

Tagungsbericht zu HPLC2019

Dr. Stavros Kromidas

Vom 16.-20. Juni 2019 fand in Università di Milano-Bicocca, Mailand, die HPLC2019, das „48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations und Related Techniques“, statt. Im nachfolgenden Bericht schildert Stavros Kromidas seine Eindrücke vom wichtigsten Symposium auf dem Gebiet der HPLC und verwandter Techniken.

Zahlen und ein paar allgemeine Eindrücke

Die Zahlen: Ca. 1.300 Teilnehmer, 50 Aussteller, knapp 300 Vorträge. Der Gesamteindruck war sehr positiv, dabei beziehe ich mich auf das Wissenschaftliche. Manches, aus meiner Sicht erfreulicherweise eher Unwichtige, war verbesserungsfähig.

Suboptimal:

- Uni ist eben kein professionelles Konferenzzentrum. So fand beispielsweise wegen fehlender Klimatisierung in vielen Räumen ein permanentes „Raum-Wechsel-Dich-Spiel“ statt
- Strom-Blackout kann überall passieren – in Italien ist es ein Erlebnis: Aus „just 2 minutes“ wurden 22 Minuten und wenn der Strom wieder kommt, dann wohl wellenformartig oder auch gar nicht: Zuerst kam der Strom nur bis zum Lichtschalter, erst später bis zum Mikrofon und bis zu der Laptop-Beamer-Verbindung schaffte er es nicht mehr. War dies vielleicht doch der handfeste Beweis, dass die Raum-Zeit-Krümmung südlich der Alpen schonmal auch im Alltag zu spüren ist? Wie auch immer: Die Retro-Lösung á la 1970-80er Jahre, „next slide please“, hatte auch was...
- Gelangweiltes, unflexibles Servicepersonal, z. B: Es ist befremdlich, wenn bei einer derartigen Hitze und einem vollen Programm kurz vor der geplanten Kaffeepause das Kaffeeausschenken verweigert wird und jemand mit der Miene eines angestregten Bankdirektors drei Mal, alle 5 min verkündet: „In 5 min gibt es Kaffee – jetzt nicht!“ Die Besucher haben irgendwann richtig reagiert (...) Das sind Momente wo man richtig verinnerlicht, wieso Anarchie in Italien eine große Tradition hat

Positiv:

- Eine App lieferte quasi in Real-Time aktuelle Infos (z. B. Wechsel eines Vortragsraums)
- Die Vorträge waren kurz, die meisten 15 min, man hat peinlichst auf Einhaltung der Redezeit geachtet
- Hervorragende Qualität der Vorträge

- Eine sehr gute Idee, folgende zwei neue Formate einzuführen, in denen junge WissenschaftlerInnen aus ihrer Forschung berichteten: „HPLC-Slam“: 2 min Vortrag, 3 min Video. HPLC-Tube: 7-Min (kreative) Präsentation: Als Stummfilm, als Rap-Video, als Multi-Media-Powerpoint-Präsentation usw.

Ich möchte den nicht-fachlichen Gesamteindruck mit drei Bemerkungen abschließen:

- Die räumlichen Gegebenheiten waren so, dass man sich immer wieder getroffen hat. Und das war positiv. Um Alexandra Knauer zu zitieren, war dann die Örtlichkeit letztendlich doch „sympathisch“.
- Die Dichte der Vorträge war enorm. Man fühlte sich wie ein Dauerläufer, wollte man nichts Wichtiges verpassen, nach einem Vortrag war kaum Zeit für Fragen. Es wäre wünschenswert, wenn in zwei Jahren bei der nächsten Tagung in Düsseldorf die Anzahl der Vorträge kleiner wäre – trotz verständlicher Zwänge, denen die zwei Chairmen abermals ausgesetzt sein werden...
- Ich muss leider wieder das Gleiche berichten, wie an dieser Stelle bereits vor Jahren: Von den 297 Vorträgen wurden nur 11 von jungen Wissenschaftlern von Unis und Forschungseinrichtungen aus Deutschland gehalten. Die restlichen – spärlichen – Beiträge aus Deutschland waren von Firmenvertretern und Professoren und/oder die Redner waren jenseits der 50.

Drei 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, siehe weiter unten, wird noch einige Zeit dauern, bis sie in Industrielabors auf breiter Basis zu sehen sein werden.
- *MS – die „Attraktive“...*
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 (**H**igh **R**esolution **MS**) und IMS (**I**on **M**obility **S**pectroscopy). 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, 2D-LC-IMS/QTOF, UHPGPC-MS, HILIC x RPLC-HRMS, IEC-UV x RPLC-MS

- *Biomoleküle*

Wenn man berücksichtigt, dass in 2017 sieben von den „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 „Biowelt“: 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 (Tosoh Bioscience). Auch die Core Shell-Technologie findet hier Einzug, z. B. Core Shell-Teilchen mit 1000 Å, siehe weiter unten.

Einige Hardware-Highlights

- 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 (www.vici.com)
- Portables HPLC-Gerät, speziell für den Outdoor-Einsatz z. B. in abgelegenen Gegenden Afrikas entwickelt: 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% (King's College London)
- 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 (www.activatedresearch.com).
- DiscoverIR-LC; FTIR-Detektor für die HPLC; da das Lösungsmittel nach der Säule entfernt wird, soll das Gerät für alle gängigen HPLC-Lösungsmittel und auch im Gradientenmodus geeignet sein, Empfindlichkeit: 1 μg 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 (www.spectra-analysis.com).
- 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
- **Vacuum-jacketed column** (VJC); das Prinzip: 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 aus 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.
Natürlich durfte STAMP (**S**eparation **T**echnology for **A** **M**illion **P**eaks) nicht fehlen. Meine Einschätzung: Hier sprechen wir nicht von nur drei oder fünf Jahren bis marktreife Produkte gekauft werden...
- *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 vom und bei Bedarf automatische Justierung des Flusses, ein Monat vor eines notwendig gewordenen Austausches entsprechende Meldung 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 je nachdem APCI *und* ESI (gute Empfindlichkeit und gute Linearität) oder IMS *und* QTOF. Wenn nur ESI, dann auf jeden Fall Messung bei ESI positiv *und* ESI negativ.

- *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, siehe weiter unten.

- *Bewegung im regulierten Bereich (Pharma)*

Vereinfacht stellt sich die Situation in der Pharma 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 bescheren Unflexibilität sowie einen vermeidbaren zeitlichen/personellen Aufwand. Das ist hinreichend bekannt, es gibt Bestrebungen für einen Wechsel der Denk- und Handlungsweise. Folgendes fand ich bei der Tagung interessant: Im Vergleich zu früher, gab es mehrere Vorträge von Vertreter 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 ich nicht nur eine andere C₁₈-Säule sondern 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 Lebenszyclus der Methode überwacht werden (Monitoring)
- Begriffe wie „Stabilität“, „Methodenfähigkeit“, „kontinuierliche Überwachung“, „**M**ethod **O**perable **D**esign **R**egion (MODR)“, „**C**ritical **M**ethod **P**arameter“ (CMP), „**C**ontinuous **M**ethod **V**erification (CMV)“ usw. sind Belege von folgenden Vorstellungen:
 - o Qualität in die Methode hinein stecken und nicht nachher prüfen
 - o Das Wissen um die Methode (Änderung-Auswirkung) erlaubt in der späteren Routine flexibles Handeln
 - o 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 (**C**ontinuous **P**erformance **V**erification, CPV) wird anschließend abgesichert, dass die Methode während des gesamten Lebenszyclus noch ISK (**I**n **S**tatistischer **K**ontrolle) ist. Methodenentwicklung, Validierung, Routineanwendung sollen nicht mehr als drei zeitlich hintereinander geschaltete, voneinander unabhängige Schritte verstanden werden.

Ich möchte mit der kurzen Vorstellung einiger Produkte, die mir ins Auge gefallen sind, abschließen. Teilweise handelt es sich um bereits existierende Produkte. Jene sind mir wohl entgangen, die Aufmerksamkeit auf solche wird ja bei einem derartigen Event erfreulicherweise verstärkt gelenkt. Ergo: Solche Tagungen sind sinnvoll.

- 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-(**C**hemical **V**apor **D**eposition) Beschichtung, inert für „alle“ Chemikalien, keine Physisorption von Proteinen, Temperatur- und pH-Wertstabil (silcotek.de)
- 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 (also Merck) stellte ein Core Shell-Material mit einer PGC-Schicht (**P**orous **G**raphite **C**arbon) 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.