



„HPLC 2019“ Trends in der HPLC

Dr. Stavros Kromidas

Vom 16.-20. Juni 2019 fand in Università di Milano-Bicocca, Mailand, die HPLC 2019, das „48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques“, statt. Im nachfolgenden Bericht werden Eindrücke vom Symposium mit 1.300 Teilnehmern, 50 Ausstellern, knapp 300 Vorträge und Neuerungen auf dem Gebiet der HPLC und verwandter Techniken geschildert.

Erkennbare Megatrends

2D-Chromatographie

Mehrdimensionale Trennungen haben einen großen Raum eingenommen, sowohl was die Zahl der Vorträge betrifft, als auch die Zahl der Anwesenden. Die Vielfalt hat zugenommen; das betrifft die verwendeten Mechanismen in der 1. und 2. Dimension (z. B. HILIC x RP, HILIC x HILIC, RP x SFC usw.) sowie die Hardware-Vielfalt. Kurzfazit: RPLC x RPLC-MS scheint – auch durch die mittlerweile angebotenen Geräte und die umfangreiche Unterstützung seitens der Hersteller – eine gewisse Reife erlangt zu haben, die Akzeptanz nimmt zu. Hier tut sich definitiv etwas, natürlich zunächst im forschenden Umfeld. Bezüglich anderen Varianten von 2/3D-Techniken, weiter unten beschrieben, wird es noch einige Zeit dauern, bis sie in Industrielabors auf breiter Basis zu sehen sein werden.

Massenspektroskopie - eine attraktive Detektormethode

Es ist eine Frage der Zeit, bis MS dem UV/DAD-Detektor die Erstplatzierung bei den HPLC-Detektoren streitig machen wird, zumal in der Zwischenzeit eine ganze Palette an MS-Detektoren angeboten wird. Von dem günstigen, einfachen, kompakten und robusten Single-Mode-MS-Detektor für die Routine bis hin zu HRMS (High Resolution MS) und IMS (Ion Mobility Spectroscopy).



Università di Milano-Bicocca (Foto: Antonio Bonanno)

Wenn irgendwie möglich wird heute versucht, jede Trenntechnik mit der MS zu koppeln. Nachfolgend eine Auswahl von Kopplungen, die nach meiner Ansicht bereits jetzt wichtig sind bzw. noch eine vielversprechende Zukunft vor sich haben; hinter der zugegebenermaßen ermüdend zu lesender Anreihung von Acronymen steckt ein enormes analytisches Potential:

- SPE-CE-ESI-MS,
- Chip-ESI-IMS, Chip-LC-FLD-MS,
- HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS, 2
- D-LC-IMS/QTOF,
- UHPGPC-MS,
- HILIC x RPLC-HRMS,
- IEC-UV x RPLC-MS

Biomoleküle

Wenn man berücksichtigt, dass in 2017 sieben der „Top-10“ der Medikamente Biopharmazeutika waren und die prognostizierten jährlichen Zuwachsraten bis 2024 bei ca. 20% liegen, ist das Interesse

für Biomoleküle mehr als verständlich. Die UHPLC-Technik erobert die „Bio-welt“: Kleine Teilchen, kurze/dünne Säulen, z.B: statt 300 mm, 7,8 mm ID und 5 µm, nun 150 mm, 4,6 mm ID und 1,7/2,5 µm, also UHPIEC bzw. UHPSEC, z.B: TSKgel UP-SW3000, 2 µm von Tosoh Bioscience. Auch die Core Shell-Technologie findet hier Einzug, z.B. Core Shell-Teilchen mit 1000 Å, wie weiter unten beschrieben.

Einige Hardware-Highlights

Verschiedene Firmen stellten ihre Hardware Neuheiten vor:

VICI zeigte sein VICI TrueNano UHPLC Gradient Pumping System; ca. 10 x 10 x 20 cm, Fluss_{min.} 10 nl/min, Injektionsvolumen 5 nl, Druck 1.500 bar

Das King's College London stellte ein portables HPLC-Gerät vor, das speziell für den Outdoor-Einsatz z. B. in abgelegenen Gegenden Afrikas entwickelt

wurde: 6,7 kg inkl. Eluent, batteriebetrieben (13 h), ohne Pumpenteil (Vorkomprimiertes Gas), demnächst als Gradientensystem. Um die Robustheit des Gerätes zu demonstrieren wurde ein Video gezeigt, in dem der Koffer mit dem Gerät aus einer Höhe von über 1 m fallengelassen wurde, anschließend erfolgte eine Aminosäuren-Trennung mit einem V_k von 0,2%.

Die activated research company (arc) präsentierte den Solvere Carbon Selective Detector (CSD): FID-Detektor für die HPLC. Noch recht früh, um ein Urteil abzugeben. Sollte er tatsächlich funktionieren, bedeutete er als Universaldetektor eine sehr interessante Erweiterung der Detektionsmöglichkeiten.

Da das Lösungsmittel nach der Säule entfernt wird, soll der DiscoverIR-LC, ein FTIR-Detektor für die HPLC von Spectra Analysis, für alle gängigen HPLC-Lösungsmittel und auch im Gradientenmodus geeignet sein, mit einer Empfindlichkeit: 1 μ g pro Komponente. Auch für dieses Gerät gilt das weiter oben gesagte: Sollte der Detektor sich im Alltag bewähren, wäre mit seiner Hilfe eine recht Substanz-spezifische Detektion möglich.

Die knappe Zeit in den Labors beflügelt das Vorantreiben von parallelen Trennungen: Alle große Hersteller bieten Systeme mit unabhängigen „Fluidic Paths“ an. Ferner: MISER-Anwendungen (MISER: **M**ultiple **I**njections in a **S**ingle **E**xperimental **R**un) für einfache Trennungen in der Routine, z. B. Qualitätskontrolle von Softdrinks, geraten immer mehr in den Focus

Interessant ist auch das Prinzip der Vacuum-jacketed column (VJC): Ein Metallmantel wird um die Säule angebracht, unter Vakuum (10^{-7} Torr) wirkt er wie eine thermische Barriere zwischen „innen“ und „außen“. Ergebnis ist ein quasi-adiabatisches System, was zu einem enormen Gewinn an Effizienz führt: Die Peakverbreiterung wird stark herabgesetzt. Das System wurde zwar von Fabrice Gritti (Waters) bereits im

letzten Jahr beschrieben, die große Aufmerksamkeit hat es aber in Mailand erfahren.

Neues von der „HPLC-Front“

Miniaturisierung

Micro und Nano war gestern, die „Bühne“ wird von Chips dominiert. Die Chip-Technologie schreitet voran, man kann von einem erneuten Hype sprechen, hier einige Beispiele:

- Trennung von chiralen Substanzen auf einem Chip innerhalb 4-6 s
- Duale Detektion, z. B. Chip-LC-FLD-MS
- „2DHPLC on a Chip“, z. B.: 1. Dimension C18, 2. Dimension chirale stationäre Phase
- High-Temperature-Chip-HPLC; Temperaturgradient bis auf 170 °C, Trennzeit 20 s.

3D-Druck

Fittings und Säulen werden bereits gedruckt, die 3D-Technologie gewinnt im Bereich der HPLC-Accessoires an Boden

Multidimensionale Chromatographie

Die Wichtigkeit des Themas wurde durch mehrere Sessions unterstrichen. Die Anwendungsfelder nehmen permanent zu, hier seien nur zwei genannt: NPLC x SEC und MTF x SEC (MTF: **M**olecular **T**opology **F**ractionation). Die größten Herausforderungen sind nach wie vor:

- Active Solvent Modulation (ASM) – also die Veränderung der Zusammensetzung des Eluats aus der 1. Dimension bevor es in die zweite Säule gelangt.
- Stationary Phase Assisted Modulation (SPAM) – vereinfacht: Mithilfe einer Trap-Säule werden nur bestimmte Komponenten in die zweite Säule geführt.
- Die Kombination von 2- oder 3D-Systemen mit IMS/HRMS.
- Und nicht zuletzt als 2. Dimension ein Trennmedium bestehend aus Hunderten von Kanälen routinetauglich gestalten.
- Auch STAMP (Separation Technology for A Million Peaks) fehlte nicht.

Allerdings wird es nach meiner Einschätzung noch neininige Jahredauern, bis diese Technologien zur Marktreife gelangen

IoT

Internet of Things, ist aus anderen Bereichen längst bekannt und auch bereits in Produkten implementiert. Die instrumentelle Analytik hinkt hier ordentlich hinterher, aber immerhin, langsam passiert etwas. So wurden von Shimadzu Smart-Ansätze vorgestellt, z. B.: Warnung, wenn nicht genügend Eluent vorhanden ist, im Falle von Luftblasen wird erneut injiziert und der Lauf wiederholt, Überwachung und bei Bedarf automatische Justierung des Flusses, eine Meldung über den notwendig gewordenen Austausch des Eluenten bereits mit einem Monat Vorlauf etc.

Data Sciences

Auch auf diesem Gebiet mischt sich die Analytik nicht gerade ganz vorne mit, gleichwohl gibt es hier schon Ansätze, in den nächsten Jahren wird das Thema mehr Aufmerksamkeit erlangen. In Vorträgen wurden aus Forschungsprojekten die Möglichkeiten von Big-/Smart Data, Machine Learning, Artificial Intelligence (AI), Inverse AI dargelegt. Die Herausforderung ist einerseits, die enorme Datenmenge zu managen und andererseits, aus Daten Informationen zu generieren. So erzeugt beispielsweise eine LC-DAD-Kopplung 100 kB, bei der LC x LC-HRMS sind es bereits 15 GB und es wird prognostiziert, dass in 1-2 Jahren die Herausforderung 40 Zettabytes lauten wird.

Multidetektion

Ob in der UHPLC, Chip-LC, 2D-LC oder SFC: Die Multidetektion entwickelt sich immer mehr zu einer Selbstverständlichkeit. Neben DAD-MS, immer häufiger: Serielle Kopplung oder nach einem Splitt, FLD und MS bzw. DAD-CAD und MS. Und wenn es „nur“ MS sein soll, dann wahlweise APCI und ESI (gute Empfindlichkeit und gute Linearität) oder IMS und QTOF. Wenn ausschließlich ESI eingesetzt wird, dann auf jeden Fall Messung bei positiver und negativer Spannung.

Biomoleküle

Weiter oben wurde die wachsende Wichtigkeit von Biomolekülen – insbesondere Monoklonale Antikörper (mAbs) und Glycane – dargelegt. Somit ergibt sich, dass alle moderne Techniken Biomoleküle als deren „Objekt“ entdeckt haben, z. B: UHPSEC, SEC x SEC-MS für intakte mAbs, HILIC-FLD-MS für Glycane, LC x LC-MS zur Überprüfung der Vergleichbarkeit von Original-mAbs und Biosimilars usw.

HILIC und SFC

Der Trend setzt sich fort: Um HILIC ist es etwas ruhiger geworden, im Vordergrund steht eher die SFC. Hier dreht sich die Diskussion um die stattfindenden Mechanismen, des Weiteren nimmt die Zahl der Anwendungsfelder zu. Beide Techniken können vor allem in 2D-Anwendungen ihren Charme voll entfalten. Das Befassen mit 2D-Trennungen „katalysiert“ auch jene Haltung, dass nämlich RP, HILIC, SFC, IEC, SEC usw. weniger als isolierte „Entities“ zu betrachten oder gar in der Konkurrenz zu sehen sind. Vielmehr soll es ausschließlich um eine „gute“ Trennung/Informationsgewinnung gehen, man sollte flexibel aus der Trenntechniken-Klaviatur mal das, mal jenes aussuchen und bei Bedarf dies und jenes vorbehaltlos kombinieren. Diese Denkweise ist verwandt mit dem Lebenszyklus-Modell, was seit einiger Zeit in der Pharma intensiv diskutiert wird.

Bewegung im regulierten Bereich (Pharma)

Vereinfacht stellt sich die Situation in der Pharmaanalytik heute wie folgt dar: Viele Monographie-Methoden sind schlecht, die Anforderungen aus analytischer Sicht oft nicht sinnvoll. Wiederholmessungen, penibles Einhalten von Methodenparameter und der Focus auf Formalien beschieren Unflexibilität sowie einen vermeidbaren zeitlichen/personellen Aufwand. Das ist hinreichend bekannt und es gibt Bestrebungen für einen Wechsel der Denk- und Handlungsweise. Folgendes fand ich bei der Tagung interessant: Im Vergleich zu frü-

her, gab es mehrere Vorträge von Vertretern der Hersteller, der Pharmafirmen und auch der USP (US-Pharmakopöe), die einen neuen, pragmatischen, praxisnahen Geist propagieren. Ich kann an dieser Stelle nur stichwortartig Beispiele nennen:

- Ohne Revalidierung kann sowohl eine andere C18-Säule als auch eine Core Shell C18 verwenden – solange die Anforderungen des Systemeignungstests erfüllt sind
- Fundiertes Wissen um die Charakteristika der Methode (Robustheit und Risikobewertung) bereits bei der Methodenentwicklung steht im Vordergrund. Hier sollten mithilfe kommerzieller Software in-silico-Lösungen verstärkt angewandt werden (QbD, DoE, Peak Fitting, Fourier Dekonvolution etc.)
- Ergebnisse sollen während des gesamten Lebenszyklus der Methode überwacht werden (Monitoring)
- Begriffe wie „Stabilität“, „Methodenfähigkeit“, „kontinuierliche Überwachung“, „Method Operable Design Region (MODR)“, „Critical Method Parameter“ (CMP), „Continuous Method Verification (CMV)“ usw. sind Belege von folgenden Vorstellungen:
 - Qualität in die Methode hinein stecken und nicht nachher prüfen
 - Das Wissen um die Methode (Änderung-Auswirkung) erlaubt in der späteren Routine flexibles Handeln
 - Analytical Method Lifecycle; vereinfacht steckt folgende Philosophie dahinter: DoE-Experimente und in-silico-Tools helfen, die Methode während der Entwicklung richtig zu „verstehen“, während dieser Zeit wird der „method range“ validiert. Durch kontinuierliche Leistungs-Verifizierung (Continuous Performance Verification, CPV) wird anschließend abgesichert, dass die Methode während des gesamten Lebenszyklus noch ISK (In Statistischer Kontrolle) ist.

Methodenentwicklung, Validierung, Routineanwendung sollen nicht mehr als drei zeitlich hintereinander geschaltete, voneinander unabhängige Schritte verstanden werden.

Fazit

Ich möchte mit der kurzen Vorstellung einiger Produkte, die mir ins Auge gefallen sind, abschließen. Teilweise handelt es sich dabei um Produkte, die bereits seit einiger Zeit auf dem Markt erhältlich sind.

Paper Spray Ionisation: Ein paar µl Blut oder Urin werden auf Papier oder auf einen Objektträger aufgebracht, mit Lösungsmittel versetzt und es werden MS-Spektren aufgenommen, Ergebnis: Quantitative Info innerhalb 60 s

„Dursan“; CVD-(Chemical Vapor Deposition) Beschichtung, inert für die meisten Chemikalien, keine Physisorption von Proteinen, Temperatur- und pH-Wertstabil (silcotek)

Core Shell-Technologie für Biomoleküle, z. B: YMC-Triart Bio C4 (Hybrid-Material, 1,9 µm, YMC), BIOshell IgG 1000 Å C18 bzw. Diphenyl sowie Chromolith WP 300 mit diversen funktionellen Gruppen (Merck)

Supelco (Merck millipore) stellte ein Core Shell-Material mit einer PGC-Schicht (Porous Graphite Carbon) für die Trennung von sehr polaren Substanzen vor

GPC Clean-Up System für die Probenvorbereitung. Durch Verwendung zweier Säulen, Clean-Up von größeren Mengen einer schwierigen Matrix, beispielsweise von Öl (Knauer)

Die nächsten HPLC-Tagungen finden in 2020 in San Diego und in 2021 in Düsseldorf statt.