

Trends in der HPLC

Ist-Situation und kommende Entwicklungen

Stavros Kromidas

Die Anforderungen an die HPLC-Analytik nehmen zu. Es handelt sich zunächst um Herausforderungen analytischer Natur, einige Stichworte dazu: Biotherapeutika, Lebensmittel, Substanz-Cocktails in biologischen Proben und Umweltproben. Damit zusammenhängend gehen strengere regulatorische und gesetzliche Anforderungen einher. Schließlich kommen wachsende wirtschaftliche Zwänge hinzu. Welche Instrumente, Techniken und Trennmedien sind heute die Antworten und vielleicht auch schon „morgen“?

Ist-Situation und mittelfristige Entwicklungen

1. *Hard- und Software*

Die HPLC-Anlage von heute ist häufig eine UHPLC-Anlage. Jene wird allerdings eher selten im UHPLC-Modus betrieben, damit ist gemeint: ca. 1.000-1.200 bar und/oder Retentionszeiten kleiner 2-3 min. Das ist auch selten notwendig, denn kaum mehr als 10 % der Anwender müssen mehr als 60-80 Peaks quantifizieren oder partout 3 statt 6 min „warten“. Und: Warum sollte man sich denn im Alltag unnötigerweise Nachteile einhandeln, so stärkerer Verschleiß, häufige Leckagen, mangelnde Robustheit? Die Vorteile wie höhere Peakkapazität, niedrigere Nachweisgrenze oder sehr schnelle Trennungen sind in praxi doch nicht immer von Relevanz; man zieht lieber eine robustere Analytik und dafür ein paar Minuten längere Analysenzeiten vor. Im Übrigen: Manuelle Probenvorbereitungsschritte, manuelles Re-Integrieren und notwendiges Daten-Handling – das sind eher Geschwindigkeits-bestimmende Schritte der Analysenkette, weniger die Trennzeit. Das bedeutet: Die UHPLC hat in der Methodenentwicklung, für schwierige Proben speziell im Spurenbereich sowie in der Hoch-Durchsatzanalytik zweifelsohne einen enormen Schub gebracht. Ansonsten wird an UHPLC-Geräten oft „klassische“ HPLC-Analytik bei bis ca. 600-700 bar betrieben – allerdings schneller und empfindlicher. Und für die schwierigen Fälle? Die Antwort könnte beispielsweise lauten: 100 °C oder je nachdem auch 15 °C, $\leq 2 \mu\text{m}$, 1.200 bar – und genau solche Trennungen ermöglicht ja eine UHPLC-Anlage, hier liegen ihre Stärken. Die porösen $\leq 2 \mu\text{m}$ -Teilchen können durch monolithisches Material oder Core Shell-Teilchen ersetzt werden, dadurch werden längere – oder in Serie gekoppelte – Säulen/Kapillaren einsetzbar. Das ist heute in etwa Stand der Technik für eindimensionale Trennungen, siehe Abbildung 1.

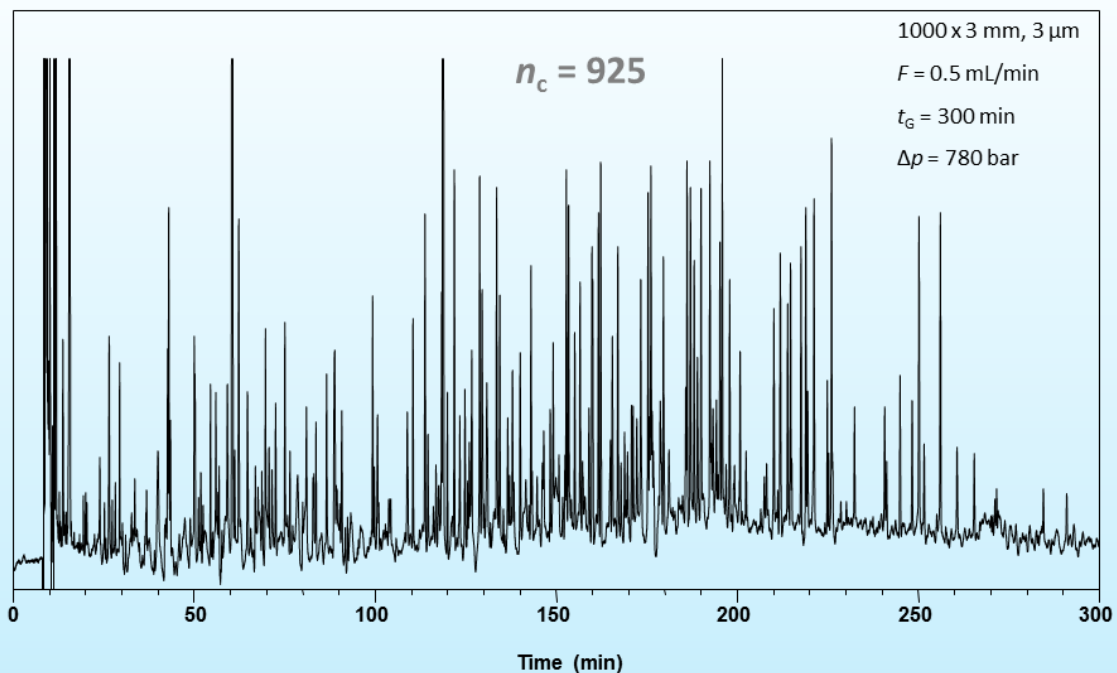


Abb. 1 Hochauflösende 1D-UHPLC Trennung eines tryptischen Verdaus von fünf Proteinen. Eine Kette von vier 250 mm langen Säulen wurde mit totvolumenfreien Kopplungsstücken basierend auf Viper-Verschraubungen (ThermoScientific) aufgebaut. Stationäre Phase: Acclaim 120 C18 (ThermoScientific), Temperatur: 30 °C. Theoretische Peakkapazität berechnet aus der Peakbreite einzelner gut aufgelöster Peaks.

Und für die noch schwierigeren Fälle? Gerätetechnisch wären 200 °C, $\leq 1 \mu\text{m}$ -Teilchen, 1 mm-Kapillare und bis zu ca. 5.000 bar notwendig und Trennungen unter diesen Bedingungen sind in Forschungsgruppen längst realisiert worden – allerdings: Solche bleiben für eine breite (!) Anwendung in absehbarer Zeit nicht Routine-tauglich. Dafür gibt es zahlreiche Gründe, nachfolgend seien einige genannt: $\leq 1 \mu\text{m}$ -Teilchen sind schwer reproduzierbar herzustellen, sie sind auch schwer gut zu packen, deren Löslichkeit ist nicht zu vernachlässigen, die Korngrößenverteilung ist breit. Ferner: Die bei den hohen Drücken erhöhte Kompressibilität der Flüssigkeiten erlaubt kaum einen konstanten Fluss in der Routine, die heutigen Geräte sind immer noch nicht gut genug um die theoretisch mögliche Effizienz der $\leq 1 \mu\text{m}$ -Teilchen auszunutzen. Durch die Reibungswärme ergäbe sich ein Temperaturgradient in der Säule von weit über 20 °C. Schließlich erweist sich Materialermüdung bereits ab ca. 1.200-1.300 bar im Dauerbetrieb als ein ernst zu nehmendes Problem. Man geht also einen anderen Weg: Die bessere Lösung lautet 2D-Chromatographie, in einigen

Jahren vielleicht sogar 3D-Chromatographie. Mehrdimensionale Chromatographie stellt einerseits einen selektiven „Detektor“ dar (beste Überprüfungsmöglichkeit der Peakhomogenität) und ist andererseits die schnellste Möglichkeit viele (ähnliche) Komponenten in einer komplexen Matrix/Probe zu trennen. Nach der 2. Dimension kann die Probe mithilfe von Schaltventilen zu unterschiedlichen Detektoren geführt werden. Infrage kommt sowohl optische Spektroskopie (DAD, FLD) und MS (HRMS, ESI, Orbitrap, IMS, Q-TOF, ICP-MS) als auch ELSD-, CAD- und NMR-Detektion. Bedeutung und Diversität derartiger Kopplungen dürften für schwierige Trennprobleme, wenn es also um hohe Peakkapazitäten *und* möglichst sichere Identifizierung geht, zunehmen. Weitere aktuelle Entwicklungen: Evolutionäre Verbesserung der Instrumente, im Fokus liegen hier: Miniaturisierung und Detektion um Effizienz- und Empfindlichkeitsverluste im Falle von 1 mm/≤ 2 µm-Säulen zu begrenzen, ferner automatisierte Probenvorbereitung. Zu einer permanenten Verbesserung gehören beispielsweise resistente und inerte Materialien, sowie Zubehörteile wie Mischkammer, Verbindungsstücke und Ventile, die mithilfe der 3D-Technik hergestellt werden. Zu erwähnen wären noch portable HPLC-Geräte, die im neuen Design und Funktionalitäten nach 30 Jahren einen neuen Anlauf für die vor-Ort Analytik nehmen. Einige Bemerkungen bezüglich Software und Datenhandling: Es wird versucht, die Software so flexibel zu gestalten, dass mit *einer* (Cloud-basierten) Software „sämtliche“ Gerätschaften – LC, LCMS, GC, SFE-SFC, GCMS, SFC, 2D etc. – bedienbar und steuerbar sind. Ferner wird die Funktionalität derart erweitert, dass sie den Anforderungen von 2D-Trennungen gerecht wird. Der real-time Vergleich von MS-Spektren, auch und gerade von Fragmenten, mit Spektrenbibliotheken steckt zwar noch in den Anfängen, wird dennoch immer wichtiger. In puncto Handling von Big Data/Meta-Daten läuft die Analytik anderen Branchen etwas hinterher, die Entwicklung ist eher langsam. Das weiter oben Angeführte bezieht sich im Wesentlichen auf die Forschung, d. h. auf Herausforderungen bezüglich Trennungsverbesserung. In der Routine stehen dagegen Robustheit, Einfachheit, Reproduzierbarkeit im Fokus. Die Antwort der Hersteller hier lautet: „UHPLC-light“, also Geräte, die robuster und einfacher sind als die ursprünglich an die forschenden HPLC-Anwender adressierten Forschungsgeräte. Dazu gehören auch einfache, anwenderfreundliche, robuste, kleine und günstige Massendetektoren als in Serie geschaltete Detektoren zum DAD. Das Ziel ist hier sicheres Erfassen von „bekannten“ und erwarteten Daten mit moderner Technologie, Vermeidung von Wiederholmessungen, geringstmögliche Ausfallzeiten. Da ist man sicherlich auf einem guten Weg.

2. Trenntechniken

Die Trennung und Identifizierung von polaren Substanzen in biologischen Proben und Umweltproben nimmt an Bedeutung zu. Dies beflügelt die Weiterentwicklung und Verbreitung von HILIC und SFC. Diese Techniken, häufig in Kopplung mit der UHPLC, eröffnen neue analytische Möglichkeiten. Gerade SFC erlebt z. Z. einen Hype. Der relativ geringe Druck auch bei kleinen Teilchen in längeren Säulen/Kapillaren und damit einhergehend eine hohe Effizienz/Peakkapazität und die

anschließend eher unproblematische Kopplung mit MS bescheren SFC eine zunehmende Aufmerksamkeit. Neben kleinen, polaren Molekülen stehen Biomoleküle aus verständlichem Grunde im Vordergrund. Das Angebot der HPLC-Anbieter: $\leq 2 \mu\text{m}$ poröse Teilchen mit – neben der klassischen C4 – zusätzlichen Funktionalitäten, Core Shell-Materialien mit 450-1.000 Å, organische Monolithen in Kapillaren, IEC x HPSEC-Kopplung. Die wachsende Bedeutung von Biomolekülen könnte der Kapillar-Elektrochromatographie (CEC) doch zu einem gewissen Durchbruch verhelfen. Die Vormachtstellung der RP-HPLC ist weiterhin unangefochten. Bezüglich der Chemie der Oberfläche erleben wir seit Jahren eine zunehmende Zahl an polaren Phasen wie Phenyl/Biphenyl und Pentafluorphenyl sowie insbesondere Mixed Mode-Phasen oder Phasen mit einer zusätzlichen Ladung, also „hydrophobic-hydrophilic balanced phases“.

Die nächsten 5-10 Jahre

Es liegt auf der Hand, dass eine Prognose schwierig ist. Man kann nur anhand des heutigen Wissenstands einige mögliche Entwicklungen skizzieren.

1. Säulen, Trennmedien

Möglicherweise werden eher kurze und umgekehrt eher lange Säulen an Bedeutung gewinnen, Säulen mittlerer Länge (125-200 mm) werden immer seltener verwendet: Trennungen von bis zu 15-20 Peaks sind mit $\leq 100 \text{ mm}$ zu bewerkstelligen, für komplexere Proben mit $\geq 60-70$ Peaks sind 250 mm-Säulen/Kapillaren bzw. Säulenkopplungen bzw. 2D-Techniken notwendig. Mixed-/Multi-Mode-Säulen mit orthogonalen Selektivitäten sowie Polymer-basierte Materialien könnten an Wichtigkeit gewinnen. Die seit 4-5 Jahren diskutierten und teilweise vorgestellten 3D-Säulen und Pillar Array Columns müssen zunächst ihre Praxistauglichkeit unter Beweis stellen, siehe Abbildung 2.

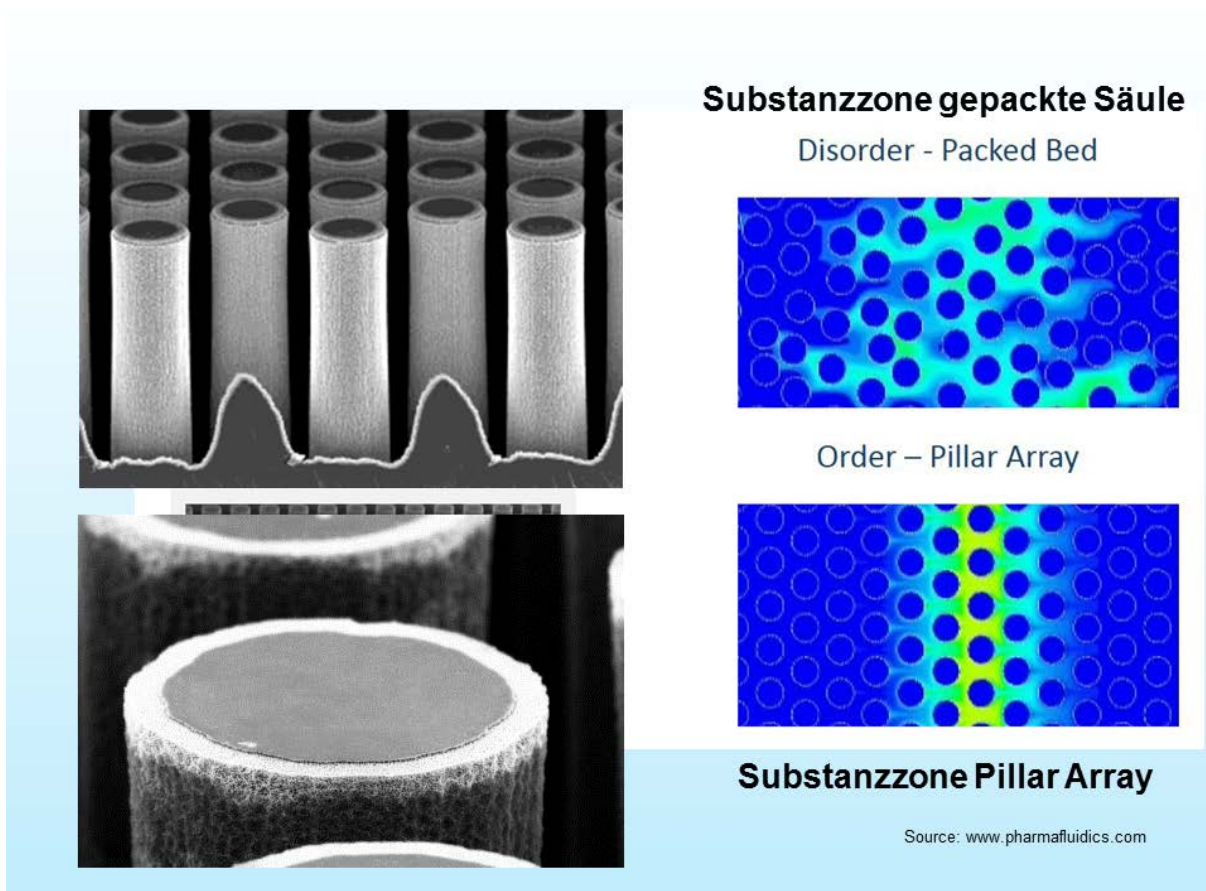


Abb. 2 Pillar Array Column (Fa. Pharmafluidics); durch die „ordentliche“ Anordnung von Pillars soll sich eine engere Substanzzone im Vergleich zu einer „Unordnung“ infolge von Teilchen in einer gepackten Säule ergeben

Monolithen bleiben definitiv ein Thema, restliche Entwicklungen wie Chip-Säulen, micro-/nano-LC und immobilisierte Discs dürften eher Nischen besetzen.

2. Hardware

Vorbemerkung: Es wird bei den Ausführungen weiter unten angenommen, dass das Prinzip der HPLC in etwa konstant bleibt: Der Eluent wird durch eine Pumpe befördert, die Information wird durch Trennung und spezifischer Detektion gewonnen. Sollten bestimmte Alternativen – die übrigens seit längerem in der Diskussion sind – doch Realität werden, ergäbe sich natürlich ein völlig anderes Bild, z. B: Anstelle mechanischer, elektronischer Fluss, als Trennmedium Array von Substanz-spezifischen Sensoren an diversen Oberflächen angebracht, universelle Acoustic Flame Detection (AFD).

Man registriert eine Differenzierung des Gerätedesigns, die evtl. noch an Fahrt gewinnen wird: Auf der einen Seite für die Routine einfache, robuste, teilweise spezialisierte Geräte bis hin zum spezifischen Analysator: Smartphone mit speziellen Aufsätzen zur Bestimmung von einfachen Parametern und Funktionsintegration auf hochspezialisiertem Silizium-Chip. Auf der anderen Seite

vollautomatische 2-/3D-Geräte mit eingebauter Intelligenz (siehe auch nächsten Abschnitt) und multiplen Detektoren zur automatischen Methodenentwicklung.

3. Smart-HPLC, Labor 4.0, Big/smart Data

Alexa und Siri, Internet der Dinge, intelligente Oberfläche und intelligenter Kühlschrank: Die omnipräsente und gepriesene totale Vernetzung und Kommunikation als Realität und Vision ist natürlich auch für das HPLC-Labor von morgen ein Thema. Nachfolgend werden Beispiele genannt, die technisch möglich wären. Es sind Ansätze, die in anderen Branchen bereits Realität sind bzw. als Prototypen gerade getestet werden. Was davon den Weg ins Labor findet, wird sich zeigen.

- *Uneingeschränkte Kommunikation zwischen Geräten bzw. Geräteteilen, Vernetzung mit dem WLAN.* Einige Anwendungen dazu:
 - Die Pumpe „merkt“, dass sie Luft enthält, öffnet das Purgeventil, erhöht den Fluss und nach Aufheben des Problems wird das Purgeventil wieder geschlossen und die Messung wiederholt. Natürlich erfolgt eine vollständige Dokumentation.
 - Der eingebaute pH-Wert-Sensor registriert eine Verschiebung des pH-Wertes und es erscheint eine Meldung mit exakter Diagnose: *„Die Verschiebung der Retentionszeit von Peak Nr. 5 liegt an einer Verschiebung des pH-Wertes, da die Retentionszeit der übrigen neutralen Komponenten konstant geblieben ist, ferner hat sich auch der Asymmetriefaktor von Peak Nr. 5 verändert und nicht zuletzt seine Peakfläche, da dessen UV-Absorption pH-Wert-abhängig ist...“*
 - Füllstandsensoren überwachen Vorrats- und Abfallgefäß und sie sind direkt mit dem Bestell- und Entsorgungsmanagement verbunden.
 - Die Säulen enthalten einen „smart column chip“ (SCC) mit Säulendaten, gespeicherten Methoden inkl. Spülprozedur; nach dem Einbau werden die Daten automatisch übernommen, die Sequenz kann starten. Schließlich teilt die Säule mit, wenn sie ausgetauscht werden soll.
- *Vorausschauende Wartung*
 - Die Anlage wird mit chemischen, physikalischen und elektronischen Sensoren bestückt. Je nach Einsatzgebiet des Gerätes bzw. besonderen Wünschen des Kunden können sie sehr spezifisch sein. Der Anwender/Hersteller hat somit 24/7 Infos zum aktuellen Zustand des entsprechenden Moduls. Anhand der gespeicherten Informationen kann frühzeitig und nicht erst nach Auftreten des Problems reagiert werden: Z. B. „merkt“ der Sensor, dass bald eine Deuteriumlampe benötigt wird oder dass der Saphirkolben sich schief bewegt. Er meldet sich beim Anwender/Hersteller und erstattet genau Bericht, der Serviceingenieur weiß, was an welchem Gerät in welchem Labor zu tun ist und was er mitzubringen hat.
- *Argumentative Maschinen*

- Diese Maschinen enthalten einen fachspezifischen allgemeinen Inhalt, z. B: Theorie der Chromatographie, Spezifika von Trennmethoden wie HILIC oder Ionenaustauschchromatographie, spezifische Optimierungsalgorithmen, ferner einen Part mit individuellem Inhalt, z. B. Kunden-/Matrix-/Substanzklassen-spezifische Infos. Der Inhalt wird mit Computerlinguistik und –semantik kombiniert. Ein Dialog zwischen Anwender und Maschine in gesprochener Form führt schließlich zu einem maßgeschneiderten Vorschlag inkl. alternativer Lösungsansätzen.
- *Intelligente Datenanalysen*
 - Die verfügbaren Daten werden besser als heute genutzt: Die Werte aus: Retentionszeiten, Quotient aus Fläche und Höhe, Quotient von UV- Intensitäten bei unterschiedlichen Wellenlängen, MS-Spektren nach unterschiedlicher Ionisierung etc. ergeben mehrdimensionale Bilder, die aufgrund der Datenfülle recht Substanz-spezifisch sein dürften.
 - Erzeugte Spektren werden zu Monitoring-Zwecken automatisch mit Tausenden von Spektren in Bibliotheken verglichen (z. B. Umweltanalytik, Lebensmittelüberwachung, Produktion).
 - Neben statistischen Berechnungen werden mit den Daten Trendanalysen geführt und mittels Principal Component Analysis (PCA) wird auf etwaige Zusammenhängen geprüft.
- *Automatischer Universalanalysator*
 - Die feste Probe wird im Automaten in drei parallelen Ansätzen mit drei Lösungsmitteln extrahiert, filtriert und aliquotiert. Es wird jeweils ein NMR-, ein UV- und ein MS-Spektrum aufgenommen. Anhand der Löslichkeit, die durch Konzentrationsmessungen ermittelt wird, und den Infos aus den Spektren wird die Probe zur Kapillar-GC, SFC oder UHPLC geführt. Der Analysator verfügt über Eluenten- und Säulenschaltventile, um mithilfe von QbD-basierter Optimierungssoftware automatisch die Methode zu entwickeln, 2-/3D-Trennungen sind ebenso möglich. Über Schaltventile werden nach der Trennung Aliquote zu unterschiedlichen Detektoren geführt. Parallel zu Datenanalyse erfolgt der Vergleich der aufgenommenen Spektren mit Bibliothekspektren, Ergebnis: „Ja/nein“ bzw. Erscheinen einer/mehrerer Zahl(en), auf Wunsch auch ein Kommentar und bei Bedarf eine „to do“-Empfehlung.

Schlussfolgerung

Zusammengefasst könnte man zur Zukunft der HPLC als mögliche Entwicklungen Folgendes schlussfolgern:

- Der Druck bleibt unter ca. 2.000 bar, die Teilchen werden nicht wesentlich kleiner, die Bodenzahl verliert als Attribut an Ausstrahlungskraft
- Die SFC gewinnt an Bedeutung

- Die mehrdimensionale Chromatographie gewinnt stark an Bedeutung
- Häufiger Wechsel zwischen den Trenntechniken, *den/die* HPLC-Anwender(in) wird es immer seltener geben
- Immer häufiger (mindestens) zwei Detektoren im Einsatz – auch in der Routine
- Die Geräte werden smart, intelligente Softwarelösungen werden Entscheidungen erleichtern

Dr. Stavros Kromidas
info@kromidas.de
www.kromidas.de