

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

x | Inhaltsverzeichnis

2	Do you HILIC? Mit Massenspektrometrie? Dann bitte systematisch	23
	<i>Thomas Letzel</i>	
2.1	Ausgangssituation und optimale Nutzung von stationären HILIC-Phasen	26
2.2	Ausgangssituation und optimale Nutzung von mobiler HILIC-Phase	28
2.3	Weitere Einstellungen bzw. Bedingungen speziell für massenspektrometrische Detektion (siehe auch Kap. 3)	35
	Literatur	36
3	Optimierungsstrategien in der LC-MS-Methodenentwicklung	39
	<i>Markus M. Martin</i>	
3.1	Einführung	39
3.2	Methodenentwicklung für HPLC-MS-Trennungen	39
3.2.1	Optimierung der LC-Trennung	40
3.2.2	Optimierung der Ionenquellenbedingungen	45
3.2.3	Optimierung der MS-Detektion	47
3.2.4	Überprüfung der Komplettmethode	48
3.2.5	Unterstützung bei der Methodenentwicklung durch softwaregestützte Parametervariation	50
3.3	Übertragen von HPLC-Bestandsmethoden an die Massenspektrometrie	51
3.3.1	Übertragung einer vollständigen HPLC-Methode an ein Massenspektrometer	52
3.3.2	Selektierte Analyse einer unbekanntenen Verunreinigung – Lösemittelwechsel mittels Single-/Multi-Heartcut-Technologien	53
3.4	Abkürzungen	55
	Literatur	56
4	Strategien für die erfolgreiche Charakterisierung von Proteinbiopharmazeutika	57
	<i>Szabolcs Fekete, Valentina D'Atri und Davy Guillarme</i>	
4.1	Einführung in Proteinbiopharmazeutika	57
4.2	Von der Standard- zur Hochleistungschromatographie von Proteinbiopharmazeutika	58
4.3	Online-Kopplung von nicht denaturierenden LC-Modi mit MS	62
4.4	Mehrdimensionale LC-Ansätze für Proteinbiopharmazeutika	63
4.5	Schlussfolgerung und Zukunftstrends in der Analyse von Proteinbiopharmazeutika	66
	Literatur	68
5	Optimierungsstrategien für die HPLC-Trennung von Biomolekülen	73
	<i>Lisa Strasser, Florian Füssl und Jonathan Bones</i>	
5.1	Einleitung	73
5.2	Optimierung der chromatographischen Trennung	73
5.3	Optimierung der Geschwindigkeit einer HPLC-Trennung	78
5.4	Optimierung der Sensitivität einer HPLC-Trennung	80

- 5.5 Multidimensionale Trennungen (siehe auch Kap. 1) 81
- 5.6 Überlegungen bezüglich MS-Detektion (siehe auch Kap. 3) 82
- 5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick 84
- Literatur 85

- 6 Optimierungsstrategien 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 Optimierungsstrategien 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

XII | *Inhaltsverzeichnis*

- 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[®] 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

XIV | Inhaltsverzeichnis

	Teil III Anwender berichten	229
12	Moderne HPLC-Methodenentwicklung	231
	<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
13	Optimierungsstrategien in der HPLC aus Sicht eines Industriedienstleisters	243
	<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
14	Optimierungsstrategien in der HPLC aus Sicht eines Dienstleisters – der UNTIE[®]-Prozess der CUP-Laboratorien	249
	<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 [®] -Prozess der CUP-Laboratorien	251
14.3.1	Die Kundenbedürfnisse verstehen	251
14.3.2	Der Test einer existierenden Methode	252
14.3.3	Methodenentwicklung und -optimierung	253
14.3.4	Durchführung der Validierung	255
14.3.5	Zusammenfassung	256
	Literatur	257
15	Optimierungsstrategien in der HPLC	259
	<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_S)	265
15.2.3	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient	273
15.2.4	UV-Absorption	275
15.2.5	Stabilität des gelösten Analyten	277
15.3	Generische Methoden	282
15.3.1	Generelle Methode für die Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe	282

- 15.3.2 Erweiterungen des Einsatzbereiches 284
- 15.3.3 Grenzen dieser generellen Methode 284
- 15.3.4 Beispiel, Bestimmung von Butamiratdihydrogencitrat
in einem Hustensirup 286
- 15.4 Generelle Tipps zum Optimieren von HPLC-Methoden 288
 - 15.4.1 Herstellen von mobilen Phasen 288
 - 15.4.2 Blankproben 290
 - 15.4.3 Festlegen von Messwellenlängen für die UV-Detektion 291
 - 15.4.4 UV-Detektion bei niedrigen Wellenlängen 293
 - 15.4.5 Vermeidung von 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 CO₂ 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

XVI | Inhaltsverzeichnis

- 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 Schad, 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
	<i>Falk-Thilo Ferse, Detlev Kurth, Tran N. Pham, Fadi L. Alkhateeb und Paul Rainville</i>	
	Literatur	392
	Stichwortverzeichnis	393

