

Inhaltsverzeichnis

Vorwort V

Autorenverzeichnis XXII

Zum Aufbau des Buches XXVII

Grundsätzliches zur Optimierung 1

Grundsätze der Optimierung in der HPLC am Beispiel der
RP-Chromatographie 3

Stavros Kromidas

Vor den ersten Optimierungsschritten 3

Was heißt eigentlich „Optimierung“? 6

Verbesserung der Auflösung („besser trennen“) 6

Prinzipielle Möglichkeiten zur Verbesserung der Auflösung 8

Was „bringt“ das meiste? 10

Welche Reihenfolge der Maßnahmen ist bei Optimierungsversuchen
sinnvoll? 12

Wie ändere ich k , α und N ? 18

1 Isokratischer Modus 18

2 Gradientenmodus 19

3 Acetonitril oder Methanol? 20

Überprüfung der Peakhomogenität – das Drei-Stufen-Modell 22

Unbekannte Probe – wie soll ich anfangen? Strategien und
Konzepte 36

Die „2-Tage-Methode“ 37

„Das 5-Schritte-Modell“ 41

Verkürzung der Analysendauer („schneller trennen“) 50

Empfindlichkeit erhöhen („mehr sehen“, d. h. Nachweisgrenze
erniedrigen) 51

Ökonomie in der HPLC („billiger trennen“) 52

Abschlussbemerkungen und Ausblick 54

Literatur 61

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

Auswahl des richtigen pH-Wertes in der HPLC 95*Michael McBrien**(Übersetzung aus dem Englischen von Sven Fischer)*

Einleitung 95

Typische Vorgehensweisen zur Wahl des pH-Wertes 96

Auswahl des Anfangs-pH-Wertes 97

Grundlage für die Vorhersage/Berechnung eines pK_S -Wertes 98

Korrektur des pH-Wertes aufgrund des organischen Anteils im Eluenten 99

Optimierung des pH-Wertes der mobilen Phase ohne Kenntnis der chemischen Struktur der Analyte 102

Eine systematische Vorgehensweise zur Auswahl des pH-Wertes 103

Beispiel: Trennung von 1,4-Bis[(2-pyriden-2-ylethyl)thio]butan-2,3-diol von seinen Verunreinigungen 104

Fehlersuche beim pH-Wert der mobilen Phase 109

) Ein Blick in die Zukunft 110

Zusammenfassung 110

Literatur 111

Optimierung der Auswertung in der Chromatographie 113*Hans-Joachim Kuss*

Auswertung und Bewertung chromatographischer Daten – eine Einführung 113

Arbeitsbereich 113

Interner Standard 114

Kalibrierung 115

Lineare Regression 116

Wichtungsexponent 118

In der Praxis 120

Pharmaanalytik 120

Messunsicherheit 121

) Nullpunktsgerade 123

Literatur 124

Gütekennwerte der Kalibration und Messunsicherheit als Indikatoren für Optimierungspotenzial 125*Stefan Schömer*

Optimierung der Kalibration – was ist das Ziel? 125

Der zentrale Gütekennwert einer Kalibration 126

Beispiele 126

1 Bedeutet eine höhere Empfindlichkeit auch eine bessere Methode? 126

2 Ist ein konstanter Variationskoeffizient gut oder schlecht –

Inhaltsverzeichnis

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

Charakterisierung von Umkehrphasen in der Flüssigkeits-
chromatographie mittels Hauptkomponentenanalyse 272

Melvin R. Euerby und Patrik Petersson

(Übersetzung aus dem Englischen von Ulrich Panne)

Einleitung 272

Theorie der Hauptkomponentenanalyse 273

PCA der Datenbank mit RP-Kieselgel-Materialien 275

- 1 PCA von „polar embedded“-Phasen, „AQ“-Phasen und Phasen
mit erhöhter polarer Selektivität 277

- 2 PCA von perfluorierten Phasen 278

PCA zur Identifizierung der Ähnlichkeit/Äquivalenz von Säulen und
Phasen 279

PCA für eine systematische Auswahl von stationären Phasen für die
Methodenentwicklung 286

- 1 Optimierungsstrategie für Eluent und stationäre Phase 287

Literatur 288

Chemometrie – ein geeignetes Werkzeug für die Verarbeitung von
großen Datensätzen 289

Cinzia Stella und Jean-Luc Veuthey

(Übersetzung aus dem Englischen von Ulrich Panne)

Einleitung 289

Chromatographische Tests und ihre Bedeutung für die Auswahl
der Trennsäule 289

Der Einsatz der Hauptkomponentenanalyse (PCA) für die Bewertung
und Auswahl von Testverbindungen 290

- 1 Physikochemische Eigenschaften der Testverbindungen 290

- 2 Chromatographische Eigenschaften der Testverbindungen 293

Der Einsatz der Hauptkomponentenanalyse (PCA) für die
Beurteilung von chromatographischen Trägermaterialien 294

- 1 Bewertung der stationären Phasen mit Phosphatpuffer

bei pH 7,0 als mobiler Phase 296

- 2 Bewertung der chromatographischen Phasen mit Phosphatpuffer

bei pH 3,0 als mobiler Phase 298

Optimierung eines chromatographischen Verfahrens durch
Chemometrie 300

- 1 Testverbindungen 300

- 2 Mobile Phasen 301

- 3 Chromatographische Parameter und Vergleichspräzision
der Chargen und Trennsäulen 302

Zusammenfassung und Ausblick 304

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

Suspensions- ^1H HR/MAS- T_1 -Relaxations-Messungen	357
Wo finden die Wechselwirkungen statt?	359
Wasserstoffbrückenbindungen	360
Einige praktische Gesichtspunkte	360
Ausblick	362
Literatur	362

Optimierung in der Normalphasen-Chromatographie 363

Veronika R. Meyer

Einleitung	363
Eluenten in der NP-HPLC	364
Stationäre Phasen in der NP-HPLC	368
Troubleshooting in der Normalphasen-Chromatographie	370
Weiterführende Literatur	371

Optimierung von GPC-Analysen durch geeignete Wahl von stationärer Phase und Detektionsverfahren 373

Peter Kilz

Einleitung	373
Grundlagen der GPC-Trennung	374
Trennmechanismen in der Säule	376
Kriterien zur Auswahl von GPC-Säulen und Optimierung von GPC-Trennungen	378
Auswahl von Porengröße und Trennbereich	379
Vor- und Nachteile von Linearsäulen	380
Hochgeschwindigkeits (HighSpeed)-GPC-Trennungen	381
Umfassende Detektionsmöglichkeiten zur Aufklärung makromolekularer Materialien	383
Anwendung informationsreicher Detektoren in der Flüssigchromatographie	385
Analyse von Copolymeren mit Multidetektions-GPC	386
Simultane Trennung und Identifizierung durch GPC-FTIR-Kopplung	390
Anwendung molmassensensitiver Detektoren in der GPC	392
Lichtstreuendetektoren	392
GPC-Viskosimetrie-Kopplung	394
Zusammenfassung	395
Literatur	396

Gelfiltration – Größenausschluss-Chromatographie von Biopolymeren – Optimierungsstrategien und Fehlersuche 397

M. Quaglia, E. Machtejevas, T. Hennessy und K. K. Unger

Ausgangssituation und gegenwärtige Trends	397
---	-----

Inhaltsverzeichnis

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
	<i>Egbert Müller</i>	
2.5.1	Einführung und Grundlagen der Affinitätschromatographie	419
2.5.2	Auswahl der Basismaterialien	423
2.5.3	Immobilisierungsmethoden	424
2.5.4	Aktivierungsmethoden	425
2.5.5	Spacer	429
2.5.6	Gerichtete Immobilisierung	432
2.5.7	Nicht-partikuläre Affinitätssträger	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
	<i>Markus Juza</i>	
2.6.1	Einleitung	445
2.6.2	Grundlegende Prinzipien der enantioselektiven HPLC	445
2.6.2.1	Thermodynamische Grundlagen der enantioselektiven HPLC	448
2.6.2.2	Adsorption und chirale Erkennung	449
2.6.2.3	Unterschiede zur RP- und NP-HPLC	451
2.6.2.4	Grundsätzliches zur Optimierung enantioselektiver HPLC-Trennungen	452
2.6.3	Selektoren und stationäre Phasen	452

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

Inhaltsverzeichnis

- 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

Kopplungstechniken 529

Immunchromatographische Kopplungen 531

Michael G. Weller

Einführung 531

Bindungsmoleküle 531

Immunoassays 533

Immunchromatographische Techniken 533

1 Affinitätsanreicherung (Affinity SPE) 535

2 Echte Affinitätschromatographie
(„Weak Affinity Chromatography“) 542

3 Biochemische Detektoren 543

Beispiele 545

1 Beispiel 1: Affinitätsextraktion („Affinity SPE“) 545

2 Beispiel 2: „Weak Affinity Chromatography“ (WAC) 546

3 Beispiel 3: Biochemische Detektion 547

Literatur 548

Erweiterte Charakterisierungs- und Analysemöglichkeiten durch 2-dimensionale Chromatographie 549

Peter Kilz

Einleitung 549

Anwendung der 2D-Chromatographie – experimentelle Aspekte 551

Auswertung von 2D-Daten und Ergebnisdarstellung 557

Stand der Technik in der 2D-Chromatographie 558

Zusammenfassung 562

Literatur 562

LC-MS – Hinweise zur Optimierung und Fehlersuche 563

Friedrich Mandel

Optimieren des Ionisationsprozesses 563

Verschwundene LC/MS-Peaks 565

1 Grenzwertiger pH-Wert der mobilen Phase 565

2 Ionenpaarbildner im HPLC-System 565

3 Ionensuppression (Ionisationsunterdrückung) durch die
Probenmatrix oder Kontaminantien 566

Wie sauber muss eine Ionenquelle sein? 566

Wie evaluiere ich die Ionensuppression? 568

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

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