

## Laborautomation

# Parallele *positive pressure*-Festphasenextraktion – eine Übersicht

KERSTIN THUROW<sup>1</sup>, ANNA BACH<sup>1</sup>, STEFFEN JUNGINGER<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CENTER FOR LIFE SCIENCE AUTOMATION, UNIVERSITÄT ROSTOCK

<sup>2</sup> INSTITUT FÜR AUTOMATISIERUNGSTECHNIK, UNIVERSITÄT ROSTOCK

**Solid phase extraction has become the most frequently used method in sample preparation. A significant advantage of solid phase extraction is the significantly lower solvent consumption, which has a positive effect both in terms of costs and environmentally relevant aspects. SPE-based sample preparation processes are characterized by a large number of different sub-processes. For the processing of large numbers of samples, in particular, the automation of this process is ideal in terms of throughput, minimizing processing times and reducing costs.**

DOI: 10.1007/s12268-020-1441-z  
© Die Autoren 2020

■ Die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) ist mittlerweile die am weitesten verbreitete Methode der Probenaufreinigung oder -anreicherung für die moderne Analytik. Eine aktuelle Studie zum globalen SPE-Markt prognostiziert für die kommenden Jahre 2020–2025 steigende Wachstumsraten bis zu 20 Prozent [1].

Ähnlich wie bei der Säulenchromatographie findet bei der Festphasenextraktion ein physikalischer Extraktionsprozess zwischen einer festen und einer flüssigen Phase statt. Die jeweiligen Proben werden auf speziellen Adsorbentien aufgegeben und dort nach erfolgter Anreicherung mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert. Durch eine geeignete Wahl der Elutionsmittel gelingt neben der Anreicherung der gewünschten Analyten auch eine Abtrennung von Matrixbestandteilen [2]. Die Elution der Proben kann entweder vakuumbasiert oder durch einen Überdruck auf den Säulen erreicht werden. Bei der vakuumbasierten SPE wird die Flüssigkeit durch Anlegen eines Vakuums durch die Kartuschen gezogen. Probleme treten insbesondere bei parallelen SPE-Methoden auf, da das Anlegen und Aufrechterhalten eines gleichmäßigen Vakuums an mehreren Säulen problematisch ist. Eine Alternative ist die Nutzung von Überdruck, der die Flüssigkeiten durch die SPE-Kartuschen drückt. Mithilfe der Überdruck-SPE kann eine

höhere Druckkonsistenz auf den Säulen erreicht werden. SPE-basierte Probenvorbereitungsverfahren sind durch eine Vielzahl unterschiedlicher Teilprozesse gekennzeichnet. Insbesondere für die Prozessierung großer Probenzahlen bietet sich daher in Bezug auf Durchsätze, Minimierung von Bearbeitungszeiten und Reduzierung der Kosten die Automatisierung dieses Verfahrens an.

### Automatisierte Festphasenextraktion mit Überdruck

Heute stehen verschiedene teil- und vollautomatisierte Systeme für die Festphasenextraktion zur Verfügung. Erste Automationsansätze wurden bereits von E. M. Thurman *et al.* beschrieben [3]. In einem Reviewpaper fassten D. T. Rossi *et al.* im Jahr 2000 aktuelle und zukünftige Trends in der Entwicklung der automatisierten Festphasenextraktion zusammen [4]. Während bei den vollautomatischen Systemen eine vollständig autonome Prozessierung der Proben möglich ist, sind bei den halbautomatisierten Varianten manuelle Prozessschritte erforderlich (z. B. Resolvex A200, Tecan).

**Tabelle 1** zeigt eine Gegenüberstellung von Parametern unterschiedlicher vollautomatischer Systeme, die das Prinzip der Überdruck-SPE nutzen. Für flexibel programmierbare Festphasenextraktionsprozesse müssen einige Anforderungen an die Automations-

lösungen gestellt werden. So sind das Konditionieren und Waschen der Säulen bei gleichzeitiger Ableitung der Flüssigkeiten in den Flüssigabfall zu realisieren. Unterschiedliche Säulenformate, sowohl im Mikrotierplattenformat als auch Einzelsäulen, sollten unterstützt werden. Für eine vollständig automatisierte parallele Festphasenextraktionen müssen die Geräte Schnittstellen zur Steuerung durch ein übergeordnetes System besitzen. Weiterhin muss auch das selektive Bestücken der Säulen-Labware und der Elutions-Labware durch einen Roboterarm bzw. den Greifer eines Liquid Handlers ermöglicht werden. Es existieren proprietäre Systeme mit eigenem Pipettierarm für das Zuführen der Proben, Standards usw. Die größere Flexibilität bieten jedoch Extraktionsgeräte, die in marktverfügbare Pipettierroboter integriert werden können und den direkten Pipettierzugriff auf die im Extraktionsgerät befindliche Labware gestatten. Solche Systeme sind auch leichter für höhere automatisierte Durchsätze einsetzbar, da sie mehr Labwarekapazität auf dem Liquid Handler bereitstellen.

Die erreichbaren Drücke in den kommerziell verfügbaren Systemen liegen i. d. R. zwischen 0 und 100 psi, bei einigen Systemen auch darunter. Viele Geräte können bis zu 96 Proben parallel bearbeiten; die Bearbeitung höherer Probenzahlen (384–1536) ist mit einzelnen Systemen ebenfalls möglich. Üblicherweise werden 96-Well-Platten auf den Systemen eingesetzt; es können aber auch andere Plattenformate, z. B. 24-, 48-, 384-Well-Platten, verarbeitet werden. Flexible Systeme ermöglichen auch die Verwendung klassischer 1-, 3- oder 6-ml-Kartuschen.

Durch eine Flussbegrenzung des zur Druckbeaufschlagung genutzten Gases für jede einzelne SPE-Säule wird bei den Systemen [MPE]<sup>2</sup> (Hamilton) und Positive Pressure Device (celisca) sichergestellt, dass an jedem dieser Kanäle jederzeit der zur Druckbeaufschlagung eingestellte Druck unabhängig von der Anzahl der bestückten Säulen anliegt und auch bei probenbedingtem unterschiedlichen Elutionsverhalten stabil bleibt.

**Tab. 1:** Auswahl von Geräten für die vollautomatische parallele Positive Pressure Festphasenextraktion

	Hamilton [MPE] <sup>2</sup>	Tecan Freedom EVO positive pressure cartridge package	Biotage Extrahera	Celisca	Fornax Technologies Automated SPE Workstation	Tomtec Quadra 4
<b>Probenanzahl</b>	Bis zu 96	144 mit 1 mL Säulen, 80 mit 3 mL Säulen und 64 mit 6 mL Säulen	Bis zu 96	Bis zu 384	1-96 parallele Bearbeitung einzelner Säulen oder 96/384 Well-Platten	96 (bis zu 1536)
<b>Säulen oder Mikrotiterplatten</b>	Einzelssäulen; 24, 48 und 96 Wellplatten bis max. Stackhöhe 110 mm	1, 3 und 6 mL Säulen	96 oder 48 Wellplatten	1, 3 und 6 mL Säulen; 12, 24, 48, 96 und 384 Wellplatten bis max. Stackhöhe 200 mm	96 Wellplatten	96 Wellplatten
<b>Überdruck (positive pressure)</b>	0-100 psi	N/A	0-73 psi	0-100 psi	0-100 psi	N/A
<b>Plate height</b>	selbstjustierend	N/A	N/A	selbstjustierend	selbstjustierend	selbstjustierend
<b>Spezielle Features</b>	Verdampfer-modul; ANSI/SLAS Format Adapter für kleine Filtertubes verfügbar.	-	-	Offene Plattform, integrierbar in zahlreiche Liquid Handling Plattformen	Einfache Nachrüstung der Pipettierroboter der Serie EVO 100, 150 und 200 von Tecan	Positive Pressure SPE Einheit wird als Option angeboten

**Tab. 2:** Auswahl von Applikationen mit automatisierter Festphasenextraktion

Analyt	Matrix	Literatur
Alprazolam, Clonazepam und Nitrazepam	Humanes Serum, Humanes Plasma	[5]
Amphetamine, Kokain, Opiode, Benzodiazepine	Blut	[6]
Beta-Blocker	Blut	[7]
Cannabis, Cannabinoide	Marihuana, Pflanzen	[8]
Codeine, 6-Monoacetylmorphine (6-MAM), Morphine, Cocaine, Methadone, Ecstasy (MDMA) und Eve (MDE)	Haare	[9]
Cyclophosphamid	Zellen	[10]
Dentalmaterialien	Speichel	[11]
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> (25OHD <sub>3</sub> ) and D2 (25OHD <sub>2</sub> )	Serum Plasma	[12]
Opiate	Urin	[13]
Plasmid-DNA-Reinigung	<i>E. coli</i> -Kulturen	[14]
Steroide	Serum, Speichel	[15]
Δ <sup>9</sup> -Tetrahydrocannabinol (THC)	Blut	[16]

Die Zephyr G3 SPE Workstation (Perkin Elmer) ist zusätzlich zur Erkennung von Verstopfungen auf den einzelnen Säulen mit einem ultraschallbasierten Sensor (PING Non Contact Clog Detection) ausgestattet.

### Labware für die automatisierte Festphasenextraktion

Klassischerweise finden in der Festphasenextraktion Säulen mit unterschiedlichen Adsorbentien Anwendung. Diese können prinzipiell auch in automatisierten Systemen

eingesetzt werden. Derzeit existiert kein Standard bezüglich der Abmessungen der Labware zur Festphasenextraktion. Typische Säulengrößen sind 1 ml, 3 ml sowie 6 ml. Die Einzelssäulen werden entweder in auf dem Liquid-Handler-Deck fest installierte Racks bestückt oder in mobile Racks gesteckt (meist im Mikrotiterplattenformat), wodurch der Transport der Racks mit robotischen Greifern sichergestellt wird. Da die Einzelssäulen neben den unterschiedlichen Baugrößen auch mit Flansch, flanschlos sowie rand-

los vorliegen können, sind letztendlich für diverse verschiedene Ausführungen auch jeweils unterschiedliche Adapter zu verwenden, die als anwendungsspezifisch angefertigtes Zubehör bei den Lieferanten der automatisierten *positive pressure*-SPE-Geräte zu beziehen sind.

Für eine hohe Parallelität kommen auch Mikrotiterplatten zum Einsatz. Dabei wird unterschieden zwischen *solid phase*-Extraktionsplatten in einem Stück (*molded format*) und entsprechenden Platten im modularen

Format mit herausnehmbaren Wells. Klassische *solid phase*-Extraktionsplatten sind u. a. von Agilent (Bond Elute Extraktionsplatten), Merck (Discovery Plates), Phenomenex (Strata) oder Water (Oasis) mit Adsorbemengen zwischen zehn und 100 Milligramm verfügbar.

Die Verwendung modularer Platten ermöglicht die flexible Bestückung der Platten mit unterschiedlichen Säulen. Hierbei kann auch eine Bestückung mit unterschiedlichen Säulen vorgenommen werden, was insbesondere im Bereich der Methodenentwicklung von Bedeutung ist bzw. bei geringeren Anzahlen an Proben genutzt werden kann. Modulare Platten sind u. a. bei Agilent, Thermo Scientific oder Biotage verfügbar. Für die Bestückung mit 96 Säulen kommen i. d. R. Säulen mit Volumina von einem Milliliter zur Anwendung.

Wie bei den Einzelsäulen sind auch bei der Säulenlabware mit Mikrotiterplatten-Basisfläche keine Standards bzgl. der Formgestaltung der Labware vorhanden. Vor allem für das sichere und kontaminationsfreie Abstellen der Säulenplatten werden auch hier i. d. R. Adapterrahmen benötigt, die oft labware- und applikationsspezifisch sind.

Für die in **Tabelle 1** genannten Systeme wurden zahlreiche Applikationen berichtet. Diese umfassen eine Vielzahl an Substanzklassen, z. B. Triazine, Herbizide und Nitrosamine in Wasser oder Diuretika sowie Opiate in Urin. **Tabelle 2** zeigt eine Auswahl weiterer Applikationen, für die automatisierte SPE-Verfahren entwickelt wurden. ■

## Literatur

- [1] Apex Market Research (20219) Global solid phase extraction (SPE) market by product type (normal phase SPE, reversed phase SPE) and by end-users/application (pharma, academia) global market share, forecast data, in-depth analysis, and detailed overview, and forecast, 2013–2026. [www.apexmarketsresearch.com/report/global-solid-phase-extraction-spe-market-by-product-237104/](http://www.apexmarketsresearch.com/report/global-solid-phase-extraction-spe-market-by-product-237104/)
- [2] Thurman EM, Mills MS (1998) Solid-phase extraction – principles and practice. In: Winefordner JD (Hrsg.) *Chemical Analysis*, Volume 147, A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications. John Wiley & Sons Inc., New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapur/Toronto
- [3] Thurman EM, Mills MS (1998) Solid phase extraction: Principles and Practice. John Wiley & Sons, 1998
- [4] Rossi DT, Zhang N (2000) Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *J Chrom A* 885:97–113
- [5] Akeman KK, Jolkkonen J, Parvianinen M et al. (1996) Analysis of low-dose benzodiazepines by HPLC with automated solid-phase extraction. *Clin Chem* 42:1412–1416
- [6] Pekol T, Danaceau J, Naughton S et al. (2017) Determination of urinary opioids by solid-phase extraction LC-MS/MS for clinical research: comparison of automated and manual sample preparation. Application Note Water, <https://www.waters.com/nextgen/is/en/library/application-notes/2017/urinary-opioids-solid-phase-extraction-lc-ms-ms-clinical-research-automated-manual-sample-preparation.html>
- [7] Kristoffersen L, Oiestad EL, Opdal MS et al. (2007) Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry: Method development and robustness testing by experimental design. *J Chrom B* 850:147–160
- [8] Kinsella B, Fanning T, Searfoss J et al. (2016) Analysis of 47 pesticides in cannabis for high-throughput analysis: traditional dSPE vs. positive pressure dSPE in a 96-well plate. Application Note Hamilton, [www.hamiltoncompany.com/automation/case-studies/analysis-of-47-pesticides-in-cannabis-for-high-throughput-analysis-traditional-dspe-vs-positive-pressure-dspe-in-a-96-well-plate](http://www.hamiltoncompany.com/automation/case-studies/analysis-of-47-pesticides-in-cannabis-for-high-throughput-analysis-traditional-dspe-vs-positive-pressure-dspe-in-a-96-well-plate)
- [9] Girod C, Staub C (2000) Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EL/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Sci Int* 107:261–271
- [10] Gallert C, Vorberg E, Roddelkopf T et al. (2015) Evaluation of an automated solid-phase extraction method using positive pressure. *Am Pharm Rev*, [www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/174342-Evaluation-of-an-Automated-Solid-Phase-Extraction-Method-Using-Positive-Pressure/](http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/174342-Evaluation-of-an-Automated-Solid-Phase-Extraction-Method-Using-Positive-Pressure/)
- [11] Schedler M, Roddelkopf T, Bandomir J et al. (2018) Automated pre-sensoric selectivity system for determination of methacrylates from dental composite materials. Proceedings, IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference I2MTC 2018, Houston (US), 136–140
- [12] Knox S, Harris J, Calton L et al. (2009) A simple automated solid-phase extraction procedure for measurement of 25-hydroxyvitamin D3 and D2 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 46:226–230
- [13] Biotage (2019) Automated extraction of opiates from hydrolyzed and non-hydrolyzed urine using ISOLUTE® SLE+ prior to GC/MS analysis. Application Note AN918, [www.biotage.com/news/a-fully-automated-method-for-extraction-of-opiates-from-urine](http://www.biotage.com/news/a-fully-automated-method-for-extraction-of-opiates-from-urine)
- [14] Wolff C, von Bohl A, Pustelny C et al. (2019) High-throughput plasmid DNA purification using the [MPE]2 positive pressure module. Application Note Hamilton, [www.hamiltoncompany.com/automation/case-studies/high-throughput-plasmid-dna-purification-using-the-mpe2-positive-pressure-module](http://www.hamiltoncompany.com/automation/case-studies/high-throughput-plasmid-dna-purification-using-the-mpe2-positive-pressure-module)
- [15] Scherling C, Lättig J, Antar SJ (2019) Multi-steroid extraction from saliva or serum using positive pressure SPE for automated LC-MS sample prep. Application Note Tecan,
- [16] Lerch O, Temme O, Daldrup T (2013) Comprehensive automation of the SPE-GC/MS analysis of opioids, cocaine and metabolites from serum and other matrices. Application Note 7/2013 Gerstel, <http://bit.ly/2lpxLbk>

**Funding** Open Access funding provided by Projekt DEAL.

**Open Access** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/ die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Kerstin Thurow, Anna Bach und Steffen Junginger (von oben nach unten)

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr.-Ing. habil. Kerstin Thurow  
celisca, Universität Rostock  
Friedrich-Barnewitz-Straße 8  
D-18119 Rostock  
Kerstin.thurow@celisca.de  
[www.celisca.de](http://www.celisca.de)