

„HPLC 2017“ – Trends in der HPLC

Vom 18. – 22. Juni 2017 fand in Prag die „HPLC2017“, das „45. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques“ statt. Dieses Symposium ist vermutlich das wichtigste auf dem Gebiet der HPLC und verwandter Techniken. Dr. Stavros Kromidas berichtet im nachfolgenden Beitrag von der Tagung und zeigt Schwerpunkte und Trends auf.

Zunächst das Wichtigste für den eiligen Leser

Es war insgesamt eine sehr gute Tagung, die wesentlichen Sachen haben gestimmt: Örtlichkeiten, Wahl der Themen, Dauer der Vorträge/Tutorien etc. Erfreulicherweise war lediglich manch´ Zweitrangiges suboptimal: Organisatorisches und „Dienstleistung an den Kunden“, hier: Tagungsbesucher, waren teilweise unterdurchschnittlich. Doch später mehr dazu. Nachfolgend Kurzkommentare zu einzelnen Punkten:

Hard- und Software

Es gab kaum neue Vorstellungen (nicht erst in Prag aber in diesem Jahr neu: Elute LC series von Bruker: UHPLC bis 1.300 bar für LC-MS), vielmehr hält der Trend der letzten Jahre an: Evolutionäre Entwicklung von Soft- und Hardware, die erweiterte Produkte sollen mehr Flexibilität und Anwenderfreundlichkeit bieten, hier einige Beispiele: Biokompatible-Pumpe von Thermo für die Vanquish-Plattform, Software-Add on`s um 2D-Trennungen zu unterstützen, Cloud-Based Empower 3 von Waters, Chromeleon 7.2 SR5 für GC, LC, IC, MS von Thermo, OpenLABCDS 2.1 für LC, GC, LC-MS, GC-MS von Agilent. Die Verkaufszahlen der zwar hervorragenden aber teureren und für viele zu „sophisticated“ und überfrachteten UHPLC- und MS-Geräten waren in den letzten Jahren – und sie sind es weiterhin – ernüchternd. So bieten die Gerätehersteller seit ca. 5 Jahren (auch) einfachere, robuste Geräte für die breitere Anwenderschaft, dies wurde auch in Prag deutlich, z. B: ISC-EC Single Quadrupole Mass Spectrometer von Thermo, 1260 Infinity II Prime LC System von Agilent. Zwar langsam aber offensichtlich doch, kommt bei den Herstellern die Erkenntnis an: Gute Umsatzzahlen sind nur mit robusten und einfachen, sprich: Anwenderfreundlichen Geräten zu generieren.

Trenntechniken

SFC, HILIC und RP werden in einem Atemzug genannt, dies unterstreicht die mittlerweile Gleichwertigkeit der drei Techniken – jedenfalls für die forschende HPLC-Community. Übrigens: RP wird sicherlich einerseits aus Höflichkeit und Respekt vor der „alten Dame“ sowie andererseits – da bekannt und gut erforscht – als Referenz genannt, denn: Was kann schon an der klassischen RP noch großartig Neues entwickelt werden? Die Ionenaustauschchromatographie wird ferner ob ihrer Selektivität „neu“ entdeckt, oft im Zusammenhang mit 2D-Trennungen.

UHPLC-MS: Dies ist und bleibt ein Megatrend, die Anzahl der Anwendungsfelder wächst

2D-Chromatographie: Sie ist bereits wichtig und sie könnte – sogar mittelfristig – einen regelrechten Boom erfahren

Miniaturisierung (Nano-LC, Chip-LC usw.): Seit Michael Widmer's μ -TAS (Micro Total Analytical System) aus den 1980er Jahren ein Dauerthema auf Tagungen, wissenschaftliche Meriten sind hier nahezu garantiert. So bekam Andreas Manz, ein Widmer-Schüler, einen Preis in Prag. Die breite Anwendung im Industrielabor dürfte allerdings noch etwas auf sich warten lassen.

Füllmaterialien

1. Die Chemie der Oberfläche: Die Aufmerksamkeit genießen z. Z. zweifelsohne stationäre Phasen mit geladenen Gruppierungen an der Oberfläche, z. B.: LUNA Omega PS von Phenomenex. Mit solchen Phasen kann im Säuren ohne die Verwendung von lästigen Puffern und TFA gearbeitet werden. Für die Entwicklung stand zunächst die HPLC-MS-Kopplung im Fokus, diese Phasen sind jedoch nicht nur dort interessant. Wie stets wurden neue Mixed Mode Phases, Biphenylphasen, Wasser-resistente RP-Phasen, Phasen mit „exotischen“ Liganden usw. vorgestellt, das Ziel lautet: Dem Anwender einerseits „hydrophobic-hydrophilic balanced phases“ und eine möglichst große Variabilität an unterschiedlichen Liganden anzubieten. So werden immer mehr Fused Core-Materialien mit diverser Belegung angeboten.
2. Die Matrix: Vor ca. 10 Jahren ist erkannt worden, dass für eine vernünftige Anwendung in der Praxis bzgl. Porendurchmessers mit ca. 1,3 μm die Grenze nach unten erreicht worden ist. Die Alternative heißt: Monolithen und Fused Core (SPP, Superficial Porous Particles). So wurden in Prag neue Monolithen auf Polymerbasis sowie von Agilent ein verbessertes SPP-Material mit einem für die Moleküle weniger „diffusen“ Pfad in der aktiven porösen Schicht und somit mit besserer Effizienz vorgestellt: PMT-SP (Pseudomorphic Transformation Superficial Particles). Man denkt natürlich weiter – eigentlich seit eben 7-10 Jahren – was denn die Alternative zu kleinen, runden Kugeln sein könnte. Bemerkung: Ich erwähne in diesem Bericht nur das, was in Prag diskutiert/vorgelegt wurde und nicht das, was in der wissenschaftlichen Literatur zu finden ist (ceramic pillars, compact discs, molecular imprinting polymers): Zum einen aus einer Glasoberfläche herausgeätzten „Mikro-Säulen“ (μPAC , Micro Pillar Array Column von PharmaFluidics, mit einer 2 m langen Trennstrecke auf einem Chip ist bereits kommerziell erhältlich). Das Ergebnis sollten sehr schnelle Trennungen – Faktor 100 gegenüber UHPLC – und sehr gute Bodenzahlen sein – Faktor 10 gegenüber klassischen runden 1,3 μm -Teilchen. Zum anderen 3D-Materialien: Nach einer im Vorfeld an Modellen berechneten optimalen Struktur wird die „ideale“ Säule mit einer perfekten Packung („Skeleton“, Tetraeder-Struktur) ohne Zwischenräume und

Wandeffekten und somit kaum einer wahrnehmbaren Eddy-Diffusion gedruckt. An solchen Projekten sind Firmen und Hochschulgruppen involviert, wobei Doktoranden sicherlich die ehrlicheren Spezies sein dürften. Nach lockerem Austausch mit Letzteren abseits von Vorträgen und Diskussionen am Firmenständen habe ich den Eindruck gewonnen, dass diese Entwicklungen inform von kommerziellen Produkten eher „übermorgen“ als „morgen“ das klassische Industrielabor erreichen werden. Es muss noch Einiges an Grundlagenarbeit geleistet werden.

Anwendungsfelder als Motor für Innovationen

Biologie und Medizin unangefochten an erster, und Umwelt- und Lebensmittelanalytik an zweiter Stelle geben den Ton für die Entwicklung analytischer Techniken vor. So waren 2016 8 von 10 Blockbuster „biologics“, 5 davon mit einem Umsatz von mehr als 5 Milliarden Dollar monoklonale Antikörper (mAb´s). Da ferner z. Z. ca. 50 mAb´s sich in klinischer Phase III befinden, wird verständlich, warum der Fokus neben sehr polaren Substanzen auf Biomolekülen gerichtet ist: Es werden immer mehr poröse 300 Å aber auch verstärkt entsprechende Fused Core-Materialien angeboten (z. B. HALO mit 1000 Å). Wenn möglich, wird die Spezifität der Spektroskopie genutzt, um ohne vorherige Trennung die Information, die benötigt wird schnell und sicher zu erhalten, hier ein Beispiel: Bei REIMS (Rapid Evaporative Ionization-MS) befindet sich an dem Skalpell des Chirurgen während der operativen Entfernung von vermeintlichem Krebs-befallenem Gewebe eine MS-Sonde. Es werden permanent MS-Spektren erzeugt und in real-time wird angezeigt, ob es sich um ein mit Metastasen befallenes Gewebe handelt oder eben nicht. Die Technik funktioniert offensichtlich genau so gut wie die aufwendigere histologische Prüfung.

Zahlen, Eindrücke und dergleichen...

HPLC2017 war mit knapp 1400 teilnehmenden Personen eine wirklich gut besuchte Tagung. Abzüglich Herstellern, Vortragenden und Poster-Autoren kamen ca. 200-220 „echte“ Besucher nach Prag. Es wurden ca. 600 Poster vorgestellt, ferner konnte man aus einer Vielzahl an Plenarvorträgen, Tutorien, Kurzvorträgen von Jungwissenschaftlern und Firmenpräsentationen das Passende aussuchen. Nachfolgend in Kürze ein Paar subjektive Eindrücke fernab vom Wissenschaftlichen:

Positiv:

- Die Vortragssäle waren häufig voll, man hatte aber – ähnlich Public Viewing – das Geschehen bequem sitzend auf großen Screens verfolgen können
- Schöne, beruhigende, nicht-laute Hintergrundmusik bis zum Beginn der Vorträge
- Aktuelle Bilder/Impressionen/Begegnungen des Vortages als Bilderabfolge in den Pausen

- Sehr gute Aufteilung und Unterbringung der Poster, sie standen während der Gesamtdauer des Symposiums den Interessenden zur Verfügung
- In der Mittagspause sehr gutes Essen mit unterschiedlichen Bieren und Weinen, man hat sich wie in einem besseren Restaurant gefühlt. Dass die tschechischen Biere hervorragend sind, ist eine Binsenweisheit. Ebenso, dass Asiaten Alkohol nicht besonders gut vertragen. Das hat man dann nachmittags bei einigen Vorträgen auch gehört. Aber ich muss zur Entlastung erwähnen, dass man im großen Saal ganz hinten links im Dunklen sehr bequem hatte sitzen können...
- Eine sehr gute Idee der Veranstalter: Jungen Wissenschaftlern wurde die Chance gegeben, in 12 min von ihrer Arbeit zu berichten – sehr gelungen!

Einige Kritikpunkte:

- Ökonomische Zwänge und formale Vorgaben sind mir durchaus geläufig. Aber das monotone Auflisten von *diesen* Platinum-Sponsoren (Aufzählen...) und *diesen* Gold-Sponsoren (Aufzählen...) und *diesen* Silbersponsoren (Aufzählen...) bei der Eröffnungszeremonie war einfach suboptimal. Ebenso die Akkord-artige Vergabe von Preisen; mit etwas Kreativität kann man dies sicherlich auch und gerade für die Preisträger netter gestalten!
- Das zuständige Personal für Essen und Getränke war – jedenfalls nach üblichen Kriterien – nicht besonders gut geschult und weniger geneigt, ansprechende Arbeit zu liefern: Das Aufräumen von Kaffeetassen war teilweise in einem Abstand von 7-10 m zu hören und auf den leisen Hinweis, dass dies oder jenes fehle reagierte manche, grimmig dreinschauende Catering-Kraft mit einem Achselzucken
- Für das Orgelkonzert standen ca. 150 Stühle zur Verfügung. Auch bei der Annahme, dass nur ca. 1/3 der Teilnehmenden gekommen wären, war von vornherein klar, dass Manche(r) stehen muss – so kam es dann auch
- Selbstverständlich sollte man am Eingang für den Eintritt seinen Namenschild zeigen. Aber dass vor jedem Vortragsaal ein(e) – zugebenerweise sehr(!) nette(r) – Aufpasser(in) mit Argusaugen wachte war definitiv übertrieben. Die Fenster waren sehr hoch und eine Hintertür konnte ich nicht ausfindig machen – dieses unbegründete Misstrauen empfand ich persönlich als recht unangenehm und unnötig

Ein Wort zur Marktsituation

Es herrscht immens wachsende Konkurrenz – überall. Der Analytikmarkt wächst zwar, aber die Vorgaben durch das Management der Gerätehersteller liegen bei höheren Prozentpunkten, das macht die Hersteller zu schaffen. Man spürt förmlich den Druck umsatzstarke Produkte platzieren zu müssen. Und da kommen schon Dilemmata auf. Nachfolgend ein Beispiel, wie ein Gerätehersteller es mir in etwa schilderte: „Sollte man die Miniaturisierung forcieren und als neue Trennmedien Mikrochips, Membrane etc. aktiv anbieten, das alles haben wir

bereits. Und wir wollen ja den richtigen Zeitpunkt nicht verpassen. Andererseits würde ein erfolgreiches Einführen enorme Umsatzeinbuße mit sich bringen: Wir würden weniger Lösungsmittel, Säulen, UHPLC-/2D-Geräte usw. verkaufen – und *solche* Produkte, nicht Mikrochips bringen Geld“. Somit dürften die Firmen vorerst kein gesteigertes Interesse haben, hier besonders aktiv zu werden. Im Vordergrund stehen nach wie vor Umsatz-starke Techniken. Stichwort dazu, „3-Liter-Motor“: Dessen fertige Pläne schlummern seit der Ölkrise 1973 in den Schubladen von VW. Die Konkurrenzsituation betrifft nicht nur Hersteller sondern auch Verlage und Organisatoren von Tagungen gleichermaßen. So hat mancher Vortragender zum Schluss seines Vortrages – analog einem Reisebürovertreter – von dem hervorragenden Golfplatz und dem tollen Sandstrand in der Nähe des Hotels, in dem diese oder jene zukünftige chromatographische Veranstaltung stattfindet, geschwärmt. Und in Tracht gekleidete Koreanerinnen haben am Rande der Tagung sich sehr rührend darum bemüht, die Teilnehmer zu der nächsten HPLC-Tagung nach Südkorea zu lotsen – und ein ordentlicher Frühbuchungsrabatt ist natürlich eine Selbstverständlichkeit. Es gibt einfach von allem (zu) viel...

Ein Wort zu aktuellen Techniken:

HILIC

Die HILIC ist endgültig bei den Forschenden angekommen; Ein Zeichen, dass sie nun als eine wichtige – für viele die wichtigste – Trenntechnik für sehr polare bzw. geladene Moleküle wie beispielsweise starke Basen angesehen wird sieht man an Folgendem: Meines Wissens war es in Prag das erste Mal überhaupt, dass der Namensgeber der HILIC, Andrew Alpert, für einen Vortrag (genauer: Tutorium, sehr gut besucht) eingeladen wurde. Die Vorträge befassten sich einerseits mit den Mechanismen in der HILIC, z. B.: Ab welchem ACN-Anteil bildet sich die Wasserschicht an der Oberfläche des Materials, wie dick ist wann, bei welchen Bedingungen jene Schicht usw. Andererseits werden immer mehr Applikationen aus diversen Anwendungsfeldern, von Pharma über Umweltanalytik bis hin zu Lebensmittelchemie vorgestellt. Sehr stark im Fokus: Ihre Kopplung mit der RP-HPLC. Und: Dank HILIC erleben NP-Phasen eine Renaissance. Man sollte allerdings nicht verschweigen, dass in einigen Matrices (z. B. Urin) die polaren Verunreinigungen, die eigentlich weniger interessieren, störend wirken: Sie werden retardiert und erschweren die Trennung der anderen Komponenten, während in der RP in der Nähe der Totzeit sie als ein riesiger Peak eluieren, jener stört oft wenig.

SFC

SFC erlebt z. Z. einen regelrechten Hype. Nach meinem Eindruck sogar einen Größeren als vor einigen Jahren die HILIC. Die Gründe dürften vielfältig sein: Sie passt zu der seit einiger Zeit geführten Diskussion über „green chemistry“, sie

stellt den prominentesten Vertreter der „green HPLC“ dar, das Lösungsmittel CO₂ ist schlichtweg Umwelt-freundlich. SFC ist schnell, günstig, recht robust und recht einfach. Waren die Haupt-Anwendungsfelder noch bis vor kurzem chirale und präparative Trennungen, wurden in Prag sehr unterschiedliche Beispiele sowohl mit sehr lipophilen als auch sehr hydrophilen Substanzen gezeigt, z. B: In Wasser instabile Verbindungen, Positionsisomere, Vitamine, Lipide. Wurden bis dato wegen Erweiterung des Löslichkeitsspektrums im Wesentlichen nur wenige Modifizierer zum CO₂ dazu gegeben, wurde nun von Zusätzen berichtet, die man von der RP-HPLC her kennt: Säuren, Basen und Ionenpaarreagenzien. Schließlich wurden sehr intensiv Modelle und Wechselwirkungs-Mechanismen diskutiert. Sollte aus (firmen)politischen Gründen die Umweltdiskussion an Fahrt gewinnen, könnte dies die Verbreitung der SFC beschleunigen.

2D-Chromatographie

2D ist seit Jahren ein „Dauergast“ bei HPLC-Tagungen. Sie stellt zweifelsohne die mit Abstand beste Möglichkeit, die Peakhomogenität zu überprüfen. Ferner die schnellste Möglichkeit, in einer komplexen Probe/Matrix „alle“ Komponenten trennen zu können und sie in Kopplung mit hochauflösender Massenspektrometrie in der zweiten Dimension zu charakterisieren. Software-Add-on's sowie entsprechende Plattformen werden von allen großen Herstellern angeboten. Auch die Anzahl der Applikationsbeispiele auf deren Homepages wächst permanent. Ob und in welchem Zeitraum diese Technik in größerem Maß eingesetzt wird ist noch ungewiss, denn: Es bedarf schon etwas Zeit und Geld, bis sie in einem Industrielabor zuverlässig läuft. Ein entscheidender Faktor dürfte sein, wie stark der Druck beispielsweise seitens der Behörden sein wird, „bessere“ Tools als DAD und MS zur Überprüfung von Peakhomogenität und Charakterisierung von Substanzen in wichtigen, komplexen Proben einzusetzen. Mit gleichen Ionen (z. B. Epimere) nach identischer Zeit in der MS ankommend, haben auch hochauflösende Massenspektrometer ihre Probleme. Hier stellt 2D den selektiveren „Detektor“ dar. Und sie ist schnell, hier ein Zahlenbeispiel: Eine theoretische Peakkapazität von 1000 innerhalb von 3 Minuten ist nur mit 2D möglich. Und nur mit dieser Peakkapazität kann ich (rechnerisch) sicher sein, dass 10 Peaks ohne Interferenzen getrennt werden können. Oder aber, ich entscheide mich für eine 1-dimensionale Trennung – allerdings: Ich muss sehr, sehr lange warten. Wenn möglich, sollte in der 2. Dimension eine RP-Trennung angestrebt werden: RP ist schnell, reproduzierbar und liefert hohe Effizienz (schnelle Gradienten, scharfe Peaks). Die Kombinationen sind beliebig, folgende werden im Moment am häufigsten eingesetzt: LC1 x LC2, 2 x LC1 bei 2 pH-Werten, HILIC x RP, SEC x IEC, SEC x RP, chiral x achiral. Es versteht sich von selbst, dass die Sicherheit der Aussage wächst, wenn nach der zweiten Dimension (mindestens) zwei MS-Analysatoren verwendet werden, z. B. Ion-Trap MS und TOF.

2-3 Worte zum Schluss

Leider waren auch diesmal Vorträge aus der Industrie recht spärlich. Folgender Trend zeigt sich bei den jungen Wissenschaftlern: Es wird viel modelliert und gerechnet, um dann im Experiment die Vorhersagen zu überprüfen. Diese Entwicklung wird durch die schnellen Rechner und die diversen Tools für das Handling von Big Data begünstigt. Auch pfiffige, einfache technische Lösungen, bzw. Applikationen, erfreuten das HPLC-Herz, zwei Beispiele dazu: Eine einfache Lösung von Agilent (ASM, Active Solvent Modulation) kann „zweckentfremdet“ für das Verhindern von Fronting verwendet werden, muss die Probe doch in einem stark organischen Lösungsmittel aufgelöst werden. Ionenaustauschchromatographie an Polystyrolphasen in der Ag^+ -Form ermöglichen anhand von Mono-Oligoaccharid-Profilen die Unterscheidung von ca. 200 Bieren. Und dies schnell, isokratisch und ohne MALDI-MS. Nach meinem Eindruck fiel das stärkste Interesse der Besucher auf die Vorträge zu den Grundlagen und zu den Tutorien/Kurzvorträgen der Jungwissenschaftler. Auch sehr stark besucht waren die Vorträge zu SFC, HILIC und 2D-Chromatographie. Erfreulicherweise wurde die Van-Deemter-Gleichung diesmal etwas seltener gezeigt, auch das „Bodenturnen“ („unsere Säule hat 300.000 Böden/m“) hielt sich in Grenzen.

Die nächsten Tagungen finden in 2017 im November in Süd Korea, in 2018 in Washington DC und in 2019 in Mailand statt.

Stavros Kromidas, Blieskastel

im August 2017