

Trocknung von Extrakten

Rotationsvakuumkonzentrator versus Stickstoffabblasen

Die Entfernung kleinerer Volumina eines organischen Lösungsmittels aus einem Extrakt (z.B. nach Flüssig/Flüssig oder Festphasenextraktion) erfolgt in vielen Laboratorien durch „Abblasen“ mit Stickstoff bei geringer Wärmezufuhr (z.B. 40°C). Hierzu werden häufig wenig standardisierte Apparaturen verwendet, die Einstellung der Strömungsgeschwindigkeit des Gases sowie die Position der Stickstoffdüsen zur Probe werden häufig „subjektiv“ eingestellt und sind wenig reproduzierbar. Bei hohen Gasflüssen und geringem Düsenabstand ist zudem die Gefahr einer Tröpfchenbildung von Probenmaterial gegeben.



Abb. 1: Probentrocknung in der Vakuumzentrifuge (links) sowie durch „Abblasen“ mittels Stickstoff

Die bisher in unserem Institut angewandte Methode für das Trocknen von organischen Extrakten, das Abblasen mittels Stickstoff, wurde mit dem alternativ möglichen Einsatz eines Rotationsvakuumkonzentrators (RVC), auch Vakuumzentrifuge genannt, verglichen. Der Prozess läuft in der RVC wesentlich definierter, schneller und mit weniger Aufwand ab und das Gerät wird inzwischen routinemäßig in unserem Institut und in anderen Toxikologielaboren eingesetzt. Es ist generell sehr gut für definierte Aufkonzentrierungsschritte von organischen und wässrigen Medien geeignet.

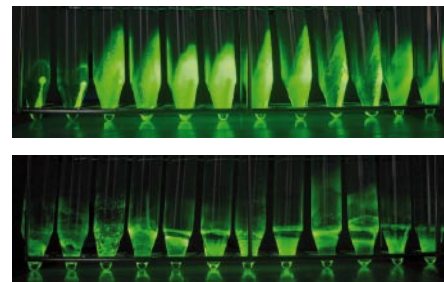
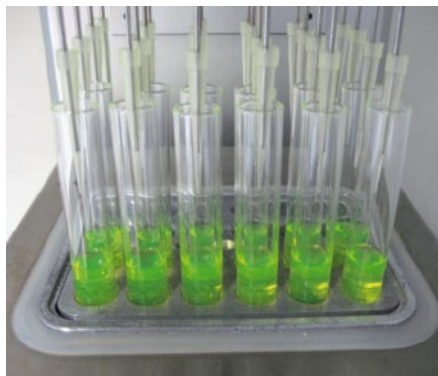


Abb. 2: 12 mittels RVC (oben) und unter Stickstoff (unten) getrocknete Proben unterschiedlicher Lösungsmittel: 1–2 Acetonitril; 3–4 Methanol; 5–6 Aceton; 7–8 Cyclohexan; 9–10 Isooctan; 1–12 Ethylacetat

Als alternatives Verfahren bietet sich eine Trocknung von Extrakten mittels eines Rotationsvakuumkonzentrators (RVC) an. Diese Technologie wird in biotechnologischen / molekularbiologischen Laboratorien seit Jahren als Standardverfahren für die verschiedensten An-

wendungen der Aufkonzentrierung von wässrigen oder Lösungsmittel-haltigen Proben genutzt.

Hierbei werden die zu trocknenden Extrakte in einer evakuierbaren Kammer zentrifugiert und das Lösungsmittel im Vakuum an einem Kondensator abgeschieden. Dabei sind sämtliche, den

Trocknungsvorgang bestimmende Parameter (Vakuum, Kammertemperatur, Rotordrehzahl, Kondensatortemperatur) regel- und messbar und somit reproduzierbar bzw. standardisierbar. Für die Vergleichstests wurde ein Rotationsvakuumkonzentrator (RVC) der Firma Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH Osterode / Harz eingesetzt. Mit den hier gezeigten Untersuchungen sollte geprüft werden, ob objektivierbare, qualitative Unterschiede der Probentrocknung existieren. Im Detail sollten dazu die Rückstandsverteilung nach der Trocknung, eventuelle Verluste bzw. Wiederfindungsraten der analytischen Substanz sowie die Trocknungsgeschwindigkeit betrachtet werden.

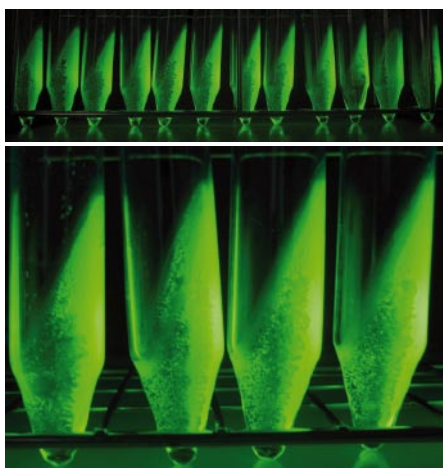
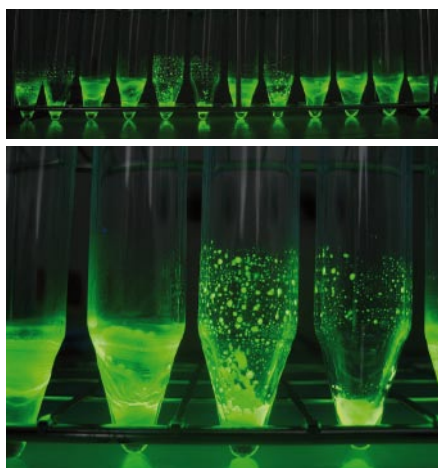


Abb. 3: 12 mittels RVC (links) und unter Stickstoff (rechts) getrocknete Proben desselben Lösungsmittels (Ethanol)



Methoden

Zur bildlichen Darstellung des Trocknungsvorgangs wurde ein PEG/ Fluorescein-Gemisch eingesetzt, was in verschiedenen Lösungsmitteln (je 3 ml) gelöst wurde. Nach Zentrifugation der Proben bei 4.000g (zum Ausschluss einer Unlöslichkeit des Farbstoffs) wurden die Proben mit den beiden beschriebenen Verfahren getrocknet (RVC: 1500 rpm/ 8 mbar/ Kammer 40°C/ Kon-

densator -60°C). Siehe Abb. 1. Die Sichtbarmachung erfolgte dann unter $\text{UV}=366\text{ nm}$. Zur Prüfung der Wiederfindung wurden Amphetamin (100 ng) sowie Cocain (100 ng) in je 3 ml Ethanol gelöst. Nach Zusatz von 100 μl Isopropanol/HCl wurde mit beiden Verfahren getrocknet. Nach Trocknung wurden die Zentrifugenröhrchen mit je 100 μl ETAC, das jeweils 100 ng deuteriertes Amphetamin und 100 ng deuteriertes Cocain enthielt, für exakt 30 s gevortext. Die Derivatisierung erfolgte mit 50 μl PFP (4 min/ 400 W Mikrowelle), die Analyse mittels GC/(EI)/MS. Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte durch Vergleich der Signalfächen der Ionen $m/z=190/194$ (Amphetamin) sowie $m/z=182/185$ (Cocain).

Ergebnisse

Abbildung 2 und 3 zeigen, dass die Fluoresceinverteilung im Probengefäß nach der Trocknung deutliche Unterschiede aufweist. Aufgrund der Neigung der Gefäße im RVC bildet sich bei diesem Trocknungsverfahren ein Substanzfilm, der auf der radial außen liegenden Gefäßwand eine über das ursprüngliche Füllvolumen hinausgehende Höhe aufweist. Dabei ist ein Einfluss des verwendeten Lösungsmittels erkennbar (Abb.2). Die Fluoresceinverteilung im Gefäß ist bei Proben desselben Lösungsmittels sehr gleichförmig (Abb.3). Die Trocknung mittels Stickstoff führte zu ungleichmäßiger Fluoresceinverteilung in den Probengefäßen sowohl bei Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel (Abb.2) als auch bei Proben desselben Lösungsmittels (Abb. 3). Die Höhe des erreichten Fluoresceinspiegels im Gefäß lag im Durchschnitt deutlich unter dem, der bei der RVC-Trocknung erreicht wurde.

Hinsichtlich der Wiederfindung von Amphetamin sowie Cocain wurde bei den Verfahren kein signifikanter Unterschied festgestellt. (Abb.5). Der Vergleich der Lösungsmittelniveaus nach 15 min. Trocknungszeit (Abb. 6) zeigt die deutlich höhere Trocknungsgeschwindigkeit des RVC gegenüber dem Stickstoffevaporator.

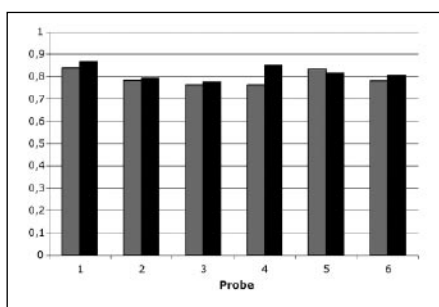


Abb. 5: Wiederfindungen für Cocain (links) sowie Amphetamin (rechts) nach Trocknung mittels RVC (grau) sowie Stickstoff (schwarz)

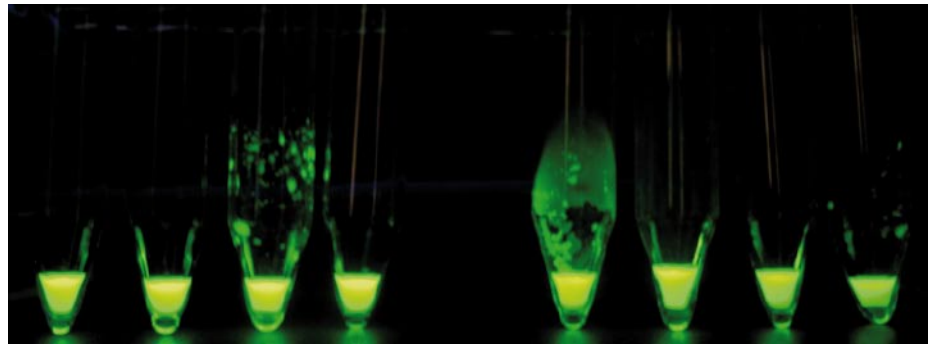


Abb. 4: Wiederaufnahme von je 4 getrockneten Proben (Stickstoff links, RVC rechts) in 100 μl Ethanol, 30 s Vortex

Fazit

Kein höherer Verlust von flüchtigen Substanzen durch Vakuumeinsatz

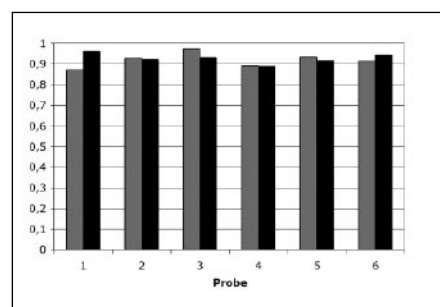
Experimentell ergaben sich bei den untersuchten Trocknungsverfahren keine Hinweise auf unterschiedliche Wiederfindungsraten der untersuchten Analyte, insbesondere bei dem als sehr flüchtig bekannten Amphetamin.

Gleichmässigerer Rückstandsverteilung und verlässliche Wiederaufnahme der Analyten

Die Ablagerung der Substanz erfolgt bei der RVC wesentlich homogener, sowohl bei der Wiederholung der Prozesse als auch beim Vergleich unterschiedlicher Lösungsmittel. Die Substanzen sind bei der Verwendung des oben beschriebenen Statusrotors relativ weit über die Glasinnenoberfläche verteilt. Die Wiederaufnahme in wenigen μl Lösungsmittel (inkl. Einsatz Vortex) zur Weiterverarbeitung bzw. der Analytik erfolgt jedoch gleich zuverlässig. Der Einsatz von Ausschwingrotoren, die für das Modell 2-33 mit dem größeren Rotorinnenraum zur Verfügung stehen, würde sicherstellen, dass die Substanz nur am Gefäßboden konzentriert anfällt.

Zeitersparnis

Die RVC erlaubt eine wesentlich schnellere Trocknung, wobei hierfür in erster Linie die Qualität des Vakuums von entscheidender Bedeutung ist. Das oben erwähnte größere Modell ist



mit einer integrierten IR-Heizung verfügbar, was die Trocknungsgeschwindigkeiten nochmals in entscheidendem Maße erhöht.

Definierter Prozess mit mess- und regelbaren Parametern

Die RVC-Trocknung verbessert durch die Programmierbarkeit und damit Gleichförmigkeit der Prozessbedingungen in hohem Maße die Prozessqualität. Dieser Aspekt ist generell ein wesentlicher Punkt für die Optimierung und Validierung der Untersuchungsverfahren sowie der Qualitätssicherung.

Keine Verschleppung von Probenmaterial

Die immer wieder beobachtete Verschleppung von Probenmaterial durch das bei der Stickstoffmethode notwendige Eintauchen der Spitzen in die Gefäße ist hier quasi ausgeschlossen. Dazu wurden allerdings bisher keine bestätigenden Untersuchungen angestellt, weil sich dies prinzipiell aus der Anordnung ergibt.

Umwelt und Entsorgung

Durch den Einsatz einer Kühlfalle werden die abgedampften Lösungsmittel kondensiert und gesammelt. Sie gelangen somit nicht umwelt- und gesundheitsschädigend in die Abluft und können umweltgerecht entsorgt werden.

Einfache Handhabung

Bei der Einführung der Methode bedurfte es einiger Experimente, um die optimalen Prozessbedingungen und auch den Zeitbedarf des Aufkonzentrierungsprozesses festzustellen. Der Prozess kann so gesteuert werden, dass bis zur Trockne eingedampft wird oder bei entsprechendem früheren Abbruch des Prozesses noch ein bestimmtes Restvolumen des Lösungsmittels vorhanden ist. Wenn diese Parameter aber bestimmt und in der RVC programmiert sind, verläuft der gesamte Prozess der Trocknung nach dem Starten automatisiert und erfordert keinerlei manuel-

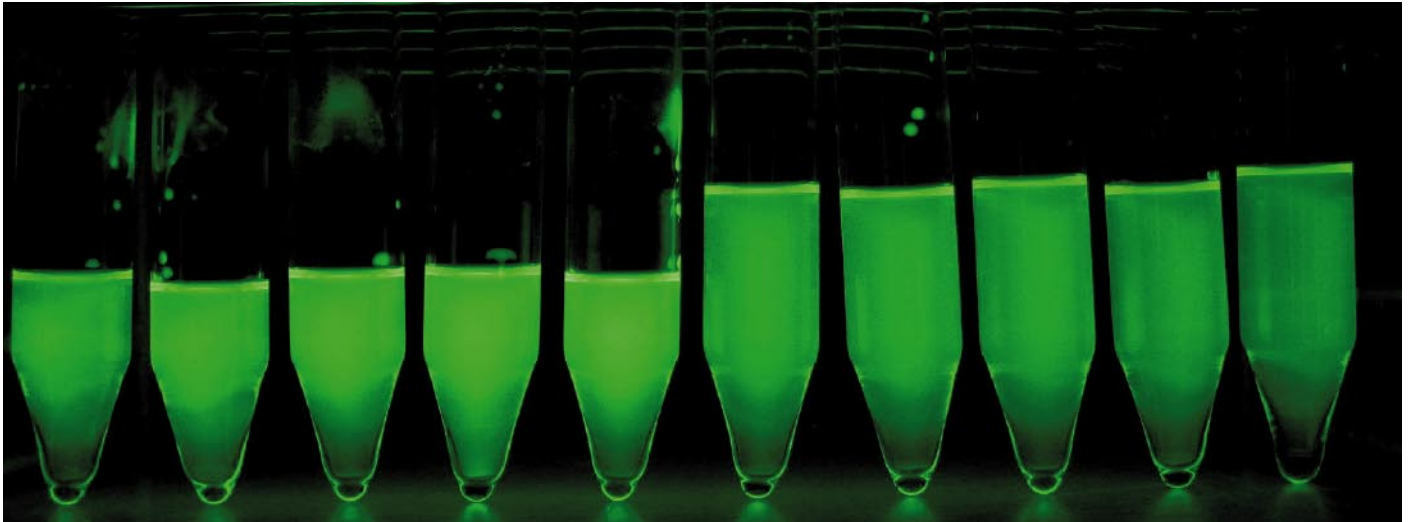


Abb. 6: 12 mittels RVC (links) und Stickstoffevaporator (rechts) getrocknete Proben (Ethanol Pyrex 5 ml) nach 15 min

le Steuerung oder Aufsicht. Ein akustisches Signal weist auf Wunsch auf das Ende hin. Insgesamt ist die Handhabung dadurch einfacher und sicher.

Für wässrige und organische Proben geeignet

Ein Vorteil der RVC-Trocknung ist, dass sie auch für wässrige Proben oder Lösungsmittel mit hohem Siedepunkt wie z.B. DMSO, sehr gut einsetzbar ist. Natürlich verlängert sich dafür dann die Prozesszeit, der oben angesprochene Einsatz der IR-Heizung ist dafür dann empfehlenswert.

GC-Probenvorbereitung

Das Entfernen überschüssiger Derivatisierungsreagenzien im Rahmen der Probenvorbereitung für gaschromatographische Analysen konnte ebenfalls sehr gut in der RVC etabliert werden. Da diese Substanzen häufig gesundheits- und umweltschädliche Eigenschaften (auch starke Geruchsbildung) aufweisen, sollte das Abblasen in die Umgebungsluft vermieden werden. Das Entfernen überschüssiger Derivatisierungsmittel im RVC ist möglich, es ist allerdings zwingend erforderlich, dass dieser Vorgang bei einem stärkeren Vakuum (ca. 1 mbar) ausgeführt wird. Bei dem Einsatz einer Membranpumpe (ca. 8 mbar) kommt es zu unangenehmen rötlichen Ablagerungen im In-

nenraum der RVC, die nur mit viel Aufwand wieder entfernt werden können.

Routine

Nach den guten Ergebnissen wird die Methode in unserem Institut nun routinemäßig angewandt. Die Ergebnisse wurden auf der Tagung der Gesellschaft für toxikologische forensische Chemie im Arbeitskreis Extraktion vorgestellt. Inzwischen haben mehrere Rechtsmedizinische Institute die Methode etabliert, andere sind dabei. Die Methode ist generell branchenübergreifend für viele Aufkonzentrierungsschritte unter Verwendung verschiedenster Gefäßtypen einsetzbar.

► KONTAKT

Dr. rer. nat. Alexander Müller
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Institut für Rechtsmedizin, Abteilung
Toxikologie
Universitätsklinikum Hamburg-
Eppendorf

**Martin Christ Gefriertrocknungs-
anlagen GmbH**
Osterode am Harz
Tel.: 05522/50070
Fax: 05522/500712
info@martinchrist.de
www.martinchrist.de