

Trends in der HPLC

Stand der Technik – Ist-Situation und nahe Zukunft

Dr. Stavros Kromidas

A. Routine-HPLC

Es wird beobachtet, dass die Zahl der HPLC-Anwender, die keine Analytiker sind anwächst. Man rechnet damit, dass zukünftig in vielen Labors der Life Science das fachspezifische, analytische Know-how und die zur Verfügung stehende Zeit noch rarer werden. Im angelsächsischen Raum wird nun häufiger statt vom „HPLC-User“, vom „HPLC-Operator“ gesprochen. Dies beschreibt wertfrei die Situation und auch die Bezeichnung ist keinesfalls negativ besetzt: Ein erfolgreiches Betreiben der HPLC-Anlage bedeutet eine souveräne und sichere Erzeugung von Zahlen. Die Hersteller haben darauf reagiert, diese Entwicklung wird immer stärker beim Gerätedesign und Datenmanagement berücksichtigt, einige Beispiele dazu:

- Es existiert bereits eine Reihe robuster Geräte für ein problemloses Arbeiten bei ca. 650 bar mit einem Diodenarraydetektor (DAD) oder einem einfachen, genügend empfindlichen Massenspektrometer (MS) als Detektor. Einfache, günstige und robuste MS-Geräte sind vielerorts dabei, den UV-Detektor als „universellen“ Detektor abzulösen. Zukünftig dürfte häufiger auch die serielle Kopplung DAD-MS anzutreffen sein.

- Praktisch keine Intervention des Anwenders zwischen „Autosampler bestücken“ und „Ergebnis überprüfen“ – was in der „Maschine“ passiert gerät zunehmend aus dem Blickfeld des Anwenders.

- Mit dem Ziel einer Minimierung von Fehlern in der Routine kann die Software von heute nach Aufrufen einer Methode neben der Steuerung der Anlage, Trends ermitteln, sowie automatisch Ergebnisse, Statistiken und die Einhaltung von Kriterien prüfen; die Ergebnisse außerhalb der vorgegebenen Toleranzen werden angezeigt, dies beinhaltet auch den automatischen Vergleich von aufgenommenen Spektren mit Spektren aus Datenbibliotheken. Das sind nur wenige Merkmale einer modernen Software, auf Herstellerseiten findet sich Näheres, siehe auch weiter unten.

- Orts- und zeitunabhängiges Ansteuern der Geräte nimmt zu. Diese Möglichkeit führt zu

mehr „von-zu-Hause-arbeiten“-Jobs, was immer mehr Arbeitnehmer und Arbeitgeber gleichermaßen begrüßen.

- Mehr Output pro Zeiteinheit; dies wird durch Technologien wie „Dual Needle System“ (unabhängige Injektionspfade, Agilent), „Multi Flow Technology“ (unabhängige fluidische Systeme in einem Gerät, ThermoScientific), parallele Trennungen an Säulen-Arrays etc. vorangetrieben, on- und inline-Anwendungen in den Betrieben dürften zunehmen.

Technische Entwicklungen, die bereits jetzt schon oder in nächster Zeit genutzt werden, helfen Herstellern bzgl. Service effektiv und somit wirtschaftlich zu arbeiten; oder die Servicefreundlichkeit der Geräte dient verdienstweise als ein gutes Verkaufsargument. Dazu zwei Beispiele:

- Datenbrillen (Smart Glasses) für den Servicetechniker vor Ort: Die Datenbrille ist mit Kamera und Mikrofon ausgestattet und mit dem Handy sowie Computer der Anlage vernetzbar. Ferner kann der Servicetechniker sich beim Rechnen seiner Firma einloggen, ihm stehen somit alle notwendigen, Firmeninterne Informationen wie Spezifikationen, Lieferzeiten etc. zur Verfügung.

- Der Wechsel von Geräteteilen ist stark vereinfacht, nach dem Einbau und dem anschließenden automatischen Check (Systemeignung erfüllt?) wäre eine Gerätequalifizierung eigentlich gar nicht notwendig.

B. HPLC in der Forschung

Ich werde der Einfachheit halber die „40-bis-60-Peaks-“, und die „mehrere-100-Peaks-Anwender“ zusammenfassen. Bei ca. 40-60 Peaks steht meist die Peakkapazität, das ist Anzahl der Peaks pro Zeiteinheit, im Vordergrund: Ähnliche Substanzen weisen ähnliche Selektivitäten auf, sie sind nur über die Effizienz, sprich mithilfe einer hohen Bodenzahl, also durch schmale Peaks zu trennen. Diese Aufgabe ist mittels einer chromatographischen Dimension („1D“), vorwiegend UHPLC, meist in Kopplung mit MS, zu bewältigen. Bei noch mehr Peaks und/oder schwieriger Matrix

ist ohne eine zweidimensionale Chromatographie („2D“) die Trennung einer großen Anzahl von Peaks kaum möglich. Oft kommt die geringe Konzentration einiger Substanzen erschwerend hinzu. Solche Herausforderungen haben die Gerätehersteller im Blick, wenn sie neue Systeme entwickeln, den forschenden HPLC-Anwendern kommen die neuen Möglichkeiten zugute. Das Ziel lautet hier, sich der Wahrheit nähern. Nachfolgend auch zu diesem HPLC-Segment ein Blick zum Stand der Technik:

1. Chromatographische Trennung, Erhöhung der Peakkapazität

- Für die Quantifizierung von 40-60 Peaks kann eine 1.200-1.500 bar-UHPLC-Anlage mit einer ca. 150 mm x 2,1-Säule, bestückt mit 1,7 µm-Partikeln eingesetzt werden; das analytische Problem ist in der Regel hiermit zu lösen. Interessante Alternative im Falle von „sauberen“ Proben: 1,3-2,5 µm Core Shell-Materialien. Dazu einige Zahlen, um ein Gefühl für das theoretisch-machbare zu geben: 1D-UHPLC mit 1,7 µm bei über 1.000 bar ergibt ca. 30-40.000 Böden in 3-4 min, theoretisch wären ca. 20-30 Peaks trennbar. Werden die Möglichkeiten der UHPLC genutzt, bekommen wir mit dieser Technik die größtmögliche Bodenzahl pro Zeit

- Für mehr als ca. 70-80 Peaks (hier ist nicht die Rede von Fingerprint sondern von tatsächlicher Trennung aller Komponenten) ist eine 2D-Chromatographie notwendig. Im Falle von Hunderten von Komponenten ist für das Finden von überlappten Peaks eine 3D-Trennung (LC x LC x LC) unerlässlich. Bemerkung: Ein „LC“ kann natürlich durch „SFC“ oder „Kapillar-LC“ ersetzt werden. So wird die Entwicklung der 3D-Chromatographie vom European Research Council durch Subventionen unterstützt [1]

2. Erhöhung der Empfindlichkeit

Vorbemerkung: Auf Anreicherungs-techniken werde ich nicht eingehen, ich konzentriere mich auf die Chromatographie. Die drei Möglichkeiten hier lauten: Möglichst dünne Säulen

len/Kapillaren, eine möglichst geringe Diffusion der Substanzzone, eine möglichst empfindliche Detektion. Nun, die Lösungen dazu:

- Altbewährte Techniken (1 mm-Säulen, $\leq 300 \mu\text{m}$ -Kapillaren) erleben eine Renaissance und erreichen in der Zwischenzeit teilweise eine derartige Marktreife und Automation, dass sie in der Routine auch von fachfremdem Personal genutzt werden können, dazu ein Beispiel: Beim Waters „ionKey-MS System“ wird eine $150 \mu\text{m}$ Kapillare, gepackt mit $1,7 \mu\text{m}$, verwendet. Unter UHPLC-Bedingungen erfolgt die Kopplung mit einem Elektrospray, laut Hersteller wird eine um 40 x höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu 2,1 mm-Säulen erreicht

- „0-Totvolumen“-System, denn: Am Ein- und Ausgang der Säule einerseits und aufgrund des Totvolumens – auch an modernen Geräten – andererseits verliert man bei typischen UHPLC- oder 1 mm-Säulen bis zu 30-40 % an Effizienz. Anmerkung: Dies gilt nur für isokratische Trennungen, im Falle von Gradientenläufen ist der Effizienzverlust weit weniger dramatisch. Dennoch lautet die Devise: Integriertes System Autosampler-Säule/Kapillare-Detektor, d. h: Kapillarfreie, also „on-column-injection“, „on-tube-detection“ oder wenn es doch ein klassischer Detektor sein soll, dann einer mit $< 80\text{-}100 \text{ nL}$ -Zelle.

- Light Emitting Dioden für die UV-Spektroskopie (allerdings mit einem beschränkten Wellenlängenbereich) und u. a. der Einsatz eines DMS-Moduls (differenzielle Ionenmobilitäts-Spektrometrie) in der MS ermöglichen eine weit höhere Empfindlichkeit.

3. Erhöhung der Auflösung/Peakkapazität bzw. der Spezifität

Für die gezielte Trennung von chemisch verwandten Komponenten wird zunächst versucht, die Selektivität zu erhöhen; dies gelingt am effektivsten durch orthogonale 2D-Techniken (RPLC x HILIC, IC x SEC usw.). Es wird sich zeigen, ob 3D-Trenntechniken den Weg in „real Life-Labors“ finden werden. Bei einer großen Anzahl sehr ähnlicher Komponenten kann realistisch nur die Effizienz erhöht werden: Lange Säulen/Kapillaren mit sub $2 \mu\text{m}$ Teilchen (porös, Core Shell) ggf. im 2D-Modus; letzteres um vielleicht neben Peakkapazität doch noch zusätzlich Selektivität zu bekommen. Obwohl diese Techniken „im Prinzip“ seit Jahren funktionieren ist der Aufwand nicht unbeträchtlich. Also wird versucht, bei gleichbleibender chromatographischer Auflösung, mithilfe der Spektroskopie die Spezifität zu erhöhen. Wenn die „Physik“ funktioniert, ist sie schneller, robuster und weniger aufwendig als die „Chemie/Chromatographie“. Nachfolgend stichwortartig die Möglichkeiten:

- MS; 2D-LC-IM-qTOF-MS, Triple Quadrupole MS, LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer (LTQ, Linear Trap Quadrupole) werden seit Jahren erfolgreich eingesetzt. In letzter Zeit gerät die Ionenmobilitäts-Spektrometrie (IMS) und speziell für die Trennung von isobaren und isomeren Analyten die differenzielle Ionenmobilitäts-Spektrometrie (DMS) in den Fokus [2, 3]. Für solche Spezies ist ferner von Vorteil, wenn unterschiedliche Interfaces und Ionisierungsarten getestet werden, man kann dadurch die Sicherheit der Aussage erhöhen.

- Mehrere Detektoren und evtl. Kopplung unterschiedlicher Techniken („Chemie“ plus „Physik“)

Nicht alle Substanzen können ionisiert werden, auch sind nicht alle Substanzen UV-aktiv. Diese triviale Erkenntnis führt im Falle der Non-Target-Analytik zu einer notwendigen Kombination von mehreren Detektoren, z. B: Kopplung DAD/Corona oder DAD/MS – welches MS auch immer. Wenn man zunächst an die populäre und sicherlich sinnvolle Kopplung DAD-MS/MS denkt, ermöglicht ein simples T-Stück darüber hinaus die Verwendung eines weiteren spezifischen Detektors wie FLD oder ECD bzw. eines universellen Aerosoldetektors wie ELSD bzw. Corona [4]. Sollten Sie, lieber Leser, an dieser Stelle die Stirn runzeln, da Ihnen der Aufwand unverhältnismäßig groß erscheint, sei erinnert: Hier ist die Rede von recht großen analytischen Herausforderungen und von einem Herantasten an die „Wahrheit“. Immer wieder konfrontieren uns nicht gerade tag-tägliche Kopplungen wie UHPLC/GC-MS, UHPLC/2D-HPTLC-MALDI-MS und HPLC-Elisa (Immunochromatographie) mit neuen Fakten: „Dieser Peak war wirklich alles andere als „sauber“, und: „Was sind denn alles für Signale an der Peakflanke?“

C. Die HPLC-Technik und das Umfeld

Massenspektrometrie

Die LC/MS-Kopplung ist zweifelsohne eine Erfolgsgeschichte und sie bleibt weiterhin im Fokus: Es geht einerseits um „High Resolution MS“, um Ionenmobilität, um „6 m-TOF“, um neue Ionisierungstechniken; andererseits aber neben „high tech“-Themen auch um robuste, günstige Routine-MS-Geräte. Letztere entwickeln weniger Hitze, verbrauchen weniger Strom und sind sowohl als Stand-Alone-Geräte als auch für die Aufnahme von anspruchsvollen MS-Spektren in Kombination mit einer UHPLC-Anlage ausgelegt, z. B. Acquity QDa. Erfreulicherweise bieten heute alle große Hersteller (Waters, Agilent, Sciex, Thermo, Bruker, Shimadzu) günstige Quadrupole. Ebenfalls ein zeitlos-Dauerthema ist die Kopplung der MS mit praktisch allen (miniaturisierten) Flüssig-Trenntechniken: Nano-, Micro- und

Kapillar-LC, CE. So funktioniert beispielsweise CE-MS wunderbar, der Durchbruch (im Forschungsbereich!) könnte tatsächlich bevorstehen.

Die Säule

Es werden weiterhin neue stationäre Phasen entwickelt, zur Verbesserung der Auflösung behält die Selektivität auch im 7. Jahrzehnt der Chromatographie ihre prominente Rolle. Der Blick richtet sich z. Z. einerseits auf sehr polare und andererseits auf große (Bio)Moleküle: DNA, RNA, Proteine, Antikörper, Zelle/Zellorganelle. Dementsprechend haben polare stationäre Phasen und spezielle 300 \AA -Phasen z. Z. Konjunktur. Für sehr saubere Proben werden sub $2 \mu\text{m}$ -Teilchen – sowohl porös als auch Core Shell – verwendet, ihre Bedeutung könnte noch zunehmen. Für nicht so saubere Proben, machen die 3 oder $5 \mu\text{m}$ -Teilchen weiterhin das Rennen. Für bis zu ca. 10 Peaks wird sich möglicherweise die 50 mm , für 20-25 Peaks die 100 mm -Säule etablieren.

Die HPLC-Anlage

In der Routine werden robuste „Semi-UHPLC“-Geräte verwendet, für die Trennung sind nicht mehr als ca. 600 bar notwendig. Oder aber man verfügt über UHPLC-Geräte, dennoch wird eher selten bei mehr als ca. 800 bar gearbeitet. Wird es Geräte geben, die für mehr Druck ausgelegt sind, wenn es um wirklich schwierige Trennungen geht? Nun, es stellt kein unüberwindbares Problem dar, Pumpen für einen Druck von 2.000 - 3.000 bar herzustellen. Es wurde von Gert Desmet, Universität Brüssel, berichtet, dass auch die Säulen einen Druck von über 2.500 bar längere Zeit überstehen. Die Probleme liegen woanders: Bereits bei 1.000 bar haben wir eine Kompressibilität der mobilen Phase von ca. 10 %, aufgrund von Reibungskräften einen Temperaturgradienten in der Säule von bis ca. $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und die Ermüdung von verbauten Materialien in der Anlage ab ca. 1.200-1.300 bar ist keinesfalls vernachlässigbar [5]. Die Herausforderungen sind weniger ingenieurtechnischer Natur, Materialforscher sind hier eher gefragt: Inertheit, Materialermüdung, Artefaktbildung. Was bedeutet das alles? $0,5\text{-}1 \mu\text{m}$ -Teilchen, sowohl porös als auch unporös, können seit langem hergestellt werden; deren Routineanwendung jedoch bringt größere Probleme mit sich, auf die hier nicht eingegangen wird. Einem hohen Druck mithilfe von klassischen Pumpen sind Grenzen gesetzt. Für einen „großen“ Entwicklungsschritt in der Flüssigchromatographie sind womöglich neue Materialien notwendig, evtl. sollten wir (die Hersteller!) nicht ausschließlich und selbstverständlich an Pumpen sondern z. B. an den elektroosmotischen Fluss denken.

Die chromatographische Methode

Die Implementierung von 2D auf breiter Basis ist in der Zwischenzeit auch in Industrielabors wenigstens in der Diskussion, das Interesse dürfte zunehmen. Was Trenntechniken selbst betrifft, dürfte SFC die größte Aufmerksamkeit auf sich ziehen: Sie ist günstig, schnell, umweltfreundlich, liefert schmale Peaks, kann mit MS gekoppelt werden und lässt sich sowohl mit der LC als weitere Trenn-technik als auch mit der SFE als Probenvorbereitungsschritt koppeln und automatisieren (Shimadzu). SFC hat zwar nicht die Strahlkraft einer modernen UHPLC-Anlage aber die Argumente werden möglicherweise dazu führen, dass sie der UHPLC Teile der HPLC-Kundschaft wird streitig machen können. Oder aber, sie werden gemeinsam als UHPLC/SFC-MS auftreten. Die zweite interessante Technik der letzten Jahre, HILIC, hat zwar etwas an Attraktivität verloren und kämpft weiterhin gegen ein – positiv formuliert – differenziertes Image. Dennoch wird sie vermutlich an Bedeutung gewinnen, ihre Stärke für die Trennung von sehr polaren Komponenten sind nicht weg zu diskutieren. Immer mehr neue stationäre Phasen, die multiple Mechanismen ermöglichen (Beispiel, iHILIC-Fusion: Hydrophile Verteilung, schwache elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoff-Brückenbindungen) erweitern das Selektivitätsspektrum für polare Komponenten und stellt mit der komplementären RP eine leistungsfähige Kopplungstechnik dar.

Literatur

- [1] W. John Lough, „High Impact Chromatographic Developments of the Past 60 Years“, *The Chromatographic Society: Diamond Jubilee Supplement*, LC-GC Europe, September 2016
- [2] Wolfgang Brodacz, „Methodenentwicklung in der organischen Spurenanalytik“, LABO, 3/2016
- [3] Giuseppe Astarita et al., „Ion-Mobility Mass Spectrometry in Metabolomics and Lipidomics“, LC-GC Europe, September 2015
- [4] Edmond Fleischer, „Problemlösungen mittels HPLC-MS aus der Praxis für die Praxis“ in Stavros Kromidas (Hrsg.) „HPLC-MS für Anwender“, Wiley-VCH, 2017
- [5] Tobias Fehrenbach und Steffen Wiese, „Materialien in HPLC und UHPLC – was für welchen Zweck“ in Stavros Kromidas (Hrsg.) „Der HPLC-Experte II“, Wiley-VCH, 2016

