

## „HPLC 2017“ – Trends in der HPLC

Dr. Stavros Kromidas

Vom 18. - 22. Juni 2017 fand in Prag die „HPLC 2017“, das „45. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques“ statt. Dieses Symposium ist mit das Wichtigste auf dem Gebiet der HPLC und verwandter Techniken. Im nachfolgenden Beitrag werden Schwerpunkte und Trends aufgezeigt.

### Hard- und Software

Es gab kaum neue Vorstellungen (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 erweiterten Produkte sollen mehr Flexibilität und Anwenderfreundlichkeit bieten. Hier einige Beispiele:

- Biokompatible-Pumpe von Thermo für die Vanquish-Plattform,
- Software-Add-ons um 2D-Trennungen zu unterstützen,
- Cloud-Based Empower 3 von Waters,
- Chromeleon 7.2 SR5 für GC, LC, IC, MS von Thermo,
- OpenLAB CDS 2.1 für LC, GC, LC-MS, GC-MS von Agilent.

Die Verkaufszahlen der zwar hervorragenden aber teuren und für viele zu „sophisticated“ und überfrachteten UHPLC- und MS-Geräten sind wie in den letzten Jahren ernüchternd. So bieten die Gerätehersteller seit ca. 5 Jahren auch einfachere, robuste Geräte für die breitere Anwenderschaft an. Dies wurde in Prag deutlich, z.B:

- ISC-EC Single Quadrupole Mass Spectrometer von Thermo,
- 1260 Infinity II Prime LC System von Agilent.

Offensichtlich kommt bei den Herstellern die Erkenntnis an: Gute Umsatzzahlen sind nur mit robusten und einfachen, also anwenderfreundlichen Geräten zu generieren.

### Trenntechniken

SFC, HILIC und RP werden in einem Atemzug genannt. Dies unterstreicht, dass die drei Techniken mittlerweile als gleichwertig betrachtet werden, jedenfalls innerhalb der

forschenden 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. Was kann schon an der klassischen RP noch großartig Neues entwickelt werden? Die Ionenaustauschromatographie 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 könnte mittelfristig einen regelrechten Boom erfahren.

**Miniaturisierung (Nano-LC, Chip-LC, usw.):** Seit Michael Widmers  $\mu$ -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. Es wurden neue Mixed Mode Phasen, 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. Porendurchmesser mit ca. 1,3  $\mu$ m 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 vorgestellt. Agilent präsentierte ein verbessertes SPP-Material mit einem für die Moleküle weniger „diffusen“ Pfad in der aktiven porösen Schicht und somit mit besserer Effizienz: PMT-SP (Pseudomorphic Transformation Superficial Particles). Seit 7-10 Jahren denkt man weiter, was denn die Alternative zu kleinen, runden Kugeln sein könnte. Ich erwähne in diesem Bericht nur das, was in Prag diskutiert und vorgestellt wurde und nicht das, was in der wissenschaftlichen Literatur zu finden ist (ceramic pillars, compact discs, molecular imprinting polymers).

Zum einen findet man aus einer Glasoberfläche herausgeätzten „Mikro-Säulen“.  $\mu$ PAC, Micro Pillar Array Column von Pharma-Fluidics, 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  $\mu$ m-Teilchen).

Zum anderen sind 3D-Materialien zu erwähnen. 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.

Nach lockerem Austausch mit Doktoranden abseits von Vorträgen und Diskussionen an Firmenständen habe ich den Eindruck gewonnen, dass diese Entwicklungen in Form 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

Den Ton für die Entwicklung analytischer Techniken geben an erster Stelle die Biologie und Medizin, an zweiter Stelle die Umwelt- und Lebensmittelanalytik. So waren 2016 acht

von zehn Bestseller „biologics“, 5 davon mit einem Umsatz von mehr als 5 Milliarden Dollar monoklonale Antikörper (mAb's). Da sich ferner z.Z. ca. 50 mAb's 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 vermeintlich krebsbefallenem Gewebe eine MS-Sonde. Es werden permanent MS-Spektren erzeugt. In Echtzeit wird angezeigt, ob es sich um ein mit Metastasen befallenes Gewebe handelt oder eben nicht. Diese Technik funktioniert offensichtlich genau so gut wie die aufwendigere histologische Prüfung.

### Ein Wort zur Marktsituation

Es herrscht eine immens wachsende Konkurrenz. Der Analytikmarkt wächst, aber die Vorgaben durch das Management der Gerätehersteller liegen bei höheren Prozentpunkten. Das macht den Herstellern zu schaffen. Man spürt den Druck, umsatzstarke Produkte platzieren zu müssen. Ein Gerätehersteller schilderte: „Man sollte die Miniaturisierung forcieren und als neue Trennmedien Mikrochips, Membranen etc. aktiv anbieten. Das alles haben wir bereits. Wir wollen den richtigen Zeitpunkt nicht verpassen. Andererseits würde ein erfolgreiches Einführen enorme Umsatzeinbuße mit sich bringen, da wir weniger Lösungsmittel, Säulen, UHPLC-/2D-Geräte usw. verkaufen würden. Aber 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 umsatzstarke Techniken.

Vergleichbar ist die Situation mit dem „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 Frühbuchungs-rabatt 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 eingeladen wurde.

Die Vorträge befassten sich einerseits mit den Mechanismen in der HILIC, z.B.: Ab welchem ACN-Anteil bildet sich eine Wasserschicht an der Oberfläche des Materials? Unter welchen Bedingungen ändert sich die Dicke dieser Schicht? Immer mehr Applikationen aus diversen Anwendungsfeldern, von Pharma über Umweltanalytik bis hin zu Lebensmittelchemie wurden vorgestellt. Sehr stark im Fokus: die Kopplung von HILIC mit der RP-HPLC. 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. In der RP eluieren sie in der Nähe der Totzeit als riesiger Peak, was weniger stört.

#### SFC

SFC erlebt z.Z. einen regelrechten Hype. Nach meinem Eindruck sogar einen größeren als vor einigen Jahren die HILIC. Sie passt zu der seit einiger Zeit geführten Diskussion über „green chemistry“. Sie stellt den prominentesten Vertreter der „green HPLC“ dar, da das Lösungsmittel CO<sub>2</sub> umweltfreundlich ist. SFC ist schnell, günstig, recht robust und recht einfach. Waren die Hauptanwendungsfelder noch bis vor kurzem chirale und präparative Trennungen, wurden in Prag sehr unterschiedliche Beispiele sowohl mit sehr lipophilen als auch mit sehr hydrophilen Substanzen gezeigt, z.B: In Wasser instabile Verbindungen, Positionsisomere, Vitamine, Lipide.

Wurden bis dato wegen Erweiterung des Löslichkeitsspektrums im Wesentlichen nur wenige Modifier zum CO<sub>2</sub> dazu gegeben, wurde nun von Zusätzen berichtet, die man von der RP-HPLC her kennt: Säuren, Basen und Ionenpaarreagenzien. Modelle und Wechselwirkungs-Mechanismen wurden 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 bietet zweifelsohne die mit Abstand beste Möglichkeit, die Peakhomogenität zu überprüfen. Außerdem gewährleistet sie in einer komplexen Probe/Matrix alle Komponenten schnell zu trennen und sie in Kopplung mit hochauflösender Massenspektrometrie in der zweiten Dimension zu charakterisieren. Software-Add-ons 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. 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.

Entscheide ich mich für eine 1-dimensionale Trennung muss ich 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

HPLC 2017 war mit knapp 1400 teilnehmenden Personen eine 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.

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 auf die Kurzvorträge 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 im November 2017 in Süd Korea, 2018 in Washington DC und 2019 in Mailand statt.