

„HPLC 2015“ – Trends in der HPLC

Dr. Stavros Kromidas

Vom 22. bis 25. Juni 2015 fand in Genf die „HPLC 2015“, das „42. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques“ statt. Dieses Symposium ist das mit Abstand wichtigste auf dem Gebiet der HPLC und verwandter Techniken. Der Autor gibt im nachfolgenden Beitrag einige Eindrücke wieder und zeigt Schwerpunkte und Trends auf.

Kurzes Gesamtfazit

Es ist eine sehr gelungene Tagung gewesen, nahezu alles war perfekt: Von der Örtlichkeit über die Organisation bis hin zum Fachlichen hat alles gepasst. Die Anzahl der Poster und der Aussteller war wohlthuend kleiner als sonst und somit zu „bewältigen“. Nun kurz zum Wissenschaftlichen: Auffallend bei der diesjährigen Tagung war, dass etwas Großes, etwas völlig Neues gefehlt hat. Vielmehr hat man sich sehr ruhig, ja fast demütig und intensiv über zunächst banal anmutende Themen ausgetauscht, wie Temperatur, pH-Wert und Wasseranteil im Eluenten. Erst in den letzten Jahren erkennt man peu à peu wie komplex die HPLC eigentlich ist und wie stark alles mit allem zusammenhängt - hier haben die neuen Techniken wie UHPLC und Core-Shell-Technologie einen entscheidenden Beitrag geleistet. Doch später mehr dazu.

Folgendes ist aus meiner Sicht erwähnenswert: Mittlerweile bieten fast alle Säulenhersteller „Bio“-Säulen für die Trennung von Peptiden und Proteinen an. HILIC befindet sich nach erfolgter Einführung nun im Stadium des „Verstehens“: Es gab sehr viele Vorträge und Poster über mögliche Mechanismen, über Modelle etc. Etwas zeitversetzt folgt die SFC: Das Promoten seitens der Firmen ist in vollem Gange; in den nächsten zwei bis drei Jahren dürfte die Beschäftigung mit der Theorie an Dynamik gewinnen.

Für viele Anwender war der Sprung von der HPLC zur „echten“ UHPLC offensichtlich zu schnell. Die Gerätehersteller waren mit den Verkaufszahlen wohl nicht ganz zufrieden – Ergebnis: Alle drei großen Hersteller bieten mittlerweile etwas zwischen „klassischer HPLC“ und „UHPLC“ an, das sind HPLC-



Foto: www.hplc2015-geneva.org

Geräte, „UHPLC-like“ (die mit ca. 650 – 1000 bar arbeiten), nach dem Motto: „Lieber Kunde, kaufe doch jetzt etwas Modernes, Robustes und mach' weiterhin das, was du die ganze Zeit gemacht hast und was du auch kennst – nur besser als bis dato“.

Dauerthemen der letzten Jahre wie 2D-Chromatographie, Miniaturisierung und Kopplungen haben natürlich nicht gefehlt, allerdings standen eher Applikationsbeispiele im Vordergrund. Der Kreis wiederholt sich offensichtlich: Einführung, Theorie, Anwendung.

Wissenschaftlicher Teil

Geräteentwicklung

Die Geräte-Hybridtechnologie hat das Industrie-Labor längst noch nicht erreicht, aber sie dürfte doch eine Zukunft haben. Das, was Waters und Agilent bereits vor fünf bis sechs Jahren begonnen haben und jetzt mit der SFE-SFC/MS-Anlage von Shimadzu weiter geführt wird, dürfte zwar langsam aber stetig an Bedeutung gewinnen: Flexible Geräte, die je nach Bedarf im HPLC- oder SFC-Modus oder aber in Form einer LC-SFC-MS, oder wie auch immer gearteten Kopplung betrieben werden.

Halten wir als Tendenz wie folgt fest: Es wird erhöhte Flexibilität geboten. Weitere

Beispiele dazu wären, der 1290 Infinity II Autosampler von Agilent mit zwei unabhängigen Injektionspfaden („Dual Needle System“), oder die „Multi Flow Technology“ von Waters.

Aber auch Folgendes wird beobachtet: Man bietet den Kunden Geräte mit etwas „schlechteren“ Spezifikationen als jene der eigenen Spitzenprodukte an, dafür aber robuster, einfacher, maßgeschneidert für eine bestimmte Zielgruppe (z. B. Pharma), also weniger „sophisticated“ – und wesentlich günstiger. Man denke an Vanquish Flex von ThermoScientific (ca. 1.000 bar) oder ACQUITY Arc UHPLC von Waters (ca. 650 bar). Die Anwender profitieren von der starken Konkurrenz. Es gibt heute hervorragende Geräte für jedes Portemonnaie und für nahezu jede Anwendung: Von dem günstigen, modernen und robusten HPLC- bis hin zum super UHPLC-Gerät. Der Wechsel von Geräteteilen ist derart vereinfacht, dass eine Gerätequalifizierung (geregelter Bereich, GMP-Umgebung) nahezu entfällt.

Medizin und Biologie machen das Rennen

In der analytischen Forschung stellen Medizin und Biologie wahrscheinlich diejenigen Bereiche mit den größten Wachstumsraten dar. „Med“ und „Bio“ treiben die Entwicklung

an, somit beherrschen „...omics“ seit Jahren die Szene. Es besteht ein großer Bedarf für spezifische, empfindliche Methoden. Der Forschungs- und damit auch der analytische Fokus sind beispielsweise auf eine einzelne Zelle oder gar Zellbereiche gerichtet. Und da ja das wirtschaftliche Potential hier enorm ist, versuchen die Hersteller Produkte speziell für diesen Bereich zu entwickeln.

Dazu einige Beispiele: Man spricht etwas selbstironisch von „STAMP“ (Separation Technology for a Million Peaks); im Rahmen des Proteom-Projektes müsste man ca. 50.000 Proteine trennen („separated, non differentiated“). Es wird eine Peakkapazität von 1.000.000 benötigt. Es ist völlig klar, dass dies Zukunftsmusik ist. Diese Richtung beeinflusst jedoch das Design der zu entwickelnden Produkte, so bieten zum Beispiel nahezu alle Firmen Säulen auf Polymer- und vor allem auf 300Å -Kieselgelbasis für die Trennung von Peptiden und Proteinen an. Ferner: Die Metabolomics-Forschung verlangt nach Säulen mit guter Selektivität für kleine polare Moleküle. Immer mehr HILIC-Säulen werden vorgestellt. Um sich der geforderten Nachweisgrenze möglichst zu nähern, strebt man ein „0-Totvolumen“ integriertes System an – „Autosampler-Säule-Detektor“: Kapillarfreie Injektion, „on-tube-Detection“.

Vereinfacht gesagt: Die heutigen Säulen sind viel zu gut für die heutigen Geräte, nach einer Phase der relativen Ruhe, dürfte in den nächsten Jahren gerätetechnisch einiges passieren, denn: Am Säulenein- und -ausgang verliert man bei kurzen Säulen ca. 30-40% an Effizienz. Die Zahl der HPLC-Anwender, die keine Analytiker sind, wächst. Diese Entwicklung wurde von den Herstellern erkannt und sie wird immer mehr beim Geräte- und Softwaredesign berücksichtigt. Gerätebedienung, Methodenentwicklung und Data-Handling sollen intuitiv, einfach und robust sein, denn: man rechnet damit, dass zukünftig in vielen Labors in der Life Science Know-How und Zeit noch rarer werden.

SFC, HILIC, RP-HPLC

SFC, „der alte Newcomer“, erlebt zurzeit zweifelsohne einen Hype; nach Ende der 1980er Jahre und Anfang der 2000er Jahre, erscheint dieser dritte Anlauf erfolgversprechender. War früher die SFC im Wesentlichen „nur“ eine Alternative für präparative Trennungen im Normal-Phase-Modus (chirale Trennungen, Isolierung organischer Substanzen), erobert sie heute immer mehr Analytikfelder. Diese Entwicklung wird von folgenden drei Faktoren begünstigt: mittlerweile robuste, leicht zu handhabende Geräte, Erweiterung der Anwendungsbereiche durch

immer mehr Modifier in der mobilen Phase sowie die Kopplung mit der MS. Es wird erwartet, dass auf den nächsten Tagungen eine gründliche Auseinandersetzung über die Dinge erfolgen wird, die im überkritischen Zustand tatsächlich passieren – die Entwicklung theoretischer Modelle steht noch bevor.

HILIC hat ihre „Feuertaufe“ hinter sich. Sie hat es zwar immer noch recht schwer, sich auf breiter Basis zu etablieren. Aber sie kommt, wenn schon auch langsam, und dies dank der wachsenden Zahl interessanter, polarer Verbindungen; und sie wird immer wertvoller als Kopplungspartner der RP. Viele Vorträge in Genf befassten sich mit den Mechanismen in der HILIC. So beeinflusst beispielsweise die Dicke der Wasserschicht an der Oberfläche der stationären Phase die Peakform, die Selektivität, Beladbarkeit und Reproduzierbarkeit stark. Und diese Dicke der Wasserschicht selbst wird wiederum von vielen Faktoren beeinflusst. Die „Good News“ dabei: durch Beachten einiger weniger aber entscheidender Regeln kann auch ein RP-verwöhnter Anwender mit HILIC seine Freude entwickeln.

Und RP, die „alte Dame“? Die RP-HPLC-Pioniere sind verstorben oder aber bleiben, bis auf wenige Ausnahmen (Berry Karger, Pavel Jandera), altersbedingt solchen Tagungen meist fern (Joseph Kirkland, Lloyd Snyder). Mit was beschäftigen sich nun deren Nachfolger? Ein sowohl „back to the roots“ als auch „Zukunft gestalten“. Ich gewinne den Eindruck, dass heute die Zusammenarbeit zwischen Hochschulen und Instituten einerseits und Industrie und Geräteherstellern andererseits intensiver, unverkrampfter und offener ist – und das ist zunächst gut so. Die Hersteller erhalten einen schnellen und guten Input, die Geräte sind gut, nur: oft haben Entscheider bei den Firmen die große Masse der Anwender nicht im Blick, manch eine Geräteentwicklung geht an ihnen vorbei. Des Weiteren ist für manchen Softwareentwickler „Analytik“ offensichtlich immer noch ein Fremdwort. Halten wir also fest: forschende HPLC-Anwender profitieren als erste von hervorragenden Entwicklungen (2D, Miniaturisierung, 1,5 µm, Kapillar-LC-Ionenmobilität). Die guten, robusten Routinegeräte erobern in einem zweiten Schritt den Markt. Zum Schluss möchte ich kurz am Beispiel der Temperatur skizzieren, wieso man nach fast 50 Jahren HPLC auf wissenschaftlichen Tagungen in Postern, Vorträgen und auch Tutorien (so ein sehr gutes Tutorium mit Frank Steiner und Thorsten Teutenberg) sich immer noch oder eher wieder mit solchen „banalen“ Sachen beschäftigt.

Die Temperatur beeinflusst sowohl die Kinetik (Effizienz, Peakform) als auch die Thermo-

dynamik (Selektivität). Nehmen wir an, die Temperatur erhöht sich. Was kann alles passieren? Nachfolgend stichwortartig einige Konsequenzen:

- Freie Silanolgruppen dissoziieren stärker, Ionenaustauschwechselwirkungen nehmen zu. Dies beeinflusst Peakform und Retentionszeit
- Der pH-Wert ändert sich. Gleiche Konsequenz wie oben
- Das Minimum der Van-Deemter-Gleichung verschiebt sich nach rechts. Man müsste bei höheren Flüssen arbeiten, um eine maximale Bodenzahl zu erzielen
- Temperaturerhöhung führt zu einer Veränderung der Solvatisierungsenergie, zu einer Änderung der Dicke einer evtl. vorhandenen Wasserschicht an der Oberfläche der stationären Phase und beeinflusst Dissoziations- sowie weitere Gleichgewichte, so z. B. die Dimerisierung. Das betrifft nicht nur die Probenmoleküle, sondern auch die (evtl. unterschiedlichen) funktionellen Gruppen der stationären Phase. Eine stärkere Temperaturerhöhung macht das Wasser schließlich apolarer

Jetzt nehmen wir an, die Moleküle in der Probe haben unterschiedlichen chemischen Charakter (Peptide, Proteine mit sauren und basischen Gruppen)...

Oder nehmen wir an, es wurden zwei Trennungen durchgeführt, zum einen ein HPLC-Lauf, zum anderen ein UHPLC-Lauf mit einer 1,7 µm-Säule. Im zweiten Fall ist die Temperatur am Ende der Säule aufgrund der Reibungswärme ca. 18-20°C höher als eingestellt, im ersten Fall bleibt sie gleich.

Man verwendet einen Vorheizler – oder aber nicht – man verwendet einen Säulenofen der adiabatisch arbeitet – oder eben diabatisch – oder man hat einmal eine 2,1 mm-Säule und das nächste Mal eine 4,6 mm-Säule. In einem Fall herrscht neben dem longitudinalen auch ein radialer Temperaturgradient – im anderen Fall eben nicht.

Diese Auflistung lässt sich wirklich fast beliebig erweitern. Man erkennt vielleicht, wieso eine gewollte oder unbeabsichtigte Änderung der Temperatur zu „Allem“ führen kann: Verschlechterung oder Verbesserung der Peakform sowie der Auflösung und der Nachweisgrenze, Koelution, auch die Anzahl der Peaks kann sich ändern, schließlich auch die Elutionsreihenfolge.

Mancher Anwender stellt nun eine solche Änderung fest, bringt sie allerdings nicht unbedingt mit der „harmlosen“ Temperatur in Zusammenhang. Man wird sich noch einige

Zeit mit solchen Sachen beschäftigen müssen, will man das Geschehen in der HPLC ein wenig besser verstehen.

Zwei bis drei Worte zum Schluss

Auch diesmal hätte ich mir mehr Vorträge aus der Industrie gewünscht.

Auch diesmal hätte ich mir von einigen Säulenherstellern mehr Seriosität gewünscht: man zeigt Vergleichschromatogramme, um zu beweisen, dass die eigene Säule umso und so viel % mehr Böden liefert als die Konkurrenz – nur: die chromatographischen Bedingungen sind nicht vergleichbar. Die unterschiedliche Chemie der Oberfläche zweier zu vergleichenden „C18-Säulen“ bedingt unterschiedliche Wechselwirkungen und damit unterschiedliche Kinetik, was zur unterschiedlichen Bodenzahl führt, obwohl die Säule der Konkurrenz vielleicht besser gepackt gewesen ist.

Auch diesmal war ich vom Interesse der Besucher angetan: Trotz des tollen Wetters war die Sonnenterasse während der Vorträge fast leer (ich war nur kurz dort, um es feststellen zu können...)

Auch dieses Mal war die Qualität der Poster hervorragend. Hinsichtlich der Anwendungsgebiete war die Anzahl der Poster aus dem Bereich Bio und Pharma mit Abstand am höchsten (ca. 100), gefolgt von den Anwendungsbereichen „Lebensmittel“ (38) und „Umwelt“ (26). Was die anderen Fachgebiete betrifft, waren die Themen „Fundamentals“, „LC-MS-Kopplung“ und „Säulen“ ungefähr gleich stark vertreten (jeweils ca. 50-60) gefolgt von der Probenvorbereitung (37). Auffallend klein (nur 22) war die Anzahl der Poster zur UHPLC. Sie hat ihren Charme als Forschungsgebiet verloren und nach über 10 Jahren weiß man ja, dass in der UHPLC die Retentionszeiten kurz und die Peaks scharf sind.

Zahlen, persönliche Eindrücke und dergleichen...

Die „HPLC 2015“ war mit knapp 1.100 teilnehmenden Personen eine recht gut besuchte Tagung. Abzüglich Hersteller, Vortragenden und Poster-Autoren kamen ca. 200 bis 250 Besucher nach Genf. Es wurden ca. 600 Poster vorgestellt, ferner konnte man aus insgesamt 93 Plenarvorträgen, Tutorien und Firmenpräsentationen das Passende aussuchen. Nachfolgend in Kürze ein Paar subjektive Eindrücke:

Neutral:

Sehr enge Zusammenarbeit zwischen Forschungsinstituten, bzw. Universitäten, mit der Industrie und den Geräteherstellern. Kaum ein Vortrag seitens einer Universität kam ohne „sponsored by...“ aus.

Verglichen mit der jüngsten Vergangenheit war eine relativ geringe Besucherzahl aus Asien anwesend, was verständlich ist: Zum einen existiert dort eine Schwestertagung zum anderen verzeichnen wir eine wachsende Anzahl an Konkurrenzveranstaltungen überall in Asien.

Positiv:

Ich mach's kurz, weil eben alles gut war: Perfekter Tagungsort, Getränke und Kaffee reichlich, gut, stets vorhanden, keine Warteschlangen, exzellente Küche.

Das Fehlen von übertriebenen „Show-Elementen“ gepaart mit der sachlich geführten, intensiven Diskussion zwischen Herstellern und Besuchern empfand ich als sehr angenehm.

Eine „gaaanz“ kleine Kritik :

Vier parallele Sessions; man kann hier sicherlich geteilter Meinung sein, aber die Entscheidung fiel oft schwer.

Ich habe nach weiteren Kritikpunkten gesucht, es ist mir jedoch nur äußerst knapp gelungen, gerade noch zwei winzige zu finden:

Wenn ich mich nicht irre, ist es bei dieser Tagungsserie das erste Mal überhaupt gewesen, dass im Plenarsaal Blumen gefehlt haben. Bei teilweise recht trockenen Themen täte der Anblick eines großen, bunten, schönen, Blumenstraußes gut...

Genf ist bekanntlich recht französisch geprägt. Ich kann mich daran erinnern, in Nizza war es „das Gleiche in Grün“: Zwar eine hervorragende Küche, aber man bekam mittags nur ein Löffelchen und ein Messer zum Essen. Im erweiterten französischen Raum müssen Gabeln wohl recht teuer sein, seien sie auch nur aus Plastik...

Die nächsten Tagungen finden in 2016 in San Francisco und in 2017 in Prag statt.