Sir Alexander Fleming Building
London, SW7 2AZ
United Kingdom

Vsevolod Tanchuk

Institute of Bioorganic Chemistry of
Ukrainian National Academy of
Sciences
Murmanskaja str., 1
02660 Kiev-94, MCP-600
Ukraine

KimVan Tran

Waters Corporation, CAT
34 Maple Street
Milford, MA 01757
USA

Klaus K. Unger

Institut für Anorganische Chemie
und Analytische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität
Duesbergweg 10–14
55099 Mainz

Jean-Luc Veuthey

Faculty of Sciences
School of Pharmaceutical Sciences
University of Geneva
20, Bd d'Yvoy
1211 Genève 4
Schweiz

Knut Wagner

Pharma Analytical Laboratory
Merck KGaA
Frankfurter Straße 250
64293 Darmstadt

Michael G. Weller

Institut für Wasserchemie und
Chemische Balneologie
Technische Universität München
Marchioninistraße 17
81377 München

Norbert Welsch

Institut für Organische Chemie
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18
72076 Tübingen

Loren Wisley

Analytical and Quality Sciences
Wyeth Research
401 N. Middletown Road
Pearl River, NY 10965
USA

Zum Aufbau des Buches

Das Buch besteht aus fünf Teilen.

Teil 1: Grundsätzliches zur Optimierung in der HPLC

Im Teil 1 wird versucht, wichtige Aspekte der Optimierung in der HPLC aus verschiedenen Blickwinkeln zu beleuchten. Im ersten Kapitel (1.1 *Stavros Kromidas*) werden die Grundsätze der Optimierung am Beispiel der RP-HPLC dargestellt und Vorschläge zur Methodenentwicklung gemacht. Schnelle Gradienten an kurzen Säulen führen häufiger als man zunächst annehmen würde zu ausreichender Auflösung bei kürzesten Analysenzeiten, diese Thematik wird in Kapitel 1.2 diskutiert (*Uwe D. Neue*). Der pH-Wert ist bei der Trennung von polaren/ionischen Substanzen mit Abstand der wichtigste Faktor im Optimierungsgeschehen. Diesem Aspekt sind die zwei nachfolgenden Kapitel gewidmet (1.3 *Uwe D. Neue*, 1.4 *Michael McBrien*). Optimierung bedeutet mehr als lediglich die „richtige“ Wahl von Methodenparametern. Zur Optimierung gehören alle Bemühungen, möglichst die maximale – oder vielleicht die notwendige – Information zu gewinnen. So kommen der Auswertung von chromatographischen Daten und der Kalibrierung eine gewichtige Bedeutung zu. Diese Themen werden in Kapitel 1.5 (*Hans-Joachim Kuss*) und 1.6 (*Stefan Schömer*) behandelt.

Teil 2: Die Charakteristika der Optimierung in einzelnen HPLC-Modi

Im Teil 2 wird auf die Spezifika der Optimierung in einzelnen Techniken eingegangen. In der RP-Chromatographie (Abschnitt 2.1) stellt neben der Auswahl des Eluenten (s. dazu auch Kapitel 1.1 bis 1.4) vor allem die Säulenauswahl eine schwierige und zeitraubende Aufgabe dar. Das Thema „RP-Säule“ wird von insgesamt sechs Autoren bearbeitet: Zwei Autoren (2.1.1 *Stavros Kromidas*, 2.1.2 *Uwe D. Neue*) gehen eher praktisch an diese Aufgabenstellung heran, während *Frank Steiner* (2.1.5) und *Lloyd R. Snyder* (2.1.6) zur Frage „Säulencharakterisierung“ und „Säulenauswahl“ grundsätzliche, theoretische Überlegungen – jedoch mit konkreter, praktischer Relevanz – vorstellen. Mit der Anzahl von experimentellen Daten nimmt naturgemäß die Aussagekraft zu, wobei das Handling der Zahlen und vor allem das Finden und Deuten von Korrelationen nur mit mathematischen Tools möglich ist. Chemometrie ist ein geeignetes Tool, um beispielsweise die Ähnlichkeit von Säulen anhand chromatographischer Daten herauszufinden. Die Anwendung der Chemometrie aus praktischer Sicht wird

kurz in Kapitel 2.1.1 (*Stavros Kromidas*) und ausführlich in Kapitel 2.1.3 (*Melvin R. Euerby*) und 2.1.4 (*Cinzia Stella*) dargestellt. Zum Abschluss des Abschnittes „RP-HPLC“ zeigt *Urban Skogsberg* (2.1.7), wie durch Magic-Angle-Spinning-NMR-Spektroskopie genaue Informationen über die Wechselwirkungen und die Anordnung von funktionellen Gruppen an RP-Oberflächen erhalten werden können. Anschließend geht es um die Optimierung, aber auch um die Fehlersuche und die Fehlervermeidung in folgenden Bereichen der HPLC: Normal Phase (2.2 *Veronika R. Meyer*), GPC (2.3 *Peter Kilz*), Gelfiltration (2.4 *Klaus K. Unger*), Affinitätschromatographie (2.5 *Egbert Müller*) und Enantiomerentrennung (2.6 *Markus Juza*). Drei unterschiedliche Ansätze wurden gewählt, um sich mit dem Thema Miniaturisierung auseinander zu setzen: *Jürgen Maier-Rosenkranz* beschäftigt sich in Kapitel 2.7.1 mit der Micro/Nano-LC, in Kapitel 2.7.2 stellt *Jörg P. Kutter* Flüssig(chromatographische)-Trennungen auf Chips vor und in Kapitel 2.7.3 beschreibt *Uwe D. Neue* die Möglichkeiten und Grenzen einer neuen Variante der klassischen HPLC, der UPLC. Mit allen drei Techniken ist eine bemerkenswerte Zeitersparnis möglich – es werden allerdings auch Limitierungen und Schwierigkeiten genannt.

Teil 3: Kopplungstechniken

Teil 3 ist ausschließlich den Kopplungen vorbehalten. Je anspruchsvoller die analytische Fragestellung in der Separationstechnik ist (Komplexität und Anzahl der Probenkomponenten, große chemische Ähnlichkeit der zu trennenden Analyte usw.), umso notwendiger erscheinen Kopplungstechniken. Dabei führen zum einen Kopplungen zwischen verschiedenen Trenntechniken zu einer Verbesserung der chromatographischen Auflösung wie z. B. Immunochromatographie (3.1 *Michael G. Weller*) und LC-GPC-Kopplung (3.2 *Peter Kilz*). Zum anderen führt bei einer gegebenen Auflösung die Kopplung LC-Spektroskopie zu einer spezifisch(er)en Aussage. Die populärsten Kopplungstechniken sind LC-MS (3.3 *Friedrich Mandel*) und LC-NMR (3.4 *Klaus Albert*).

Teil 4: Computer-unterstützte Optimierung

Automatisierung kann generell zur Fehlervermeidung und Zeitersparnis führen. Die vollautomatische bzw. halbautomatische, Computer-unterstützte Methodentwicklung und Optimierung in der HPLC hat in der Zwischenzeit einen beachtlichen Reifegrad erreicht. Anhand mehrerer realer Beispiele legt *Lloyd R. Snyder* (4.1) die Möglichkeiten der DryLab- und *Sergey Galushko* (4.2) die der ChromSword-Software dar. *Michael Pfeffer* (4.3) vergleicht die zwei Software-Konzepte aus Anwendersicht und präsentiert ein neues Software-Tool, in dem auch die automatische Säulenauswahl integriert ist.

Teil 5: „Anwender berichten“

Im letzten Teil kommen Anwender zu Wort. In vier unterschiedlichen Fällen werden zwar anspruchsvolle und/oder neue Techniken/Konzepte zur Lösung einer bestimmten Fragestellung vorgestellt – diese jedoch eben aus Anwendersicht und praxisnah. Der eine oder andere Lösungsansatz könnte für manche(n)