

Automatisierte Probenvorbereitung

Effizienzsteigerung im spurenanalytischen Labor

Wolfgang Brodacz

Die Probenvorbereitung ist mit Abstand der Manpower-intensivste Teil in der chemischen Analytik. Neben der „Übersetzung“ des konventionellen manuellen Workflows in automatisierte maschinelle Abläufe bergen innovative Techniken besonderes Potential zur Miniaturisierung und Effizienzsteigerung.

Die automatisierte Probenaufgabe mittels Autosamplern ist aus der heutigen Analytik nicht mehr wegzudenken. Für die Aufarbeitung bis zur injektionsfertigen Messlösung ist der Automatisierungsbedarf zwar gegeben, der Umsetzungsgrad aber noch steigerungsfähig. In diesem kurzen Überblick sollen neben bereits weit verbreiteten Clean-up-Methoden mit hohem Automatisierungsgrad (SPE) nur einige innovative Techniken für die organische Spurenanalytik exemplarisch herausgegriffen werden, die sich durch Miniaturisierung meist auch für kleine Probenmengen eignen.

Ein weiteres Kriterium soll die Eignung zur Online-Einbindung in chromatographische Techniken sein. Auf etablierte Standardverfahren wie Headspace, SPME, Thermodesorption, etc. kann aus Platzgründen hier leider nicht eingegangen werden.

Festphasenextraktion SPE

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) ist eine sehr weit verbreitete Clean-up-Technik, die vielfach nicht nur zur Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen genutzt wird, sondern auch Anreicherungen ermöglicht. Dies ist immer dann der Fall, wenn Analyten aus einem relativ großen Volumen mittels SPE zurückgehalten werden können und sich dann durch ein wesentlich kleineres Volumen eluieren lassen.

Bei den vielen notwendigen Teilschritten (siehe Bild 1) ist es nicht nur im Sinne einer höheren Kosteneffizienz zweckmäßig, diese von einem möglichst flexiblen Automatisierungssystem abarbeiten zu lassen. Ein gut automatisierter Prozess ist immer exakter und reproduzierbarer. Genau definierte Volumina durchspülen in exakt gleicher Zeit die Festphase, die Elution wird unter Druck und die Überführung des Eluenten z.B. mittels einer Einmal-Kanüle in ein geschlossenes Vial durchgeführt.

Besondere Herausforderungen für die SPE-Automatisierung stellen sich durch die Vielfalt unterschiedlicher SPE-Säulen (Typen und Formate) und insbesondere durch die große Bandbreite an erforderlichen Probenaufgabevolumen. Während bei forensischen Aufgabenstellungen oft nur wenige μl zur Verfügung stehen, verlangt die Umweltanalytik eine Anreicherung aus z.B. 50 ml Wasser. Zusätzlich sind manchmal auch Fraktionierungen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln gefragt.

Fast immer ist es notwendig, die Eluate zur Verbesserung der Sensitivität in einer

Verdampfungsstation zu konzentrieren und in Autosampler-Vials zu überführen. Entscheidende Kriterien dafür können sein, wie schonend dieser Prozess für labile Analyten gestaltet werden kann und wie gut Verschleppungen vermieden werden.

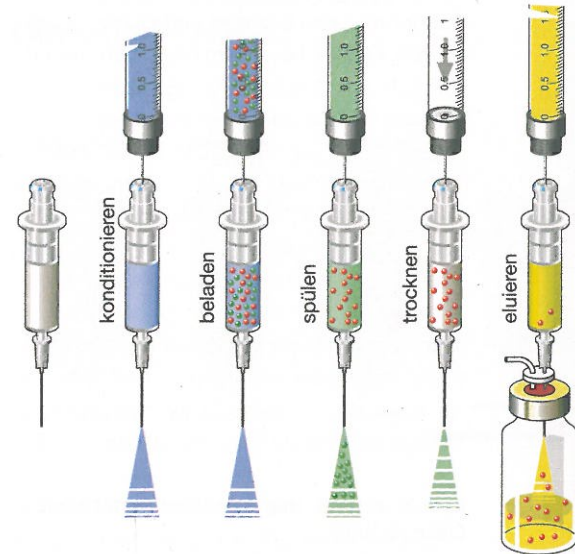


Bild 1: Teilschritte einer Festphasenextraktion (SPE).
© Fa. Gerstel

Der gesamte SPE-Prozess ist so zu gestalten, dass er verlustfrei, reproduzierbar und ohne Kontaminationen verläuft.

Selbst wenn ein Automat für einzelne Proben etwas länger brauchen sollte (was unwahrscheinlich ist), spart er dem Anwender trotzdem 100 % seiner Arbeitszeit und minimiert seinen Kontakt mit toxischen Lösungsmitteln. Außerdem lassen sich bei Probenreihen viele Arbeitsschritte einer automatisierten SPE überlappend konfigurieren (Verschachtelung) und mit weiteren Probenvorbereitungsschritten wie z.B. Zugabe von (internen) Standards oder einer Derivatisierung kombinieren.

Automatisierte SPE-Multifunktionsstationen stehen nicht nur als Stand-alone-Varianten im Labor zur Verfügung, sie können mit einer erweiterten Autosampler-Funktionalität auch direkt als Probenaufgabesystem für das Messsystem (z.B. GC-MS, LC-MS, etc.) fungieren. Insbesondere bei geringen Probenmengen ist (von einer manuellen Einwaage ausgehend) eine Analysen-Gesamtsystemlösung, welche alle klassischen Elemente einer komplexen Rückstandsanalytik umfasst, vollkommen automatisierbar. Extraktionen aus Feststoffen und Flüssigkeiten, alle Formen des Liquid Handling mit z.B. verschiedenen parallel eingesetzten Spritzengrößen, von

einfachen Aliquotierungen bis zu Flüssig-Flüssig-Extraktionen, Verdünnen und Zugabe von Standards, Rück- und Zwischenwiegungen, Zentrifugationen, verschiedenste Aufreinigungsverfahren (Clean ups) und deren Kombinationen, Trocknen von SPE-Kartuschen, Anreicherungen, Derivatisierungen, Aufkonzentrierung von Lösungen und Eluaten, Zugabe von Keeper-Lösungsmitteln, Lösungsmittel

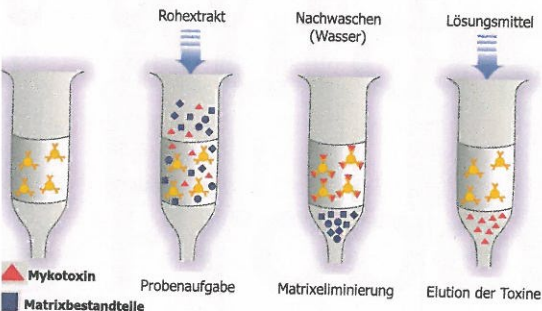


Bild 2: Prinzip des Immunaffinitätsäulen-Clean up (IAC).

telwechsel, etc. sind heute grundsätzlich in ein flexibles Multifunktions-System integrierbar (z.B. Gerstel „MultiPurposeSampler MPS“). Ein anwenderfreundliches System sollte die passende Programmierung dafür mit intuitiv bedienbarer Software vereinfachen und alle diese Funktionen vom PC aus steuern. Die Integration dieses Programms in die Steuerungssoftware des Chromatographen runden die Automatisierungsmöglichkeiten ab.

Auf der Hardware-Seite sollte die Kompatibilität mit handelsüblichen Standard-Kartuschen und diversen Hilfsmitteln die Übertragung eines manuellen Workflows bzw. die spätere Implementierung weiterer Automatisierungsschritte erleichtern. Bei einem optimal integrierten Gesamtsystem verläuft die SPE parallel zum GC- oder LC-Analysenlauf der vorherigen Probe und ist just-in-time zur Injektion bereitgestellt. Die optimale Systemauslastung wird im Idealfall zeitgleich durch eine grafische Darstellung von chromatographischer Analysendauer, Sequenzverlauf und Verschachtelung sichtbar (z.B. „Maestro Scheduler“).

Ein klassischer SPE-Workflow ist in Bild 1 schematisch dargestellt. Bei der (optionalen) Konditionierung werden die SPE-Kartuschen für die anschließende Beladung vorbereitet. Spül-Schritte dienen dann zur Entfernung von störenden Bestandteilen und zur Anpassung des Lösungsmittels an den Eluenten. Wenn diese Dosierungen mit konstantem Volumen

und konstantem Fluss erfolgen, ist eine gute Reproduzierbarkeit auch bei unterschiedlichen Packungsdichten gewährleistet. In einigen Fällen ist es günstig, die Kartusche vor der Elution zu trocknen. Bei der Elution werden die zurückgehaltenen Analyten letztlich mit einem bestimmten Lösungsmittel aus der SPE-Kartusche gespült. Da die Elution in ein geschlossenes Vial erfolgt, besteht kein Kontaminationsrisiko und anschließend kann das Eluat auch automatisiert eingedampft werden.

Immunoaffinitätsäulen-Clean up (IAC)

Um hohe Anreicherungen und sehr gute Reinigungseffizienz bei schwierigen Matrices zu erreichen, wurden für spezielle Anwendungen besonders ausgeklügelte Separationsmechanismen entwickelt, die auf bestimmte Teile der Molekülstruktur der Zielanalyten zugeschnitten sind. In Form der IACs (Immuno Affinity Columns) wurden z.B. für die wichtigsten Mykotoxine hochselektive Einweg-Reinigungssäulen entwickelt.

IACs bestehen aus einem organischen Trägermaterial, an dessen Oberfläche monoklonale Antikörper gebunden sind. Diese speziell produzierten Antikörper sind im wahrsten Sinne des Wortes der Schlüssel zum Reinigungserfolg, denn die selektive Bindung der Mykotoxine an die Säulenfü-

llung erfolgt bei der Probenaufgabe nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip (Bild 2). Dazu wird der wässrige Rohextrakt so verdünnt aufgetragen, dass der meist mit 10..20 % limitierte organische Lösungsmittelanteil nicht überschritten wird. Nach der Eliminierung der Matrix durch Nachwaschen mit Wasser bzw. Puffern werden die Antikörper gezielt mit einem reinen organischen Lösungsmittel denaturiert und dabei die Mykotoxine freigesetzt und eluiert.

Da bei der Probenaufgabe auch größere wässrige Volumina verwendet werden können, die Elution aber mit einem sehr kleinen Volumen möglich ist, kommt es zu einer starken Anreicherung der Toxine in der Messlösung. Dies und die meist hohe Reinheit der Eluate begünstigen die Nachweisempfindlichkeit solcher Methoden.

Eine Abwandlung der IAC-Automatisierung hat die Firma LC-Tech mit dem sogenannten ThermElute-Modul auf Basis des sogenannten FreeStyle-Systems (Bild 3) entwickelt. Das Ziel war eine umfassende Automatisierung der Mykotoxin-Analytik (Aflatoxine bzw. Ochratoxin A) von der Bearbeitung des Rohextrakts bis zum fertigen HPLC-Fluoreszenz-Chromatogramm ohne manuelle Arbeitsschritte dazwischen. Die IAC wird dabei nach dem Nachwaschen gezielt erhitzt und damit die Bindung zwischen Toxin und Antikörper aufgebrochen. Dann kann mit einem wässrigen

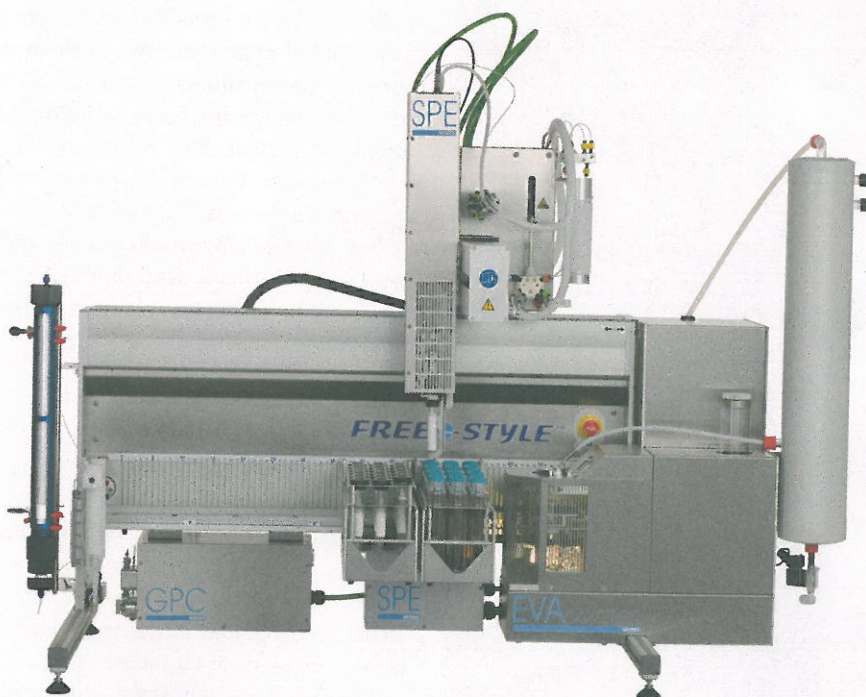


Bild 3: Automatisiertes Clean up für z.B. Mykotoxin-Analysen – wahlweise via SPE, IAC (Mitte) und für Öle auch mittels GPC (links). Rechts befindet sich die serielle Evaporation (EVA) zur automatischen Konzentrierung der Eluate.

© Fa. LC Tech

Medium direkt in eine HPLC-Probenschleife injiziert werden. Das hat im Gegensatz zur klassischen Elution mit einem organischen Lösungsmittel den Vorteil, dass beim anschließenden Transfer der Probe auf eine HPLC-Säule durch Aufkonzentrierung am Säulenkopf wesentlich höhere Aufgabevolumina möglich werden.

Disposable Pipette Extraction - DPX

Die DPX ist eine besondere Art der Festphasenextraktion, die von Dr. William E. Brewer an der University of South Carolina entwickelt und 2001 patentiert wurde (www.dpx-labs.com). In Zusammenarbeit mit DPX Labs konnte die Fa. Gerstel das Verfahren mit Hilfe des sogenannten MultiPurposeSamplers

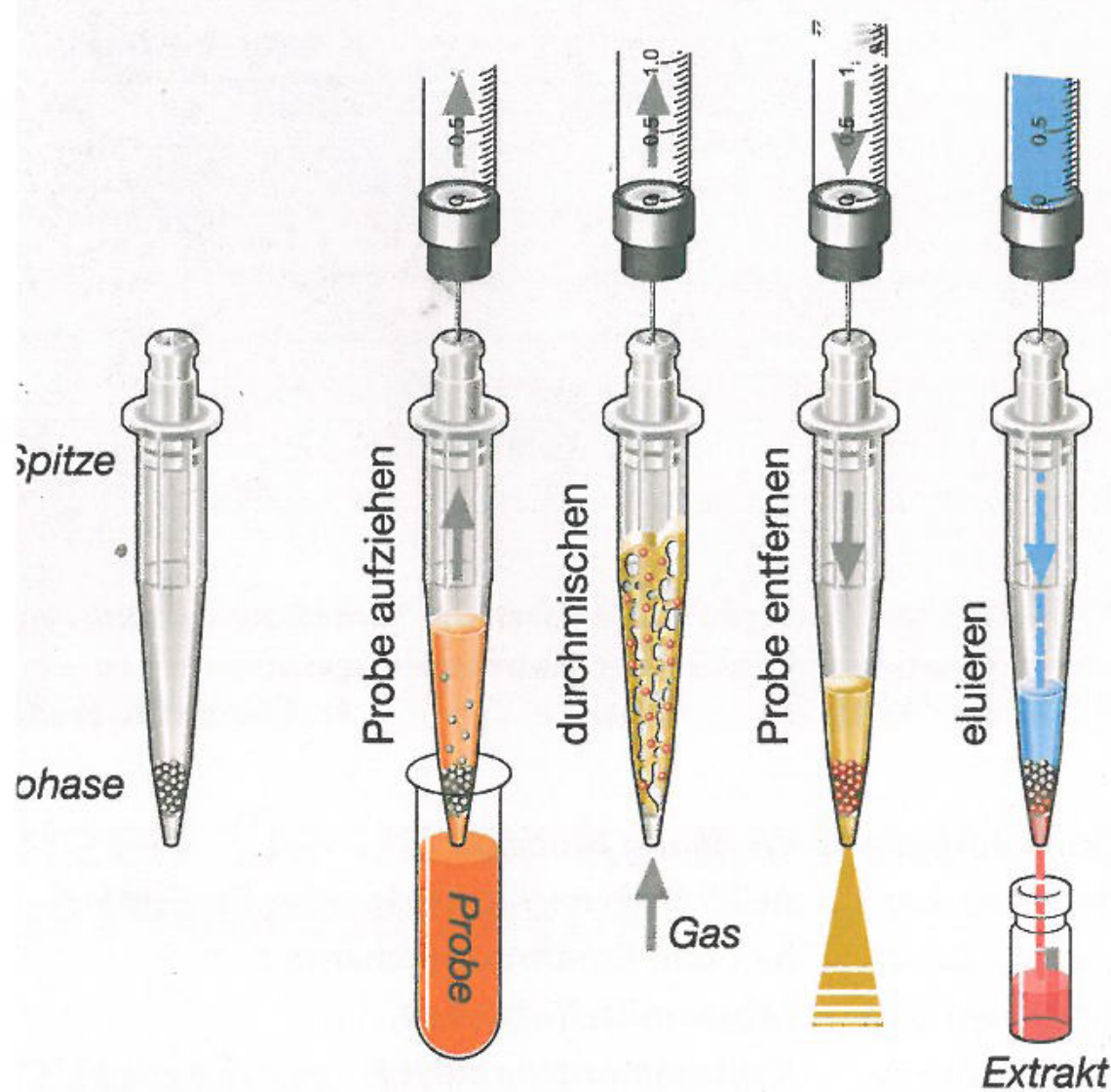


Bild 4: Workflow einer DPX-Probenreinigung.

automatisieren und somit auch in GC- oder LC-Systeme integrieren.

Während bei der klassischen SPE die Festphase in Form einer gepackten Säule vorliegt, ist das SPE-Material im Fall der DPX innerhalb einer Pipettenspitze frei beweglich. Dadurch wird der Stoffaustausch mit der flüssigen Probe wesentlich beschleunigt und das benötigte Probenvolumen ist deutlich geringer. Während SPE-Kartuschen verstopfen können, lassen sich per DPX selbst Proben mit einem großen Anteil an Feststoffen oder viskosen Proben (z.B. Vollblut) störungsfrei bearbeiten.

Im Vergleich zur klassischen SPE zeigt Bild 4 den vereinfachten Ablauf der Disposable Pipette Extraction (DPX). Die intensive

Durchmischung wird mittels durchgesaugter Luft bewerkstelligt.

Stir Bar Sorptive Extraction - SBSE

Die SBSE wurde am Research Institute for Chromatography (Kortrijk, Belgien) entwickelt und ist eine Gleichgewichtstechnik wie die SPME (Solid Phase Micro Extraction). Der große Vorteil liegt darin, dass die verwendete Phasenmenge vergleichsweise um mindestens den Faktor 100 größer ist und daraus laut Firma Gerstel die bis zu 1000-fache Empfindlichkeit gegenüber der SPME resultiert.

Als patentiertes Extraktionsmedium für die Stir Bar Sorptive Extraction SBSE ermöglicht der sogenannte „Twister“ von Gerstel den Ultraschallnachweis organischer Verbindungen aus wässrigen und auch aus gasförmigen Matrices. Er kann z.B. auch als Passiv-Sammler in der Umweltanalytik eingesetzt werden.

In wässrigen Medien extrahiert das sorbentummantelte Rührstäbchen für Magnetrührer die organischen Komponenten, während es die Probe durchmischt (Bild 5, links). Als Sorbens werden Polydimethylsiloxan (PDMS) bzw. PDMS/Ethylenglykol-(EG-) Copolymere verwendet, um unpolare Stoffe, aber auch polare Wasserstoffbrücken-Donatoren, (z.B. Phenole) anzureichern. Für die GC-Analytik erfolgt die anschließende Thermodesorption des Twisters mit

einer vollautomatisierten Thermodesorptionseinheit (z.B. „TDS-A“).

Twister Back Extraction

Um die Twister-Technologie auch für die LC-Analytik zugänglich zu machen, wurde von der UFZ Leipzig-Halle in enger Kooperation mit der Firma Gerstel ein Verfahren entwickelt, das sich Twister Back Extraction TBE nennt und als Erweiterung der Anwendungsbreite der SBSE verstanden werden darf.

Die angereicherten Stoffe lassen sich damit automatisiert mit einem geeigneten Lösungsmittel aus dem Twister extrahieren und in ein LC-System überführen (Bild 5).

Die Kombination der Twister-Technologie SBSE mit einer Elution und anschließender LC-MS(-MS) ist ein nachweisstarkes Verfahren zur Bestimmung auch von thermolabilen oder schwerflüchtigen Substanzen.

Membrane Assisted Solvent Extraction - MASE

Die automatisierte MASE stellt eine Variante der Flüssig-Flüssig-Extraktion dar, bei der eine semipermeable Membran als Phasengrenzfläche dient (Bild 6). Sie wurde von Gerstel in enger Kooperation mit der UFZ Leipzig-Halle entwickelt. Da die Membran störende Schwebstoffe und andere Matrixbestandteile zurückhält, lassen sich durch MASE ohne weitere Probenvorbereitung wie Filtrieren oder Zentrifugieren saubere Extrakte von stark Matrix-belasteten Proben gewinnen, die direkt in ein GC-MS oder LC-MS/MS injiziert werden können.

Ein großer Vorteil dabei ist, dass damit auch Extraktionen mit Proben/Lösungsmittelsystemen möglich sind, die bei einer klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion nur schwer zu einer Phasentrennung führen würden. Die Probe wird in einem 20-ml-Headspace-Vial vorgelegt und mit einem speziellen Membraneinsatz versehen. Von der Zugabe des Extraktionsmittels bis hin zur GC- oder LC-Injektion läuft die Membrane Assisted Solvent Extraction vollständig automatisiert ab. Besonders bei komplexen Proben, wie beispielsweise Wasser/Öl-Emulsionen (Milch), kann eine sichere Extraktion erreicht werden.

Turboflow-Technologie

Die Turboflow-Technologie (Thermo Scientific) nutzt gezielt die Unterschiede der Diffusionsraten von kleinen und großen Molekülen und verstärkt dieses Selektionskriterium

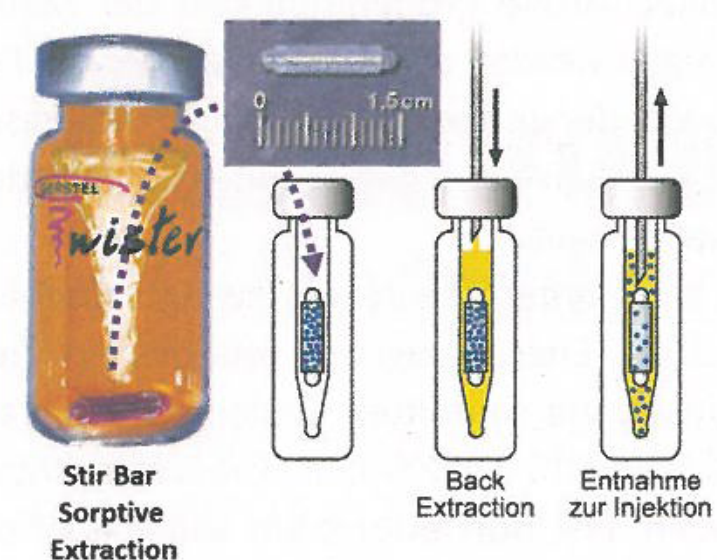


Bild 5: SBSE mit anschließender Twister Back Extraction. © Fa. Gerstel

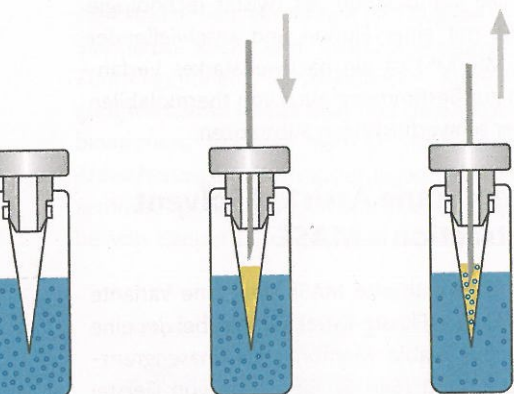


Bild 6: Membrane Assisted Solvent Extraction MASE.
© Fa. Gerstel

durch eine turbulente Strömung. Der Fluss der mobilen Phase durch die Turboflow-Säule ist mit 1...6 ml/min deutlich größer als er typischerweise bei HPLC-Säulen verwendet wird (z.B. 5-fach). Die Kombination der großen Zwischenräume zwischen den Partikeln (Partikellänge ca. 40...150 µm vs 2...5 µm bei der LC) mit der hohen linearen Flussgeschwindigkeit führt zu den erwünschten Turbulenzen ohne hohen Gegendruck.

Im Gegensatz zum HPLC-üblichen laminaren Flussprofil, das eine parabolische Form aufweist, dominieren hier starke Verwirbelungen (Pfropfenströmung). Dadurch wird ein gleichmäßigeres, flaches Geschwindigkeitsprofil über den Durchmesser der Kolonne unterstützt und radialer Stoffaustausch wird begünstigt.

Kleine Moleküle besitzen eine höhere Diffusionsrate als große und können so in die Partikelporen (ca. 60 Ångström) hineindiffundieren (Bild 7). Dort werden sie intensiver mit der stationären Phase interagieren und je nach Affinität mehr oder weniger an die Innenfläche der Partikelporen gebunden (Bild 8). Kleine Analytmoleküle mit geringerer Bindungsneigung können eher wieder aus den Poren herausdiffundieren und weitertransportiert werden, als solche mit starker Affinität. Große Probenmoleküle der Matrix hingegen werden ohne Umweg über die Poren von der schnellen mobilen Phase rasch durch die Säule geschleust und letztlich in den Waste gespült.

Ein Eluenten-Wechsel erzwingt abschließend die Freisetzung der retardierten Zielanalyten, um sie mittels Säulenschaltung auf eine klassische analytische LC-Säule zu transferieren. Erst dort erfolgt am Säulenkopf die Refokussierung und dann durch Gradientenelution die chromatographische Auftrennung der Zielanalyten.

Die Turboflow-Technologie kombiniert somit Diffusionseffekte, klassische Säulenchemie und Größenausschluss, um ein automatisiertes Online-Clean-up direkt vor der HPLC-Trennung und MS-Detektion durchzuführen.

Standardisierung notwendig

Wie wichtig das Thema Automatisierung für Hersteller von chromatographischen Systemen ist, zeigt zum Beispiel der Einstieg von Agilent Technologies in das Roboter-basierte Automated Liquid Handling („Bravo“), sowie in die Hochdurchsatz-Analytik mit SPE und MS („RapidFire“ mit 6...10 s/Probe). Derzeit dominieren aber immer noch Einzelsysteme von bestimmten Herstellern, die dann kaum miteinander verknüpft werden können.

Langsam nimmt jedoch eine Standardisierung Gestalt an, die Komponenten verschiedener Hersteller kombinierbar machen soll. Mit dem „SiLA“-Standard (Association Consortium Standardization in Lab Automation; www.sila-standard.org) wurde ein erster Schritt gesetzt, der ein gemeinsames Kommunikationsprotokoll und einen standardisierten Befehlssatz herstellerübergreifend etablieren wird. Durch die Vereinheitlichung von Schnittstellen und Datenformaten soll dem Anwender die Integration der neuesten Entwicklungen verschiedener Gerätehersteller in bestehende

Systeme ermöglicht bzw. erleichtert werden. Nebenbei wird sich auch seine Abhängigkeit von einzelnen Zulieferern reduzieren.

Auf der Herstellerseite bieten diese Schnittstellen die Möglichkeit zur Fokussierung und Spezialisierung auf Kernkompetenzen, ohne komplette Automationsysteme entwickeln zu müssen. Der SiLA Interface Standard definiert daher generische Instrumentenklassen (Schüttler, Liquid Handling, etc.) und dazugehörige, aufeinander abgestimmte Befehlssätze. Mit dieser Vorreiterrolle soll SiLA den Weg für eine beschleunigte Integration von Laborautomatonsystemen ebnen.

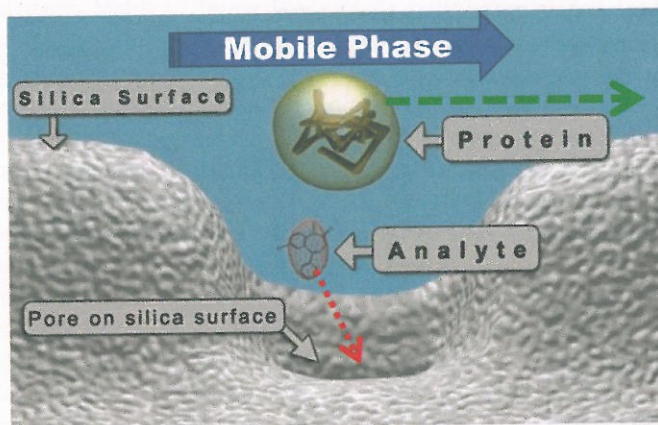


Bild 7: Zielanalyten dringen in die Poren des Turboflow-Partikels ein, während die großen Moleküle der Matrix weitergespült werden.

© Fa. Thermo Scientific

Wolfgang Brodacz
AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit,
Lebensmittelsicherheit,
Kontaminantenanalytik
4020 Linz
E-Mail: wolfgang.brodacz@ages.at

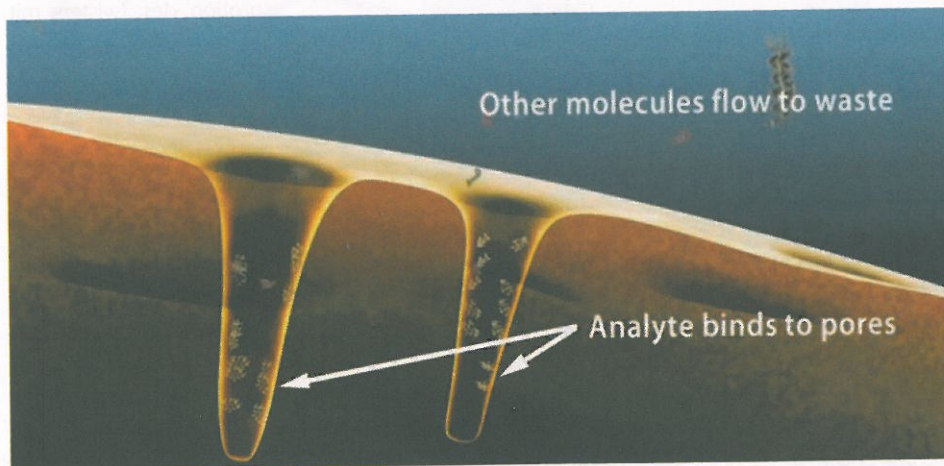


Bild 8: Retention kleiner Analytmoleküle durch Bindung in den Poren des Turboflow-Partikels.

© Fa. Thermo Scientific