

are different fluorescent stains available for different nucleic acid species. The detection of protein involves the reaction of a nonfluorescent compound with lysine to form a fluorescent moiety. For more information concerning these applications and others involving the use of microplates, please visit the Bio-Tek Instruments Web site at www.biotek.com.

Received: January 9, 2001

- [1] E.L. McGown, J.W. Nelson, J. Williams, C. Fraser, *American Laboratory* **1997**, 29 (10), 21–24.
- [2] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, 'Molecular Cloning A Laboratory Manual', Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, **1982**.
- [3] K. Burton, *Biochem. J.* **1965**, 62, 315–322.
- [4] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265–275
- [5] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- [6] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, D.C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, 150, 76–85.
- [7] C. Labarca, K. Paigen, *Anal. Biochem.* **1980**, 102, 344–352.
- [8] S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele, *Science* **1972**, 178, 871–872.
- [9] J.R. Benson, P.E. Hare, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 619–622.
- [10] W.W. You, R.P. Haugland, D.K. Ryan, R.P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1997**, 244, 277–282.

Chimia 55 (2001) 42–45
© Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft
ISSN 0009–4293

Bioanalytische Festphasenextraktion: Ein Klassiker in einem neuen, massgeschneiderten Gewand

Karl-Siegfried Boos^{*} and Claudia T. Fleischer

Bioanalytical solid-phase extraction: A classic in a new, tailor-made garment

Abstract: In bioanalytical HPLC, optimization of sample pretreatment should be directed towards improved selectivity, high sample through-put and total automation with simultaneous cost-reduction and improvement of the analytical quality. These requirements can be accomplished by integrating the extractive sample clean-up process (Solid-Phase Extraction; SPE) into the HPLC-system. For this purpose, tailor-made adsorbents (Restricted Access Materials, RAM; Molecular Imprinted Polymers, MIP) are used as precolumn packings.

Keywords: Molecular Imprinted Polymers (MIP) · Restricted Access Materials (RAM) · Solid-Phase Extraction (SPE)

Trotz ausgereifter Instrumentierung, intelligenter Software und hoher Selektivität sowie Effizienz der analytischen Trennsäulen erfüllt die HPLC-Analytik von niedermolekularen Komponenten in komplexen biologischen Matrices bislang nur in eingeschränkter Masse die Anforderungen, die an ein routineteugliches Hochleistungsanalysenverfahren gestellt werden.

Biologische Proben – insbesondere proteinhaltige, wie z.B. Plasma, Serum, Milch, Speichel, Fermenterbrühe, Zell- und Gewebshomogenatüberstand – müssen vor der analytischen Trennung überwiegend noch manuell oder teilautomatisiert durch Extraktion, Denaturierung, Dialyse, Ultrazentrifugation oder unspezifische Adsorption aufbereitet werden. Diese Vorgehensweise ist mit einem hohen Arbeits- und Kostenaufwand sowie mit komplexen und somit fehlerträchtigen Mehrschrittoperationen verbunden.

Ziele einer optimierten Probenaufbereitung sind daher gesteigerte Selektivität, hoher Probendurchsatz und vollständige Automation bei gleichzeitiger Kosteneinsparung und Verbesserung der

analytischen Qualität. Diese Anforderungen können – wie nachfolgend aufgeführt – durch die Kopplung oder Integration der Probenaufbereitung an bzw. in ein Trennsystem erfüllt werden. Beispielsweise kann die klassische Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) über spezielle Roboter (at-line Modus) oder SPE-Automaten (on-line Kartuschen-Modus) an ein HPLC-System gekoppelt werden (Abb. 1) [1].

Nachteile dieser Kopplungstechnik sind die komplexe Instrumentierung und die Verwendung von Einmalkartuschen. Darüber hinaus kann es bei der Aufbereitung von proteinhaltigen Proben zu einer unspezifischen Adsorption oder Denaturierung von Proteinen und somit zu

Korrespondenz: Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos
Institut für Klinische Chemie
Klinikum der Universität München
D-81366 München
Tel.: +49 89 7095 3209
Fax: +49 89 7095 8888
E-Mail: boos@klich.med.uni-muenchen.de

are different fluorescent stains available for different nucleic acid species. The detection of protein involves the reaction of a nonfluorescent compound with lysine to form a fluorescent moiety. For more information concerning these applications and others involving the use of microplates, please visit the Bio-Tek Instruments Web site at www.biotek.com.

Received: January 9, 2001

- [1] E.L. McGown, J.W. Nelson, J. Williams, C. Fraser, *American Laboratory* **1997**, 29 (10), 21–24.
- [2] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, 'Molecular Cloning A Laboratory Manual', Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, **1982**.
- [3] K. Burton, *Biochem. J.* **1965**, 62, 315–322.
- [4] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265–275
- [5] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- [6] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, 150, 76–85.
- [7] C. Labarca, K. Paigen, *Anal. Biochem.* **1980**, 102, 344–352.
- [8] S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele, *Science* **1972**, 178, 871–872.
- [9] J.R. Benson, P.E. Hare, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 619–622.
- [10] W.W. You, R.P. Haugland, D.K. Ryan, R.P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1997**, 244, 277–282.

Chimia 55 (2001) 42–45
© Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft
ISSN 0009–4293

Bioanalytische Festphasenextraktion: Ein Klassiker in einem neuen, massgeschneiderten Gewand

Karl-Siegfried Boos^{*} and Claudia T. Fleischer

Bioanalytical solid-phase extraction: A classic in a new, tailor-made garment

Abstract: In bioanalytical HPLC, optimization of sample pretreatment should be directed towards improved selectivity, high sample through-put and total automation with simultaneous cost-reduction and improvement of the analytical quality. These requirements can be accomplished by integrating the extractive sample clean-up process (Solid-Phase Extraction; SPE) into the HPLC-system. For this purpose, tailor-made adsorbents (Restricted Access Materials, RAM; Molecular Imprinted Polymers, MIP) are used as precolumn packings.

Keywords: Molecular Imprinted Polymers (MIP) · Restricted Access Materials (RAM) · Solid-Phase Extraction (SPE)

Trotz ausgereifter Instrumentierung, intelligenter Software und hoher Selektivität sowie Effizienz der analytischen Trennsäulen erfüllt die HPLC-Analytik von niedermolekularen Komponenten in komplexen biologischen Matrices bislang nur in eingeschränkter Masse die Anforderungen, die an ein routineteugliches Hochleistungsanalysenverfahren gestellt werden.

Biologische Proben – insbesondere proteinhaltige, wie z.B. Plasma, Serum, Milch, Speichel, Fermenterbrühe, Zell- und Gewebshomogenatüberstand – müssen vor der analytischen Trennung überwiegend noch manuell oder teilautomatisiert durch Extraktion, Denaturierung, Dialyse, Ultrazentrifugation oder unspezifische Adsorption aufbereitet werden. Diese Vorgehensweise ist mit einem hohen Arbeits- und Kostenaufwand sowie mit komplexen und somit fehlerträchtigen Mehrschrittoperationen verbunden.

Ziele einer optimierten Probenaufbereitung sind daher gesteigerte Selektivität, hoher Probendurchsatz und vollständige Automation bei gleichzeitiger Kosteneinsparung und Verbesserung der

analytischen Qualität. Diese Anforderungen können – wie nachfolgend aufgeführt – durch die Kopplung oder Integration der Probenaufbereitung an bzw. in ein Trennsystem erfüllt werden. Beispielsweise kann die klassische Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) über spezielle Roboter (at-line Modus) oder SPE-Automaten (on-line Kartuschen-Modus) an ein HPLC-System gekoppelt werden (Abb. 1) [1].

Nachteile dieser Kopplungstechnik sind die komplexe Instrumentierung und die Verwendung von Einmalkartuschen. Darüber hinaus kann es bei der Aufbereitung von proteinhaltigen Proben zu einer unspezifischen Adsorption oder Denaturierung von Proteinen und somit zu

Korrespondenz: Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos
Institut für Klinische Chemie
Klinikum der Universität München
D-81366 München
Tel.: +49 89 7095 3209
Fax: +49 89 7095 8888
E-Mail: boos@klich.med.uni-muenchen.de

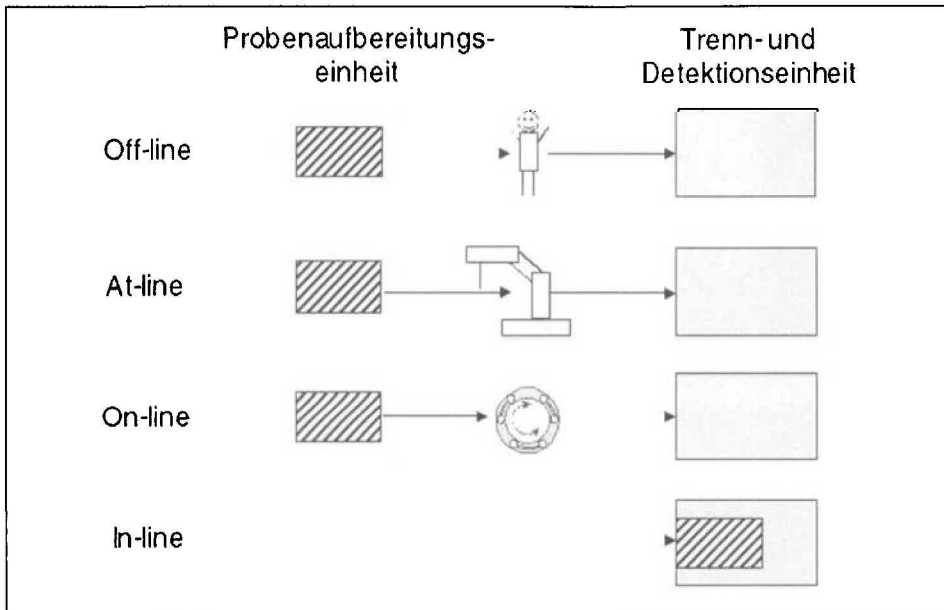


Abb. 1. Modi operandi für die Festphasenextraktion.

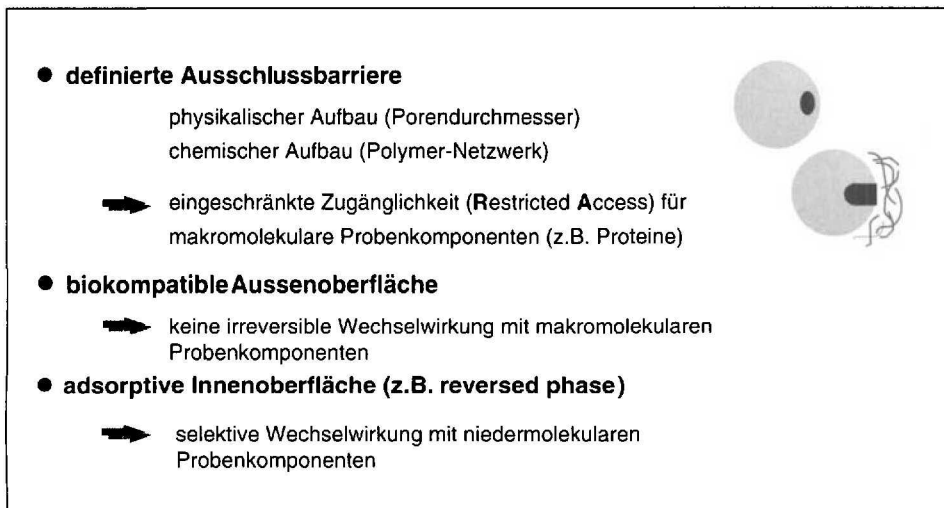


Abb. 2. Restricted Access Materialien, RAM.

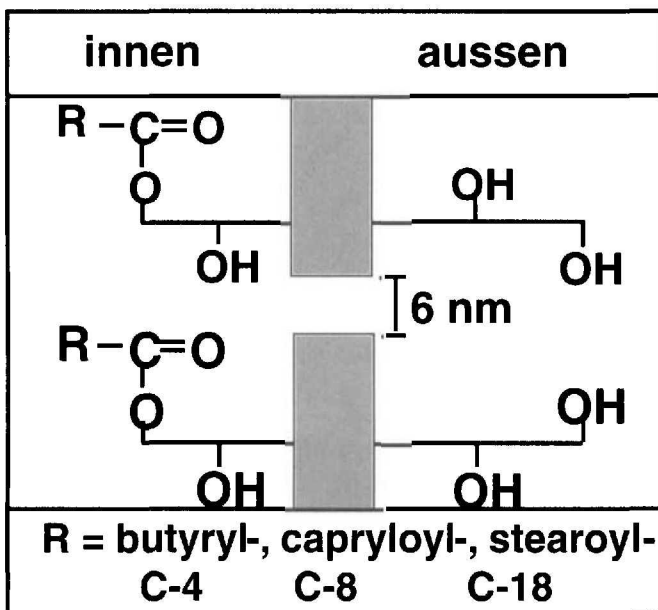


Abb. 3. LiChrospher® ADS: Topochemie.

einem unerwünschten Kapazitäts- und Selektivitätsverlust der konventionellen Adsorbentien kommen.

Restricted Access Materialien (RAM)

Die extractive Probenaufbereitung an einer Festphase kann aber auch auf apparativ einfache und preiswerte Weise mit Hilfe einer sog. Vorsäule (Dimension z.B. 25 x 4 mm I.D.) und eines konventionellen Sechsweg-Schaltventils in ein HPLC-System integriert werden (Säulenschaltung; LC-LC Kopplung). Die analytische Qualität und die Routine-tauglichkeit eines HPLC-Verfahrens mit integrierter Probenaufbereitung und dualer Säulenkopplung wird weitgehend durch die selektiven Extraktionseigenschaften des Packungsmaterial der Vorsäule und durch dessen Eliminationsverhalten gegenüber der komplexen Probenmatrix bestimmt. Es wurden daher spezielle Materialien entwickelt, die eine wiederholte Injektion (bis zu 2000 Analysenzyklen) und integrierte Festphasenextraktion unbehalteter, proteinhaltiger Flüssigkeiten ermöglichen [2]. Die Fraktionierung der Probe in Matrix und Analyt mit Hilfe dieser stationären Phasen beruht auf der simultanen Durchführung zweier chromatographischer Trennprinzipien, d.h. neben einer selektiven Adsorptionschromatographie niedermolekularer Analyte erfolgt eine sterische Ausschlusschromatographie makromolekularer Komponenten. Diese sog. 'Restricted Access' Materialien (RAM, Abb. 2) besitzen topographisch einheitliche oder differenzierte Oberflächenbelegungen (Verteilungsphasen). Letztere können selektiv mit Hilfe von Enzymen (Abb. 3) oder makromolekularen Reagenzien generiert werden.

Zusätzlich bewirkt eine physikalische Ausschlussbarriere (Porengrösse des Trägers < 6 nm) und/oder eine chemische Ausschlussbarriere (Polymernetzwerk), dass die (ausschliesslich) im Poreninneren vorhandenen Adsorptions-Zentren nur für niedermolekulare Analyten zugänglich sind. Makromolekulare Probenbestandteile, wie z.B. Proteine, Nucleinsäuren, Polysaccharide, werden an der idealerweise elektroneutralen und hydrophilen Aussenoberfläche (Kontaktfläche) des Trägers nicht retiniert und können daher im Totvolumen der Säule direkt in den Abfall eluiert werden. Nach diesem vorgeschalteten Fraktionierungsschritt kann die auf der Vorsäule retinierte und aufkonzentrierte Analytfraktion über das Schaltventil auf ein Trennsystem (z.B.

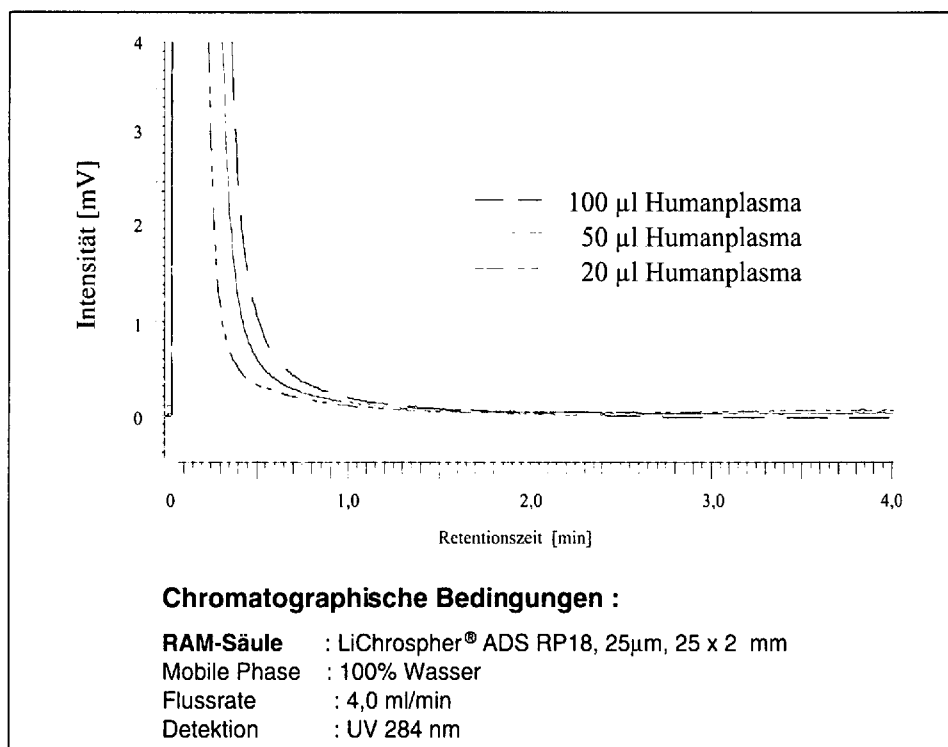


Abb. 4. On-line 'High-Speed' SPE: Elutionsprofile der Probenmatrix.

HPLC) transferiert oder direkt in ein Detektionssystem (z.B. MS/MS) eluiert werden.

Dieser vollständig automatisierte und instrumentell einfach integrierbare Fraktionierungsschritt einer komplexen Probenflüssigkeit an einer massgeschneiderten, porösen Festphase eignet sich insbesondere für moderne Hochdurchsatz/Trenn- und Detektionssysteme (z.B. LC-MS/MS). Mit Hilfe einer speziell konfigurierten RAM-Vorsäule können wir eine native Plasmaprobe in weniger als 60 Sekunden extrahieren bzw. fraktionieren (Abb. 4). Trotz dieser Probenaufbereitung im 'Eiltempo' wird jedoch die Qualität und die Anzahl der Extraktionszyklen nicht vermindert.

'Molekular geprägte' Polymere (Molecular Imprinted Polymers, MIP's)

MIP's sind massgeschneiderte (geprägte), poröse Packungsmaterialien auf Polymerbasis für die Analyt-spezifische Festphasenextraktion.

Der Extraktionsschritt beruht auf einer spezifischen Erkennung des Analyten auf molekularer Ebene und somit auf einer affinitätschromatographischen Anreicherung. Da die Selektivität und Affinität der MIP's mit der von Antikörpern vergleichbar ist, werden MIP's auch als 'künstliche'- oder 'Plastik'-Antikörper bezeichnet (Abb. 5). Eine aktuelle Übersicht über die Synthese und Anwendung von MIP's findet sich in [3].

Im Rahmen eines von der EU geförderten Projektes (Molecular Imprinting techniques for efficient methods in Chemical Analysis, FMRX-CT 98-0173) haben wir ein neuartiges Verfahren für die hochselektive, extraktive Aufbereitung komplexer Flüssigkeiten unter Verwendung von MIP's entwickelt [4]. Das vollständig automatisierbare (on-line) SPE-Verfahren setzt sich aus zwei Schritten zusammen und trägt die Bezeichnung Six-S ProcEdure (Size Selective Sample Separation and Solvent Switch, kurz Six-SPE). Im ersten Schritt wird die Probe mit Hilfe der oben beschriebenen RAM-Säule grössen-selektiv in makromolekulare Matrix (z.B. Proteine) und niedermolekularen Analyt fraktioniert. Im Anschluss daran erfolgt im Trennsystem ein Lösemittelwechsel (*Solvent Switch*) und nachfolgend die Desorption des Analyten von der RAM-Säule sowie die molekulare Erkennung des Analyten am MIP-Adsorbens. Der Transfer der Analytfraktion erfolgt mit einem aprotischen Lösemittel,

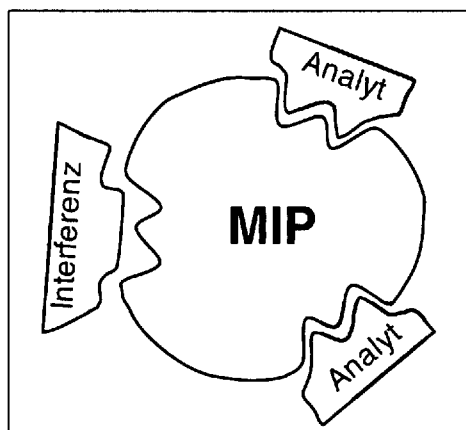


Abb. 5. Schematische Darstellung eines molekular geprägten Polymers (Molecular Imprinted Polymer, MIP).

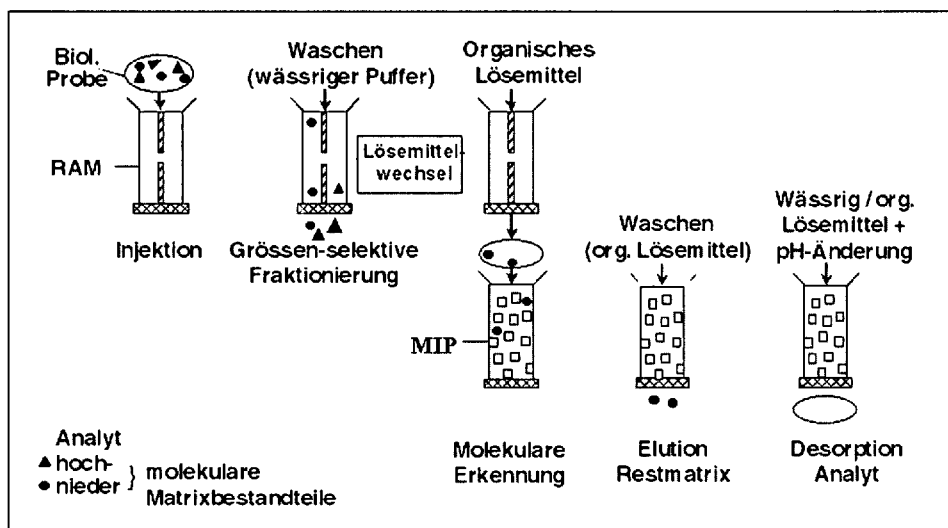


Abb. 6. Six-SPE Verfahrensschritte. RAM (Restricted Access Material) – SPE Säule. MIP (Molecular Imprinted Polymer) – SPE Säule.

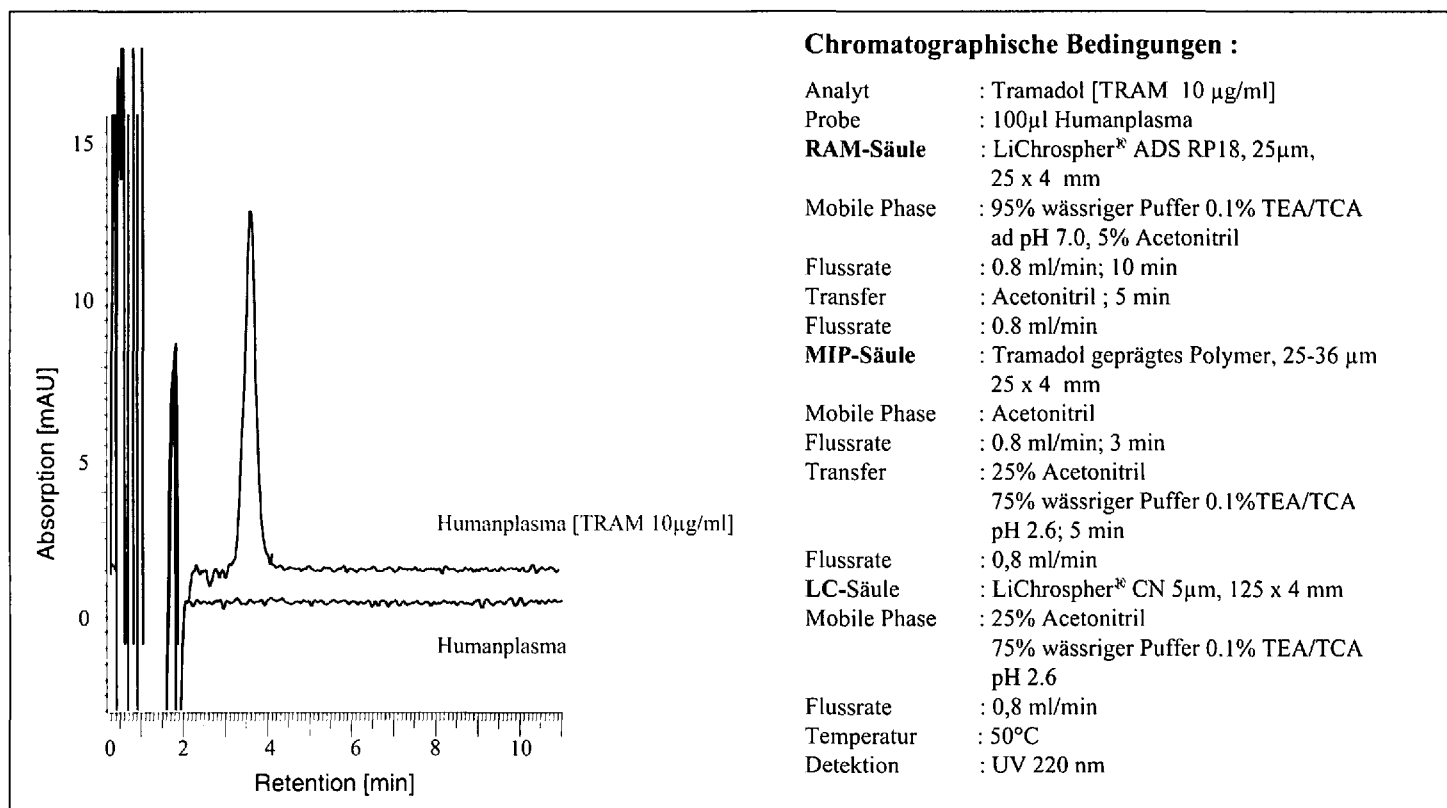


Abb. 7. Hochselektive und vollständig automatisierte Bestimmung von Tramadol in Humanplasma unter Verwendung des Six-SPE Verfahrens.

wie beispielsweise Acetonitril. Dadurch wird der Zielanalyt aus der wässrigen Probenmatrix in ein organische Lösemittel überführt ('Lösemittelwechsel'). Diese Bedingungen erlauben eine hochselektive molekulare Erkennung des Zielmoleküls ohne Störung durch makromolekulare Matrixbestandteile oder Einschränkung durch ein wässriges Milieu. In Abb. 6 sind die Verfahrensschritte der Six-SPE Methode zusammenfassend dargestellt.

In Abb. 7 ist das Ergebnis eines RAM-MIP-LC Analysenzyklus (Six-SPE Verfahren) zur direkten Bestimmung von Tramadol in 100 µl unbehandeltem Humanplasma dargestellt. Zum Vergleich ist das Chromatogramm gezeigt, das unter identischen chromatographischen Bedingungen mit einer TRAM-freien Plasmaprobe erhalten wurde. Die Detektion erfolgte mittels UV bei 220 nm und die absolute Wirkstoffkonzentration betrug 1 µg.

Der im sensitiven, niederen UV-Bereich durchgeführte Vergleich zeigt, dass durch die RAM-MIP Kopplung bzw. durch das Six-SPE Verfahren nicht nur makromolekulare Komponenten der Probenmatrix wie z.B. Proteine, sondern auch niedermolekulare, endogene Probenbestandteile selektiv eliminiert werden. Infolgedessen wird die quantitative Bestimmung des Analyten nicht durch Interferenzen beeinträchtigt und somit

die Richtigkeit und Nachweisempfindlichkeit der Analyse wesentlich verbessert.

Die hier vorgestellten massgeschneiderten Adsorbentien und die damit erstellten modernen, HPLC-integrierten Extraktionsverfahren erlauben auf einfache und effiziente Weise 1) eine hochselektive Extraktion und Anreicherung des Zielanalyten, 2) eine quantitative Abreicherung komplexer, hochmolekularer Probenmatrices, 3) die wiederholte, direkte Injektion unbehandelter biologischer Flüssigkeiten, 4) eine 'Just-in-time' Aufarbeitung empfindlicher Proben, 5) eine signifikante Steigerung der Robustheit, Präzision und Nachweisempfindlichkeit, 6) eine vollständige Automation und 7) die on-line Kopplung an weitere Trennsysteme (z.B. HPLC) oder Detektoren (z.B. MS).

Eingegangen am 9. Januar 2001

- [1] L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vincentw, *Chromatographia* **1995**, *40*, 474-483.
 [2] K.-S. Boos, C.-H. Grimm, *TrAC* **1999**, *18* (3), 175-180.
 [3] B. Sellergren, *TrAC* **1999**, *18* (3), 164-174.
 [4] C.T. Fleischer, K.-S. Boos, *GIT Spezial Separation* **2000**, *20*, 15-17.