

## Inhaltsverzeichnis

**Vorwort** IX

**Zum Aufbau des Buches** XI

**Zu den Autoren** XIII

**Beitragsautoren** XVII

**Teil 1 Die Grundsätze der Gradientenelution** 1

**1 Aspekte der Gradienten-Optimierung** 3

*Stavros Kromidas*

- 1.1 Einführung 3
- 1.2 Besonderheiten des Gradienten 3
- 1.3 Einige chromatographische Größen und Formeln 5
- 1.4 Nachweisgrenze, Peakkapazität, Auflösung – Möglichkeiten der Optimierung 8
  - 1.4.1 Nachweisgrenze 8
  - 1.4.2 Peakkapazität und Auflösung 10
- 1.5 Gradienten-„Mythen“ 14
- 1.6 Beispiele zur Optimierung von Gradientenläufen: ausreichende Auflösung in einer adäquaten Zeit 16
- 1.7 Gradienten-Aphorismen 38

**2 Apparative Einflüsse auf die Qualität von Gradienten-Methoden und deren Übertragung zwischen unterschiedlichen Geräten** 43

*Frank Steiner*

- 2.1 Arten der technischen Umsetzung der Gradientenelution und die jeweiligen Charakteristika 43
  - 2.1.1 Die niederdruckseitige und die hochdruckseitige Gradientenerzeugung – Zwei technisch grundlegend verschiedene Prinzipien 43

- 2.1.2 Die Rolle der Mischvorrichtung bei HPG- und LPG-Systemen vor dem Hintergrund der verschiedenen Prinzipien der Gradientenformung 45
- 2.1.3 Die Arbeitsweise von Mischvorrichtungen und die systematische Charakterisierung von deren Effektivität 49
- 2.1.4 Auswirkungen der Volumenkontraktion beim Mischen von Wasser und organischen Lösemitteln bei Gradientensystemen 62
- 2.1.5 Auswirkungen kleinster Leckraten von Pumpenköpfen bei sensiblen Applikationen und HPG-Synchronisierungs-Techniken zu deren Korrektur 68
- 2.2 Die Bestimmung und Bedeutung des Gradientenverzögerungsvolumens der Apparatur 70
  - 2.2.1 Die Bestimmung des GDV und seine Abhängigkeit von den Betriebsbedingungen des Systems 71
  - 2.2.2 Der Einfluss des GDV auf die chromatographischen Ergebnisse 82
  - 2.2.3 Möglichkeiten der GDV-Beeinflussung und seiner Auswirkung durch den Anwender 83
- 2.3 Die Übertragung von Gradientenmethoden zwischen unterschiedlichen HPLC-Systemen 86
  - 2.3.1 Praktische Tipps zum Umgang mit abweichenden GDVs und Gegenmaßnahmen 86
  - 2.3.2 Was ist bezüglich Druckabhängigkeit des GDV zu beachten? 89
  - 2.3.3 Auswirkung einer zu großen Elutionsstärke des Probelösemittels im schwachen Laufmittel des Gradientenstarts 91
- 2.4 Einfluss von Schwankungen der Eluentenzusammensetzung auf die Qualität der Detektion 94
  - 2.4.1 Einfluss eines Referenzkanals auf die Basislinie bei den Diodenarray-Detektoren 95
  - 2.4.2 Die spezielle Herausforderung bei Methoden mit UV-absorbierenden retardierten Additiven wie TFA (Trifluoressigsäure) in der mobilen Phase 96
- 2.5 Weitere Arten der praktischen Anwendung von Gradientensystemen in der HPLC 103
  - 2.5.1 Alternative und kombinierte Gradienten-Modi in der HPLC 103
  - 2.5.2 Vorteile bei der Umsetzung isokratischer Methoden mit Gradientenapparaturen 104
  - 2.5.3 Nutzung von Gradientensystemen bei der Methodenentwicklung und Methodenoptimierung 106

- 3 Optimierung einer „Reversed-Phase“-Gradiententrennung mit EXCEL 111**  
*Hans-Joachim Kuss*
- Teil 2 Die Spezifika des Gradienten in einzelnen Trennmodi 119**
- 4 Die Gradientelution ionischer Verbindungen 121**  
*Joachim Weiss*
- 4.1 Einführung 121
- 4.2 Theoretische Aspekte 122
- 4.3 Gradientenarten in der Ionenchromatographie 124
- 4.4 Wahl des Eluenten 128
- 4.4.1 Möglichkeiten zur Optimierung von Konzentrationsgradienten 134
- 4.5 Gradientelution von Anionen an Anionenaustauschern 135
- 4.6 Gradientelution von Kationen an Kationenaustauschern 146
- 4.6.1 pH-Gradienten für die Trennung monoklonaler Antikörper 154
- 4.7 Gradientelution von Anionen und Kationen an Mixed-mode-Phasen 160
- 5 Der Gradient in der Biochromatographie 173**  
*Oliver Genz*
- 5.1 Biomoleküle 173
- 5.2 Biochromatographie 173
- 5.3 Der Gradient in der Biochromatographie 174
- 5.3.1 Ein Gradient, den man unbedingt vermeiden sollte 175
- 5.4 Gradienten bei unterschiedlichen Biochromatographietechniken 176
- 5.4.1 Gelfiltration, Size-Exclusion-Chromatography (SEC) 176
- 5.4.2 Ionenaustauschchromatographie 177
- 5.4.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) 181
- 5.4.4 Umkehrphasenchromatographie von Biomolekülen 183
- 5.4.5 Affinitätschromatographie (AC) 184
- 5.5 Zusammenfassung 186
- 6 Spezifika der Gradientenelution in der HILIC 187**  
*Thomas Letzel*
- 7 Spezifika der Gradientenelution in der SFC 197**  
*Stefan Bieber und Thomas Letzel*
- 7.1 Arten von Gradienten in der SFC 197
- 7.1.1 Lösungsmittelgradienten 197
- 7.1.2 Druckgradienten 199
- 7.1.3 Temperaturgradienten 199
- 7.2 Effekte von Gradienten 200

<b>8</b>	<b>Der Gradient in LC-MS-Messungen</b>	<b>203</b>
	<i>Markus M. Martin</i>	
8.1	Bedeutung der Gradientelution für LC-MS	203
8.2	Technische Aspekte des Einsatzes von Gradientelution zur LC-MS-Analytik	207
8.2.1	Technische Einflüsse der LC-Anlage: Systemdispersion, Proportionierungspräzision und ihre Bedeutung für MS-Messungen	207
8.2.2	Technische Einflüsse des Massenspektrometers: der LC-Gradient und die Signalerzeugung im MS	212
8.2.3	Quantifizierung im Massenspektrometer innerhalb einer Gradientelution: Matrixeinflüsse und ihre Kompensation	219
8.2.4	MS-Auslastung in der Gradientelution – Säulenäquilibrierung als Durchsatzvernichter	222
8.2.5	Gradientenverzögerung, Flussrate und Säulendimension – wieviel hilft Downsizing bei Gradiententrennungen in der LC-MS?	224
8.3	Fazit	227
8.4	Abkürzungen	227
<b>9</b>	<b>Zusätzliche Werkzeuge zur Methodenverbesserung: Fluss- und Temperaturgradienten</b>	<b>231</b>
	<i>Egidijus Machtejevas</i>	
9.1	Einleitung	231
9.2	Temperaturgradienten	231
9.3	Flussgradienten	232
9.3.1	Kombination von Fluss- und Temperaturgradienten	233
9.3.2	Fallbeispiele	233
9.4	Schlussfolgerung	236
	<b>Stichwortverzeichnis</b>	<b>239</b>