

Unpolare SPE: Probenaufgabe und Waschen

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 10. Februar 2009)

Wir bleiben auch in dieser Folge bei der Durchführung der unpolaren SPE an C18- oder Polymer-Material und schauen uns an, was es bei den weiteren Schritten der Handhabung zu beachten gibt.

Nach der Konditionierung des unpolaren SPE-Materials, die wir in [Folge 4](#) besprochen hatten, schließt sich zunächst die Probenaufgabe an.

Was ist bei der Probenaufgabe zu beachten?

Wichtig ist zunächst, dass das SPE-Material nach der Konditionierung **nicht trocken** gelaufen ist. (Falls doch, muss neu konditioniert werden.)

Bei der anschließenden Probenaufgabe gilt: **je langsamer, desto besser**.

Aber es muss ja auch **praktikabel** sein. Als **Faustregel** kann man zusammenfassen:

- kleine Volumina (wenige mL) mit etwa **0.5 - 2 mL/min** aufgeben,
- große Volumina (mehrere 100 mL bis 1 L) mit etwa **10 - 15 mL/min** aufgeben.

Die richtige Durchflussgeschwindigkeit hängt natürlich auch vom **Analyten** und seiner Affinität zur Phase ab.

- Starke bzw. schnelle Wechselwirkungen erlauben einen schnelleren Durchfluss,
- schwache bzw. langsame Wechselwirkungen erfordern eine langsamere Flussrate.

Im Anschluss an die Probenaufgabe erfolgt der Waschschriff.

Was ist beim Waschen zu beachten?

Ziel des Waschens ist die **Entfernung von Matrixbestandteilen**.

Waschen mit Wasser (bzw. Puffer, wenn eine pH-Einstellung notwendig war) ist der einfachste Fall und sorgt dafür, dass nichts von der Probenmatrix mehr auf bzw. in dem SPE-Material sitzt, was nicht adsorbiert ist. Diese Reste müssen entfernt werden, weil sie beim Eluieren mitgerissen würden.

Zu **Beginn der Methodenentwicklung** sollte man es auch beim Waschen mit Wasser / Puffer belassen, um nicht zuviele Unbekannte ins Spiel zu bringen. Wenn klar ist, dass der Mechanismus für den Analyten funktioniert und eine ausreichend hohe Wiederfindungsrate erzielt wurde, kann man sich um die Optimierung der Extraktreinheit kümmern.

Wie kann man die Extraktreinheit verbessern?

Durch **Waschen mit einem Anteil an organischem Lösemittel** (z.B. Methanol) können auch Matrixbestandteile entfernt werden, die durch hydrophobe Wechselwirkungen ans Sorbens gebunden sind.

Ob das funktioniert, **hängt** in erster Linie **vom Analyten ab**. Man muss natürlich sicher stellen, dass das Waschlösemittel nur die Matrixbestandteile, nicht aber den Analyten vom SPE-Sorbens wäscht.

Bei zu polaren Analyten kann schon mit wenigen Prozent Methanol eine Teilelution stattfinden, bei unpolaren Substanzen ist dies relativ unkritisch, wie wir später in einem Beispiel noch sehen werden.

Wie kann man zur Optimierung des Waschschriffes vorgehen?

Man kann „auf Verdacht“ **5 - 10 % organischen Modifier** einsetzen, wie z.B. in der Standardmethode für Bond Elut Plexa (Volumina für 10 mg Sorbens):

- Probenvorbehandlung:
 - Saure Wirkstoffe: 100 µL Plasma/Serum verdünnen mit 300 µL 1% Ameisensäure
 - Basische Wirkstoffe: 100 µL Plasma/Serum verdünnen mit 300 µL 2% Ammoniak
- Konditionierung:
 - 500 µL Methanol, 500 µL Wasser
- Probenaufgabe:
 - vorbereitete Probe langsam durchlaufen lassen
- Waschen:
 - 500 µL 5% Methanol in Wasser
- Elution:
 - 500 µL Methanol

Sollte die Extraktreinheit danach noch nicht ausreichend sein, kann man durch Aufnahme eines **Elutionsprofils** die **optimale Zusammensetzung der Waschlösung** ermitteln.

Je nachdem wie detailliert das Elutionsprofil werden soll, kann es aufwändig werden. Hier muss der Anwender selbst entscheiden, wieviel Aufwand ein reinerer Extrakt wert ist. Es kann sich aber durchaus lohnen!

Unpolare SPE: Probenaufgabe und Waschen

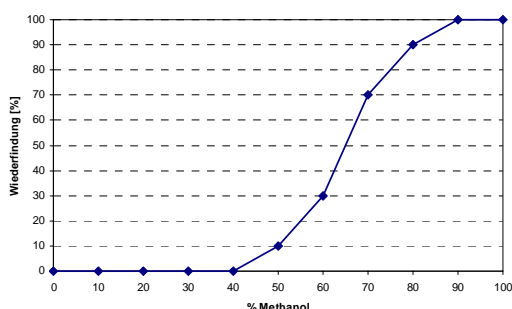
(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 10. Februar 2009)

Wie erstellt man nun ein Elutionsprofil?

Man bearbeitet parallel z.B. 11 Kartuschen (oder Wells) mit der zuvor entwickelten Methode und nimmt beim Waschschrift für jede Kartusche eine andere Mischung aus Wasser oder Puffer mit ansteigendem Anteil an organischem Lösemittel, z.B. 0 / 10 / 20 / 30 / 40 / 50 / 60 / 70 / 80 / 90 / 100% Methanol.

Verträgt die nachfolgende Messmethode einen wässrigen Anteil im Eluat (z.B. RP-HPLC), kann man direkt den Durchlauf des Waschschriftes analysieren und sieht sofort, ab welcher Menge an organischem Lösemittel der Analyt vom Sorbens gewaschen wird.

Das Ergebnis könnte dann folgendermaßen aussehen:

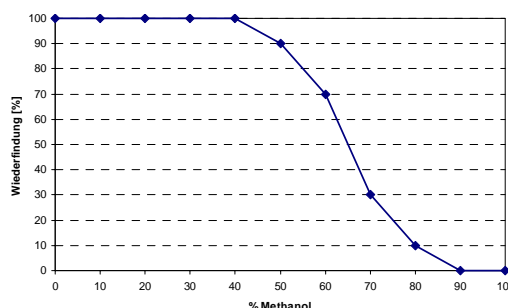


In diesem fiktiven Beispiel könnte man problemlos mit Methanol/Wasser 30/70 waschen, ohne Einbußen in der Wiederfindung des Analyten befürchten zu müssen. Erst ab 40% Methanol beginnt der Analyt zu eluieren.

Muss der Extrakt für die nachfolgende Analyse wasserfrei sein (z.B. für eine Derivatisierung), muss man die Methode komplett durchführen, d.h. nach dem Waschen muss getrocknet und eluiert werden (mehr dazu in der nächsten Folge).

Wichtig dabei: die Elution muss schon so weit optimiert sein, dass akzeptable und vor allem reproduzierbare Wiederfindungsraten erhalten werden.

Hier sieht man anhand der Wiederfindungsrate im Extrakt, bis zu welchem Gehalt an organischem Lösemittel man waschen kann, ohne signifikante Mengen an Analyt zu verlieren. Die Kurve sieht entsprechend umgekehrt aus im Vergleich zur direkten Analyse der Waschlösungen:



Auch hier sieht man, dass ab 40% Methanol im Waschlösemittel mit Verlusten an Analyt zu rechnen ist, d.h. man kann mit etwa 30% Methanol waschen.

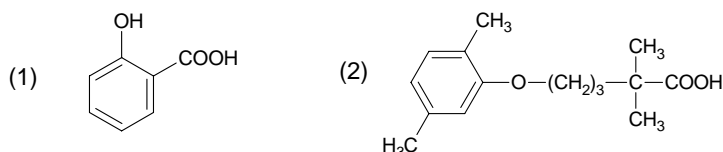
Unpolare SPE: Probenaufgabe und Waschen

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 10. Februar 2009)

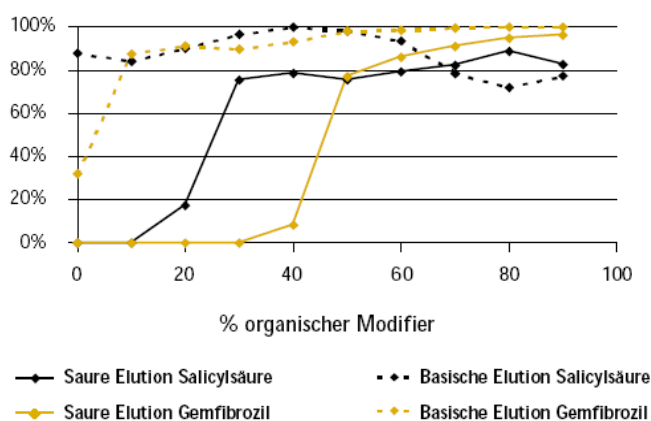
Außer dem Gehalt an organischem Lösemittel kann man auch den **pH-Wert des wässrigen Anteils variieren**. Je nach Ladungszustand der Verunreinigungen und des Analyten, kann ein saurer oder basischer Waschschrift günstiger sein als ein neutraler.

Folgendes **Beispiel** zeigt dies recht anschaulich:

Zwei saure Analyten werden bei saurer Probenaufgabe an einem Polymermaterial gebunden. Salicylsäure (1) ist ziemlich polar, Gemfibrozil (2) deutlich unpolarer.



Die **Abbildung** zeigt die Wiederfindungsraten der Substanzen im **Durchlauf des Waschschriftes** mit unterschiedlichem Gehalt an organischem Modifier (Methanol/AcN 2/1) mit saurem bzw. basischem wässrigen Anteil (mit 2% Ameisensäure bzw. 2% Ammoniak).



Die durchgezogenen Linien zeigen den **sauren Waschschrift**.

Salicylsäure (schwarze Linie) beginnt bei > 10% Organik schon zu eluieren, d.h. hier kann man nicht mit mehr als 5-10% waschen, ohne Analyt zu verlieren.

Das unpolare Gemfibrozil (gelbe Linie) ist stärker gebunden und „verträgt“ bis zu 30% organisches Lösemittel, bevor es zu eluieren beginnt.

Wäscht man dagegen mit **basischem** Lösemittelgemisch (gestrichelte Linien), eluieren beide Substanzen schon mit rein wässriger Waschlösung, die polare Salicylsäure sofort zu ca. 90%, Gemfibrozil zu etwa 30%.

Warum? Durch die basische Waschlösung wurden die sauren Substanzen deprotoniert, also in den ionischen Zustand überführt und damit viel polarer, wodurch die Wechselwirkungen mit dem unpolaren Sorbens verringert wurden. (Hier sieht man wieder, wie wichtig der richtige pH-Wert für die Retention der Analyten ist!)

Basisches Waschen ist somit für diese Substanzen nicht geeignet. (Basische Elution dagegen sehr wohl, mehr dazu in der nächsten Folge.)

Schließlich kann man bei der Aufnahme des Elutionsprofils außer dem pH-Wert der Waschlösung auch den **pH der Probenaufgabe** noch einmal variieren. Bei Substanzen, die bei mehreren pH-Werten ausreichend gut am unpolaren Sorbens retardiert werden, kann sich das lohnen. Denn die Retention der Matrixbestandteile kann ja auch pH-abhängig sein.

Aufnahme des Elutionsprofils mit Standard oder aufgestockter Matrix?

Ob man den Versuch mit einer Standardlösung oder aufgestockter Matrix durchführen soll, daran scheiden sich die Geister.

Zunächst mit Standardlösungen zu arbeiten ist auf jeden Fall unproblematischer, insbesondere wenn man den Durchlauf des Waschschriftes direkt analysiert. Man kann damit auf jeden Fall grob das Verhalten des Analyten bei den verschiedenen pH-Werten und Lösemittelanteilen abschätzen. Und darauf kommt es ja zunächst an.

In Anwesenheit der Probenmatrix kann sich das Elutionsverhalten des Analyten u.U. stark verändern. D.h. man muss das **Ergebnis** der Waschversuche natürlich **mit aufgestockter Matrix überprüfen** und die **Robustheit absichern**. Aber dazu braucht man meist nicht das ganze Elutionsprofil neu aufzunehmen.