Kontakt:
Tel. 06151-703273
ute.beyer@varianinc.com

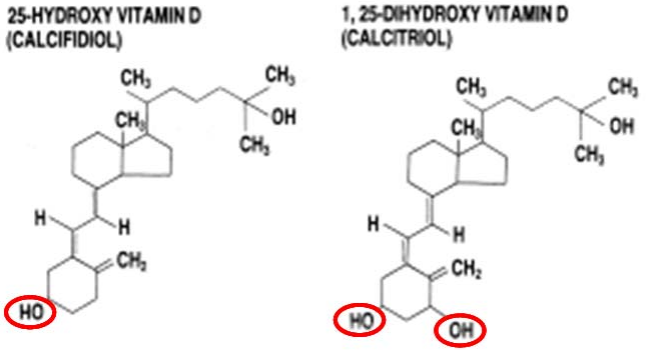
Polare SPE zur Fraktionierung

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 19. März 2010)

Die eigentliche **Stärke der polaren SPE** liegt in ihrer **Selektivität**. Aufgrund der starken Wechselwirkungen können relativ ähnliche Substanzen voneinander getrennt werden, was bei unpolarer SPE nie möglich wäre.

Ein **klassisches Beispiel** ist die Trennung bzw. die fraktionierte Elution von 25-Hydroxy-Vitamin D und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D mittels polarer SPE an einer Aminophase.

Diese beiden Substanzen sind biologisch aktive Metaboliten von Vitamin D3, weshalb deren Bestimmung von klinischer Bedeutung ist. Vitamin D3 beeinflusst wesentlich den Calciumspiegel im Körper.



- ✓ Die beiden Metaboliten unterscheiden sich nur an einer Stelle im Molekül und dort nur durch eine OH-Gruppe.
- ✓ Die Hydrophobizität der Moleküle unterscheidet sich kaum, mittels unpolarer SPE können beide Substanzen aus biologischer Matrix heraus an C18 oder Polymermaterial angereichert werden.
- ✓ Trennen kann sie aber nur die polare SPE, da dort sehr wohl unterschieden wird, wieviele polare Gruppen in einem Molekül vorhanden sind.
- ✓ 25-Hydroxy-Vitamin D lässt sich mit 4% Isopropanol in Hexan von einer Aminophase eluieren, während 1,25-Dihydroxy-Vitamin D noch auf dem Sorbens bleibt. Diese stärker polare Substanz (zwei OH-Gruppen im insgesamt unpolaren Molekül) benötigt einen höheren Gehalt an polarem Lösemittel und wird erst mit 25% Isopropanol in Hexan von der Aminophase eluiert.
- ✓ Voraussetzung für die Anwendung der polaren SPE ist das Vorliegen der Probe in unpolarem Lösemittel (z.B. Hexan, Dichlormethan etc.). Direkt aus der wässrigen Probe heraus (z.B. Serum) würde dies nicht funktionieren.
- ✓ D.h. zunächst ist ein Lösemittelwechsel notwendig, den man entweder über Flüssigextraktion machen kann (z.B. mit ChemElut) oder über eine unpolare SPE.

Hier die komplette Methode zur **Trennung und Isolierung von 25-Hydroxy-Vitamin D und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D in Serum**

in Anlehnung an:
P. Kao and D. Heser, CLIN. CHEM., 30/1, 56-61 (1984)

Siehe auch
Handbook of Sorbent Extraction Technology
(kann kostenlos von der Varian Webseite heruntergeladen werden)

Probenvorbehandlung:

- ✓ 3 mL Serum mit 4 mL 0,1 M HCl verdünnen, vortexen
- ✓ 8,5 mL MeOH hinzufügen, vortexen
- ✓ zentrifugieren und mit dem Überstand weiter arbeiten

SPE an Bond Elut C18 (500 mg / 3 mL):

- ✓ Konditionieren mit je 3 mL Methanol und Wasser
- ✓ vorbereitete Probe aufgeben
- ✓ Waschen mit 2 mL Wasser und anschließend mit 10 mL 70% Methanol in Wasser
- ✓ Kartusche trocknen
- ✓ Elution mit 10 mL Methanol (oder Hexan oder Dichlormethan, dann muss die Kartusche aber vor der Elution wirklich vollständig trocken sein. Das Elutionsvolumen kann dann reduziert werden, da die Elutionskraft stärker ist.)
- ✓ Bei Elution mit Methanol: Eluat eindampfen, Rückstand in 400 µL Dichlormethan oder Chloroform aufnehmen, vortexen
- ✓ Bei Elution mit Hexan oder Dichlormethan: einengen auf etwa 400 µL

SPE an Bond Elut NH_2 (500 mg / 3 mL):

- ✓ Konditionieren mit 3 mL Hexan
- ✓ Vorbereitete Probe aufgeben
- ✓ Waschen mit 4 mL 0,5% Isopropanol in Hexan
- ✓ Elution von 25-Hydroxy-Vitamin D mit 10 mL 4% Isopropanol in Hexan
- ✓ Anschließend Elution von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D mit 8 mL 25% Isopropanol in Hexan