

Unpolare SPE: Probenvorbehandlung für verschiedene Probentypen

Teil 2: Biologische Flüssigkeiten (Serum, Plasma, Blut, Urin)

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 2. Dezember 2008)

In der ersten Folge dieser Reihe wurde die Notwendigkeit der pH-Werteinstellung in Abhängigkeit vom Analyten besprochen. Zusätzlich werden häufig noch weitere Arten der Probenvorbehandlung empfohlen, und zwar in Abhängigkeit vom Probentyp, also der Matrix. Heute steht die **matrixabhängige Probenvorbehandlung von biologischen Flüssigkeiten (Serum, Plasma, Blut, Urin)** im Vordergrund, aus denen anschließend Analyten mittels SPE an C18 oder Polymermaterial angereichert bzw. aufgereinigt werden sollen. Die Charakteristika dieser Matrices (Quelle: Römpp Chemielexikon) sind für die Vorgehensweise entscheidend.

Urin

- Ausscheidungsprodukt der Nieren, wässrige Lösung zahlreicher organischer und anorganischer Stoffe
- pH-Wert 5.0 – 6.4
- Inhaltsstoffe:
 - hauptsächlich Harnstoff, Salze
 - geringe Mengen von u.a. Aminosäuren, Proteinen, Zucker, organischen Säuren, Vitaminen, flüchtige Verbindungen und Farbstoffe (sog. Urochrome)
- Problematik in der **SPE**:
 - unproblematisch für unpolare SPE, **Verdünnung genügt**, z.B. **1:1** mit Wasser oder Puffer*
 - Problematisch aber für Ionenaustausch bzw. Mixed-Mode SPE wegen des hohen Gehaltes an Salzen (zu hohe Ionenstärke)
 - Abhilfe: stärker verdünnen, evtl. anderen Mechanismus wählen
- Problematisch in der **LCMS**, wenn polare Analyten ohne Probenvorbereitung durch Verdünnung und direkte Injektion bestimmt werden sollen („dilute and shoot“)
 - Ionensuppression für früh eluierende Analyten durch die Salze, die u.U. mehrere Minuten lang am Beginn des Chromatogramms eluieren
 - Abhilfe: Entfernung der Salze durch „**Filtration**“ über **PL-Mixed MP** (Mischung von polymerbasierendem starkem Kationen- und Anionenaustauscher) (für nähere Informationen dazu bitte Email an ute.beyer@varianinc.com)
- **Besonderheit**: manche **Analyten** liegen im Urin nicht frei vor, sondern **metabolisiert** (z.B. in Form von Glucuroniden)
 - Erster Schritt der Probenvorbereitung: **Freisetzen der Analyten** durch **Hydrolyse**, z.B. mit β -Glucuronidase oder einem β -Glucuronidase-Arylsulfatase-Gemisch
 - Beispiel: Steroidhormone in Urin (Varian Applikation [M2708](#))

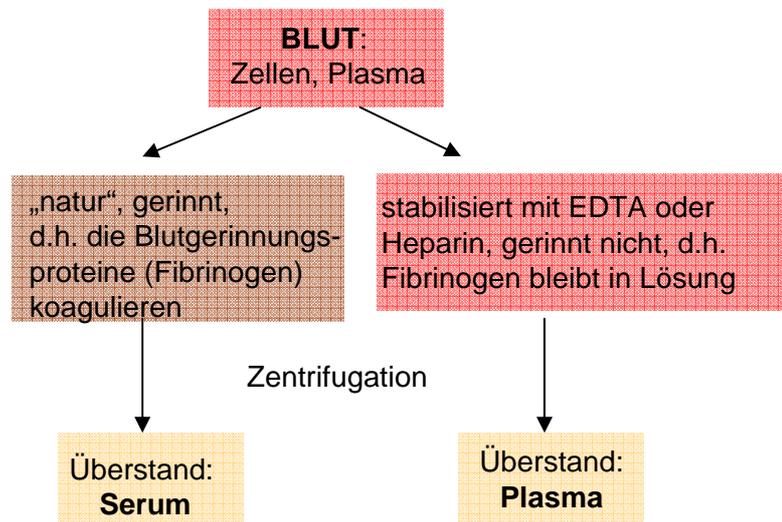
Blut

Undurchsichtige rote Körperflüssigkeit der Wirbeltiere
Zusammensetzung

- **Zellen** (45%)
 - hauptsächlich Erythrocyten (rote Blutkörperchen)
 - kleinere Mengen an Leukocyten (weiße Blutkörperchen) und Thrombocyten (Blutplättchen)
- **Plasma** (55%)
 - **Serum**
 - **Fibrinogen**

Vorbehandlung von Blutproben für die unpolare **SPE**

- Einfachster Fall: **Verdünnung** mit isotonischer Kochsalzlösung, mindestens 1:1
 - **Nachteil**: Die Kartusche kann durch die Zellen verstopft werden
 - **Abhilfe**:
 - aus dem Vollblut zunächst **Plasma oder Serum erzeugen** (s.u., Weiterverarbeitung siehe S.2)
 - oder für **besseren Durchfluss** sorgen:
 - kieselgelbasierendes SPE-Material mit größeren Partikeln wählen (z.B. Bond Elut C18 HF (= High Flow))
 - oder Polymermaterialien mit geringem Flußwiderstand nehmen (z.B. Bond Elut Plexa, Nexus)
- **Nachteil** der Verarbeitung als Plasma oder Serum
 - manche Analyten (z.B. Immunsuppressiva) bleiben an den Zellen (insbesondere den Erythrocyten) hängen und werden so beim Zentrifugieren aus der Lösung entfernt
 - **Abhilfe**: hämolysiertes EDTA-Blut einsetzen



* ggf. pH-Wert einstellen

Unpolare SPE: Probenvorbehandlung für verschiedene Probentypen

Teil 2: Biologische Flüssigkeiten (Serum, Plasma, Blut, Urin)

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 2. Dezember 2008)

Plasma

Klarer Überstand nach Zentrifugation von stabilisiertem, nicht geronnenem Blut (z.B. mit EDTA- oder Heparin-Zusatz)

Zusammensetzung: Wässrige Lösung von niedermolekularen Substanzen und Proteinen

- Plasmaproteine (7-8%) (hauptsächlich Glykoproteine)
 - Gemisch von über 100 Proteinen, u.a. Albumine, Transferrin, Globuline, Lipoproteine, Enzyme, **Blutgerinnungsproteine (Fibrinogen)**, Antikörper
- Lipide (Triglyceride, Cholesterin, Phospholipide), freie Fettsäuren
- Glucose (Blutzucker)
- stickstoffhaltige Stoffwechselprodukte wie Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure und freie Aminosäuren
- anorganische Salze (hauptsächlich NaCl, aber auch K-, Ca-, Mg-, HCO₃⁻ und Phosphationen)

zu beachten: Die Stabilisierung kann u.U. auch die Analyten beeinflussen, in dem Fall dann besser Serum verwenden

Problematik bei der unpolaren SPE

Die **stark polaren Bestandteile** sind kein Problem, sie laufen bei der Probenaufgabe überwiegend durch, nachwaschen mit Wasser genügt

Proteine und Lipide werden aber größtenteils mit angereichert

- Nachteile:
 - Die erhaltenen Extrakte sind nicht sauber genug, Störung der Chromatographie
 - Speziell bei der LCMS findet durch koeluiierende Proteine und Lipide Ionensuppression statt
- Abhilfe:
 - **Bond Elut Plexa** benutzen: durch die spezielle Porenstruktur und Oberfläche werden große und hydrophobe Proteine ausgeschlossen und laufen bei der Probenaufgabe durch, der am Ende erhaltene Extrakt ist reiner
 - **Elutionsbedingungen und Waschschr**itte optimieren
 - auch hier ist Bond Elut Plexa zu empfehlen, da aufgrund starker Wechselwirkungen effektive Waschschritte möglich sind
 - Je unpolarer das Elutionsmittel ist, desto mehr Lipide werden mit eluiert.

- z.B. Hexan oder Hexan/Ethylacetat-Mischungen eluieren die Lipide sehr gut, d.h. als Elutionsmittel liefern sie eine schlechte Extraktreinheit
- Sofern die Analyten nicht in ganz unpolarem Lösemittel(gemisch) löslich sind, könnte man einen Waschschritt mit Hexan oder Hexan/Ethylacetat 1:1 durchführen (anschließend trocknen, dann mit polarerem Lösemittel die Analyten eluieren.)
- Mit Methanol und Acetonitril als Elutionsmittel bleibt ein großer Teil der Lipide auf dem unpolaren SPE-Material zurück
- Nicht alle Analyten brauchen zur Elution unbedingt 100% Acetonitril oder Methanol. Ein Gemisch mit einem Anteil Wasser oder Puffer (pH-Wert wichtig!) kann je nach Polarität der Analyten auch zur Elution ausreichend sein, aber Matrixbestandteile, insbesondere Lipide und Proteine (zumindest teilweise) auf dem Sorbens lassen (siehe auch [Folge 5](#), Aufnahme eines Elutionsprofils).

Problematik Proteinbindung

Ein weiteres Problem ist die Bindung von Analyten an Proteine, wodurch sie sich anders verhalten als der freie Analyt und im schlimmsten Fall nicht mit erfaßt werden.

- Abhilfe: **Lösen der Proteinbindung**
 - Durch Zugabe von Säure (z.B. Phosphorsäure, TFA, Endkonzentration 2%, Ameisensäure und Essigsäure sind auch möglich, aber weniger effektiv)
 - Bei säurelabilen Analyten kann Ammoniak verwendet werden (Endkonzentration 2%)
 - Auch organisches Lösemittel (z.B. AcN) löst Bindungen an Proteine. Grundsätzlich sollte allerdings der AcN-Gehalt der Probe bei unpolare SPE maximal 5-10% betragen, um Durchbruch der Analyten zu vermeiden. Bei unpolaren Analyten kann der AcN-Gehalt auch höher sein. Man kann die tolerierbare Menge anhand einer Durchbruchkurve individuell für jeden Analyten bestimmen (siehe Elutionsprofil, [Folge 5](#)).

Unpolare SPE: Probenvorbehandlung für verschiedene Probentypen

Teil 2: Biologische Flüssigkeiten (Serum, Plasma, Blut, Urin)

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 2. Dezember 2008)

Serum

- Klarer Überstand nach Zentrifugation geronnenen, nicht stabilisierten Blutes
- Zusammensetzung:
 - wie Plasma, allerdings ohne die Blutgerinnungsproteine (Fibrinogen)
- dem ursprünglichen Blut am ähnlichsten, da ohne Zusatzstoffe
- Probenvorbehandlung analog Plasma

Proteinfällung

- Die Proteinfällung ist auch eine Option zur Entfernung von Proteinen.
- Am häufigsten wird durch Zugabe von AcN oder Methanol, z.B. im Verhältnis Probe:Fällungsmittel = 1:1 (oder mehr) gefällt, anschließend **zentrifugiert** oder **filtriert** (z.B. über [Varian Captiva](#)).
- Zur Weiterverarbeitung mit SPE muss das Eluat mit Wasser bzw. Puffer* verdünnt werden, um den Gehalt an organischem Lösemittel zu verringern (s.o.).
- Das Eluat bzw. Zentrifugat der Proteinfällung kann auch direkt zur Messung eingesetzt werden. Die erhaltenen Lösungen sind meist nicht so rein wie mit SPE, aber das Verfahren stellt insbesondere für die empfindliche LCMS eine gute Alternative dar.
 - Mit der neuen Filtrationsplatte [Varian Captiva ND^{Lipids}](#) lassen sich außer den Proteinen auch Phospholipide sehr effektiv entfernen
- Auch hier ggf. durch Ansäuern der ursprünglichen Lösung die Bindungen der Analyten an die Proteine oder Zellen lösen

Zusammenfassung Serum/Plasma

Probenvorbehandlung

- Verdünnen, mindestens 1:1 (u.a. zum Herabsetzen der Viskosität der Lösung für einen homogenen Durchfluss)
 - mit Wasser oder besser
 - mit Puffer zur pH-Werteinstellung (um maximale Wechselwirkungen zwischen Analyt und Sorbens zu gewährleisten, siehe [Folge 1](#))
 - ggf. mit Säure (oder Base oder AcN) zur Auflösung von Proteinbindungen

Beispielapplikation:

- Extraktion von sauren Arzneistoffen aus Plasma mit Bond Elut Plexa (10 mg 96 well plate, Artikelnummer A4969010 ([Varian Applikation SI-0602](#)))

