

Universität Rostock



Traditio et Innovatio



Automationskonzepte für die komplexe, bioanalytische Probenvorbereitung

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

am Institut für Automatisierungstechnik

der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik

der Universität Rostock

vorgelegt von

Anna Bach

Rostock, 2024

Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. habil. Kerstin Thurow, Universität Rostock, Institut für Automatisierungstechnik, DE
Prof. Dr.-Ing. habil. Heidi Fleischer, Universität Rostock, Institut für Automatisierungstechnik, DE
Prof. Dr. Deirdre Meldrum, Arizona State University, Biodesign Institute, USA

Jahr der Einreichung: 2024

Jahr der Verteidigung: 2025

Für meine Eltern

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr.-Ing. habil. Kerstin Thurow für die Möglichkeit der Promotion am Center for Life Science Automation, für das vielseitige, spannende und anwendungsorientierte Thema meiner Dissertation sowie für die ständige Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr.-Ing. habil. Heidi Fleischer für die jederzeitige Unterstützung und für die zahlreichen wertvollen Anregungen bei der Erstellung dieser Arbeit, insbesondere im Bereich der Messtechnik und Validierungen, bedanken.

Bei Prof. Dr.-Ing. Norbert Stoll bedanke ich mich für die vielen Ratschläge und für die Unterstützung mit den Geräten.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kollegen am Center for Life Science Automation und am Institut für Automatisierungstechnik der Universität Rostock für ihre stets prompte Hilfsbereitschaft und für die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung und unendliche Liebe!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Stand der Technik	3
2.1 Bioanalytik	3
2.1.1 Einordnung der Bioanalytik in die Life Sciences.....	3
2.1.2 Bioanalytische Matrices	5
2.1.3 Grundlegende Probenvorbereitungstechniken in der Bioanalytik.....	7
2.1.4 Analytische Methoden und Matrixeffekte in der Bioanalytik	13
2.2 Automatisierung in der Bioanalytik	17
2.2.1 Aufbau, Einteilung und Arten von Robotern	17
2.2.2 Automationssysteme in der Bioanalytik.....	19
2.2.3 Stand der Automatisierung in der Bioanalytik.....	23
2.2.4 Liquid-Handling-Systeme.....	24
2.2.5 Automationssysteme der messtechnischen Analyse und der totalen Laborautomation....	30
3. Gegenstand der Dissertation	32
4. Konzeptionierung des Automationssystems	34
4.1 Analyse von Laborprozessen	34
4.2 Auswahl des Automationssystems	39
4.3 Konzept des Automationssystems.....	41
4.3.1 Grundkonfiguration	41
4.3.2 Zusatzkomponenten	43
5. Methoden zur Bewertung des Automationssystems	50
5.1 Qualitative Überprüfung.....	50
5.2 Wirtschaftliche Überprüfung	53
5.2.1 Kostenvergleichsrechnung	53
5.2.2 Beurteilung der Opportunität und Risikoabschätzung	55
5.3 Überprüfung der Nachhaltigkeit.....	56
5.4 Bewertung und Optimierung des Gesamtsystems	60
6. Realisierung des Automationskonzepts	62
6.1 Anwendung 1 – Bestimmung von Benzodiazepinen	63

6.1.1	Einführung	63
6.1.2	Prozessanalyse und Systemanforderungen	65
6.1.3	Anforderungsanalyse und Systemrealisierung	69
6.1.4	Systemüberprüfung – Bestimmung von Benzodiazepinen	75
6.2	Anwendung 2 – Bestimmung von Cannabinoiden	83
6.2.1	Einführung	83
6.2.2	Prozessanalyse und Systemanforderungen	85
6.2.3	Anforderungsanalyse und Systemrealisierung	92
6.2.4	Systemüberprüfung – Bestimmung von Cannabinoiden	96
6.3	Anwendung 3 – Bestimmung von Benzoesäuren	101
6.3.1	Einführung	101
6.3.2	Prozessanalyse und Systemanforderungen	103
6.3.3	Anforderungsanalyse und Systemrealisierung	106
6.3.4	Systemüberprüfung – Bestimmung von Benzoesäuren	108
6.4	Anwendung 4 – Bestimmung von Antikörpern	112
6.4.1	Einführung	112
6.4.2	Prozessanalyse und Systemanforderungen	115
6.4.3	Anforderungsanalyse und Systemrealisierung	120
6.4.4	Systemüberprüfung – Aufreinigung von Antikörpern	125
7.	Bewertung des Gesamtsystems	129
7.1	Qualität des allgemeingültigen Automationssystems	129
7.2	Wirtschaftlichkeit des allgemeingültigen Automationssystems	131
7.3	Nachhaltigkeit des allgemeingültigen Automationssystems	133
8.	Zusammenfassung und Ausblick.....	134
9.	Literatur	137
10.	Anhang	172
11.	Veröffentlichungen	229

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Laborleistungen in Deutschland 2002–2022	1
Abbildung 2.1: Überblick Bioscreening und Bioanalytik	3
Abbildung 2.2: Vergleich Prozesslängen Bioscreening/ Bioanalytik.....	4
Abbildung 2.3: Schema eines Filtrationsprozesses	8
Abbildung 2.4: LLE mit Zucker oder Salz zur Erhöhung der Extraktionseffizienz	10
Abbildung 2.5: Ablauf der Festphasenextraktion	11
Abbildung 2.6: LC-MS System	15
Abbildung 2.7: Häufig genutzte robotische Konfigurationen.....	18
Abbildung 2.8: Automationssysteme/-konzepte	19
Abbildung 2.9: Bestandteile eines Automationssystems; nach Integrationsgrad	22
Abbildung 2.10: Verknüpfung zw. Automationsgrad und Probendurchsatz in Life Sciences Laboren	23
Abbildung 2.11: Labware Übersicht.....	25
Abbildung 2.12: Klassifikation von Liquid-Handling-Systemen nach Konfiguration.....	27
Abbildung 4.1: Überblick Laborprozess	34
Abbildung 4.2: Einteilung des Prozesses der Probenvorbereitung in 3 Stufen	35
Abbildung 4.3: Prozesse ausgewählter Probenvorbereitungstechniken	37
Abbildung 4.4: Überblick grundlegende und spezielle Funktionen	38
Abbildung 4.5: Überblick Systemkomponenten der Biomek i7 Hybrid Liquid Handling Workstation	41
Abbildung 4.6: Übersicht Werkzeuge der Biomek i7 Workstation	42
Abbildung 4.7: Überblick Biomek 5 Software	43
Abbildung 4.8: Positive Pressure Unit	44
Abbildung 4.9: VSpin Zentrifuge	44
Abbildung 4.10: Shaking Peltier ALP	45
Abbildung 4.11: Static Peltier ALP.....	45
Abbildung 4.12: Single Plate Incubator	46
Abbildung 4.13: 3D-Tilting ALP	46
Abbildung 4.14: Self-Refilling Quarter Reservoir	47
Abbildung 4.15: RoboColumn Unit	48
Abbildung 4.16: Liquid Handling Workstation mit integrierten Zusatzgeräten	49
Abbildung 5.1: Farbcode Nachhaltigkeitsbewertung (normalisiert)	57
Abbildung 6.1: Überblick über die Probenvorbereitungsprozesse der vier Anwendungen.....	62
Abbildung 6.2: Strukturformeln ausgewählter Benzodiazepine	63
Abbildung 6.3: Ausgangspunkt Methodenentwicklung Benzodiazepine	65
Abbildung 6.4: Prozessablaufpläne zur Bestimmung von Benzodiazepinen aus Serum	66
Abbildung 6.5: Eppendorf Vial Rack.....	71
Abbildung 6.6: Aluminium Rack mit 1,5 ml Standard Vials.....	71
Abbildung 6.7: Schüttelungs- und zentrifugationsgeeignetes Rack mit 1,5 ml Standard Vials	72
Abbildung 6.8: Strata X Kartuschen; Spritzenaufsatz; Positive Pressure Rack	72

Abbildung 6.9: Stack aus geschlitzten Racks zur Methodenentwicklung	73
Abbildung 6.10: Decklayout zur automatisierten Bestimmung von Benzodiazepinen mit Platten	74
Abbildung 6.11: Decklayout zur automatisierten Bestimmung von Benzodiazepinen mit Kartuschen	74
Abbildung 6.12: Wiederfindungsraten Benzodiazepine Platten	75
Abbildung 6.13: Wiederfindungsraten Benzodiazepine Kartuschen	77
Abbildung 6.14: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzodiazepine	78
Abbildung 6.15: Strukturformeln von Δ^9 -THC sowie den zwei Hauptmetaboliten	83
Abbildung 6.16: Ausgangspunkt Methodenentwicklung Cannabinoide	86
Abbildung 6.17: Prozessablaufplan Bestimmung von Cannabinoiden aus Serum, Urin und Speichel ...	87
Abbildung 6.18: Decklayout THC aus Serum	94
Abbildung 6.19: Decklayout THC aus Urin	94
Abbildung 6.20: Decklayout THC aus Speichel	95
Abbildung 6.21: Wiederfindungsraten Cannabinoide aus Serum, Urin und Speichel	97
Abbildung 6.22: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Cannabinoide	99
Abbildung 6.23: Strukturformeln ausgewählter Benzoesäuren	101
Abbildung 6.24: Ausgangspunkt Methodenentwicklung Benzoesäuren aus Wasserproben	103
Abbildung 6.25: Prozessablaufplan Benzoesäuren	104
Abbildung 6.26: Wheaton Vial Rack	107
Abbildung 6.27: Positive Pressure Rack, Kartuschen, Spritzenaufsätze, Spacer Adapter	107
Abbildung 6.28: Decklayout zur automatisierten Bestimmung von Benzoesäuren aus Wasser	108
Abbildung 6.29: Wiederfindungsraten Benzoesäuren	109
Abbildung 6.30: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzoesäuren	110
Abbildung 6.31: Varianten der chromatographischen Miniaturisierung	113
Abbildung 6.32: Ausgangspunkt Methodenentwicklung Aufreinigung IgG aus Zellkulturmatrix	115
Abbildung 6.33: Prozessablaufpläne der Antikörperaufreinigung	116
Abbildung 6.34: Blotting Rack	121
Abbildung 6.35: Spacer Adapter	122
Abbildung 6.36: Decklayout Antikörperaufreinigung mit RoboColumns	123
Abbildung 6.37: Decklayout Antikörperaufreinigung mit PreDictor Plates	123
Abbildung 6.38: Bilder realisiertes System Antikörperaufreinigung	124
Abbildung 6.39: Wiederfindungsraten IgG aus Zellkulturmatrix	126
Abbildung 6.40: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit IgG	127
Abbildung 7.1: Zusammenfassung der Validierungsergebnisse	130
Abbildung 7.2: Gegenüberstellung der Kosten pro Probe aller Anwendungen	132
Abbildung 8.1: Realisiertes allgemeingültiges Automationssystem	134
Abbildung 10.1: Übertragung der dreistufigen Gliederung auf ausgewählte Beispiele in Literatur	173
Abbildung 10.2: Kalibrierkurven, Chromatogramme Benzodiazepine mittels LC-MS/MS	182
Abbildung 10.3: Kalibrierkurven Benzodiazepine aus Serum 1-500 ng/ml	185
Abbildung 10.4: Messpräzision Benzodiazepine Strata X Platten	186
Abbildung 10.5: Laborinterne Vergleichspräzision Benzodiazepine Strata X Platten	186

Abbildung 10.6: Messpräzision Benzodiazepine Strata X Kartuschen	189
Abbildung 10.7: Laborinterne Vergleichspräzision Benzodiazepine Strata X Kartuschen	189
Abbildung 10.8: Kalibrierkurven, Chromatogramme und Massenspektren für Cannabinoide	201
Abbildung 10.9: Messpräzision Cannabinoide Serum	202
Abbildung 10.10: Laborinterne Vergleichspräzision Cannabinoide Serum	202
Abbildung 10.11: Messpräzision Cannabinoide Urin	203
Abbildung 10.12: Laborinterne Vergleichspräzision Cannabinoide Urin	203
Abbildung 10.13: Messpräzision Cannabinoide Speichel	204
Abbildung 10.14: Laborinterne Vergleichspräzision Cannabinoide Speichel	204
Abbildung 10.15: Chromatogramm (2 Wellenlängen) und Kalibrierkurven Benzoessäuren	212
Abbildung 10.16: Messpräzision Benzoessäuren	214
Abbildung 10.17: Laborinterne Vergleichspräzision Benzoessäuren	214
Abbildung 10.18: Kalibrierkurve IgG	224
Abbildung 10.19: Messpräzision IgG aus Zellkulturmatrix	225
Abbildung 10.20: Laborinterne Vergleichspräzision IgG	225

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Automatisierungsstufen nach Frohm am Beispiel eines Liquid-Transfer-Prozesses.....	21
Tabelle 2.2: Übersicht kommerzieller Zusatzgeräte	26
Tabelle 5.1: Berechnung der Kosten pro Probe	53
Tabelle 5.2: Zusammensetzung Betriebskosten	53
Tabelle 5.3: Kapitalkosten	54
Tabelle 5.4: Marktrecherche Kosten Labortest.....	55
Tabelle 5.5: Prinzipien der GAC und Parameter zu deren Bewertung	56
Tabelle 6.1: Prozessanalyse Benzodiazepinextraktion Strata X Kartuschen manuell	68
Tabelle 6.2: Prozessanalyse Benzodiazepinextraktion Strata X Platten manuell	69
Tabelle 6.3: Überprüfung der Anforderungen an das Automationssystem Benzodiazepinextraktion	70
Tabelle 6.4: Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzodiazepinaufreinigung	82
Tabelle 6.5: Prozessanalyse Cannabinoidextraktion Serum Strata X-C μ Elutionsplatten manuell.....	89
Tabelle 6.6: Prozessanalyse Cannabinoidextraktion Urin Strata X-C μ Elutionsplatten manuell.....	90
Tabelle 6.7: Prozessanalyse Cannabinoidextraktion Speichel Strata X-C μ Elutionsplatten manuell	91
Tabelle 6.8: Überprüfung der Anforderungen an das Automationssystem Cannabinoidextraktion	93
Tabelle 6.9: Ergebnisse Nachhaltigkeit Cannabinoidaufreinigung	100
Tabelle 6.10: Prozessanalyse Benzoesäureextraktion Strata X-A Kartuschen manuell	105
Tabelle 6.11: Überprüfung der Anforderungen an das Automationssystem Benzoesäureextraktion	106
Tabelle 6.12: Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzoesäureextraktion	111
Tabelle 6.13: Struktur und Eigenschaften der verschiedenen Antikörperklassen	112
Tabelle 6.14: Prozessanalyse IgG-Aufreinigung aus Zellkulturmatrix mit RoboColumns	118
Tabelle 6.15: Prozessanalyse IgG-Aufreinigung aus Zellkulturmatrix mit PreDicator Plates manuell.....	119
Tabelle 6.16: Überprüfung der Anforderungen an das Automationssystem für die IgG-Aufreinigung ..	120
Tabelle 6.17: Ergebnisse Nachhaltigkeit IgG-Aufreinigung	128
Tabelle 7.1: Ergebnisse Bewertung des allgemeingültigen Automationssystems.....	132
Tabelle 10.1: Übersicht Molekulargewicht verschiedener Verbindungen	172
Tabelle 10.2: Robotische Funktionen und dafür benötigte Module	173
Tabelle 10.3: Zusammenhang zwischen prozessabhängigen Faktoren und Probenzahl n_R	174
Tabelle 10.4: Nachhaltigkeitsbewertung.....	175
Tabelle 10.5: Probenvorbereitungsmethoden Benzodiazepine Literatur.....	178
Tabelle 10.6: Probenvorbereitungsmethode Extraktion von Benzodiazepinen Strata X Platten	179
Tabelle 10.7: Probenvorbereitungsmethode Extraktion von Benzodiazepinen Strata X Kartuschen	179
Tabelle 10.8: Materialverzeichnis Benzodiazepine mit Strata X Platten	180
Tabelle 10.9: Materialverzeichnis Benzodiazepine Strata X Kartuschen	181
Tabelle 10.10: Überblick LC-MS/MS System und Parameter Benzodiazepine.....	183
Tabelle 10.11: dMRM Parameter Benzodiazepine	184
Tabelle 10.12: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Platten Teil 1	187
Tabelle 10.13: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Platten Teil 2.....	187

Tabelle 10.14: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Platten Teil 3.....	188
Tabelle 10.15: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Kartuschen Teil 1.....	190
Tabelle 10.16: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Kartuschen Teil 2.....	190
Tabelle 10.17: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Kartuschen Teil 3.....	191
Tabelle 10.18: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzodiazepine	192
Tabelle 10.19: Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzodiazepine nicht normalisiert	192
Tabelle 10.20: Methoden Cannabinoide aus Blut, Plasma, Serum	193
Tabelle 10.21: Methoden Cannabinoide aus Urin	194
Tabelle 10.22: Methoden Cannabinoide aus Speichel	195
Tabelle 10.23: Probenvorbereitungsmethode Bestimmung von Cannabinoiden aus Serum	196
Tabelle 10.24: Probenvorbereitungsmethode Bestimmung von Cannabinoiden aus Urin	196
Tabelle 10.25: Probenvorbereitungsmethode Bestimmung von Cannabinoiden aus Speichel.....	197
Tabelle 10.26: Materialverzeichnis Cannabinoide aus Serum	198
Tabelle 10.27: Materialverzeichnis Cannabinoide aus Urin	199
Tabelle 10.28: Materialverzeichnis Cannabinoide aus Speichel.....	200
Tabelle 10.29: Parameter Analytik Cannabinoide	201
Tabelle 10.30: Ergebnisse Δ 9-THC-D ₃ , THC-OH und THC-COOH aus Serum.....	205
Tabelle 10.31: Ergebnisse Δ 9-THC-D ₃ , THC-OH, THC-COOH aus Urin.....	206
Tabelle 10.32: Ergebnisse Δ 9-THC-D ₃ , THC-OH, THC-COOH aus Speichel.....	207
Tabelle 10.33: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Cannabinoide.....	208
Tabelle 10.34: Ergebnisse Nachhaltigkeit Cannabinoide nicht normalisiert.....	209
Tabelle 10.35: Probenvorbereitungsmethoden Benzoesäuren	210
Tabelle 10.36: Probenvorbereitungsmethode Bestimmung von Benzoesäuren aus Wasserproben	210
Tabelle 10.37: Materialverzeichnis Benzoesäuren aus Wasser	211
Tabelle 10.38: Analytik Parameter Benzoesäuren	213
Tabelle 10.39: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzoesäuren Teil 1	215
Tabelle 10.40: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzoesäuren Teil 2	215
Tabelle 10.41: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzoesäuren Teil 3	216
Tabelle 10.42: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzoesäuren.....	217
Tabelle 10.43: Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzoesäuren nicht normalisiert.....	218
Tabelle 10.44: Probenvorbereitungsmethoden Antikörper	219
Tabelle 10.45: Probenvorbereitungsmethode IgG-Aufreinigung RoboColumns	220
Tabelle 10.46: Probenvorbereitungsmethode IgG-Aufreinigung PreDicator Plates	221
Tabelle 10.47: Materialverzeichnis IgG mit RoboColumns	222
Tabelle 10.48: Materialverzeichnis IgG mit PreDicator Plates	223
Tabelle 10.49: Methodenparameter IgG.....	224
Tabelle 10.50: Zusammenfassung der Ergebnisse Antikörperaufreinigung.....	226
Tabelle 10.51: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Antikörper	227
Tabelle 10.52: Ergebnisse Nachhaltigkeit Antikörper nicht normalisiert.....	228

Anhangsverzeichnis

10.1	Bioanalytische Probenvorbereitung	172
10.2	Anhang Systemkonzept.....	173
10.3	Anhang Bewertung des Automationssystems	174
10.4	Anhang Benzodiazepine.....	178
10.4.1	Methoden und Parameter Benzodiazepine	178
10.4.2	Analytik Benzodiazepine.....	182
10.4.3	Ergebnisse Benzodiazepine Platten	186
10.4.4	Ergebnisse Benzodiazepine Kartuschen	189
10.4.5	Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzodiazepine	192
10.4.6	Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzodiazepine.....	192
10.5	Anhang Cannabinoide	193
10.5.1	Methoden und Parameter Cannabinoide.....	193
10.5.2	Analytik Cannabinoide	201
10.5.3	Ergebnisse Cannabinoide.....	202
10.5.4	Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Cannabinoide.....	208
10.5.5	Ergebnisse Nachhaltigkeit Cannabinoide	209
10.6	Anhang Benzoessäuren	210
10.6.1	Methoden und Parameter Benzoessäuren.....	210
10.6.2	Analytik Benzoessäuren	212
10.6.3	Ergebnisse Benzoessäuren.....	214
10.6.4	Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzoessäuren.....	217
10.6.5	Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzoessäuren	218
10.7	Anhang Antikörper	219
10.7.1	Methoden und Parameter Antikörper.....	219
10.7.2	Analytik Antikörper	224
10.7.3	Ergebnisse Antikörper	225
10.7.4	Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Antikörper	227
10.7.5	Ergebnisse Nachhaltigkeit Antikörper.....	228

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung Deutsch (Englische Übersetzung)
A	Extinktion
A ₀	Anschaffungsauszahlung
AB	Antikörper (Antibody)
AC	Affinitätschromatographie
ACN	Acetonitril
AGREE	Analytical GREENness Calculator
ALP	Position auf dem Deck eines Liquid-Handling-Systems (Automated Labware Position)
A _t	jährliche Abschreibung
BSA	Bernsteinsäure
C18	Octadecyl-Kohlenstoffkette
C8	Octyl-Kohlenstoffkette
CV	Variationskoeffizient (Coefficient of Variation)
d	optische Weglänge
DB	Deckungsbeitrag
DB _{rel}	relativer Deckungsbeitrag
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
DZ	Durchlaufzahl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisierung
Evap.	Evaporation
FAMSA	Fully Automated MS Analyzer
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAC	Grüne Analytische Chemie (Green Analytical Chemistry)
GAPI	Index für grüne Analyseverfahren (Green Analytical Procedure Index)
GC	Gaschromatographie (Gas Chromatography)
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Gas Chromatography Mass Spectrometry)
GC-MS/MS	Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry)
H ₂ O	Wasser
HCOOH	Ameisensäure
HF-LPME	Hohlfaser-Flüssigphasenmikroextraktion (Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction)

Abkürzung	Bedeutung Deutsch (Englische Übersetzung)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-DAD	Hochleistungsflüssigchromatographie-Absorptionsspektroskopie mit Dioden Array Detektor (High Performance Liquid Chromatography with UV Detection and Diode Array Detector)
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry)
HPLC-UV	Hochleistungsflüssigchromatographie-Absorptionsspektroskopie (High Performance Liquid Chromatography with UV Detection)
i	kalkulatorischer Zinssatz
IEC	Ionenaustauschchromatographie (Ion Exchange Chromatography)
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IQR	Interquartilabstand
K_B	Betriebskosten
K_E	Energiekosten
K_{Fix}	Fixkosten
K_G	Gesamtkosten pro Jahr
K_I	Instandhaltungskosten
K_M	Materialkosten, Kosten für Verbrauchsmaterialien
K_P	Personalkosten
K_S	Kosten pro Probe
L_0	Liquidationserlös
LC	Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography)
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (Liquid Chromatography Mass Spectrometry)
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry)
LC-MS/MS-ESI	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisierung
LC-Q-TOF-MS	Flüssigchromatographie-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (Liquid Chromatography Quadrupol Time of Flight Mass Spectrometry)
LC-UV-VIS	Flüssigchromatographie-Absorptionsspektroskopie
LHS	Liquid-Handling-System
LIVP	Laborinterne Vergleichspräzision (Within-laboratory Precision)
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid Liquid Extraction)
LOD	Nachweisgrenze (Limit of Detection)
LOD_m	methodische Nachweisgrenze (Methodical Limit of Detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification)
LOQ_m	methodische Bestimmungsgrenze (Methodical Limit of Quantification)

Abkürzung	Bedeutung Deutsch (Englische Übersetzung)
LPME	Flüssigphasen-Mikroextraktion (Liquid Phase Microextraction)
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mAB	monoklonaler Antikörper (Monoclonal Antibody)
MC-Pod	Mehrkanal-Pipettierkopf (Multichannel-Pod, auch Multichannel-Head)
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Methanol
MEPS	Mikroextraktion mit gepacktem Sorptionsmaterial (Microextraction by Packed Sorbent)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
N	Normal
n	Probenzahl
N ₂	Stickstoffstrom
NaOH	Natriumhydroxid
NEMI	Nationaler Umwelt Index (National Environmental Index)
NPV	Kapitalwert (Net Present Value)
P	Einnahmen
PBS-Puffer	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PPT	Proteinfällung (Protein Precipitation)
PT-SPE	Pipettenspitzen-Festphasenextraktion (Pipette Tip Solid Phase Extraction)
PT- μ SPE	Pipettenspitzen-Mikrofestphasenextraktion (Pipette Tip Micro Solid Phase Extraction)
PV	Probenvorbereitung
PZ	Mindestprobenzahl
Q	Quadrupol
Q-TOF	Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (Quadrupol Time of Flight Mass Spectrometer)
QQQ	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Triple Quadrupol Mass Spectrometer)
Q1	1. Quartil
Q3	3. Quartil
R	Wiederfindungsrate (Recovery Rate)
r	Rotorradius
RIA	Radioimmunoassay
RK	Rekonstitution
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions Per Minute)

Abkürzung	Bedeutung Deutsch (Englische Übersetzung)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
SALLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Aussalzen (Salting-out assisted Liquid Liquid Extraction)
SAMSHA	Gesellschaft für Drogenmissbrauch und psychische Gesundheit (Substance Abuse and Mental Health Service Administration)
SBSE	Rührstab-Sorbitionsextraktion (Stir-Bar Sorptive Extraction)
SCARA	Selective Compliance Assembly Robot Arm
SEC	Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography)
SLE	Vereinfachte Flüssig-Flüssig-Extraktion (Simplified Liquid Extraction, Supported Liquid Extraction)
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Microextraction)
SULLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Zucker (Sugaring-out assisted Liquid Liquid Extraction)
t	Periode
THC-COOH	11-nor-Carboxy-Delta-9-Carboxy-Tetrahydrocannabinol
TLA	Totale Laborautomation
TOF	Flugzeit (Time of Flight)
UV	Ultraviolett
VF	Verdünnungsfaktor, Aufkonzentrationsfaktor
\bar{x}	Mittelwert
Z_K	jährlichen kalkulatorischen Zinsen
$ZnSO_4$	Zinksulfat
Δ^9 -THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol
Δ^9 -THC-D ₃	Delta-9-Tetrahydrocannabinol deuteriert
Δ^9 -THC-OH	Delta-9-Hydroxy-Tetrahydrocannabinol
Δ^9 -THCA-A	Delta-9-Tetrahydrocannabinolsäure A
ε	Extinktionskoeffizient
μ SPE	Mikrofestphasenextraktion (Micro Solid Phase Extraction)
σ	Standardabweichung
2-MBA	2-Methylbenzoesäure
2,3-DMBA	2,3-Dimethylbenzoesäure
2,4-DMBA	2,4-Dimethylbenzoesäure
2,5-DMBA	2,5-Dimethylbenzoesäure
2,6-DMBA	2,6-Dimethylbenzoesäure
3-MBA	3-Methylbenzoesäure
3,4-DMBA	2,4-Dimethylbenzoesäure

Abkürzung	Bedeutung Deutsch (Englische Übersetzung)
3,5-DMBA	3,5-Dimethylbenzoesäure
4-MBA	4-Methylbenzoesäure

1. Einleitung

Vor dem Hintergrund des demographischen Wandels, Pandemien und eines steigenden Gesundheitsbewusstseins wächst auch der Bedarf an Laboranalysen. Steigende Kosten und eine Verschärfung des Fachkräftemangels erhöhen gleichzeitig den Druck auf kleine und mittlere Labore und führen zunehmend zu Marktkonsolidierungen [1]. Dabei sind dezentrale Konzepte ein wesentliches Element zur Sicherstellung einer bedarfsgerechten Versorgung.

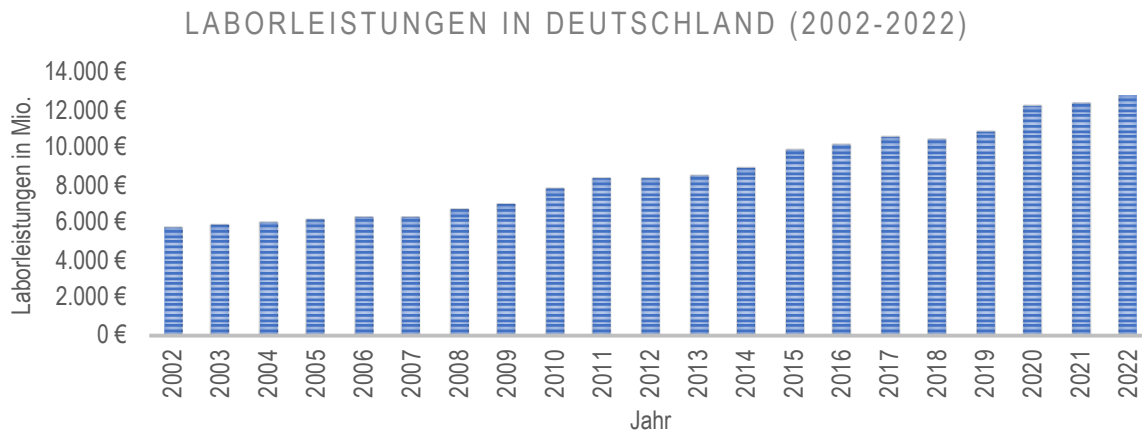


Abbildung 1.1: Laborleistungen in Deutschland 2002–2022, Quelle: Statistisches Bundesamt, eigene Darstellung der Daten [2]

Der Einsatz von Automationssystemen in Laboren kann die Effizienz, Produktivität und Qualität der benötigten Analysen signifikant erhöhen [3, 4]. In Laborprozessen entfallen aufgrund einer zunehmend effizienteren Analytik ca. 60 Prozent des Gesamtzeitbedarfs auf die Probenvorbereitung, was diese zum Engpass im Laborprozess macht [5, 6]. Besonders bei den komplexen bioanalytischen Proben ist der erforderliche Arbeitsaufwand zur Aufreinigung der Proben hoch, da zahlreiche Teilschritte, eine Vielzahl an benötigten Geräten, Gefäßen und Reagenzien eine aufwendige Probenvorbereitung bedingen [7]. Die Automatisierung dieser Prozesse ist daher besonders wünschenswert, stellt zugleich jedoch auch eine erhebliche Herausforderung dar. Es existieren zahlreiche, hochspezialisierte Automationssysteme [8-11]. Die hohen Investitionskosten für diese spezialisierten Systeme sind jedoch für Labore mit geringen Probenzahlen oder wechselnden Prozessen ein Hindernis bei der Einführung von Automationslösungen [12, 13]. Demzufolge werden für kleine und mittlere bioanalytische Labore alternative, wirtschaftliche Automationskonzepte benötigt.

Zur Einführung in das bioanalytische Anwendungsgebiet werden im Stand der Technik (Kapitel 2) typische bioanalytische Matrices charakterisiert, häufig eingesetzte und nachfolgend zu automatisierende Probenvorbereitungstechniken vorgestellt sowie das Zusammenspiel bei der Auswahl von Probenvorbereitungsmethode, Messtechnik und der Eigenschaften der Matrix und des Analyten herausgearbeitet. Im zweiten Teil dieses Kapitels werden grundlegende Klassifizierungs- und Charakterisierungsmöglichkeiten von Automationssystemen vorgestellt, gefolgt von einer Darstellung des aktuellen Stands der Laborautomatisierung sowie der dazugehörigen Automationskonzepte.

In Kapitel 3 werden die Erkenntnisse des Stands der Technik zusammengefasst und das Ziel der Dissertation – die Entwicklung eines allgemein einsetzbaren Automationskonzepts für die bioanalytische Probenvorbereitung – genau definiert. Die Erstellung des Automationskonzepts erfordert eine detaillierte Analyse der zu automatisierenden Prozesse, um aus der Vielzahl bestehender Automationslösungen ein bedarfs- und anforderungsgerechtes Automationskonzept zu entwickeln, was in Kapitel 4 behandelt wird. In Kapitel 5 werden die zur Bewertung des realisierten Automationskonzepts angewandten Methoden vorgestellt. Die drei Hauptbewertungskriterien sind die Qualität der Prozessergebnisse, die Kosten und die Nachhaltigkeit des realisierten Systems. Die Ergebnisse der Realisierung des entworfenen Automationskonzepts werden in Kapitel 6 anhand von vier beispielhaften Anwendungen vorgestellt. Nach der Realisierung der vier Anwendungen erfolgt die Überprüfung des Gesamtkonzepts in Hinblick auf seine Eignung zur Sicherstellung der Wettbewerbsfähigkeit kleiner und mittlerer bioanalytischer Labore in Kapitel 7. Kapitel 8 fasst die Ergebnisse der Arbeit zusammen und gibt einen Ausblick auf weitere Arbeiten.

2. Stand der Technik

2.1 Bioanalytik

2.1.1 Einordnung der Bioanalytik in die Life Sciences

Der Begriff „Life Sciences“ oder „Lebenswissenschaften“ umfasst ein breites Themengebiet aus den Bereichen der Bio-Medizin, Bio-Chemie, Bio-Physik und Bio-Informatik, deren Gemeinsamkeit der biotechnologische Bezug ist. Typische Anwendungsgebiete sind die Arzneimittelforschung, die Genomik, Proteomik und Metabolomik, die medizinische Versorgung sowie die Umwelt- und Lebensmittelwissenschaften.

Zwei große Teilgebiete aus den Life Sciences sind die Bioanalytik und das Bioscreening. Ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Analyten wie Antikörpern, Antigenen, Lipiden oder Harnstoff aus diesen Bereichen sind Laboruntersuchungen. Dabei können sich die Prozessmerkmale von Bioscreening- und Bioanalytik-Untersuchungen deutlich unterscheiden [3, 14, 15].

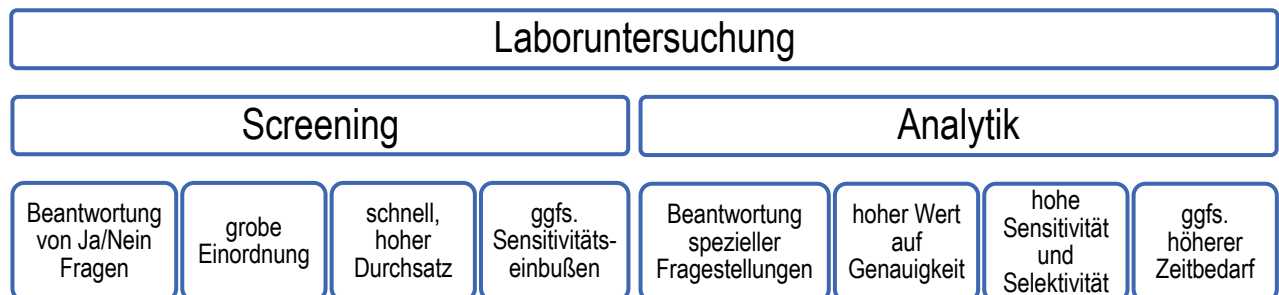


Abbildung 2.1: Überblick Bioscreening und Bioanalytik

„To screen“ bedeutet selektieren, rastern, aussieben, durchleuchten oder filtern [16]. Das Ziel von Screening-Methoden besteht in der Verschaffung eines Überblicks oder einer groben Einordnung. Die Schnelligkeit der Beantwortung von Fragestellungen nimmt in Screening-Methoden einen hohen Stellenwert ein, z.B. um eine große Probenzahl zu untersuchen, einen hohen Durchsatz zu erzielen oder um sehr schnell Einzelergebnisse zu erhalten [17, 18]. Typische Beispiele für Screening-Methoden sind pharmazeutische Hochdurchsatzscreenings zur Entwicklung neuer Wirkstoffe, immunologische Schnelltests, wie der SARS-CoV-2-Antigen-Schnelltest, oder Drogentests der Polizei [19-21].

Im Gegensatz dazu liegt das Ziel analytischer Methoden in der genauen Beantwortung von Fragestellungen. Hoher Sensitivität und Selektivität wird mehr Bedeutung zugemessen. Der Zeitbedarf der Methode darf höher sein. Hier kann beispielsweise das Testergebnis eines Schnelltests mittels eines spezifischeren Verfahrens, wie einer chromatographiegekoppelten massenspektrometrischen Methode, bestätigt oder konkretisiert werden, indem die Menge der vorhandenen Antikörper oder die Drogenkonzentration im Blut oder einer anderen Matrix bestimmt wird [22-26]. Die Erhöhung der Genauigkeit, Sensitivität und Selektivität wird in bioanalytischen Methoden sowohl durch das Messverfahren als auch durch den gezielten Einsatz von Probenvorbereitungsverfahren erreicht. Ein Beispiel ist der Einsatz einer Festphasenextraktion zur Extraktion und Anreicherung der Analyten und

Entfernung von Störsubstanzen [27-31]. Dies führt zu einer Erhöhung des Prozessaufwands, was zu einer Steigerung des Zeitbedarfs und der Kosten führt. Die Erhöhung des Aufwands im Vergleich zu Screening-Anwendungen wird in Abbildung 2.2 durch die Gegenüberstellung einer bioanalytischen Methode und eines Screening-Assays zur Cannabinoid-Bestimmung in Urinproben veranschaulicht [32, 33]. Der erforderliche Zeitaufwand für das Screening-Assay beträgt ca. 140 min im Vergleich zu einem Zeitaufwand von ca. 280 min für die bioanalytische Methode.

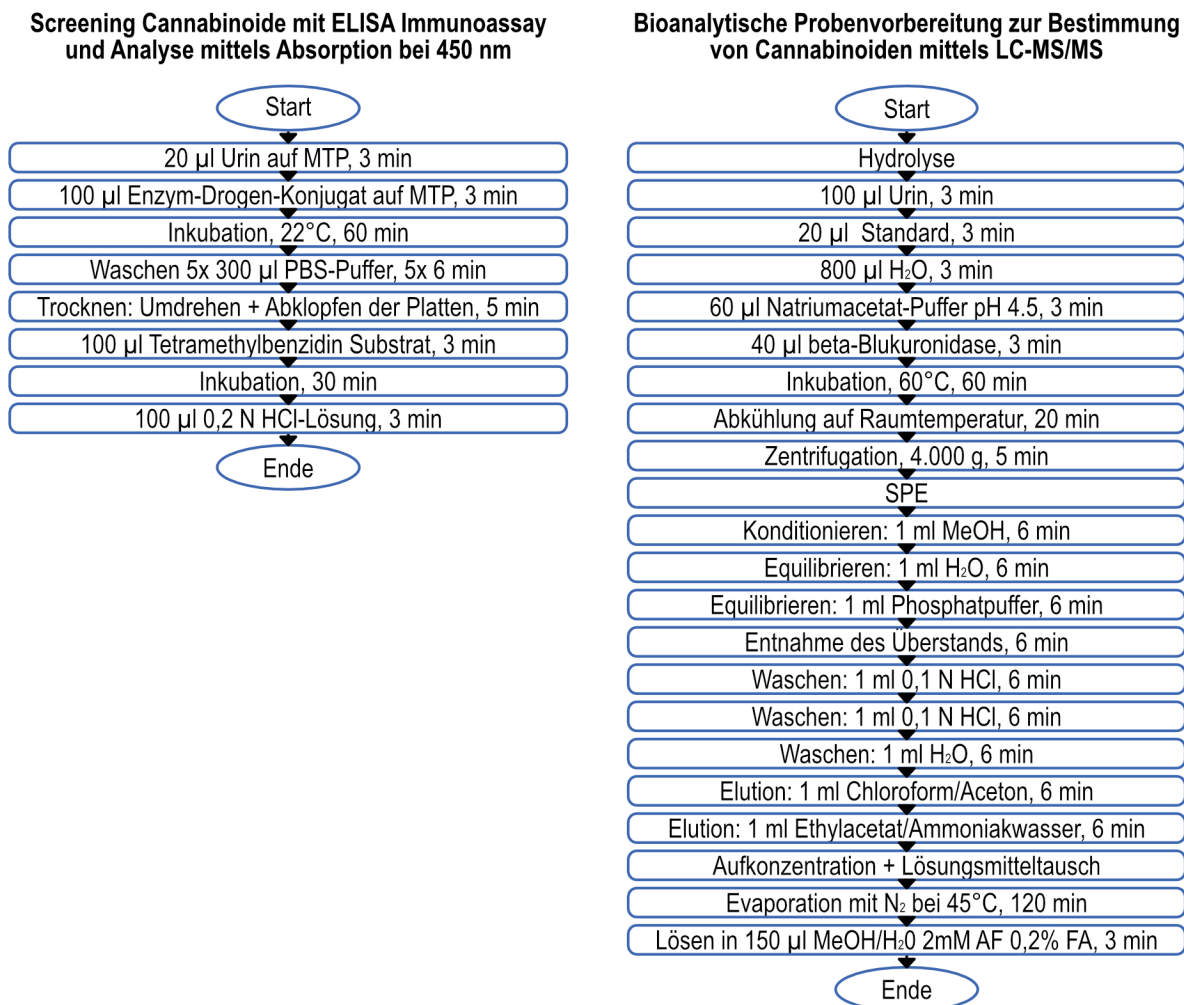


Abbildung 2.2: Vergleich Prozesslängen Bioscreening/ Bioanalytik

Typische Kennzeichen von Bioscreening-Anwendungen sind weiterhin die überwiegende Verwendung des Standardformats der Mikrotiterplatte mit 96-, 384- oder 1.536-Wells, einfache Verschlüsse durch Deckel oder Folien, milde chemische Bedingungen mit wässrigen Lösungsmitteln oder Puffern, unkomplizierte Prozessabläufe, die im Wesentlichen aus Pipettier-, Inkubations- und Durchmischungsschritten bestehen sowie der Einsatz optischer, hochparallelisierbarer Messverfahren. Im Gegensatz dazu sind bioanalytische Anwendungen durch komplexere Prozesse wie Extraktionen, Filtrationen, Derivatisierungen oder auch die Handhabung von Einzelproben gekennzeichnet. Diese erfordern häufig den Einsatz von Spezialvials und -tubes in unterschiedlichen Formen und Volumina (0,1 ml bis z.B. 50 ml). Die Gefäßverschlüsse sind mit Schraub-, Crimp- oder Schnappdeckeln

dementsprechend vielfältig. Beim Pipettieren müssen neben wässrigen Lösungsmitteln auch anspruchsvollere Reagenzien wie organische Lösungsmittel mit hohen Dampfdrücken oder Säuren und Laugen mit ätzenden Eigenschaften dosiert werden. Die Bestimmung erfolgt häufig sequenziell und quantitativ mit komplexen Messverfahren wie der chromatografiegekoppelten Massenspektrometrie [34]. Nachfolgend werden die Bestandteile bioanalytischer Methoden, typische Matrices, Probenvorbereitungsmethoden sowie relevante Analytikmethoden, analytenunabhängig genauer untersucht.

2.1.2 Bioanalytische Matrices

Typische Matrices in der Bioanalytik sind Blut, Blutplasma und -serum sowie Gewebeproben. Aber auch Matrices wie Urin, Speichel, Schweiß und Haare werden aufgrund der Nicht-Invasivität der Entnahme immer häufiger untersucht [35]. In der Proteinanalytik spielen Zellkulturmedien eine wichtige Rolle. Die Zusammensetzungen und die Eigenschaften der Matrices variieren in Abhängigkeit ihrer Funktionalität stark und sind gleichzeitig ein entscheidendes Kriterium bei der Auswahl der Probenvorbereitungsmethode, um den Bestandteil der Matrix von Interesse – den „Analyten“ – von allen weiteren Matrixbestandteilen zu trennen und eine sensitive und störungsfreie Analytik zu ermöglichen. Daher erfolgt die Charakterisierung der bioanalytischen Matrices anhand ihrer Zusammensetzung sowie für den Laborprozess, die Analyse und Interpretation des Ergebnisses relevanter Faktoren.

2.1.2.1 Blut, Serum und Plasma

Blut besteht aus zellulären und nicht-zellulären, flüssigen Komponenten. Zu den zellulären Bestandteilen (ca. 55%) des Blutes zählen die Erythrozyten, die Thrombozyten und die Leukozyten. Das Blutplasma (ca. 45%) ist der zellfreie, flüssige Anteil des Blutes und wird mittels Zentrifugation gewonnen [36, 37]. Hauptbestandteil des Blutplasmas ist Wasser. Im Wasser gelöst sind Elektrolyte wie Natrium-, Kalium-, Kalzium-, Magnesium-, Chlorid-, Bikarbonat- und Phosphat-Ionen, niedermolekulare Stoffe wie Glukose, Harnstoff und Kreatinin sowie verschiedenste Proteine [37].

Hauptproteinfraktionen sind das Albumin und die Globuline. Fibrinogen gehört zu den Globulinen und wird während der Blutgerinnung verbraucht. Blutserum entsteht nach der Zentrifugation des geronnenen Bluts [38].

Bei der Entnahme von Blutplasma wird die Gerinnung durch den Zusatz von Antikoagulantien wie EDTA, Citrat oder Heparin verhindert [39]. Das eingesetzte Antikoagulant beeinflusst die Proteinzusammensetzung [40, 41], ebenso wie die zur Plasma- und Serumgewinnung eingesetzte Zentrifugation. Der Scherstress löst Mikropartikel aus der Plasmamembran und erhöht die prokoagulatorische Aktivität der Thrombozyten [41]. Ein weiterer Unterschied bei der Plasma- und Serumgewinnung ist der Zeitbedarf. Plasma kann sofort zentrifugiert werden, während die künftige Serumprobe zur Ermöglichung des Ablaufs der Koagulation mindestens eine Stunde ruht [42].

Das Blut ist Träger zahlreicher Biomarker. Biomarker sind messbare Merkmale für physiologische oder pathologische Prozesse oder Merkmale von Reaktionen auf pharmakologische oder therapeutische Maßnahmen. Die Auswahl der zu bestimmenden Biomarker ist abhängig von der Fragestellung. Typische

klinische Biomarker aus Blut sind hämatologische Parameter wie die Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und der Hämatokrit, Elektrolyte wie Natrium, Kalium und Kalzium, oder organspezifische Parameter wie die Herzenzyme Troponin und Kreatinkinase, Tumormarker wie das Alpha-Fetoprotein, oder das Hormon Beta humanes Choriongonadotropin [40, 473].

2.1.2.2 Urin

Die Hauptbestandteile von Urin sind Wasser, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, Proteine (Albumin, Immunoglobulin, Bilirubin, Urobilinogen), Glukose, Zellen (z.B. Erythrozyten und Leukozyten), Bakterien, anorganische Salze und weitere Stoffwechselmetaboliten, welche häufig glukuronidiert oder sulfoniert vorliegen [43, 44].

Biomarker aus dem Urin werden zur Diagnose von Nieren- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Diabetes und Infektionen insbesondere zur Früherkennung eingesetzt [45, 46].

In der Forensik wird Urin u.a. zum Nachweis eines Alkohol-, Cannabinoid-, Kokain-, Benzodiazepin- oder Opiodmissbrauchs verwendet [47].

Wesentliche Vorteile der Matrix Urin sind die einfache, nicht invasive, kostengünstige Probennahme, die hohe verfügbare Probenmenge sowie die weniger komplexe Zusammensetzung des Urins im Vergleich zu anderen Matrices [46]. Allerdings unterliegt die Zusammensetzung des Urins in Abhängigkeit von Tageszeit, Hydrierung und Ernährungsstatus starken Schwankungen [48]. Zudem besteht die Gefahr der Alduteration (Verfälschung, Verunreinigung), was wiederum eine aufwendigere Untersuchung der Proben zum Ausschluss von Manipulationen erfordert [49].

2.1.2.3 Speichel

Speichel besteht zu 99% aus Wasser, in welchem zahlreiche Stoffe gelöst sind. Dazu gehören Elektrolyte wie Chlorid-, Bikarbonat-, Natrium-, Kalium-, Kalzium-, Fluorid-, Jodid-, Magnesium-, Phosphat-, Ammonium- und Sulfat-Ionen, Proteine wie Mucin, Enzyme, Kathelicidine und Immunglobuline, kleinere Moleküle wie Stickstoff, Urea, Kreatinin, Sialinsäure, Glukose, Aminosäuren, Lipide und Hormone wie Cortisol, Estradiol, Thyroxin und Testosteron [50-53].

Die Probennahme von Speichel ist einfach, kostengünstig und nicht invasiv. Allerdings unterliegt die Zusammensetzung und Menge von Speichel ebenso wie bei Urin starken Schwankungen. Auch hier ist die Dokumentation der Probennahme und die Bestimmung von Konzentrationsmarkern wichtig [54, 55]. Speichel wird insbesondere in der Anti-Doping-Kontrolle und der Forensik als Matrix verwendet, aber auch die Bestimmung von infektiologischen, karzinogenen, renalen und metabolischen Biomarkern gewinnt zunehmend an Bedeutung [56-59].

2.1.2.4 Weitere körpereigene Matrices

Schweiß [60-62], Liquor, Tränenflüssigkeit, Sputum, Cerumen, Muttermilch, Fruchtwasser sowie Gallen- und Gelenkflüssigkeit sind weitere Körperflüssigkeiten, die als Probenmatrix zur Verfügung stehen. Diese werden jedoch seltener, beispielsweise zur Alzheimer-Diagnose, zur Bestimmung des Drogenkonsums post mortem oder zur Bestimmung von lokalen inflammatorischen Aktivitäten, genutzt [7, 63].

Zu den festen Matrices zählen Haare, Nägel, Knochen, Haut und andere Gewebeproben, die im Unterschied zu flüssigen Proben vor der weiteren Probenvorbereitung einem Zerkleinerungsprozess durch Schneiden, Zermahlen und Pulverisieren unterzogen werden müssen, jedoch im Vergleich zu den Körperflüssigkeiten die Möglichkeit eines längerfristigen Nachweises, beispielsweise eines vorangegangenen Drogenkonsums, bieten [54].

2.1.2.5 Zellkulturmedium und Zellkulturüberstand

Im Gegensatz zu den zuvor genannten, natürlich in Organismen vorkommenden Matrices, handelt es sich bei dem Zellkulturmedium um eine artifizielle Matrix. Zellkulturmedien werden in Zellkulturen zur Herstellung eines lebensechten Milieus eingesetzt, um durch die Bereitstellung aller notwendigen Substanzen ein *in vitro* Wachstum von Zellen zu ermöglichen [64]. Typische Bestandteile von Zellkulturmedien sind Aminosäuren wie Glutamin, Lysin, Leucin, Tyrosin, Valin, Threonin oder Phenylalanin, Salze wie Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Kalziumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat oder Magnesiumsulfat, Vitamine wie Folsäure, Niacinamid, Thiamin, Cholinchlorid oder Vitamin B12 und Energieträger wie Glukose, Glutamin und Natriumpyruvat, Linolsäure oder Farbstoffe wie Phenolrot [65, 66]. Mit der Zusammensetzung des Zellkulturmediums können Zellfunktionen wie die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung oder Produktion angeregt werden. Typische kommerzielle Beispiele sind MEM (Minium Essential Medium), DMEM (Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium), Glasgow-MEM und Ham's F-12 Nutrient Mixture [67-69]. Neben dem Zellkulturmedium besteht der Zellkulturüberstand aus Zellen und Zellbestandteilen. Für die Auswahl der Probenvorbereitungsmethode ist dabei die Wachstumsart der Zellen, welche adhärent an Oberflächen wachsend oder in Suspension schwimmend sein kann, von Bedeutung [70]. Folglich ist auch der Zellkulturüberstand eine komplexe Matrix mit variabler Zusammensetzung.

2.1.3 Grundlegende Probenvorbereitungstechniken in der Bioanalytik

Das Ziel der Probenvorbereitung ist die Überführung der in einer Probe vorliegenden Analyten in einen Zustand, in dem diese an einem ausgewählten Messgerät nachweisbar sind. Dieses Ziel kann durch Probenvorbereitungstechniken zur Aufkonzentration, Stabilisierung oder Volatilitätserhöhung der Analyten sowie durch Techniken zur Entfernung von Matrixbestandteilen erreicht werden [71]. Im Nachfolgenden werden typische bioanalytische Probenvorbereitungstechniken wie die Verdünnung, die Proteinfällung, die Zentrifugation, die Evaporation und verschiedene Extraktionstechniken vorgestellt.

2.1.3.1 Verdünnung der Probe

Die Verdünnung, auch „Dilute- and Shoot-Ansatz“ genannt, ist die einfachste Probenvorbereitungstechnik. Dabei wird der Probe ein Verdünnungs- oder Lösungsmittel hinzugefügt, um die Konzentration von Salzen, Proteinen oder Phospholipiden zu senken und Matrixeffekte zu reduzieren. Allerdings wird dabei auch die Konzentration des Analyten selbst gesenkt, wodurch die Sensitivität sinkt. Daher eignet sich diese Methode nur für Proben mit hohen Analytkonzentrationen. Die Verdünnung wird häufig für Urinproben verwendet und selten bei Serum-, Plasma- oder Blutproben [7].

2.1.3.2 Hydrolyse

Zur Verhinderung der Akkumulation von lipophilen Xenobiotika im menschlichen Körper, wie Medikamenten und Drogen (z.B. $\Delta 9$ -THC), werden die funktionellen Gruppen der Xenobiotika durch Anlagerung von Glukuronid-, Sulfat-, Acetyl- oder Methyl-Gruppen chemisch maskiert (konjugiert), wodurch die Polarität und Wasserlöslichkeit und damit die Ausscheidungsfähigkeit der Moleküle über die Nieren steigen [72]. Zur Bestimmung des ursprünglichen Moleküls können diese Konjugate im Rahmen der Probenvorbereitung von Urinproben mittels Hydrolyse abgespalten werden. Dazu stehen enzymatische, alkalische oder saure Hydrolysen zur Verfügung [73]. Die Hydrolyse erfolgt durch den Zusatz von Reagenzien wie Natriumhydroxid [74], Kaliumhydroxid [75], Ammoniak [76], Salzsäure [77] oder Enzymen wie β -Glukuronidase oder Arylsulfatase [78, 79].

Die Kombination der enzymatischen und sauren oder alkalischen Hydrolyse kann zu einer optimierten Konjugatabspaltung führen [80-82].

Zur Verhinderung der Kontamination von empfindlichen Messgeräten durch die zur Hydrolyse eingebrachten Enzyme oder starken Salze werden Hydrolysen in der Regel mit weiteren probenvorbereitenden Maßnahmen wie der Flüssig-Flüssig-Extraktion oder der Festphasenextraktion kombiniert [83].

2.1.3.3 Filtration

Die Filtration ist ein Verfahren zur Abscheidung von Feststoffen aus Flüssigkeiten und wird in biologischen Matrices häufig zur Entfernung von zellulären Komponenten oder Proteinen verwendet. In Abbildung 2.3 ist ein Filtrationsprozess schematisch dargestellt. Die Abscheidung ist abhängig vom Zusammenspiel der Filter- und Moleküleigenschaften, wie der Hydrophilie oder Hydrophobie, und dem Porendurchmesser bzw. der Molekülgröße [84]. Anhand der Porengröße erfolgt die Klassifikation der Filtration zum Beispiel in Nanofiltration (1–10 nm), Ultrafiltration (0,01–0,1 μm) und Mikrofiltration (0,1–20 μm) [85, 86].

Zur Beschleunigung der Filtration kann zentrifugiert, Überdruck oder Vakuum angelegt werden. In der Automatisierung werden häufig Filter im Mikrotiterplattenformat eingesetzt, was zu einer Erhöhung des Probendurchsatzes führt [87].

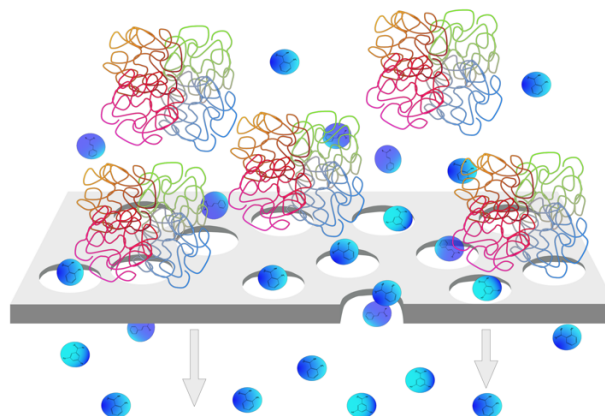


Abbildung 2.3: Schema eines Filtrationsprozesses

2.1.3.4 Zentrifugation

Bei der Zentrifugation erfolgt eine Beschleunigung der Sedimentation durch Anwendung der Zentrifugalkraft und eine Trennung von Probenbestandteilen anhand ihrer Dichte oder Größe [88]. Die Zentrifugation wird beispielsweise zur Trennung von zellulären und nicht-zellulären Blutbestandteilen zur Gewinnung von Plasma oder Serum verwendet. Die Sedimentationsdauer ist abhängig von der Leistungsfähigkeit einer Zentrifuge, welche durch die relative Zentrifugalbeschleunigung beschrieben wird. Die relative Zentrifugalbeschleunigung wird als Vielfaches der Erdbeschleunigung g beschrieben und ist abhängig vom Rotorradius r sowie der Anzahl der Umdrehungen pro Minute rpm (siehe nachfolgende Gleichung) [89, 90].

$$\text{relative Zentrifugalbeschleunigung} = g = 1,119 * 10^{-5} * r * rpm^2 \quad (2.1)$$

$$\text{Sedimentationsdauer} = \frac{1}{\text{relative Zentrifugalbeschleunigung}} \quad (2.2)$$

In Hinblick auf die Automatisierung ist die Größe einer Zentrifuge und damit der Rotorradius ein wichtiger Faktor, da die Integrierbarkeit einer Zentrifuge in Automationssysteme wie Liquid-Handling-Systeme mit begrenzter Platzkapazität von ihrer Größe abhängt. Ein weiterer Einflussfaktor ist die Analytgröße. Hochmolekulare Stoffe wie große Proteine (Kilo-Dalton-Bereich), Viren, Zellorganellen (Mega-Dalton) und DNA (menschlich, Tera-Dalton) benötigen höhere relative Zentrifugalbeschleunigungen zur erfolgreichen Trennung als kleine Moleküle (Dalton-Bereich) [91]. Eine Übersicht der unterschiedlichen Molekülgrößen befindet sich in Anhang 10.1 in Tabelle 10.1.

2.1.3.5 Proteinfällung

Die Proteinfällung (Protein Precipitation, PPT) ist eine schnelle und einfache Technik zur Entfernung von Proteinen aus biologischen Matrices durch die Zugabe eines Fällungsreagenzes [92]. Am häufigsten werden organische Lösungsmittel wie Acetonitril und Methanol, Säuren wie Trichloressigsäure oder Salze wie Zinkhydroxid als Fällungsreagenzien eingesetzt [93, 94]. Die denaturierten Proteine aggregieren in Form eines sichtbaren Niederschlags, welcher durch den Einsatz einer Filtration oder einer Zentrifugation vom Überstand getrennt wird [95, 96]. Bei der Auswahl des Fällungsreagenzes sind der zu isolierende Analyt sowie die nachfolgende Analytik zu beachten, da beispielsweise Protein-Analyten durch den Einsatz von Trichloressigsäure ihre biologische Aktivität verlieren. Darüber hinaus kann es dazu kommen, dass Analyten durch ihre Bindung an Plasmaproteine mit ausgefällt werden oder zur Fällung verwendete Salze und nicht entfernte Matrixbestandteile das nachfolgende Massenspektrometer verunreinigen oder zu starken Interferenzen führen [97]. Da die Proteinfällung zudem stets auch eine Verdünnung der Probe darstellt, wird diese Technik in der Regel im ersten Schritt einer Probenvorbereitungsmethode zur breiten, nicht selektiven Entfernung von Proteinen eingesetzt [27].

2.1.3.6 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid Liquid Extraction, LLE) erfolgt die Entfernung störender Matrixkomponenten durch Überführung des Analyten in eine andere Phase, wohingegen ungewollte Matrixkomponenten in der Ursprungsphase verbleiben. Dies erfolgt unter Ausnutzung der unterschiedlichen Löslichkeit des Analyten in zwei nicht miteinander mischbaren, flüssigen Phasen. Dazu wird der wässrigen biologischen Probe ein organisches Lösungsmittel hinzugefügt (siehe Abbildung 2.4). Anschließend werden beide Phasen vermisch (z.B. durch Schütteln), um den Phasenwechsel des Analyten zu ermöglichen. Nach dem Schütteln werden die beiden unterschiedlich dichten Phasen beispielsweise mithilfe eines Scheidetrichters oder durch Entnahme des Überstands getrennt [98]. Zur Steigerung der Extraktionseffizienz können Zucker oder Salze, wie bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Zucker oder der Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Aussalzens (Sugaring-out assisted Liquid Liquid Extraction, SULLE und Salting-out assisted Liquid Liquid Extraction, SALLE), verwendet werden [97, 99, 100].

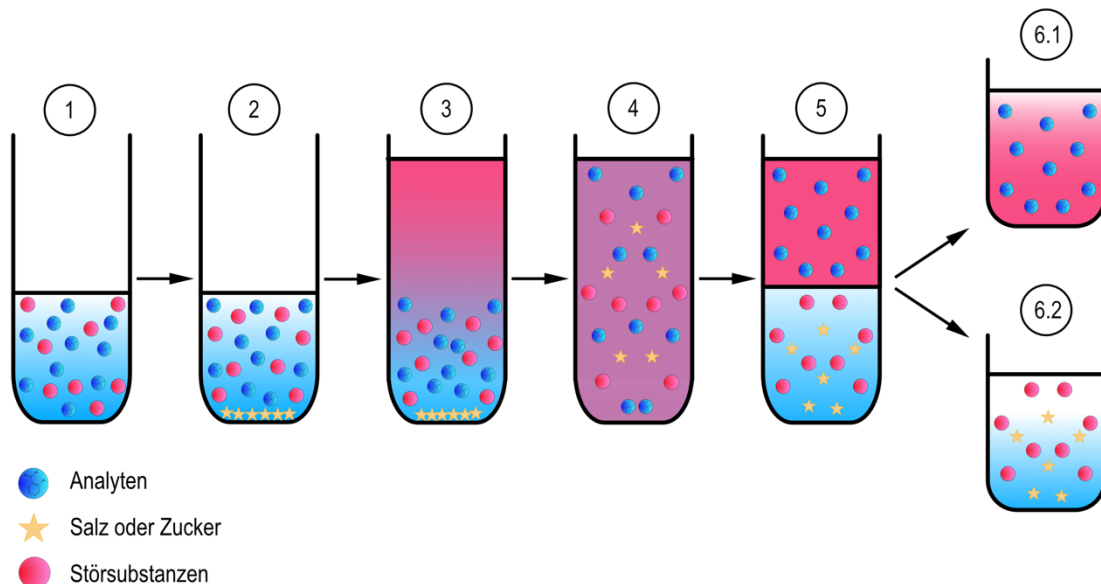


Abbildung 2.4: LLE mit Zucker oder Salz zur Erhöhung der Extraktionseffizienz; (1) Probe mit Analyten und Störsubstanzen; (2) Zugabe Salz oder Zucker (optional); (3) Zugabe Extraktionsmittel; (4) Mischen; (5) Phasentrennung; (6.1) Analyten in Extraktionsmittel; (6.2) Störsubstanzen, Salz oder Zucker in Probenmatrix

2.1.3.7 Festphasenextraktion

Bei der Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) werden die in einer mobilen Phase gelösten Analyten selektiv an eine feste, stationäre Phase (Sorbtionsmittel, Sorbentmaterial) gebunden und von störenden, ungebundenen Matrixkomponenten wie nicht flüchtigen Salzen isoliert. Zur Isolation der Analyten stehen unterschiedliche Wechselwirkungen zur Verfügung, wie die Umkehrphasen-, Normalphasen-, Ionenaustausch- oder Mixed-Mode-SPE [101, 102]. Klassische Sorbentmaterialien sind silizium- oder polymerbasiert. Um den anspruchsvollen Bedingungen bioanalytischer Extraktionen wie den komplexen Matrices und niedrigen Analytkonzentrationen gerecht zu werden, werden neue Sorbentmaterialien entwickelt, wie molekular- oder ionenbedruckte Polymere, magnetische Nanopartikel oder Faserbeschichtungen [103-105].

Die Festphasenextraktion besteht typischerweise aus fünf Schritten. Im ersten Schritt, der Konditionierung, erfolgt die Benetzung des Sorbentbetts. Bei der Vorbereitung von wasserbasierten biologischen Proben werden häufig die Umkehrphasen-SPE oder Ionenaustausch-SPE eingesetzt, weswegen zur Konditionierung vielfach Methanol oder Acetonitril verwendet werden. Im zweiten Schritt, der Equilibrierung, wird das Sorbentbett auf die nachfolgende Probenaufgabe vorbereitet, indem es mit einem Lösungsmittel benetzt wird, welches dem der Probe ähnelt. Bei biologischen Proben ist dies zumeist Wasser. Im dritten Schritt, der Probenaufgabe, werden die Wechselwirkungen zwischen Analyt und Sorbentbett aufgebaut, weswegen die Aufgabe der zu untersuchenden Probe langsam erfolgen muss. Im sich anschließenden Waschschrift werden ungebundene Matrixkomponenten entfernt. Salze können, je nach Art des Retentionsmechanismus, beispielsweise durch ionische Puffer und ungebundene unpolare Komponenten durch die Verwendung eines organischen Lösungsmittels entfernt werden. Die Elution stellt den finalen Schritt der SPE dar, bei welchem der Analyt aus dem Sorbentbett durch die Aufhebung der Wechselwirkungskräfte, zum Beispiel durch eine pH-Wertveränderung, gelöst wird [106]. In Abbildung 2.5 ist der verallgemeinerte Ablauf einer Festphasenextraktion dargestellt.

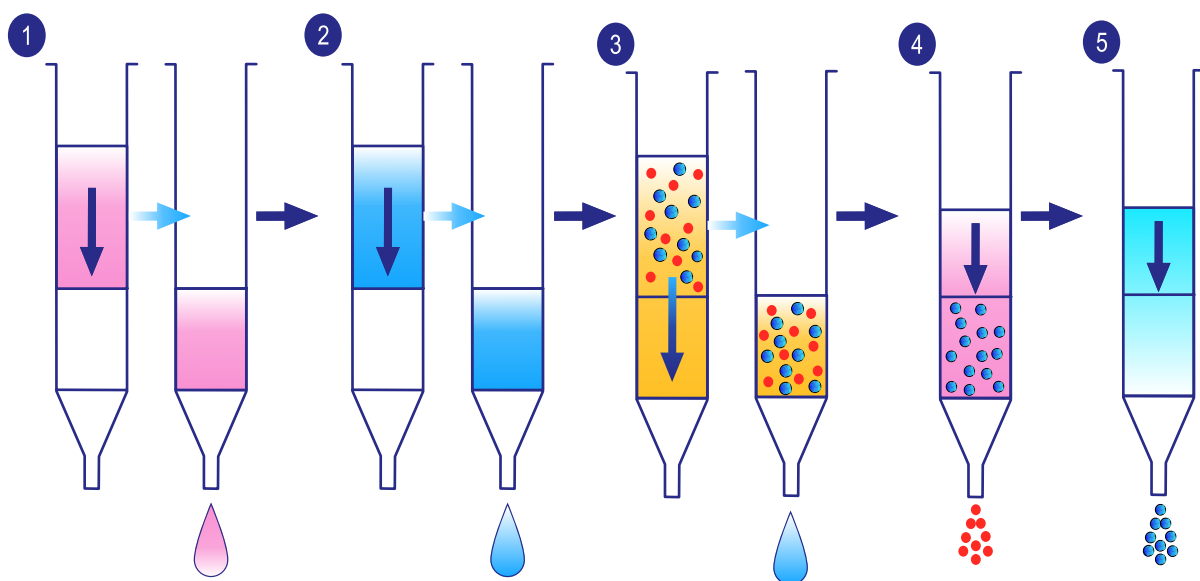


Abbildung 2.5: Ablauf der Festphasenextraktion: (1) Konditionieren, (2) Equilibrieren, (3) Probenaufgabe, (4) Waschen, (5) Eluieren

Das Sorbentmaterial für die klassische Festphasenextraktion ist in Kartuschen gepackt [107]. Weitere mögliche Formate und Abwandlungen der Technik sind die Packung des Sorbentmaterials in die Wells einer Mikrotiterplatte zur Erhöhung des Durchsatzes [108], die Packung des Sorbentmaterials in Pipettenspitzen (Pipette Tip Solid Phase Extraction, PT-SPE) [80, 109], die Verwendung eines geringen Sorbentbettvolumens (Micro Solid Phase Extraction, μ SPE) [110], die Mikroextraktion mit gepacktem Sorptionsmaterial (Micro Extraction by Packed Sorbent, MEPS) [111, 112] oder die Rührstab-Sorbitionsextraktion (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE) [113, 114]. Aufgrund ihrer hohen Selektivität und ihrer vergleichsweise einfachen Automatisierbarkeit [26, 115-117] sowie Möglichkeiten der gleichzeitigen Aufkonzentration und Adaptation des Lösungsmittels an die mobile Phase, des geringen Lösungsmittelbedarfs sowie der zahlreichen zur Verfügung stehenden Formate, ist die SPE eine der am häufigsten verwendeten Probenvorbereitungstechniken in der Bioanalytik.

2.1.3.8 Mikroextraktionstechniken

Mikroextraktionstechniken sind durch ein im Vergleich zum Probenvolumen stark reduziertes Extraktionsmittelvolumen ($< 100 \mu\text{l}$ oder $< 10 \text{ mg}$) gekennzeichnet [118]. Beispiele sind die Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Microextraction, SPME) und die Pipettenspitzen-Festphasenmikroextraktion (Pipette Tip Micro Solid Phase Extraction, PT- μ SPE) [119], die Flüssigphasenmikroextraktion (Liquid Phase Microextraction, LPME) [120] oder die Hohlfaser-Flüssigphasenmikroextraktion (Hollow Fibre Liquid Phase Microextraction, HF-LPME) [121]. Das reduzierte Lösungsmittelvolumen führt zu einer Verbesserung der Umweltverträglichkeit der Probenvorbereitungsmethode. Die Entwicklung und Etablierung neuer Mikroextraktionstechniken erfolgt auch unter dem Gesichtspunkt der Methodenvereinfachung, zum Beispiel durch eine Reduktion der Prozessschritte, was neben der Zeitreduktion auch die Anwenderfreundlichkeit, die Fehleranfälligkeit und Robustheit der Methode verbessert, Kosten senkt und somit insgesamt zu einer Performanceerhöhung führt [122].

2.1.3.9 Evaporation

Die Verdampfung wird zur Aufkonzentration von Proben mit dem Ergebnis der Sensitivitätserhöhung oder zur Lösungsmitteländerung eingesetzt [123, 124]. Eine in der Bioanalytik häufig eingesetzte Technik ist die Blow-Down-Evaporation, bei der kontinuierlich ein Stickstoffstrom über die Oberfläche der zu reduzierenden Probe geblasen wird. Durch eine zusätzliche Beheizung kann die Evaporationsdauer gesenkt werden [125]. Weitere Evaporationstechniken sind die Unterdruck-Zentrifugation, die Vortex-Evaporation und die Lyophilisation [126-128]. Die Evaporation wird häufig im Anschluss an Probenvorbereitungstechniken eingesetzt, die die Analytkonzentration verdünnen, wie die Proteinfällung oder die Flüssig-Flüssig-Extraktion [7]. Die Automatisierung der Evaporation ist aufgrund des hohen Zeitaufwands sowie möglicher Gesundheitsrisiken durch giftige Lösungsmitteldämpfe erstrebenswert [124]. Herausforderungen bei der Automatisierung sind beispielsweise die Justierung des Stickstoffstroms auf die Oberfläche in Abhängigkeit vom Füllstand, die Vermeidung von Kreuzkontaminationen durch verspritzendes Lösungsmittel, die Regelung der Temperatur als Optimum

zwischen Evaporationsgeschwindigkeit und thermischer Degradation sowie die Sicherstellung der vollständigen Resolubilisierung [129]. Aufgrund der genannten Herausforderungen werden alternative Probenvorbereitungsmethoden zur Aufkonzentration, wie die Festphasenmikroextraktion, vermehrt eingesetzt.

2.1.4 Analytische Methoden und Matrixeffekte in der Bioanalytik

Die messtechnische Bestimmung schließt sich an die Probenvorbereitung an. Eigenschaften des Analyten wie die Polarität, die Matrix und die darin vorhandenen endogenen Komponenten, welche zu Interferenzen während der Messung führen können, die Konzentration des Analyten, welche die benötigte Sensitivität des Messgeräts bestimmt, aber auch der für den Nachweis zur Verfügung stehende Zeitrahmen beeinflussen die Auswahl der Messtechnik. Spektroskopische Messmethoden und chromatographiegekoppelte massenspektrometrische Verfahren werden in der Bioanalytik vielfach eingesetzt [102, 130].

2.1.4.1 Absorptionsspektroskopie

Spektroskopische Messmethoden basieren auf der Nutzung von Licht, um Substanzen in einer Lösung nachzuweisen [131]. Die extinktionsbasierten Methoden nutzen das Lambert-Beer'sche Gesetz in (2.3), welches den Zusammenhang zwischen Extinktion A und Konzentration c in Abhängigkeit von der optischen Weglänge d beschreibt. Der Extinktionskoeffizient ε ist substanzspezifisch und beschreibt die Höhe der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d = \log_{10} \left(\frac{\text{Intensität des ausgesendeten Lichts } I_0}{\text{Intensität des transmittierten Lichts } I} \right) \quad (2.3)$$

Zur Quantifizierung muss entweder der Extinktionskoeffizient bestimmt oder die Konzentration mithilfe einer Standardkurve ermittelt werden [132, 133]. Anwendungsbeispiele sind die Bestimmung der Absorption aromatischer Aminosäuren wie Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin bei einer Wellenlänge von 280 nm [134, 135] oder die Detektion des Absorptionsshifts von 470 nm zu 595 nm durch die Reaktion zwischen Coomassie Brilliant Blau, Arginin und aromatischen Aminosäuren beim kolorimetrischen Bradford-Assay zur Quantifizierung von Proteinen [25, 136].

Zur Senkung der Nachweisgrenze kann die optische Detektion mit einem Immunoassay gekoppelt werden, welches Analyten sehr selektiv aus der Probe entfernt [137]. Der Konzentrationsbereich für die Proteinbestimmung mittels Absorption im Bereich der ultravioletten (UV-) Strahlung liegt im mg/ml-Bereich. Der Arbeitsbereich der Bradford-Methode liegt im $\mu\text{g/ml}$ -Bereich und immunbasierte Nachweismethoden arbeiten im ng/ml-Bereich [134, 138-141].

Weitere optische Nachweisverfahren sind die Fluoreszenz oder Lumineszenz. Die Messung der Proben erfolgt in Mikrotiterplatten mit einem Volumen von 100–200 μl pro Vertiefung oder selten in Küvetten für höhere Volumina in Mikrotiterplattenlesegeräten. Das schnelle, kontaktfreie Detektionsverfahren, das geringe Probenvolumen und die Verwendung des Mikrotiterplattenformats ermöglichen einen hohen Probendurchsatz und vereinfachen die Automatisierung [142].

2.1.4.2 Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie

Die chromatographiegekoppelte Massenspektrometrie ist ein Trenn- und Messverfahren, welches in der Bioanalytik aufgrund seiner hohen Sensitivität und Selektivität häufig zum Einsatz kommt. Die Chromatographie dient der zeitlichen Trennung der Analyten anhand physikalisch-chemischer Eigenschaften. Im Massenspektrometer erfolgt die hochselektive Trennung der Analyten anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) [143, 144].

Die beiden grundlegenden chromatographischen Verfahren sind die Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography, LC) und die Gaschromatographie (GC). Aufgrund ihrer hohen Flexibilität wird die LC heute häufiger eingesetzt, da sie weder durch die Volatilität der Analyten noch durch deren thermische Stabilität begrenzt ist [130, 145]. Das Prinzip der LC basiert auf der Verteilung einer Substanzmischung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Nach der Probenaufgabe wandert das Substanzgemisch je nach Art der Wechselwirkung zwischen Trennsäule, mobiler Phase und Substanz mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Säule. Es können Substanzen mit einem Molekulargewicht zwischen 100 und 100.000 Dalton analysiert werden [143]. Typische stationäre Phasen für kleine, polare Analyten in biologischen Matrices sind die Umkehrphasensäulen. Für die Trennung von Proteinen werden biochromatographische Verfahren wie die Größenausschluss-, Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie eingesetzt [83, 146-148]. Als mobile Phase werden häufig organische Lösungsmittel wie Acetonitril und Methanol sowie Wasser oder wässrige Pufferlösungen eingesetzt [149]. Für eine effektive Trennung ist die Anpassung des chromatographischen Systems an die Aufgabenstellung wichtig [150, 151]. Ein chromatographisches System besteht mindestens aus einer Lösungsmittelpumpe, einem Probenaufgabesystem sowie einer Trennsäule in einem Säulenofen (siehe Abbildung 2.6). Nach der Trennung auf der Säule kann zum Beispiel die UV-Absorption der Analyten mit Diodenarraydetektoren detektiert werden [152, 153].

Für die hochempfindliche Bestimmung der Molekülmassen und Analyse komplexer Probengemische wird die LC mit der Massenspektrometrie (MS) zur LC-MS gekoppelt [154]. Dazu wird das Eluat der LC in eine Ionenquelle geleitet, in welcher das Lösungsmittel entfernt und die Analyten ionisiert werden. Im Anschluss erfolgt die Überführung der Ionen in den Massenanalysator. Die Trennung der Massen kann im Hochfrequenzfeld eines Quadrupolsystems (Q), anhand ihrer Flugzeit (Time of Flight, TOF) oder durch Einfangen der Ionen in einer Ionenfalle erfolgen. Für die Ionendetektion werden Sekundärelektronenvervielfacher, Fotoplatten oder Faraday-Becher eingesetzt. Die Massentrennung erfolgt im Hochvakuum (10^{-5} bis 10^{-9} mbar) [155, 156].

Ein zusätzlicher Selektivitäts- und Sensitivitätsgewinn kann durch die Kombination mehrerer Massenanalysatoren wie beim Triple-Quadrupol- (QQQ) oder Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (Q-TOF) erzielt werden [157, 158]. Hierbei können die Vorteile der unterschiedlichen Massenanalysatoren in einem Gerät kombiniert genutzt und Fragmente der Ionen erzeugt werden (auch Tandem-Massenspektrometrie, MS/MS). Ein Beispiel hierfür ist der Produkt-Ionen-Scan. Dabei werden im ersten Quadrupol Ionen mit einem bestimmten m/z selektiert, im zweiten Quadrupol fragmentiert und im dritten Quadrupol werden die entstehenden Produktionen gescannt bzw. detektiert. Der Selektivitätsgewinn ist insbesondere bei den komplexen biologischen Matrices von Bedeutung [159, 160]. Die Ergebnisse der LC-MS werden als Elutionspeaks der Signalintensität über der Zeit im

Chromatogramm und als relative Häufigkeit der Ionen (Signalintensität) über dem Masse-zu-Ladungsverhältnis im Massenspektrum dargestellt. Zur Quantifizierung von Proben in unbekannter Konzentration werden diese mit einer aus Proben bekannter Konzentration erstellten Kalibrierung verglichen. Zusätzlich können interne Standards verwendet werden [161, 162]. Die Sensitivität einer LC-MS-Methodik ist stark anwendungsabhängig, typisch sind jedoch Messungen im ng/ml (\triangleq ppb) bis $\mu\text{g/ml}$ (\triangleq ppm) Bereich.

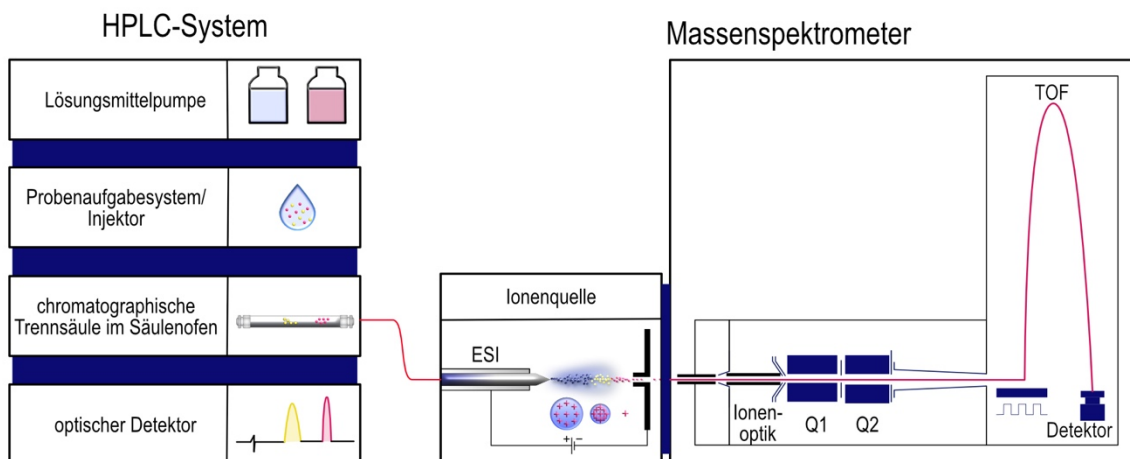


Abbildung 2.6: LC-MS System

Bei der Verwendung der LC-MS mit bioanalytischen Proben sind probenvorbereitende Maßnahmen essenziell, um die Lebensdauer der chromatographischen Säulen zu verlängern, da die Partikelgröße insbesondere im Bereich der Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) sehr gering ist ($< 2.0 \mu\text{m}$) [163]. Auch bei der MS ist die Vermeidung des Einbringens von Matrixkomponenten durch Probenvorbereitungsmethoden wichtig, um eine hohe Sensitivität der Analyse zu gewährleisten. Die sogenannten Matrixeffekte können während der Ionisierung zur Ionensuppression oder -verstärkung führen, indem ungewünschte Matrixbestandteile während der Tröpfchenbildung den Zugang der Analyten zur Ladung versperren, die Entstehung feinerer Tröpfchen behindern, mit den Analyten um vorhandene Ladungen konkurrieren, die Stabilität gebildeter Ionen reduzieren oder den Übergang gebildeter Ionen in das Massenspektrometer verhindern. Zudem können die Analyten zusammen mit nichtflüchtigen Matrixbestandteilen ausfallen, wodurch die Signalstärke ebenfalls reduziert wird [164-166]. Ein typisches Beispiel sind die aus Zellmembranen stammenden Phospholipide, die mit den Analyten co-eluieren und zu Matrixeffekten führen [167-169]. Neben der geschickten Auswahl der Ionisierungsmethode oder dem Einsatz eines internen Standards können Matrixeffekte durch die Anwendung von Probenvorbereitungsmethoden vermieden werden [31, 170, 171]. Typische Probenvorbereitungsmethoden sind die Proteinfällung, SPE und LLE [94, 172-175]. Häufig eingesetzte Techniken zur Ionisierung in der Bioanalytik sind die sanfte Elektronenspray-Ionisierung (ESI) zur Ionisierung von polaren Analyten und großen Biomolekülen wie Proteinen [176] sowie die Ionisierung unter Atmosphärendruck zur Ionisierung von unpolaren Analyten [177, 178].

Die vorgestellten Analysemethoden werden in der Bioanalytik gerne eingesetzt. Chromatographiegekoppelte massenspektrometrische Methoden zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität und Selektivität aus, was insbesondere für die in niedrigen Konzentrationen in biologischen Matrices vorkommenden Vitamine, Drogen oder Pharmazeutika oder bei der Strukturaufklärung von Bedeutung ist. Beispiele sind die Bestimmung von Cannabinoiden aus Plasma mittels LC-MS/MS [179] oder die Bestimmung von Suvorexant aus Urin mittels LC-Q-TOF-MS [180]. Im Vergleich sind optische Detektionsmethoden weniger sensitiv und selektiv, aber auch unempfindlicher gegenüber Matrixeffekten, da kein direkter Kontakt zwischen Detektor und Probe besteht und somit Verunreinigungen des Messgeräts durch die Probe vermieden werden. Optische, in Mikrotiterplattenlesegeräten durchgeführte Detektionsmethoden sind sehr schnelle Messmethoden, welche die parallele Analyse einer hohen Probenanzahl (typisch sind 96 bis 384 Proben) ermöglichen [181]. Zudem sind die Anschaffungs- und Betriebskosten für diese Geräte geringer [182]. Ein Vergleich zahlreicher HPLC-UV- und HPLC-MS-Methoden zur Bestimmung von Meloxicam aus biologischen Matrices befindet sich in der Übersichtsarbeit von Bresovska et al. [183]. Für die Automatisierung sind nach der Optimierung und Validierung der analytischen Methode die Bereitstellung der Proben im automatisierten Probengeber sowie das zur Verfügung stehende Budget relevant.

2.2 Automatisierung in der Bioanalytik

Als Automation bezeichnet man „den Einsatz von Technologien, um Abläufe, Prozesse oder Systeme zu automatisieren“ [184]. Die Automatisierung ist die „Übertragung von Funktionen des Produktionsprozesses, insbesondere von Prozesssteuerungs- und Regelungsaufgaben vom Menschen auf künstliche Systeme“ [185, 186]. Dies kann beispielsweise mithilfe von Robotern erfolgen. Roboter sind „universell einsetzbare Bewegungsautomaten mit mehreren Achsen, deren Bewegungen hinsichtlich Bewegungsfolge und Wegen bzw. Winkeln frei (d.h. ohne mechanischen Eingriff) programmierbar und ggf. sensorgeführt sind“ [187]. Der Ersatz der physischen Arbeit durch die Maschinen wird dabei auch als Mechanisierung bezeichnet [188].

2.2.1 Aufbau, Einteilung und Arten von Robotern

Roboter bestehen aus dem Effektor, über den der Roboter mit der Umgebung in Kontakt tritt, wie z.B. einem Greifer, Werkzeug oder Pipettierkanal. Weitere Bestandteile sind bewegliche Glieder, die von einem Antrieb bewegt werden und über Gelenke verbunden sind. Es werden translatorische und rotatorische Gelenke unterschieden, die je nach Kinematik seriell oder parallel bewegt werden [189, 190]. Roboter können in stationäre und mobile Roboter eingeteilt werden. Mobile Roboter bewegen sich frei in einem unbegrenzten Arbeitsbereich, wohingegen der Arbeitsbereich von stationären Robotern auf den Installationsort beschränkt ist. Der durch einen stationären Roboter erreichbare geometrische Arbeitsraum wird durch die Freiheitsgrade bzw. Achsen (1 Freiheitsgrad entspricht 1 Achse) des Roboters bestimmt [191-193].

Wichtige robotische Konfigurationen sind kartesische, zylindrische und horizontal artikulierte sowie vertikal artikulierte Roboter (siehe Abbildung 2.7) [194].

Zylindrische und horizontal artikulierte Roboter bestehen aus einer Kombination aus rotatorischen und translatorischen Achsen. Sie besitzen eine feste Basis, an die sich ein oder zwei Drehgelenke anschließen, gefolgt von ein oder zwei translatorischen Achsen mit 3 bis 4 Freiheitsgraden. In ihrem so entstehenden kreisförmigen Arbeitsbereich sind hohe Bewegungsgeschwindigkeiten möglich, weswegen sie häufig in der industriellen Fertigung eingesetzt werden. Besonders häufig eingesetzt werden die SCARA-Roboter des Herstellers Epson (Meerbusch, DE), weswegen horizontal artikulierte Roboter auch unter dem Begriff SCARA (Selective Compliance Assembly Robot Arm) bekannt sind [189, 190, 195].

Vertikal artikulierte Roboter besitzen zwei oder mehr sequenzielle Kugelgelenke und werden häufig zur Imitation von manuellen Prozessen, z.B. durch die Handhabung der gleichen Geräte, eingesetzt. Typische Aufgaben sind der Transfer von Flüssigkeiten sowie die Bestückung von Geräten und Instrumenten. Der Platzanspruch ist gering. Vertikal artikulierte Roboter besitzen 6 bis 7 Freiheitsgrade. Die Bewegungsgeschwindigkeit ist im Vergleich zu horizontal artikulierten Robotern jedoch geringer. Erreicht wird der siebte Freiheitsgrad durch die Montage auf Schienen oder durch die Verwendung eines zweiten Manipulators [189, 190, 195, 196]. Ein Anwendungsbeispiel ist die automatisierte Probenvorbereitung von Ablagerungen an Gallengangendoprothesen zur Bestimmung von Cholesterin mithilfe eines Zweiarmsroboters. Der Zweiarmsroboter führt alle Schritte in Analogie zum manuellen Prozess durch [197].

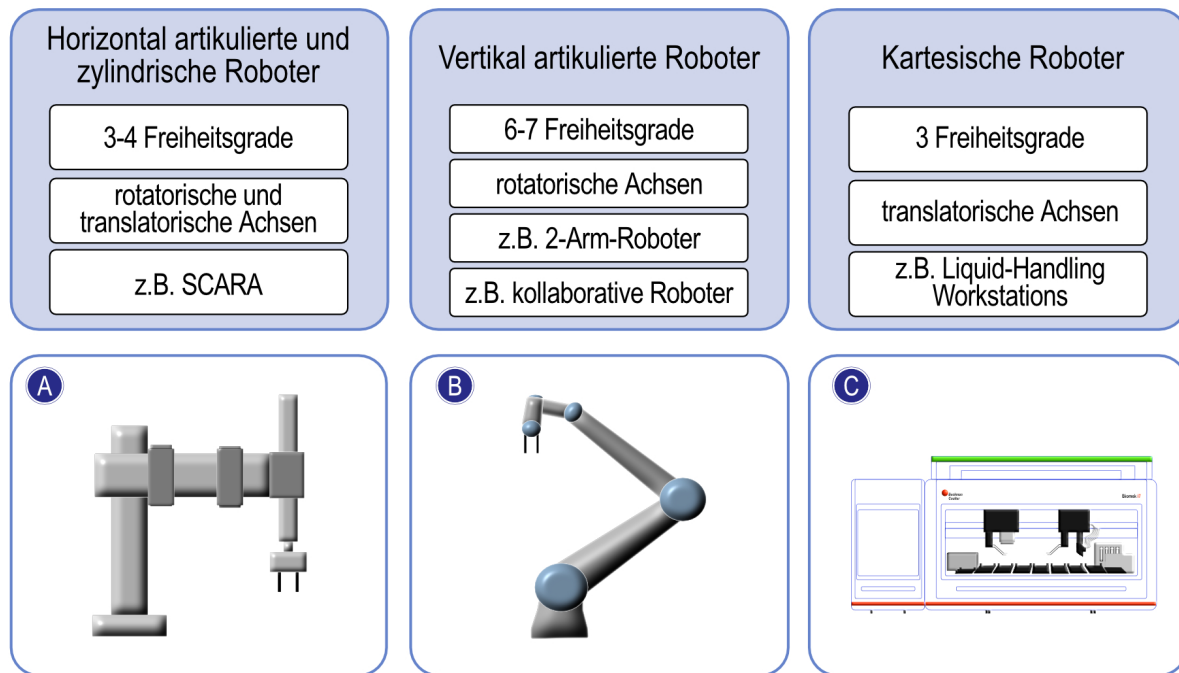


Abbildung 2.7: Häufig genutzte robotische Konfigurationen

Kollaborative Roboter sind eine besonders leichte und mit zusätzlichen Sicherheitsfunktionen ausgestattete Variante der vertikalen Roboter. Durch den Einsatz von Abstands- und Kollisionssensoren, reduzierten Bewegungsgeschwindigkeiten und einer verminderten Kraft können kollaborative Roboter auch gemeinsam mit dem Menschen in einem Arbeitsbereich eingesetzt werden.

Trotz der Bezeichnung ist eine echte Kollaboration zwischen Mensch und Roboter noch selten [198, 199]. Ein häufig eingesetzter kollaborativer Roboter ist der 6-Achs-Roboter von Universal Robots (UR, Odense, DK).

Kartesische Roboter besitzen drei translatorische Achsen und drei Freiheitsgrade. Der Arbeitsbereich dieser Roboter ist durch ein kartesisches Koordinatensystem begrenzt, in dem jeder Punkt durch die Koordinaten x (Breite), y (Tiefe) und z (Höhe) definiert wird. Die kartesischen Roboter bilden die Basis von Pipettierrobotern in der Laborautomation und werden aufgrund ihrer gleichbleibend hohen Positioniergenauigkeit (zwischen 10–100 μm [200]), ihrem geringem Platzanspruch sowie der einfachen Erweiterbarkeit des Arbeitsbereiches und der Möglichkeit der Parallelisierung von Arbeitsschritten häufig eingesetzt [189, 190, 195]. Pipettierroboter werden auch als Liquid-Handling-Systeme bezeichnet. Ein Beispiel ist die Biomek i7 Liquid-Handling-Workstation von Beckman Coulter Life Sciences (Indianapolis, USA).

2.2.2 Automationssysteme in der Bioanalytik

Als Automationssystem wird eine klar definierte Zusammenfassung von Geräten und Maschinen bezeichnet. Bei diesen kann es sich um Geräte mit einer einzelnen Funktion bis hin zu komplexen Maschinen zur Automatisierung vollständiger Prozesse handeln [14, 201].

2.2.2.1 Einteilung von Automationssystemen

Automationssysteme können in zentrale Systeme und dezentrale Systeme eingeteilt werden. Zentrale Systeme sind definiert als „lokal und funktional zentralisiertes Automationssystem“, bei denen ein „zentraler Roboter Transportaufgaben und/oder die Probenbearbeitung zwischen den eingebundenen Stationen“ übernimmt. Typische Herausforderungen sind die eingeschränkte Flexibilität sowie die schwierige Anpassbarkeit an neue Prozesse [202]. Dezentrale Systeme sind definiert als „lokal und funktional verteilte Automationssysteme“, bei denen „humane oder mobile Roboter für den Transport genutzt und multiple roboterbasierte Stationen möglich sind“. Typische Herausforderungen sind die hohen Ansprüche an das Workflow-Management sowie die hohen Kosten [202].

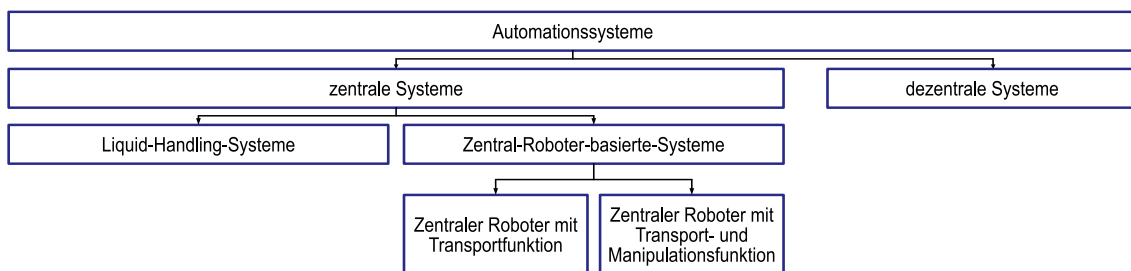


Abbildung 2.8: Automationssysteme/-konzepte

Zentrale Systeme werden weiterhin in Liquid-Handler-basierte Automationssysteme mit parallelen, aber begrenzten Bearbeitungsmöglichkeiten sowie die auf einem zentralen Roboter basierenden Systeme eingeteilt. Eine Erweiterung der Bearbeitungsmöglichkeit der Liquid-Handler-basierten Systeme ist durch die Integration von peripheren Geräten möglich. Anwendungsbeispiele mit Liquid-Handler-basierten-Systemen sind das Hochdurchsatzscreening nach therapeutischen Proteinen [203] wie Antikörpern mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) [204] oder die Optimierung von Glykosylierungsprozessen an Immunglobulinen [205]. Komplexere Bearbeitungsmöglichkeiten bieten die auf einem zentralen Roboter basierenden Systeme, welche weiter in Systeme, bei denen der zentrale Roboter reine Transportaufgaben zwischen den zur Bearbeitung der Proben verwendeten speziellen Geräten wahrnimmt, und Systeme, in denen der zentrale Roboter sowohl für den Probentransport als auch zur Probenbearbeitung eingesetzt wird, eingeteilt werden.

Bei auf einem zentralen Roboter mit reinen Transportaufgaben basierenden Systemen ist der Durchsatz von den speziellen Geräten abhängig, wobei der begrenzende Faktor bei den auf einem zentralen Roboter basierenden Systemen mit Transport- und Bearbeitungsfunktionen der Roboter selbst ist. Zur Bearbeitung der Proben werden herkömmliche Laborgeräte verwendet [202, 206].

Anwendungsbeispiele für den Einsatz eines zentralen Roboters mit reiner Transportfunktion sind die Bestimmung von Kalzium und Schwermetallen an Gallengangendoprothesen [207], die Bestimmung von

Schwermetallen in Hausstaub [208] oder die Bestimmung von Schwermetallen in Gewebeproben an Gelenkendoprothesen [209]. Beispiele für den Einsatz eines zentralen Roboters mit Transport- und Manipulationsfunktion sind die Bestimmung von Cholesterol an Gallengangendoprothesen [197], die Bestimmung von Enantiomeren mittels LC-MS [210, 211], die Ernte von Proteinkristallen [212], der Einsatz als Feststoffwägestation [213] sowie die Überprüfung der Qualität rekonstruierter humaner Epidermis [214].

2.2.2.2 Charakterisierung von Automationssystemen

Zur Charakterisierung von Automationssystemen können sowohl der Automationsgrad als auch der Integrationsgrad herangezogen werden.

Der Automationsgrad beschreibt den Anteil der Übernahme von manuellen Prozessen durch ein Automationssystem. Nach Frohm et al. werden sieben Automatisierungsstufen von der manuellen Durchführung aller Aufgaben ohne Hilfsmittel über die Nutzung von Hilfsmitteln oder ganzen Arbeitsstationen bis hin zur vollständig automatischen Durchführung aller Aufgaben innerhalb eines Prozesses definiert [215, 216]. In Tabelle 2.1 werden die sieben Stufen der Automatisierung beschrieben und am Beispiel des Lösungsmitteltransfers illustriert. In Analogie kann der Grad der Automatisierung von Prozessen auch in manuelle, halbautomatische und automatische Prozesse eingeteilt oder bei der Automatisierung von Laboren in keine Laborautomation, partielle Laborautomation oder totale Laborautomation unterteilt werden. Bei der totalen Laborautomation (TLA) sind alle Schritte eines Laborprozesses vollständig automatisiert, wohingegen bei der partiellen Laborautomation nur einzelne Arbeitsabläufe oder Prozesse (z.B. nur die Analytik) automatisiert sein können, andere Prozesse jedoch weiterhin manuell durchgeführt werden [8, 11, 217, 218].

Tabelle 2.1: Automatisierungsstufen nach Frohm am Beispiel eines Liquid-Transfer-Prozesses

Automatisierungsstufe	Beschreibung	Beispiel
1	manuelle Durchführung aller Aufgaben ohne Hilfsmittel	Schöpfen von Flüssigkeit mit der Handfläche, Sichtkontrollen
2	manuelle Durchführung aller Aufgaben mit statischem Hilfsmittel	Transfer von Lösungsmittel mit Schöpfkelle (oder Glaspipette mit 1 Messmarke)
3	manuelle Durchführung aller Aufgaben mit flexiblem Hilfsmittel	Transfer von Lösungsmittel mit Handpipette mit einstellbarem Volumen
4	manuelle Durchführung aller Aufgaben mit automatischem Hilfsmittel	Transfer von Lösungsmittel mit elektronischer Pipette
5	Nutzung statischer Arbeitsstationen, die auf die Durchführung einer Aufgabe spezialisiert sind (z.B. Zentrifuge)	Transfer des Lösungsmittels mit automatischer Dispensierstation wie der BioTek MicroFill Dispenser (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
6	Nutzung einer Arbeitsstation, die an verschiedene Aufgaben angepasst werden kann (flexible Arbeitsstation)	Automatischer Transfer des Lösungsmittels mit MultiFlo FX (Dispensieren + Aspirieren zum Waschen oder Austausch des Mediums) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
7	alle Aufgaben innerhalb eines Prozesses, werden vollständig automatisiert durchgeführt (z.B. Zellkultursystem)	Prozess des Lösungsmitteltransfers ist vollständig automatisiert (Befüllen des Lösungsmittelreservoirs, Abnahme des Mikrotiterplattendeckels, Transfer verschiedener Lösungsmittel (Aspirieren und Dispensieren), Homogenisieren, Verschluss der Mikrotiterplatte, Bearbeitung und Transport mehrerer Mikrotiterplatten) mit Biomek i7 Workstation (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA)

Mithilfe des Integrationsgrades kann der Zusammenhang zwischen Automationsgrad und Komplexität eines Automationssystems beschrieben werden.

Mit dem Integrationsgrad werden Geräte, Arbeitsstationen und integrierte Systeme unterschieden.

Geräte sind Einzellösungen, wie beispielsweise eine Zentrifuge, ein Inkubator, ein Pipettor oder eine Waage, die eine bestimmte Funktion ausführen. Der Automationsgrad, der Integrationsgrad und die Komplexität sind gering.

Arbeitsstationen sind Verbände mehrerer Geräte. Die Arbeitsstation kann auch als modulare Automationslösung oder Insellösung aufgefasst werden. Die Komplexität und der Integrationsgrad steigen [201, 218, 219].

Die Verbindung mehrerer Arbeitsstationen durch ein Transportsystem führt zur Entwicklung von integrierten Systemen [220]. Die Komplexität ist hoch.

Mit wachsendem Integrationsgrad steigt der Grad der Laborautomation über die partielle bis hin zur totalen Laborautomation. Gleichzeitig steigt die Komplexität des Automationssystems (siehe Abbildung 2.9).

Die Flexibilität von Automationssystemen wird auch durch die Begriffe eines offenen oder geschlossenen Systems charakterisiert. Offene Systeme sind erweiterbar. Die Prozesse dieser Systeme können angepasst, geändert oder neu erstellt werden. Die Flexibilität ist hoch. Im Gegensatz dazu sind Änderungen der Prozesse oder der Systemkomponenten in geschlossenen Systemen kaum möglich. Die Flexibilität ist gering. Typische Kennzeichen von Anwendungen eines geschlossenen Systems sind hohe Probendurchsätze und ein gleichbleibender Prozess über einen langen Zeitraum, wohingegen offene Systeme für häufig wechselnde Prozesse bei niedrigeren Probendurchsätzen eingesetzt werden [221].

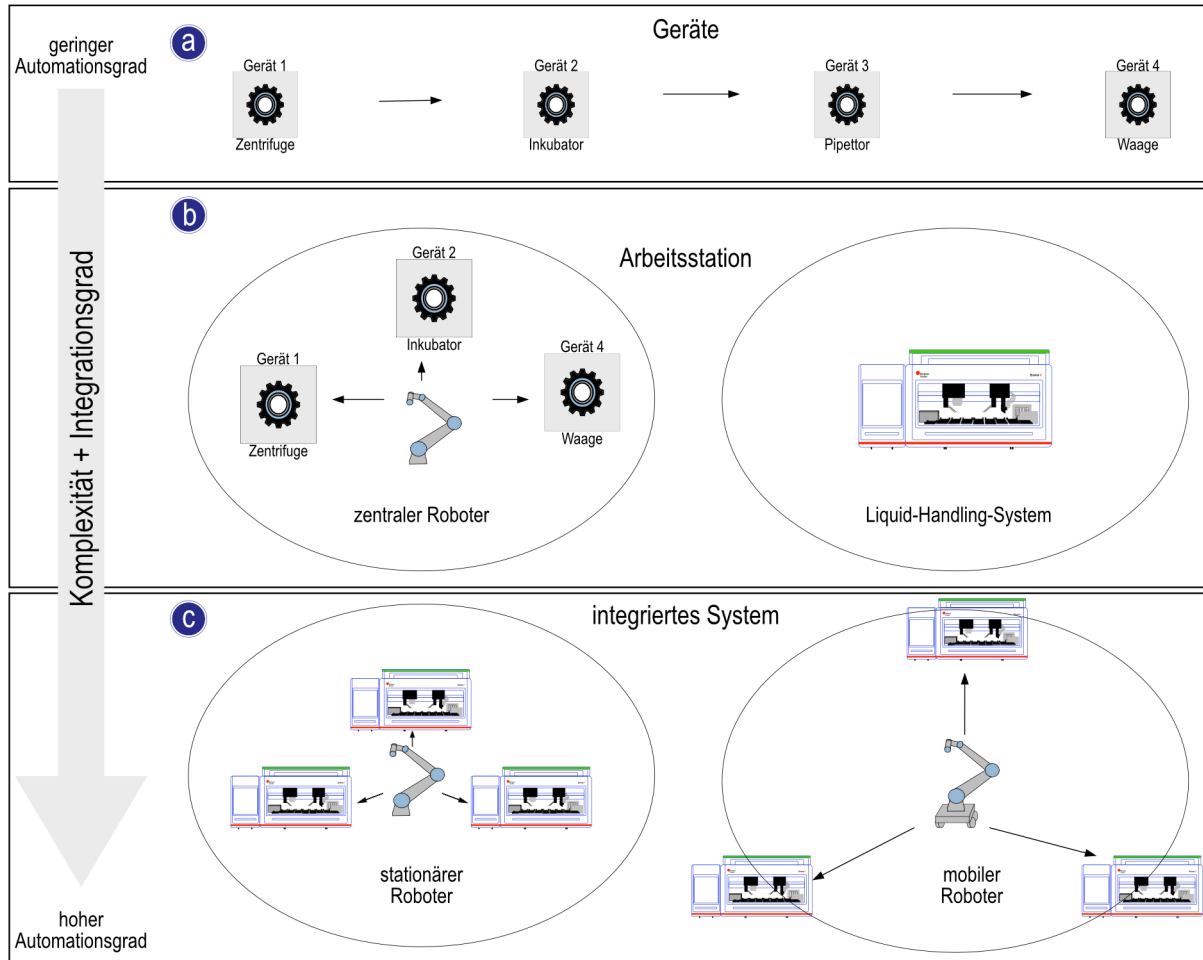


Abbildung 2.9: Bestandteile eines Automationssystems; nach Integrationsgrad: (a) Geräte; (b) Arbeitsstation / Insellösung / modulares Automationssystem; (c) Totale Laborautomation oder Integriertes System

2.2.3 Stand der Automatisierung in der Bioanalytik

Der bestehende Automationsgrad in Life Science Laboren variiert in Abhängigkeit vom Probenaufkommen und von der Art der Tätigkeit (Forschung, Auftragsanalytik, Routinelabor) stark. Demzufolge können Life Sciences Labore in Labore mit hohem, mittlerem und niedrigem Probendurchsatz eingeteilt werden. Typische Beispiele für Hochdurchsatzlabore sind klinische Zentrallabore und Labore der Pharmaindustrie, wohingegen (universitäre) Forschungseinrichtungen in der Regel einen niedrigen Probendurchsatz besitzen [13, 222-224]. Untersuchungen, die in klinischen Zentrallaboren durchgeführt werden, können der Bioanalytik zugeordnet werden, wohingegen die Suche nach neuen Wirkstoffen in Laboren der Pharmaindustrie eher dem Bioscreening zugeordnet wird.

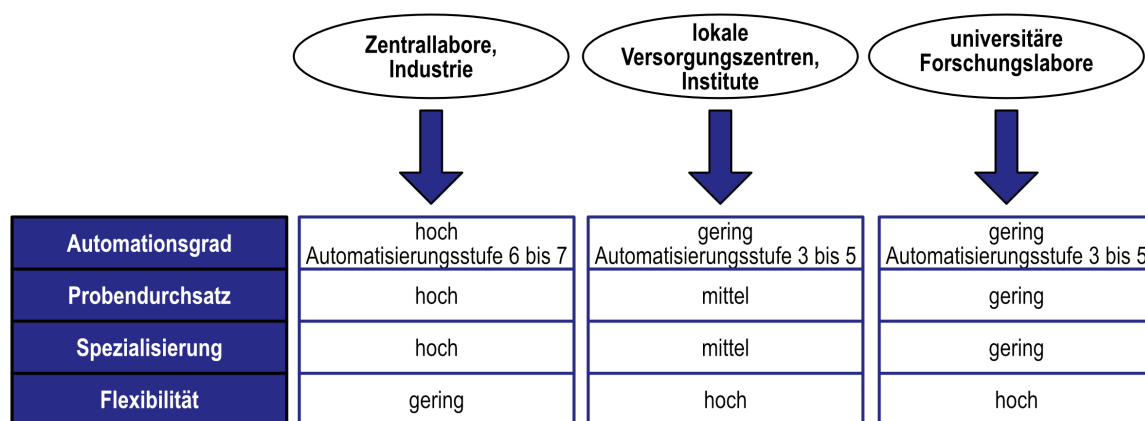


Abbildung 2.10: Verknüpfung zw. Automationsgrad und Probendurchsatz in Life Sciences Laboren

Ein hoher Probendurchsatz und die damit verbundenen hohen Prozesskosten stellen einen wesentlichen Treiber für die Entwicklung und den Einsatz von Automationslösungen dar. Die Hochdurchsatz-Screening-Assays zur Entdeckung neuer Leitstrukturen in der pharmazeutischen Industrie aus dem Bereich des Bioscreenings werden häufig mit Liquid-Handling-Systemen durchgeführt. Der hohe Automationsgrad in zentralisierten klinischen Laboren zur Untersuchung der bioanalytischen Proben wird häufig durch sogenannte Analyzer-Systeme erreicht (siehe Abschnitt 2.2.5.2) [225-228]. Die eingesetzten geschlossenen Automationssysteme sind hochspezialisiert auf die Durchführung eines einzigen Prozesses optimiert und die Flexibilität ist gering [229]. Ein Beispiel ist die von Tickle et al. vorgestellte maßgeschneiderte und vollständig automatisierte Antikörper-Screening-Plattform. Die Plattform ermöglicht das parallele primäre Screening von mehr als einer Milliarde B-Zellen auf 500 Mikrotiterplatten am Tag zur Ermittlung der Antigenbindungsstellen [230]. Im Zentrallaborbereich wird beispielsweise der Analyzer ADVIA Centaur XPT (Siemens Healthineers, Erlangen, DE) zur Bestimmung klinischer Laborparameter eingesetzt, mit welchem Probendurchsätze von bis zu 240 Tests pro Stunde möglich sind [231].

Niedrigere Probendurchsätze wie in kleinen und mittleren Laboren führen zu einer niedrigeren Rentabilität und erschweren die Einführung eines Automationssystems in diesem Bereich aufgrund hoher Investitionskosten. Eine unangepasste Übernahme bestehender Automationslösungen aus dem Hochdurchsatzbereich zur Probenvorbereitung in kleinen und mittleren Laboren mit niedrigeren

Probendurchsätzen ist somit nur mit finanziellen Einbußen möglich, zum Beispiel bei starkem Personalmangel oder zur Verkürzung der Durchlaufzeit in Notfallsituationen.

Auch die häufig wechselnden Anforderungen an das Automationssystem, bedingt durch den in Forschungslaboren angenommenen steten Wechsel der Prozesse, stellen Hürden bei der Einführung eines hochspezialisierten Automationssystems dar [13, 226, 232, 233]. Die aus der Durchführung von Bioscreening-Anwendungen stammenden Liquid-Handling-Systeme bieten hingegen für bioanalytische Probenvorbereitungsmethoden nicht genügend Funktionalitäten. Demzufolge sind für bioanalytische Labore mit wechselnden Prozessen und niedrigen Durchsätzen flexible Automationslösungen mit einem erweiterten Funktionsumfang notwendig [234]. Flexible Automationssysteme könnten durch die wechselnde Durchführung von verschiedenen Methoden ausgelastet und kosteneffektiv genutzt werden, z.B. bei einer wöchentlichen Frequenz der Durchführung einer Methode. Aber auch die Änderung des Durchsatzes an sich, z.B. bei saisonaler Erhöhung des Probenaufkommens (Grippewellen) oder Krisenzeiten (Pandemien). Ein erweiterter Funktionsumfang ermöglicht die Automatisierung komplexer bioanalytischer Prozesse.

2.2.4 Liquid-Handling-Systeme

Die auf den kartesischen Robotern basierenden Liquid-Handling-Systeme (LHS) bestehen in der einfachsten Ausführung aus einer Pipettiereinheit und dienen dem reinen Lösungsmitteltransfer. Die Bandbreite der verfügbaren Pipettiereinheiten ist hoch und beginnt bei sehr einfachen, halbautomatischen Pipettiersystemen bis zu Kombinationen aus Einzelkanal- und Mehrkanal-Pipettiereinheiten [235].

Die Technologien für den Flüssigkeitstransfer können sowohl luft- oder flüssigkeitsbasiert sein als auch kontaktlos erfolgen. Bei den luft- und flüssigkeitsbasierten Pipettiereinheiten beträgt die maximale Kanalanzahl 1.536, während beim kontaktlosen Dispensieren, wie beim Biomek ECHO (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA), bis zu 3.456 Kanäle möglich sind. Das transferierbare Volumen je Transfervorgang beginnt im μl -Bereich und endet im niedrigen Milliliter-Bereich. Am häufigsten werden Volumenbereiche zwischen 0,5 und 5.000 μl angegeben. Klassische Liquid-Handling-Systeme besitzen zudem Greifer für den Transport von Labware sowie Positionen für die Bereitstellung von Proben, Lösungsmitteln, Pipettenspitzen oder weiterer benötigter Labware (Automated Labware Positions, ALPs). Die Zahl der Manipulatoren und die Ausführung der Greifer für den Transport der Labware variieren in Abhängigkeit vom Anwendungszweck. Grundsätzlich existiert aber meist eine Bewegungseinheit mit Greifern für den Transport von Labware im Standardformat. Optional kann ein Greifer für den Transport von Einzelgefäßen, das Öffnen von Schnapp- oder Schraubverschlüssen oder den Transport von Labware mittels Unterdruck oder Magnetismus integriert werden. In Abbildung 2.11 ist ein Überblick zu verschiedenen Gefäß- und Mikrotiterplattentypen dargestellt.

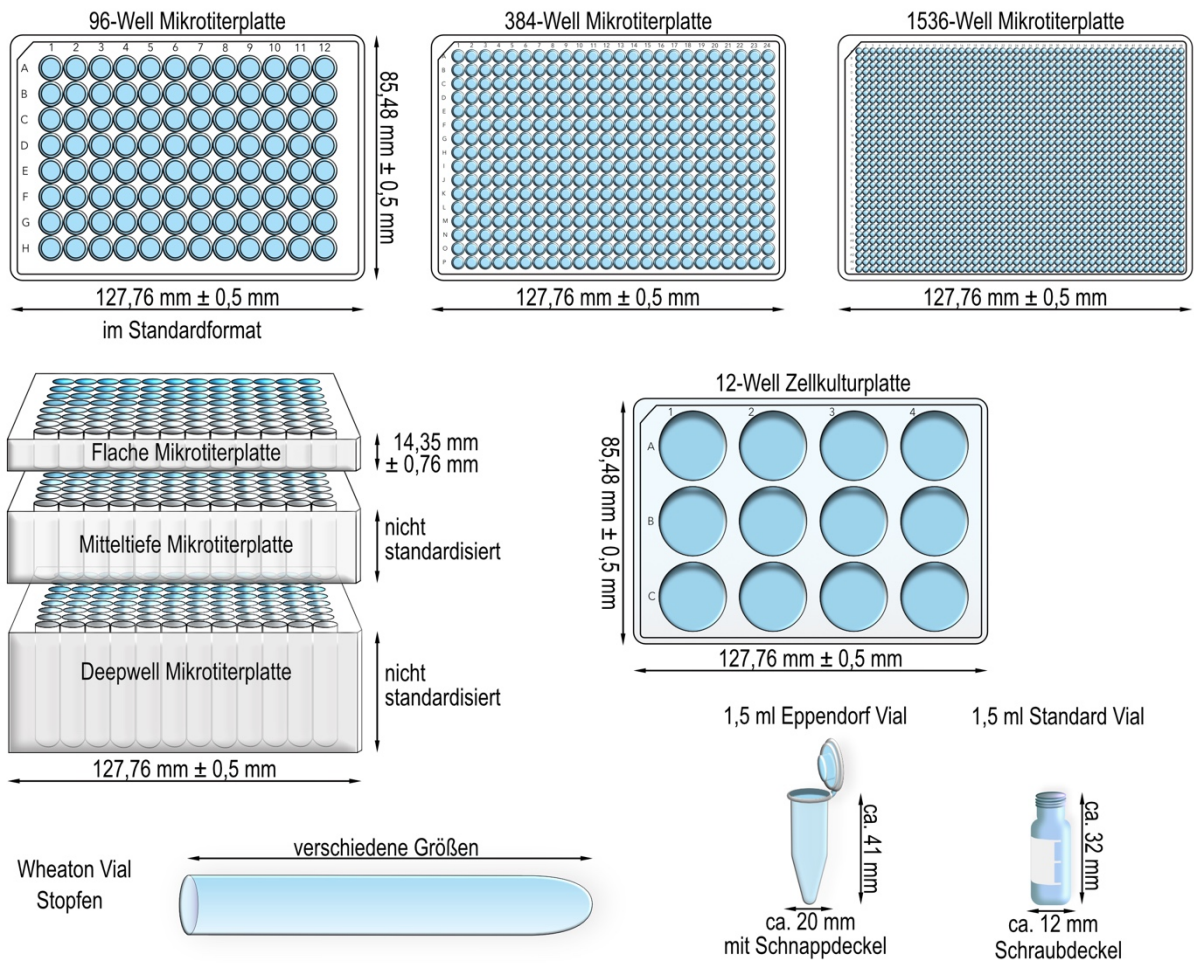


Abbildung 2.11: Labware Übersicht

Zur Durchführung von spezielleren Aufgaben, wie beispielsweise der Druckaufgabe im Rahmen einer Festphasenextraktion, ist die Integration von Zusatzgeräten in die Workstation notwendig. Diese Zusatzgeräte können anhand ihrer Funktion beispielsweise in Geräte für die Extraktion, Inkubation oder Zentrifugation unterteilt werden. In Tabelle 2.2 ist eine Übersicht kommerziell verfügbarer Beispiele geordnet nach Funktionen dargestellt.

Tabelle 2.2: Übersicht kommerzieller Zusatzgeräte

Funktion	Beispiel	Hersteller
Barcode-Lesegeräte	easyCode carrier SAFE READ Single Integration VisionMate 96	Hamilton, Reno, USA LVL Technologies, Crailsheim, DE Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Evaporation	mVAP Ultravap Mistral UltraVap Levante	GERSTEL, Mühlheim an der Ruhr, DE Porvair Science, Wrexham, UK Porvair Science, Wrexham, UK
Extraktion/ Filtration	Positive Pressure Unit Hamilton [MPE] ² Hamilton On-Deck Vacuum Station Freedom EVO Positive Pressure Cartridge Package Resolvex i300 Resolvex A200	amplus GmbH, Warnemünde, DE Hamilton, Reno, USA Hamilton, Reno, USA Tecan, Männedorf, CHE Tecan, Männedorf, CHE Tecan, Männedorf, CHE
Handling von Lösungsmitteln	Self-Refilling Quarter Reservoir Self-Refilling Multichannel Reservoir 2D Tilting ALP 3D Tilting ALP SolventFillingStation SFS 3 Blue Washer	amplus GmbH, Warnemünde, DE amplus GmbH, Warnemünde, DE amplus GmbH, Warnemünde, DE amplus GmbH, Warnemünde, DE GERSTEL, Mühlheim an der Ruhr, DE Blue Cat Bio, Lebanon, USA
Homogenisieren	Ultraschallbad Sonorex Digitech 102HRC Shaking Peltier ALP BioShake Q1 LE220R plus	Bandelin, Berlin, DE Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE QINSTRUMENTS, Jena, DE Covaris, Woburn, USA
Inkubation	SCILA CO2 4-Position Cell Incubator Single Plate Incubator Shaker Storex STX	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE LiCONiC Instruments, Mauren, LIE
Optische Verfahren	Visual ALP Colony Picking ALP Pherastar FS, Plus Infinite M200 Pro, M Nano, Lumi, M Plex, F Plex SpectraMax ABS Plus	amplus GmbH, Warnemünde, DE amplus GmbH, Warnemünde, DE BMG Labtech, Ortenberg, DE Tecan, Männedorf, CHE Molecular Devices, San José, USA
Proteinaufreinigung	RoboColumn Unit Te-Crom Modul C.Wash (Plate Washer)	amplus GmbH, Warnemünde, DE Tecan, Männedorf, CHE Cytexa, Freiburg, DE
Temperieren	Static Peltier ALP On Deck Thermal Cycler Hamilton Heater Cooler MéCour SBS Compliant Thermal Block Heat Plate Biometra TRobot II	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE Hamilton, Reno, USA MéCour, Groveland, USA QINSTRUMENTS, Jena, DE Analytik Jena, Jena, DE
Versiegelung	Hamilton Plate Sealer LVL AD Sealer Ultraseal Pro PlateLoc Thermal Microplate Sealer	Hamilton, Reno, USA LVL Technologies, Crailsheim, DE Porvair Science, Wrexham, UK Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Wiegen	DualRange Wägemodul WXSS205DU SAG285/L Balance	Mettler Toledo, Columbus, USA Mettler Toledo, Columbus, USA
Zentrifugation	VSpin Zentrifuge Kompaktzentrifuge Sigma 4-5KRL HiG 3 and 4 Automated Centrifuge	Agilent Technologies, Santa Clara, USA Gerstel, Mühlheim an der Ruhr, DE Sigma Laborzentrifugen, Osterode, DE BioNex Solutions, San José, USA

Speziell auf die Durchführung eines Prozesses angepasste und von den Herstellern kommerziell angebotene Workstations werden als vorkonfigurierte oder nach Wells et al. als applikationsspezifische Workstations bezeichnet [236]. Die Flexibilität ist gering. Das System ist geschlossen. Aktuell am Markt verfügbare Beispiele sind die ADAP STAR Workstation zur Bestimmung von SARS-CoV-2-Antikörpern (Hamilton, Reno, USA), das Biomek NGenius Next Generation Library Prep System zur Next-Generation-

Sequencing-Bibliotheksvorbereitung (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA) oder die Freedom EVOlyzer Workstation zur Durchführung von ELISA-Assays (Tecan, Männedorf, CH) (siehe Abbildung 2.12).

Frei konfigurierbare Liquid-Handling-Systeme sind modular aufgebaut, erlauben das einfache Hinzufügen und Entfernen von Komponenten und sind erweiterbar, wodurch zum einen eine Hochdurchsatzzeignung entsteht und zum anderen ein konstanter Prozesswechsel bzw. ein Wechsel der Probenvorbereitungsmethode ermöglicht wird und der Grad der Flexibilität steigt (offenes System). Beispiele sind die Hamilton Microlab STAR und STAR V Plattform, Workstations der Beckman i-series oder die Tecan Fluent und Tecan Freedom EVO Workstation (siehe Abbildung 2.12).

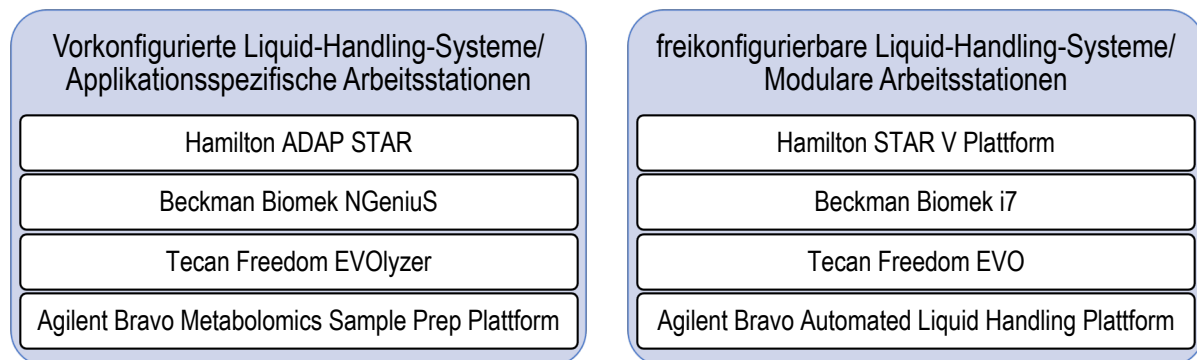


Abbildung 2.12: Klassifikation von Liquid-Handling-Systemen nach Konfiguration

Ein Vorteil der Automatisierung von Prozessen mit Liquid-Handling-Workstations ist die Möglichkeit des parallelen Flüssigkeitstransfers [237]. Durch die Verwendung spezieller Mehrkanal-Pipettierköpfe, wie dem Multichannel-Head der Biomek i7 Workstation (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA), können beispielsweise 96 Proben in einem Schritt transferiert werden. Die Parallelisierung des Prozesses wird durch die Verwendung geeigneter Labware, wie Mikrotiterplatten (MTP), und Geräten, wie Festphasenextraktionseinheiten, unterstützt [238].

2.2.4.1 Geschlossene, vorkonfigurierte Liquid-Handling-Systeme

Typische Einsatzgebiete vorkonfigurierter Liquid-Handling-Systeme sind die Genomik mit Aufgaben wie der Nukleinsäureextraktion, Sequenzierungsreaktionen, RNA-Amplifikation oder PCR [239], die Mikrobiologie mit zellulären Anwendungen wie dem Colony Picking oder der Zellviabilitätstests, Anwendungen der Proteinkristallographie, der Metabolomik und immunologischen Assays. In Zusammenhang mit der COVID-19-Pandemie haben zahlreiche Hersteller zudem vorkonfigurierte Plattformen und Protokolle für den SARS-CoV-2-Nachweis entwickelt, wie beispielsweise der Tecan Freedom EVOlyzer mit IVD98/79/EC und CFR 21 Teil 11 Zulassung oder die Hamilton ADAP STAR Assay Ready Workstation [240-242].

Die Hamilton ADAP STAR Assay Ready Workstation ist ein vorkonfiguriertes Liquid-Handling-System, basierend auf der Hamilton Microlab STAR Plattform, für den SARS-CoV-2-Antikörper-Nachweis durch Agglutinations-PCR [242, 243]. Die Biomek NGenius Workstation dient der DNA-Extraktion, -Quantifizierung, -Fragmentierung und Bibliotheksnormalisierung mittels Assays wie dem Illumina DNA

Prep oder dem Roche KAPA HyperPlus [244, 245]. Weitere Beispiele für vorkonfigurierte Liquid-Handling-Systeme sind die Biomek i5 Multichannel 96 Genomics Workstation zur Aufreinigung von DNA mittels PCR mit dem standardisierten Beckman Coulter AMPure XP Kit [246], der Tecan Freedom EVOlyzer, ein für die Durchführung von ELISA-Assays optimiertes Liquid-Handling-System [247] sowie die Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Plattform mit einsatzbereiten Protokollen zur Entfernung von Enzymen, Proteinen und Lipiden aus Plasma (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) [248]. Die flexible Nutzung der vorkonfigurierten Plattformen ist aufgrund ihrer Optimierung und Spezialisierung auf eine bestimmte Anwendung nur eingeschränkt möglich.

2.2.4.2 Offene, nicht-vorkonfigurierte Liquid-Handling-Systeme

Das Gegenstück zu den vorkonfigurierten Liquid-Handling-Systemen bilden die nicht vorkonfigurierten Plattformen, welche i.d.R. in ein bis zwei Größenausführungen bei den Herstellern verfügbar sind, als Basisfunktionen das Liquid-Handling und den Labwaretransport besitzen und in welche der Nutzer die verfügbaren Zusatzgeräte selbst integrieren kann.

Die frei konfigurierbare STAR V Liquid-Handling-Workstation (Hamilton, Reno, USA) besitzt eine Deckkapazität von 35 oder 60 MTP-Positionen. Es können 1 bis 2 Manipulatoren mit Greifern in unterschiedlichen Ausführungen für den Transport von MTP, das Öffnen von Deckeln von Einzelgefäßen sowie den Transport von leichter Labware durch Unterdruck installiert und Einzelkanal- und Mehrkanal-Pipettiereinheiten verwendet werden. Zusätzlich können Geräte wie ein Barcode Reader, das MEP² Multi-Flow Positive Pressure Extraction Modul, ein On-Deck Thermal Cycler, das Hamilton Heater Shaker oder Heating Cooler Modul, der Hamilton Incubator Shaker oder der Hamilton Plate Reader in das Deck integriert werden [249, 250].

Die Biomek i-series Liquid-Handling-Systeme (Biomek i5 und i7, Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA) sind mit einer Deckkapazität von 25 oder 45 MTP-Positionen für einen mittleren bis hohen Probendurchsatz entwickelt. Die Pipettiereinheitsoptionen beinhalten die 96- bis 384-Mehrkanal-Pipettieroptionen, die 8-Einzelkanal-Pipettieroptionen oder die Verwendung von zwei Mehrkanälen oder einer Kombination aus Einzel- und Mehrkanal-Pipettieroptionen mit Volumina zwischen 0,5 und 5.000 µl. Bis zu zwei Greifer stehen für den Transport von Labware zur Verfügung. Zusätzlich können in das Deck beispielsweise Tube Scan, Positive Pressure, Shaking Peltier, Static Peltier, Tip Wash 96 oder Tip Wash Span-8 Module integriert werden [235, 251].

Die frei konfigurierbare Freedom EVO Plattform (Tecan, Männedorf, CH) wird mit 27, 30, 45 oder 69 Deckpositionen angeboten. Je nach Größe des Decks sind ein bis drei Manipulatoren verfügbar, die als Greifer ausgeführt dem Transport von MTP oder Einzelgefäßen sowie als Pipettiereinheit dem Transfer von Lösungsmitteln dienen. Die Pipettiereinheit kann flüssigkeitsbasiert oder luftbasiert mit zwei bis acht Einzelkanälen oder einem 96- oder 384-Mehrkanal-System mit fixierten oder Einmal-Spitzen mit Volumina zwischen 0,5 und 5.000 µl sein. Optional können in das Deck Vakuumfiltrationseinheiten, Schüttler, Heizelemente, Inkubatoren sowie Elemente für die magnetische Separation integriert werden [252].

Die flexible Liquid-Handling-Plattform Bravo (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) besitzt neun Deckpositionen und ist mit einem Greifer sowie wahlweise mit einer 96- oder 384-Mehrkanal-

Pipettiereinheit ausgestattet. Für die Realisierung verschiedenster Probenvorbereitungsmethoden stehen über 60 Zubehörteile zur Verfügung, wie eine Vakuumfiltrationsstation, eine Waage, Tip-Wash-Stationen, Heizelemente, Schüttler sowie Magnetic Bead Accessoires [253].

Liquid-Handling-Systeme werden zur Automatisierung von Prozessschritten in der Probenvorbereitung eingesetzt (siehe Kapitel 4.1), wodurch, bezogen auf den gesamten Arbeitsablauf eines Laborprozesses, eine Teilautomatisierung erreicht wird. Die vollständige Automatisierung kann durch Einsatz von zentralen stationären Robotern oder mobilen Robotern durch die Anbindung zum Messgerät erreicht und zur Entstehung eines zentralen oder dezentralen, integrierten Systems führen.

2.2.5 Automationssysteme der messtechnischen Analyse und der totalen Laborautomation

Instrumentelle Analytikmessgeräte mit automatischem Probengeber sowie klinische oder mikrobiologische Analysemesssysteme, auch als Analyser bezeichnet, gehören zu geschlossenen Laborautomationssystemen, die den Laborprozess teilweise oder vollständig automatisieren. Der Schwerpunkt dieser Systeme liegt auf der messtechnischen Analyse, wobei sie optional auch einfache Probenvorbereitungsmaßnahmen durchführen können.

2.2.5.1 Instrumentelle Analytikmessgeräte

Die instrumentelle Analytik, wie die Probeninjektion, die chromatographische Trennung sowie die massenspektrometrische Bestimmung, läuft nach dem Einstellen der Probe in den automatischen Probengeber vollständig automatisiert ab [254]. Einfache probenvorbereitende Maßnahmen wie Verdünnungen sind mit dem automatischen Probengeber ebenfalls möglich [255]. Eine Sonderform stellen die on-line Extraktionstechniken dar, bei denen das chromatographische System neben der Separierung der Analyten auch zur Durchführung von Extraktionen, beispielsweise durch die Vorschaltung von präparativen Säulen oder durch die Nutzung von wiederverwendbaren online-SPE-Kartuschen, eingesetzt wird. Die direkte Kopplung der Probenaufreinigung und -konzentrierung mit dem chromatographischen System führt zur Eliminierung eines Transportschritts, zu Zeiteinsparungen sowie zur Erhöhung des Automationsgrads [256-259]. Dies wird auch bei der direkten physischen Verbindung zwischen Automationssystemen zur Probenvorbereitung und dem instrumentellen Analysemesssystem genutzt. Ein Beispiel ist die Kopplung des GERSTEL MultiPurpose Samplers (Mülheim an der Ruhr, DE) mit dem AB SCIEX QTRAP 4500 LC/MS/MS-System (Framingham, USA) zur Bestimmung von Drogen aus Urinproben [260].

2.2.5.2 Analyser-Systeme

Analyser sind geschlossene Automationssysteme, die durch den Hersteller zur Durchführung spezieller, kommerziell erhältlicher Tests konfiguriert wurden und auf die Erzielung hoher Probendurchsätze ausgelegt sind. Die Flexibilität ist im Gegensatz zu on-line-SPE-Systemen, die beispielsweise durch den Tausch der Säule relativ einfach an neue Methoden angepasst werden können, geringer.

Im Gegensatz zur „klassischen“ instrumentellen Analytik, welche die messtechnische Analyse des Laborprozesses automatisiert, ermöglichen Analyser die vollständige Automatisierung des gesamten Laborprozesses (TLA).

Analyser werden in der klinischen Chemie, Hämatologie und Mikrobiologie zur Untersuchung von Analyten aus Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben eingesetzt [11, 261-264]. Typische Analyten sind Kalzium-, Natrium-, Chlorid-, Magnesium-, Eisen- und Blei-Ionen, kleine Moleküle wie Glukose, Harnstoff, Laktat, Cholesterol, Triglyzeride, Medikamente, Drogen und Alkohol, aber auch große Moleküle, wie beispielsweise Transportproteine (Albumin), Immunglobuline, Lipoproteine, Diabetes-Marker und Enzyme wie Amylase und Lactat-Dehydrogenase. Die Tests werden häufig zu Panels zusammengefasst, in denen mehrere Tests für krankheitsspezifische Marker mit einer Probe durchgeführt werden, z.B.

Elektrolyt- oder Nieren-Panel (Untersuchung von anorganischem Phosphor, Harnstoff, Stickstoff, Kreatinin, Magnesium) [265-269].

Im Analyzer werden automatisiert Sicherheitsprozesse durchgeführt wie ein Systemcheck, die Kalibrierung oder die Messung von Quality-Control-Proben. Anschließend erfolgen die Sortierung der Proben, die Durchführung probenvorbereitender Maßnahmen wie die Zugabe eines Reagenzes, das Homogenisieren oder die Inkubation sowie die optische Messung. Abschließend erfolgen die Berechnung und Ausgabe der Ergebnisse. Ähnlich wie in der Automobilindustrie entstehen Automationsstraßen, wodurch die Erzielung hoher Probendurchsätze ermöglicht wird. Einfache Änderungen des Ablaufs sind i.d.R. nicht möglich und die Flexibilität dementsprechend gering. Zu den wichtigsten Herstellern zählen Abbott Laboratories, Beckman Coulter, Medica, Mindray, Ortho Clinical Diagnostics, Roche, Randox Laboratories, Siemens Healthineers und Thermo Fisher Scientific [270, 271]. Mit dem Clinical Chemistry Analyzer AU680 von Beckman Coulter ist ein Probendurchsatz von 800 Proben pro Stunde möglich [272]. Der molekulardiagnostische Abbott Alinity m Analyzer dient der vollautomatisierten Durchführung kommerzieller Assays, wie dem Alinity m SARS-CoV-2 Assay. Das Assay für den qualitativen Nachweis der Präsenz von SARS-CoV-2-RNA besteht aus einer Probenvorbereitung, einer RT-PCR, einer Amplifikation sowie der Detektion und Ausgabe des Ergebnisses und wird mit dem Abbott Alinity m vollautomatisiert innerhalb von zwei Stunden durchgeführt. Der maximale Durchsatz beträgt 1.080 Proben pro Tag [273, 274]. Perchetti et al. vergleichen in ihrer Studie die Ergebnisse unterschiedlicher kommerzieller Assays mit verschiedenen Analyzern [275]. In einer Studie von Thomson et al. wird das kommerziell erhältliche BD Kiestra TLA-System (Becton Dickinson and Company, New York, USA) vorgestellt und mit Systemen zur partiellen mikrobiologischen Laborautomatisierung verglichen [9, 217, 276].

Analyzer, die mit einem Massenspektrometer gekoppelt sind, werden auch als FAMSA-Systeme bezeichnet (Fully Automated MS Analyzer) [254]. Ein Beispiel ist der Cascadion SM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), welcher speziell für die Probenvorbereitung und Analyse mittels LC-MS/MS zur Bestimmung des 25-Hydroxy-Vitamin-D-Gehalts konfiguriert wurde [277]. Mit dem Cascadion SM können bis zu 25 Proben pro Stunde bei einer Gesamtbeladungskapazität von 60 Proben vorbereitet und analysiert werden. Ein Eingriff durch das Laborpersonal ist nicht notwendig, wodurch Fehlerquellen reduziert und eine hohe Reproduzierbarkeit auch zwischen verschiedenen Laboren erreicht wird [254]. In der Studie von Benton et al. wird eine Übereinstimmung von $R^2 > 0,97$ bei der Bestimmung von Vitamin D aus 154 Serumproben mit zwei Cascadion SM Systemen in verschiedenen Laboren erreicht [278]. Die Investitionskosten für die auf höchste Durchsätze optimierten, hochspezialisierten, geschlossenen totalen Laborautomationssysteme betragen i.d.R. mehr als eine Million Euro [219, 279].

3. Gegenstand der Dissertation

Die Bioanalytik spielt eine entscheidende Rolle in der pharmazeutischen, forensischen oder umweltwissenschaftlichen Forschung und Entwicklung sowie der Routineanalytik, um sowohl kleine Moleküle wie Medikamente und Drogen als auch größere Moleküle wie Proteine in biologischen Matrices nachzuweisen oder zu charakterisieren. Für den Analytnachweis stehen verschiedene instrumentelle Techniken zur Verfügung, die je nach Analyt, Matrix und Ziel der Untersuchung ausgewählt werden. Optische Techniken ermöglichen die Parallelisierung von Analysen, sind schnell und stellen aufgrund der geringeren Matrixeffekte weniger Anforderungen an die Probenvorbereitung, da der Detektor nicht mit der Probe in Berührung kommt. Allerdings bieten sie keine Möglichkeit, strukturelle Informationen über den Analyten zu gewinnen. Im Gegensatz dazu können massenspektrometrische Techniken strukturelle Informationen liefern. In der Bioanalytik werden die LC-MS und LC-MS/MS aufgrund ihrer hohen Sensitivität, Spezifität und des hohen Probendurchsatzes besonders häufig eingesetzt. Die vorgeschaltete Flüssigchromatographie ermöglicht die zeitliche Trennung der Analyten, sodass diese nicht simultan bestimmt werden müssen. Die hohe Sensitivität und Selektivität dieser Techniken kann jedoch nur durch eine vorherige Entfernung störender Matrixkomponenten gewährleistet werden, um die Qualität der Messung durch Interferenzen nicht negativ zu beeinträchtigen. Folglich spielt die Probenvorbereitung bei der Untersuchung von Analyten aus komplexen biologischen Matrices eine entscheidende Rolle.

Ziele der Probenvorbereitung sind die Aufreinigung und Anreicherung der Analyten, die Entfernung störender Matrixkomponenten, der Lösungsmitteltausch oder die Überführung des Analyten in eine für die Analytik geeignete Form mittels Hydrolyse, Derivatisierung oder Ansäuerung. Häufig genutzte Probenvorbereitungstechniken in der Bioanalytik sind die Proteinfällung, die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die SPE sowie Kombinationen dieser Techniken. Vor dem Hintergrund Bioanalysen ressourcenschonender zu gestalten, gewinnen außerdem Mikroextraktionstechniken wie die μ SPE an Bedeutung.

Die zunehmende Effizienz instrumenteller Analysetechniken hat dazu geführt, dass die Probenvorbereitung mittlerweile den Großteil der Zeit einer Analyse beansprucht und zu hohen Kosten führt. Ein zentrales Ziel bei der Entwicklung bioanalytischer Methoden besteht daher darin, neue Verfahren kosteneffizient und nachhaltig zu gestalten. Die Automatisierung bietet diese Möglichkeit. Zudem können Labormitarbeiter vor schädlichen Lösungsmitteldämpfen und repetitiven Tätigkeiten geschützt werden. Auch die Qualität der Ergebnisse kann durch die immer gleiche Durchführung auf einem Automationssystem gesteigert und grobe Fehler vermieden werden. Für die Automatisierung im Hochdurchsatz stehen zahlreiche leistungsfähige, allerdings auch hochspezialisierte Systeme zur Verfügung. Diese sind in kleineren und mittleren Laboren nicht wirtschaftlich einsetzbar. Für den Bereich niedrigerer Durchsätze sind flexiblere Probenvorbereitungssysteme notwendig.

Eine Möglichkeit, Automationssysteme auch für kleine und mittlere Labore mit geringeren Probendurchsätzen wirtschaftlich nutzbar zu machen, besteht in der Entwicklung eines Systems, welches nicht hochspezialisiert auf die Durchführung einer Anwendung ausgelegt ist, sondern die Durchführung

einer breiten Palette von Anwendungen ermöglicht. Durch die Kombination von Proben aus verschiedenen Anwendungen kann das Automationssystem auch bei niedrigen Probenzahlen der einzelnen Anwendung ausgelastet werden, wodurch die Rentabilität des Systems und damit auch des Labors steigt.

Das Ziel dieser Arbeit besteht demnach in der Entwicklung eines flexiblen, generalisierten und dadurch möglichst „allgemeingültigen“ Automationssystems zur Sicherstellung der Wettbewerbsfähigkeit kleiner und mittlerer Labore.

Für den Entwurf des Automationssystems erfolgt zunächst eine allgemeine Analyse von Laborprozessen, um Gemeinsamkeiten der Prozesse, Möglichkeiten zur Standardisierung sowie benötigte Funktionalitäten zu ermitteln und darauf basierend eine geeignete robotische Konfiguration auszuwählen und mit einer breiten Auswahl an Komponenten auszustatten (Kapitel 4).

Im Anschluss erfolgt die Realisierung verschiedener komplexer, bioanalytischer Probenvorbereitungsprozesse auf dem entwickelten Automationssystem. Dazu werden die zu automatisierenden Probenvorbereitungsprozesse analysiert, Anforderungen an das System abgeleitet und mit dem entworfenen Automationskonzept in Hinblick auf die Machbarkeit überprüft. Nach der Realisierung der Anwendungen erfolgt die qualitative Überprüfung durch Validierungen. Darüber hinaus werden die automatisierten Probenvorbereitungsmethoden aus wirtschaftlicher Perspektive sowie hinsichtlich ihrer Nachhaltigkeit bewertet (Kapitel 6). Abschließend erfolgt die Bewertung des Gesamtsystems in Hinblick auf das Ziel, die Wirtschaftlichkeit und Wettbewerbsfähigkeit von kleinen und mittleren Laboren auch mit der Herausforderung von wechselnden oder niedrigen Probenzahlen sicherzustellen (Kapitel 7).

4. Konzeptionierung des Automationssystems

4.1 Analyse von Laborprozessen

Laborprozesse können allgemein in die Probenvorbereitung, die messtechnische Analyse der Proben („Analytik“) und die Datenauswertung gegliedert werden (siehe Abbildung 4.1).

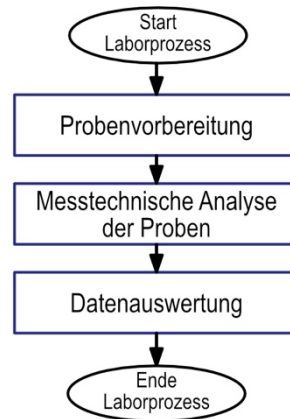


Abbildung 4.1: Überblick Laborprozess

Das Ziel in allen bioanalytischen Laborprozessen ist die eindeutige qualitative und quantitative Bestimmung von Analyten. Um Analyten in den komplexen bioanalytischen Matrices bestimmen zu können, ist eine hohe Selektivität in allen Laborprozessschritten erforderlich. Die in dieser Arbeit im Fokus stehende zu automatisierende Probenvorbereitung wird der präsensorischen Selektivierung zugeordnet (Konzept der prä-, intra- und postsensorischen Selektivierung [14]). Eine hohe präsensorische Selektivierung kann durch die Kopplung der verschiedenen, in Abschnitt 2.1.3 vorgestellten, Probenvorbereitungstechniken erreicht werden. Trotz der Vielzahl der entstehenden Probenvorbereitungsmethoden ist eine allgemeine dreistufige Gliederung der speziell an Analyt, Matrix und Messtechnik angepassten Probenvorbereitungsprozesse möglich (siehe Abbildung 4.2).

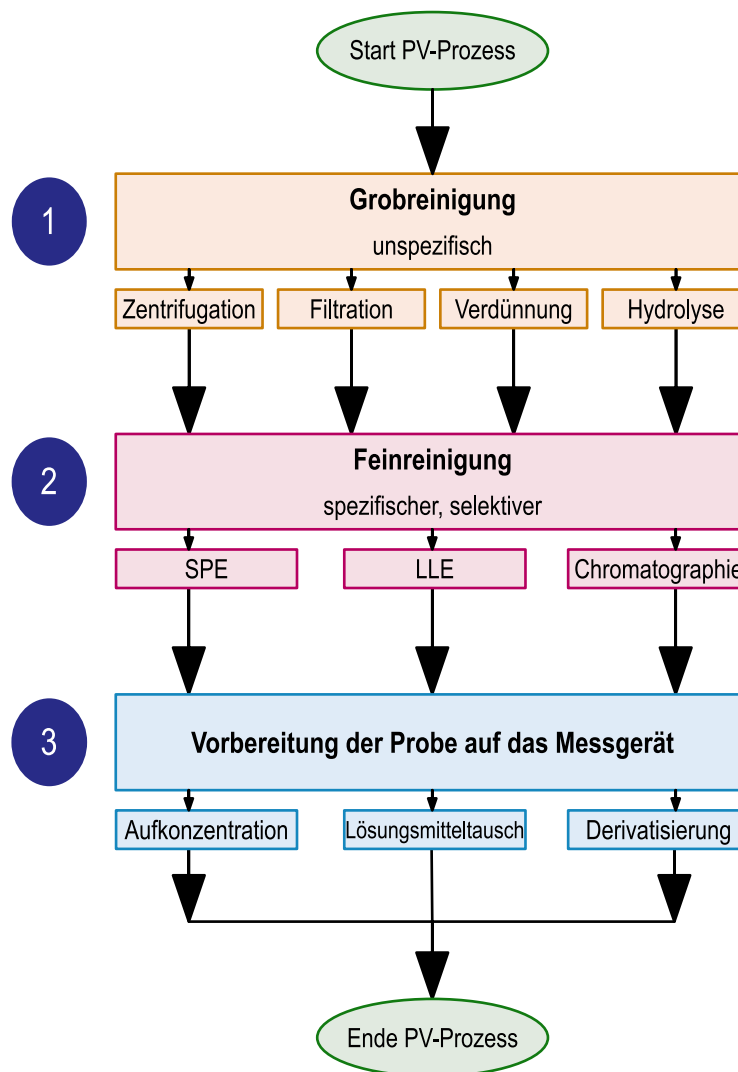


Abbildung 4.2: Einteilung des Prozesses der Probenvorbereitung (PV) in 3 Stufen

In der ersten Stufe erfolgt eine „grobe“, noch relativ unspezifisch wirkende Reinigung der Probe. Dieser Stufe werden Probenvorbereitungstechniken wie die Zentrifugation, Proteinfällung und Filtration zur Abtrennung schwerer oder größerer Bestandteile wie Zellen, Proteine oder Moleküle einer bestimmten Größe, die Verdünnung und die Hydrolyse zur Abspaltung unerwünschter Probenbestandteile zugeordnet. In der zweiten Stufe erfolgt die Feinreinigung der Analyten. Die in dieser Stufe des Probenvorbereitungsprozesses eingesetzten Probenvorbereitungstechniken sind selektiver und spezifischer an den Analyten und dessen Eigenschaften angepasst. Dazu gehören Probenvorbereitungstechniken wie die SPE, die LLE und die Chromatographie. Die in Stufe drei des Probenvorbereitungsprozesses eingesetzten Techniken können als Techniken aufgefasst werden, welche die Probe auf die Messung vorbereiten. Dazu gehört u.a. die Evaporation, welche zum einen der Aufkonzentration und damit der Sensitivitätsanpassung an das Messgerät dient und zum anderen auch einen Tausch des Lösungsmittels durch die sich bei vollständiger Verdampfung des Lösungsmittels anschließende Rekonstitution ermöglicht. Derivatisierungen, welche ebenfalls der dritten Stufe des

Probenvorbereitungsprozesses zugeordnet werden, ermöglichen u.a. die Bestimmung nicht volatiler Analyten mittels GC-MS oder die Trennung chiraler Analyten in der LC-MS(/MS) [102].

Die in Abbildung 4.2 vorgestellte dreistufige Gliederung des Probenvorbereitungsprozesses wird in Abbildung 10.1 in Anhang 10.2. auf weitere in der Literatur vorgestellte Probenvorbereitungsprozesse übertragen.

Zur tiefergehenden Prozessanalyse werden die Prozesse der einzelnen Probenvorbereitungstechniken analysiert. Der Prozess der Probenvorbereitungstechnik *Verdünnung* besteht im Wesentlichen aus dem Transfer des zur Verdünnung genutzten Lösungsmittels. Je nach benötigtem Volumen kann dies in ein oder mehr Transferschritten geschehen. Zusätzlich kann auch die zu verdünnende Probe in ein für die Verdünnung genutztes Gefäß durch einen weiteren Transferschritt überführt oder die Verdünnung durch einen Schritt zur Homogenisierung des Gemischs abgeschlossen werden. Die Entnahme geringer Volumina während des Flüssigkeitstransferschritts kann durch eine Neigung der Labware vereinfacht werden. Der Prozess der häufig genutzten Kombination aus *Proteinfällung und Zentrifugation* besteht ebenfalls aus Transferschritten (Transfer der Probe, Transfer des Fällungsreagenzes), Transportschritten (Be- und Entladung der Zentrifuge) sowie dem Schritt des Zentrifugierens. Der Prozess der Probenvorbereitungstechnik *Filtration* besteht aus einem Transfer der zu filtrierenden Flüssigkeit auf den Filter sowie einem Druckaufgabe- oder Zentrifugationsschritt bzw. einer einfachen Wartezeit (Schwerkrafftfiltration). Aufwendigere Probenvorbereitungstechniken wie die *Festphasenextraktion* bestehen aus Transportschritten von Labware, Transfer von Flüssigkeit- sowie Druckaufgabe-Schritten in mehrfacher Wiederholung. Der Prozess der Probenvorbereitungstechnik *Hydrolyse* besteht aus Transferschritten, wie dem Hydrolysereagenz, dem Transfer der Probe und der Pufferlösung sowie dem Schritt des Inkubierens. Die Prozesse der unterschiedlichen Probenvorbereitungstechniken sind in Abbildung 4.3 zusammengefasst.

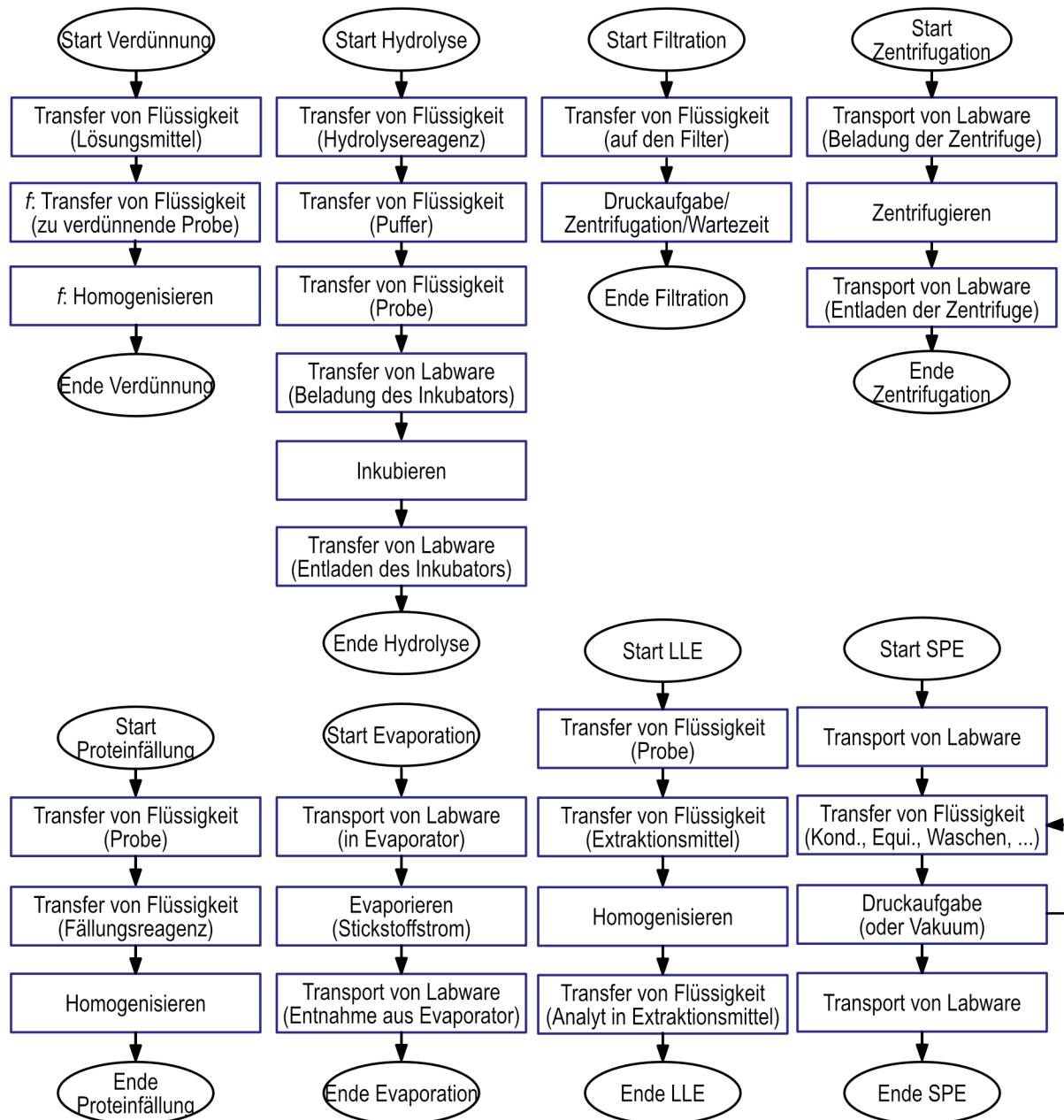


Abbildung 4.3: Prozesse ausgewählter Probenvorbereitungstechniken (f=fakultativ)

Beim Vergleich der Prozesse der einzelnen Probenvorbereitungstechniken ist erkennbar, dass Funktionen wie der Transfer von Flüssigkeiten und der Transport von Labware sehr häufig vorkommen, weswegen diese als grundlegende Funktionen identifiziert werden. Weiterhin werden spezielle Funktionen, wie das Zentrifugieren, Inkubieren, Filtrieren (Druckaufgabe) und Temperieren identifiziert, die zumeist mit der Verwendung spezialisierter Geräte gekoppelt sind. Die grundlegenden und speziellen Funktionen einer Probenvorbereitungstechnik sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

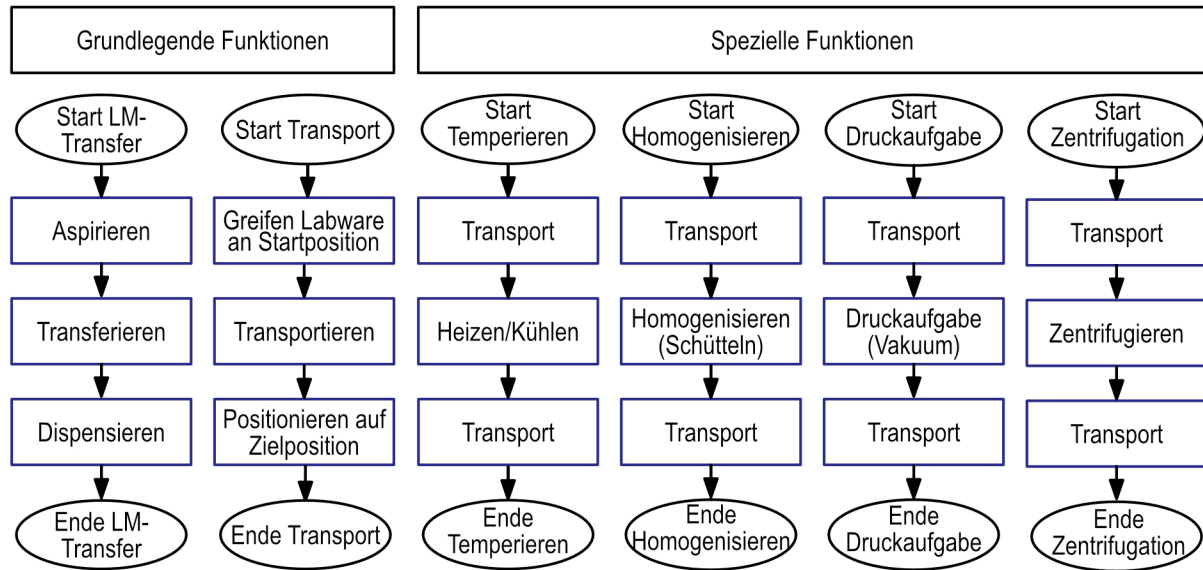


Abbildung 4.4: Überblick grundlegende und spezielle Funktionen: Transfer und Transport sowie Temperieren, Homogenisieren, Druckaufgabe und Zentrifugation

Die grundlegenden Funktionen werden bei der manuellen Durchführung eines Probenvorbereitungsprozesses durch den Menschen vorgenommen. Dies kann durch Zuhilfenahme einfacher Hilfsmittel wie einer manuell zu führenden Pipette wie beim Lösungsmitteltransfer oder vollständig manuell wie beim Transport von Labware erfolgen. Auch vorbereitende Maßnahmen wie das Aufnehmen oder Abwerfen von Pipettenspitzen erfolgen manuell. Die spezielleren Funktionen wie die Druckaufgabe oder die Zentrifugation werden im manuellen Prozess durch spezielle Geräte realisiert. Die Bestückung der Geräte und die Parametereinstellung erfolgt manuell durch den Bediener.

4.2 Auswahl des Automationssystems

Das Ziel dieser Arbeit ist die wirtschaftliche Automatisierung bioanalytischer Probenvorbereitungsprozesse. Das Hauptauswahlkriterium ist daher die Realisierungsmöglichkeit bioanalytischer Probenvorbereitungsprozesse und daraus abgeleitet die Automatisierbarkeit der grundlegenden und speziellen Funktionen eines Probenvorbereitungsprozesses (siehe Kapitel 4.1).

Demzufolge umfassen die Basisanforderungen an das Automationssystem den automatisierten Lösungsmitteltransfer, den Transport von Labware sowie die häufig genutzten Temperier-, Durchmischungs-, Druckaufgabe- und Zentrifugationsschritte. Die spezielleren Funktionen müssen ebenso wie im manuellen Prozess durch den Einsatz spezieller Geräte realisiert werden, woraus sich die Anforderungen der Integrierbarkeit dieser Geräte in ein Automationssystem durch geeignete Schnittstellen zur Steuerung, der Bestückbarkeit der Geräte durch das Automationssystem sowie die Berücksichtigung des zur Verfügung stehenden Platzes im Automationssystem ergeben. Die einfache Erweiterbarkeit oder der Tausch eines speziellen Geräts, um andere als die zuvor genannten Funktionen zu ermöglichen, ist eine weitere Anforderung.

Das zweite Auswahlkriterium ist die Wirtschaftlichkeit. Die Wirtschaftlichkeit eines Systems ist in hohem Maß abhängig vom möglichen Probendurchsatz, der Auslastung sowie den Investitions- und Betriebskosten. Im Bereich der kleinen und mittleren Labore mit niedrigeren oder schwankenden Probenzahlen ist eine hohe Flexibilität und breite („universelle“) Einsetzbarkeit des Automationssystems wichtig, um dieses mit wechselnden Prozessen trotz niedrigerer Probenzahlen auslasten zu können.

Weitere Auswahlkriterien für ein Automationssystem sind eine hohe Präzision und Robustheit sowie die Bereitstellung von Schutzfunktionen für den Menschen als auch die Ermöglichung nachhaltiger Lösungen.

Liquid-Handling-Systeme sind auf die Durchführung der Grundfunktionen bioanalytischer Prozesse des Transfers von Lösungsmitteln sowie des Transports von Labware mit hoher Präzision optimiert. Liquid-Handling-Systeme existieren in verschiedenen Größen, was eine Anpassbarkeit des Systems an unterschiedliche Durchsätze ermöglicht. Die kartesische Konfiguration von Liquid-Handling-Systemen führt zu einem klar definierten Arbeitsbereich und einem geringen Platzbedarf. Der Zusatzaufwand zur Installation von Schutzeinrichtungen ist minimal. Die in Abschnitt 2.2.4 vorgestellten nicht vorkonfigurierten, offenen LHS ermöglichen zudem die Integration von Zusatzgeräten, um auch die spezielleren Funktionen bioanalytischer Prozesse automatisiert durchführen zu können. Die vordefinierten Bewegungsabläufe und eine graphische Benutzeroberfläche vereinfachen die Bedienbarkeit von LHS und beschleunigen die Erstellung neuer Probenvorbereitungsmethoden, was für die Realisierung häufig wechselnder Prozesse in kleinen und mittleren bioanalytischen Laboren wichtig ist.

Grundsätzlich sind auch artikulierte Roboter (s. Abschnitt 2.2.1 und Abbildung 2.8) zur Realisierung bioanalytischer Probenvorbereitungsprozesse gut geeignet, da mit diesen menschliche Bewegungsabläufe- und -prozesse besser imitiert werden können. Im Vergleich mit LHS ist jedoch der Programmieraufwand höher, da jeder Bewegungsablauf zunächst geteached werden muss. Da hier keine Regulationen zur Automatisierung bereits validierter Prozesse, wie im Medizinbereich vielfach, vorliegen, wird auf den Zusatzaufwand zugunsten der Bedienbarkeit und einer einfacheren Umsetzbarkeit häufig

wechselnder Prozesse verzichtet. Dies ist besonders bei den in der Bioanalytik verbreiteten Spezial- oder Einzelgefäße wichtig.

Die hochspezialisierten, auf Hochdurchsatz optimierten, geschlossenen Analyzersysteme oder totalen Laborautomationssysteme (s. Abschnitt 2.2.5.2) sind aufgrund ihrer hohen Spezifität, ihrer geringen Flexibilität sowie des hohen Installations- und Änderungsaufwands für die Automatisierung der wechselnden Prozessen in kleinen und mittleren Laboren ungeeignet. Zudem sind die Investitionskosten für die in kleinen und mittleren Laboren geringeren Probendurchsätze für einen wirtschaftlichen Betrieb dieser Systeme zu hoch.

Demzufolge wird zur Automatisierung der wechselnden, bioanalytischen Probenvorbereitungsprozesse in kleinen und mittleren Laboren ein LHS gewählt. Durch die Integration von Zusatzkomponenten wird auch die Durchführung von spezielleren Funktionen automatisiert. Die Auswahl der Zusatzkomponenten erfolgt anhand der in der Bioanalytik häufig genutzten Probenvorbereitungsmethoden (siehe Abschnitt 2.1.3), wodurch das System einen möglichst allgemeingültigen Charakter erhält. Das konfigurierte System wird in dem nachfolgenden Kapitel vorgestellt.

4.3 Konzept des Automationssystems

4.3.1 Grundkonfiguration

Die Basis des flexibel einsetzbaren, „allgemeingültigen“ Automationssystems bildet die Biomek i7 Liquid Handling Workstation (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA). Für die Realisierung von Probenvorbereitungsmethoden stehen bis zu 45 Positionen im Mikrotiterplattenformat in einem Deck zur Verfügung (siehe Abbildung 4.5), wodurch auch höhere Probendurchsätze realisiert werden können. Die Positionen können flexibel innerhalb der Workstation positioniert werden. Dies vereinfacht die Anpassbarkeit des Systems an verschiedene Probenvorbereitungsmethoden und ermöglicht den Einbau von Zusatzgeräten.

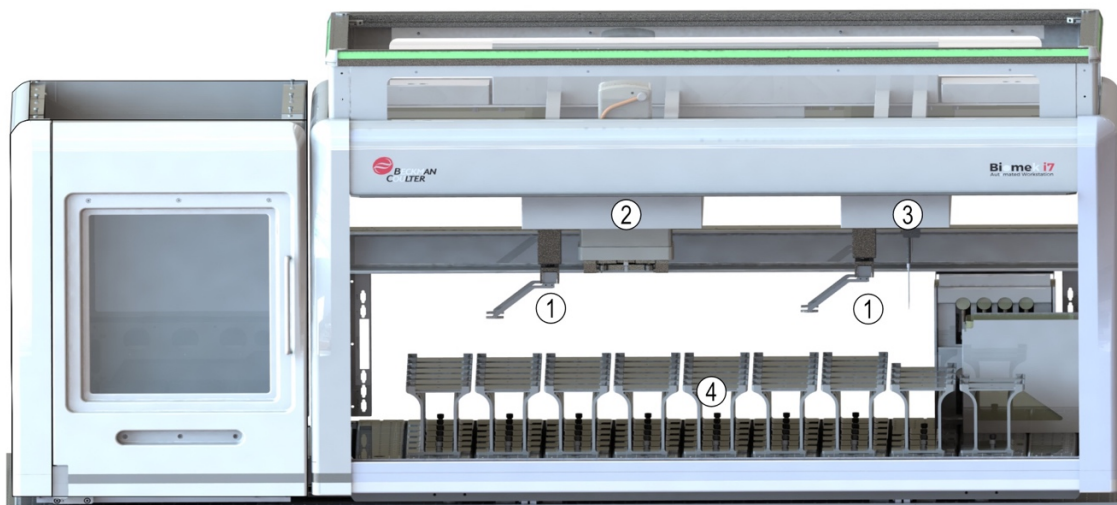


Abbildung 4.5: Überblick Systemkomponenten der Biomek i7 Hybrid Liquid Handling Workstation: (1) Greifer; (2) Mehrkanal-Pipettierkopf: Multichannel-Pod; (3) Einzelkanal-Pipettierkopf: Span-8 Pod; (4) Automated Labware Positions (ALPs)

Die Bearbeitung von Proben wird durch zwei robotische Arme ermöglicht, die jeweils mit einem Greifer zum Labware Transport und zwei Pipettierköpfen ausgestattet sind. Die Greifer bestehen aus zwei parallelen, um 360° drehbaren Fingern mit einer maximalen Greifhöhe von 5,6 cm und einer Traglast von 725 g (siehe Abbildung 4.5 (1) und Abbildung 4.6) für den optimalen Transport von Mikrotiterplatten und Labware im Standardformat. Die Biomek i7 Hybrid Workstation wird mit zwei Pipettierköpfen ausgestattet. Der „Multichannel-Pod“ (MC-Pod, siehe Abbildung 4.5 (2)) ist ein 96-Kanal-Pipettierkopf und ermöglicht den parallelen Transfer von bis zu 96 Proben, wodurch der Zeitbedarf für die häufig vorkommenden Lösungsmitteltransferprozesse stark reduziert wird und der Durchsatz steigt. Das maximal transferierbare Volumen beträgt 1.200 µl. Der „Span-8-Pod“ (siehe Abbildung 4.5 (3)) ist ein Einzelkanal-Pipettierkopf für die Bearbeitung von Einzelproben oder Spezialgefäßen. Alternativ können bis zu acht Proben parallel transferiert werden. Im Gegensatz zum Multichannel-Pod kann der Span-8-Pod sowohl mit fixierten, wiederverwendbaren Pipettenspitzen „fixed tips“ als auch mit Einweg-Pipettenspitzen „disposable tips“ verwendet werden. Dies ist in Hinblick auf die Nachhaltigkeit, aber auch für den Ausschluss von Kreuzkontaminationen oder der Wahrung der Sterilität wichtig. Die acht Einzelkanäle sind über das Schlauchsystem an die Spritzenpumpen angeschlossen. Das Volumen der Spritze definiert das maximal

transferierbare Volumen. In der vorliegenden Konfiguration ist eine 1 ml Spritze verbaut. Der Arbeitsbereich ist optimal für die häufigsten bioanalytischen Anwendungen. Falls notwendig können die Spritzen aber auch gegen kleinere Spritzen (bis zu 100 μ l) für miniaturisierte Anwendungen oder gegen größere Spritzen (bis zu 5 ml) getauscht werden, um schnell größere Lösungsmittelmengen zu transferieren.

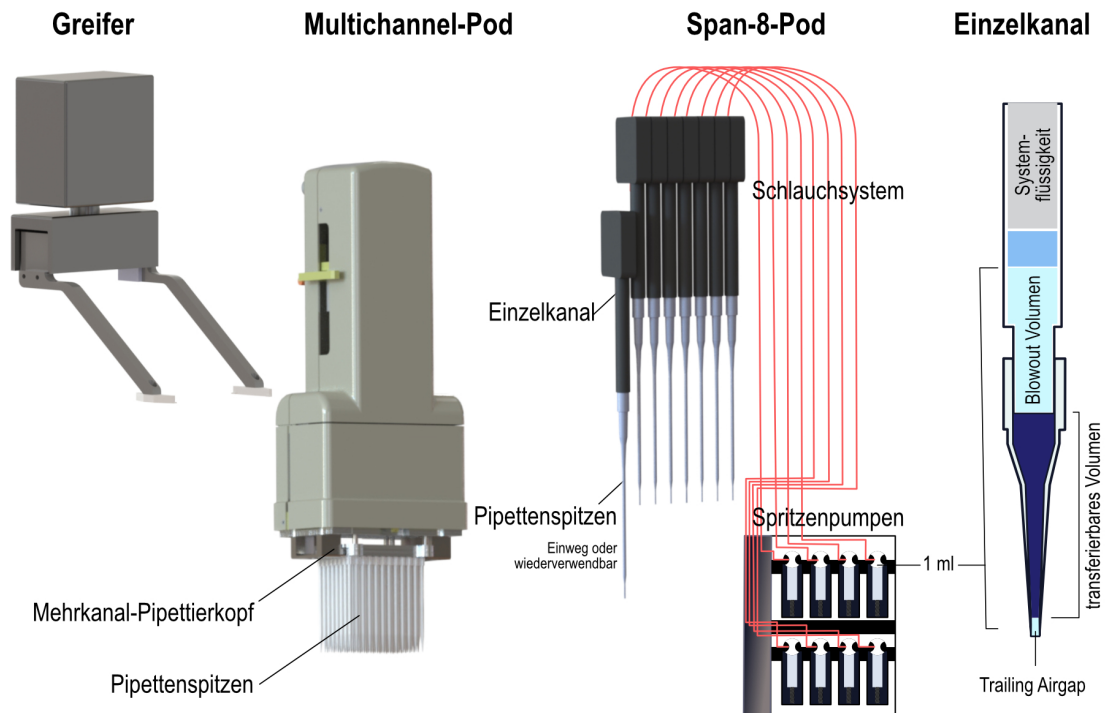


Abbildung 4.6: Übersicht Werkzeuge der Biomek i7 Workstation¹: Greifer, Mehrkanal-Pipettierkopf, Einzelkanal-Pipettierkopf mit 8 Einzelkanälen und Pumpensystem, schematische Darstellung der Flüssigkeits- und Luftschichten im Einzelkanal

Die Präzision des Lösungsmitteltransfers ist im hohen Maß abhängig von den für den Pipettierprozess verwendeten Parametern. Die Pipettierparameter, wie die Aspirations- und Dispensiergeschwindigkeit, das Blowout Volumen oder das Trailing Airgap, müssen sorgfältig an das Volumen und die Eigenschaften der zu transferierenden Flüssigkeiten angepasst werden (siehe Abbildung 4.6). Weiterhin ist eine regelmäßige Kalibrierung des Dosiersystems für eine hohe Richtigkeit empfehlenswert. Die Kalibrierung kann gravimetrisch oder optisch und automatisiert erfolgen [281]. Die Biomek i7 Workstation bietet umfassende Möglichkeiten, um die Parameter zu individualisieren und somit eine hohe Genauigkeit für alle Lösungsmitteltransferprozesse sicherzustellen. Die Anpassungen der Pipettierparameter, ebenso wie die Erstellung aller Probenvorbereitungsmethoden und die Steuerung des Systems erfolgen in der Biomek 5 Software über den Automation Controller (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA, siehe Abbildung 4.7).

¹ Abbildung in Anlehnung an [280]

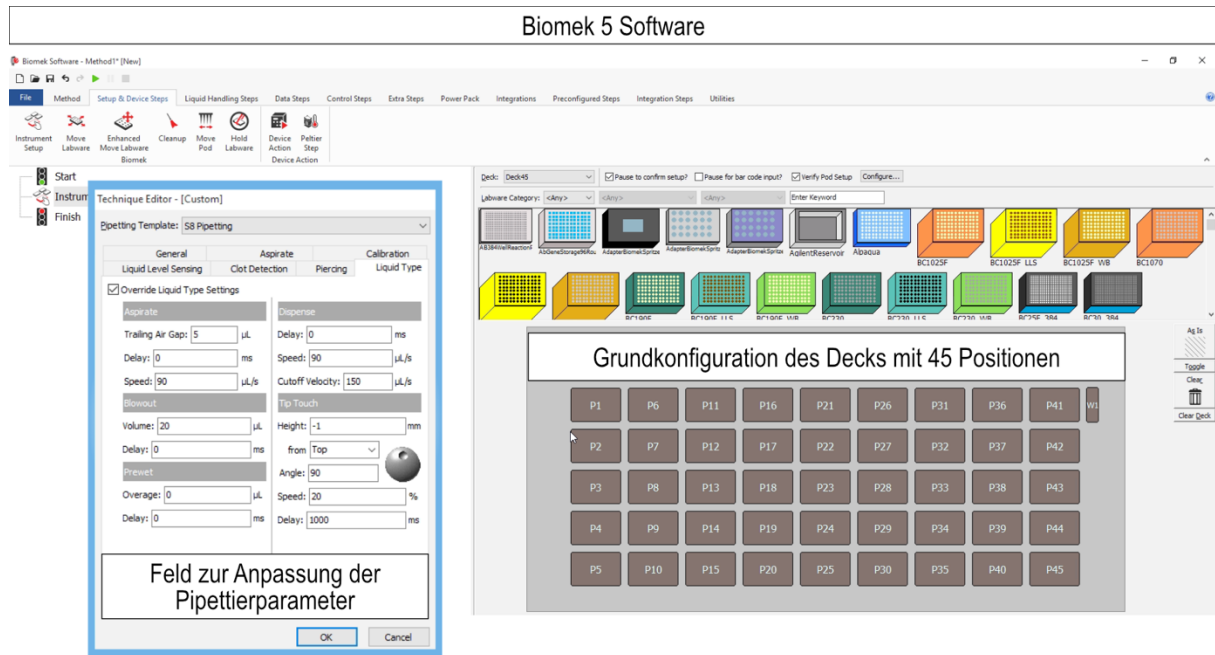


Abbildung 4.7: Überblick Biomek 5 Software: Deckpositionen und Feld zur Modifizierung der Pipettierparameter

4.3.2 Zusatzkomponenten

Zur Automatisierung der speziellen Funktionen von Probenvorbereitungstechniken (Abbildung 4.4) und zur Realisierung des „allgemeingültigen“ Automationskonzepts werden in die Biomek i7 Workstation verschiedene Zusatzgeräte integriert.

Die spezielle Funktion der Zentrifugation wird durch die Integration der VSpin Zentrifuge (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ermöglicht. Die Druckaufgabefunktion wird durch die Integration der Positive Pressure Unit (amplus GmbH, Rostock, DE) realisiert. Die Funktion des Homogenisierens wird mithilfe des Shaking Peltier ALPs (Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE) umgesetzt. Zur Erfüllung der Funktion des Temperierens wird ein Static Peltier ALP (Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE) integriert. Die Grundfunktionen der Biomek i7 Workstation werden durch die Integration eines 3D-Tilting ALPs (amplus GmbH, Rostock, DE) sowie eines Self-Filling Quarter Reservoirs (amplus GmbH, Rostock, DE) erweitert. Die integrierten Zusatzgeräte werden nachfolgend genauer vorgestellt.

Die Positive Pressure Unit wird zur Durchführung von Filtrations- und Extraktionsprozessen eingesetzt (Abbildung 4.8). In der integrierten Positive Pressure Unit wird die mit Druck zu beaufschlagende Labware auf einem Schlitten positioniert, welcher mit der Labware in die Druckeinheit hineinfährt. Ein pneumatisch betriebener Druckkopf wird mit einem maximalen Druck von 9.000 mbar auf die Labware abgesenkt und erzeugt den Überdruck. Mit der Positive Pressure Unit können sowohl einzelne Proben als auch bis zu 96 Proben parallel bearbeitet und somit hohe Durchsätze erzielt werden. Eine zusätzliche Durchsatzsteigerung ist bei Bedarf durch den Einsatz des 384er Druckkopfes möglich. Weiterhin ist die Prozessierung verschiedener Labware – sowohl Labware im Mikrotiterplattenformat als auch von traditionellen SPE-Kartuschen mit Hilfe spezieller Racks – möglich. Zudem kann Labware oder Stapel

aus Labware in unterschiedlichen Höhen bearbeitet werden (Mindesthöhe 3,5 cm; maximale Höhe: 20 cm), was die Flexibilität zusätzlich erhöht. Im Vergleich ist dies mit den für Filtrations- oder Extraktionsaufgaben ebenfalls einsetzbaren Zentrifugen nur begrenzt möglich (Abschnitt 4.1), da der bearbeitbare Höhenbereich kleiner sein kann und ein Labwarestapel fixierbar sein muss. Ein weiterer Vorteil der Positive Pressure Unit ist die Beibehaltung eines konstanten Drucks pro Well auch bei hoher Probenvariabilität durch eine Flussbegrenzung.

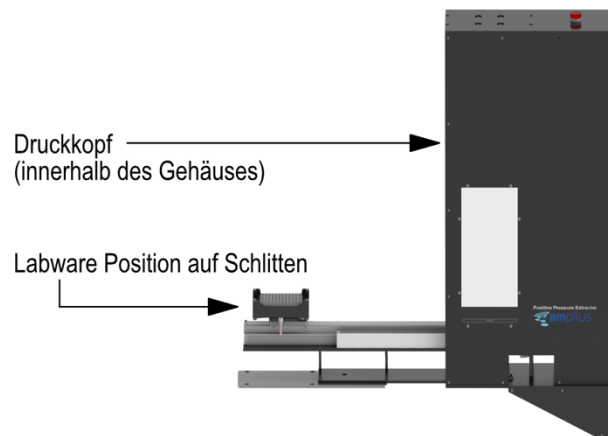


Abbildung 4.8: Positive Pressure Unit (amplus GmbH, Rostock, DE)

Zur Durchführung und Beschleunigung von Sedimentations- und Trennprozessen wird die Zentrifuge VSpin in das Automationssystem integriert, welche Labware im MTP-Standardformat mit bis zu 3.000 rpm zentrifugiert (Abbildung 4.9). Die maximal mögliche Höhe der Labware beträgt 4 cm bei einer Labwaretiefe von 8,6 cm (MTP + Deckel). Dies ermöglicht sowohl die Zentrifugation von Mikrotiterplatten in verschiedenen Größen als auch die Zentrifugation von speziellerer Labware im Standardformat.

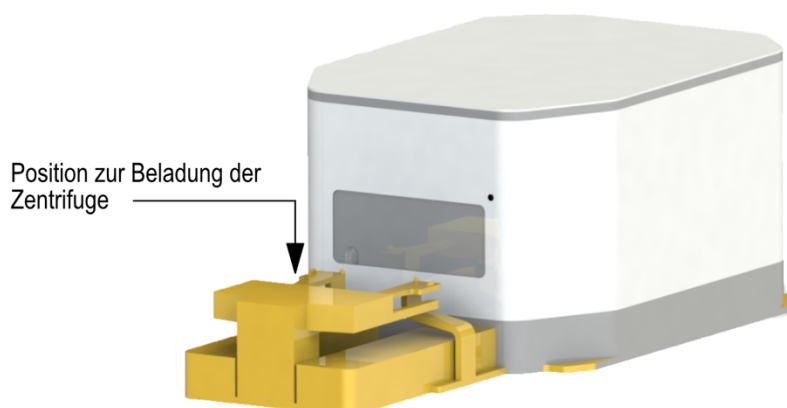


Abbildung 4.9: VSpin Zentrifuge (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Mit der Integration eines Shaking Peltier ALPs wird das generalisierte Automationssystem um Temperier- und Schüttelfunktionen ergänzt. Das Shaking Peltier ALP heizt oder kühlt Labware im Bereich zwischen 4°C und 70°C und schüttelt Labware mit bis zu 2.000 rpm in horizontaler (X), vertikaler (Y) oder orbitaler (XY) Richtung zur Homogenisierung von Lösungen (Abbildung 4.10).

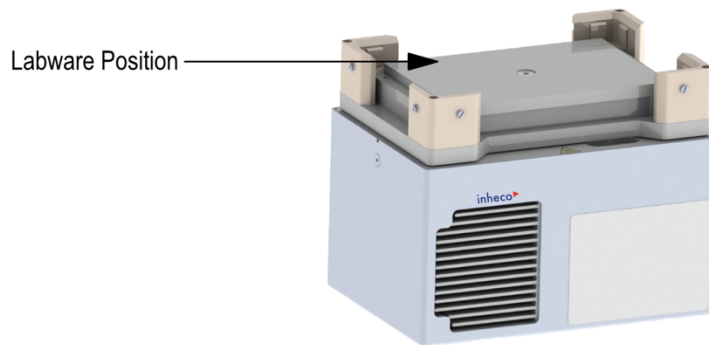


Abbildung 4.10: Shaking Peltier ALP (Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE)

Um bei Bedarf mehr als eine Labware erwärmen oder kühlen zu können, wie beispielsweise zur kontinuierlichen Kühlung empfindlicher Reagenzien wie Standards oder hochvolatiler Lösungsmittel, wird ein zusätzliches Static Peltier ALP mit einem Arbeitsbereich zwischen 4°C und 100°C in die Workstation integriert (Abbildung 4.11).

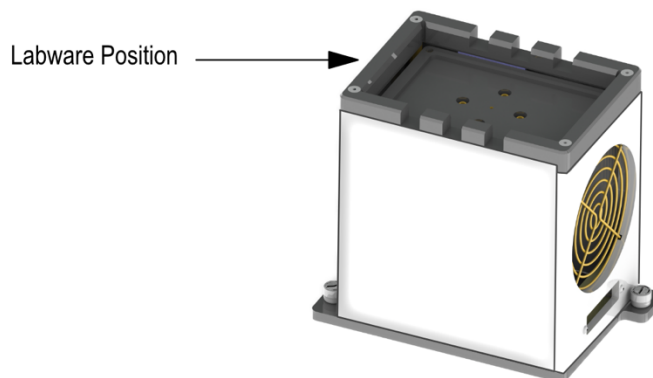


Abbildung 4.11: Static Peltier ALP (Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE)

Zusätzlich wird ein Inkubator in die Workstation integriert, um Umgebungsparameter wie die Temperatur und Luftzirkulation noch kontrollierter regulieren zu können, um optimale Bedingungen für Aufschlüsse oder das Wachstum von Zellen zu schaffen (Abbildung 4.12). Der Arbeitsbereich des Single Plate Incubators liegt zwischen 20°C und 80°C.

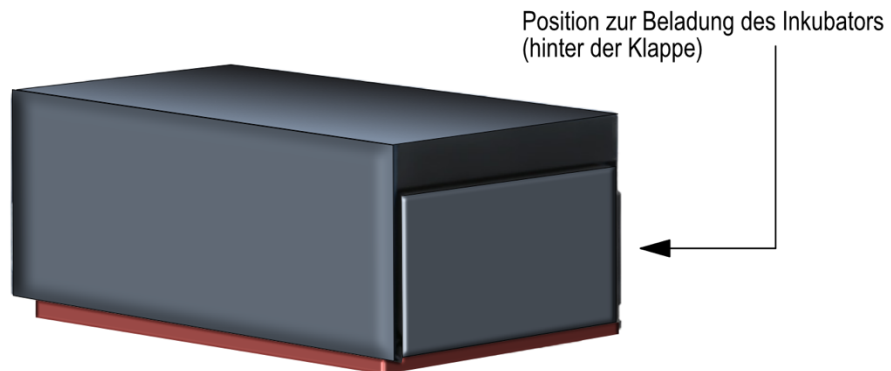


Abbildung 4.12: Single Plate Incubator (Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE)

Eine wichtige, im manuellen Pipettierprozess häufig unterbewusst durchgeführte Handhabung ist das Anschrägen von Gefäßen, um Flüssigkeiten möglichst vollständig entnehmen zu können. In einem kartesischen Liquid-Handling-System ist diese Bewegung grundsätzlich nicht vorgesehen. Um den Kippprozess dennoch automatisieren zu können, wird ein 3D-Tilting ALP in die Workstation integriert (Abbildung 4.13). Mit dem 3D-Tilting ALP kann Labware im Standardformat (quer, längs oder diagonal) um bis zu 15 Grad angeschragt werden. Durch das Anschrägen können Reagenzien auch automatisiert vollständig aus Vials und Mikrotiterplatten mit flachen oder konkaven Böden entnommen werden, was zu einer ressourcenschonenderen und nachhaltigeren Arbeitsweise führt.

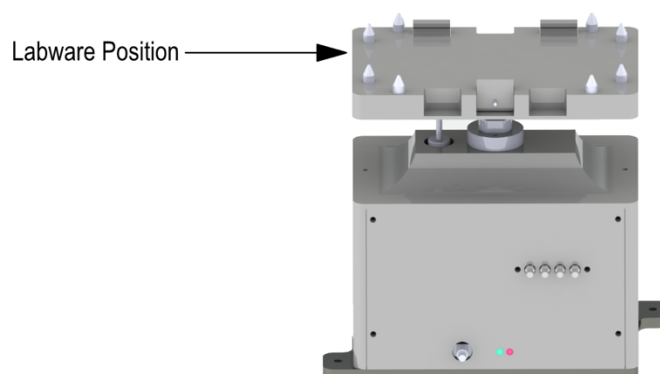


Abbildung 4.13: 3D-Tilting ALP (amplus GmbH, Rostock, DE)

Neben Vials und Mikrotiterplatten können größere Lösungsmittelmengen in Reservoiren auf dem Deck der Liquid-Handling-Workstation bereitgestellt werden. Die Reservoirs sind in verschiedenen Größen verfügbar. Kleinere Lösungsmittelmengen werden beispielsweise in 40 ml Reservoiren bereitgestellt und erfordern i.d.R. die Entnahme durch den Span-8-Pod. In größeren Ausführungen besitzen die verwendeten Reservoirs eine Kapazität von ca. 300 ml und ermöglichen durch ihre Ausführung im MTP-Standardformat den Transfer von Lösungsmitteln mit dem MC-Pod. Zur Bereitstellung höherer Lösungsmittelmengen wird ein automatisch nachfüllendes Reservoir in die Workstation integriert. Das integrierte Self-Refilling Quarter Reservoir ermöglicht das automatische Nachfüllen der Lösungsmittel aus unter Druck stehenden Lösungsmittelbehältern nach der Lösungsmittelentnahme durch die sensorische Überwachung des Füllstands in den vier getrennten Reservoiren. Gleichzeitig wird die Evaporation der häufig flüchtigen Lösungsmittel reduziert (siehe Abbildung 4.14).

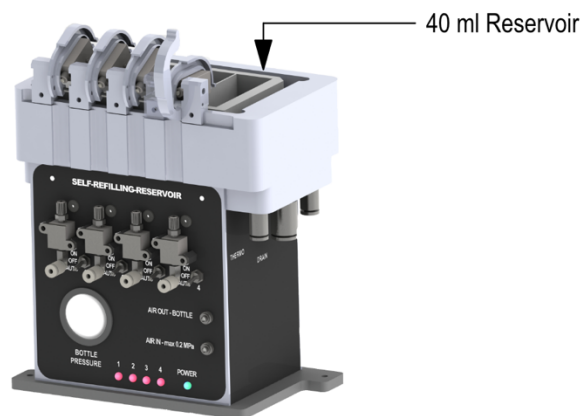


Abbildung 4.14: Self-Refilling Quarter Reservoir (amplius GmbH, Rostock, DE)

Die Positionierung der zu bearbeitenden Labware auf den Zusatzgeräten erfolgt durch die Greifer, das Beladen und die weitere Prozessierung (wie beispielsweise das Beladen der Zentrifuge oder das Einfahren in die Positive Pressure Unit) erfolgt durch das integrierte Gerät. Das Pipettieren auf Geräten wie dem Self-Refilling Quarter Reservoir oder dem 3D-Tilting ALP wird mit dem Span-8 Pod durchgeführt. Die Programmierung und Steuerung erfolgt über die Biomek 5 Software (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA).

Die Zusatzgeräte werden am Rand der Workstation positioniert, um den zur Verfügung stehenden Platz optimal auszunutzen und einen flexiblen Wechsel zu ermöglichen. Außerdem sind die Geräte für Wartungen und Befüllprozessen leicht zugänglich, was die Bedienung vereinfacht. Zudem werden aufwändige Umfahwege durch geräteabhängige Restriktionen mit Einfluss auf die optimierten vordefinierten Bewegungsabläufe der Workstation vermieden, wodurch ein möglichst optimaler Prozessablauf sichergestellt wird.

Eine Besonderheit ist die flexible integrierbare RoboColumn Unit (amplius GmbH, Rostock, DE, Abbildung 4.15). Die RoboColumn Unit dient der automatisierten Bearbeitung von miniaturisierten chromatographischen Säulen (RoboColumns) und ermöglicht neben der Bereitstellung der RoboColumns auf dem Deck auch das Unterstellen einer Deepwellplatte (auch Auffangplatte) unterhalb der Columns, um Wasch- und Elutionsfraktionen zu sammeln. Die Deepwellplatte ist auf einem Schlitten positioniert, wodurch die in 8 Zeilen mal 12 Spalten im 96-Well-MTP-Format angeordneten RoboColumns spaltenweise angefahren und die chromatographischen Fraktionen ebenfalls spaltenweise in der Deepwellplatte gesammelt werden können, um den Einfluss der zahlreichen chromatographischen Einflussfaktoren und Parameter zu evaluieren und zu optimieren. Ein zusätzlich auf der RoboColumn Unit montierter Niederhalter verhindert das Herausziehen der RoboColumns nach dem Flüssigkeitstransfer. Für den Flüssigkeitstransfer werden anstelle der Einmal-Pipettenspitzen feste Spitzen am Span-8-Pod montiert, um den Dichtungsring der Columns zu durchstechen und den für den Transfer der Flüssigkeit durch das chromatographische Material benötigten Druck aufzubringen.

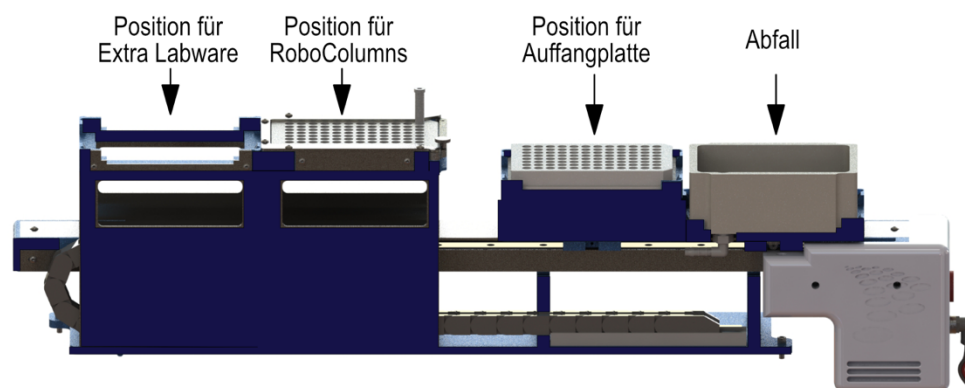


Abbildung 4.15: RoboColumn Unit (amplius GmbH, Rostock, DE)

Da die RoboColumn Unit sehr spezifisch auf die Bearbeitung der miniaturisierten chromatographischen Säulen ausgelegt ist, wird diese nur bei Bedarf eingebaut und am vorderen Rand der Workstation positioniert, um einen schnellen Wechsel zu ermöglichen. Bei Nicht-Gebrauch werden an der Stelle vier ALPs positioniert, um die Zahl der zur Verfügung stehenden Deckpositionen zu erhöhen. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, die Biomek i7 Workstation an dieser Stelle um ein zusätzliches (applikationsspezifisches) Gerät zu ergänzen und somit den Funktionsumfang des Automationssystems weiter zu erhöhen.

In Abbildung 4.16 ist das Liquid-Handling-System mit allen integrierten Zusatzgeräten dargestellt.

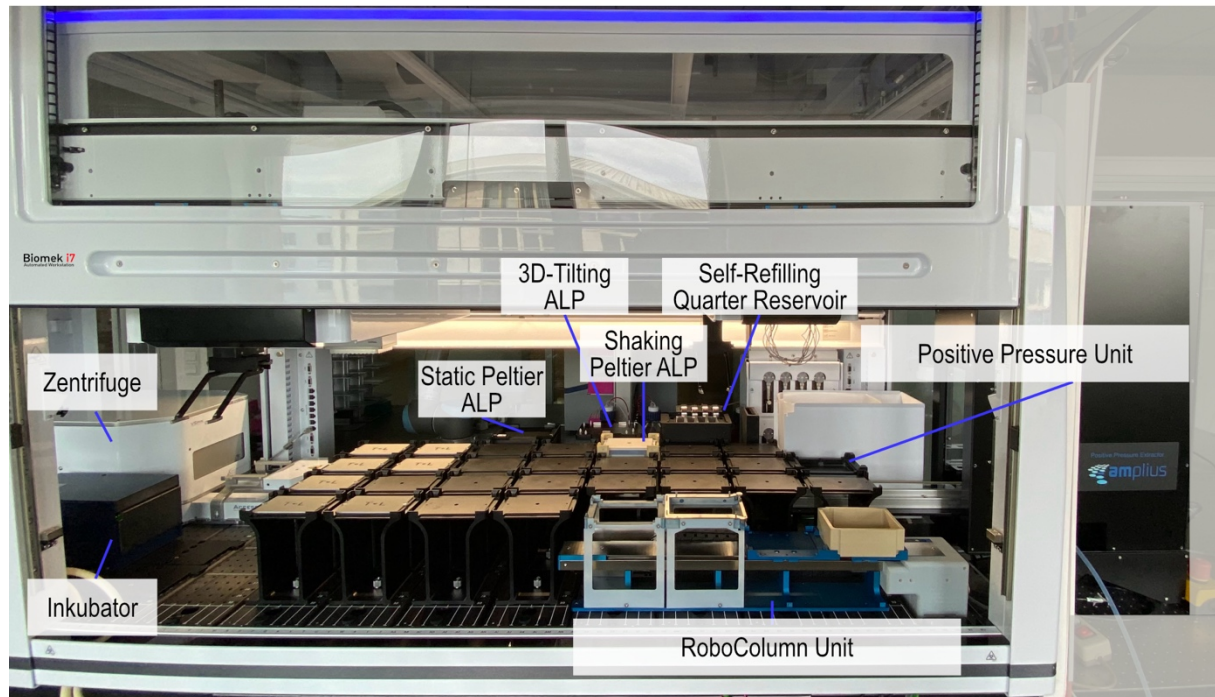


Abbildung 4.16: Liquid Handling Workstation mit integrierten Zusatzgeräten

Die Integration der Zusatzgeräte erweitert den Funktionsumfang der Liquid-Handling-Workstation erheblich und ermöglicht die vollständige Automatisierung ganzer Probenvorbereitungsmethoden. Dies soll anhand von vier Beispielanwendungen belegt werden. Die Methoden zur anschließenden Bewertung der Qualität der automatisierten Methoden sowie zur Bewertung des entworfenen Gesamtsystems werden nachfolgend vorgestellt.

5. Methoden zur Bewertung des Automationssystems

Die Bewertung des entworfenen, allgemeingültigen Automationssystems erfolgt unter drei Aspekten: Qualität, Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit. Nach der Einzelbewertung der realisierten Probenvorbereitungsmethoden folgt die Bewertung des Gesamtsystems.

5.1 Qualitative Überprüfung

Für die qualitative Bewertung der Anwendungen werden die Parameter Messpräzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Wiederfindungsrate, Wiederholpräzision sowie die laborinterne Vergleichspräzision gewählt und im Rahmen der Validierung ermittelt.

Die *Messpräzision (Measurement Precision)* beschreibt die Abweichung, welche durch das Messgerät selbst entsteht und wird durch die zehnfache Messung einer stabilen Probe bestimmt. Zur Beschreibung der Messpräzision wird der aus der Standardabweichung σ bezogen auf den Mittelwert der Messungen \bar{x} berechnete Variationskoeffizient *CV (Coefficient of Variation)* in (5.1) verwendet. Bei chromatographischen und photometrischen Messungen sollte dieser typischerweise kleiner als ein Prozent sein [282].

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (5.1)$$

Die *Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD)* beschreibt die kleinste in einer Probe nachweisbare Menge des Analyten. Die *Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ)* hingegen ist definiert als die kleinste in einer Probe quantifizierbare Menge des Analyten. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze können experimentell bestimmt oder gemäß DIN 32645 aus den im Rahmen einer Kalibrierung ermittelten Daten berechnet werden [283]. Bei der experimentellen Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze werden zehn Leerproben, welche aus dem internen Standard und entionisiertem Wasser als Ersatz der Matrix bestehen, vorbereitet und gemessen. Die Nachweisgrenze bildet die Summe aus Mittelwert des Blindwerts \bar{x}_0 sowie der dreifachen Standardabweichung σ_0 . Die Bestimmungsgrenze wird von der Summe aus Mittelwert des Blindwerts sowie der zehnfachen Standardabweichung gebildet [282, 283].

$$\text{Nachweisgrenze (LOD)} = \bar{x}_0 + 3 \cdot \sigma_0 \quad (5.2)$$

$$\text{Bestimmungsgrenze (LOQ)} = \bar{x}_0 + 10 \cdot \sigma_0 \quad (5.3)$$

Bei der Verwendung von Probenvorbereitungsmethoden mit einem Verdünnungs- oder Aufkonzentrationsfaktor werden zudem die *analytische und methodische Nachweis- und Bestimmungsgrenze* unterschieden. Die analytischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind die Grenzen, die mit dem jeweiligen Messgerät erreicht werden können (Gleichungen (5.2) und (5.3)), wohingegen die methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen die Grenzen der Bestimmung des Analyten aus der jeweiligen Matrix angeben. Diese hängen sowohl von der angewendeten Probenvorbereitungsmethode als auch von der nachfolgenden analytischen Technik ab. Die Berechnung

der methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD_m, LOQ_m) erfolgt mithilfe der Division des Verdünnungs- oder Aufkonzentrationsfaktors VF der Probenvorbereitungsmethode entsprechend Gleichungen (5.4) und (5.5).

$$\text{methodische Nachweisgrenze } (LOD_m) = (\bar{x}_0 + 3 \cdot \sigma_0) / VF \quad (5.4)$$

$$\text{methodische Bestimmungsgrenze } (LOQ_m) = (\bar{x}_0 + 10 \cdot \sigma_0) / VF \quad (5.5)$$

Die Beurteilung der ermittelten Grenzen erfolgt anhand des Einsatzzwecks der Methode sowie durch den Vergleich mit in der Literatur berichteten Werten (siehe Tabelle 10.5, Tabelle 10.20 bis Tabelle 10.22, Tabelle 10.35).

Die *Wiederfindungsrate* R (*Recovery Rate*) und die *Wiederholpräzision* (*Repeatability*) werden durch die Vorbereitung und Messung von n_R Proben innerhalb eines kurzen Zeitraums unter Wiederholbedingungen bestimmt (Vgl. ISO 5725-2:2019 [284], [282]). Die Anzahl der verwendeten Proben n wird an den Prozess angepasst (Zeitdauer, Anzahl der bearbeitbaren Positionen, $\sigma \approx 1/\sqrt{n_R}$) und variiert zwischen 16 und 25 Proben (Vgl. in Tabelle 10.3, [209, 285-290]).

Zur Beschreibung der Wiederholpräzision werden der Mittelwert, die Standardabweichung und der CV verwendet. Die Berechnung der Wiederfindungsrate erfolgt entsprechend Gleichung (5.6) aus dem Mittelwert der Messungen \bar{x} , bezogen auf die richtige Konzentration x_R , wodurch relevante Verluste ausgeschlossen und die Richtigkeit bestimmt werden können.

$$R = \frac{\bar{x}}{x_R} \cdot 100 \quad (5.6)$$

Zur Bewertung der Robustheit der Methode werden die mittleren Konzentrationen, die Standardabweichungen bzw. Variationskoeffizienten der Vorbereitung und Messung von acht bis zehn Proben an fünf verschiedenen Tagen (Minimalkonzept [289]) in Form der *laborinternen Vergleichspräzision* (*LIVP, Within-laboratory Precision*) berechnet [282]. Um die Vergleichbarkeit verschiedener Probenvorbereitungsmethoden zu vereinfachen und die Lesbarkeit zu verbessern werden, wie bei der Wiederfindungsrate, in dieser Arbeit die mittleren Konzentrationen der Messergebnisse der LIVP als relative Größen, bezogen auf die Zielkonzentration der jeweiligen Probenvorbereitungsmethode, angegeben (Gleichung (5.6)).

Zusätzlich werden regelmäßig Leerproben (Matrix und interner Standard) vorbereitet und gemessen, um Verunreinigungen während der Probenvorbereitung auszuschließen. Die Injektion und Inspektion von reinen Lösungsmittelproben dient dem Ausschluss von Carry-Over-Effekten, beispielsweise durch die Nadel des Autosamplers oder die chromatographische Säule [291].

Zur Quantifizierung von Proben mit unbekannter Konzentration wird eine Kalibrierfunktion benötigt, in der die Signalintensität des jeweiligen Messsystems einer Konzentration zugeordnet wird. Für die Erstellung der Kalibrierung werden aus Standardlösungen des Analyten und dem für die Elution verwendeten Lösungsmittel Stammlösungen in dreifacher Ausführung in verschiedenen Konzentrationen innerhalb des

Kalibrierbereichs hergestellt und gemessen, sodass jedem Kalibrierlevel mit bekannter Konzentration eine Signalintensität zugeordnet werden kann [102]. Die ermittelte Kalibrierfunktion sollte im Kalibrierbereich linear sein (mit $y=ax +b$ mit a als Maß für Empfindlichkeit der Messmethode, je größer a desto empfindlicher ist die Methode, wichtig für Spurenbereich und b als Signal des Untergrunds, idealerweise null). Das für die Kalibrierfunktion ermittelte Bestimmtheitsmaß R^2 kann zur zusätzlichen Beurteilung der Güte der Beschreibung der mathematischen Funktion der experimentell ermittelten Werte herangezogen werden und sollte nahe dem Wert eins liegen [282, 292]. Die Verwendung eines internen Standards ermöglicht den Ausgleich von Analytverlusten im Rahmen der Probenvorbereitung (bei Zugabe zu Beginn der Probenvorbereitung) sowie den Ausgleich von Matrixeffekten im Rahmen der Detektion. Interne Standards können deuterierte Formen der Analyten (z.B. Δ^9 -THC- D_3 für Δ^9 -THC) sein oder dem Analyten strukturell ähneln (z.B. trans-Zimtsäure für die Bestimmung von Benzoesäuren) [293]. Da alle Probenvorbereitungsprozesse volumenabhängig sind, wurde zudem eine Überprüfung des durch die Liquid-Handling-Workstation transferierten Volumens mit anschließender Kalibrierung durchgeführt.

5.2 Wirtschaftliche Überprüfung

Zur Beurteilung der Wirtschaftlichkeit der Automatisierung der Probenvorbereitungsmethoden werden die Parameter Kosten pro Probe, Kapitalwert und Amortisationsdauer mithilfe einer Kostenvergleichsrechnung sowie der Kapitalwertmethode bestimmt.

Die Kapitalwertmethode bewertet den Totalerfolg einer Methode bzw. die Kosten der Opportunität. Ein positiver Kapitalwert indiziert, dass die Investition (in die Automatisierung der Methode) im Vergleich zur Opportunität (der manuellen Durchführung der Methode) wirtschaftlich sinnvoll ist. Bei mehreren Optionen wird die Investition mit dem höchsten Kapitalwert gewählt. Zur Bewertung des Risikos einer Investition wird die Amortisationsdauer verwendet. Je kürzer die Amortisationsdauer, desto geringer ist das Risiko der Investition. Bei der Kostenvergleichsrechnung erfolgt die Investitionsentscheidung zwischen den erlösgleichen Alternativen auf Basis der Kosten pro Probe [294, 295].

5.2.1 Kostenvergleichsrechnung

Die Ermittlung der Kosten pro Probe K_S erfolgt aus den jährlichen Betriebskosten K_B , den jährlichen Abschreibungen A_t sowie den jährlichen kalkulatorischen Zinsen Z_K [295]. Diese bilden die Gesamtkosten K_G einer Probenvorbereitungsmethode. Mithilfe der jährlichen Gesamtprobenzahl n werden die Kosten pro Probe ermittelt (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Berechnung der Kosten pro Probe

	Betriebskosten pro Jahr	K_B	(5.9)
+	Jährliche Abschreibung	A_t	(5.10)
+	Jährliche kalkulatorische Zinsen	Z_K	(5.11)
Σ	Gesamtkosten pro Jahr	$K_G = K_B + A_t + Z_K$	(5.7)
	Probenzahl pro Jahr	n	(5.12)
=	Kosten pro Probe	$K_S = K_G/n$	(5.8)

Die Betriebskosten K_B bestehen aus den Materialkosten K_M , den Personalkosten K_P , den Instandhaltungskosten der Anlage K_I und den Energiekosten K_E . In Tabelle 5.2 ist die Berechnung der Betriebskosten zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Zusammensetzung Betriebskosten

	Materialkosten K_M	Pipettenspitzen, weitere Einweg-Labware, Lösungsmittel, Reagenzien ²
+	Personalkosten K_P	80 €/h ³
+	Energiekosten K_E	0,31 €/kWh ⁴
+	Instandhaltungskosten K_I	10.952€ /Jahr ⁵
Σ	Betriebskosten K_B	$K_B = K_M + K_P + K_I + K_E$ (5.9)

² Listenpreis des jeweiligen Herstellers (Stand August 2023)

³ Persönliches Gespräch Prof. Dr.-Ing. habil. Kerstin Thurow

⁴ Stadtwerke Rostock (Stand Juli 2023)

⁵ Listenpreis Beckman Coulter Life Sciences (Stand August 2023), zweifache Installationskosten

In die Materialkosten gehen die Kosten für Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Einweg-Labware, Lösungsmittel und Reagenzien ein. Für die Berechnung werden Personalkosten von 80 €/Stunde, Energiekosten von 0,31 €/kWh sowie Instandhaltungskosten von 10.952 €/Jahr für Wartungen und Reparaturen angenommen. Die Berechnung der Materialkosten basiert auf den Materialverzeichnissen in Tabelle 10.8, Tabelle 10.9, Tabelle 10.26 bis Tabelle 10.28, Tabelle 10.37, Tabelle 10.47 und Tabelle 10.48.

Die Kapitalkosten für die Investition in das Automationssystem fließen in Form der jährlichen Abschreibung A_t sowie den jährlichen kalkulatorischen Zinsen Z_K in die Berechnung der Kosten pro Probe ein. Die Investitionskosten bestehen aus den Anschaffungskosten für die Liquid-Handling-Workstation, den Anschaffungskosten für die Zusatzgeräte sowie den Anschaffungskosten für wiederverwendbare Labware. Die kalkulatorische Abschreibung beschreibt den Werteverzehr innerhalb einer Periode. In dieser Arbeit entspricht eine Periode einem Zeitraum von einem Jahr. Die Abschreibung erfolgt linear bei einer planmäßigen Nutzungsdauer von 5 Jahren⁶ (siehe Gleichung (5.10)) [296]. Zur Berechnung der kalkulatorischen Zinsen wird die Durchschnittsmethode für maschinelle Anlagen mit halben Abschreibungsausgangswert und einem kalkulatorischen Zinssatz von vier Prozent⁷ verwendet (siehe Gleichung (5.11)) [297]. Die Berechnung der Kapitalkosten ist in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tabelle 5.3: Kapitalkosten

Investitionskosten	Biomek i7 Hybrid Grundkonfiguration ⁸ , Zusatzgeräte ⁹ , wiederverwendbare Labware	
Nutzungsdauer	5 Jahre	
kalkulatorischen Zinssatz	$i = 4\%$	
Jährliche Abschreibung	$A_t = \text{Investitionskosten} / \text{Nutzungsdauer}$	(5.10)
Jährliche kalkulatorische Zinsen	$Z_K = \text{Investitionskosten} / 2 \cdot i$	(5.11)

Zur Bestimmung der Gesamtprobenzahl wird die Anzahl möglicher Durchläufe pro Jahr mit der Probenzahl je Durchlauf multipliziert (siehe Gleichung (5.12)). Zur Bestimmung der Anzahl möglicher Durchläufe pro Jahr (siehe Gleichung (5.13)) wird eine Betriebszeit von 24 h an fünf aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche (= 120 h, wöchentliche Kapazität des Automationssystems) in 50 Wochen pro Jahr angenommen und durch den Gesamtzeitbedarf einer Probenvorbereitungsmethode dividiert.

$$n = \text{Anzahl möglicher Durchläufe pro Jahr} \cdot \text{Probenanzahl pro Durchlauf} \quad (5.12)$$

$$\text{Anzahl möglicher Durchläufe pro Jahr} = \frac{5 \text{ Tage} \cdot 24 \text{ h}}{\text{Durchlaufzeit} + \text{Vor- und Nachbereitungszeit}} \cdot 50 \text{ Wochen} \quad (5.13)$$

⁶ entsprechend den AfA-Tabellen des Bundesministeriums für Finanzen

⁷ Leitzins der Europäischen Zentralbank: 4%, 21.06.2023

⁸ Listenpreise Beckman Coulter Life Sciences (Stand August 2023)

⁹ Listenpreise *amplius* GmbH, Beckman Coulter Life Sciences (Stand August 2023)

Abschließend erfolgt die Berechnung der Kosten pro Probe K_S aus den von der Summe der Betriebs- und Kapitalkosten gebildeten jährlichen Gesamtkosten K_G durch Division mit der maximal möglichen Probenzahl pro Jahr n (siehe Gleichung (5.8)).

5.2.2 Beurteilung der Opportunität und Risikoabschätzung

Der Kapitalwert NPV (Net Present Value) wird aus der Summe der abgezinsten Zahlungsströme pro Periode und der Anschaffungsauszahlung A_0 gebildet (5.14) [295]. Die Anschaffungsauszahlung entspricht den zuvor berechneten Investitionskosten. Der Entfall des Liquidationserlöses L_0 wird durch die Fortsetzung der Zahlungsströme bis zum Ende der Lebensdauer des Liquid-Handling-Systems berücksichtigt. Als kalkulatorischer Zinssatz i wird eine 2,4-prozentige¹⁰ Verzinsung angenommen [298].

$$NPV = -A_0 + \sum_{t=0}^{Nutzungs\text{dauer}} \frac{(Einzahlung_t - Auszahlung_t)}{(1+i)^t} + \frac{L_0}{(1+i)^{Nutzungs\text{dauer}}} \quad (5.14)$$

Die Berechnung der Einzahlungsströme erfolgt auf Basis einer Preisrecherche vergleichbarer Analysemethoden am Markt. Für die Berechnung wird ein Viertel¹¹ des marktüblichen Preises (Tabelle 5.4) verwendet. Für die Berechnung der Auszahlungsströme werden die in der Kostenvergleichsrechnung ermittelten Kosten pro Probe der jeweiligen Methode verwendet.

Tabelle 5.4: Marktrecherche Kosten Labortest

Probenvorbereitungsmethode	Preis am Markt (zzgl. MwSt)	in Berechnung verwendete Einzahlungen	Ref.
Quantitative Bestimmung von Cannabinoiden aus Serum	51,90 €	12,98 €	[299]
Quantitative Bestimmung von Cannabinoiden aus Urin	51,90 €	12,98 €	[300]
Quantitative Bestimmung von Cannabinoiden aus Speichel	51,90 €	12,98 €	[300]
Quantitative Bestimmung von Benzodiazepinen aus Serum	60,33 €	15,08 €	[301, 302]
Quantitative Bestimmung von Benzoesäuren aus Wasser	70,40 €	17,60 €	[303]
Quantitative Bestimmung von Antikörpern	53,62 €	13,41 €	[304]

Die ebenfalls bestimmte Amortisationsdauer gibt den Zeitpunkt des erstmaligen Übertreffens der kumulierten Einzahlungsüberschüsse über der Anschaffungsauszahlung an und beschreibt somit den Startzeitpunkt der Rentabilität einer Probenvorbereitungsmethode sowie über die Dauer der Kapitalrückflusses das Risiko einer Investition [295].

Die für die Berechnungen angenommenen Werte sind an den Markt angelehnt, um möglichst realitätsnahe Ergebnisse zu erzielen. Die Werte sind jedoch nicht repräsentativ für alle Labore, sondern können je nach spezifischen Rahmenbedingungen variieren. Die daraus resultierenden Berechnungsergebnisse dienen als Grundlage für die individuelle Investitionsentscheidung.

¹⁰ Bundesobligation BUDE000BU25018, Kupon 2,4%, Laufzeit 5 Jahre

¹¹ Annahme (25% Probenvorbereitung, 25% Analytik, Rest z.B. Gemeinkosten, sonstige Kosten)

5.3 Überprüfung der Nachhaltigkeit

Die Bewertung der Nachhaltigkeit einer Methode ist vielschichtig, da zahlreiche Einflussfaktoren existieren, die berücksichtigt, unterschiedlich gewichtet oder in den Hintergrund gestellt werden können. Bestehende Ansätze zur Bewertung der Nachhaltigkeit umfassen unter anderem den National Environmental Methods Index (NEMI) [305], den Analytical Eco-Scale [306], den Green Analytical Procedure Index (GAPI) [307, 308] und den Analytical GREENness Calculator (AGREE) [309]. Diese Verfahren unterscheiden sich in ihren Bewertungsansätzen deutlich, die von Piktogrammen mit binären Entscheidungsverfahren und Punktesystemen zur Bestrafung von umweltunfreundlichen Aspekten über farbcodierte Skalen bis hin zu multikriteriellen Entscheidungsansätzen reichen. Dennoch basieren alle Ansätze auf den Prinzipien der grünen analytischen Chemie (GAC), weshalb auch in dieser Arbeit die Prinzipien der GAC als Grundlage zur Bewertung der Nachhaltigkeit herangezogen werden. In den 12 Prinzipien der GAC (siehe Tabelle 5.5) sind die wichtigsten Aspekte zur Steigerung der Nachhaltigkeit wie die Minimierung des Ressourcenverbrauchs und damit einhergehend die Abfallvermeidung sowie die Risikominimierung formuliert [310]. Die Prinzipien der GAC beziehen sich auf den gesamten Laborprozess (Probenvorbereitung und Analytik). Da in dieser Arbeit der Fokus auf dem Prozess der Probenvorbereitung liegt, werden zur Bewertung der Nachhaltigkeit die auf den Probenvorbereitungsprozess zutreffenden Prinzipien überprüft.

Tabelle 5.5: Prinzipien der GAC und Parameter zu deren Bewertung

Nr.	Prinzip der grünen analytischen Chemie [310]	Parameter zur Bewertung des Prinzips (in dieser Arbeit)	Bemerkung
1	Auswahl einer direkten analytischen Technik	nicht bewertet	Teil der Analytik
2	Minimale Probengröße und -anzahl	Probenvolumen	Probenanzahl nicht bewertet, da prozessunabhängig
3	Durchführung von in-situ Messungen	nicht bewertet	Teil der Analytik
4	Integration analytischer Techniken und Prozesse zur Einsparung von Energie und Reagenzien	nicht bewertet	Teil der Analytik
5	Verwendung automatisierter und miniaturisierter Methoden	Miniaturisierung und Automatisierung	-
6	Vermeidung von Derivatisierungen	nicht bewertet	keine Derivatisierungen vorhanden
7	Vermeidung der Generierung großer Abfallmengen	Probenvolumen Plastikabfall Wiederverwendbare Labware	-
8	Verwendung von Mehranalyten- oder Mehrparametermethoden	Durchlaufzeit pro Probe	-
9	Reduktion des Energieverbrauchs	Durchlaufzeit pro Probe	wird nicht separat bewertet
10	Bevorzugung von Reagenzien aus erneuerbaren Quellen	Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel	-
11	Eliminierung oder Vermeidung toxischer Reagenzien	Einsatz von schädlichen Lösungsmitteln Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel	-
12	Erhöhung der Sicherheit des Mitarbeiters	Mitarbeitersicherheit Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel	-

Zur Beschreibung der Prinzipien werden die Parameter Miniaturisierung und Automatisierung, Probenvolumen, Mitarbeitersicherheit, Durchlaufzeit pro Probe, Einsatz von umweltfreundlichen sowie schädlichen Lösungsmitteln und Reagenzien, Abfallvolumen, Plastikabfall und der Grad der Wiederverwendbarkeit der Labware in Anlehnung an Pereira et al. gewählt [309], da diese Parameter einfach quantifizierbar sind (siehe Tabelle 5.5).

Um die Interpretierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verbessern, werden diese mithilfe der von Pereira et al. vorgeschlagenen Funktionen zwischen null (nicht umweltfreundlich, rote Markierung des Zahlenwerts) und eins (umweltfreundlich, grüne Markierung des Zahlenwerts) normalisiert. Ein Zahlenwert von 0,5 markiert den Übergang von umweltfreundlichen zu nicht umweltfreundlichen Methoden und wird gelb dargestellt (Abbildung 5.1) [309].

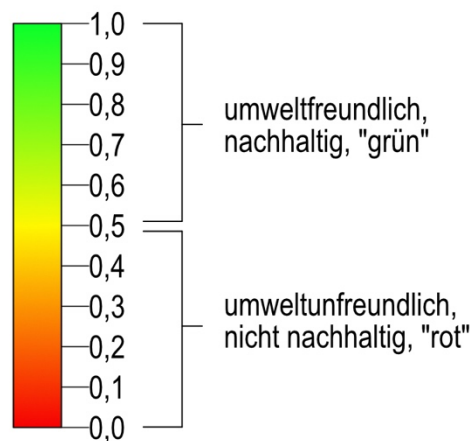


Abbildung 5.1: Farbcode Nachhaltigkeitsbewertung (normalisiert)

Die Bewertung des Parameters *Miniaturisierung und Automatisierung* einer Methode erfolgt anhand des folgenden Punkteschemas: vollständig automatisierte und miniaturisierte Methoden werden mit 100% bewertet und entsprechend auf 1,0 normalisiert (grün); halbautomatisierte, miniaturisierte Methoden erhalten 75% und werden auf 0,75 normalisiert; manuelle, miniaturisierte sowie automatische, nicht miniaturisierte Methoden erhalten 50% und werden auf 0,5 normalisiert (gelb); halbautomatisierte, nicht miniaturisierte Methoden werden mit 25% bewertet und auf 0,25 normalisiert, während manuelle und nicht miniaturisierte Methoden mit 0% bewertet und entsprechend auf 0,0 (rot) normalisiert werden (*Prinzip 5*, in Anlehnung an [309]).

Miniaturisierte Anwendungen sind Mikroextraktionstechniken, die durch ein Sorbentbett von weniger als 100 µl oder weniger als 10 mg gekennzeichnet sind (vgl. Abschnitt 2.1.3.8).

Beim Parameter *Probenvolumen* werden ebenfalls Proben mit einem Volumen von weniger als 100 µl als umweltfreundlich (grün) bewertet, wohingegen Probenvolumina von 100 ml und mehr als nicht umweltfreundlich (rot) gelten. Die Normalisierung des Probenvolumens erfolgt entsprechend Gleichung (5.15) (*Prinzip 2*, in Anlehnung an [309]).

$$\text{Normalisierung des Probenvolumens} = -0,142 \cdot \ln(\text{Probenvolumen in ml}) + 0,65 \quad (5.15)$$

Die Minimierung des Ressourcenverbrauchs ist ein zentrales Element der GAC. Daher werden zur Bewertung des 7. *Prinzips* der GAC, der Abfallvermeidung, die drei Parameter *Abfallvolumen*, *Plastikabfall* und *Grad der Wiederverwendbarkeit* von Labware verwendet.

Zur Quantifizierung der Parameter *Plastikabfall* und *Abfallvolumen* wird das Gewicht oder das Volumen des produzierten Abfalls anhand der Probenvorbereitungsprozesse ermittelt. Methoden, die weniger als 0,1 g (oder ml) Abfall pro Probe erzeugen, werden als umweltfreundlich eingestuft und entsprechend mit 1 normalisiert. Methoden, die 100 g (oder ml) Abfall pro Probe produzieren, gelten als umweltunfreundlich und werden mit 0,1 normalisiert. Zwischenstufen umfassen Abfallmengen von 10 g (oder ml) und 25 g (oder ml), die entsprechend mit 0,4 bzw. 0,25 normalisiert werden. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgt gemäß Gleichung (5.16) [309].

$$\begin{aligned} \text{Normalisierung der Abfallmenge} & \quad (5.16) \\ & = -0,134 \cdot \ln(\text{Abfallvolumen in g oder ml pro Probe}) + 0,6946 \end{aligned}$$

Der *Grad der Wiederverwendbarkeit von Labware* wird aus dem Verhältnis von wiederverwendbarer Labware zur Gesamtanzahl der verwendeten Labware bestimmt (siehe Gleichung (5.17)). In dieser Arbeit gelten Racks, Adapter, Reservoirs sowie weitere aufreimbare Labware, wie beispielsweise miniaturisierte chromatographische Säulen, als wiederverwendbare Labware.

$$\text{Grad der Wiederverwendbarkeit} = \frac{\text{Anzahl wiederverwendbare Labware}}{\text{Gesamtanzahl Labware}} \quad (5.17)$$

Zur Beurteilung des 8. *Prinzips* der GAC wird die *Durchlaufzeit pro Probe* betrachtet. Der Durchsatz ergibt sich aus der Durchlaufzeit und der Anzahl der pro Methode vorbereiteten Proben. Ein Durchsatz von höchstens einer Probe pro Stunde wird als rot, weniger als zehn Proben pro Stunde als gelb und mehr als 70 Proben pro Stunde als grün und somit als umweltfreundlich eingestuft. Die Normalisierung erfolgt entsprechend Gleichung (5.18) (in Anlehnung an [309]).

$$\text{Normalisierung der Durchlaufzeit pro Probe} = 0,2429 \cdot \ln(\text{Durchsatz pro h}) - 0,0517 \quad (5.18)$$

Die Bewertung der Eliminierung oder Vermeidung des Einsatzes gefährlicher und schädlicher Lösungsmittel basiert auf der Annahme, dass Volumina (oder Massen) von 44 ml (oder g) und mehr pro Probe von Stoffen, die durch Einatmen, Verschlucken oder Hautkontakt Schaden verursachen, umweltunfreundlich sind. Ein Volumen von 1,8 ml pro Probe wird hingegen als wenig umweltschädlich und Volumina unter 70 μl pro Probe werden als grün eingestuft. Zur Normalisierung des *Einsatzes schädlicher Lösungsmittelvolumina* wird Gleichung (5.19) verwendet (*Prinzip 11*, in Anlehnung an [309]).

$$\begin{aligned} \text{Normalisierung der Gefahrstoffvermeidung} & \quad (5.19) \\ & = -0,156 \cdot \ln(\text{ml oder g des schädlichen Stoffes pro Probe}) + 0,5898 \end{aligned}$$

Das 11. *Prinzip* kann auch durch den Einsatz umweltfreundlicher, wiederverwendbarer Lösungsmittel beschrieben werden, wobei gleichzeitig Aspekte von *Prinzip 10* und *Prinzip 12* (der Bevorzugung von Lösungsmitteln aus erneuerbaren Quellen und der Erhöhung der Mitarbeitersicherheit durch die Vermeidung toxischer Reagenzien) beschrieben werden. Der Parameter *Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel* wird nach dem Abzug des Probenvolumens sowie des Volumens schädlicher Lösungsmittel vom Gesamtvolumen ins Verhältnis zum Gesamtvolumen gesetzt (siehe Gleichung (5.20)).

$$\text{Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel} = \frac{V_{\text{Gesamt}} - V_{\text{Probe}} - V_{\text{schädliche Lösungsmittel}}}{V_{\text{Gesamt}}} \quad (5.20)$$

Die *Mitarbeitersicherheit* (*Prinzip 12*) wird durch den Einsatz miniaturisierter, automatisierter Systeme, weniger toxischer, natürlicher Reagenzien sowie durch die Dekontamination von Abfällen im System erhöht [310]. Demzufolge kann der Einsatz eines Automationssystems zur Erhöhung der Mitarbeitersicherheit beitragen. Zur Quantifizierung der Mitarbeitersicherheit wird in dieser Arbeit die durch den Einsatz des Automationssystems erzielte Reduktion der Mitarbeiteranwesenheit im Labor verwendet. Hierfür wird die Anwesenheitszeit im Labor, die sich auf den Zeitbedarf zur Vor- und Nachbereitung der automatisierten Methode bezieht, ins Verhältnis zum Gesamtzeitbedarf der Methode gesetzt (siehe Gleichung (5.21)).

$$\text{Mitarbeitersicherheit} = 1 - \frac{\text{Anwesenheitszeit}}{\text{Anwesenheitszeit} + \text{Durchlaufzeit}} \quad (5.21)$$

Die Prinzipien werden durch die Ermittlung der jeweiligen Zeiten, Volumina, Massen und Stückzahlen auf die entwickelten Probenvorbereitungsmethoden angewendet.

Neben den Farbcodes der einzelnen Prinzipien der Nachhaltigkeitsbewertung ermöglicht die Bildung des Mittelwerts aller normalisierten Werte der gewählten Parameter die einfache Vergleichbarkeit der einzelnen Methoden in den verschiedenen Konfigurationen des Automationssystems. Der gebildete Mittelwert wird in dieser Arbeit als *Nachhaltigkeitsindex* bezeichnet. Bei der Bildung des Mittelwerts ist zusätzlich eine Gewichtung der einzelnen Parameter durch die Einführung von Faktoren möglich, je nach Bedeutung der verschiedenen Nachhaltigkeitsaspekte für das jeweilige Labor. In der hier angewendeten Bewertung gehen alle Parameter gleichwertig in den Nachhaltigkeitsindex ein. Durch die Mehrfachbewertung des 7. Prinzips sowie der Prinzipien 5, 10, 11 und 12 liegt der Fokus besonders auf den Aspekten der Abfallvermeidung und der Erhöhung der Mitarbeitersicherheit.

Das zuvor erläuterte Bewertungsschema wird auch auf den Nachhaltigkeitsindex angewendet. Ein Nachhaltigkeitsindex von null wird als nicht umweltfreundlich, ein Nachhaltigkeitsindex von eins als umweltfreundlich und Nachhaltigkeitsindices, die größer sind als 0,5, werden als positiv, bezogen auf die Nachhaltigkeit einer Probenvorbereitungsmethode, gewertet. Die Parameter zur Bewertung der Nachhaltigkeit sowie die den Funktionen zugrunde liegenden Punkteschemata sind in Tabelle 10.4 im Anhang zusammengefasst.

5.4 Bewertung und Optimierung des Gesamtsystems

Zur Abschätzung der benötigten Auslastung und des Deckungsbeitrags wird das Produktionsprogramm mithilfe der operativen Produktionsprogrammplanung erstellt. Die Produktionsprogrammplanung ist ein Verfahren zur Bestimmung von Art und Menge des herzustellenden Produkts unter den Bedingungen der „technischen Realisierbarkeit, der wirtschaftlichen Zweckmäßigkeit sowie der Einhaltung von Restriktionen innerhalb und außerhalb des Unternehmens“ [311]. Im Sinn dieser Arbeit wird unter dem Produktionsprogramm die Art und Anzahl der durchzuführenden Probenvorbereitungsmethoden verstanden. Es ist dasjenige Produktionsprogramm für die Planperiode zu bestimmen, welches unter Beachtung einer hohen Kapazitätsauslastung den „höchsten Grad der Zielerreichung (z.B. einen maximalen Deckungsbeitrag bzw. Gewinn) realisiert“ [311].

Zur Bewertung des gesamten Automationssystems sowie der eingehenden Anwendungen werden in dieser Arbeit drei Fälle untersucht. Der erste Fall beinhaltet das Ziel der Maximierung des Deckungsbeitrags. Im zweiten Fall erfolgt die Planung mit dem Ziel der Amortisation des allgemeingültigen Automationssystems in Periode drei. Im dritten Fall wird die unwirtschaftlichste Auslastung des Automationssystems untersucht (siehe Abschnitt 7.2). Der Engpass bei der Produktionsprogrammplanung ist in allen Fällen die Kapazität des Automationssystems mit maximal 120 Betriebsstunden pro Woche (siehe Abschnitt 5.2.1).

$$\text{Fall 1:} \quad DB ! = \max. \quad (5.22)$$

$$\text{Fall 2:} \quad NPV_{t_3} \geq 0 \quad (5.23)$$

$$\text{Fall 3:} \quad DB ! = \min. \quad (5.24)$$

$$\text{Engpass} \quad \text{Kapazität} \leq 120 \text{ h} \quad (5.25)$$

Vor der Optimierung müssen zunächst die in das Automationssystem eingehenden Anwendungen bestimmt werden. Die Auswahl erfolgt anhand der niedrigsten Kosten pro Probe (bei mehreren zur Verfügung stehenden Optionen wie zwei Labwareformaten) sowie unter Abwägung von qualitativen und nachhaltigen Aspekten. Zur Planung des Produktionsprogramms werden zunächst die Deckungsbeiträge DB der ausgewählten Anwendungen aus den variablen Stückkosten K_M (den Kosten für die Verbrauchsmaterialien einer Anwendung) sowie den Einnahmen P (siehe Tabelle 5.4) bestimmt, um im Anschluss die relativen Deckungsbeiträge DB_{rel} aus dem Deckungsbeitrag, bezogen auf den Kapazitätsbedarf am Engpass, zu bestimmen. Die Höhe der relativen Deckungsbeiträge bestimmt die Rangordnung der Produktion. Nach der Produktion der Mindestmenge erfolgt die Auslastung der Restkapazität des Automationssystems entsprechend der gebildeten Rangordnung.

$$DB = P - K_M \quad (5.26)$$

$$DB_{rel} = \frac{DB}{\text{Kapazität}} \quad (5.27)$$

Bei der Optimierung des Produktionsprogramms gelten die Bedingungen der Ganzzahligkeit der Durchlaufzahl DZ sowie eine Mindestprobenzahl pro Anwendung PZ von 192, welche aus dem höchstmöglichen Probendurchsatz aller eingehenden Anwendungen abgeleitet wird.

$$DZ \in \mathbb{Z} \quad (5.28)$$

$$PZ \geq 192 \quad (5.29)$$

Abschließend wird der maximierte (oder minimierte) Deckungsbeitrag zur Berechnung des Kapitalwerts (siehe Gleichung (5.14)) und der Amortisationsdauer des allgemeingültigen Automationssystems verwendet. Anhand der Auswahl der in das Automationssystem eingehenden Anwendungen können die zur Realisierung des Systems notwendigen Bestandteile und davon abgeleitet die Investitionskosten bestimmt werden. Die entstehenden Kapitalkosten der Investition sowie die Kosten für die Instandhaltung, die Energie- und Personalkosten bilden die Fixkosten K_{fix} des allgemeingültigen Automationssystems, welche in Kombination mit der Summe der optimierten Deckungsbeiträge der Ermittlung des Zahlungsstroms zur Berechnung des Kapitalwerts dienen.

$$K_{fix} = K_I + K_E + K_P + A_t + Z_K \quad (5.30)$$

$$\text{Zahlungsstrom} = DB \max. - K_{fix} \quad (5.31)$$

6. Realisierung des Automationskonzepts

Das Konzept des allgemeingültigen Automationssystems wird zur Realisierung von vier automatisierten Probenvorbereitungsmethoden aus den Bereichen Arzneimittel & Forensik, Umwelt sowie Proteomik genutzt.

Nach der Einführung in das Anwendungsgebiet, der Untersuchung der Eigenschaften des Analyten und der Probenmatrix sowie eines Literaturüberblicks, werden geeignete Probenvorbereitungsmethoden abgeleitet. Die Probenvorbereitungsmethoden werden analysiert, um zu überprüfen, ob das entworfene „allgemeingültige“ Automationssystem für die Automatisierung des Probenvorbereitungsprozesses geeignet ist und um ggfs. fehlende Komponenten zu ergänzen. Nach der Vorstellung der resultierenden, automatisierten Anwendung wird das realisierte System in Hinblick auf Qualität, Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit überprüft.

Die erste Anwendung beinhaltet die Extraktion ausgewählter Benzodiazepine aus Serum mithilfe einer Festphasenextraktion. Im Rahmen der Automatisierung werden zwei Labwareformate für die SPE getestet (Kartuschen und 96-Well-Platten, siehe Abbildung 6.1). Die zweite Anwendung besteht in der Automatisierung des Probenvorbereitungsprozesses zur Extraktion von Cannabinoiden aus den verschiedenen Matrices Serum, Urin und Speichel. Die dritte Anwendung stammt aus dem umweltanalytischen Bereich und zeigt die Extraktion und Anreicherung von Benzoesäuren aus Wasserproben. In der vierten Anwendung wird das entwickelte generalisierte Automationssystem zur Aufreinigung von Antikörpern aus einer Zellkultur mittels Zentrifugation und miniaturisierter Chromatographie in zwei Labwareformaten verwendet und validiert.

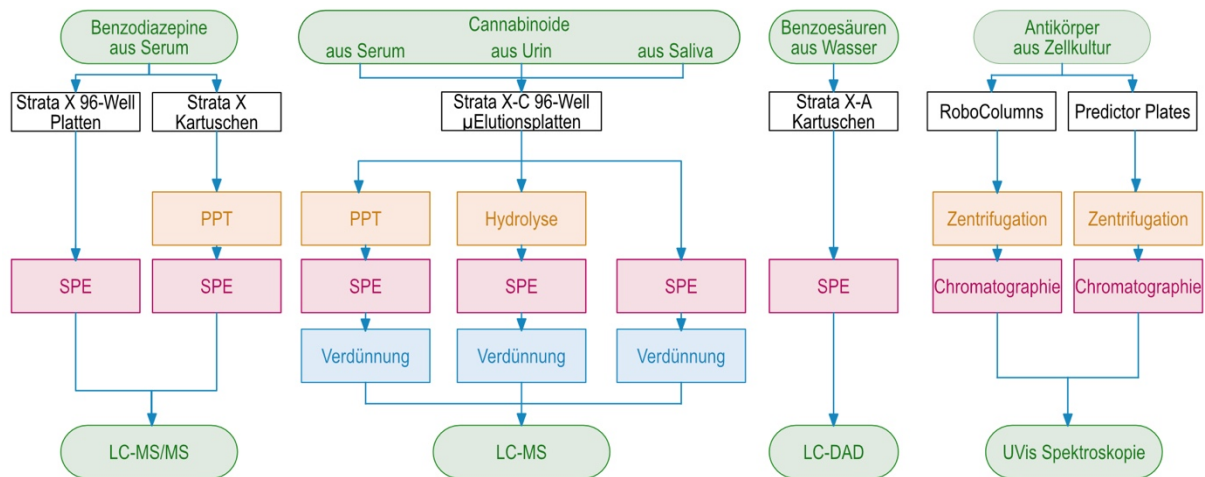


Abbildung 6.1: Überblick über die Probenvorbereitungsprozesse der vier Anwendungen

6.1 Anwendung 1 – Bestimmung von Benzodiazepinen

6.1.1 Einführung

Die heterozyklisch aus einem Diazepin- und Benzenring aufgebauten Benzodiazepine gehören zu den psychoaktiven Medikamenten. Sie besitzen ein hohes Missbrauchspotenzial und werden regulär zur Behandlung von Angst- und Schlafstörungen eingesetzt [312, 313]. In Abbildung 6.2 sind typische Vertreter der Benzodiazepine dargestellt.

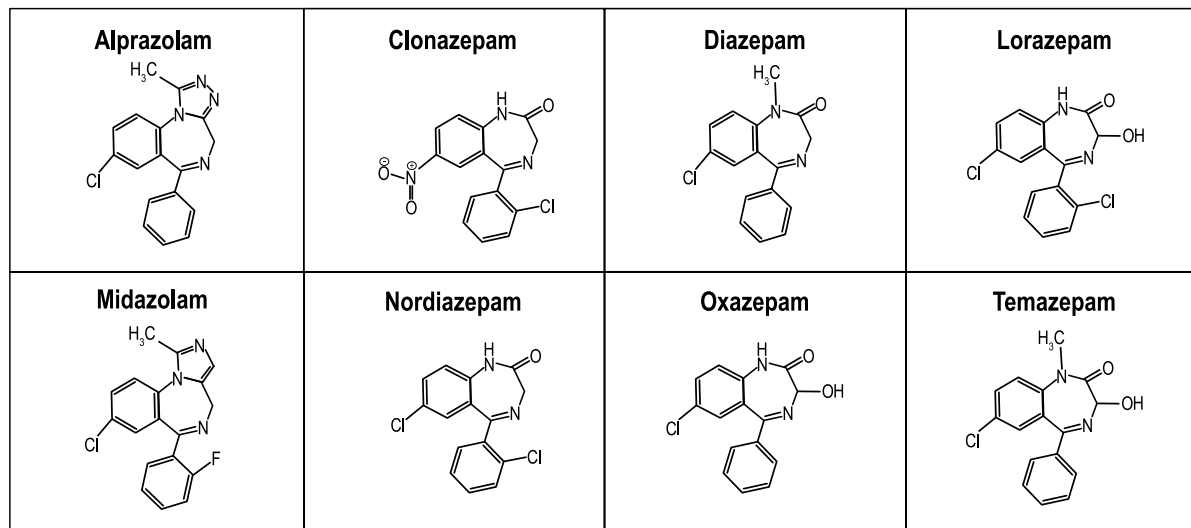


Abbildung 6.2: Strukturformeln ausgewählter Benzodiazepine

Nach oraler Einnahme erfolgt die Resorption der Benzodiazepine in das Blut im Gastrointestinaltrakt [314]. Die lipophilen Moleküle können die Blut-Hirnschranke passieren und wirken durch Bindung an der allosterischen Stelle des Gamma-Aminobuttersäure-Rezeptors Typ A, welcher die Bindungsstelle für den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter GABA (Gamma-Aminobuttersäure) im Gehirn ist. Die Bindung der Benzodiazepine verstärkt die inhibitorische Wirkung von GABA, was zu einer Verminderung der Erregbarkeit und den antikonvulsiven, anxiolytischen, sedativen bis hin zu amnestischen und hypnotischen Wirkungen der Benzodiazepine führt [315-317].

Benzodiazepine werden im ersten Schritt durch Cytochrom P450 Monooxygenase verstoffwechselt [314]. Die entstehenden Metaboliten können ebenfalls pharmakologisch aktiv sein, was zur Erzeugung unterschiedlicher Wirkungsauern genutzt wird [318]. Je nach Dauer der Verstoffwechslung können Benzodiazepine in kurzfristig (Halbwertszeit < 24 h, z.B. Midazolam, Temazepam, Alprazolam, Oxazepam), mittelfristig (Halbwertszeit > 24 h, z.B. Nitrazepam, Clonazepam) und langfristig wirksame Substanzen (Halbwertszeit > 48 h, z.B. Diazepam, Flurazepam) eingeteilt werden [319]. Die Inaktivierung erfolgt zumeist durch Konjugation mit Glucuronsäure [314]. Diazepam, Nordiazepam und Temazepam werden hauptsächlich zu Oxazepam metabolisiert, welches direkt oder glukuriniert ausgeschieden wird. Oxazepam ist der am häufigsten im Urin gefundene Metabolit.

Die therapeutische Spanne im Blut liegt für Diazepam, Nordiazepam, Oxazepam und Temazepam zwischen 100–1.000 ng/ml [318, 320, 321]. Benzodiazepine sind stark an Plasmaproteine gebunden, was die Diffusion aus dem Kapillaren in die Speichel- und Haarfollikel deutlich reduziert, den ähnlichen

Konzentrations-Zeitverlauf in Blut und Speichel jedoch nicht beeinflusst [319, 322, 323]. Weitere für den Nachweis geeignete Matrices sind somit Urin, Speichel und Haar [49, 323-325].

Für die Aufreinigung von Benzodiazepinen aus den komplexen, biologischen Matrices werden am häufigsten die LLE (46%), die SPE (34%), die Verdünnung (8%) und die SPME (6%) eingesetzt. [318]. Die Entfernung der Proteine aus Serum, Plasma und Vollblutproben wird durch den kombinierten Einsatz einer Proteinfällung mit Methanol oder Acetonitril und einer SPE erreicht [326, 327]. Zur Erhöhung der Sensitivität wird im Anschluss an die SPE häufig eine Aufkonzentration mittels Evaporation durchgeführt [108, 328-330]. Als analytische Technik wird die LC mit 61% deutlich häufiger eingesetzt als die GC mit 11%, da die Verwendung der LC keine Derivatisierung der Analyten erfordert [313, 318]. Immunoassays wie ELISA oder RIA werden für Drogen-Schnelltest zum Screening von biologischen Proben, vor der Quantifizierung mittels LC-MS/MS eingesetzt [331-333].

Samanidou et al. stellen eine manuelle Probenvorbereitungsmethode zur Bestimmung von Alprazolam, Bromazepam, Diazepam und Flunitrazepam aus Plasma vor. Für die Aufreinigung der Plasmaproben wird eine Proteinfällung mit anschließender Zentrifugation sowie eine SPE eingesetzt. Nach der SPE erfolgt ein Lösungsmitteltausch durch Evaporation und Rekonstitution und die Bestimmung mittels LC-UV-VIS. Die Wiederfindungsraten liegen zwischen 81–115% [326]. Auch in den Methoden von Allqvist et al. und Xue et al. wird eine Proteinfällung mit Zentrifugation und eine SPE zur Extraktion von Benzodiazepinen aus Plasmaproben eingesetzt [327, 334]. Zur Verkürzung des Extraktionsprotokolls verzichten Xue et al. in einer weiteren Extraktionsmethode auf Konditionierungs- und Waschschriffe der 96-Well μ Elutionsplatte [327].

Eine halbautomatische Methode zur Bestimmung von Alprazolam, Clonazepam, Diazepam, Nordiazepam, Oxazepam, Temazepam und weiteren Medikamenten und Drogen mittels Verdünnung, Zentrifugation, SPE, Evaporation und Rekonstitution wird von Dalsgaard et al. präsentiert. Die Autoren nutzen eine Freedom EVO 200 Workstation (Tecan, Männedorf, CHE) zur Automatisierung der SPE. Die erzielten Wiederfindungsraten liegen für alle 30 Analyten zwischen 41-97%. In einer ähnlichen Methode von Bjørk et al. werden alle Probenvorbereitungsschritte inklusive der Zentrifugation und Evaporation vollständig automatisiert auf der Freedom EVO 200 Workstation durchgeführt. Für die Automatisierung werden zahlreiche externe Geräte wie beispielsweise eine Waage, eine Zentrifuge und ein Evaporator in das Deck der Freedom Evo 200 Workstation integriert. Die Wiederfindungsraten der automatisierten Probenvorbereitung liegen zwischen 35–84% [108]. Durch den Evaporationsschritt werden in den manuellen Methoden Aufkonzentrationsfaktoren des fünf- bis zehnfachen erzielt [326, 330, 334]. In Tabelle 10.5 im Anhang befindet sich eine Übersicht der Methoden.

6.1.2 Prozessanalyse und Systemanforderungen

Basierend auf den zuvor vorgestellten Probenvorbereitungsmethoden, die in verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten grundsätzlich auf einer SPE im Kartuschen- oder Plattenformat mit und ohne vorherige Proteinfällung basieren und mit einem Aufkonzentrationsschritt abschließen, werden die Strata X 96-Well Platten und Strata X Kartuschen (1 ml, 30 mg, Phenomenex, Torrance, USA) zur Extraktion von Benzodiazepinen aus Serumproben ausgewählt.

Die zu automatisierende und optimierende Probenvorbereitungsmethode besteht aus einem Konditionierungsschritt mit 1 ml Methanol (MeOH), einem Equilibrierungsschritt mit 1 ml Wasser, der Probenaufgabe, sowie einem Waschschrift mit 1 ml 5% bis 60% Methanol und zwei Elutionsschritten mit je 500 µl 2% Ameisensäure in Methanol/Acetonitril. Optional wird vom Hersteller die ein- bis zweifache Verdünnung der Probe sowie eine Proteinfällung mit Zinksulfat (ZnSO₄) oder Acetonitril (ACN) vorgeschlagen¹² (siehe Abbildung 6.3)[335].

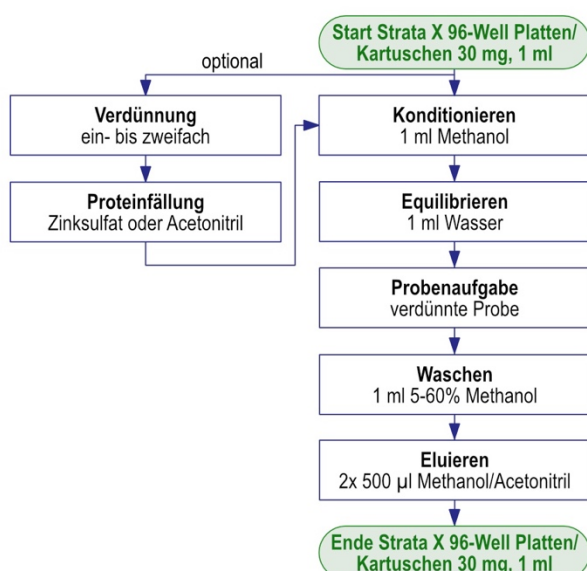


Abbildung 6.3: Ausgangspunkt Methodenentwicklung Benzodiazepine

Im Rahmen der Methodenentwicklung werden verschiedene Bedingungen getestet, um die Wiederfindungsraten und Sensitivität der Benzodiazepinextraktion aus Serum zu optimieren.

Die optimierte Probenvorbereitungsmethode mit den Strata X 96-Well-MTP beginnt mit der Konditionierung und Equilibrierung der Strata X 96-Well-MTP mit je 900 µl MeOH und H₂O (siehe Abbildung 6.4, links).

¹² Für die Bearbeitung der Kartuschen wird entsprechend den Angaben des Herstellers ein 12 oder 24 Positionen umfassendes Vakuum-Manifold, oder eine Spritze mit einem Adapter-Aufsatz bzw. ein Roboter benötigt. Für die Bearbeitung der 96-Well Platten wird ein 96-Well Platten-Manifold, oder der Presston 100 oder ein Roboter empfohlen [335].

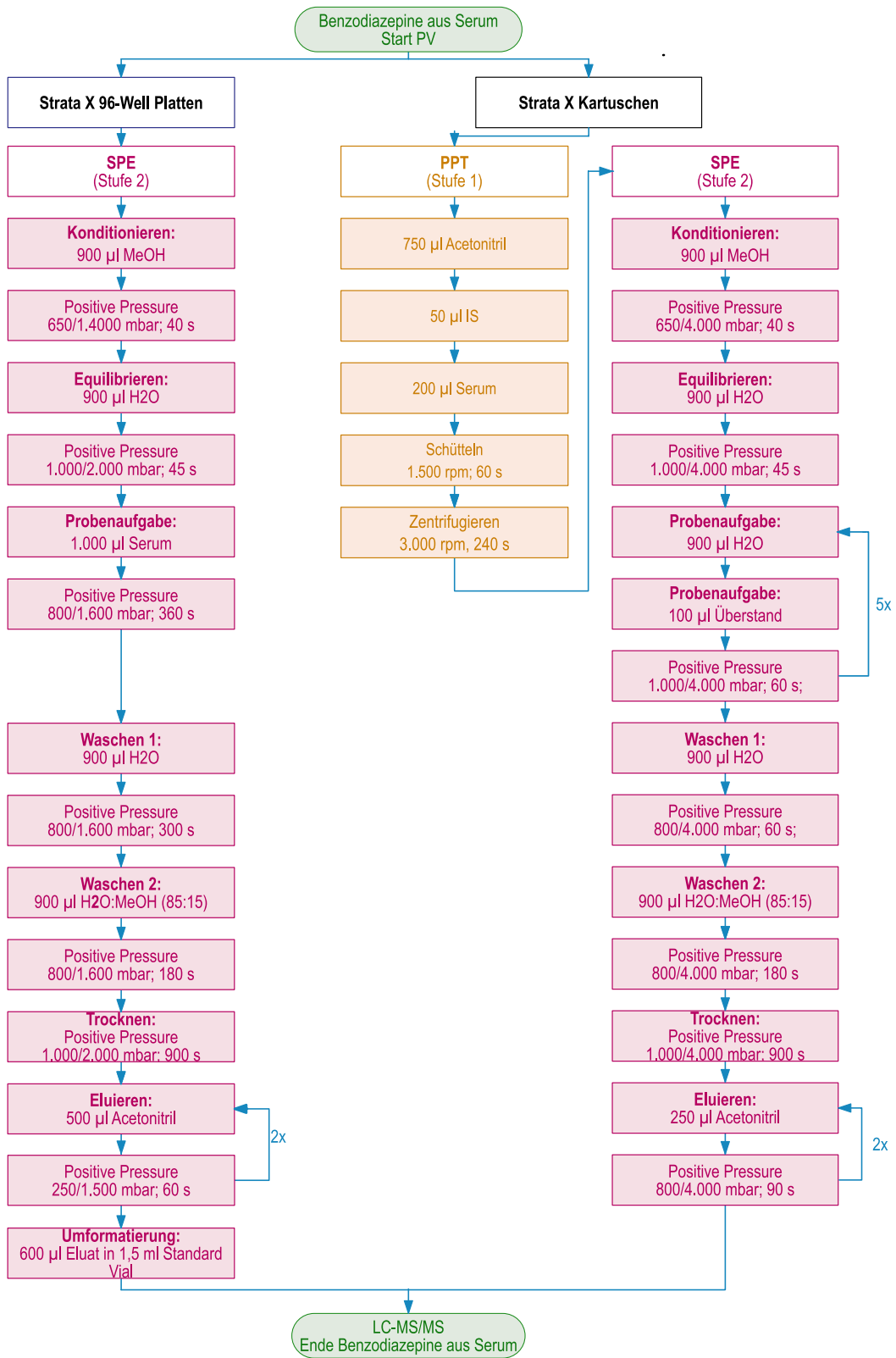


Abbildung 6.4: Prozessablaufpläne zur Bestimmung von Benzodiazepinen aus Serum

Im Anschluss erfolgt die Beladung der Strata X 96-Well-MTP mit 1.000 µl Serumprobe. Das Waschen erfolgt in zwei Schritten mit 900 µl H₂O und 900 µl H₂O/MeOH (85:15) vor einer 15-minütigen Trocknungszeit. Anschließend werden die Analyten in zwei Schritten mit jeweils 500 µl ACN eluiert. Die Quantifizierung der aufgereinigten Benzodiazepine erfolgt mittels LC-MS/MS.

Bei den Strata X Kartuschen manifestierte sich im Rahmen der Methodenentwicklung ein Druckanstieg bei der LC nach wenigen Injektionen des Eluats, was auf eine mangelnde Reinheit der Probe zurückgeführt wurde. Aus diesem Grund wurde bei den Strata X Kartuschen vor der SPE eine Proteinfällung mit 750 µl ACN, 50 µl internem Standard (IS) und einem Probenvolumen von 200 µl durchgeführt (siehe Abbildung 6.4, rechts). Nach der Durchmischung mit einem Schüttler werden die ausgefällten Proteine vom Überstand durch eine Zentrifugation getrennt. Vor der Aufgabe des Überstands werden die Strata X Kartuschen mit je 900 µl MeOH und 900 µl H₂O konditioniert und equilibriert. Die Beladung der Kartuschen erfolgt in 5 Schritten. Pro Beladungsschritt werden 900 µl H₂O und 100 µl des Überstands auf die Kartuschen gegeben. Das Waschen und Trocknen der Kartuschen erfolgt in Analogie zu den Strata X Platten mit je 900 µl H₂O und 900 µl H₂O/MeOH (85:15). Im Anschluss werden die Analyten zweimal mit je 250 µl ACN eluiert und mittels LC-MS/MS analysiert. Eine Anpassung des Lösungsmittels ist für die Analyse nicht erforderlich, weswegen die dritte Stufe des Probenvorbereitungsprozesses entfällt. Die Serumproben werden aus Eppendorf Vials (Eppendorf AG, Hamburg, DE) entnommen. Die Proteinfällung wird in 1,5 ml Standard Vials (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Standardlösung wird aus 1,5 ml Standard Vials entnommen und anschließend wieder im Kühlschrank gelagert. Die eluierten Proben werden in 1,5 ml Standard Vials im Autosampler der nachfolgenden LC-MS/MS Analyse bereitgestellt. Für die Methode wird eine Zentrifuge, ein Vortexer, ein Vakuum Manifold für die Strata X Kartuschen und ein 96-Well Platten Manifold (z.B. Presston 100, siehe Herstellerempfehlungen) benötigt. Da das Ziel die optimierte, automatisierte Durchführung der Benzodiazepinextraktion ist, werden auch im manuellen Prozess bereits die für die Automatisierung vorgesehenen Geräte eingesetzt, um Methodenparameter wie Druck und Zeit einzustellen. In den Prozessanalysen in den Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 werden zur Ableitung der Anforderungen an das Automationssystem die in klassischen manuellen Prozessen eingesetzten Geräte betrachtet.

Tabelle 6.1: Prozessanalyse Benzodiazepinextraktion Strata X Kartuschen manuell

Beschreibung Prozessschritt	Ausgangslabware	Ziellabware	Manueller Prozess	Anforderung Automationsystem
Transfer des Fällungsreagenzes, 750 µl ACN	Lösungsmittelflasche	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer, Öffnen u. Schließen der Flasche	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial auf dem Deck Bereitstellung Lösungsmittel, Reduktion der Evaporation
Transfer des internen Standards, 50 µl IS	1,5 ml Standard Vial	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer, Lagerung des Standards in Kühlschrank	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial auf dem Deck Kühlung/Temperieren 1,5 ml Standard Vial
Transfer der Serumprobe, 200 µl	Eppendorf Vial	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Eppendorf Vials auf dem Deck
Homogenisieren	-	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transport, Vortexer	Automatisierung des Transports Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial (schüttelbar) Homogenisieren
Zentrifugieren	-	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transport, Zentrifuge	Automatisierung des Transports Zentrifugieren Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials (zentrifugierbar)
Konditionieren: 900 µl Methanol	Lösungsmittelflasche	Strata X Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X Kartusche auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X Kartusche (druckgeeignet)
Equilibrierung: 900 µl H ₂ O	Lösungsmittelflasche	Strata X Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X Kartusche auf dem Deck
Probenaufgabe: 5x 100 µl Überstand 5x 900 µl H ₂ O	1,5 ml Standard Vial Lösungsmittelflasche	Strata X Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X Kartusche auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X Kartusche (druckgeeignet)
Waschen 1: 900 µl H ₂ O	Lösungsmittelflasche	Strata X Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X Kartusche auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X Kartusche (druckgeeignet)
Waschen 2: 900 µl H ₂ O/MeOH	Lösungsmittelflasche	Strata X Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X Kartusche auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X Kartusche (druckgeeignet)
Eluieren: 2x 250 µl ACN	Lösungsmittelflasche	Strata X Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X Kartusche auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X Kartusche (druckgeeignet)
Direkter Transfer des Eluats in 1,5 ml Standard Vial zur Bestimmung der Benzodiazepin Konzentration mittels LC-MS/MS (Autosampler)	Strata X Kartusche	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transport, Vakuum Manifold Unterstellen des Vials	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X Kartuschen über 1,5 ml Standard Vials Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial (druckgeeignet)

Tabelle 6.2: Prozessanalyse Benzodiazepinextraktion Strata X Platten manuell

Beschreibung Prozessschritt	Ausgangslabware	Ziellabware	Manueller Prozess	Anforderung Automationssystem
Konditionieren: 900 µl Methanol	Lösungsmittelflasche	Strata X Platte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X Platte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Equilibrierung: 900 µl H ₂ O	Lösungsmittelflasche	Strata X Platte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Probenaufgabe: 1.000 µl Serum	Eppendorf Vial	Strata X Platte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Eppendorf Vials auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X Platte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Waschen 1: 900 µl H ₂ O	Lösungsmittelflasche	Strata X Platte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X Platte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Waschen 2: 900 µl H ₂ O/MeOH	Lösungsmittelflasche	Strata X Platte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X Platte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Eluieren: 2x 500 µl ACN	Lösungsmittelflasche	Strata X Platte Deepwell Platte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X Platte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Transfer des Eluats in 1,5 ml Standard Vial für Autosampler (600 µl)	Deepwell Platte	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial

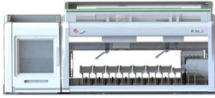






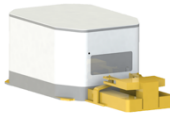


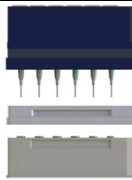
Die Prozessanalysen zeigen, dass die wesentlichen Anforderungen an das Automationssystem in der Übernahme der manuell durchgeführten Transfer- und Transportschritte, der Zusammenführung aller Funktionalitäten für einen ununterbrochen Prozessablauf (Integration aller Zusatzgeräte), der Bereitstellung der Lösungsmittel im System sowie der Ermöglichung der Bearbeitung der aus manuellen Prozessen stammenden Gefäße und Labware bestehen. Zur Bearbeitung (Transport und Lagerung) von Labware wie 1,5 ml Standard Vials oder den Strata X Kartuschen ist die Entwicklung spezieller Racks erforderlich.

6.1.3 Anforderungsanalyse und Systemrealisierung

Aus der Prozessanalyse ergeben sich 11 Anforderungen an das allgemeingültige Automationssystem, die in Tabelle 6.3 zusammengefasst sind. Die Anforderungen 1, 2, 4, 7, 8 und 9 werden durch das konfigurierte allgemeingültige Automationssystem erfüllt (grünes Häkchen in Tabelle 6.3).

Zur Realisierung der Anforderungen 3, 5, 6, 10 und 11 sind zusätzliche Lösungen erforderlich (mit einem Kreuz markiert in Tabelle 6.3), welche nachfolgend vorgestellt werden.

Tabelle 6.3: Überprüfung der Anforderungen an das Automationssystem für die Benzodiazepinextraktion

Nr.	Anforderung	Erfüllt durch allgemeingültiges Automationssystem?	Lösung:	Zusatzmodul/ spezialisierte Labware	Erfüllt durch allgemeingültiges Automationssystem mit Speziallabware?
1	Automatisierung des Transfers und des Transports	✓	Biomek i7		✓
2	Bereitstellung der Lösungsmittel	✓	Self-Refilling Quarter Reservoir		✓
3	Bereitstellung Eppendorf Vials auf dem Deck	✗	Entwicklung eines Racks für Eppendorf Vials inklusive Befestigung der Schnappdeckel		✓
4	Druckaufgabe	✓	Positive Pressure Unit		✓
5	Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial druckgeeignet, kühlgeeignet	✗	Entwicklung eines Racks für 1,5 ml Standard Vials		✓
6	Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial zentrifugationsgeeignet, schüttelgeeignet	✗	Entwicklung eines Racks zur Zentrifugation von 1,5 ml Standard Vials		✓
7	Homogenisieren	✓	Shaking Peltier ALP		✓
8	Zentrifugieren	✓	VSpin Zentrifuge		✓
9	Temperieren	✓	Static Peltier ALP		✓
10	Bereitstellung der Strata X Kartuschen, druckgeeignet	✗	Nutzung des Positive Pressure Racks, 1 ml		✓
11	Bereitstellung Strata X Kartuschen über 1,5 ml Standard Vials	✗	Entwicklung Spacer Adapter, Nutzung von Spritzenaufsätzen Stack aus Positive Pressure Rack, Spacer Adapter und Rack 1,5 ml Standard Vials		✓

Die Automatisierung der Lösungsmitteltransfer- und Labwaretransportprozesse wird durch die Grundkonfiguration der Biomek i7 Workstation erfüllt (Anforderung 1). Der kreuzkontaminationsfreie Transfer der Proben und Lösungsmittel wird durch den Einsatz von Einweg-Pipettenspitzen in den Größen 90 µl, 230 µl und 1.070 µl (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA) sichergestellt. Die Lösungsmittel werden im integrierten Self-Refilling Quarter Reservoir auf dem Deck bereitgestellt (Anforderung 2). Gemäß Anforderung 3 wird für die Bereitstellung der in 1,5 ml Eppendorf Vials aufbewahrten Serumproben auf dem Deck der Biomek i7 Workstation ein spezielles Rack benötigt und entwickelt, mit welchem die automatisierte Bearbeitung der Vials durch das konfigurierte System ermöglicht wird. Das resultierende Eppendorf Vial Rack mit 25 Wells ist in Abbildung 6.5 dargestellt.

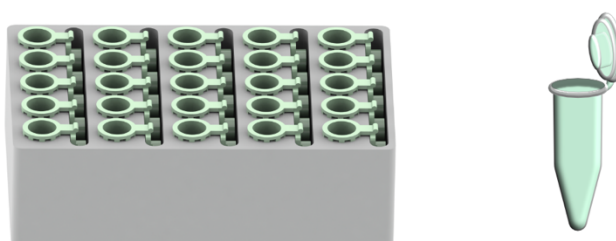


Abbildung 6.5: Eppendorf Vial Rack

Die automatisierte Filtration der Strata X Kartuschen und Platten wird durch die integrierte Positive Pressure Unit erfüllt (Anforderung 4). Zur Kühlung des internen Standard, welcher in 1,5 ml Standard Vials auf dem Deck bereitgestellt wird, wird ein zusätzliches Rack benötigt, welches gute Wärmeleitfähigkeitseigenschaften besitzt. Dazu wird ein Rack aus Aluminium mit 24 Wells entwickelt, welches eine optimale Kühlung ermöglicht. Die hohe Stabilität des Aluminium Racks erlaubt zudem die Nutzung des Racks in der Positive Pressure Unit, wodurch Anforderung 5 erfüllt wird. Das Aluminium-Rack ist in Abbildung 6.6 dargestellt.

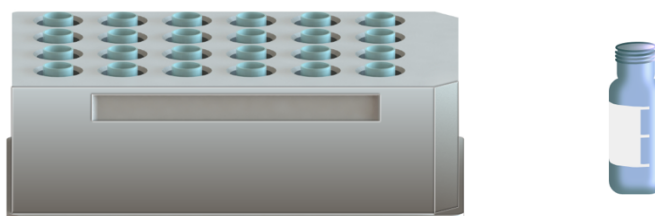


Abbildung 6.6: Aluminium Rack mit 1,5 ml Standard Vials

Zur Proteinfällung werden 1,5 ml Standard-Vials genutzt. Zur automatisierte Bearbeitung der Einzelvials wird gemäß Anforderung 6 ein zentrifugations- und schüttelungsgeeignetes Rack mit 28 Wells entwickelt, welches in Abbildung 6.7 dargestellt ist.

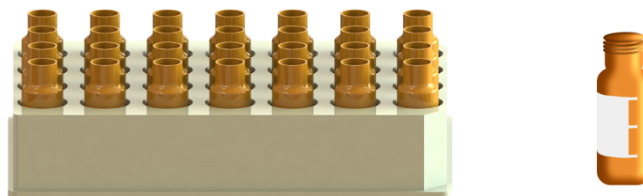


Abbildung 6.7: Schüttelungs- und zentrifugationsgeeignetes Rack mit 1,5 ml Standard Vials

Das Homogenisieren, Zentrifugieren und Temperieren der Proben wird durch die im allgemeingültigen Automationssystem integrierten Geräte Shaking Peltier ALP, VSpin Zentrifuge und Static Peltier ALP realisiert (Anforderung 7, 8 und 9). Zur Bereitstellung der Strata X Kartuschen auf dem Deck sowie zur Bearbeitung dieser in der Positive Pressure Unit wird zusätzlich ein Positive Pressure Rack mit 24 Positionen für 1 ml Kartuschen (amplus GmbH, Rostock, DE) benötigt (Anforderung 10, Abbildung 6.8 (3)).

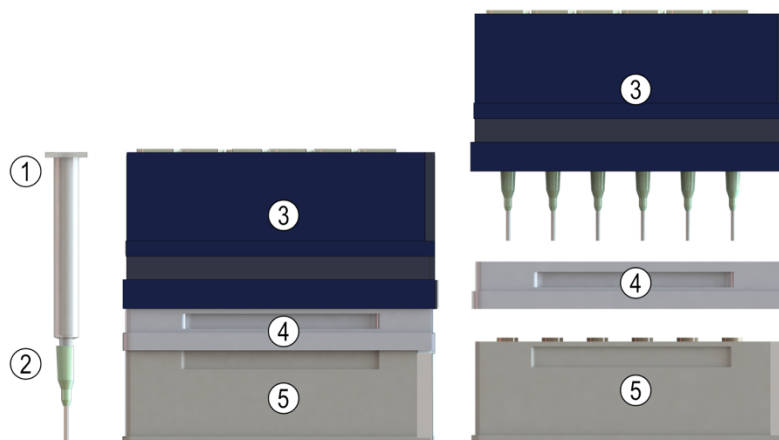


Abbildung 6.8: (1) Strata X Kartuschen; (2) Spritzenaufsatz; (3) Positive Pressure Rack; (4) Spacer Adapter; (5) Aluminium Rack

Um das Eluat aus den Strata X Kartuschen aufzufangen und in der sich anschließenden Analyse im Autosampler bereitzustellen, werden 1,5 ml Standard-Vials verwendet. Die Vials werden mithilfe des 24-Well Aluminium Racks unter den Kartuschen positioniert. Am Kartuschenausgang werden zusätzlich Spritzen befestigt, welche den sauberen Transfer des Eluats zwischen Kartuschenausgang und den Eingängen der 1,5 ml Standard Vials sicherstellen (Abbildung 6.8 (2)). Der dadurch entstehende Höhenunterschied wird durch einen zusätzlichen Spacer Adapter ausgeglichen und verhindert gleichzeitig den luftdichten Verschluss der 1,5 ml Standard-Vials. Mit dem entstehenden Stack in Abbildung 6.8 (1–5) wird Anforderung 11 erfüllt. Im Gegensatz zu den Strata X Kartuschen wird bei den Strata X Platten wird in eine halbtransparente 96-Well Deepwellplatte eluiert. In diesem Stack ist keine

Zusatzlabware erforderlich. Nach der Elution wird das Eluat zur Analyse oder Aufbewahrung in 1,5 ml Standard Vials transferiert, die wieder im Aluminium Rack bereitgestellt werden.

Im Rahmen der Methodenentwicklung mit den Strata X Kartuschen wurden die entwickelten Racks in einer modifizierten Variante mit Sichtschlitzen verwendet. Die Sichtschlitze in den seitlichen Wänden der Racks ermöglichen die visuelle Überprüfung des Lösungsmittel- und Probentransfers und damit die optimale Parametereinstellung der Positive Pressure Unit (siehe Abbildung 6.9).



Abbildung 6.9: Stack aus geschlitzten Racks zur Methodenentwicklung

Die Entwicklung der Racks erfolgte unter Maximierung der Probenzahl sowie unter Beachtung notwendiger Kompatibilitäten für mögliche Labware Stacks. Das zur Verfügung stehende MTP-Standardformat wurde optimal ausgenutzt, was jedoch auch zu unterschiedlichen Wellanzahlen (24 bis 28 Wells) der Racks führte.

In der vorliegenden Konfiguration des Automationssystems können mit den Strata X Platten bis zu 192 Proben in einem Durchlauf vorbereitet werden. Das resultierende Decklayout ist in Abbildung 6.10 dargestellt. Aufgrund des höheren Labwarebedarfs durch die Zentrifugation sowie des höheren Platzbedarfs für die Bereitstellung der Strata X Kartuschen (24 Kartuschen je ALP-Position im Vergleich zu 96 Wells je ALP-Position einer Strata X Platte), können mit dem resultierenden Decklayout in Abbildung 6.11 mit den Strata X Kartuschen bis zu 72 Benzodiazepinextraktionen aus Serumproben in einem Durchlauf durchgeführt werden.

Die tabellarischen Prozessablaufpläne, die Materialverzeichnisse mit den eingesetzten Reagenzien, der Labware und den Geräten sind in Tabelle 10.6 bis Tabelle 10.9 in Anhang 10.4.1 zusammengefasst. Zur Analyse und Quantifizierung der vorbereiteten Proben wird ein LC-MS/MS System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) eingesetzt. Die methodischen Parameter befinden sich in Anhang 10.4.2.

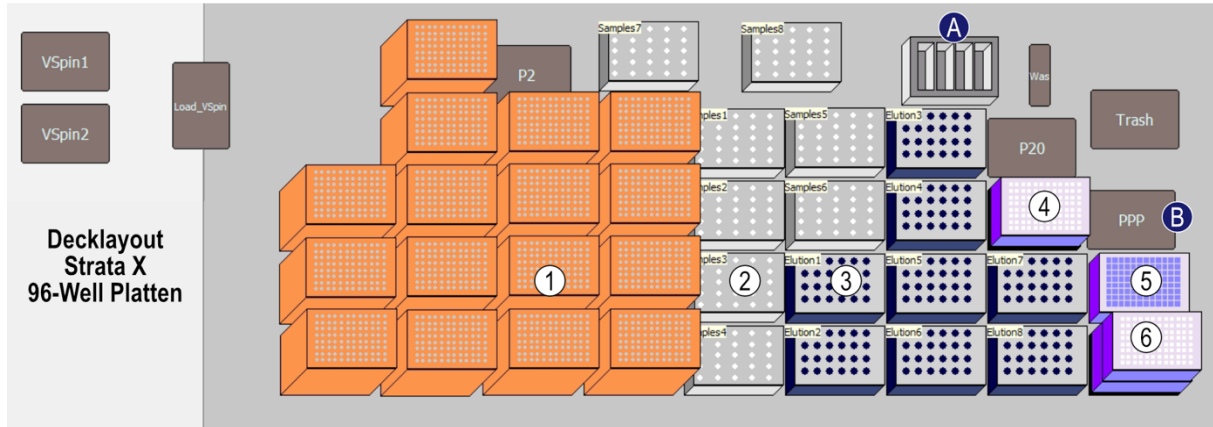


Abbildung 6.10: Decklayout zur automatisierten Bestimmung von Benzodiazepinen mit 96-Well Platten für bis zu 192 Proben

(A) Self-Refilling Quarter Reservoir; (B) Positive Pressure Unit;

(1) 1.070 µl Pipettenspitzen; (2) Eppendorf Vial Rack; (3) Rack 1.5 ml Standard Vials, (4) Strata X 96-Well Plate (30 mg, 1 ml);

(5) 96-Well Elutionsplatte (2 ml); (6) Stack aus Strata X und Deepwellplatte

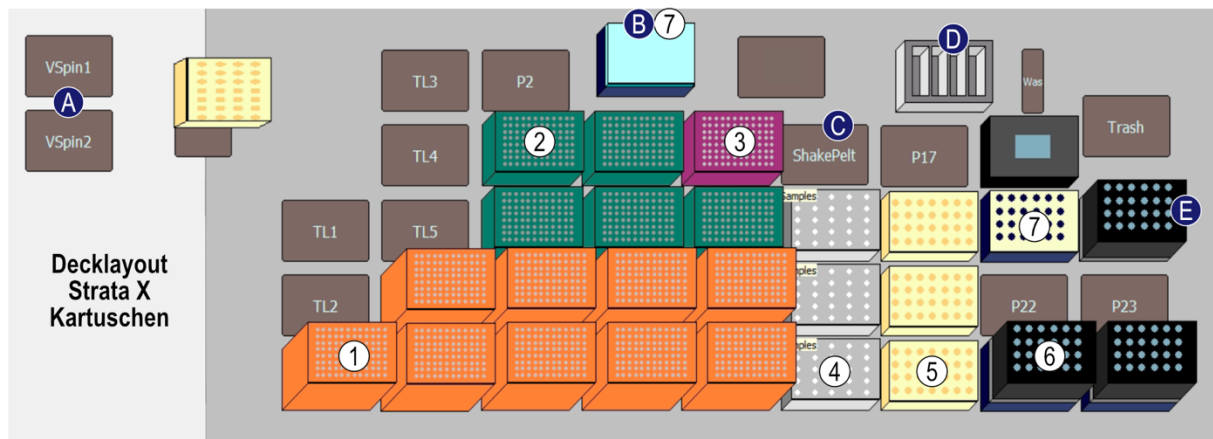


Abbildung 6.11: Decklayout zur automatisierten Bestimmung von Benzodiazepinen mit Kartuschen für bis zu 72 Proben

(A) Zentrifuge mit zwei Positionen (VSpin1 und VSpin2); (B) Temperier Position; (C) Shaker; (D) Self-Refilling Quarter Reservoir;

(E) Positive Pressure Unit;

(1) 1.070 µl Pipettenspitzen; (2) 230 µl Pipettenspitzen; (3) 90 µl Pipettenspitzen; (4) Eppendorf Vial Rack; (5) Rack 1.5 ml Standard

Vials, (6) Stack aus Positive Pressure Rack; mit Strata X Kartuschen und Spritzenaufsätzen, Spacer Adapter und Aluminium Rack mit 1,5 ml Standard Vials; (7) Aluminium Rack

6.1.4 Systemüberprüfung – Bestimmung von Benzodiazepinen

6.1.4.1 Ergebnisse der Validierung der Benzodiazepinextraktion mit Platten

Die Variationskoeffizienten der Messpräzision der Benzodiazepinextraktion mit den Strata X Platten und Analyse mittels LC-MS/MS liegen für alle Analyten zwischen 0,47% und 3,06% (siehe Abbildung 10.4). Die Wiederfindungsraten werden mit 24 Proben bestimmt und liegen im Mittel zwischen 89,33% und 101,74% mit CVs zwischen 2,67% und 3,96% und einer Spanne von 82,41% bis 106,49% für alle Analyten bis auf Lorazepam. Die mittlere Wiederfindungsrate von Lorazepam beträgt 106,21% bei einer Spanne von 95,10% bis 119,73% und ist bei einem resultierenden CV von 5,92% erhöht (siehe Abbildung 6.12).

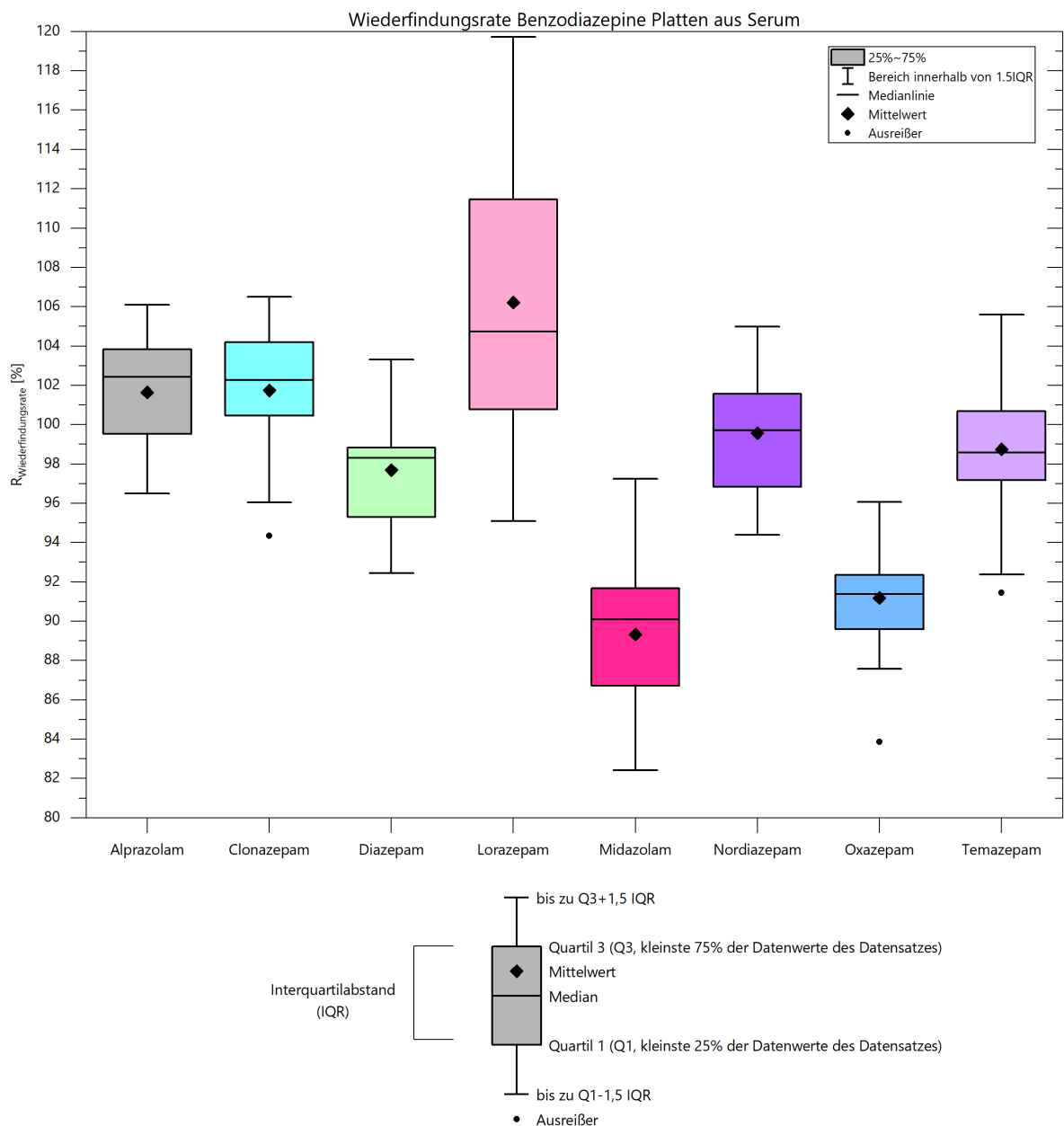


Abbildung 6.12: Wiederfindungsraten Benzodiazepine Platten

Die Variationskoeffizienten der laborinternen Vergleichspräzision sind kleiner als 6,61% (siehe Abbildung 10.5). Die mittleren Wiederfindungsraten liegen zwischen 77,96% und 103,47% (bis auf Lorazepam). Auch hier sind die Wiederfindungsraten von Lorazepam erhöht ($R_{\text{Max}}=126,82\%$) und könnten beispielsweise auf eine Ionenverstärkung durch nicht entfernte Matrixbestandteile zurückgeführt werden. Die nach DIN 32645 berechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei der Extraktion von Benzodiazepinen mit den Strata X Platten liegen zwischen 3,29 ng/ml und 17,60 ng/ml sowie zwischen 11,63 ng/ml und 61,22 ng/ml. Der Verdünnungsfaktor ist eins, daher entsprechen die methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen den analytischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Eine detaillierte Übersicht der Ergebnisse befindet sich in Anhang 10.4.3 in Tabelle 10.12 bis Tabelle 10.14. entsprechend [287].

6.1.4.2 Ergebnisse der Validierung der Benzodiazepinextraktion mit Kartuschen

Für automatisierte Extraktion von Benzodiazepinen aus Serumproben mit den Strata X Kartuschen und der Bestimmung mittels LC-MS/MS liegen die Variationskoeffizienten der Messpräzision zwischen 0,59% und 2,62% für alle Analyten (siehe Abbildung 10.6). Sie sind damit mit den zuvor ermittelten Variationskoeffizienten der Strata X Platten vergleichbar. Die Wiederfindungsraten der Benzodiazepinextraktion mit Strata X Kartuschen wurden entsprechend einer vollen Besetzung des Racks mit 24 Proben bestimmt. Die Wiederfindungsraten lagen im Mittel zwischen 82,29% und 93,43% mit CVs zwischen 2,26% und 3,30% und einer Spanne von 78,30% bis 97,52% bis auf Temazepam. Hier lag die Wiederfindungsrate im Mittel bei 71,38% mit einer Spanne von 63,09% und 77,26% mit einem CV von 6,09% (siehe Abbildung 6.13). Die höhere Streuung bei der Ermittlung der Wiederfindungsraten von Temazepam könnte durch ein Mitausfallen des noch an Plasmaproteine gebundenen Analyten durch die zusätzliche Proteinfällung verursacht sein, wohingegen die auf Matrixeffekte zurückgeführte Streuung von Lorazepam bei der Extraktion mit den Platten ohne Proteinfällung nicht mehr beobachtbar ist. Insgesamt sind die Wiederfindungsraten mit den Strata X Kartuschen und der Proteinfällung geringer als bei der Extraktion mit den Strata X Platten, was auf Verluste durch den zusätzlichen Probenvorbereitungsschritt zurückgeführt wird. Die mittleren Wiederfindungsraten, die im Rahmen der laborinternen Vergleichspräzision ermittelt wurden, liegen zwischen 77,19% und 105,98% mit CVs zwischen 1,71% und 6,19% für alle Analyten (siehe Abbildung 10.7). Die analytischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzodiazepinextraktion mit Strata X Kartuschen wurden anhand der Kalibrierung entsprechend DIN 32645 berechnet. Die Nachweisgrenzen für alle Analyten lagen zwischen 0,78 ng/ml und 4,42 ng/ml. Die Bestimmungsgrenzen lagen zwischen 2,83 ng/ml und 15,96 ng/ml. Durch die im Rahmen der Proteinfällung erfolgte Verdünnung der Serumproben sind die methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen höher als die analytischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und liegen zwischen 3,89 ng/ml und 22,09 ng/ml sowie zwischen 14,13 ng/ml und 79,80 ng/ml ($\text{VF}=0,2$). Trotz des zusätzlichen Verdünnungsschritts sind die methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Benzodiazepinextraktion der Strata X Kartuschen mit den ermittelten Grenzen der Strata X Platten vergleichbar. Dies wird auf einen Sensitivitätsgewinn durch den zusätzlichen Aufreinigungsschritt zurückgeführt. Eine detaillierte Darstellung der Validierungsergebnisse mit den Strata X Kartuschen befindet sich in Anhang 10.4.4 in Tabelle 10.15 bis Tabelle 10.17.

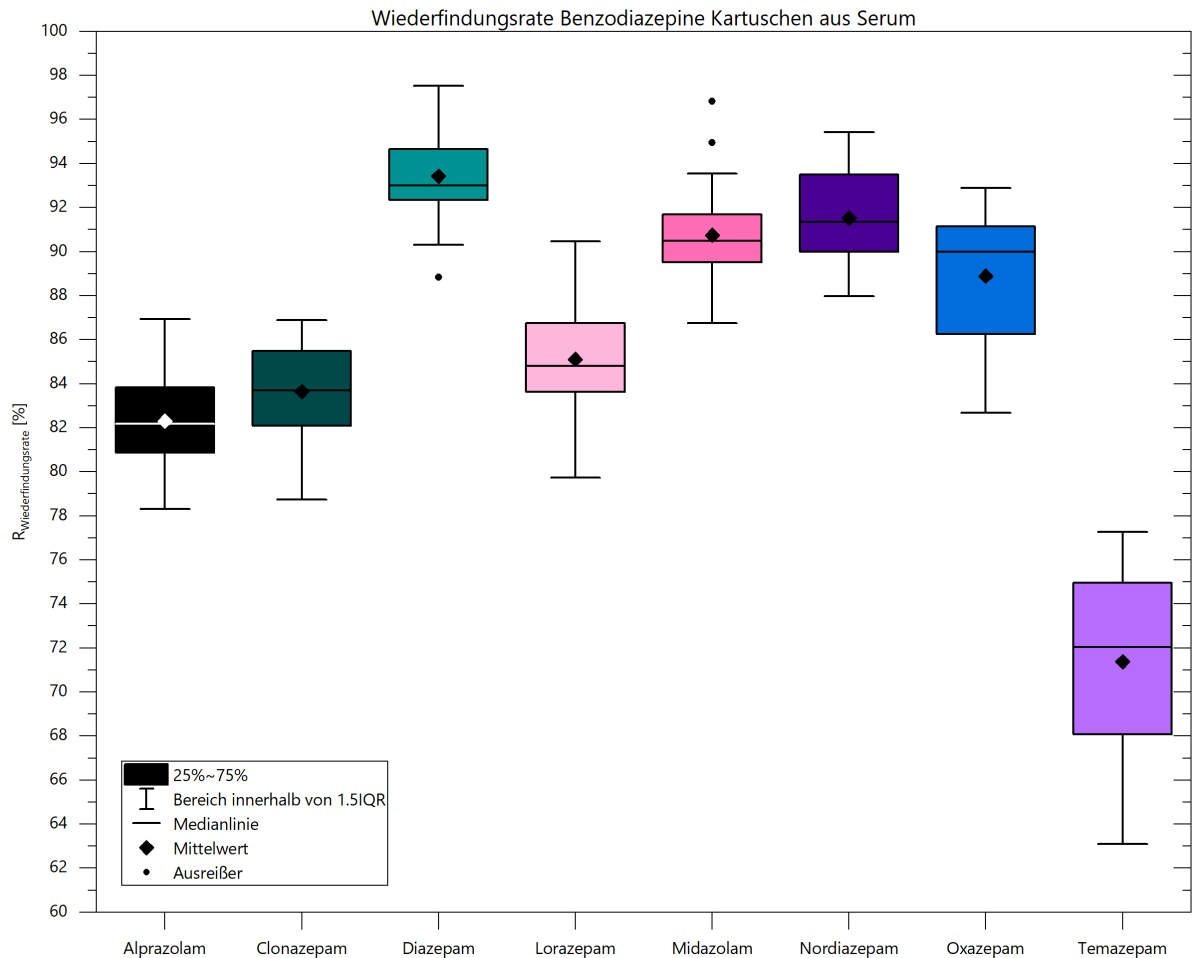


Abbildung 6.13: Wiederfindungsraten Benzodiazepine Kartuschen

Die entwickelten Methoden sind zur Therapieüberwachung geeignet, da die therapeutische Spanne von Benzodiazepinen im Blut zwischen 100–1.000 ng/ml liegt [318, 320, 321]. In einer ähnlichen Probenvorbereitungsmethode [330] liegen die Nachweisgrenzen zwischen 0,3 ng/ml und 11,4 ng/ml und die Bestimmungsgrenzen zwischen 0,8 ng/ml und 38,1 ng/ml und sind somit geringer als die hier bestimmten Grenzen. Dies kann auf die hier nicht durchgeführte Evaporation zurückgeführt werden. Insgesamt sind die in der Literatur berichteten Wiederfindungsraten mit den hier bestimmten Wiederfindungsraten vergleichbar (beispielsweise Temazepam $R=73\%$ in [108]), weisen jedoch auch für einzelne Analyten mit Wiederfindungsraten zwischen 35% und 115% und CVs von bis zu 18% eine hohe Variabilität auf (siehe Tabelle 10.5). Im Vergleich zeigen die hier entwickelten Methoden hohe Wiederfindungsraten für alle Analyten mit $R > 71,38\%$ und mit CVs $< 7\%$ eine hohe Präzision.

6.1.4.3 Ergebnisse der Überprüfung der Wirtschaftlichkeit der Benzodiazepinaufreinigung

Mit dem konfigurierten Automationssystem können mit den Strata X Platten 192 Proben und mit den Strata X Kartuschen 72 Proben in einem Durchlauf vorbereitet werden. Die Unterschiede in den Probenzahlen ergeben sich unter anderem aus der Notwendigkeit der Verwendung spezialisierter Labware, wie dem Stack aus Positive Pressure Rack, Spacer Adapter und Aluminium Rack, zur Bearbeitung der Strata X Kartuschen.

Die Durchlaufzeit mit den Strata X Platten beträgt 4,1 h, während die Durchlaufzeit mit den Strata X Kartuschen aufgrund der zusätzlichen Proteinfällung sowie der Einzelbearbeitung mit dem Span-8 Pod höher ist und 6,15 h beträgt. Für die manuelle Vor- und Nachbereitung der Methode wird ein Zeitaufwand von 0,58 h benötigt. Dies führt zu jährlichen Durchsätzen von 240.000 Proben mit den Strata X Platten und 61.200 Proben mit den Strata X Kartuschen.

Die jährlichen Betriebskosten mit den Strata X Kartuschen betragen 512.515,96 €. Aufgrund des höheren Probendurchsatzes und des folglich höheren Materialverbrauchs sind die Betriebskosten der Aufreinigung mit den Strata X Platten höher und betragen 1.853.613,67 €. Nach der Addition der Kapitalkosten betragen die Gesamtkosten pro Jahr 1.945.826,85 € mit den Strata X Platten und 626.492,67 € mit den Strata X Kartuschen. Zur Berechnung der Kosten pro Probe werden die Gesamtkosten durch den Probendurchsatz dividiert. Die sich ergebenden Kosten pro Probe betragen 8,11 € mit den Strata X Platten und 10,24 € mit den Strata X Kartuschen (siehe Abbildung 6.14).

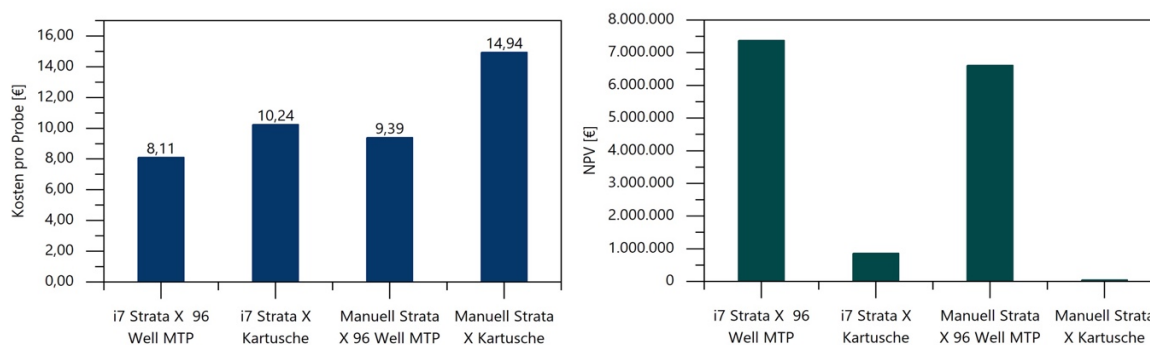


Abbildung 6.14: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzodiazepine: Kosten pro Probe (links) und Kapitalwerte (rechts) für die automatisierte und manuelle Bearbeitung der Strata X Platten und Strata X Kartuschen

Im Vergleich sind die Kosten der manuellen Bearbeitung höher, wobei die Kosten mit den Strata X Platten 9,39 € und mit den Strata X Kartuschen 14,94 € betragen. Dies ist auf den vergleichsweise hohen Personalkostenanteil zurückzuführen, da die Durchlaufzeiten sowie die Probenzahlen ähnlich sind und die Kapitalkosten entfallen.

Die Betriebskosten bei der Bearbeitung der Strata X Platten betragen 2.343.629,80 € mit Personalkosten von 476.320,00 € im Vergleich zu Personalkosten von 58.000 € bei der automatisierten Bearbeitung der Strata X Platten, welche durch die Zeit zur Vor- und Nachbereitung des Decks entstehen. Bei der Bearbeitung der Strata X Kartuschen betragen die Betriebskosten 968.016,35 € mit Personalkosten von 473.760 €, im Vergleich zu Personalkosten von 39.440,00 € bei der automatisierten Bearbeitung der Strata X Kartuschen.

Zur Berechnung des Kapitalwerts werden die Kosten pro Probe mit den auf einer Marktrecherche basierenden Einzahlungen sowie den Investitionskosten zur Berechnung der Zahlungsströme verwendet, welche über eine Dauer von 5 Jahren mit einem Zinssatz von 2,4% (siehe Kapitel 5.2) abgezinst werden. Für die Probenvorbereitung von Benzodiazepinen aus Serumproben werden in dieser Arbeit Einzahlungen von 15,05 € pro Probe angenommen (siehe Tabelle 5.4). Die ermittelten Kapitalwerte sind in allen Durchführungsvarianten positiv, wobei der höchste Kapitalwert bei der automatisierten Bearbeitung der Strata X Platten erzielt wird (siehe Abbildung 6.14). Der Kapitalwert bei der automatisierten Bearbeitung der Strata X Platten beträgt 7.377.483,79 € und bei der manuellen Bearbeitung 6.617.685,90 €. Aufgrund der höheren Kosten pro Probe sind die Kapitalwerte bei der automatisierten und manuellen Bearbeitung der Strata X Kartuschen geringer und betragen 862.936,05 € sowie 42.714,19 €.

Die ebenfalls anhand der Zahlungsströme ermittelte Amortisationsdauer des Automationssystems beträgt mit den Strata X Kartuschen 1,75 Jahre. Mit den Strata X Platten ist die Amortisationsdauer aufgrund der geringeren Kosten pro Probe sowie des höheren jährlichen Probendurchsatzes kürzer und beträgt 0,25 Jahre. Folglich ist das Investitionsrisiko für eine Automatisierung mit den Strata X Platten geringer. Bei der manuellen Bearbeitung der Platten und Kartuschen beträgt die Amortisationsdauer null Jahre, da hier keine Investitionen angenommen werden, wodurch auch kein Investitionsrisiko besteht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Wirtschaftlichkeitsbetrachtung befindet sich in Tabelle 10.18 in Anhang 10.4.5.

6.1.4.4 Ergebnisse der Überprüfung der Nachhaltigkeit der Benzodiazepinaufreinigung

Die verwendeten Strata X Platten und Kartuschen besitzen ein Sorbentbett von 30 mg, weswegen die Labware das Kriterium der Miniaturisierung nicht erfüllt. Miniaturisierte Verfahren erfordern ein Sorbentbett von weniger als 10 mg. Daher wird der Parameter Miniaturisierung und Automatisierung wie folgt eingestuft. Für die automatisierte Durchführung der Probenvorbereitungsmethode wird ein Wert von 0,5 vergeben, da die Methode automatisiert, jedoch nicht miniaturisiert ist. Die manuelle Durchführung der Probenvorbereitung wird mit 0 bewertet, da die Methode weder miniaturisiert noch automatisiert ist (vgl. Abschnitt 5.3).

Das Probenvolumen beträgt bei der Verwendung der Strata X Platten 1 ml und bei den Strata X Kartuschen 200 µl. Die Normalisierung erfolgt entsprechend Gleichung (5.15). Daraus resultieren für die Strata X Platten ein Wert von 0,65, der auf das höhere Probenvolumen zurückzuführen ist, und mit den Strata X Kartuschen ein Wert von 0,88, bedingt durch das geringere Probenvolumen. Beide Werte liegen jedoch über dem Schwellenwert von 0,5 und sind damit umweltfreundlich.

Durch den Einsatz des Automationssystems kann die Anwesenheitszeit im Labor bei der Nutzung der Strata X Platten um 4,1 h (entsprechend der Durchlaufzeit der Methode) und mit den Strata X Kartuschen um 6,15 h gesenkt werden. Die verbleibende Anwesenheitszeit von 0,58 h wird für die Vor- und Nachbereitung der automatisierten Probenvorbereitung benötigt. Dies führt zu einer Verringerung der Anwesenheitszeit im Labor von 88% bis 91% durch den Einsatz des Automationssystems. Im Gegensatz dazu ist bei der manuellen Durchführung keine Reduktion der Anwesenheitszeit im Labor möglich, weshalb die Mitarbeitersicherheit in diesem Fall nicht gesteigert und mit 0% bewertet wird. Die normalisierten Werte der Bewertung der Mitarbeitersicherheit betragen bei der automatisierten Bearbeitung der Strata X Platten 0,88 und bei den Strata X Kartuschen 0,91. Die manuelle Bearbeitung wird mit 0 bewertet.

Mit dem Automationssystem und den Strata X Platten können 192 Proben in 4,1 h vorbereitet werden. Dies entspricht einer Durchlaufzeit pro Probe von 46 Proben/h. Mit dem Automationssystem und den Strata X Kartuschen können 72 Proben in 6,15 h vorbereitet werden. Dies entspricht einer Durchlaufzeit pro Probe von 11 Proben/h. Bei der manuellen Bearbeitung der Strata X Platten können 192 Proben in 4 h und mit den Strata X Kartuschen 72 Proben in 6 h vorbereitet werden. Dies entspricht Durchlaufzeiten pro Probe von 48 bzw. 12 Proben/h. Damit sind die automatisierten und manuellen Durchlaufzeiten pro Probe vergleichbar. Dies spiegelt sich auch in den gemäß Gleichung (5.18) normalisierten Werten von 0,88 und 0,89 für die automatisierte und manuelle Bearbeitung der Strata X Platten sowie 0,53 und 0,55 für die automatisierte und manuelle Bearbeitung der Strata X Kartuschen wider. Da alle normalisierten Werte über 0,5 liegen, werden die Durchlaufzeiten pro Probe als umweltfreundlich gewertet. Gleichzeitig liegen die Durchlaufzeiten pro Probe der Strata X Kartuschen nahe am Grenzbereich, was auf ein Verbesserungspotenzial im Hinblick auf die Prinzipien 8 und 9 der GAC hinweist. In Bezug auf die Energieintensität sind sowohl bei der automatisierten als auch bei der manuellen Bearbeitung die Strata X Platten zu bevorzugen, um die Nachhaltigkeit zu steigern.

Zur Bewertung des Einsatzes schädlicher sowie umweltfreundlicher Lösungsmittel und des Abfallvolumens werden die in der Probenvorbereitungsmethode verwendeten Volumina gemäß den Prozessablaufplänen in Abbildung 6.4 summiert. Zu den schädlichen Lösungsmitteln zählen organische Lösungsmittel, Säuren und Laugen, wie das für die Konditionierung der Platten und Kartuschen verwendete Methanol, das zur Proteinfällung und Elution verwendete Acetonitril, oder der 15-prozentige Methanolanteil im zweiten Waschschrift. Zu den umweltfreundlichen Lösungsmitteln gehört das Wasser, welches zur Equilibrierung der Platten und Kartuschen sowie für den ersten Waschschrift verwendet wird. Zum Abfallvolumen zählen alle Volumina, einschließlich des verwendeten Probenvolumens. Bei den Strata X Platten beträgt das Abfallvolumen 5,6 ml und das Volumen der schädlichen Lösungsmittel 2,04 ml. Bei den Strata X Kartuschen betragen diese Werte 9,6 ml und 2,33 ml.

Die Volumina werden gemäß den Gleichungen (5.16) und (5.19) normalisiert. Für das Abfallvolumen ergibt sich ein Wert von 0,46 mit den Strata X Platten und 0,39 mit den Strata X Kartuschen. Auch der Einsatz schädlicher Lösungsmittel wird in beiden Labwareformaten als eher umweltunfreundlich bewertet und beträgt mit den Strata X Platten 0,48 und mit den Strata X Kartuschen 0,46.

Der gemäß Gleichung (5.20) berechnete Anteil umweltfreundlicher Lösungsmittel beträgt mit den Strata X Platten 46% und normalisiert 0,46. Im Gegensatz dazu beträgt der Anteil umweltfreundlicher Lösungsmittel mit den Strata X Kartuschen 74% und normalisiert 0,74, was auf den höheren Wasseranteil zurückzuführen ist.

Bei der Bewertung der Parameter Plastikabfall und wiederverwendbare Labware wird angenommen, dass die Anzahl der im manuellen Prozess verwendeten Labware der im automatisierten Prozess entspricht, da auch manuell Racks (z.B. für Probenvials) verwendet werden, manuelle Prozesse aber auch stark nutzerabhängig sind (z.B. in Hinblick auf die Art und Anzahl der verwendeten Pipettenspitzen). Aus diesem Grund sind die Parameter Plastikabfall und wiederverwendbare Labware in beiden Prozessen vergleichbar und dienen eher der Bewertung und Unterscheidung zwischen verschiedenen Labwareformaten. Zur Ermittlung des Plastikabfalls wird die im Prozess verwendete Labware gewogen und summiert. Im Fall von Mikrotiterplatten oder den Strata X Platten wird das Gesamtgewicht der Platte bestimmt und der Anteil pro Probe berechnet. Der Plastikabfall beträgt bei den Strata X Platten 34,96 g pro Probe und bei den Strata X Kartuschen 52,14 g pro Probe. Der höhere Plastikabfall der Strata X Kartuschen ist darauf zurückzuführen, dass die einzelnen Kartuschen einen größeren Plastikabfall pro Probe verursachen als die im 96-Well Format angeordneten Strata X Platten. Die entsprechend Gleichung (5.16) normalisierten Werte betragen 0,22 mit den Strata X Platten und 0,16 mit den Strata X Kartuschen. Beide Ergebnisse weisen somit ein deutliches Verbesserungspotenzial auf. Dies gilt auch für den gemäß Gleichung (5.17) berechneten Anteil wiederverwendbarer Labware (z.B. Racks für die Strata X Kartuschen). Dieser ist in beiden Labwareformaten nahezu identisch und beträgt mit den Strata X Kartuschen 19% (normalisiert 0,19) und 18% (normalisiert 0,18) mit den Strata X Platten.

Die Bewertung der Nachhaltigkeit zeigt für die zwei Labformate insgesamt ähnliche Ergebnisse. Der Nachhaltigkeitsindex beträgt für die Strata X Platten 0,52, während der Index für die Strata X Kartuschen 0,53 beträgt. Im Vergleich zur manuellen Durchführung der beiden Aufreinigungsmethoden führt die

Automatisierung zu einer 40-prozentigen Verbesserung der Nachhaltigkeit, da der Schutz der Mitarbeiter durch eine bis zu 91-prozentige Reduktion der Anwesenheit im Labor steigt. Zugleich zeigt die Bewertung der Nachhaltigkeit Verbesserungspotenziale, welche insbesondere in Hinblick auf entstehenden Plastikabfall pro Probe sowie den Anteil wiederverwendbarer Labware bestehen, auf. In Tabelle 6.4 sind die normalisierten Ergebnisse dargestellt. Die nicht normalisierten Ergebnisse befinden sich in Tabelle 10.19 in Anhang 10.4.6.

Tabelle 6.4: Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzodiazepinaufreinigung

Kategorie Nachhaltigkeit	Automatisiert 192 Proben Strata X Platten	Automatisiert 72 Proben Strata X Kartuschen	Manuell 192 Proben Strata X Platten	Manuell 72 Proben Strata X Kartuschen
Miniaturisierung und Automatisierung	0,50	0,50	0,00	0,00
Probenvolumen	0,65	0,88	0,65	0,88
Mitarbeitersicherheit	0,88	0,91	0,00	0,00
Durchlaufzeit pro Probe	0,88	0,53	0,89	0,55
Einsatz schädlicher Lösungsmittel	0,48	0,46	0,48	0,46
Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel	0,46	0,74	0,46	0,74
Abfallvolumen	0,46	0,39	0,46	0,39
Plastikabfall	0,22	0,16	0,22	0,16
Wiederverwendbare Labware	0,19	0,18	0,19	0,18
Nachhaltigkeitsindex	0,52	0,53	0,37	0,37

6.2 Anwendung 2 – Bestimmung von Cannabinoiden

6.2.1 Einführung

In der Pflanze *Cannabis Sativa* (indischer Hanf) kommen über 100 verschiedene Substanzen vor, welche unter der Bezeichnung Cannabinoide zusammengefasst werden [336].

Das zur Gruppe der terpenoiden Benzpyranderivate gehörende Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) ist der wichtigste Vertreter der Cannabinoide und als psychoaktiv wirksame Substanz, die am häufigsten konsumierte Droge weltweit [337]. Δ^9 -THC entsteht bei der Decarboxylierung von der in *Cannabis Sativa* vorkommenden Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A (THCA-A). Es gelangt über die Lungen oder den Verdauungstrakt in das Blut und wird dort an Plasmaproteine gebunden [167]. Die Metabolisierung von Δ^9 -THC erfolgt in der Leber durch Enzyme der P450 Familie zu den zwei Hauptmetaboliten 11-Hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC-OH) und 11-nor-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC-COOH), wobei erstes ebenfalls psychoaktiv wirksam ist [338, 339]. Die Strukturformeln der drei Hauptmetaboliten sind in Abbildung 6.15 dargestellt. Die Ausscheidung von Δ^9 -THC und Metaboliten erfolgt passiv durch Diffusion zum Beispiel in die Schweißdrüsen oder Haarfollikel oder aktiv durch die Glukuronidierung zur Erhöhung der Hydrophilie der Metaboliten in den Nieren und der Leber [167, 179]. Entsprechend des beschriebenen Stoffwechselweges sind Δ^9 -THC und Metaboliten in den Matrices Speichel, Blut, Serum, Plasma, Schweiß, Haaren, Urin und Stuhl nachweisbar.

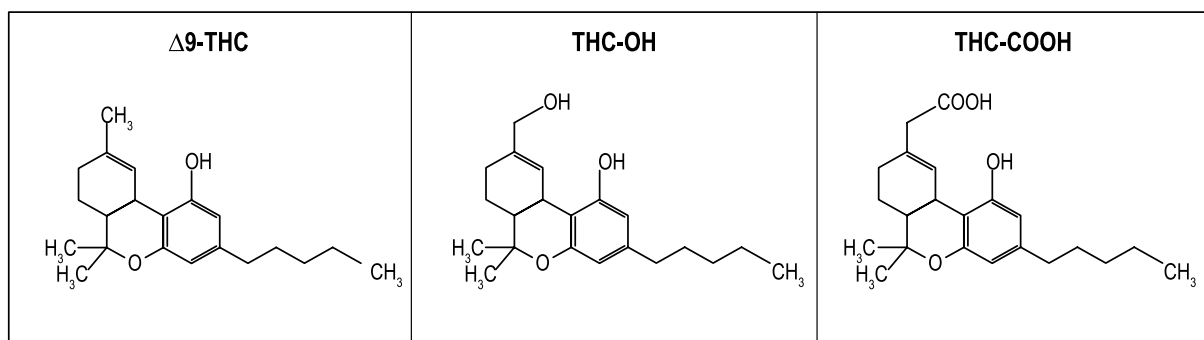


Abbildung 6.15: Strukturformeln von Δ^9 -THC sowie den zwei Hauptmetaboliten THC-OH und THC-COOH

Neben der missbräuchlichen Verwendung als Droge werden Cannabinoide aufgrund ihrer analgetisierenden, antiemetischen und antikonvulsiven Eigenschaften auch zunehmend in der Krebs- und Schmerztherapie eingesetzt [81]. Zudem wird die modulierende Wirkung der Cannabinoide auf Immunzellen in Hinblick auf mögliche Anwendungen zur Behandlung von neurodegenerativen und Autoimmunerkrankungen erforscht [340-342].

Die therapeutische Konzentration von Δ^9 -THC in Blutplasma beträgt ca. 5–10 ng/ml mit einer Halbwertszeit von ca. 30 Minuten [343-345]. Neben Δ^9 -THC ist hauptsächlich THC-COOH im Plasma nachweisbar. THC-OH ist ebenso wie Δ^9 -THC lipophil, weswegen beide Metaboliten eine hohe Gewebegängigkeit besitzen, im Fettgewebe gespeichert und schrittweise wieder freigesetzt werden. Die schrittweise Wiederfreisetzung führt bei einer entsprechend gespeicherten Menge durch wiederholte Einnahme zu der langen Nachweisbarkeit eines vorangegangenen Cannabiskonsums [73, 346, 347].

In Speichel kann die Δ 9-THC-Konzentration bis zu 1.000 ng/ml kurz nach der Inhalation einer Cannabis Zigarette betragen [348], wohingegen die Metaboliten THC-OH und THC-COOH nur in sehr geringen Mengen (< 0,5 ng/ml) durch die Schleimhäute in den Speichel gelangen [349, 350].

In Urin und Stuhl ist bei chronischem Konsum eine Nachweisbarkeit der Analyten von mehr als 30 Tagen möglich. Der Hauptteil der Ausscheidung der gebildeten Metaboliten erfolgt innerhalb der ersten 5 Tage nach dem Konsum zu 65 Prozent in Form von THC-OH über den Stuhl und zu 20 Prozent in Form von THC-COOH über den Urin. Bei einmaliger Einnahme sind Δ 9-THC und Metaboliten ca. drei Tage im Urin nachweisbar [347, 351, 352]. Im Haar sind die Analyten bei Ausschluss von Manipulationen, wie zum Beispiel durch das Färben des Haares, praktisch unbegrenzt lange nachweisbar, da nach Einbau des Analyten in die Haarmatrix und nach Verlassen des Haarfollikels der Metabolismus endet [324, 353].

Für die Aufreinigung von Serum, Plasma, Vollblutproben, Urin und Speichel zur Bestimmung von Δ 9-THC und Metaboliten werden am häufigsten die SPE [23, 32, 160, 350, 354-359], die LLE [78, 329, 360-365] und die vereinfachte Flüssig-Flüssig-Extraktion (Simplified Liquid Extraction, SLE) verwendet [366-369]. Aber auch Mikroextraktionstechniken wie die SPME [370], die MEPS aus Urin [371] oder die PT- μ SPE [109] werden zur Aufreinigung von Cannabinoiden aus biologischen Matrices eingesetzt [372]. Aufgrund des hohen Proteingehalts in Serum, Plasma und Vollblutproben wird vor der SPE häufig eine zusätzliche Proteinfällung durchgeführt [179, 373-376].

Im Gegensatz dazu erfordern die im Urin vorliegenden glukuronierten Cannabinoide die Vorschaltung einer Hydrolyse zur Brechung der Bindung zwischen Glukuronid-Konjugat und Analyt (siehe Abschnitt 2.1.3.2) [73, 75, 78, 355, 377-379]. Zur Erhöhung der generellen Sensitivität werden die Proben mittels Evaporation aufkonzentriert, was insbesondere bei der Analyse mittels LC-MS/MS-ESI+ für THC-COOH von Bedeutung ist [26, 74, 160, 350, 357, 358, 380]. Die LC-MS/MS wird zur messtechnischen Bestimmung von Cannabinoiden am häufigsten eingesetzt [355, 362, 381]. Weitere Bestimmungsmethoden sind die LC-MS [373], die GC-MS [338] sowie die GC-MS/MS [382].

Es existieren zahlreiche manuelle Probenvorbereitungsmethoden [111, 160, 179, 350, 356, 359, 364, 365, 367, 375-377, 382-386]. Ferreirós et al. stellen eine sensitive, schnelle, manuelle Methode zur Bestimmung von Δ 9-THC, THC-OH und THC-COOH aus Plasma vor. Vor der Extraktion mit C18 Kartuschen, wird den Plasmaproben ein interner Standard sowie eine Methanol-Essigsäure-Lösung hinzugefügt. Nach der Extraktion werden die Proben aufkonzentriert und mittels LC-MS/MS bestimmt. Die Verwendung eines geringen Probenvolumens ermöglicht die niedrige Bestimmungsgrenze von 0,05 ng/ml für Δ 9-THC und THC-COOH sowie 0,2 ng/ml für THC-OH [179].

In halbautomatischen Methoden wird ein Teil der Probenvorbereitung automatisiert durchgeführt, wie beispielsweise die SPE [32, 78, 387], wohingegen andere Schritte, wie die Verdünnung der Proben [26, 357, 358], die Proteinfällung bei Serumproben vor der online-SPE [344] oder die Evaporation weiterhin manuell durchgeführt werden [354]. Zur automatisierten Durchführung der SPE wird u.a. den Gilson ASPEC (Middleton, USA) oder den Zymark Rapid Trace (Hopkington, USA) verwendet. Ein Beispiel für eine halbautomatische Methode ist die Bestimmung von Δ 9-THC und THC-COOH aus Speichel mittels GC-MS und automatisierter SPE von Choi et al. Für die Automatisierung der SPE wird der Zymark Rapid Trace eingesetzt. Die Zugabe des internen Standards, die Evaporation und Derivatisierung werden

manuell durchgeführt. Die experimentell ermittelten Bestimmungsgrenzen betragen für Δ^9 -THC und THC-COOH 2 ng/ml. Die Wiederfindungsraten sind für Δ^9 -THC und THC-COOH größer als 65% und 79% [26].

Bei den wenigen, vollständig automatisierten Methoden werden alle Probenvorbereitungsschritte, inklusive der Proteinfällung, der Zentrifugation, der Hydrolyse, der SLE oder SPE und der Evaporation, vollständig automatisiert durchgeführt. Die Automatisierung erfolgt mithilfe der Tecan Freedom EVO Workstation (Männedorf, CHE) [329, 366, 369, 373, 380]. Cattell et al. stellten kürzlich eine vollständig automatisierte Methode zur Bestimmung von Δ^9 -THC und THC-COOH aus Blutproben mit einer Liquid-Handling-Workstation (Hamilton, Reno, USA) vor. Nach der Zugabe des internen Standards, einer Zell-Lyse-Lösung und einem Mischungsschritt durch die Liquid-Handling-Workstation wurde eine Proteinfällung mithilfe spezieller PPT-Fällungsplatten (Waters, Milford, USA) sowie eine SPE mit den C18-Mikroelutionsplatten (Hamilton, Reno, USA) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels LC-MS/MS. Die Bestimmungsgrenzen für Δ^9 -THC und THC-COOH betragen 1 ng/ml sowie 5 ng/ml [388].

In Tabelle 10.20 bis Tabelle 10.22 im Anhang befindet sich eine Übersicht ausgewählter manueller, halbautomatischer und automatischer Probenvorbereitungsmethoden zur Bestimmung von Cannabinoiden aus Serum, Plasma, Blut, Urin und Speichel.

6.2.2 Prozessanalyse und Systemanforderungen

Zur Aufreinigung von Cannabinoiden aus Serum, Urin und Speichel wird die am häufigsten genutzte Probenvorbereitungstechnik SPE mit dem starken Kationenaustausch-Umkehrphase Polymer Strata X-C (Phenomenex, Torrance, USA) gewählt [389]. Zur Grobreinigung der Serum- und Urinproben wird eine PPT bzw. eine Hydrolyse entsprechend den Herstellerempfehlungen eingesetzt. Bei Speichelproben ist keine Grobreinigung notwendig [390]. Zur Reduzierung des Probenvorbereitungsaufwands¹³ durch einen zusätzlichen Aufkonzentrationsschritt werden die Strata X-C μ Elutionsplatten eingesetzt. Das geringe Sorbentbettvolumen von 2 mg in den μ Elutionsplatten ermöglicht die Verwendung sehr geringer Elutionsvolumina von bis zu 25 μ l, wodurch bei Probenaufgabevolumina von bis zu 750 μ l ein Aufkonzentrationsfaktor von 30 erzielt werden kann, was den sensitiven Nachweis von Xenobiotika aus biologischen Matrices ohne Zusatzaufwand durch einen zusätzlichen Aufkonzentrationsschritt ermöglicht. Die zu automatisierende und optimierende Probenvorbereitungsmethode besteht aus einer Proteinfällung bei den Serumproben, einer enzymatischen, basischen oder sauren Hydrolyse bei den Urinproben sowie bei allen Matrices aus einer zur Feinreinigung genutzten SPE. Die SPE besteht aus einem Konditionierungsschritt mit 200 μ l Methanol, einem Equilibrierungsschritt mit 200 μ l Wasser, einem Probenaufgabeschritt zwischen 25 μ l bis 750 μ l, zwei Waschschritten mit je 200 μ l 0,1 N Essigsäure und 30% Acetonitril in 0,1 N Essigsäure sowie einem Elutionsschritt mit 25 μ l 2% Essigsäure in Acetonitril (siehe Abbildung 6.16)[389, 390]. Die Analyse erfolgt mittels LC-MS (siehe Anhang 10.5.2).

¹³ Die Aufkonzentration wird i.d.R. mittels eines warmen Stickstoffstroms (ca. 40°C), welcher oberflächennah auf die Probe gerichtet wird und mit zunehmender Probenreduktion eine Nachjustierung der Höhe des Strahls erfordert, erzielt ([109, 363, 375] und vgl. Tabelle 8.16 bis Tabelle 8.18). Die eingedampfte Probe wird im Anschluss in einem an die mobile Phase angepassten Lösungsmittel rekonstituiert. Dieser Prozess ist jedoch zeitaufwendig und dementsprechend kostenintensiv.

Die zu automatisierenden Probenvorbereitungsmethoden werden in Hinblick auf die Sensitivität und Wiederfindungsraten optimiert.

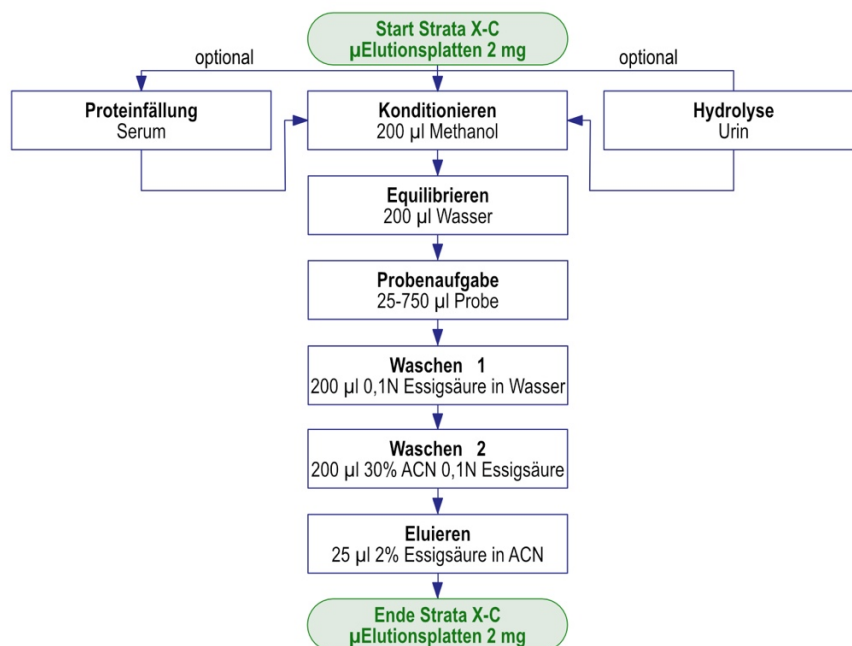


Abbildung 6.16: Ausgangspunkt Methodenentwicklung Cannabinoide

Die optimierte Probenvorbereitungsmethode zur Extraktion von Cannabinoiden aus Serumproben beginnt mit der Proteinfällung durch die Zugabe von 500 μl Methanol, 200 μl Zinksulfat sowie 50 μl internem Standard zu 200 μl Probe (siehe Abbildung 6.17, links). Nach der Durchmischung und dem Schütteln werden 400 μl des Überstands auf die mit 200 μl Methanol und 200 μl Wasser konditionierten und equilibrierten Platten gegeben. Nach zwei Waschrufen mit je 200 μl 0,1 N Essigsäure und 0,1 N Essigsäure in 30% Acetonitril folgt eine 10-minütige Trocknungszeit vor der Elution mit 25 μl 2% Essigsäure in Acetonitril. Zur Erhöhung der Wiederfindungsrate wurde der Elutionsvorgang wiederholt. Vor der Analyse mittels LC-MS erfolgt eine Anpassung an die mobile Phase durch die Zugabe von 50 μl Wasser.

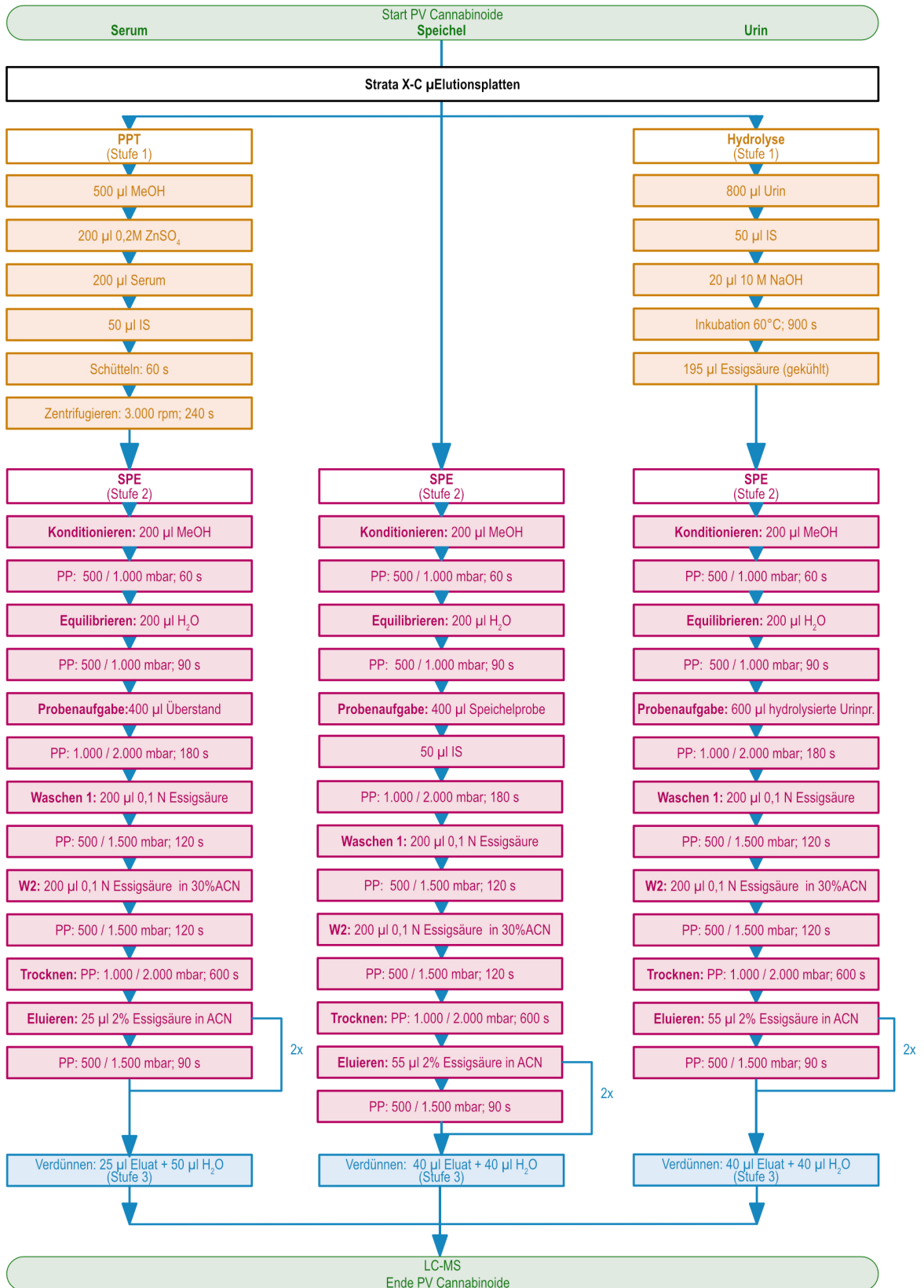


Abbildung 6.17: Prozessablaufplan Bestimmung von Cannabinoiden aus Serum, Urin und Speichel¹⁴

Die Aufreinigung der Cannabinoide aus Urin beginnt mit der basischen Hydrolyse der Probe durch die Zugabe von 20 μl 10 M Natriumhydroxid (NaOH) sowie 50 μl des internen Standards (siehe Abbildung 6.17, rechts). Im Anschluss an die 15-minütige Inkubationszeit bei 60°C wird die Reaktion durch die Zugabe von 195 μl gekühlter Essigsäure gestoppt. Bei der sich anschließenden μSPE beträgt das Probenaufgabevolumen 600 μl . Die Elution erfolgt mit einem Volumen von 2x 55 μl 2% Essigsäure in Acetonitril und die Anpassung an die mobile Phase mit 40 μl Wasser. Bei der Verwendung der weniger komplexen Speichelmatrix wird die Probenvorbereitungsmethode auf die μSPE verkürzt (Stufe 2 des PV-Prozesses) und in Analogie zu den Urinproben durchgeführt (siehe Abbildung 6.17, Mitte).

Die Serum-, Urin- und Speichelproben werden aus Eppendorf Vials entnommen. Die Proteinfällung wird in 1,5 ml Standard Vials durchgeführt. Die Standardlösung wird in 1,5 ml Standard Vials im Kühlschrank gelagert. Die Hydrolyse wird in einer 48-Well-MTP mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 ml durchgeführt. Für den Lösungsmitteltransfer werden Einweg-Pipettenspitzen verwendet. Die eluierten Proben werden in 1,5 ml Standard Vials mit Inserts im Autosampler der nachfolgenden LC-MS Analyse bereitgestellt. Für die Methoden werden eine Zentrifuge, ein Inkubator, ein Vortexer und ein 96-Well Platten-Manifold (z.B. Preston 100, siehe Herstellerempfehlungen) benötigt. Da das Ziel die optimierte, automatisierte Durchführung der Cannabinoidextraktion ist, werden auch im manuellen Prozess bereits die für die Automatisierung vorgesehenen Geräte eingesetzt, um Methodenparameter wie Druck und Zeit einzustellen. In den Prozessanalysen in Tabelle 6.5 bis Tabelle 6.7 werden zur Ableitung der Anforderungen an das Automationssystem die in klassischen manuellen Prozessen eingesetzten Geräte betrachtet.

Tabelle 6.5: Prozessanalyse Cannabinoidextraktion aus Serum Strata X-C μ Elutionsplatten manuell

Beschreibung Prozessschritt	Ausgangslabware	Ziellabware	Manueller Prozess	Anforderung Automationssystem
Transfer der Fällungsreagenzien (500 μ l MeOH, 200 μ l ZnSO ₄)	Lösungsmittelflaschen	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer, Öffnen u. Schließen der Flasche	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials auf dem Deck Bereitstellung Lösungsmittel, Reduktion der Evaporation
Transfer der Serumprobe (200 μ l)	Eppendorf Vial	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Eppendorf Vials auf dem Deck
Transfer des internen Standards (50 μ l)	1,5 ml Standard Vial	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer, Anschrägen der Labware, Lagerung des Standards in Kühlschrank	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial auf dem Deck Automatisierung des Kippprozesses der Vials Kühlung/Temperieren 1,5 ml Standard Vials
Homogenisieren	-	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transport, Vortexer	Automatisierung des Transports Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials (schüttelbar) Homogenisieren
Zentrifugieren	-	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transport, Zentrifuge	Automatisierung des Transports Zentrifugieren Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials (zentrifugierbar)
Konditionieren: 200 μ l Methanol	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Equilibrierung: 200 μ l H ₂ O	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Probenaufgabe: 400 μ l Überstand	1,5 ml Standard Vial	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Waschen 1: 200 μ l 0,1 N Essigsäure	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Waschen 2: 200 μ l 0,1 N Essigsäure in 30% ACN	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Eluieren: 2x 25 μ l 2% Essigsäure in ACN	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte 96-Deepwellplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Transfer des Eluats in 1,5 ml Standard Vial für Autosampler, Normalisierung des Volumens (25 μ l)	96-Deepwellplatte	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials
Anpassung an mobile Phase (50 μ l)	Lösungsmittelflasche	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials

Tabelle 6.6: Prozessanalyse Cannabinoidextraktion aus Urin Strata X-C μ Elutionsplatten manuell

Beschreibung Prozessschritt	Ausgangslabware	Ziellabware	Manueller Prozess	Anforderung Automationssystem
Transfer der Urinprobe (800 μ l)	Eppendorf Vial	48-Well Platte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Eppendorf Vials auf dem Deck
Transfer des internen Standards (50 μ l IS)	1,5 ml Standard Vial	48-Well Platte	Manueller Transfer, Anschlägen der Labware, Lagerung des Standards in Kühlschrank	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial auf dem Deck Automatisierung des Kippprozesses der Vials Kühlung/Temperieren 1,5 ml Standard Vials
Transfer des 1. Hydrolysereagens ¹ (20 μ l NaOH)	Lösungsmittelflasche	48-Well Platte	Manueller Transfer, Öffnen u. Schließen der Flasche	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel, Reduktion der Evaporation
Inkubieren	-	48-Well Platte	Manueller Transport, Inkubator	Automatisierung des Transports Inkubieren (kompatibel mit Inkubator)
Transfer des 2. Hydrolysereagens ² (195 μ l HAC)	Lösungsmittelflasche	48-Well Platte	Manueller Transfer, Öffnen u. Schließen der Flasche	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel, Reduktion der Evaporation
Konditionieren: 200 μ l Methanol	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Equilibrierung: 200 μ l H ₂ O	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Probenaufgabe: 600 μ l hydrolys. Probe	48-Well Platte	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Waschen 1: 200 μ l 0,1 N Essigsäure	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Waschen 2: 200 μ l 0,1 N Essigsäure in 30% ACN	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Eluieren: 2x 55 μ l 2% Essigsäure in ACN	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte 96-Deepwellplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Transfer des Eluats in 1,5 ml Standard Vial für Autosampler, Normalisierung des Volumens (40 μ l)	96-Deepwellplatte	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials
Anpassung an mobile Phase (40 μ l H ₂ O)	Lösungsmittelflasche	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials

Tabelle 6.7: Prozessanalyse Cannabinoidextraktion aus Speichel Strata X-C μ Elutionsplatten manuell

Beschreibung Prozessschritt	Ausgangslabware	Ziellabware	Manueller Prozess	Anforderung Automationssystem
Konditionieren: 200 μ l Methanol	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer, Öffnen und Schließen der Flasche	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel, Reduktion der Evaporation
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Equilibrierung: 200 μ l H ₂ O	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Probenaufgabe: 400 μ l Speichel Probe	Eppendorf Vial	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Eppendorf Vials auf dem Deck
Transfer des internen Standards (50 μ l IS)	1,5 ml Standard Vial	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer, Anschragen der Labware, Lagerung des Standards in Kühlschranks	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial auf dem Deck Automatisierung des Kippprozesses der Vials Kühlung/Temperieren 1,5 ml Standard Vials
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Waschen 1: 200 μ l 0,1 N Essigsäure	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Waschen 2: 200 μ l 0,1 N Essigsäure in 30% ACN	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Eluieren: 2x 55 μ l 2% Essigsäure in ACN	Lösungsmittelflasche	Strata X-C μ Elutionsplatte 96-Deepwellplatte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Druckaufgabe	-	Strata X-C μ Elutionsplatte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Transfer des Eluats in 1,5 ml Standard Vial für Autosampler, Normalisierung des Volumens (40 μ l)	96-Deepwellplatte	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials
Anpassung an mobile Phase (40 μ l H ₂ O)	Lösungsmittelflasche	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials

Die Analyse der Cannabinoidaufreinigungsprozesse zeigt, dass ebenso wie bei der Benzodiazepinaufreinigung die wesentlichen Anforderungen an das Automationssystem in der Übernahme der manuell durchgeführten Transfer- und Transportschritte, der Zusammenführung aller Funktionalitäten für einen ununterbrochenen Prozessablauf (Integration aller Zusatzgeräte), der Bereitstellung der Lösungsmittel im System sowie der Ermöglichung der Bearbeitung der aus manuellen Prozessen stammenden Gefäße und Labware durch die Entwicklung spezieller Racks bestehen.

6.2.3 Anforderungsanalyse und Systemrealisierung

Die aus der Prozessanalyse stammenden Anforderungen an das Automationssystem sowie die automatisierten Lösungen sind in Tabelle 6.8 zusammengefasst. Die Anforderungen 1, 2, 4 sowie 7–11 sind durch das allgemeingültige Automationssystem erfüllt. Zur Realisierung der Anforderungen 3, 5 und 6 werden spezielle Racks benötigt.

Anforderung 1 wird durch die Grundkonfiguration der Biomek i7 Workstation erfüllt. Für den Transfer der Lösungsmittel und Proben werden Einweg-Pipettenspitzen in den Größen 90 µl, 230 µl und 1.070 µl eingesetzt. Die für die Methode benötigten Lösungsmittel (Anforderung 2) werden im Self-Refilling Quarter Reservoir und einem zusätzlichen Quarter Reservoir auf dem Deck der Biomek i7 Workstation bereitgestellt. Das maximal benötigte Volumen beträgt 67,2 ml Methanol. Zur Bereitstellung der Serum-, Urin- und Speichelproben in 1,5 ml Eppendorf Vials wird ein spezielles Rack benötigt. Dies wird durch das 25-Well Eppendorf Vial Rack realisiert (Anforderung 3, Abbildung 6.5). Die Filtration der Platten wird mit der Positive Pressure Unit realisiert (Anforderung 4). Zur Kühlung des internen Standards ist ein zusätzliches Rack erforderlich. Die Realisierung erfolgt mit dem entwickelten kühlbaren Aluminium Rack sowie der integrierten Peltier Temperierposition (Anforderung 5 und 9, Abbildung 6.6). Zur Proteinfällung werden die 1,5 ml Standard-Vials in einem speziell entwickelten zentrifugations- und schüttelgeeigneten Rack bereitgestellt (Anforderung 6, Abbildung 6.7). Die Durchmischung der Proben mit dem Fällungsreagenz und die Zentrifugation erfolgt mit der integrierten Peltier Temperier- und Schüttelposition und der VSpin Zentrifuge (Anforderung 7 und 8). Der integrierte Inkubator wird für die Hydrolyse der Urinproben bei 60°C genutzt. Für die Hydrolyse werden die Proben in einer 48-Well-MTP bereitgestellt und durch das Automationssystem im Inkubator platziert (Anforderung 10). Zur vollständigen Entnahme der wertvollen Standardlösungen aus den mit konkaven Böden versehenen 1,5 ml Standard Vials wird die Labware angeschrägt. Der automatisierte Kippprozess wird mit dem Zusatzgerät 3D-Tilting ALP realisiert (Anforderung 11). Bei der Extraktion der Cannabinoide aus Urin und Speichel wird die Entnahme des Standards durch den Einsatz von 1,5 ml High Recovery Vials vereinfacht.

Mit dem entwickelten allgemeingültigen Automationssystem können bis zu 96 Serum-, Urin- oder Speichelproben in einem Durchlauf vorbereitet werden. Die Decklayouts sind in Abbildung 6.18 bis Abbildung 6.20 dargestellt.

Die tabellarischen Prozessablaufpläne, die Materialverzeichnisse mit den eingesetzten Reagenzien, der Labware und den Geräten sind in Tabelle 10.23 bis Tabelle 10.28 in Anhang 10.5.1 zusammengefasst. Zur selektiven und sensitiven messtechnischen Bestimmung von Δ^9 -THC-D₃, THC-OH und THC-COOH wird ein LC-QTOF-MS System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) eingesetzt. Die Methodenparameter befinden sich in Anhang 10.5.2.

Tabelle 6.8: Überprüfung der Anforderungen an das Automationssystem für die Cannabinoidextraktion

Nr.	Anforderung	Erfüllt durch allgemeingültiges Automationssystem?	Lösung:	Zusatzmodul/ spezialisierte Labware	Erfüllt durch allgemeingültiges Automationssystem mit Speziallabware?
1	Automatisierung des Transfers und des Transports	✓	Biomek i7 Workstation		✓
2	Bereitstellung der Lösungsmittel	✓	Self-Refilling Quarter Reservoir		✓
3	Bereitstellung Eppendorf Vials auf dem Deck	X	Entwicklung Rack Eppendorf Vials inklusive Befestigung der Schnapdeckel		✓
4	Druckaufgabe	✓	Positive Pressure Unit		✓
5	Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial kühlgeeignet	X	Entwicklung Rack für 1,5 ml Standard Vials		✓
6	Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial, zentrifugationsgeeignet, schüttelgeeignet	X	Entwicklung Rack für Zentrifugation		✓
7	Homogenisieren	✓	Shaking Peltier ALP		✓
8	Zentrifugieren	✓	VSpin Zentrifuge		✓
9	Temperieren	✓	Static Peltier ALP		✓
10	Inkubieren	✓	Inkubator		✓
11	Automatisierung des Kippprozesses von Vials	✓	3D-Tilting ALP Einsatz 1,5 ml High Recovery Vial		✓

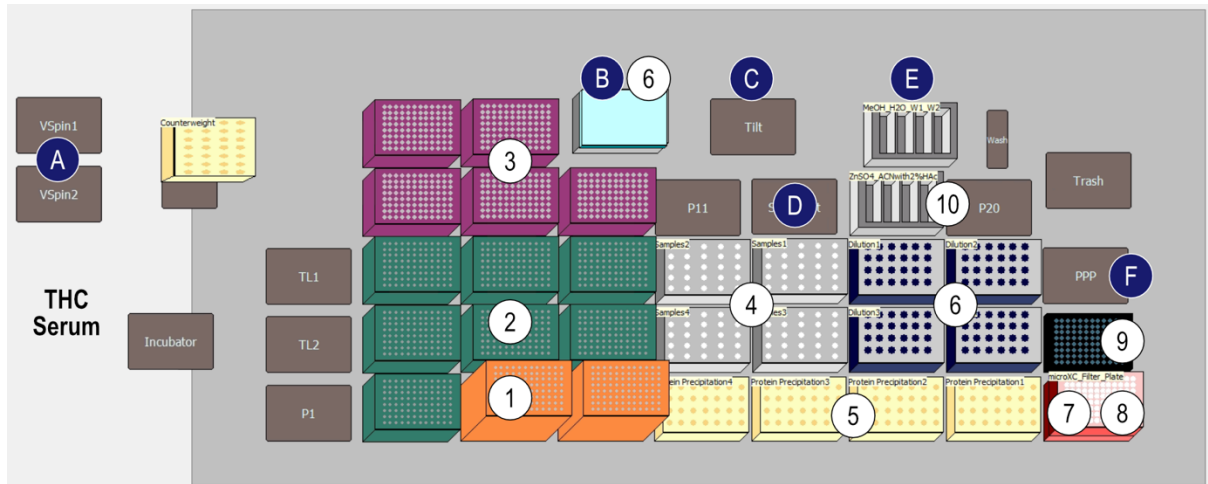


Abbildung 6.18: Decklayout THC aus Serum für bis zu 96 Proben

(A) Zentrifuge; (B) Temperier Position; (C) 3D-Tilting ALP; (D) Shaker; (E) Self-Refilling Quarter Reservoir; (F) Positive Pressure Unit

(1) 1.070 µl Pipettenspitzen; (2) 230 µl Pipettenspitzen; (3) 90 µl Pipettenspitzen; (4) Eppendorf Vial Rack; (5) Rack 1.5 ml Standard Vials, (6) Aluminium Rack; (7) 96-Well Elutionsplatte, 350 µl; (8) Strata X-C 96-Well µElutionsplatte (2 mg); (9) 96-Well-MTP, 200 µl; (10) Quarter Reservoir

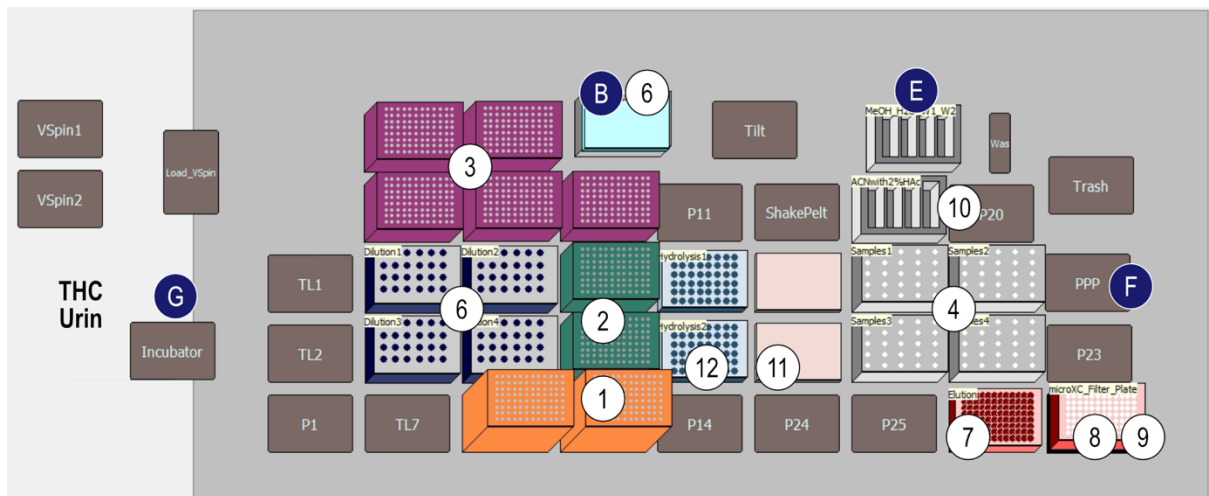


Abbildung 6.19: Decklayout THC aus Urin für bis zu 96 Proben

(B) Temperier Position; Self-Refilling Quarter Reservoir; (F) Positive Pressure Unit; (G) Inkubator

(1) 1.070 µl Pipettenspitzen; (2) 230 µl Pipettenspitzen; (3) 90 µl Pipettenspitzen; (4) Eppendorf Vial Rack; (6) Aluminium Rack; (7) 96-Well Elutionsplatte, 350 µl; (8) Strata X-C 96-Well µElutionsplatte (2 mg); (9) 96-Well-MTP, 200 µl; (10) Quarter Reservoir; (11) Lid; (12) Platte Hydrolyse 48-Wells, 1,5 ml

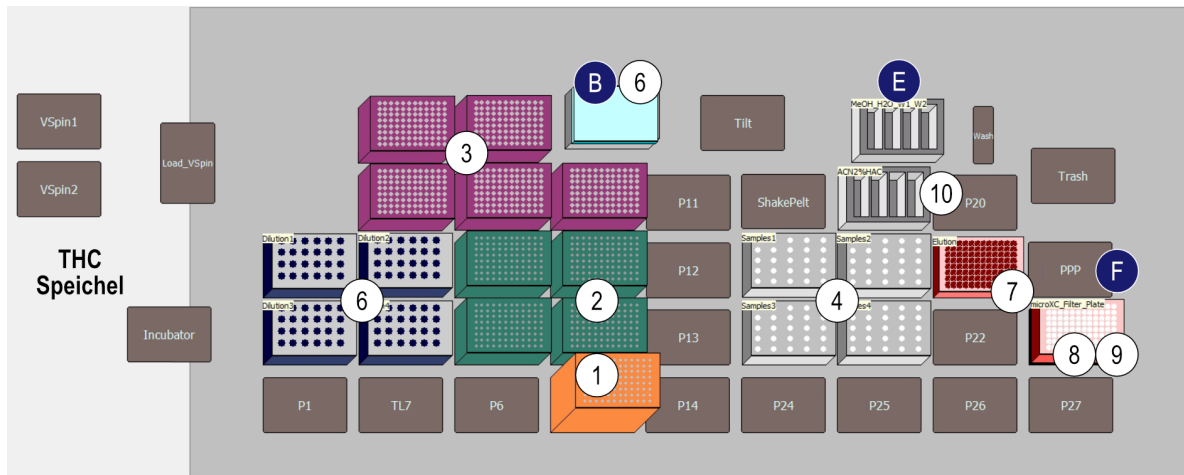


Abbildung 6.20: Decklayout THC aus Speicher für bis zu 96 Proben

(B) Temperier Position; (E) Self-Refilling Quarter Reservoir; (F) Positive Pressure Unit;

(1) 1.070 μ l Pipettenspitzen; (2) 230 μ l Pipettenspitzen; (3) 90 μ l Pipettenspitzen; (4) Eppendorf Vial Rack; (6) Aluminium Rack;

(7) 96-Well Elutionsplatte, 350 μ l; (8) Strata X-C 96-Well μ Elutionsplatte (2 mg); (9) 96-Well-MTP, 200 μ l; (10) Quarter Reservoir

6.2.4 Systemüberprüfung – Bestimmung von Cannabinoiden

6.2.4.1 Ergebnisse der Validierung der Extraktion von Δ^9 -THC-D₃, THC-OH, THC-COOH aus Serum

Die Wiederfindungsraten der automatisierten, miniaturisierten Extraktion von Δ^9 -THC-D₃, THC-OH und THC-COOH aus Serum liegen zwischen 96,41% und 104,15% mit CVs zwischen 0,52% und 1,51% (siehe Abbildung 6.21). Zur Ermittlung der Wiederfindungsraten werden 25 Proben vorbereitet und gemessen. Die Wiederfindungsraten, die im Rahmen der laborinternen Vergleichspräzision ermittelt wurden, liegen im Mittel zwischen 94,28% und 103,11% mit CVs zwischen 0,44% und 3,11% und bestätigen somit die zuvor ermittelten Wiederfindungsraten (siehe Abbildung 10.10). Die experimentell ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Extraktion von Cannabinoiden betragen 0,087 ng/ml und 0,099 ng/ml für Δ^9 -THC-D₃, 0,196 ng/ml und 0,215 ng/ml für THC-OH und 0,503 ng/ml und 0,554 ng/ml für THC-COOH. Die probenvorbereitenden Maßnahmen führen zu Änderungen der methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Der Einsatz der Proteinfällung führt zu einer Verdünnung, während die eingesetzte SPE zu einer Aufkonzentration der Proben führt. Die methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen betragen 0,156 ng/ml und 0,176 ng/ml für Δ^9 -TH-D₃, 0,349 ng/ml und 0,384 ng/ml für THC-OH sowie 0,896 ng/ml und 0,987 ng/ml für THC-COOH mit einem Verdünnungsfaktor von 0,56. Die Variationskoeffizienten der Messpräzision des LC-MS Systems sind für alle Analyten kleiner als 0,52% (siehe Abbildung 10.9). Die Validierungsergebnisse der Extraktion von Cannabinoiden aus Serum sind in Tabelle 10.30 zusammengefasst [288].

6.2.4.2 Ergebnisse der Validierung der Extraktion von Δ^9 -THC-D₃, THC-OH, THC-COOH aus Urin

Die Wiederfindungsraten der automatisierten Aufreinigung von Δ^9 -THC-D₃, THC-OH und THC-COOH aus Urin liegen zwischen 77,54% und 94,53% mit CVs zwischen 1,85% und 3,64% (siehe Abbildung 6.21) und sind im Mittel mit 83,86%, 91,09% und 83,54% für Δ^9 -THC-D₃, THC-OH und THC-COOH geringer als die mittleren Wiederfindungsraten der Extraktion aus Serum mit 101,21%, 99,54% und 100,65% für Δ^9 -THC-D₃, THC-OH und THC-COOH. Die im Rahmen der laborinternen Vergleichspräzision bestimmten mittleren Wiederfindungsraten liegen zwischen 77,85% und 99,64% mit CVs zwischen 1,03% und 3,89% (siehe Abbildung 10.12). Die geringeren Wiederfindungsraten könnten beispielsweise auf eine unvollständige Hydrolyse oder auf eine verminderte Stabilität der Analyten infolge der pH-Wert Änderungen zurückzuführen sein, die durch während der Hydrolyse eingebrachte Substanzen verursacht wurden [350]. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen betragen 0,081 ng/ml und 0,228 ng/ml, 0,232 ng/ml und 0,571 ng/ml sowie 0,482 ng/ml und 1,089 ng/ml für Δ^9 -THC-D₃, THC-OH und THC-COOH. Im Rahmen der SPE wird durch das hohe Aufgabevolumen der hydrolysierten Probe im Beladungsschritt und das geringe Elutionsvolumen eine Aufkonzentration erzielt, wodurch die methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aus Urin auf 0,04 ng/ml und 0,111 ng/ml für Δ^9 -THC-D₃, auf 0,113 ng/ml und 0,279 ng/ml für THC-OH sowie auf 0,235 ng/ml und 0,531 ng/ml für THC-COOH sinken (VF=2,04). Die Variationskoeffizienten der Messpräzision sind bei der Extraktion der Cannabinoide aus Urin geringer als 1,59% (siehe Abbildung 10.11). Die Validierungsergebnisse sind in Tabelle 10.31 zusammengefasst [288].

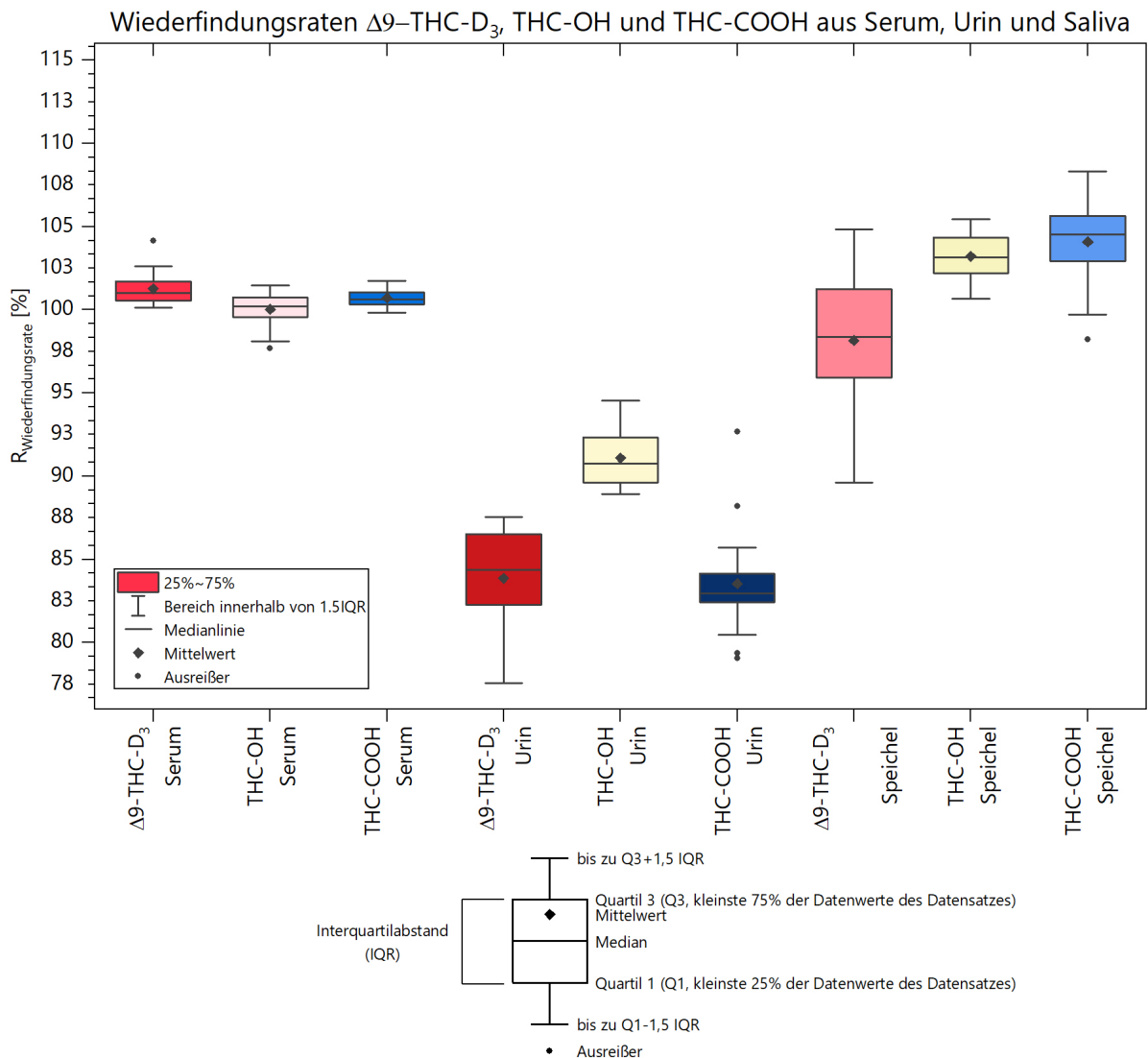


Abbildung 6.21: Wiederfindungsraten Cannabinoide aus Serum, Urin und Speichel

6.2.4.3 Ergebnisse der Validierung der Extraktion von $\Delta 9$ -THC- D_3 , THC-OH, THC-COOH aus Speichel

Die mittleren Wiederfindungsraten der auf Stufe 2 verkürzten Probenvorbereitungsmethode zur Bestimmung von $\Delta 9$ -THC- D_3 , THC-OH und THC-COOH aus Speichel betragen 98,15%, 103,22% und 104,08% mit CVs zwischen 1,36% und 3,85% und einer Spanne von 89,62% bis 108,34% (siehe Abbildung 6.21). Die Variationskoeffizienten der laborinternen Vergleichspräzision liegen zwischen 1,32% und 3,97% für alle Analyten und die in diesem Rahmen ermittelten mittleren Wiederfindungsraten liegen zwischen 99,27% und 108,62% (siehe Abbildung 10.14). Die Variationskoeffizienten der Messpräzision sind geringer als 0,78% (siehe Abbildung 10.13). Die methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen betragen 0,037 ng/ml und 0,082 ng/ml für $\Delta 9$ -THC- D_3 , 0,328 ng/ml und 0,773 ng/ml für THC-OH sowie 0,942 ng/ml und 2,247 ng/ml für THC-COOH und sind somit höher als die zuvor ermittelten Grenzwerte der mit Proteinfällung oder Hydrolyse gekoppelten Extraktion, weswegen die Erhöhung des Grundrauschens auf nicht vollständig entfernte Matrixbestandteile durch das verkürzte

Probenvorbereitungsverfahren zurückgeführt wird. Da die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen jedoch im Bereich der von der SAMSHA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) empfohlenen Cutoff-Limits von 1 bzw. 2 ng/ml liegen, kann auch bei der Extraktion von THC und Metaboliten aus Speichel auf einen zusätzlichen Evaporationsschritt verzichtet werden. Die Validierungsergebnisse sind in Anhang 10.5.3 in Tabelle 10.32 zusammengefasst [288].

Die hohen Wiederfindungsraten und niedrigen Variationskoeffizienten der Validierungen belegen zudem die Anwendbarkeit einer Extraktionsmethode auf verschiedene Matrices. Auch der Vergleich mit der Literatur zeigt die hohe Qualität der entwickelten Probenvorbereitungsmethoden. Mit in der Literatur vorgestellten Methoden (Tabelle 10.20 bis Tabelle 10.22) werden bei der Extraktion von THC und Metaboliten aus Blut, Serum, Plasma und der Analyse mittels LC-MS/MS Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zwischen 0,2 und 5 ng/ml sowie Wiederfindungsraten zwischen 51% und 95% erzielt [354, 363, 375]. Bei der LC-MS Analyse von THC-COOH aus Urin wird eine Nachweisgrenze von 15 ng/ml bei 95-prozentiger Wiederfindung erzielt [356]. Auch bei der Bestimmung von THC und Metaboliten mittels LC-MS/MS aus Urin und Speichel sind die Nachweisgrenzen mit bis zu 20 ng/ml höher als in der hier vorgestellten Methode [350]. Die Wiederfindungsspannen sind mit Werten zwischen 23% bis 119% sehr weit [369, 377], was die hohe Präzision der hier vorgestellten Methoden unterstreicht.

6.2.4.4 Ergebnisse der Überprüfung der Wirtschaftlichkeit der Aufreinigung von Cannabinoiden aus Serum, Urin und Speichel

Mit dem entwickelten Automationssystem zur Extraktion von Cannabinoiden aus Serum, Urin und Speichel können pro Jahr zwischen 72.000 und 187.200 Proben aufgereinigt werden. Der höchste Durchsatz wird bei der Extraktion von Cannabinoiden aus Speichel erzielt, da die Durchlaufzeit mit 2,43 h im Vergleich zu den 7,09 h bzw. 7,20 h aus Serum und Urin deutlich kürzer ist. Dies ist bedingt durch den Entfall der Proteinfällung bzw. der Hydrolyse.

Durch den Einsatz des Automationssystems können die Kosten pro Probe signifikant gesenkt werden. Bei der Aufreinigung von Cannabinoiden aus Serum sinken die Kosten von 11,33 € auf 8,37 €, bei Urin von 11,05 € auf 7,86 € und bei Speichel von 9,89 € auf 6,33 €. Diese Kostensenkungen resultieren aus einer Reduktion der Personalkosten von ca. 45% bei der manuellen Bearbeitung auf unter 10% bei Verwendung des Automationssystems.

Der Kapitalwert aller Aufreinigungsmethoden ist positiv und übersteigt den Kapitalwert der manuellen Bearbeitung. Die Amortisationsdauer ist gering und liegt zwischen 0,34 Jahren und 1,60 Jahren. Sowohl die positiven Ergebnisse der Kostenvergleichsrechnung, d.h. die Kostensenkung durch den Einsatz des Automationssystems, als auch die Ergebnisse der dynamischen Investitionsrechnung und der Risikobewertung sprechen für die Investition in das entwickelte Automationssystem.

Die Ergebnisse der Bewertung der Wirtschaftlichkeit sind in Abbildung 6.22 sowie in Tabelle 10.33 in Anhang 10.5.4 zusammengefasst.

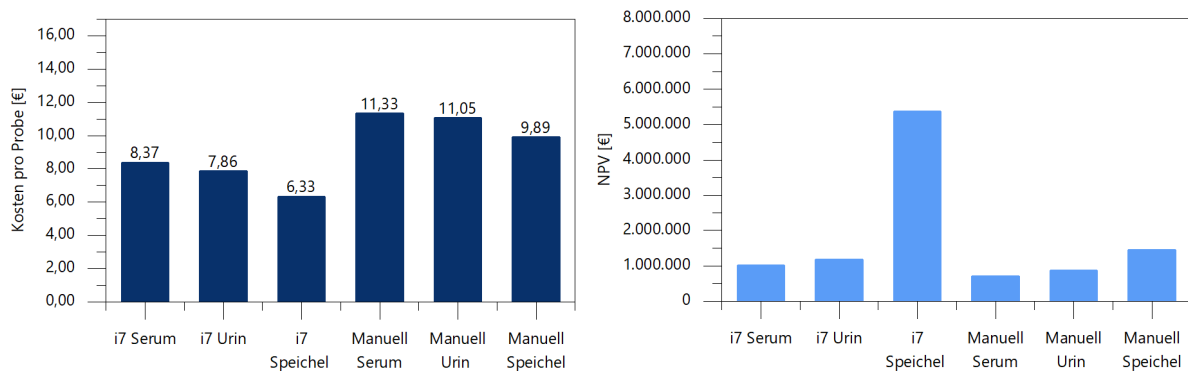


Abbildung 6.22: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Cannabinoide: Kosten pro Probe (links) und Kapitalwerte (rechts) für die automatisierte und manuelle Extraktion der Cannabinoide aus Serum, Urin und Speichel

6.2.4.5 Ergebnisse der Überprüfung der Nachhaltigkeit von Cannabinoiden aus Serum, Urin und Speichel

Die Überprüfung der Nachhaltigkeit zeigt für die drei Matrices ähnliche Ergebnisse mit Indices zwischen 0,58 und 0,63. Geringfügige Unterschiede bestehen in Hinblick auf die verschiedenen Anteile bzw. eingesetzten Lösungsmittel- und Probenvolumina als Resultat der unterschiedlichen Probenvorbereitungstechniken (Proteinfällung, Hydrolyse, keine Grobreinigung). Der bei der Aufreinigung von Cannabinoiden aus Serum entstehende Plastikabfall ist mit 23,42 g pro Probe am höchsten, da für diesen Prozess die größte Menge an Pipettenspitzen benötigt wird. Im Gegensatz dazu ist der Plastikabfall bei der Aufreinigung aus Speichel mit 17,02 g pro Probe am geringsten, da die erste Stufe des Probenvorbereitungsprozesses entfällt, was den Bedarf an Labware reduziert. Der Anteil wiederverwendbarer Labware verhält sich ähnlich und liegt zwischen 16% und 22%. Die Nachhaltigkeitsbewertung zeigt hier Verbesserungspotenziale auf. Hingegen wird durch den Einsatz des Automationssystems eine 35-prozentige Steigerung der Nachhaltigkeit, insbesondere durch die Erhöhung der Arbeitssicherheit, im Vergleich zur manuellen Durchführung erzielt. Der Einsatz der Mikroelutionsplatten mit einem Sorbentbett von 2 mg zur Extraktion der Cannabinoide trägt durch geringe Proben-, Lösungsmittel- und Abfallvolumina sowie durch die Abfallreduktion ebenfalls positiv zur Nachhaltigkeit der entwickelten Methoden bei.

In Tabelle 6.9 sind die normalisierten Ergebnisse der Überprüfung der Nachhaltigkeit zusammengefasst. Die nicht normalisierten Werte sind in Tabelle 10.34 dargestellt.

Tabelle 6.9: Ergebnisse Nachhaltigkeit Cannabinoidaufreinigung

Kategorie Nachhaltigkeit	Automatisiert 96 Proben Serum	Automatisiert 96 Proben Urin	Automatisiert 96 Proben Speichel	Manuell 96 Proben Serum	Manuell 96 Proben Urin	Manuell 96 Proben Speichel
Miniaturisierung und Automatisierung	1	1	1	0,5	0,5	0,5
Probenvolumen	0,88	0,68	0,78	0,88	0,68	0,78
Mitarbeitersicherheit	0,93	0,92	0,82	0,00	0,00	0,00
Durchlaufzeit pro Probe	0,57	0,57	0,84	0,65	0,64	0,68
Einsatz schädlicher Lösungsmittel	0,61	0,66	0,73	0,61	0,66	0,73
Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel	0,43	0,29	0,41	0,43	0,29	0,41
Abfallvolumen	0,61	0,60	0,65	0,61	0,60	0,65
Plastikabfall	0,27	0,31	0,31	0,27	0,31	0,31
Wiederverwendbare Labware	0,20	0,22	0,16	0,20	0,22	0,16
Nachhaltigkeitsindex	0,61	0,58	0,63	0,46	0,43	0,47

6.3 Anwendung 3 – Bestimmung von Benzoesäuren

6.3.1 Einführung

Benzoesäuren gehören zur Gruppe der organischen Säuren. Neben den klassischen Carboxylgruppen sind weitere funktionelle Gruppen, wie Phenol-, Alkohol- oder Methylgruppen, möglich, die in Kombination mit den vorhandenen Carboxylgruppen die Azidität der organischen Säure bestimmen [391, 392].

Die Benzoesäure (auch Phenylameisensäure oder Benzolameisensäure) leitet sich vom Phenol ab und besteht aus einem Benzolring und einer Carboxylgruppe und kann somit als aromatische Monocarboxylsäure klassifiziert werden.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Bernsteinsäure um eine aliphatische Dicarbonsäure [393].

Die Toluylsäuren oder auch Methylbenzoesäuren bestehen aus einem Benzenring mit einer Carboxyl- und einer Methylgruppe. Durch die unterschiedliche Anordnung der Methylgruppe am Benzolring ergeben sich die drei Konstitutionsisomere 2-Methylbenzoesäure, 3-Methylbenzoesäure und 4-Methylbenzoesäure, welche von der Benzoesäure abgeleitet sind und zu den aromatischen Monocarbonsäuren gehören.

Die aromatischen Dimethylbenzoesäuren gehören ebenfalls zu den Monocarbonsäuren, besitzen aber im Unterschied zu den Methylbenzoesäuren zwei Methylgruppen, deren unterschiedliche räumliche Anordnung die sechs Konstitutionsisomere 2,3-Dimethylbenzoesäure, 2,4-Dimethylbenzoesäure, 2,5-Dimethylbenzoesäure, 2,6-Dimethylbenzoesäure, 3,4-Dimethylbenzoesäure und 3,5-Dimethylbenzoesäure erzeugt. In Abbildung 6.23 sind Vertreter der Benzoesäuren dargestellt.

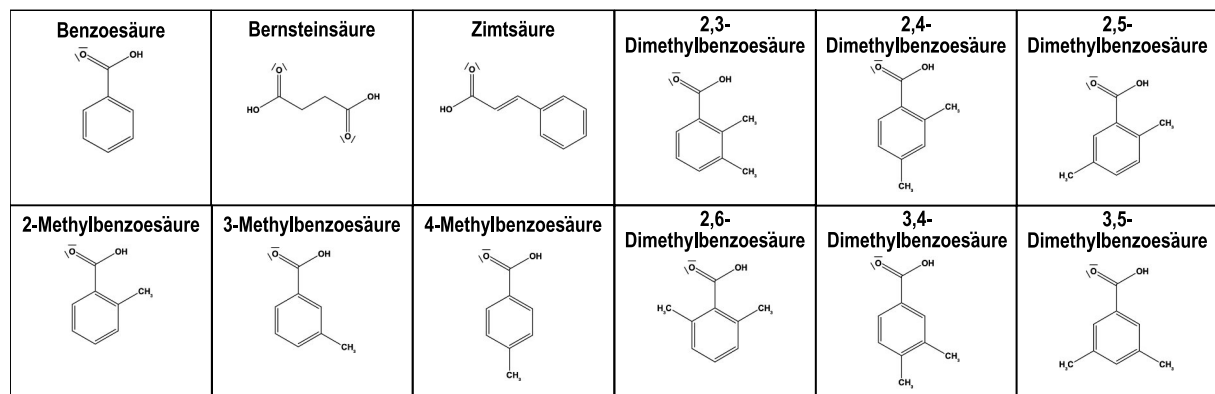


Abbildung 6.23: Strukturformeln ausgewählter Benzoesäuren

Die genannten Carboxylsäuren besitzen ein Molekulargewicht zwischen 118–150 g/mol und sind in Abhängigkeit ihres Protonierungsgrades besser in organischen Lösungsmitteln oder in Wasser löslich [394]. Die Benzoesäure besitzt zahlreiche Derivate und andere Benzolverbindungen wie Natrium-, Kalium- und Kalziumbenzoate (Salze), Benzoesäurealkylester, Hydroxybenzoatester (Parabene), Benzylalkohol, Benzaldehyd und Benzoylperoxid. Organische Säuren sind ubiquitär, da sie sowohl von Pflanzen als auch von Tieren und Mikroorganismen erzeugt werden [395].

Benzoesäuren kommen in Milch, Obst, Nüssen, Gemüse und Früchten in Konzentrationen von weniger als 1 mg/kg vor [394, 396]. Höhere Konzentrationen sind zum Beispiel in Heidel- und Preiselbeeren mit 73–124 mg/kg zu finden [397]. Benzoesäure und Derivate besitzen ein breites Anwendungsspektrum.

Der Hauptteil der produzierten Benzoe- und Bernsteinsäuremenge wird als Ausgangsstoff für die Erzeugung weiterer Stoffe wie z.B. Butandiol, Tetrahydrofuran, Arolactam und Nylon für die Industrie verwendet. Zudem werden Benzoesäuren zur Konservierung, Säuerung oder Aromatisierung in Lebensmitteln, in kosmetischen Produkten, Hygiene-, Arznei- und Reinigungsmitteln, Herbiziden, Schmiermitteln oder zur Stabilisation oder Katalyse in der Textil-, Papier-, Farbstoff-, Kunststoff- und Lösungsmittelindustrie verwendet [394, 395, 398-400]. Durch die industrielle Nutzung gelangen Benzoesäuren auch in das Grund- und Oberflächenwasser [401-405]. Die Konzentrationsspanne der Benzoesäuren in Wasserproben reicht von 0,02 µg/l in Regenwasser bis zu 1.000 µg/l in Sickerwasser bei einer Mülldeponie [406]. Die Ungefährlichkeit bzw. Toxizität von Benzoesäuren und ihren Derivaten für den menschlichen Organismus wird immer wieder kontrovers diskutiert. Aktuell gelten zum Beispiel für Lebensmittel die in der Verordnung 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe formulierten Grenzwerte von ca. 1.000 mg/kg, welche bis auf wenige Ausnahmen, z.B. gekochte rote Beete mit 2.000 mg/kg, nicht überschritten werden dürfen und aus diesem Grund überwacht werden [398, 407].

Für die analytische Bestimmung von Benzoesäure können potentiometrische und spektroskopische Methoden, die Kapillarelektrophorese, die High Performance Thin Layer Chromatography, die Gaschromatographie oder die Hochleistungsflüssigchromatographie in Kombination mit einer Massenspektrometrie eingesetzt werden [408].

Die Auswahl der Probenvorbereitungsmethode variiert und wird durch Matrix und Analyt bestimmt [409, 410]. Bei der Analyse von Wasserproben ist nach einer Filtration die direkte Injektion der Proben auf das LC-MS/MS-System möglich [411, 412]. Durch die Vorschaltung einer SPE erzielen Alumbaugh et al. durch die starke Aufkonzentration der Proben im Rahmen der SPE Nachweisgrenzen von 0,022 ng/ml und weniger. Im Vergleich dazu liegt die Nachweisgrenze bei Godin et al. ohne vorherige SPE um den Faktor 10 höher bei 0,1 ng/ml [412]. Bei festen Lebensmitteln ist die Probenvorbereitung deutlich aufwendiger. In der Methode von Burana-Osot et al. ist zur Extraktion der Analyten zunächst eine Zerkleinerung der Nudeln, eine Trocknung und Homogenisierung der Probe zu einem feinem Puder sowie das Einwiegen und Lösen der zerkleinerten Nudeln vor der LLE notwendig [408]. Die Extraktion wird im Ultraschallbad durchgeführt. Nach einer Zentrifugation erfolgt die Analyse des filtrierten Überstands mittels HPLC-DAD. Es wird eine Nachweisgrenze von 420 ng/ml erreicht. Die Nachweisgrenze einer weiteren Probenvorbereitungsmethode zur Extraktion von 16 Phenolsäuren aus Wein, bestehend aus einer Kombination aus Filtration und LLE und nachfolgender HPLC-DAD Analyse, lag bei 0,01–0,03 mg/ml [410]. Die Methoden wurden manuell durchgeführt. Karasová et al. testen und vergleichen verschiedene Methoden zur Extraktion von Benzoesäurederivaten aus *Melissa officinalis* wie die Supercritical-Fluid-Extraktion und die Matrix-Festphasendispersionstechnik, um den Lösungsmittelverbrauch zu reduzieren. Die Supercritical-Fluid-Extraktion ist nicht als Probenvorbereitungsmethode geeignet, wohingegen die Matrix-Festphasendispersionstechnik als Ersatz für die lösungsmittelintensive Soxhlet-Extraktion eingesetzt werden kann [409]. In Tabelle 10.35 im Anhang sind ausgewählte Probenvorbereitungsmethoden zusammengefasst.

6.3.2 Prozessanalyse und Systemanforderungen

Zur Aufkonzentration von Benzoesäuren aus Wasserproben wird eine SPE mit den Strata X-A Kartuschen (3 ml, 200 mg, Phenomenex, Torrance, USA) gewählt. Die zu optimierende Probenvorbereitungsmethode besteht aus einem Konditionierungsschritt mit 1 ml Methanol, der Equilibrierung mit 1 ml Wasser, der Probenaufgabe, zwei Waschsritten mit 1 ml 25 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 6–7 sowie 1 ml Methanol und zwei Elutionsschritten mit je 500 µl 5% Ameisensäure in Methanol [335].

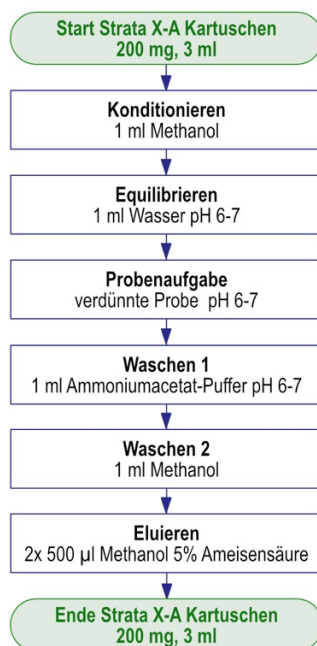


Abbildung 6.24: Ausgangspunkt Methodenentwicklung Benzoesäuren aus Wasserproben

In der optimierten Probenvorbereitungsmethode werden die Strata X-A Kartuschen mit 900 µl Methanol und 900 µl Wasser konditioniert und equilibriert. Zur Erzielung eines signifikanten Aufkonzentrationseffekts werden 10 ml der Wasserproben auf die Kartuschen geladen. Das Beladen der 3 ml Kartuschen erfolgt in 4 Schritten mit je 2.500 µl Probe. Nach der Probenaufgabe wird die Kartusche mit 900 µl Ammoniumacetat-Puffer pH 6,7 und 900 µl Methanol gewaschen, für 10 min mithilfe von Überdruck getrocknet und mit 2x 500 µl MeOH/HCOOH (95:5) eluiert. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 50 µl Standard in Stufe 3 des Probenvorbereitungsprozesses. Der Prozessablaufplan ist in Abbildung 6.25 dargestellt. Die tabellarische Prozessanalyse befindet sich in Tabelle 6.10.

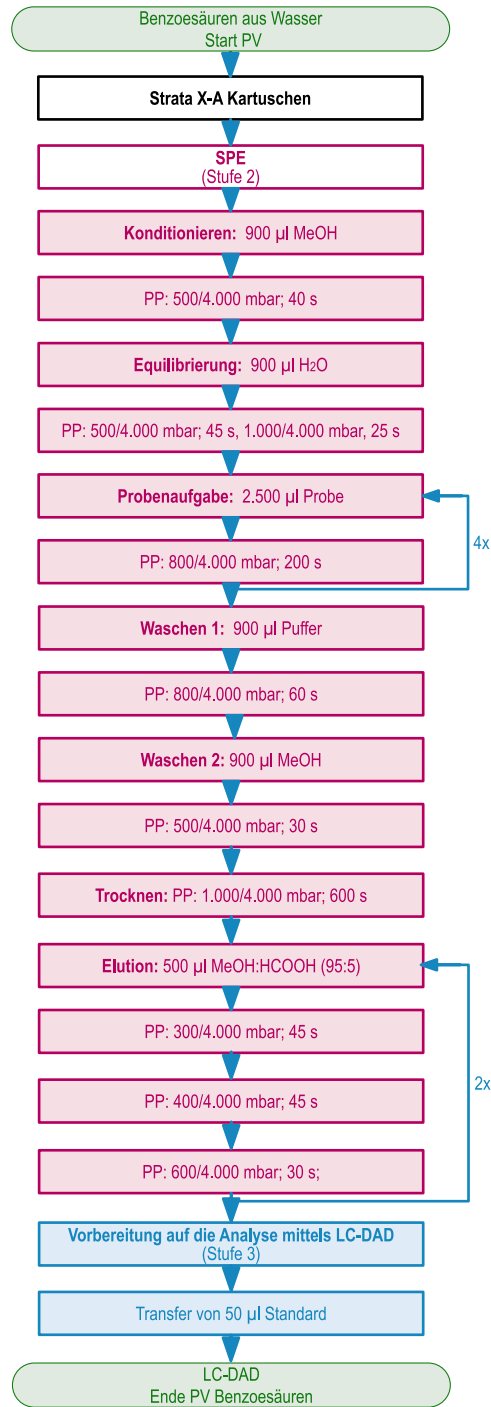


Abbildung 6.25: Prozessablaufplan Benzoensäuren

Tabelle 6.10: Prozessanalyse Benzoessäureextraktion Strata X-A Kartuschen manuell








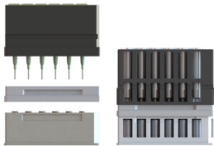
Beschreibung Prozessschritt	Ausgangslabware	Ziellabware	Manueller Prozess	Anforderung Automationsystem
Konditionieren: 900 µl Methanol	Lösungsmittelflasche	Strata X-A Kartusche	Manueller Transfer Öffnen u. Schließen der Flasche	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel, Reduktion der Evaporation Bereitstellung Strata X-A Kartuschen auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X-A Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X-A Kartuschen (druckgeeignet)
Equilibrierung: 900 µl H ₂ O	Lösungsmittelflasche	Strata X-A Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X-A Kartuschen auf dem Deck
Probenaufgabe: 4x 2.500 µl	Wheaton-Vial	Strata X-A Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung der Wheaton-Vials auf dem Deck Bereitstellung Strata X-A Kartuschen auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X-A Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X-A Kartuschen (druckgeeignet)
Waschen 1: 900 µl Puffer	Lösungsmittelflasche	Strata X-A Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X-A Kartuschen auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X-A Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X-A Kartuschen (druckgeeignet)
Waschen 2: 900 µl MeOH	Lösungsmittelflasche	Strata X-A Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X-A Kartuschen auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X-A Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X-A Kartuschen (druckgeeignet)
Eluieren: 2x 500 µl MeOH:HCOOH (95:5)	Lösungsmittelflasche	Strata X-A Kartusche	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Bereitstellung Strata X-A Kartuschen auf dem Deck
Druckaufgabe	-	Strata X-A Kartusche	Manueller Transport, Vakuum Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X Kartusche (druckgeeignet)
Direkter Transfer des Eluats in 1,5 ml Standard Vial zur Bestimmung der Benzoessäuren Konzentration mittels LC-DAD (Autosampler)	Strata X-A Kartusche	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transport, Vakuum Manifold Unterstellen des Vials	Automatisierung des Transports Druckaufgabe Bereitstellung Strata X-A Kartuschen über 1,5 ml Standard Vials Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial (druckgeeignet)
Transfer des Standards, 50 µl IS	1,5 ml Standard Vial	1,5 ml Standard Vial	Manueller Transfer, Lagerung des Standards in Kühlschrank	Automatisierung des Transfers Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial auf dem Deck Kühlung/Temperieren 1,5 ml Standard Vial

Die Analyse des Benzoessäureanreicherungsprozesses verdeutlicht, dass die Hauptanforderungen an das Automationsystem wie in den zwei zuvor vorgestellten Anwendungen in der Automatisierung bislang manuell durchgeführten Transfer- und Transportschritte, der Bereitstellung aller notwendigen Funktionalitäten für einen ununterbrochenen Prozessablauf, der Bereitstellung von Proben und Lösungsmitteln sowie der Entwicklung spezieller Racks zur Handhabung der aus manuellen Prozessen stammenden Gefäße und Labware bestehen.

6.3.3 Anforderungsanalyse und Systemrealisierung

Die aus der Prozessanalyse stammenden Anforderungen an das Automationssystem sowie die automatisierten Lösungen sind in Tabelle 6.11 zusammengefasst. Die Anforderungen 1, 2, 4 und 6 sind durch das allgemeingültige Automationssystem erfüllt. Zur Realisierung der Anforderungen 3, 5 und 8 werden spezielle Racks benötigt.

Tabelle 6.11: Überprüfung der Anforderungen an das Automationssystem für die Benzoesäureextraktion

Nr.	Anforderung	Erfüllt durch allgemeingültiges Automationssystem?	Lösung:	Zusatzmodul/ spezialisierte Labware	Erfüllt durch allgemeingültiges Automationssystem mit Speziallabware?
1	Automatisierung des Transfers und des Transports	✓	Biomek i7 Workstation		✓
2	Bereitstellung der Lösungsmittel	✓	Self-Refilling Quarter Reservoir		✓
3	Bereitstellung Wheaton Vials auf dem Deck	✗	Entwicklung Rack für Wheaton Vials		✓
4	Druckaufgabe	✓	Nutzung des Zusatzmoduls: Positive Pressure Unit		✓
5	Bereitstellung 1,5 ml Standard Vial druckgeeignet, kühlgeeignet	✗	Entwicklung Rack für 1,5 ml Standard Vials		✓
6	Temperieren	✓	Static Peltier ALP 1,5 ml Standard Vial Aluminium Rack		✓
7	Bereitstellung der Strata X-A Kartuschen, druckgeeignet	✗	Nutzung Positive Pressure Rack, 3 ml		✓
8	Bereitstellung Strata X Kartuschen über 1,5 ml Standard Vials	✗	Entwicklung Spacer Adapter, Nutzung von Spritzenaufsätzen Stack aus Positive Pressure Rack, Spacer Adapter und Rack 1,5 ml Standard Vials		✓

Die Automatisierung des Labwaretransports und des Lösungsmitteltransfers wird durch die Biomek i7 Workstation erfüllt (Anforderung 1). Der Lösungsmitteltransfer erfolgt mit Einweg-Pipettenspitzen in den Größen 90 µl, 230 µl und 1.070 µl. Zur Bereitstellung der Lösungsmittel und Puffer wird das integrierte Self-Refilling Quarter Reservoir genutzt (Anforderung 2). Zur Bereitstellung der manuell zur Probenlagerung genutzten Wheaton Vials (Sigma Aldrich, Darmstadt, DE) auf dem Deck wird ein spezielles Probenrack entwickelt (Anforderung 3), welches in Abbildung 6.26 dargestellt ist.



Abbildung 6.26: Wheaton Vial Rack

Zur Druckaufgabe wird die Positive Pressure Unit verwendet (Anforderung 4). Zur Bereitstellung der 1,5 ml Standard Vials, zur gekühlten Lagerung des Standards und zur direkten Elution der Proben in die Vials wird ein spezielles druck- und kühlgeeignetes Aluminium Rack entwickelt und verwendet (Anforderung 5, Abbildung 6.6). Zur Kühlung des Standards wird die Temperierposition genutzt (Anforderung 6). Zur automatisierten Bearbeitung der 3 ml Strata X-A Kartuschen mit der Positive Pressure Unit wird ein spezielles druckgeeignetes 24-Well Positive Pressure Rack (amplius gmbH, Rostock, DE) verwendet (Anforderung 7). Zur Ermöglichung der direkten Elution aus den Strata X-A Kartuschen in 1,5 ml Standard Vials wird das Aluminium Rack unter dem Positive Pressure Rack positioniert (Anforderung 8). An den Kartuschenausgängen werden zusätzlich Spritzenaufsätze zur Vermeidung von Kontaminationen montiert. Zudem wird ein Spacer-Adapter zwischen Ausgangs- und Ziellabware positioniert. Zur Optimierung der Parameter wird ein spezieller Stack mit Sichtschlitzen benötigt und entwickelt. Die entwickelte Speziallabware ist in Abbildung 6.27 dargestellt.

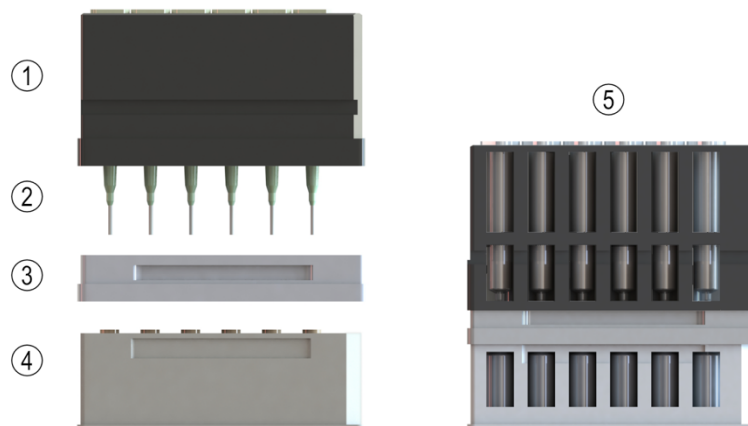


Abbildung 6.27: (1) Positive Pressure Rack, 3 ml; (2) Spritzenaufsätze; (3) Spacer Adapter; (4) Aluminium Rack; (5) geschlitzter Stack

In Abbildung 6.28 ist das Decklayout für die Bearbeitung von bis zu 96 Proben dargestellt. Aufgrund der hohen Labwarestacks ist eine höhere Probenzahl in einem Durchlauf nicht bearbeitbar. Das Materialverzeichnis befindet sich in Anhang 10.6.1. Die Quantifizierung der angereicherten Benzoesäuren erfolgt mit einem LC-DAD System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die methodischen Parameter befinden sich in Anhang 10.6.2.

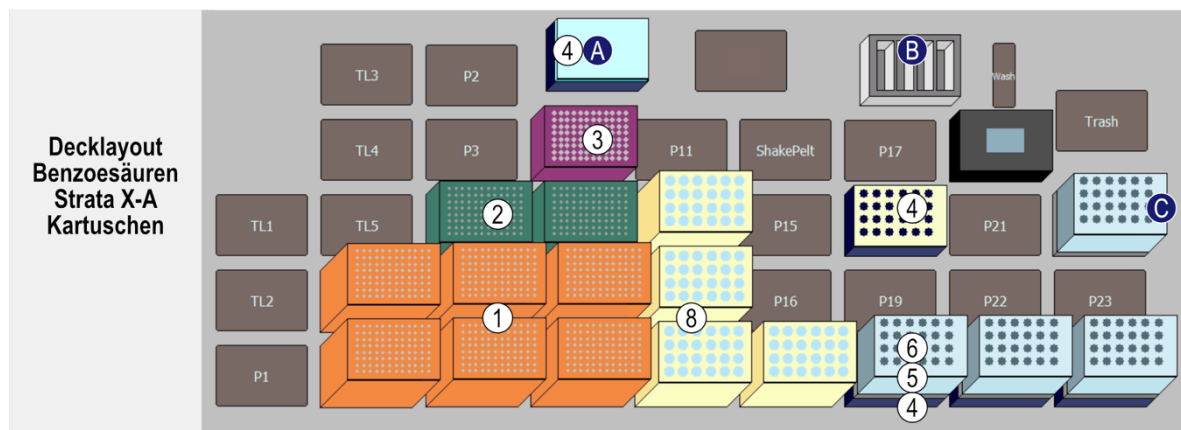


Abbildung 6.28: Decklayout zur automatisierten Bestimmung von Benzoesäuren aus Wasser für bis zu 96 Proben:
 (A) Temperier Position; (B) Self-Refilling Quarter Reservoir; (C) Positive Pressure Unit; (1) 1.070 μ l Pipettenspitzen; (2) 230 μ l Pipettenspitzen; (3) 90 μ l Pipettenspitzen; (4) Aluminium Rack; (4-6) Stack aus Aluminium Rack, Spacer Adapter und Positive Pressure Rack; (7) Strata X-A Kartusche mit Spritzenaufsatz; (8) Wheaton Vials in 10 ml Vial Rack; (9) Stack (4-6) geschlitzt

6.3.4 Systemüberprüfung – Bestimmung von Benzoesäuren

6.3.4.1 Ergebnisse der Validierung der Extraktion der Benzoesäuren

Die Variationskoeffizienten der Messpräzision des LC-DAD Systems liegen für alle Analyten zwischen 0,19% und 1,02% (siehe Abbildung 10.16). Die mittleren Wiederfindungsraten liegen für alle Analyten zwischen 91,33% und 99,55% mit CVs zwischen 1,57% und 2,30% und einer Spanne von 87,63% und 102,01% (siehe Abbildung 6.29). Die Wiederfindungsraten wurden durch die Vorbereitung und Messung von 24 Proben ermittelt. Die mittleren Wiederfindungsraten, die im Rahmen der laborinternen Vergleichspräzision ermittelt wurden, liegen zwischen 85,98% und 103,13% und CVs zwischen 0,84% und 2,76% und bestätigen damit die zuvor ermittelten präzisen und hohen Wiederfindungsraten der Vorbereitung und Messung von Benzoesäuren aus Wasserproben (siehe Abbildung 10.17). Die analytischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen liegen zwischen 71,45 ng/ml und 336,40 ng/ml sowie 105,41 ng/ml und 561,71 ng/ml für alle Analyten. Im Rahmen der Probenvorbereitung wird ein Aufkonzentrationsfaktor von 10 erreicht, weshalb die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Benzoesäuren aus Wasserproben um den Faktor 10 reduziert sind und zwischen 7,14 und 33,64 ng/ml sowie zwischen 10,54 ng/ml und 56,17 ng/ml liegen. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse befindet sich in Anhang 10.6.3 in Tabelle 10.39 bis Tabelle 10.41 entsprechend [413].

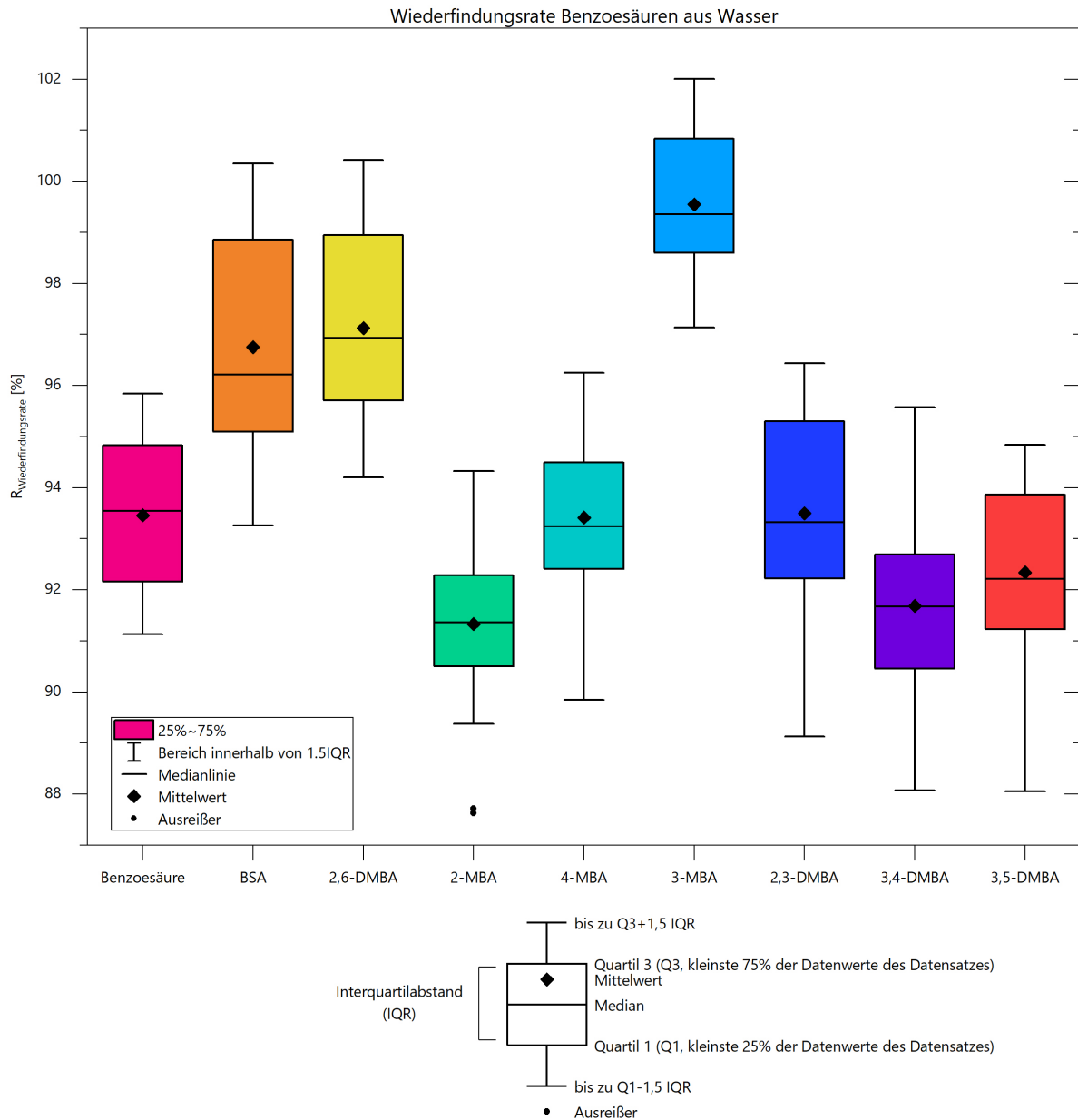


Abbildung 6.29: Wiederfindungsraten Benzooesäuren

Benzooesäuren kommen in geringen Konzentrationen überall in der Natur vor. Durch die industrielle Nutzung können Benzooesäuren aber auch in höheren Konzentrationen in das Oberflächen- und Grundwasser gelangen oder bedingt durch den Herstellungsprozess auch in höheren Konzentrationen in Lebensmitteln und Getränken, wie zum Beispiel Wein, vorkommen. Dementsprechend variiert die benötigte Sensitivität.

Bei der Extraktion von Benzooesäuren aus Nudeln mittels mechanischen Zerkleinerungs- und Löseverfahren sowie einer sich anschließenden LLE wird ebenso wie in der hier vorgestellten Methode ein LC-DAD Messsystem verwendet [408]. Die Nachweisgrenze liegt bei 420 ng/ml und die Bestimmungsgrenze bei 1.140 ng/ml und damit deutlich oberhalb der hier ermittelten Grenzwerte. Robbins et al. nutzen ebenfalls ein LC-DAD Messsystem zur Extraktion von Benzooesäuren aus Wasser und Wein. Nach der Filtration und LLE werden die Proben mit Stickstoff aufkonzentriert [410]. Die erzielten Nachweisgrenzen sind mit 10–30 ng/ml durch die vorherige Evaporation deutlich reduziert. Die mit der

automatisierten Aufreinigung von Wasserproben ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen liegen zwischen diesen beiden Methoden. Durch die Verwendung eines sensitiveren Messverfahrens wie der LC-MS/MS in [412] und [411] bei der Extraktion von Benzoesäuren aus Wasserproben können die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen auf bis zu 0,007 ng/ml bzw. 0,15 ng/ml reduziert werden (siehe Tabelle 10.35). Auch aufkonzentrierende, probenvorbereitende Maßnahmen wie die SPE oder Evaporation steigern die Sensitivität, wie in Godin et al. oder Alumbaugh et al. und in der hier vorgestellten Methode [411, 412]. Die Wiederfindungsraten liegen für alle Probenvorbereitungsmethoden im Bereich zwischen 80–100% mit CVs kleiner 4%. Damit entsprechen die im Rahmen der Validierung der automatisierten Probenvorbereitungsmethode ermittelten Wiederfindungsraten und Variationskoeffizienten den in der Literatur berichteten Werten.

6.3.4.2 Ergebnisse der Überprüfung der Wirtschaftlichkeit der Benzoesäureanreicherung

Durch die automatisierte Durchführung der Benzoesäureanreicherung mit dem konfigurierten Automationssystem können die Kosten pro Probe von 13,18 € auf 9,40 € gesenkt werden (siehe Abbildung 6.30). Pro Jahr können mit dem Automationssystem 76.800 Proben mit einer Durchlaufzeit pro Methode von 6,52 h und manuell 81.600 Proben mit einer Durchlaufzeit von 6,12 h vorbereitet werden. Für die manuelle Vor- und Nachbereitung wird eine Rüstzeit von 0,58 h angenommen. Die Kostenreduktion wird, wie bei vorherigen Anwendungen, durch die Senkung des Personalkostenanteils erreicht.

Der Kapitalwert ist in beiden Durchführungsvarianten positiv und beträgt für die manuelle Durchführung 1.679.164,59 €. Bei der Verwendung des Automationssystems ist der Kapitalwert höher und beträgt 2.500.024,30 €, weshalb die Investition getätigt werden sollte. Das Risiko der Investition ist gering, was aus der Amortisationsdauer von 0,69 Jahren hervorgeht.

Die Ergebnisse der Wirtschaftlichkeitsbetrachtung sind in Tabelle 10.42 in Anhang 10.6.4 zusammengefasst.

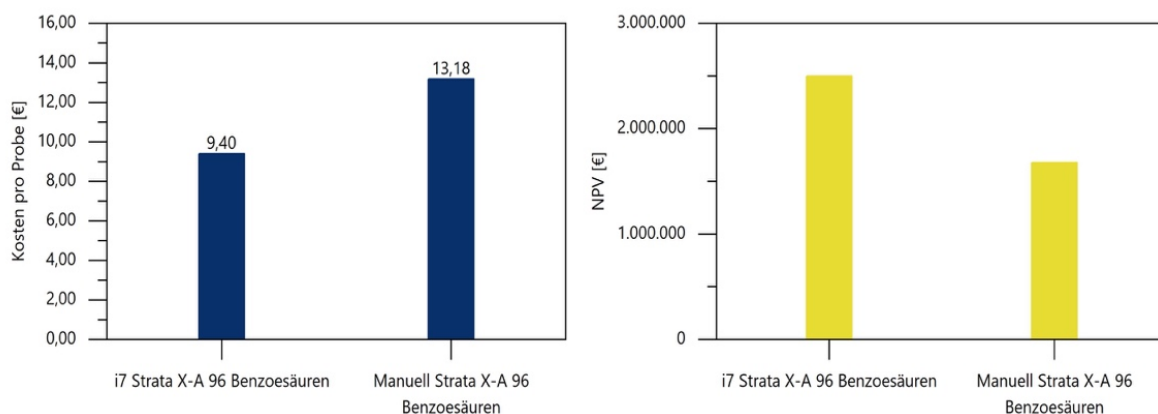


Abbildung 6.30: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzoesäuren: Kosten pro Probe (links) und Kapitalwerte (rechts) für die automatisierte und manuelle Durchführung der Probenvorbereitungsmethode

6.3.4.3 Ergebnisse der Überprüfung der Nachhaltigkeit der Benzoessäureanreicherung

Bei der Überprüfung der Nachhaltigkeit der Benzoessäureextraktion wird die Herausforderung der Ausbalancierung zwischen Ergebnisqualität und Umweltfreundlichkeit deutlich. Die niedrigen Konzentrationen von Benzoessäuren in Wasserproben erfordern die Erzielung eines hohen Aufkonzentrationsfaktors im Rahmen der Probenvorbereitung, um die Analyten mittels LC-DAD nachweisen zu können. Der notwendige Aufkonzentrationsfaktor kann mit einer SPE durch den Einsatz eines hohen Probenvolumens (10 ml) und eines vergleichsweise hohen Sorbentbettvolumens (200 mg) erzielt werden. Hohe Proben- und Sorbentbettvolumina stehen jedoch dem Miniaturisierungsgedanken der GAC entgegen und führen gleichzeitig auch zur Erhöhung des produzierten Abfalls (hier 26,75 g pro Probe). In der Gesamtbewertung der automatisierten Benzoessäureextraktion entsteht ein Nachhaltigkeitsindex von 0,42. Im Vergleich zur manuellen Benzoessäureextraktion mit einem Index von 0,26 wird durch den Einsatz des Automationssystems eine Steigerung der Umweltfreundlichkeit von 60 Prozent erzielt.

Durch den Einsatz einer sensitiveren analytischen Technik oder einer effektiveren Probenvorbereitungsmethode (Mikroextraktionstechnik) könnten das benötigte Probenvolumen und der entstehende Abfall reduziert werden, wodurch die Nachhaltigkeit der Methode weiter verbessert werden würde.

In Tabelle 6.12 sind die normalisierten Ergebnisse zusammengefasst. Die nicht normalisierten Ergebnisse sind in Tabelle 10.43 dargestellt.

Tabelle 6.12: Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzoessäureextraktion

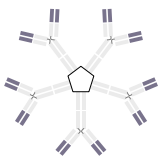
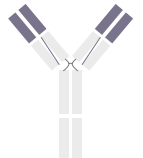
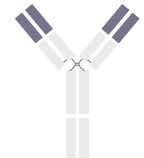
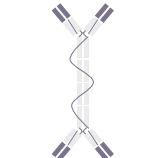
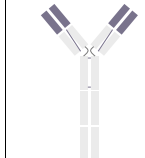
Kategorie Nachhaltigkeit	Automatisiert 96 Proben Strata X-A	Manuell 96 Proben Strata X-A
Miniaturisierung und Automatisierung	0,50	0,00
Probenvolumen	0,32	0,32
Mitarbeitersicherheit	0,92	0,00
Durchlaufzeit pro Probe	0,59	0,61
Einsatz schädlicher Lösungsmittel	0,43	0,43
Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel	0,12	0,12
Abfallvolumen	0,33	0,33
Plastikabfall	0,25	0,25
Wiederverwendbare Labware	0,31	0,31
Nachhaltigkeitsindex	0,42	0,26

6.4 Anwendung 4 – Bestimmung von Antikörpern

6.4.1 Einführung

Antikörper gehören zu den Immunglobulinen (Ig) und kommen im Menschen im Blutplasma an der Oberfläche von Lymphozyten, in exokrinen Sekreten sowie in extravaskulären Flüssigkeiten vor. Als Teil des Immunsystems schützen sie den Körper vor fremden Molekülen und Organismen, indem sie spezielle körperfremde Merkmale (Antigene) erkennen, sich an diese binden und die Eliminierung der exogenen Substanz auslösen. Die Erkennung eines Antigens durch einen Antikörper ist hochspezifisch, da eine Bindung nur bei einer komplementär aufgebauten dreidimensionalen Struktur erfolgen kann (Schlüssel-Schloss-Prinzip der Antigen-Antikörperbindung) [414]. Die fünf Antikörperklassen IgG, IgD, IgE, IgA und IgM basieren auf der Grundstruktur eines Y-förmigen, achsensymmetrischen Heterotetramers (siehe Tabelle 6.13). Je nach Aufbau variiert die molekulare Masse der Antikörper zwischen 150 kDa und 970 kDa. In Serum liegen sie mit Konzentrationen zwischen 0,00005–10 mg/ml vor und besitzen Halbwertszeiten zwischen 2 und 21 Tagen. IgG ist mit einer Serumkonzentration von ca. 10 mg/ml das am häufigsten vorkommende Immunglobulin und macht ca. 75 Prozent der Serumimmunglobuline aus und besitzt mit 21 Tagen die höchste Halbwertszeit [415, 416].

Tabelle 6.13: Struktur und Eigenschaften der verschiedenen Antikörperklassen¹⁵

	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
molekulare Masse (kDa)	970	184	150	160	188
Serumkonzentration (mg/ml)	1,5	0,03	10	3,5	5×10^{-5}
Halbwertszeit im Serum (Tage)	10	2	21	6	3
Struktur Antikörper (lila: spezifische Antigenbindestelle)					

Aufgrund der langen Halbwertszeit wird die IgG-Grundstruktur in der Medizin besonders häufig zur Entwicklung von monoklonalen Antikörpern verwendet, die durch ihre hohe Spezifität eine hohe Wirksamkeit bei geringen Nebenwirkungen besitzen. Aus diesem Grund sind monoklonale Antikörper sehr erfolgreiche, umsatz- und wachstumsstarke Therapeutika und werden zur Behandlung von Tumor-, Autoimmun- und Stoffwechselerkrankungen eingesetzt [417-419]. Dabei war der zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, Psoriasis, Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa angewandte monoklonale Antikörper Adalimumab (AbbVie, North Chicago, IL, USA) im Jahr 2022 mit 21,24 Millionen Dollar das umsatzstärkste Medikament der Welt [420]. Weitere Anwendungsgebiete sind Aufreinigungs- und Anreicherungsverfahren in der Probenvorbereitung, die passive Immunisierung oder spezifische Nachweisverfahren, wie beispielsweise Lateral-Flow-Immunoassays zum Nachweis von SARS-CoV-2-Antigenen [421-423].

¹⁵ nach [416]

Aufgrund des hohen Interesses sind neben leistungsfähigen Herstellungsverfahren mittels Hybridoma-, Phagen-Display- oder Single-B-Cell-Technologie auch effiziente Aufreinigungsverfahren notwendig. Zur Aufreinigung werden antikörperbindende Proteine wie Protein A oder G eingesetzt, die in chromatographischen Säulen immobilisiert sind und im industriellen Maßstab für Zuläufe von bis zu 2.000 Litern ausgelegt sind [424-429]. Ein Beispiel ist das ÄKTA ready XL System von Cytiva Life Sciences (Uppsala, SE). Die Entwicklung des optimal an den Antikörper angepassten chromatographischen Aufreinigungsverfahrens ist aufgrund zahlreicher zu testender Bedingungen aufwendig und erfolgt aus Kostengründen in miniaturisierter Form.

Die miniaturisierten Säulen werden als RoboColumns bezeichnet und besitzen Säulenvolumina zwischen 50 μl und 600 μl . In weiteren miniaturisierten Varianten wird das chromatographische Material in 96-Well-Mikrotiterplatten mit Volumina zwischen 2 bis 50 μl oder in Pipettenspitzen mit Volumina zwischen 5 bis 320 μl gepackt, wodurch für den Fall der automatisierten Bearbeitung die Nutzung einer 96-Mehrkanal-Pipettiereinheit möglich wird [430-434]. Die verschiedenen Labwareformate sind in Abbildung 6.31 dargestellt.

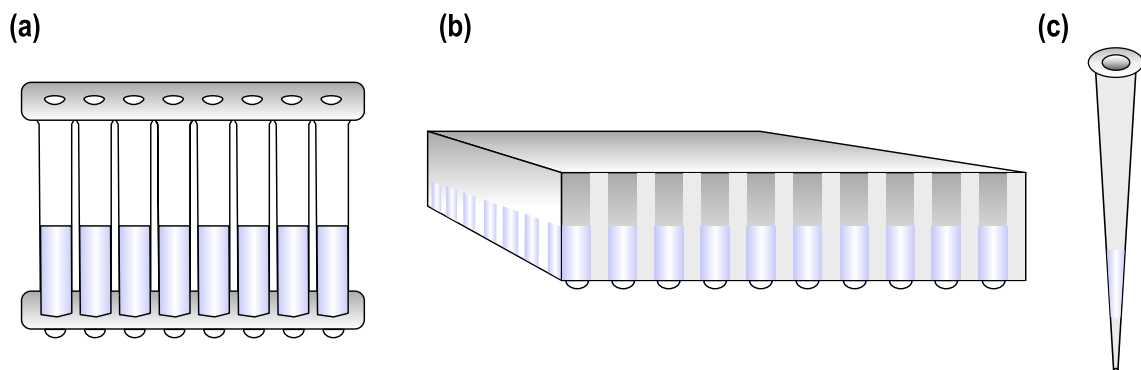


Abbildung 6.31: Varianten der chromatographischen Miniaturisierung: (a) Säulen; (b) 96-Well-Mikrotiterplatte; (c) gepackte Pipettenspitzen

Je nach benötigter Reinheit werden ein bis drei chromatographische Aufreinigungen gekoppelt. Im ersten Schritt der Aufreinigung, welcher als Capturing bezeichnet wird, wird besonders häufig die Protein A Affinitätschromatographie eingesetzt [435]. Im zweiten und dritten Schritt, welche als Intermediate Purification Step und dem finalen Polishing bezeichnet werden, können beispielsweise die Kationenaustausch-, die Anionenaustausch- oder die hydrophobe Interaktionschromatographie miteinander kombiniert werden [436-438]. Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgt im Rahmen von Prozessentwicklungs- und Optimierungsverfahren häufig mittels UV-Absorption bei 280 nm oder mit dem Bradford-, Bichoninic Acid- oder Lowry-Assay.

Die miniaturisierten Säulen und Platten oder die mit Sorbentmaterial gepackten Pipettenspitzen werden in verschiedenen Studien zur Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Bedingungen für die Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberständen eingesetzt. Die getesteten Bedingungen

umfassen verschiedenste chromatographische Medien, pH-Werte und Pufferlösungen. Die Testung erfolgt teilweise automatisiert, zum Beispiel mit Workstations von Tecan (Männedorf, CH) oder Perkin Elmer (Waltham, USA). Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgt absorptionsbasiert [439-442]. In einer vergleichenden Studie von Feliciano et al. wird die Performance von 96-Well-Filterplatten, gepackten Pipettenspitzen und miniaturisierten Säulen bei einer Protein A Aufreinigung mit dem MabSelect Sorbentmaterial (Cytiva, Uppsala, SE) gegenübergestellt. Zur Bearbeitung der gepackten Pipettenspitzen und der miniaturisierten Säulen wird die Freedom Evo Workstation (Tecan, Männedorf, CH) eingesetzt. Die miniaturisierten Säulen zeigen die größte Übereinstimmung mit dem zu Kontrollzwecken durchgeführten chromatographischen Prozess im Labscale-Format (Säulenvolumen 10 ml), wohingegen die 96-Well-Filterplatten den höchsten Durchsatz ermöglichen [443]. In weiteren Studien werden die miniaturisierten Säulen zur Isolierung spezieller Proteine, wie der Bestimmung von Albumin aus Urin und nachfolgender Charakterisierung mittels LC-MS/MS [444, 445], oder zur Überwachung von Antikörperproduktionsprozessen anhand von Attributen wie der Glykosylierung und Aufreinigung mittels Protein-A Affinitätschromatographie eingesetzt [446, 447].

Je nach Matrix, in der das zu isolierende Protein vorliegt, werden zur Proteinaufreinigung verschiedene Probenvorbereitungsmethoden durchgeführt. Bei der Isolierung von Proteinen aus Zellen oder Zellkompartimenten wird zunächst ein Zellaufschluss (Lyse) durchgeführt. Der Zellaufschluss kann osmotisch, enzymatisch, chemisch oder mechanisch erfolgen. Im Anschluss folgt die Isolation und Konzentration des Proteins mittels Proteinfällung, Kristallisation, Membranseparation, Extraktion oder Chromatographie, welche aus Kostengründen häufig den letzten Reinigungsschritt darstellt [65]. Dabei ist die Wahl der Aufreinigungsmethode von den spezifischen Eigenschaften eines Proteins abhängig und muss zudem unter Aspekten wie dem Erhalt der biologischen Aktivität des Proteins erfolgen.

Eine Übersicht der miniaturisierten chromatographischen Aufreinigungsmethoden befindet sich in Tabelle 10.44.

6.4.2 Prozessanalyse und Systemanforderungen

Zur Entwicklung einer Antikörperaufreinigungsmethode aus einer Zellkulturlösung (Nährmedium + Zellen) werden der am häufigsten eingesetzte IgG-Antikörper sowie die im Capture-Schritt am häufigsten eingesetzte Affinitätschromatographie gewählt. Zur Entfernung von Zellen und groben Verunreinigungen wird vor der selektiveren Aufreinigung mit den miniaturisierten chromatographischen Säulen MabSelectPrismA RoboColumns (200 mg, Cytiva, Uppsala, SE) oder den miniaturisierten chromatographischen Platten MabSelectPrismA PreDictor Plates (6 µl, Cytiva, Uppsala, SE) eine Zentrifugation durchgeführt. Die zu optimierende chromatographische Methode in Abbildung 6.32 besteht aus einem Equilibrierungsschritt mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS-Puffer), der Aufgabe des Zellkulturüberstands, zwei Waschschritten mit PBS- und Natriumacetatpuffer (NaAc) pH 6 sowie einem Elutionsschritt mit NaAc-Puffer pH 3,5. Bei den miniaturisierten Säulen kann im Anschluss eine Aufreinigung des chromatographischen Materials erfolgen, sodass ein erneuter Einsatz der Säulen möglich wird. Die Quantifizierung erfolgt mittels UV-Absorption bei 280 nm (siehe Anhang 10.7.2).

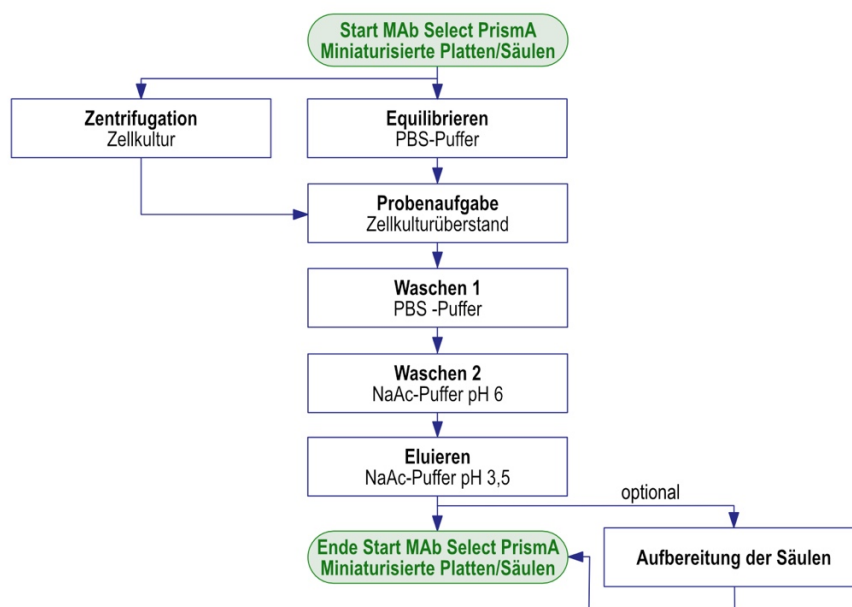


Abbildung 6.32: Ausgangspunkt der Methodenentwicklung Aufreinigung von IgG aus Zellkulturmatrix¹⁶

Die optimierte Aufreinigung mit den RoboColumns beginnt mit der Equilibrierung der Säulen mit 2.400 µl PBS-Puffer (pH 7) in 4 Schritten mit je 600 µl. Im Anschluss erfolgt die Beladung der Säule mit 600 µl des zentrifugierten Zellkulturüberstands. Die Inkubationszeit beträgt 900 Sekunden. Vor der Elution mit 600 µl NaAc-Puffer (pH 3,5) werden die Säulen mit 1.000 µl PBS-Puffer (pH 7) in 2 Schritten und 40 µl NaAc-Puffer (pH 6) gewaschen. Zur Wiederaufbereitung der Säulen werden 200 µl 0,1 M Essigsäure, 600 µl 0,5 M NaOH sowie bei nicht sofortiger Wiederverwendung der Columns 400 µl 20% Ethanol in

¹⁶ Methode in Anlehnung an [448]

H₂O zur Konservierung der Säulen transferiert. Der optimierte, finale Prozessablaufplan für die RoboColumns ist in Abbildung 6.33 rechts dargestellt.

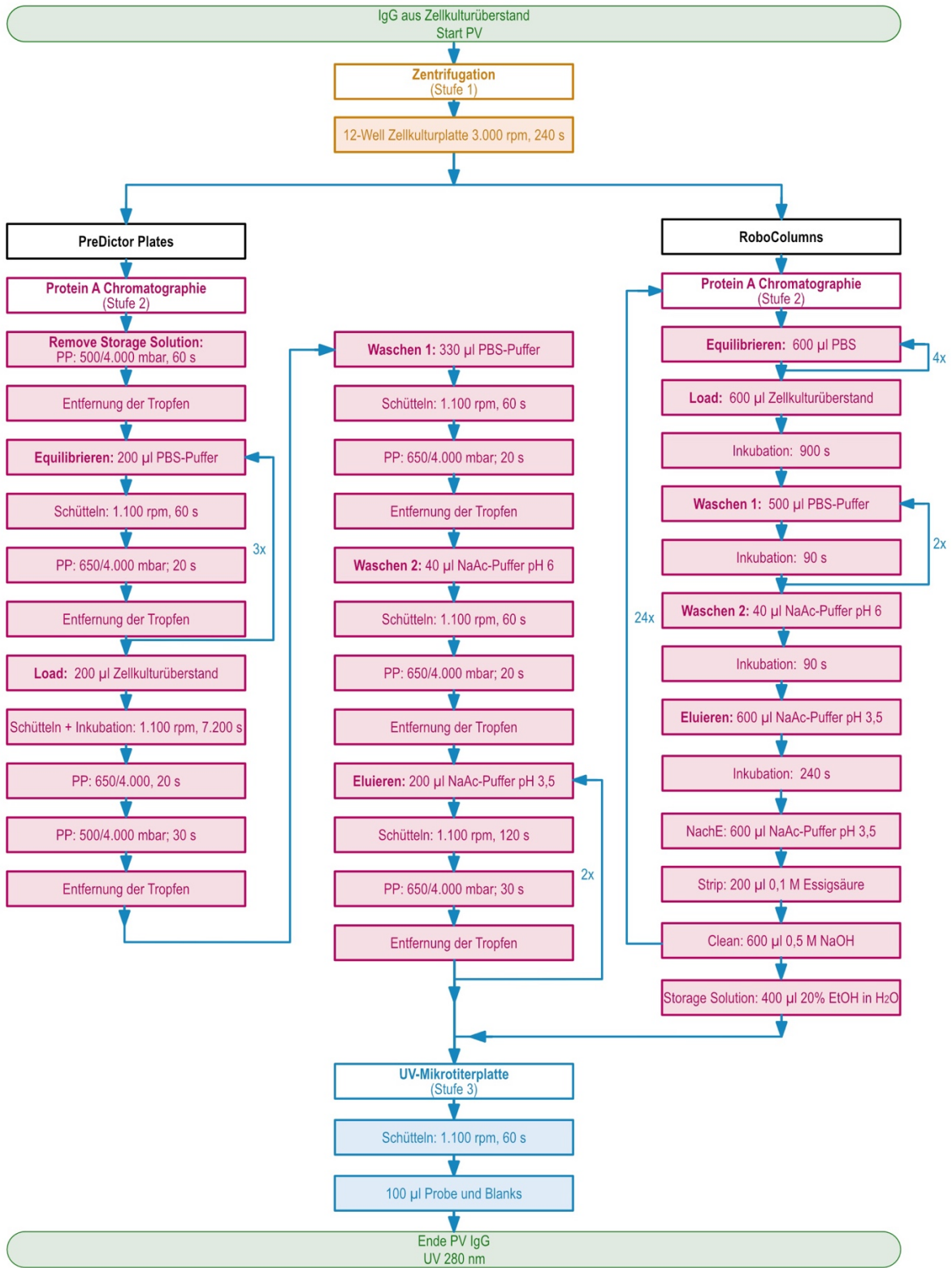


Abbildung 6.33: Prozessablaufpläne der Antikörperaufreinigung mit den RoboColumns und PreDictor Plates

Bei der IgG-Aufreinigung mit den PreDicator Plates werden die in der RoboColumn Methode verwendeten Volumina entsprechend des reduzierten chromatographischen Bettvolumens in den PreDicator Plates skaliert (Abbildung 6.33 links). Die PreDicator Plates werden mit 600 µl PBS-Puffer equilibriert und mit je 330 µl PBS-Puffer und 40 µl NaAc-Puffer pH 6 gewaschen. Bei der Beladung werden 200 µl Probe aufgegeben. Die Inkubationszeit beträgt zwei Stunden. Durch das Schütteln der Platten während der Inkubationszeit wird die Anlagerung des Antikörpers an das chromatographische Material optimiert. Die Elution wird in zwei Schritten mit je 200 µl NaAc-Puffer pH 3,5 durchgeführt. Nach jedem Volumentransferschritt und vor der Filtration mittels Überdruck werden die Platten bei 1.100 rpm für 60 s bis 120 s geschüttelt. Zur Quantifizierung der Proben werden 100 µl des Eluats in beiden Labwarevarianten in eine UV-geeignete MTP umformatiert. Vor der Umformatierung werden die Elutionsfraktionen für 60 s homogenisiert.

Bei den RoboColumns erfolgt der Volumentransfer durch das chromatographische Material mittels Überdruck, welcher bei der Aufgabe durch die Pipettenspitzen erzeugt werden muss. Hierfür sind geeignete Pipettenspitzen notwendig. Die RoboColumns werden ähnlich wie SPE-Kartuschen einzeln durch die Hersteller bereitgestellt. Demzufolge ist für die automatisierte Bearbeitung der RoboColumns eine Lösung erforderlich, die eine Bereitstellung und Bearbeitung der Columns auf dem Deck ermöglicht. Dazu gehört auch die Sammlung der Elutionsfraktionen unter den Columns. Zur vollständigen Entnahme der Proben, welche in 12-Well Zellkulturplatten bereitgestellt werden, müssen diese angeschragt werden. Für die Bearbeitung der PreDicator Plates wird eine Überdruckeinheit benötigt. Nach dem Volumentransfer durch die Platten müssen eventuell anhaftende Tropfen durch das Abtupfen des Bodens auf einem Zellstofftuch entfernt werden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die Entfernung der Tropfen muss auch bei der automatisierten Bearbeitung sichergestellt werden. Weiterhin ist für einen kreuzkontaminationsfreien Transfer die Erhöhung des Abstands zwischen den Ausgängen der PreDicator Plate und den Welleingängen der zur Sammlung des Eluats eingesetzten Deepwellplatte sinnvoll.

In beiden Prozessen sind eine Zentrifuge und ein Schüttler erforderlich. Zudem soll das Automationssystem wie in den vorangegangenen Anwendungen alle bisher manuell durchgeführten Transfer- und Transportschritte sowie die Bereitstellung der Proben- und Lösungsmittel ermöglichen. Die tabellarischen Prozessanalysen befinden sich in Tabelle 6.14 und Tabelle 6.15.

Tabelle 6.14: Prozessanalyse IgG-Aufreinigung aus Zellkulturmatrix mit RoboColumns

Beschreibung Prozessschritt	Ausgangslabware	Ziellabware	Prozess	Anforderung Automationssystem
Zentrifugieren	12-Well Zellkulturplatte	12-Well Zellkulturplatte	Transport zur Zentrifuge, Zentrifuge	Automatisierung des Transports Zentrifugieren Bereitstellung in 12-Well Zellkulturplatte (zentrifugierbar)
Equilibrieren: 4x 600 µl PBS-Puffer	Lösungsmittelflasche	RoboColumns	Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel, Reduktion der Evaporation Bereitstellung der RoboColumns auf dem Deck Bearbeitung der RoboColumns
Entnahme des Überstands/ Probenaufgabe 600 µl	Zellkulturflasche	RoboColumns	Transfer, Anschlägen der Labware	Automatisierung des Transfers Automatisierung des Kippprozesses
Waschen 1: 2x 500 µl PBS-Puffer	Lösungsmittelflasche	RoboColumns	Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Waschen 2: 40 µl NaAc-Puffer pH 6	Lösungsmittelflasche	RoboColumns	Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Eluieren: 600 µl NaAc-Puffer pH 3,5	Lösungsmittelflasche	RoboColumns 96-Deepwellplatte	Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Transfer des Eluats in 384-Well UV Platte für Analyse, Normalisierung des Volumens (100 µl), Transfer der Blanks und des Standards	96-Deepwellplatte 1,5 ml Standard Vial	384-Well UV-Platte	Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung des Standards auf dem Deck in 1,5 ml Vials
Aufbereitung der Säulen	Lösungsmittelflasche	RoboColumns	Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel

Tabelle 6.15: Prozessanalyse IgG-Aufreinigung aus Zellkulturmatrix mit PreDicator Plates manuell

Beschreibung Prozessschritt	Ausgangslabware	Ziellabware	Manueller Prozess	Anforderung Automationsystem
Zentrifugieren	12-Well Zellkulturplatte	12-Well Zellkulturplatte	Manueller Transport zur Zentrifuge, Zentrifuge	Automatisierung des Transports Zentrifugieren Bereitstellung der 12-Well Zellkulturplatte (zentrifugierbar)
Entfernung der Storage Solution	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Entfernung von Tropfen	-	PreDicator Plate Tuch	Manueller Transport	Automatisierung des Transports Automatisierte Entfernung von Tropfen, Bereitstellung Tuch auf dem Deck
Equilibrieren: 3x 200 µl PBS-Puffer	Lösungsmittelflasche	PreDicator Plate	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel, Reduktion der Evaporation
Schütteln	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, MTP-Schüttler	Automatisierung des Transports Automatisiertes Schütteln
Druckaufgabe	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Entfernung von Tropfen	-	PreDicator Plate Tuch	Manueller Transport	Automatisierung des Transports Automatisierte Entfernung von Tropfen, Bereitstellung Tuch auf dem Deck
Entnahme des Überstands/ Probenaufgabe 200 µl	12-Well Zellkulturplatte	PreDicator Plate	Manueller Transfer, Neigung der Labware	Automatisierung des Transfers Automatisierung des Kippprozesses
Inkubieren/ Schütteln	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, MTP-Schüttler	Automatisierung des Transports Automatisiertes Schütteln
Druckaufgabe	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Entfernung von Tropfen	-	PreDicator Plate Tuch	Manueller Transport	Automatisierung des Transports Automatisierte Entfernung von Tropfen, Bereitstellung Tuch auf dem Deck
Waschen 1: 3x 200 µl PBS-Puffer	Lösungsmittelflasche	PreDicator Plate	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Schütteln	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, MTP-Schüttler	Automatisierung des Transports Automatisiertes Schütteln
Druckaufgabe	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Entfernung von Tropfen	-	PreDicator Plate Tuch	Manueller Transport	Automatisierung des Transports Automatisierte Entfernung von Tropfen, Bereitstellung Tuch auf dem Deck
Waschen 2: 40 µl NaAc-Puffer pH 6	Lösungsmittelflasche	PreDicator Plate	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel
Schütteln	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, MTP-Schüttler	Automatisierung des Transports Automatisiertes Schütteln
Druckaufgabe	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Entfernung von Tropfen	-	PreDicator Plate Tuch	Manueller Transport	Automatisierung des Transports Automatisierte Entfernung von Tropfen, Bereitstellung Tuch auf dem Deck
Eluieren: 2x 200 µl NaAc-Puffer pH 3,5	Lösungsmittelflasche	PreDicator Plate 96-Well Platte	Manueller Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung Lösungsmittel Erhöhung des Abstands zwischen den Platten im Stack
Schütteln	-	PreDicator Plate	Manueller Transport, MTP-Schüttler	Automatisierung des Transports Automatisiertes Schütteln
Druckaufgabe	-	PreDicator Plate 96-Well Platte	Manueller Transport, 96-Well Platten-Manifold	Automatisierung des Transports Druckaufgabe
Entfernung von Tropfen	-	PreDicator Plate Tuch	Manueller Transport	Automatisierung des Transports Automatisierte Entfernung von Tropfen, Bereitstellung Tuch auf dem Deck
Transfer des Eluats in 384-Well UV Platte für Analyse, Normalisierung des Volumens (100 µl), Transfer der Blanks und des Standards	96-Well Platte	384-Well UV-Platte	Transfer	Automatisierung des Transfers Bereitstellung des Standards auf dem Deck in 1,5 ml Vials

6.4.3 Anforderungsanalyse und Systemrealisierung

Die aus der Prozessanalyse stammenden Anforderungen an das Automationssystem sowie die automatisierten Lösungen sind in Tabelle 6.16 zusammengefasst. Die Anforderungen 1 bis 7 sind durch das allgemeingültige Automationssystem erfüllt. Zur Realisierung der Anforderungen 8, 9 und 10 wird spezialisierte Labware benötigt.

Tabelle 6.16: Überprüfung der Anforderungen an das Automationssystem für die IgG-Aufreinigung

Nr.	Anforderung	Erfüllt durch allgemeingültiges Automationssystem?	Lösung:	Zusatzmodul/ spezialisierte Labware	Erfüllt durch allgemeingültiges Automationssystem mit Speziallabware?
1	Automatisierung des Transfers und des Transports	✓	Biomek i7 Workstation		✓
2	Bereitstellung der Lösungsmittel, Reduzierung der Evaporation	✓	Self-Refilling Quarter Reservoir		✓
3	Bereitstellung und Bearbeitung der RoboColumns	✓	Einbau des Zusatzmoduls: RoboColumn Unit Einbau der festen Pipettenspitzen		✓
4	Druckaufgabe PreDicator Plates	✓	Positive Pressure Unit		✓
5	Zentrifugieren	✓	VSpin Zentrifuge		✓
6	Automatisierung des Neigung/ des Kippprozesses der Zellkulturplatten	✓	3D-Tilting ALP		✓
7	Homogenisieren/Schütteln	✓	Shaking Peltier ALP		✓
8	Entfernung von Tropfen	X	Entwicklung eines Blotting Adapters		✓
9	Abstandserhöhung	X	Entwicklung eines Spacer Adapters		✓
10	Bereitstellung 1,5 ml Standard Vials	X	Entwicklung eines Racks für 1,5 ml Standard Vials		✓

Der automatisierte Transport von Labware und der Transfer von Flüssigkeiten wird durch die Biomek i7 Hybrid Workstation erfüllt (Anforderung 1). Zur Bereitstellung der Lösungsmittel unter Reduktion der Evaporation wird das Self-Refilling Quarter Reservoir genutzt (Anforderung 2). Die Bearbeitung der RoboColumns erfolgt mit dem flexibel integrierbaren Gerät RoboColumn Unit (siehe Abschnitt 4.3.2) und den festen Pipettenspitzen (Anforderung 3, Abbildung 6.38).

Der Puffer- und Probentransfer bei den PreDicator Plates wird mittels Überdruck durch die integrierte Positive Pressure Unit realisiert (Anforderung 4). Die IgG-Zellkulturproben werden in 12-Well Zellkulturplatten auf dem Deck der Biomek i7 Workstation bereitgestellt. Die Zentrifugation der 12-Well Zellkulturplatten wird durch die integrierte VSpin Zentrifuge ermöglicht (Anforderung 5). Die Neigung der Zellkulturplatten zur Sammlung des Zellkulturüberstands in einer Ecke der großflächigen Wells vereinfacht die Entnahme des Zellkulturüberstands und wird durch das integrierte 3D-Tiltung ALP realisiert (Anforderung 6, Abbildung 6.38). Das Schütteln der PreDicator Plates erfolgt auf dem Shaking Peltier ALP (Anforderung 7).

Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen werden zwischen den Transferschritten eventuell am Boden der PreDicator Plates anhaftende Tropfen durch das Abstreifen (Abtupfen) der Tropfen auf einem Zellstofftuch entfernt. Das Zellstofftuch wird mithilfe eines speziell entwickelten Niederhalters auf dem Deck bereitgestellt (Anforderung 8, Abbildung 6.34).

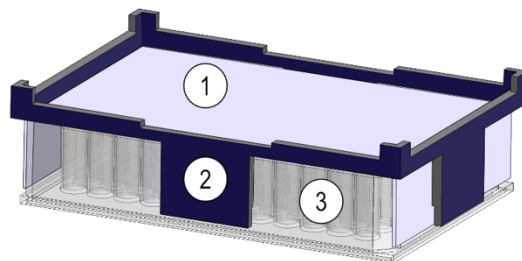


Abbildung 6.34: Blotting Rack (Stack aus (1) Zellstofftuch, (2) Niederhalter und (3) 96-Well-MTP, 350 μ l)

Weiterhin wird zur Erhöhung der Positioniergenauigkeit zwischen der PreDicator Plate und der Elutionsplatte sowie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen ein Spacer-Adapter entwickelt und im Stack zwischen PreDicator Plate und Elutionsplatte zur Abstandserhöhung eingesetzt (Anforderung 9, Abbildung 6.35).



Abbildung 6.35: Spacer Adapter

Der Standard wird in 1,5 ml Standard Vials im Rack für 1,5 ml Standard Vials auf dem Deck der Biomek i7 Workstation bereitgestellt (Anforderung 10, siehe Abbildung 6.6).

Die Decklayouts der RoboColumn- und PreDicator Plates sind in Abbildung 6.36 und Abbildung 6.37 dargestellt. In der vorliegenden Konfiguration können mit den RoboColumns bis zu 288 Proben und mit den PreDicator Plates bis zu 192 Proben in einem Durchlauf vorbereitet werden. Die tabellarischen Prozessablaufpläne sowie die Materialverzeichnisse befinden sich in Anhang 10.7.1. Die Quantifizierung erfolgt optisch mittels UV-Absorption bei 280 nm. Die Methodenparameter der messtechnischen Bestimmung befinden sich in Anhang 10.7.2. In Abbildung 6.38 sind Aufnahmen des realisierten Systems dargestellt.

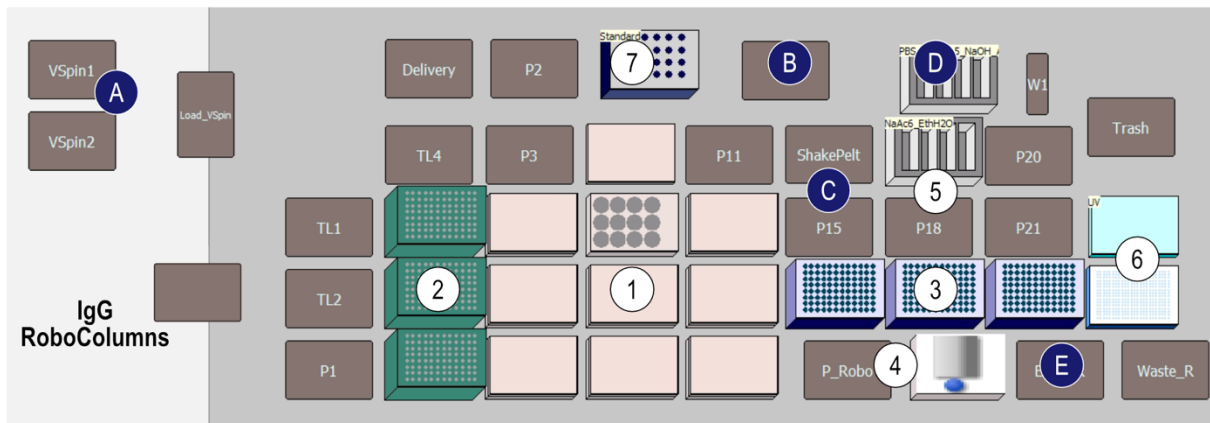


Abbildung 6.36: Decklayout Antikörperaufreinigung mit RoboColumns für bis zu 288 Proben

(A) Zentrifuge; (B) 3D-Tilting ALP; (C) Shaker; (D) Self-Refilling Quarter Reservoir; (E) RoboColumn Unit

(1) 12-Well Zellkulturplatte mit Lid; (2) 230 µl Pipettenspitzen; (3) Brand 96-Deepwell Platte; (4) Mab Select Prisma RoboColumns

(200 mg), aufreinigbar; (5) Quarter Reservoir; (6) 384-Well UV Star MTP + Lid; (7) Aluminium Rack mit Standard in 1,5 ml Vial

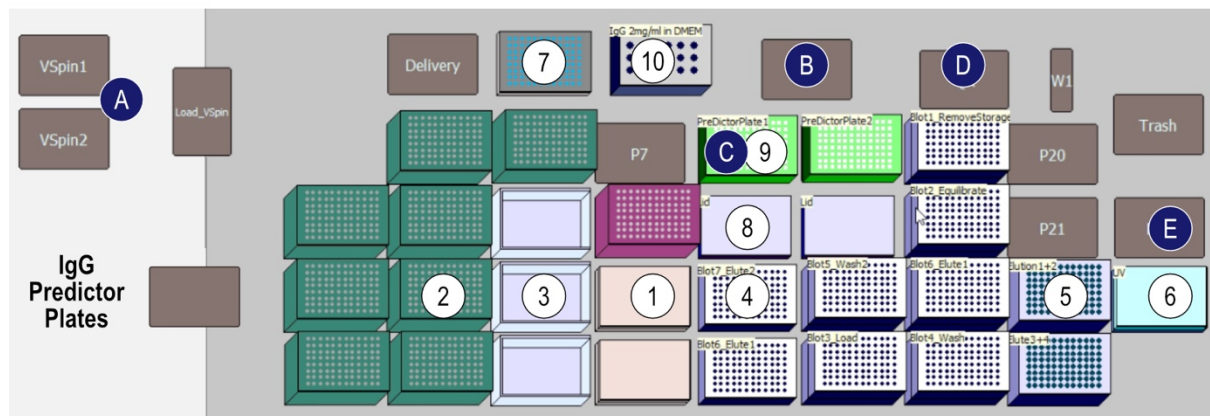


Abbildung 6.37: Decklayout Antikörperaufreinigung mit PreDictor Plates für bis zu 192 Proben

(A) Zentrifuge; (B) 3D-Tilting ALP; (C) Shaker; (D) Self-Refilling Quarter Reservoir; (E) Positive PrePressure Unit

(1) 12-Well Zellkulturplatte mit Lid; (2) 230 µl Pipettenspitzen; (3) Nunc Full Reservoir; (4) Blotting Rack (Tuch + Niederhalter + 96-

Well-MTP, 350 µl); (5) 96-Well Elutionsplatte mit Spacer Adapter; (6) 384-Well UV Star MTP + Lid; (7) 96-Well-MTP; (8) Lid PreDictor

Plate; (9) Mab Select Prisma PreDictor Plate (6 µl), (10) Aluminium Rack mit 1,5 ml Standard Vials

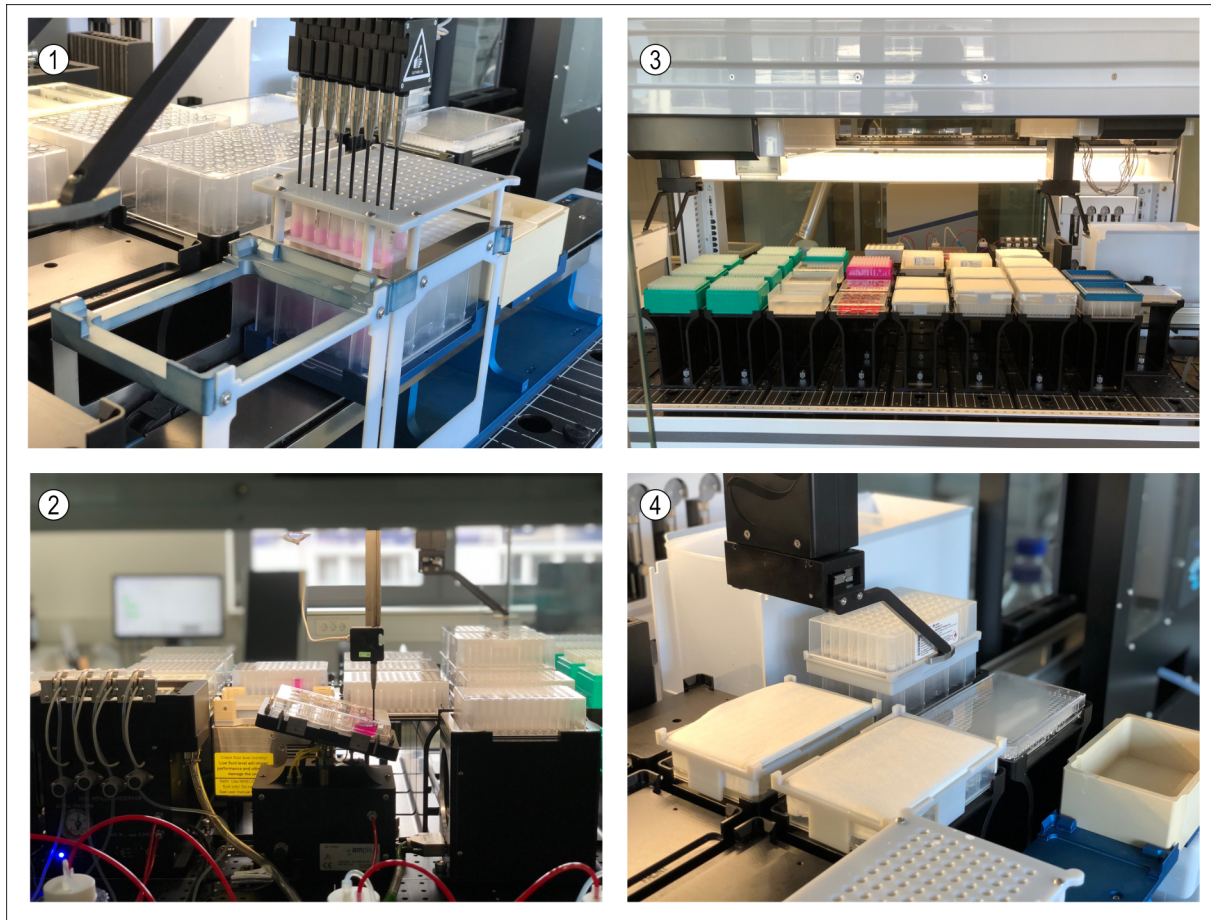


Abbildung 6.38: (1) Load Schritt RoboColumns auf RoboColumn Unit mit Niederhalter; (2) Entnahme des Überstands mit dem Span-8 Pod aus 12-Well Zellkulturplatte auf 3D-Tilting ALP; (3) Deck Predictor Plate Methode; (4) Transport PreDictor Plate zur Positive Pressure Unit - Stack aus Deepwell Elutionsplatte, Spacer Adapter und 96-Well PreDictor Plate

6.4.4 Systemüberprüfung – Aufreinigung von Antikörpern

6.4.4.1 Ergebnisse der Validierung der IgG-Extraktion

Zur Bewertung der Qualität der entwickelten automatisierten Antikörperaufreinigungsmethoden mit den PreDicator Plates und den RoboColumns werden diese entsprechend Abschnitt 5.1 validiert.

Mit den PreDicator Plates wird neben der Validierung der automatisierten Aufreinigung auch eine manuelle Aufreinigung durchgeführt und geprüft. Die Probenzahl in den Validierungen wird an die acht in einer Reihe und parallel mit den Span-8 bearbeitbaren Positionen der RoboColumns angepasst.

Bei der manuellen IgG Aufreinigung mit den PreDicator Plates beträgt der Variationskoeffizient der Messpräzision der UV-Absorption bei 280 nm 0,45% (siehe Abbildung 10.19). Die mit 16 Proben ermittelte Wiederfindungsrate beträgt im Mittel 90,09% mit einer Spanne von 81,99% bis 98,76% und einem CV von 5,68% (siehe Abbildung 6.39). Die durch die Vorbereitung von 8 Proben an 5 verschiedenen Tagen ermittelten mittleren Wiederfindungsraten der laborinternen Vergleichspräzision liegen zwischen 85,98% und 90,6% mit CVs zwischen 3,87% und 4,90% (siehe Abbildung 10.20). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen werden experimentell bestimmt und betragen 0,08 mg/ml und 0,2 mg/ml bei der manuellen Aufreinigung von IgG aus einer Zellkultur. Die analytischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind bedingt durch das doppelte Elutionsvolumen um die Hälfte reduziert und betragen 0,04 mg/ml und 0,10 mg/ml.

Der CV der Messpräzision der automatisierten IgG-Aufreinigung mit den PreDicator Plates beträgt 0,51% sowie 0,65% bei der automatisierten Aufreinigung mit den RoboColumns. Die Wiederfindungsrate der automatisierten IgG-Aufreinigung mit den PreDicator Plates beträgt im Mittel 84,71% mit einer Spanne von 74,38% und 96,62% und einem CV von 6,24%. Die mittleren Wiederfindungsraten, die im Rahmen der laborinternen Vergleichspräzision der automatisierten IgG-Aufreinigung mit den PreDicator Plates ermittelt wurden, liegen zwischen 80,61% und 90,32% und CVs zwischen 5,24% und 6,19%. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der automatisierten Extraktion von IgG aus einer Zellkultur mit den PreDicator Plates betragen 0,06 mg/ml und 0,17 mg/ml. Die analytischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen betragen 0,03 mg/ml und 0,08 mg/ml. Während der Methodenentwicklung wurde beobachtet, dass sowohl die Inkubationsdauer als auch das Schütteln während der Inkubationszeit einen entscheidenden Einfluss auf die Wiederfindungsraten besitzen. Dies stimmt mit Angaben des Herstellers überein [449].

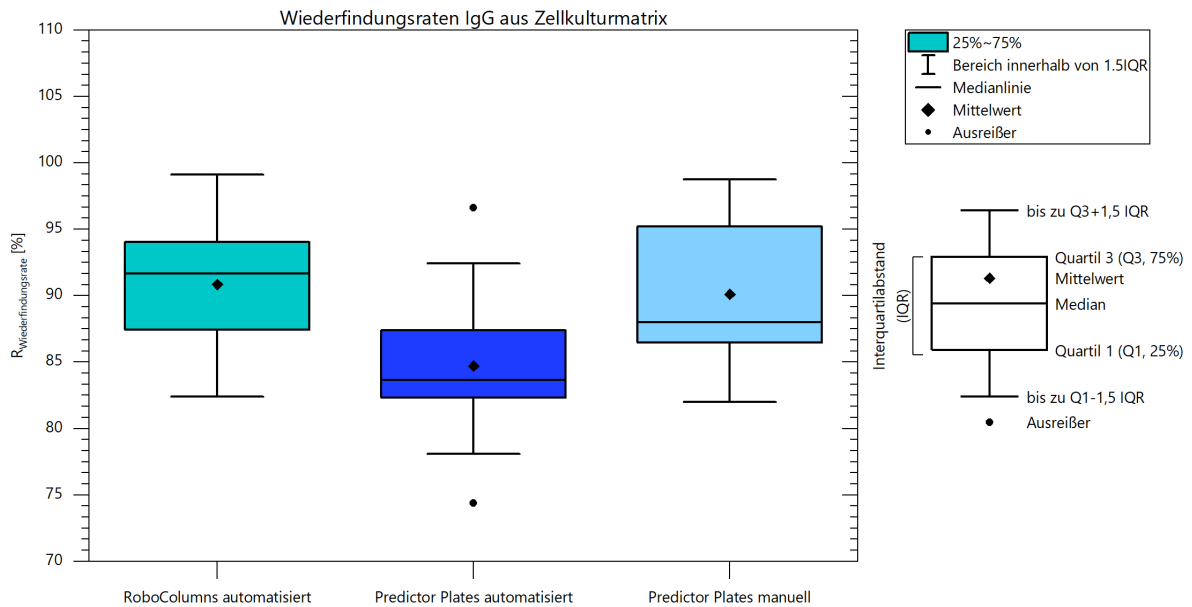


Abbildung 6.39: Wiederfindungsraten IgG aus Zellkulturmatrix

Die mittlere Wiederfindungsrate der automatisierten Aufreinigung von IgG mit den RoboColumns ist mit 90,85% und einer Spanne von 82,40% bis 99,13% am höchsten. Der CV beträgt 5,28%. Die CVs der laborinternen Vergleichspräzision mit den RoboColumns liegen zwischen 3,39% und 6,74%. Die zugehörigen mittleren Wiederfindungsraten liegen zwischen 84,85% und 93,64%. Bei der Aufreinigung von IgG aus einer Zellkultur mit den RoboColumns ist das einfache Elutionsvolumen ausreichend, um den in der Säule gebundenen Antikörper zu lösen, wodurch keine Unterscheidung zwischen analytischer und methodischer Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen betragen 0,03 mg/ml und 0,07 mg/ml. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse befindet sich in Anhang 10.7.3 in Tabelle 10.50 entsprechend [290].

Insgesamt sind die Wiederfindungsraten der manuellen und automatisierten Aufreinigung von IgG labwareunabhängig mit Werten zwischen 74,38% und 99,13% hoch und im Bereich vergleichbarer Aufreinigungsmethoden ([446]=80%, [447]=77% und vgl. Tabelle 10.44 [450]). Die ermittelten Variationskoeffizienten liegen zwischen 3,39% und 6,74% und zeigen die hohe Präzision der Aufreinigungsmethoden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der automatisierten Aufreinigung mit den PreDictor Plates und den RoboColumns sind kleiner als 0,17 mg/ml und für die sensitive, schnelle Bestimmung des IgG-Gehalts einer Zellkultur, typischerweise im Bereich zwischen 1 mg/ml und 10 mg/ml, geeignet [451-453]. Auch für die Aufreinigung von Serumproben sind die ermittelten Grenzen ausreichend sensitiv, da der IgG-Serumtiter i.d.R. bei 10 mg/ml liegt [416].

6.4.4.2 Ergebnisse der Überprüfung der Wirtschaftlichkeit der Antikörperaufreinigung

Mit den RoboColumns können pro Durchlauf bis zu 288 Proben vorbereitet werden. Aufgrund der Bearbeitung mit dem Span-8 Pod und der nachfolgenden Aufreinigung der wiederverwendbaren Säulen beträgt die Durchlaufzeit 46,8 h. Die Vor- und Nachbereitungszeit beträgt 0,58 h. Mit dem System können jährlich bis zu 28.800 Antikörperproben aufgereinigt werden. Die Kosten pro Probe betragen 5,33 €. Der Kapitalwert ist positiv und die Amortisationsdauer beträgt 2,34 Jahre.

Das für die PreDicator Plates entwickelte Decklayout ermöglicht die Vorbereitung von bis zu 192 Proben pro Durchlauf. Die parallele Bearbeitung mit dem MC-Pod führt zu einer Durchlaufzeit von 4,42 h, zusätzlich fallen 0,58 h für die Vor- und Nachbereitung an. Der geringe Zeitbedarf ermöglicht einen jährlichen Durchsatz von 230.400 Antikörperproben. Die Kosten pro Probe betragen 4,37 €. Der hohe positive Kapitalwert von 9.178.332,19 € sowie das niedrige Investitionsrisiko, bedingt durch eine Amortisationsdauer von 0,25 Jahren, sprechen für eine Automatisierung mit den Predictor Plates.

Bei der manuellen Bearbeitung von 192 Antikörperproben mit den PreDicator Plates beträgt die Durchlaufzeit 4,30 h mit einer Vor- und Nachbereitungszeit von 0,58 Stunden, was zu einem jährlichen Durchsatz führt, der dem der automatisierten Methode entspricht. Die Kosten pro Probe sind mit 5,60 € aufgrund der höheren Personalkosten von 468.480,00 € höher als bei der automatisierten Durchführung, bei der die Personalkosten 55.680,00 € betragen. Der Kapitalwert ist ebenfalls positiv, wobei der Kapitalwert der automatisierten Antikörperaufreinigung mit den PreDicator Plates am höchsten ist (siehe Abbildung 6.40). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Wirtschaftlichkeitsbetrachtung befindet sich in Anhang 10.7.4 in Tabelle 10.51.

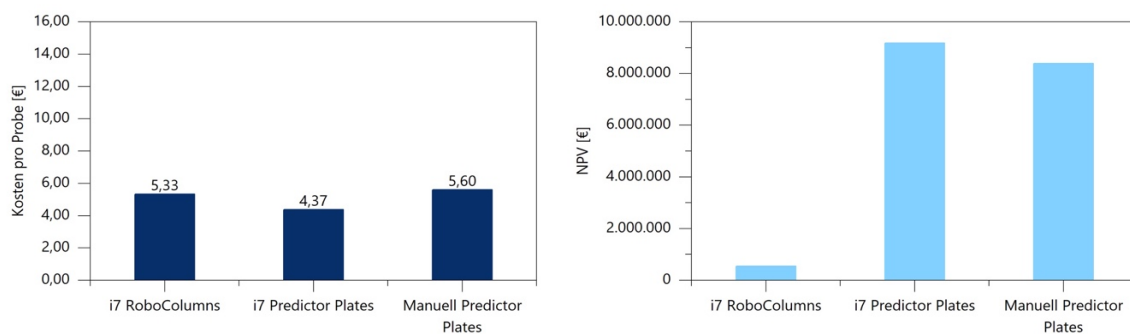


Abbildung 6.40: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit IgG: Kosten pro Probe (links) und Kapitalwerte (rechts) für die automatisierte Bearbeitung der RoboColumns sowie die automatisierte und manuelle Bearbeitung der Predictor Plates

6.4.4.3 Ergebnisse der Überprüfung der Nachhaltigkeit der Antikörperaufreinigung

Die Automatisierung der Antikörperaufreinigung steigert die Nachhaltigkeit von 0,57 auf 0,73 bzw. 0,59, beispielsweise durch die Reduktion der Mitarbeiteranwesenheit im Labor, um bis zu 99%. Sowohl bei den PreDicator Plates als auch bei den RoboColumns ist der Anteil wässriger Lösungsmittel hoch. Beim Einsatz der RoboColumns ist der Anteil nicht nachhaltiger Reagenzien durch den Einsatz von Essigsäure und Natriumhydroxid zur Aufbereitung der Columns 7% höher als mit den PreDicator Plates. Die Aufbereitung der RoboColumns führt jedoch auch zu einer Steigerung des Anteils wiederverwendbarer Labware von 4% auf 27% sowie zu einer Reduktion des Plastikabfalls von 8,62 g pro Probe mit den PreDicator Plates auf 4,2 g mit den RoboColumns. Die RoboColumns werden aufgrund eines Sorbentbettvolumens von 200 µl trotz der Bezeichnung als nicht miniaturisiert gewertet, wohingegen die Predictor Plates mit einem Sorbentbettvolumen von 6 µl miniaturisiert sind (vgl. Abschnitt 5.3). Insgesamt stellen in diesem Bewertungsschema die PreDicator Plates mit einem Nachhaltigkeitsindex von 0,73 im Vergleich zu den RoboColumns mit 0,59 durch die geringere Durchlaufzeit und die weitere Miniaturisierung des Sorbentbetts, einhergehend mit einer weiteren Reduzierung der eingesetzten Lösungsmittel- und Probenvolumina, die nachhaltigere Lösung dar. In Tabelle 6.17 sind die normalisierten Ergebnisse der Nachhaltigkeitsüberprüfung zusammengefasst. Tabelle 10.52 enthält die nicht normalisierten Werte.

Tabelle 6.17: Ergebnisse Nachhaltigkeit IgG-Aufreinigung

Kategorie Nachhaltigkeit	Automatisiert 288 Proben RoboColumns	Automatisiert 192 Proben PreDicator Plates	Manuell 192 Proben PreDicator Plates
Miniaturisierung und Automatisierung	0,50	1	0,50
Probenvolumen	0,72	0,88	0,88
Mitarbeitersicherheit	0,99	0,88	0,00
Durchlaufzeit pro Probe	0,39	0,86	0,87
Einsatz schädlicher Lösungsmittel	0,66	0,98	0,98
Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel	0,83	0,91	0,91
Abfallvolumen	0,43	0,57	0,57
Plastikabfall	0,50	0,41	0,41
Wiederverwendbare Labware	0,27	0,04	0,04
Nachhaltigkeitsindex	0,59	0,73	0,57

7. Bewertung des Gesamtsystems

7.1 Qualität des allgemeingültigen Automationssystems

Anhand der vorgestellten Anwendungen konnte gezeigt werden, dass das entwickelte System für die Automatisierung von Probenvorbereitungsmethoden aus verschiedenen bioanalytischen Bereichen, wie der Forensik, Proteomik und Umweltanalytik, geeignet ist. Durch die Integration von Zusatzkomponenten in eine Liquid Handling Workstation sowie der Entwicklung von Speziallabware wurde ein Automationssystem entwickelt, was die vollständige Automatisierung der komplexen bioanalytischen Probenvorbereitungsprozesse ermöglicht, auf verschiedenste Probenvorbereitungsprozesse anwendbar und somit „allgemeingültig“ ist.

Die Ergebnisse der Validierungen zeigen die hohe Präzision und die hohen Wiederfindungsraten der entwickelten automatisierten Probenvorbereitungsmethoden, die je nach Anwendung im Mittel zwischen 71% und 106% liegen mit einem Median von 93% (vgl. Abbildung 7.1).

Die höchste Präzision wird bei der Extraktion von Cannabinoiden aus Serumproben erzielt. Dies belegt, dass die Probenvorbereitungsmethode optimal an die drei Analyten angepasst wurde. Bei der Extraktion von Cannabinoiden aus Urinproben sind die mittleren Wiederfindungsraten mit 84% bis 91% geringer, was auf eine verminderte Stabilität der Analyten durch während der Hydrolyse eingebrachte Substanzen zurückgeführt wird [350]. Bei der Extraktion von Cannabinoiden aus Speichelproben ist die Streuung höher (ca. 4%) als bei der Extraktion aus Serumproben. Die Wiederfindungsraten entsprechen nahezu 100%. Dies wird auf die auf Stufe zwei des Probenvorbereitungsprozesses verkürzte Probenvorbereitungsmethode zurückgeführt, da das gleiche Sorbentmaterial verwendet wurde und geringere Verluste bei leicht erhöhten Variationskoeffizienten durch nicht entfernte Matrixbestandteile erwartbar sind. Ähnliche Effekte wurden in der Literatur beobachtet [358, 369].

Die Effekte zeigen sich auch bei der Extraktion von Benzodiazepinen aus Serumproben ohne und mit Proteinfällung (Platten, Kartuschen). Die höhere Analytanzahl in dieser Anwendung ($n = 8$ im Vgl. zu $n = 3$ bei den Cannabinoiden) führt zu einer geringeren Anpassbarkeit der Probenvorbereitungsmethode auf den einzelnen Analyten. Dies kann zu einzelnen Ausreißern und höheren Variationskoeffizienten führen, da die Analyten trotz struktureller Ähnlichkeit Polaritätsunterschiede aufweisen [330]. Die Präzision der entwickelten Benzodiazepinaufreinigungsmethoden ist mit Variationskoeffizienten von weniger als 7% dennoch hoch und mit in der Literatur berichteten Werten vergleichbar (siehe Abschnitt 6.3.4.1 und 6.1.4.1). Bei der Benzodiazepinextraktion ohne Proteinfällung mit den Strata X Platten ist die mittlere Wiederfindungsrate von Lorazepam mit $R = 106\%$ erhöht und könnte auf Ionenverstärkungseffekte durch nicht entfernte Matrixbestandteile zurückgeführt werden. Bei Hinzunahme der Proteinfällung mit den Strata X Kartuschen normalisiert sich die Wiederfindungsrate von Lorazepam. Gleichzeitig sinkt die mittlere Wiederfindungsrate von Temazepam unter 80%. Matrixeffekte auf Temazepam und Lorazepam werden auch in der Literatur beobachtet [328, 330]. Zur Erhöhung der Qualität dieser Anwendungen sollte für diese Analyten eine spezifischere Methode entwickelt werden.

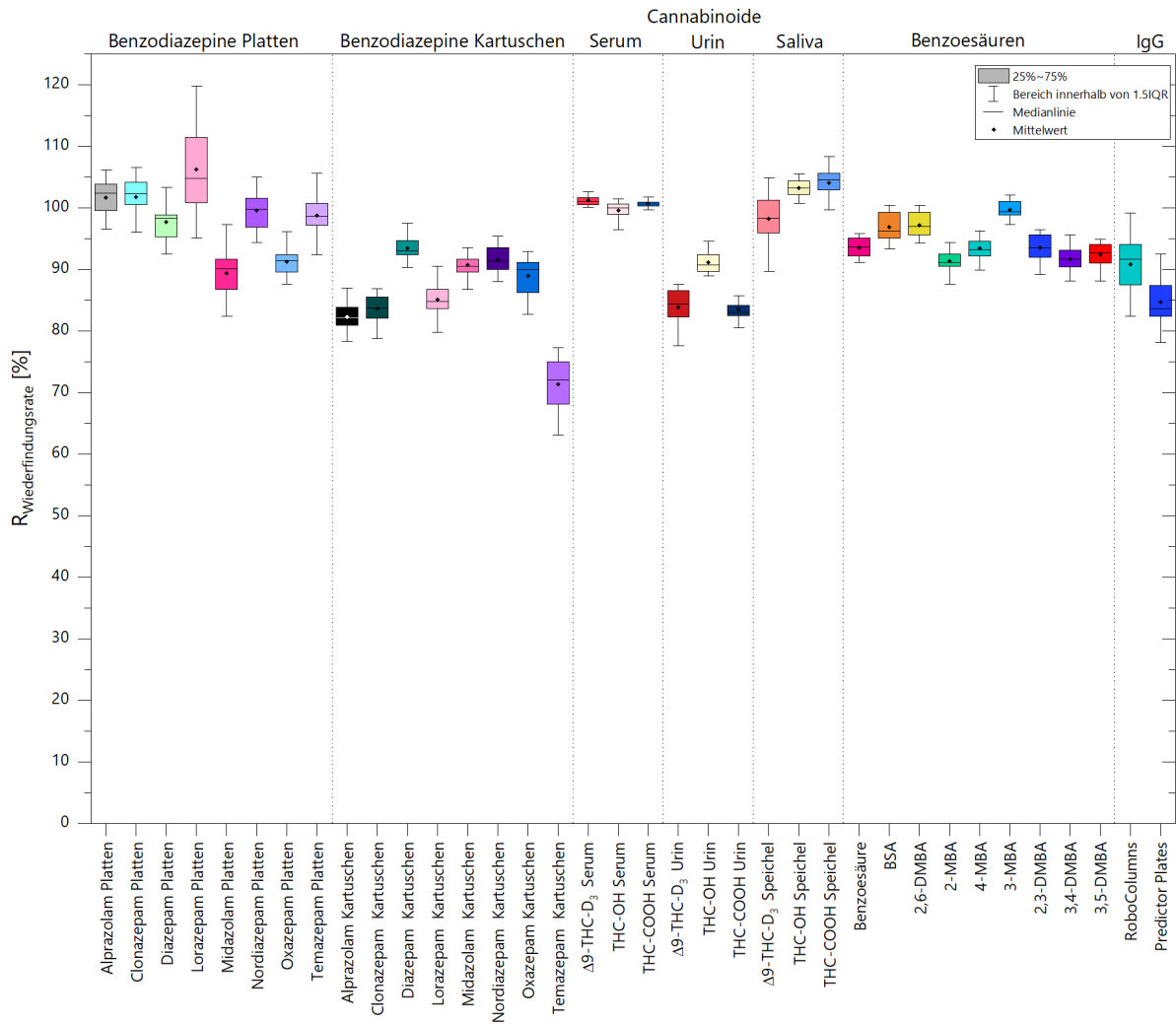


Abbildung 7.1: Zusammenfassung der Validierungsergebnisse der Anwendungen (Wiederfindungsrate)

Bei der Bestimmung von Benzoessäuren aus Wasserproben ist die Probenvorbereitungsmethode ebenfalls auf Stufe 2 des Probenvorbereitungsprozesses verkürzt und die Analytanzahl mit $n = 9$ Analyten hoch. Da die verwendeten Wasserproben jedoch sehr rein sind und die Probenvorbereitung eher einer Aufkonzentration entspricht, sind die erzielten hohen Wiederfindungsraten bei vergleichsweise geringer Streuung ($CV \leq 2,3\%$) erwartbar.

Bei der IgG-Bestimmung aus Zellkultur kann die Komplexität der Matrix die höheren Variationskoeffizienten von 6% erklären. Das Hinzufügen weiterer chromatographischer Polishing-Schritte könnte zu einem Absinken des Variationskoeffizienten führen. Die mittleren Wiederfindungsraten von 84% bei den PreDictor Plates und 90% bei den RoboColumns sind hoch und mit in der Literatur berichteten Wiederfindungsraten von 65% bis 70% sowie 80% für 96-Well-Filterplatten und 87% bis 102% für miniaturisierte Säulen vergleichbar [442, 446, 439]. Die höheren Wiederfindungsraten der RoboColumns werden auf das höhere Bindungsvermögen des größeren Sorbentbettvolumens zurückgeführt.

In allen Anwendungen wird mit den entwickelten, automatisierten Probenvorbereitungsmethoden die für den Nachweis des Analyten aus der jeweiligen Matrix mit der gewählten analytischen Technik notwendige Sensitivität erreicht. Die Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur berichteten Werten überein (vgl. jeweiliger Abschnitt sowie Tabelle 10.5, Tabelle 10.20, Tabelle 10.35 und Tabelle 10.44). Die im Rahmen der Validierungen ermittelten hohen Wiederfindungsraten sowie die hohe Präzision, Sensitivität und Reproduzierbarkeit weisen insgesamt auf die hohe Qualität der entwickelten, automatisierten Probenvorbereitungsmethoden hin und erlauben den Eingang der Anwendungen in das allgemeingültige Automationssystem.

7.2 Wirtschaftlichkeit des allgemeingültigen Automationssystems

Mit den Überprüfungen der Wirtschaftlichkeit der einzelnen Anwendung in den vorangegangenen Abschnitten 6.1.4.3, 6.2.4.4, 6.3.4.2 und 6.4.4.2 wurde bereits die ökonomische Vorteilhaftigkeit der automatisierten Durchführung im Vergleich zur manuellen Durchführung anhand der Kosten pro Probe, des Kapitalwerts sowie der Amortisationsdauer belegt. Die Berechnungen wurden unter Maximierung des Durchsatzes bzw. der Volllastung des Systems mit einer Anwendung durchgeführt. Dies führt zu einer starken Abhängigkeit der Wirtschaftlichkeit des Systems von der Auslastung bzw. vom realen Bedarf an vorzubereitenden Proben. Die Generierung und Abschätzung des Bedarfs sind eine Herausforderung in kleinen und mittleren Laboren und wesentlicher Bestandteil des wirtschaftlichen Betriebs eines Automationssystems. Der flexible, bedarfsgerechte Betrieb von Automationssystemen ist somit entscheidend und führte zum Entwurf des allgemeingültigen Automationssystems, mit dem die verschiedensten Anwendungen und Proben entsprechend des Bedarfs bearbeitet werden können.

Aufgrund der Nicht-Existenz eines realen Bedarfs bzw. der Unbekanntheit des realen Bedarfs im Rahmen der Entwicklung des Konzepts des allgemeingültigen Automationssystems sowie der starken Variation von Labor zu Labor wird die Wirtschaftlichkeit des entworfenen Systems für die drei Fälle (1) der optimalen Auslastung des Systems bei Bedarfsüberschuss, (2) der benötigten Auslastung des Systems zur Erzielung eines positiven Kapitalwerts in Periode 3 (Break-Even-Analyse) sowie (3) für den Fall der Auslastung mit einem Bedarf entsprechend einer negativen Rangfolgeordnung untersucht.

Bei Anwendungen mit verschiedenen Labwareformaten wird die Entscheidung über die Durchführung, den Eingang in das Automationssystem und in die Produktionsprogrammplanung aufgrund vergleichbarer qualitativer Ergebnisse auf Basis der Kosten pro Probe getroffen (siehe Abbildung 7.2). Demzufolge werden die Planung, Bewertung und Optimierung des allgemeingültigen Automationssystems für die Benzodiazepinextraktion mit den Strata X Platten, die Cannabinoidaufreinigung aus Serum, Urin und Speichel mit den Strata X-C μ Elutionsplatten, die Benzoesäureextraktion mit den Strata X-A Kartuschen sowie die IgG Aufreinigung mit den PreDicator Plates vorgenommen.

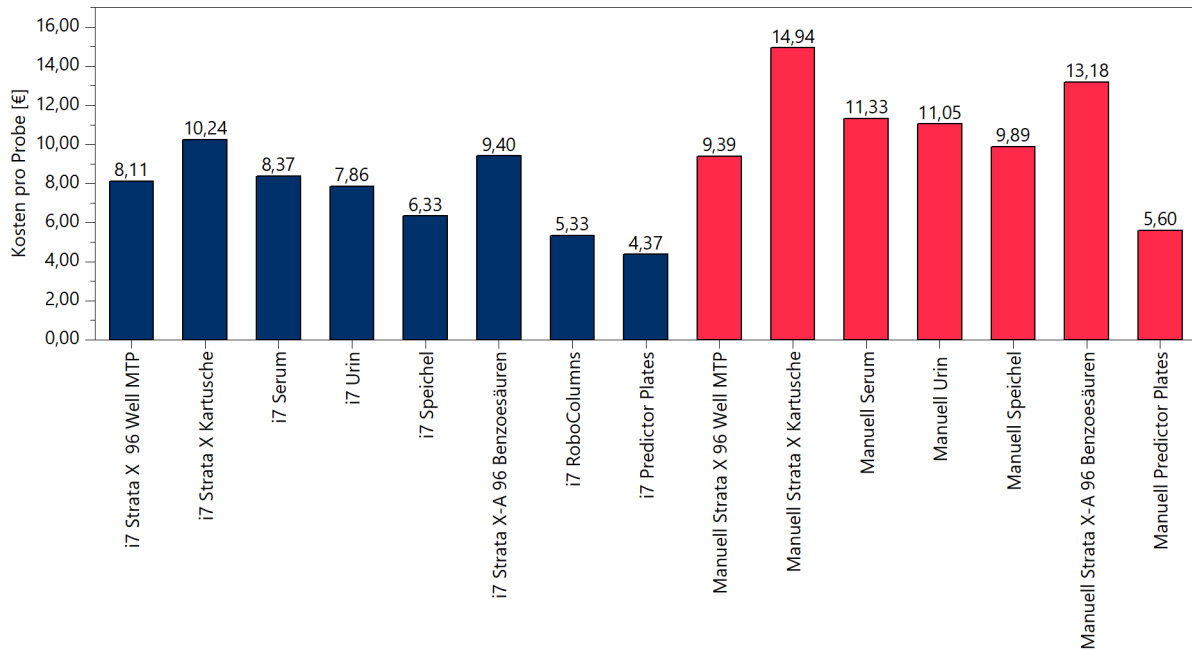


Abbildung 7.2: Gegenüberstellung der Kosten pro Probe aller Anwendungen

Zur Erzielung eines positiven Kapitalwerts in Periode 3 (Fall 2) ist ein wöchentlicher Bedarf von 192 Benzodiazepinproben, je 384 Cannabinoidproben aus Serum und Urin, 192 Cannabinoidproben aus Speichel sowie 384 Benzoesäure- und IgG-Proben notwendig (siehe Tabelle 7.1). Bei einem Bedarf von 192 Benzodiazepinproben, 384 Cannabinoidproben aus Serum, 192 Cannabinoidproben aus Urin, 288 Cannabinoidproben aus Speichel sowie je 192 Benzoesäure- und IgG-Proben ist der Kapitalwert in Periode 3 noch negativ (Fall 3). Eine Amortisation des allgemeingültigen Automationssystems wird in Periode 5 erreicht. Bei einem Bedarfsüberschuss (Fall 1) ist die optimierte Auslastung des Systems mit je 192 Benzodiazepin-, Benzoesäure- und Cannabinoidproben aus Serum, Urin und Speichel sowie 2.304 IgG-Proben möglich und führt zu der Amortisation des Systems nach 0,41 Jahren.

Tabelle 7.1: Ergebnisse Bewertung des allgemeingültigen Automationssystems

Probenart	Produktionsprogramm Fall 1		Produktionsprogramm Fall 2		Produktionsprogramm Fall 3	
	Durchläufe pro Woche	Probenzahl	Durchläufe pro Woche	Probenzahl	Durchläufe pro Woche	Probenzahl
Benzodiazepine	1	192	1	192	1	192
Cannabinoid Serum	2	192	4	384	9	864
Cannabinoid Urin	2	192	4	384	2	192
Cannabinoid Speichel	3	288	2	192	3	288
Benzoesäuren	2	192	4	384	2	192
IgG	12	2.304	2	384	1	192
Summe	22 Durchläufe	3.360	17 Durchläufe	1.920	18 Durchläufe	1.920
Kapazitätsauslastung	118,81 h		110,89 h		118,27 h	
NPV t_3	2.180.631 €		1.123 €		-174.909 €	
NPV t_5	3.896.965 €		348.260 €		61.641 €	
Amortisationsdauer	0,41 Jahre		2,99 Jahre		4,43 Jahre	
Nachhaltigkeitsindex	0,65		0,57		0,59	

Die Ergebnisse zeigen, dass die Erzielung eines positiven Kapitalwerts innerhalb von drei Jahren auch bei nicht optimierter Auslastung entsprechend des Deckungsbeitrags möglich ist. Gleichwohl erfordert dies eine hohe Kapazitätsauslastung von ca. 90%. Somit wird die Annahme bestätigt, dass der ökonomische Erfolg des Automationssystems stark von dem Bedarf bzw. der möglichen Auslastung abhängt. Da jedoch von einem Grundbedarf ausgegangen wird, da andernfalls die Anwendung nicht vorkommen würde, kann anhand der Produktionsprogrammplanung die Flexibilität des allgemeingültigen Automationssystems in Hinblick auf unterschiedliche Probenzahlen und Anwendungen, welche hier stellvertretend für die unterschiedlichsten Anwendungen stehen und bei Bedarf dem allgemeingültigen Automationssystem hinzugefügt werden, gezeigt werden. Zudem kann der wirtschaftliche Betrieb des allgemeingültigen Automationssystems selbst für den ungünstigsten Fall der Auslastung entsprechend einer negativen Deckungsbeitragsrangordnung gezeigt werden, was aus der Amortisierung der Investition nach 4,43 Jahren hervorgeht. Bei optimierter Auslastung des Systems ist eine Amortisation innerhalb eines halben Jahres möglich. Der Kapitalwert nach 5 Jahren beträgt 3,9 Millionen Euro.

7.3 Nachhaltigkeit des allgemeingültigen Automationssystems

Mit den zuvor durchgeführten Bewertungen der Nachhaltigkeit wurde gezeigt, dass durch den Einsatz des Automationssystems die Nachhaltigkeit gesteigert werden konnte. Besonders vorteilhaft sind miniaturisierte Formate. Die Indices der Einzelanwendungen werden mit den in der Bedarfsanalyse ermittelten Durchlaufzahlen gewichtet und zur Bewertung des gesamten allgemeingültigen Automationssystems genutzt. Die Ergebnisse der drei untersuchten Fälle liegen zwischen 0,57 und 0,65 (siehe Tabelle 7.1) und zeigen demzufolge ein Potenzial für Verbesserungen auf. Ein Beispiel ist die Erhöhung der Wiederverwendbarkeit. In keiner Anwendung ist der Anteil wiederverwendbarer Labware größer als 31%. Eine Erhöhung des Anteils würde gleichzeitig auch den entstehenden Plastikabfall pro Probe reduzieren und somit den Nachhaltigkeitsindex signifikant verbessern. Insgesamt ist der Nachhaltigkeitsindex des allgemeingültigen Automationssystems in allen Fällen größer als 0,5 und somit positiv.

Die Bewertung des Gesamtsystems zeigt, dass das Konzept des allgemeingültigen Automationssystems eine qualitativ hochwertige, mit dem manuellen Prozess vergleichbare, nachhaltige und wirtschaftlichere Alternative für kleine und mittlere Labore sein kann, um flexibel auf unterschiedliche Probenarten und Probenzahlen reagieren zu können.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Geringe und häufig wechselnde Probendurchsätze sind eines der wesentlichen Hindernisse bei der Einführung eines Automationssystems in kleinen und mittleren Laboren, wie die Analyse des aktuellen Stands der Automatisierung in den Life Sciences zeigte. In bioanalytischen Laboren führt die Komplexität der Probenmatrix gleichzeitig zu einer Erhöhung des Probenvorbereitungsaufwands, was die Nachfrage nach effizienten und wirtschaftlichen Probenvorbereitungsprozessen weiter steigert. Die Automatisierung stellt eine Möglichkeit zur effizienteren Gestaltung dieser Prozesse dar. Zugleich führt die Komplexität der Proben und ihrer Probenvorbereitungsmethoden zu speziellen Anforderungen an das Automationssystem, die über ein reines Liquid-Handling hinausgehen. Existierende hochspezialisierte Automationssysteme sind aufgrund ihrer hohen Investitionskosten und geringen Flexibilität für die Automatisierung der wechselnden Prozesse und geringeren Durchsätze in kleinen und mittleren Laboren nicht geeignet. Auf Basis der durchgeführten Analyse möglicher Automationssysteme wird zur Begegnung der Herausforderung der flexiblen, vollständigen Automatisierung komplexer bioanalytischer Probenvorbereitungsprozesse ein nicht vorkonfiguriertes, offenes Liquid-Handling-System gewählt.

Das kommerziell erhältliche System verfügt in seiner Grundkonfiguration über 45 Positionen zur Bereitstellung von Labware, zwei Greifer für den Labwaretransport sowie einen Einzelkanal- und einen 96-Kanal-Pipettierkopf für den Flüssigkeitstransfer.

Dieses Automationssystem wird durch die Integration von Zusatzkomponenten, wie einer Zentrifuge, einem Schüttler, einer Druckaufgabeeinheit, einer Komponente zur Bereitstellung hoher Lösungsmittelmengen sowie Geräten zum Heizen, Kühlen und Inkubieren von Labware, um zahlreiche Funktionalitäten erweitert, wodurch das System zur Automatisierung einer Vielzahl bioanalytischer Probenvorbereitungsprozesse nutzbar ist. Die erzielte Flexibilität des Automationssystems wird zudem durch eine benutzerfreundliche graphische Oberfläche, vordefinierte Bewegungsabläufe und die Anpassungsfähigkeit an spezifische Anwendungen weiter gesteigert. In Abbildung 8.1 ist das realisierte allgemeingültige Automationssystem dargestellt.

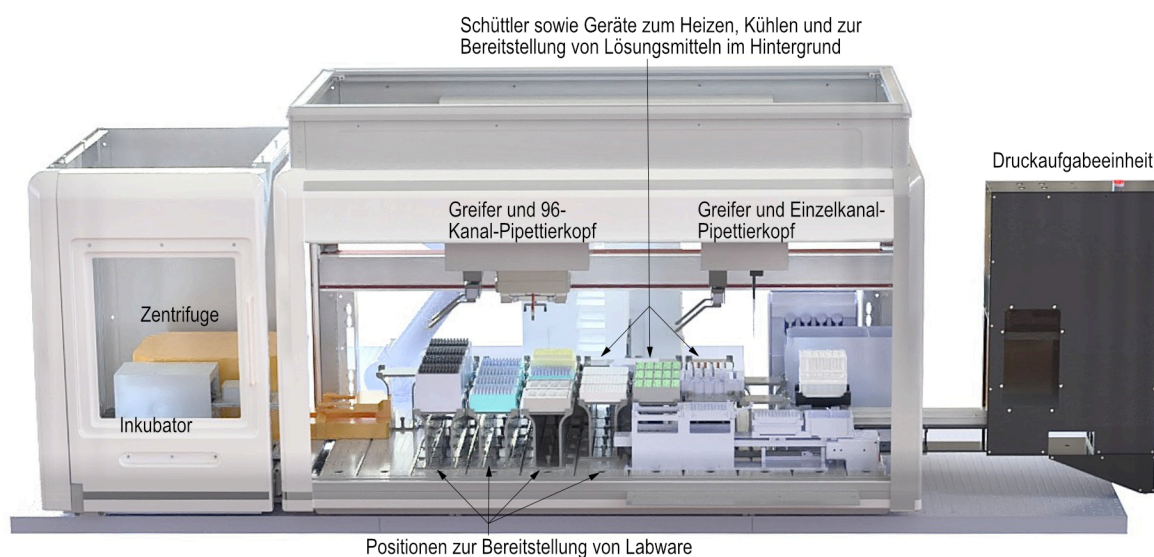


Abbildung 8.1: Realisiertes allgemeingültiges Automationssystem mit integrierten Zusatzkomponenten

Der Nachweis der Allgemeingültigkeit des realisierten Automationskonzepts erfolgt anhand von vier aktuellen Beispielanwendungen aus verschiedenen Life Sciences Bereichen. Im forensischen Bereich wird vor dem Hintergrund der Cannabis-Legalisierung eine Cannabinoidaufreinigung aus Serum, Urin und Speichel gewählt. Im Bereich des Medikamentenmonitoring und der Pharmazeutika werden die Benzodiazepinbestimmung aus Serum sowie die aktuell das größte Wachstumsfeld der pharmazeutischen Industrie darstellenden Antikörpern und damit einhergehend eine hohe Nachfrage verzeichnende Bestimmung von Antikörpern aus einer Zellkulturmatrix gewählt. Im Umweltbereich werden die ubiquitär vorkommenden Benzoesäuren aus Wasser bestimmt.

Vor der Realisierung wird zunächst eine genaue Analyse der zu automatisierenden Probenvorbereitungsmethoden durchgeführt, um die Anforderungen an das Automationssystem zu definieren. Nach der Definition erfolgt die Umsetzung der Anwendung mit dem Ziel, qualitativ hochwertige, wirtschaftliche und nachhaltige automatisierte Prozesse zu realisieren.

Zur Überprüfung der Qualität werden die realisierten Probenvorbereitungsmethoden validiert. Die Wirtschaftlichkeit der Anwendungen wird anhand der Kosten pro Probe, des Kapitalwerts und der Amortisationsdauer beurteilt. Zur Bewertung der Umweltfreundlichkeit wird ein Nachhaltigkeitsindex gebildet. Die Ergebnisse der Validierungen weisen mit Wiederfindungsraten von mehr als 80% und Variationskoeffizienten von weniger als 7% auf die reproduzierbar hohe Qualität der entwickelten automatisierten Probenvorbereitungsmethoden hin. Die Erzielung eines hohen Qualitätsstandards wird u.a. durch die Nutzung der Kernkompetenz von Liquid-Handling-Systemen, dem Flüssigkeitstransfer sowie der umfassenden Optimierung der Methode erreicht. Durch den Vergleich mit der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der automatisierten Probenvorbereitung mit Ergebnissen in der Literatur vergleichbar und für den sensitiven Nachweis des Analyten aus der jeweiligen Matrix geeignet sind.

Die Ergebnisse der Kostenvergleichsrechnungen zeigen, dass durch den Einsatz des Automationssystems die Kosten pro Probe im Vergleich zur manuellen Methode gesenkt werden können. Die ermittelten positiven Kapitalwerte sowie die geringen Amortisationsdauern weisen die Investition in das Automationssystem im Vergleich zur manuellen Durchführung der Methode als lohnenswert bei geringem Risiko aus.

Ein positiver Einfluss durch den Einsatz des Automationssystems zeigt sich auch bei der Bewertung der Nachhaltigkeit. Gleichzeitig werden Verbesserungspotenziale wie beim Grad der Wiederverwendbarkeit deutlich.

Bei der Benzodiazepin- und IgG-Anwendung wurden zusätzlich verschiedene Labwareformate miteinander verglichen. Hier zeigte die Verwendung von Labware im MTP-Standardformat (Strata X Platten, PreDicator Plates) Vorteile im Vergleich zu den aus manuellen Bearbeitungsprozessen stammenden Kartuschen bzw. den hochspezialisierten RoboColumns in Hinblick auf Durchsatz und Kosten. Aufwendige und kostspielige neue Zertifizierungsprozesse können ihren Einsatz aber dennoch rechtfertigen. Insgesamt unterstützen die Ergebnisse die Aussage, dass die Standardisierung von Labware zu einer Verbesserung der Wirtschaftlichkeit führen kann.

Der wirtschaftliche Betrieb von Automationssystemen stellt insbesondere für kleine und mittlere Labore eine Herausforderung dar, da die Wirtschaftlichkeit eines Automationssystems stark von der Auslastung und von dem tatsächlichen Bedarf an zu bearbeitenden Proben abhängt. Aus diesem Grund wurde abschließend eine Überprüfung des Gesamtsystems mit den vier Anwendungen für drei verschiedene Auslastungsfälle durchgeführt. Im ersten Fall erfolgte die Auslastung des Automationssystems unter der Maximierung des Deckungsbeitrags. Im zweiten Fall wurde die mit den vier Anwendungen notwendige Auslastung ermittelt, um eine Amortisation des Systems nach drei Jahren zu erreichen. Im dritten, ungünstigsten Fall wurde die Wirtschaftlichkeit des Systems untersucht, wenn die Auslastung entsprechend einer negativen Rangfolge des Deckungsbeitrags erfolgt. In diesem Fall wird eine Amortisation des Systems nach fünf Jahren erreicht. Bei einer optimierten Auslastung der verschiedenen Probenvorbereitungsprozesse ist die Amortisation des allgemeingültigen Automationssystems innerhalb eines halben Jahres möglich. Dies zeigt, dass der ökonomische Erfolg eines Automationssystems zwar von der Auslastung abhängt, jedoch auch in weniger günstigen Fällen noch wirtschaftlich realisierbar ist. Weiterhin kann durch die flexible Nutzung von Liquid-Handling-Systemen, die durch den Einsatz von Zusatzkomponenten einen hohen Funktionsumfang bieten, der mangelnde Bedarf an einer Analyse ausgeglichen oder flexibel auf unterschiedlichste Bedarfssituationen (z.B. saisonale Schwankungen im Herbst/Winter oder während Pandemien) reagiert werden.

Die evaluierten Anwendungsbeispiele zeigen zudem, dass die Bearbeitung der aus unterschiedlichen Bereichen der Life-Sciences stammenden Matrices und Proben auf einem einzigen System möglich ist. Durch diese Diversifikation der Analysen kann das Investitionsrisiko weiter minimiert werden.

Das entwickelte Automationskonzept kann somit zur Sicherstellung der Wettbewerbsfähigkeit von kleineren und mittleren Laboren beitragen, Fachkräftemangel ausgleichen sowie die Betriebsbereitschaft und zeitgenaue Bereitstellung von Ergebnissen gewährleisten.

Gleichzeitig wird die Nachhaltigkeit von Laborprozessen verbessert. Dies wird durch die Erhöhung der Arbeitssicherheit erreicht, indem die Mitarbeiter von repetitiven und ermüdenden Tätigkeiten entlastet werden und ihr Umgang mit giftigen, gesundheitsschädlichen Stoffen vermindert wird.

Die Reduktion der Lösungsmittelvolumina in den eingesetzten Mikroextraktionstechniken verbessert die Umweltfreundlichkeit zusätzlich und sollte unter Beachtung und Einhaltung qualitativer Merkmale in allen Anwendungen umgesetzt werden.

Ferner könnte die Planung und Entwicklung von Automationssystemen durch die Ermittlung des realen Bedarfs am Markt weiter optimiert werden. Die Ausweitung der Automatisierung auf den gesamten Laborprozess inklusive der messtechnischen Bestimmung der Proben kann die positiven Effekte der Automatisierung verstärken. Ein besonderes Augenmerk gilt auch hier der Erzielung und dem Erhalt einer hohen Flexibilität in kleinen und mittleren Laboren bei steigendem Integrationsgrad. Die hohe Flexibilität ermöglicht die schnelle Integration innovativer Probenvorbereitungstechniken und sichert somit die zukünftige Aktualität des Systems.

9. Literatur

- [1] K. Schöneberg, "Branchenanalyse Laboranalytik – Update," Working Paper Forschungsförderung, No.171, Hans-Böckler-Stiftung, Düsseldorf, DE, 2020.
- [2] Statistisches Bundesamt – destatis „Laborleistungen in Deutschland 2002–2022“, Genesis-Online – Die Datenbank des Statistischen Bundesamtes, Wiesbaden, DE. Abgerufen: 22.08.2024. [Online]: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online>
- [3] M. Zhang et al., "Editorial Special Issue on Life Science Automation," *IEEE Transactions on Automation Science and Engineering*, vol. 3, no. 2, pp. 137-140, 2006, DOI: 10.1109/tase.2006.871475.
- [4] S. E. F. Melanson; N. I. Lindeman; P. Jarolim, "How Laboratory Automation Can Help Laboratories, Clinicians, and Patients," *Lab. Med.*, vol. 39, no. 3, pp. 137-143, 2008, DOI: 10.1309/yk4wxg5t1p8ucng4.
- [5] H. Tegally; J. E. San; J. Giandhari; T. de Oliveira, "Unlocking the Efficiency of Genomics Laboratories With Robotic Liquid-Handling," *BMC Genomics*, vol. 21, no. 1, Art. no. 729, 2020, DOI: 10.1186/s12864-020-07137-1.
- [6] R. E. Majors, "Overview of Sample Preparation," *LCGC*, vol. 33, no. 11, pp. 46-51, 2015. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://www.chromatographyonline.com/view/overview-sample-preparation>
- [7] W. Li; W. Jian; Y. Fu, Eds., "Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis," 1 ed., Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2019, ISBN: 9781119274292.
- [8] A. Croxatto; G. Prod'hom; F. Faverjon; Y. Rochais; G. Greub, "Laboratory Automation in Clinical Bacteriology: What System to Choose," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 22, no. 3, pp. 217-235, 2016, DOI: 10.1016/j.cmi.2015.09.030.
- [9] R. B. Thomson; E. McElvania, "Total Laboratory Automation: What is Gained, What is Lost, and Who Can Afford it," *Clin. Lab. Med.*, vol. 39, no. 3, pp. 371-389, 2019, DOI: 10.1016/j.cll.2019.05.002.
- [10] E. Bakan; F. Z. Umudum, "Automation of Extra-Analytical Phase for Clinical Laboratory," *Turk. J. Biochem.*, vol. 46, no. 2, pp. 115-128, 2021, DOI: 10.1515/tjb-2020-0138.
- [11] K. Antonios; A. Croxatto; K. Culbreath, "Current State of Laboratory Automation in Clinical Microbiology Laboratory," *Clin. Chem.*, vol. 68, no. 1, pp. 99-114, 2021, DOI: 10.1093/clinchem/hvab242.
- [12] D. A. Armbruster; D. R. Overcash; J. Reyes, "Clinical Chemistry Laboratory Automation in the 21st Century - Amat Victoria Curam (Victory Loves Careful Preparation)," *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 35, no. 3, pp. 143-153, 2014.
- [13] I. Holland; J. A. Davies, "Automation in the Life Science Research Laboratory," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, Art. no. 571777, 2020, DOI: 10.3389/fbioe.2020.571777.
- [14] H. Fleischer; K. Thurow, "Automation Solutions for Analytical Measurements," 1 ed., Weinheim, DE: Wiley-VCH, 2017, ISBN: 9783527805297.

- [15] K. Goldberg, "What Is Automation?," *IEEE Transactions on Automation Science and Engineering*, vol. 9, no. 1, pp. 1-2, 2012, DOI: 10.1109/tase.2011.2178910.
- [16] Dict.cc, "To Screen," Dict.cc Deutsch-Englisch-Wörterbuch, Wien, AT, 2022. Abgerufen: 21.11.2022. [Online]: <https://www.dict.cc/englisch-deutsch/to+screen.html>
- [17] L. M. Mayr; P. Fuerst, "The Future of High-Throughput Screening," *J. Biomol. Screen.*, vol. 13, no. 6, pp. 443-448, 2008, DOI: 10.1177/1087057108319644.
- [18] E. Jagerdeo; J. E. Schaff, "Rapid Screening for Drugs of Abuse in Biological Fluids By Ultra High Performance Liquid Chromatography/Orbitrap Mass Spectrometry," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1027, pp. 11-18, 2016, DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.05.010.
- [19] K. P. Mishra; L. Ganju; M. Sairam; P. K. Banerjee; R. C. Sawhney, "A Review of High Throughput Technology for the Screening of Natural Products," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 62, no. 2, pp. 94-98, 2008, DOI: 10.1016/j.biopha.2007.06.012.
- [20] P. Geng et al., "Rapid and sensitive detection of amphetamine by SERS-based competitive immunoassay coupled with magnetic separation," *Analyt. Methods*, vol. 14, no. 26, pp. 2608-2615, 2022, DOI: 10.1039/d2ay00581f.
- [21] S. Lambert-Niclot et al., "Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 58, no. 8, Art. no. e00977-20, 2020, DOI: 10.1128/jcm.00977-20.
- [22] L. Zhao; H. Zhao, "Screening, Identification, and Quantitation of 102 Drugs in Human Whole Blood by LC/Q-TOF and LC-QQQ," 5994-2830EN, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 2021.
- [23] P. O. M. Gundersen; O. Spigset; M. Josefsson, "Screening, Quantification, and Confirmation of Synthetic Cannabinoid Metabolites in Urine by UHPLC-QTOF-MS," *Drug Test. Anal.*, vol. 11, no. 1, pp. 51-67, 2019, DOI: 10.1002/dta.2464.
- [24] S. Knox; J. Harris; L. Calton; A. M. Wallace, "A Simple Automated Solid-Phase Extraction Procedure for Measurement of 25-Hydroxyvitamin D3 and D2 by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 46, pp. 226-230, 2009, DOI: 10.1258/acb.2009.008206.
- [25] M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248-254, 1976, DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- [26] H. Choi et al., "Analysis of Cannabis in Oral Fluid Specimens By GC-MS With Automatic SPE," *Sci. Justice*, vol. 49, no. 4, pp. 242-246, 2009, DOI: 10.1016/j.scijus.2009.09.015.
- [27] R. Dams; M. A. Huestis; W. E. Lambert; C. M. Murphy, "Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs With LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation, and Biofluid," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 14, no. 11, pp. 1290-1294, 2003, DOI: 10.1016/S1044-0305(03)00574-9.
- [28] K. Nilsson; M. Andersson; O. Beck, "Phospholipid Removal Combined With a Semi-Automated 96-Well SPE Application for Determination of Budesonide in Human Plasma With LC-MS/MS," *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, vol. 970, pp. 31-35, 2014, DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.08.035.

- [29] H. Choi; S. Baeck; M. Jang; S. Lee; H. Choi; H. Chung, "Simultaneous Analysis of Psychotropic Phenylalkylamines in Oral Fluid By GC-MS With Automated SPE and Its Application to Legal Cases," *Forensic Sci. Int.*, vol. 215, no. 1-3, pp. 81-87, 2012, DOI: 10.1016/j.forsciint.2011.02.011.
- [30] S. A. Borden et al., "Mass Spectrometry Analysis of Drugs of Abuse: Challenges and Emerging Strategies," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 39, no. 5-6, pp. 703-744, 2020, DOI: 10.1002/mas.21624.
- [31] E. Chambers; D. M. Wagrowski-Diehl; Z. Lu; J. R. Mazzeo, "Systematic and Comprehensive Strategy for Reducing Matrix Effects in LC/MS/MS Analyses," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 852, no. 1-2, pp. 22-34, 2007, DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.12.030.
- [32] M. Jang; I. Shin; J. Kim; W. Yang, "Simultaneous Quantification of 37 Synthetic Cannabinoid Metabolites in Human Urine By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Forensic Toxicol.*, vol. 33, no. 2, pp. 221-234, 2015, DOI: 10.1007/s11419-015-0265-x.
- [33] A. J. Barnes; E. Spinelli; S. Young; T. M. Martin; K. L. Kleete; M. A. Huestis, "Validation of an ELISA Synthetic Cannabinoids Urine Assay," *Ther. Drug Monit.*, vol. 37, no. 5, pp. 661-669, 2015, DOI: 10.1097/FTD.0000000000000201.
- [34] K. Thurow; T. Roddelkopf, "Automationslösungen für das Analytiklabor 2020," *BIOspektrum*, vol. 25, pp. 520-522, 2019, DOI: 10.1007/s12268-019-1089-8.
- [35] G. M. Merone et al., "Analytical Chemistry in the 21st Century: Challenges, Solutions, and Future Perspectives of Complex Matrices Quantitative Analyses in Biological/Clinical Field," *Analytica*, vol. 1, pp. 44-59, 2020, DOI: 10.3390/analytica1010006.
- [36] A. M. Gressner; T. Arndt, Eds., "Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Band 1 Klinische Chemie," 1 ed., Heidelberg, DE: Springer Medizin Verlag, 2007, ISBN: 978-3-540-23660-3.
- [37] T. H. Schiebler; H.-W. Korf, "Anatomie," 10 ed., Darmstadt, DE: Steinkopff Verlag, 2007, ISBN: 9783798517707.
- [38] J. C. Behrends et al., "Physiologie," 3 ed., Stuttgart, DE: Thieme, 2017, ISBN: 9783131384133.
- [39] G. Lima-Oliveira; D. Monneret; F. Guerber; G. C. Guidi, "Sample Management for Clinical Biochemistry Assays: Are Serum and Plasma Interchangeable Specimens," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 55, no. 7, pp. 480-500, 2018, DOI: 10.1080/10408363.2018.1499708.
- [40] Z. Yu et al., "Differences Between Human Plasma and Serum Metabolite Profiles," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, Art. no. e21230, 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0021230.
- [41] S. Barelli; D. Crettaz; L. Thadikaran; O. Rubin; J. D. Tissot, "Plasma/Serum Proteomics: Pre-Analytical Issues," *Expert Rev. Proteomics*, vol. 4, no. 3, pp. 363-370, 2007, DOI: 10.1586/14789450.4.3.363.
- [42] F. L. Kiechle, "GP44-A4: Procedures for Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests: Approved Guideline," 4 ed., Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010, ISBN: 1562387243.
- [43] S. Aitekenov; A. Gaipov; R. Bukasov, "Review: Detection and Quantification of Proteins in Human Urine," *Talanta*, vol. 223, Art. no. 121718, 2021, DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121718.
- [44] X. Wu, "Urinalysis: A Review of Methods and Procedures," *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.*, vol. 22, no. 1, pp. 121-128, 2010, DOI: 10.1016/j.ccell.2009.10.012.

- [45] J. Jing; Y. Gao, "Urine Biomarkers in the Early Stages of Diseases: Current Status and Perspective," *Discov. Med.*, vol. 25, no. 136, pp. 57-65, 2018.
- [46] A. Zhang; H. Sun; X. Wu; X. Wang, "Urine Metabolomics," *Clin. Chim. Acta*, vol. 414, pp. 65-69, 2012, DOI: 10.1016/j.cca.2012.08.016.
- [47] D. Catlin; D. Cowan; M. Donike; D. Fraise; H. Oftebro; S. Rendic, "Testing Urine for Drugs," *Clin. Chim. Acta*, vol. 207, no. 3, pp. 13-26, 1992, DOI: 10.1016/0009-8981(92)90130-i.
- [48] E. Boyacı; K. Gorynski; A. Rodriguez-Lafuente; B. Bojko; J. Pawliszyn, "Introduction of Solid-Phase Microextraction as a High-Throughput Sample Preparation Tool in Laboratory Analysis of Prohibited Substances," *Anal. Chim. Acta*, vol. 809, pp. 69-81, 2014, DOI: 10.1016/j.aca.2013.11.056.
- [49] K. E. Moeller; K. C. Lee; J. C. Kissack, "Urine Drug Screening: Practical Guide for Clinicians," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 83, no. 1, pp. 66-76, 2008, DOI: 10.4065/83.1.66.
- [50] S. P. Humphrey; R. T. Williamson, "A Review of Saliva: Normal Composition, Flow, and Function," *J. Prosthet. Dent.*, vol. 85, no. 2, pp. 162-169, 2001, DOI: 10.1067/mpr.2001.113778.
- [51] E. Kaufman; I. B. Lamster, "The Diagnostic Applications of Saliva - A Review," *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 197-212, 2002, DOI: 10.1177/154411130201300209.
- [52] M. Murakami; T. Ohtake; R. A. Dorschner; R. L. Gallo, "Cathelicidin Antimicrobial Peptides are Expressed in Salivary Glands and Saliva," *J. Dent. Res.*, vol. 81, no. 12, pp. 845-850, 2002, DOI: 10.1177/154405910208101210.
- [53] R. F. Vining; R. A. McGinley, "Hormones in Saliva," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 23, no. 2, pp. 95-146, 1986, DOI: 10.3109/10408368609165797.
- [54] S. M. Wille; M. R. Baumgartner; V. D. Fazio; N. Samyn; T. Kraemer, "Trends in Drug Testing in Oral Fluid and Hair as Alternative Matrices," *Bioanalysis*, vol. 6, no. 17, pp. 2193-2209, 2014, DOI: 10.4155/bio.14.194.
- [55] H. Elmongy; M. Abdel-Rehim, "Saliva as an Alternative Specimen to Plasma for Drug Bioanalysis: A Review," *Trends Analyt. Chem.*, vol. 83, pp. 70-79, 2016, DOI: 10.1016/j.trac.2016.07.010.
- [56] S. Anizan; M. A. Huestis, "The Potential Role of Oral Fluid in Antidoping Testing," *Clin. Chem.*, vol. 60, no. 2, pp. 307-322, 2014, DOI: 10.1373/clinchem.2013.209676.
- [57] J. K. Aps; L. C. Martens, "Review: The Physiology of Saliva and Transfer of Drugs Into Saliva," *Forensic Sci. Int.*, vol. 150, no. 2-3, pp. 119-131, 2005, DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.10.026.
- [58] A. Tvarijonaviciute; S. Martínez-Subiela; P. López-Jornet; E. Lamy, Eds., "Saliva in Health and Disease," 1 ed., Cham, CH: Springer Nature Switzerland, 2020, ISBN: 9783030376802.
- [59] L. A. Soares Nunes; S. Mussavira; O. Sukumaran Bindhu, "Clinical and Diagnostic Utility of Saliva as a Non-Invasive Diagnostic Fluid: A Systematic Review," *Biochem. Med. (Zagreb)*, vol. 25, no. 2, pp. 177-192, 2015, DOI: 10.11613/bm.2015.018.
- [60] S. Jadoon et al., "Recent Developments in Sweat Analysis and Its Applications," *Int. J. Anal. Chem.*, pp. 164974, 2015, DOI: 10.1155/2015/164974.
- [61] A. Mena-Bravo; M. D. Luque de Castro, "Sweat: A Sample With Limited Present Applications and Promising Future in Metabolomics," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 90, pp. 139-147, 2014, DOI: 10.1016/j.jpba.2013.10.048.

- [62] Y. H. Caplan; B. A. Goldberger, "Alternative Specimens for Workplace Drug Testing," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 25, no. 5, pp. 396-399, 2001, DOI: 10.1093/jat/25.5.396.
- [63] M. Di Venere; S. Viglio; M. Cagnone; A. Bardoni; R. Salvini; P. Iadarola, "Advances in the Analysis of „Less-Conventional” Human Body Fluids: An Overview of the CE- and HPLC-MS Applications in the Years 2015-2017,” *Electrophoresis*, vol. 39, no. 1, pp. 160-178, 2018, DOI: 10.1002/elps.201700276.
- [64] Invitrogen, "Cell Culture Basics," B-087243 0110, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 2023. Abgerufen: 17.12.2023. [Online]: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>
- [65] H. Chmiel; R. Takors; D. Weuster-Botz, Eds., "Bioprozesstechnik," 4 ed., Berlin, DE: Springer Spektrum, 2018, ISBN: 9783662540411.
- [66] P. J. Price, "Best Practices for Media Selection for Mammalian Cells," *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, vol. 53, no. 8, pp. 673-681, 2017, DOI: 10.1007/s11626-017-0186-6.
- [67] H. Eagle, "Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures," *Science*, vol. 130, no. 3373, pp. 432-437, 1959, DOI: 10.1126/science.130.3373.432.
- [68] R. G. Ham, "Clonal Growth of Mammalian Cells in a Chemically Defined, Synthetic Medium," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 53, no. 2, pp. 288-293, 1965, DOI: 10.1073/pnas.53.2.288.
- [69] Thermo Fisher Scientific, "Zellkulturmedien," Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 2023. Abgerufen: 12.04.2023. [Online]: <https://www.fishersci.de/de/de/browse/90217060/cell-culture-media>
- [70] J. M. Baust et al., "Best Practices in Cell Culture: An Overview," *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, vol. 53, no. 8, pp. 669-672, 2017, DOI: 10.1007/s11626-017-0177-7.
- [71] R. D. McDowall, "Sample Preparation for Biomedical Analysis," *J. Chromatogr.*, vol. 492, pp. 3-58, 1989, DOI: 10.1016/s0378-4347(00)84463-1.
- [72] W. Wätjen; E. Fritsche, "Fremdstoffmetabolismus," in *Toxikologie*, H.-W. Vohr, Ed., Weinheim, DE: Wiley, 2010, pp. 43-74, DOI: 10.1002/9783527635528.ch3.
- [73] P. M. Kemp et al., "Cannabinoids in Humans. II. The Influence of Three Methods of Hydrolysis on the Concentration of THC and Two Metabolites in Urine," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 19, no. 5, pp. 292-298, 1995, DOI: 10.1093/jat/19.5.292.
- [74] W. Weinmann; M. Goerner; S. Vogt; R. Goerke; S. Pollak, "Fast Confirmation of 11-Nor-9-Carboxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in Urine By LC/MS/MS Using Negative Atmospheric-Pressure Chemical Ionisation (APCI)," *Forensic Sci. Int.*, vol. 121, no. 1-2, pp. 103-107, 2001, DOI: 10.1016/s0379-0738(01)00459-5.
- [75] S. Huq; A. Dixon; K. Kelly; K. M. Kallury, "Novel Solid-Phase Extraction Protocol for 11-Nor-9-Carboxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol From Urine Samples Employing a Polymeric Mixed-Mode Cation-Exchange Resin, Strata-X-C, Suitable for Gas Chromatography-Mass Spectrometry or Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1073, no. 1-2, pp. 355-361, 2005, DOI: 10.1016/j.chroma.2004.10.052.
- [76] N. Stephanson; M. Josefsson; R. Kronstrand; O. Beck, "Accurate Identification and Quantification of 11-Nor- Δ 9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Urine Drug Testing: Evaluation of a Direct

- High Efficiency Liquid Chromatographic-Mass Spectrometric Method," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 871, no. 1, pp. 101-108, 2008, DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.06.047.
- [77] K. Grucza; D. Kwiatkowska; K. Kowalczyk; M. Wicka; M. Szutowski; P. Chołbiński, "Analysis for Higenamine in Urine By Means of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Interpretation of Results," *Drug Test. Anal.*, vol. 10, no. 6, pp. 1017-1024, 2018, DOI: 10.1002/dta.2331.
- [78] C. Sempio; K. B. Scheidweiler; A. J. Barnes; M. A. Huestis, "Optimization of Recombinant B-Glucuronidase Hydrolysis and Quantification of Eight Urinary Cannabinoids and Metabolites By Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry," *Drug Test. Anal.*, vol. 10, no. 3, pp. 518-529, 2018, DOI: 10.1002/dta.2230.
- [79] F. T. Peters et al., "A Systematic Comparison of Four Different Workup Procedures for Systematic Toxicological Analysis of Urine Samples Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, no. 2, pp. 735-745, 2009, DOI: 10.1007/s00216-008-2471-4.
- [80] C. Montesano; M. Sergi; S. Odoardi; M. C. Simeoni; D. Compagnone; R. Curini, "A μ -SPE Procedure for the Determination of Cannabinoids and Their Metabolites in Urine By LC-MS/MS," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 91, pp. 169-175, 2014, DOI: 10.1016/j.jpba.2013.12.035.
- [81] T. T. Abraham; R. H. Lowe; S. O. Pirnay; W. D. Darwin; M. A. Huestis, "Simultaneous GC-EI-MS Determination of Δ 9-Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol, and 11-Nor-9-Carboxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol in Human Urine Following Tandem Enzyme-Alkaline Hydrolysis," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 31, no. 8, pp. 477-485, 2007, DOI: 10.1093/jat/31.8.477.
- [82] S. Lee et al., "Comprehensive LC-MS/MS Method Combined With Tandem Hybrid Hydrolysis for Multiple Exposure Assessment of Multiclass Environmental Pollutants," *Environ. Res.*, vol. 211, Art. no. 113053, 2022, DOI: 10.1016/j.envres.2022.113053.
- [83] N. Fontanals; R. M. Marcé; F. Borrull; P. A. G. Cormack, "Mixed-Mode Ion-Exchange Polymeric Sorbents: Dual-Phase Materials That Improve Selectivity and Capacity," *Trends Analyt. Chem.*, vol. 29, no. 7, pp. 765-779, 2010, DOI: 10.1016/j.trac.2010.03.015.
- [84] Z. Niu; W. Zhang; C. Yu; J. Zhang; Y. Wen, "Recent Advances in Biological Sample Preparation Methods Coupled With Chromatography, Spectrometry and Electrochemistry Analysis Techniques," *Trends Analyt. Chem.*, vol. 102, pp. 123-146, 2018, DOI: 10.1016/j.trac.2018.02.005.
- [85] A. F. Ismail; T. Matsuura, "Ultrafiltration and Microfiltration," in *Membrane Separation Processes*, Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2022, pp. 69-75, DOI: 10.1016/b978-0-12-819626-7.00004-1.
- [86] W. J. Koros; Y. H. Ma; T. Shimidzu, "Terminology for Membranes and Membrane Processes (IUPAC Recommendations 1996)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 68, no. 7, pp. 1479-1489, 1996, DOI: 10.1515/iupac.68.3263.
- [87] S. Soltani; A. Jouyban, "Biological Sample Preparation: Attempts on Productivity Increasing in Bioanalysis," *Bioanalysis*, vol. 6, no. 12, pp. 1691-1710, 2014, DOI: 10.4155/bio.14.118.
- [88] D. N. Taulbee; A. Furst, "Centrifugation," in *Encyclopedia of Analytical Science*, 2 ed., P. Worsfold; A. Townshend; C. Poole, Eds., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2005, pp. 469-481, DOI: 10.1016/B0-12-369397-7/00063-7.

- [89] P. Christen; R. Jaussi; R. Benoit, "Trennverfahren und allgemeine Analysemethoden," in *Biochemie und Molekularbiologie*, Berlin, Heidelberg, DE: Springer Spektrum, 2024, pp. 26-29, DOI: 10.1007/978-3-662-65477-4_37.
- [90] B. P. Kremer; H. Bannwarth, "Einführung in die Laborpraxis," 3 ed., Berlin, Heidelberg, DE: Springer Spektrum, 2014, ISBN: 9783642543333.
- [91] P. Alfred; U. Claus, "Arbeitsmethoden der Biochemie," 1 ed., Berlin, DE: De Gruyter, 1997, ISBN: 3110146967.
- [92] S. X. Peng; T. M. Branch; S. L. King, "Fully Automated 96-Well Liquid-Liquid Extraction for Analysis of Biological Samples By Liquid Chromatography With Tandem Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 3, pp. 708-714, 2001, DOI: 10.1021/ac001036c.
- [93] R. E. Majors, "Sample Preparation Fundamentals for Chromatography," 5991-3326EN, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 2013.
- [94] C. Polson; P. Sarkar; B. Incledon; V. Raguvaran; R. Grant, "Optimization of Protein Precipitation Based Upon Effectiveness of Protein Removal and Ionization Effect in Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 785, no. 2, pp. 263-275, 2003, DOI: 10.1016/s1570-0232(02)00914-5.
- [95] R. R. Burgess; M. P. Deutscher, Eds., "Guide to Protein Purification," 2 ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2009, ISBN: 9780123745361.
- [96] R. A. Biddlecombe; S. Pleasance, "Automated Protein Precipitation By Filtration in the 96-Well Format," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 734, no. 2, pp. 257-265, 1999, DOI: 10.1016/s0378-4347(99)00355-2.
- [97] M. Li et al., "Simultaneous LC-MS/MS Bioanalysis of Alkaloids, Terpenoids, and Flavonoids in Rat Plasma Through Salting-Out-Assisted Liquid-Liquid Extraction After Oral Administration of Extract From *Tetradium Reticarpum* and *Glycyrrhiza Uralensis*: A Sample Preparation Strategy to Broaden Analyte Coverage of Herbal Medicines," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 413, no. 23, pp. 5871-5884, 2021, DOI: 10.1007/s00216-021-03568-1.
- [98] Z. Berk, "Extraction," in *Food Process Engineering and Technology*, 3 ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2018, pp. 289-310, DOI: 10.1016/B978-0-12-812018-7.00011-7.
- [99] L. Nugbienyo et al., "Automated Sugaring-Out Liquid-Liquid Extraction Based on Flow System Coupled With HPLC-UV for the Determination of Procainamide in Urine," *Talanta*, vol. 167, pp. 709-713, 2017, DOI: 10.1016/j.talanta.2017.02.051.
- [100] C. P. da Silva et al., "Determination of Cannabinoids in Plasma Using Salting-Out-assisted Liquid-Liquid Extraction Followed By LC-MS/MS Analysis," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 34, no. 12, Art. no. e4952, 2020, DOI: 10.1002/bmc.4952.
- [101] X. Duan et al., "Ultrasensitive Quantification of Serum Vitamin D Metabolites Using Selective Solid-Phase Extraction Coupled to Microflow Liquid Chromatography and Isotope-Dilution Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 6, pp. 2488-2497, 2010, DOI: 10.1021/ac902869y.
- [102] M. H. Gey, "Instrumentelle Analytik und Bioanalytik," 3 ed., Berlin, Heidelberg, DE: Springer Spektrum, 2015, ISBN: 9783662462546.

- [103] B. Hashemi; P. Zohrabi; M. Shamsipur, "Recent Developments and Applications of Different Sorbents for SPE and SPME From Biological Samples," *Talanta*, vol. 187, pp. 337-347, 2018, DOI: 10.1016/j.talanta.2018.05.053.
- [104] S. H. Hashemi; F. Keykha, "Application of the Response Surface Methodology in the Optimization of Modified Molecularly Imprinted Polymer Based Pipette-Tip Micro-Solid Phase Extraction for Spectrophotometric Determination of Nicotine in Seawater and Human Plasma," *Anal. Methods*, vol. 11, no. 42, pp. 5405-5412, 2019, DOI: 10.1039/c9ay01496a.
- [105] T. Kumazawa; C. Hasegawa; X.-P. Lee; K. Sato, "New and Unique Methods of Solid-Phase Extraction for Use Before Instrumental Analysis of Xenobiotics in Human Specimens," *Forensic Toxicol.*, vol. 28, no. 2, pp. 61-68, 2010, DOI: 10.1007/s11419-010-0097-7.
- [106] S. Moldoveanu; V. David, "Solid-Phase Extraction," in *Modern Sample Preparation for Chromatography*, 1 ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2015, pp. 191-286, DOI: 10.1016/b978-0-444-54319-6.00007-4.
- [107] T. R. Krishnan; I. Ibrahim, "Solid-Phase Extraction Technique for the Analysis of Biological Samples," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 12, no. 3, pp. 287-294, 1994, DOI: 10.1016/0731-7085(94)90001-9.
- [108] M. K. Bjørk et al., "Quantification of 31 Illicit and Medicinal Drugs and Metabolites in Whole Blood By Fully Automated Solid-Phase Extraction and Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 8, pp. 2607-2617, 2013, DOI: 10.1007/s00216-012-6670-7.
- [109] J. C. Cruz; L. F. C. Miranda; M. E. C. Queiroz, "Pipette Tip Micro-Solid Phase Extraction (Octyl-Functionalized Hybrid Silica Monolith) and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Determine Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol in Plasma Samples," *J. Sep. Sci.*, vol. 44, no. 8, pp. 1621-1632, 2021, DOI: 10.1002/jssc.202000906.
- [110] A. Y. Yang; L. Sun; D. G. Musson; J. J. Zhao, "Determination of M+4 Stable Isotope Labeled Cortisone and Cortisol in Human Plasma By Microelution Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 20, no. 2, pp. 233-240, 2006, DOI: 10.1002/rcm.2303.
- [111] M. Sergi et al., "Micro Extraction By Packed Sorbent Coupled to Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for the Rapid and Sensitive Determination of Cannabinoids in Oral Fluids," *J. Chromatogr. A*, vol. 1301, pp. 139-146, 2013, DOI: 10.1016/j.chroma.2013.05.072.
- [112] M. M. Moein; A. Abdel-Rehim; M. Abdel-Rehim, "Microextraction By Packed Sorbent (MEPS) and Monolithic Packed Pipette Tips for 96-Well Plates," in *Solid-Phase Extraction. Handbooks in Separation Science*, C. F. Poole, Ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2020, pp. 473-491, DOI: 10.1016/b978-0-12-816906-3.00017-0.
- [113] C. Nazyropoulou; V. Samanidou, "Stir Bar Sorptive Extraction Applied to the Analysis of Biological Fluids," *Bioanalysis*, vol. 7, no. 17, pp. 2241-2250, 2015, DOI: 10.4155/bio.15.129.
- [114] M. M. Moein; R. Said; F. Bassyouni; M. Abdel-Rehim, "Solid Phase Microextraction and Related Techniques for Drugs in Biological Samples," *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2014, Art. no. 921350, 2014, DOI: 10.1155/2014/921350.

- [115] M. K. K. Nielsen; M. Nedahl; S. S. Johansen; K. Linnet, "Validation of a Fully Automated Solid-Phase Extraction and Ultra-High-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantification of 30 Pharmaceuticals and Metabolites in Post-Mortem Blood and Brain Samples," *Drug Test. Anal.*, vol. 10, no. 7, pp. 1147-1157, 2018, DOI: 10.1002/dta.2359.
- [116] M. M. Ramírez Fernández; F. Van Durme; S. M. Wille; V. di Fazio; N. Kummer; N. Samyn, "Validation of an Automated Solid-Phase Extraction Method for the Analysis of 23 Opioids, Cocaine, and Metabolites in Urine With Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 38, no. 5, pp. 280-288, 2014, DOI: 10.1093/jat/bku024.
- [117] P. P. Robandt; L. J. Reda; K. L. Klette, "Complete Automation of Solid-Phase Extraction With Subsequent Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Quantification of Benzoyllecgonine, M-Hydroxybenzoyllecgonine, P-Hydroxybenzoyllecgonine, and Norbenzoyllecgonine in Urine—Application to a High-Throughput Urine Analysis Laboratory," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 32, no. 8, pp. 577-585, 2008, DOI: 10.1093/jat/32.8.577.
- [118] Y. He; M. Concheiro-Guisan, "Microextraction Sample Preparation Techniques in Forensic Analytical Toxicology," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 33, no. 1, Art. no. e4444, 2019, DOI: 10.1002/bmc.4444.
- [119] S. Seidi; M. Tajik; M. Baharfar; M. Rezazadeh, "Micro Solid-Phase Extraction (Pipette Tip and Spin Column) and Thin Film Solid-Phase Microextraction: Miniaturized Concepts for Chromatographic Analysis," *Trends Analyt. Chem.*, vol. 118, pp. 810-827, 2019, DOI: 10.1016/j.trac.2019.06.036.
- [120] A. Sarafraz-Yazdi; A. Amiri, "Liquid-Phase Microextraction," *Trends Analyt. Chem.*, vol. 29, no. 1, pp. 1-14, 2010, DOI: 10.1016/j.trac.2009.10.003.
- [121] A. K. Wajid et al., "Hollow Fiber-Based Liquid Phase Microextraction Followed By Analytical Instrumental Techniques for Quantitative Analysis of Heavy Metal Ions and Pharmaceuticals," *J. Pharm. Anal.*, vol. 10, no. 2, pp. 109-122, 2020, DOI: 10.1016/j.jpha.2019.12.003.
- [122] A. Agrawal; R. Keçili; F. Ghorbani-Bidkorbeh; C. M. Hussain, "Green Miniaturized Technologies in Analytical and Bioanalytical Chemistry," *Trends Analyt. Chem.*, vol. 143, Art. no. 116383, 2021, DOI: 10.1016/j.trac.2021.116383.
- [123] Q. Song; W. Naidong, "Analysis of Omeprazole and 5-OH Omeprazole in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography With Tandem Mass Spectrometry (HILIC-MS/MS) - Eliminating Evaporation and Reconstitution Steps in 96-Well Liquid/Liquid Extraction," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 830, no. 1, pp. 135-142, 2006, DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.10.042.
- [124] P. Li; M. G. Bartlett, "A Review of Sample Preparation Methods for Quantitation of Small-Molecule Analytes in Brain Tissue by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)," *Anal. Methods*, vol. 6, no. 16, pp. 6183-6207, 2014, DOI: 10.1039/c4ay00915k.
- [125] S. Mitra, Ed., "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry," 1 ed., Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2003, ISBN: 9780471457817.
- [126] H. van der Jagt, "Water Analysis Overview," in *Encyclopedia of Analytical Science*, 3 ed., C. P. Paul Worsfold; A. Townshend; M. Miró, Eds., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2013, pp. 1-26, DOI: 10.1016/b978-0-12-409547-2.00567-9.

- [127] R. M. Smith, "Before the Injection-Modern Methods of Sample Preparation for Separation Techniques," *J. Chromatogr. A*, vol. 1000, no. 1-2, pp. 3-27, 2003, DOI: 10.1016/s0021-9673(03)00511-9.
- [128] K. E. Avis; V. L. Wu, Eds., "Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing, and Preservation," 1 ed., Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2020, ISBN: 9781003076063.
- [129] Labmate, "Rules for Effective Nitrogen Blowdown Evaporation," Labmate International, Hertfordshire, UK, 2021. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://www.labmate-online.com/news/laboratory-products/3/organomation/rules-for-effective-nitrogen-blowdown-evaporation/55675>
- [130] R. Bonfilio; M. Araújo; H. Salgado, "Recent Applications of Analytical Techniques for Quantitative Pharmaceutical Analysis: A Review," *WSEAS Trans. Biol. Biomed.*, vol. 7, no. 4, pp. 316-338, 2010.
- [131] A. Rodger; K. Sanders, "UV-Visible Absorption Spectroscopy, Biomacromolecular Applications," in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 3 ed., J. C. Lindon; G. E. Tranter; D. W. Koppenaal, Eds., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2017, pp. 495-502, DOI: 10.1016/b978-0-12-803224-4.00108-4.
- [132] S. C. Gill; P. H. von Hippel, "Calculation of Protein Extinction Coefficients From Amino Acid Sequence Data," *Anal. Biochem.*, vol. 182, no. 2, pp. 319-326, 1989, DOI: 10.1016/0003-2697(89)90602-7.
- [133] D. C. Harris, "Lehrbuch der quantitativen Analyse," 8 ed., G. Werner; T. Werner, Eds. Berlin, Heidelberg, DE: Springer Spektrum, 2014, ISBN: 9783642377877.
- [134] M. Johnson, "Protein Quantitation," *Mater Methods*, vol. 2, Art. no. 115, 2012, DOI: 10.13070/mm.en.2.115.
- [135] P. Sitasuwan; T. W. Powers; T. Medwid; Y. Huang; B. Bare; L. A. Lee, "Enhancing the Multi-Attribute Method Through an Automated and High-Throughput Sample Preparation," *MAbs*, vol. 13, no. 1, Art. no. 1978131, 2021, DOI: 10.1080/19420862.2021.1978131.
- [136] S. Parvaneh; F. Khademi; G. Abdi; A. Alizadeh; A. Mostafaie, "Efficient Conjugation of Anti-Hbsag Antibody to Modified Core-Shell Magnetic Nanoparticles (Fe₃O₄@SiO₂/NH₂)," *Bioimpacts*, vol. 11, no. 4, pp. 237-244, 2021, DOI: 10.34172/bi.2021.34.
- [137] C. Nistor; J. Emnéus, "Immunoassay: Potentials and Limitations," in *Comprehensive Analytical Chemistry*, L. Gorton, Ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2005, pp. 375-427, DOI: 10.1016/s0166-526x(05)44009-x.
- [138] BMG Labtech, "Protein Measurement: Find a Suitable Method," BMG Labtech, Ortenberg, DE, 2018. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://www.bmglabtech.com/en/blog/protein-measurement-find-a-suitable-method/>
- [139] Thermo Fisher Scientific, "Protein A280," T105 Rev. 11/2010, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 2010. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Protein-Technical-Guide-EN.pdf>
- [140] Thermo Fisher Scientific, "Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook Version 2," 1602063 12/10, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 2010. Abgerufen: 21.08.2022.

- [Online]:
https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1602063_PAssayHB_122910.pdf
- [141] F. Ganske; K. Ansell, "Homogenous IgG AlphaLisa Assay Performed on BMG Labtech's Pherastar FS," AN190, BMG Labtech, Ortenberg, DE, 2009. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://www.bmg-labtech.com/en/application-notes/homogenous-igg-alpha-lisa-assay-performed-on-bmg-labtechs-pherastar-fs/#>
- [142] J. Yang et al., "An Improved Automated High-Throughput Efficient Microplate Reader for Rapid Colorimetric Biosensing," *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 5, Art. no. 284, 2022, DOI: 10.3390/bios12050284.
- [143] F. Lottspeich; J. W. Engels, Eds., "Bioanalytics: Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology," 1 ed., Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2018, ISBN: 9783527339198 3527339191.
- [144] J. J. Pitt, "Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry," *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 30, pp. 19-34, 2009.
- [145] P. Wallemacq, "Mass Spectrometry in Laboratory Medicine: When „High-Tech“ Meets Routine Needs," *Clin. Biochem.*, vol. 44, no. 1, pp. 2-3, 2011, DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.10.001.
- [146] S. Moldoveanu; V. David, "Reversed-Phase HPLC," in *Essentials in Modern HPLC Separations*, 2 ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2022, pp. 341-419, DOI: 10.1016/b978-0-323-91177-1.00011-9.
- [147] S. Moldoveanu; V. David, "Size Exclusion HPLC," in *Essentials in Modern HPLC Separations*, 2 ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2022, pp. 541-558, DOI: 10.1016/b978-0-323-91177-1.00012-0.
- [148] B. V. Ayyar; S. Arora; C. Murphy; R. O'Kennedy, "Affinity Chromatography as a Tool for Antibody Purification," *Methods*, vol. 56, no. 2, pp. 116-129, 2012, DOI: 10.1016/j.ymeth.2011.10.007.
- [149] G. Ramis-Ramos; M. C. García-Álvarez-Coque, "Solvent Selection in Liquid Chromatography," in *Liquid Chromatography*, S. Fanali; P. R. Haddad; C. F. Poole; P. Schoenmakers; D. Lloyd, Eds., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2013, pp. 225-249, DOI: 10.1016/b978-0-12-415807-8.00010-9.
- [150] S. Kromidas, Ed., "Optimization in HPLC: Concepts and Strategies," 1 ed., Weinheim, DE: Wiley-VCH, 2021, ISBN: 9783527347896.
- [151] K. Lawlor et al., "A Review of Analytical Parameters in 'Rapid' Liquid Chromatographic Methods for Bioanalysis: Can We Do Better?," *J. Chromatogr. A*, vol. 1721, Art. no. 464803, 2024, DOI: 10.1016/j.chroma.2024.464803.
- [152] J. G. Shackman, "General Instrumentation," in *Liquid Chromatography*, S. Fanali; P. R. Haddad; C. F. Poole; P. Schoenmakers; D. Lloyd, Eds., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2013, pp. 283-306, DOI: 10.1016/b978-0-12-415807-8.00013-4.
- [153] S. Moldoveanu; V. David, "Overview of HPLC Instrumentation and Its Use," in *Essentials in Modern HPLC Separations*, 2 ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2022, pp. 21-61, DOI: 10.1016/b978-0-323-91177-1.00015-6.

- [154] G. L. Hortin, "A New Era in Protein Quantification in Clinical Laboratories: Application of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Clin. Chem.*, vol. 53, no. 4, pp. 543-544, 2007, DOI: 10.1373/clinchem.2006.083857.
- [155] J. H. Gross, "Massenspektrometrie: Spektroskopiekurs kompakt," 1 ed., Berlin, DE: Springer Spektrum, 2019, ISBN: 9783662586341.
- [156] J. H. Gross, "Massenspektrometrie," 1 ed., Berlin, Heidelberg, DE: Springer Spektrum, 2013, ISBN: 9783827429803.
- [157] W. Ens; K. G. Standing, "Hybrid Quadrupole/Time-of-Flight Mass Spectrometers for Analysis of Biomolecules," *Methods Enzymol.*, vol. 402, pp. 49-78, 2005, DOI: 10.1016/S0076-6879(05)02002-1.
- [158] M. Jemal; Z. Ouyang, "Enhanced Resolution Triple-Quadrupole Mass Spectrometry for Fast Quantitative Bioanalysis Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: Investigations of Parameters that Affect Ruggedness," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, no. 1, pp. 24-38, 2003, DOI: 10.1002/rcm.872.
- [159] J. G. van der Gugten, "Tandem Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: A Tutorial Overview," *Clin. Mass Spectrom.*, vol. 15, pp. 36-43, 2020, DOI: 10.1016/j.clinms.2019.09.002.
- [160] J. N. Kleis; C. Hess; T. Germerott; J. Roehrich, "Sensitive Screening of Synthetic Cannabinoids Using Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry After Solid Phase Extraction," *Drug Test. Anal.*, vol. 13, no. 8, pp. 1535-1551, 2021, DOI: 10.1002/dta.3052.
- [161] J. Kurreck; J. W. Engels; F. Lottspeich, Eds., "Bioanalytik," 4 ed., Berlin, DE: Springer Spektrum, 2022, ISBN: 9783662617069.
- [162] A. Tan; K. Awaie, "Use of Internal Standards in LC-MS Bioanalysis," in Handbook of LC-MS Bioanalysis, 1 ed., W. Li; J. Zhang; F. L. S. Tse, Eds., Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2013, pp. 217-227, DOI: 10.1002/9781118671276.ch17.
- [163] L. Goodwin; S. A. White; N. Spooner, "Evaluation of Ultra-Performance Liquid Chromatography in the Bioanalysis of Small Molecule Drug Candidates in Plasma," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 45, no. 6, pp. 298-304, 2007, DOI: 10.1093/chromsci/45.6.298.
- [164] P. J. Taylor, "Matrix Effects: The Achilles Heel of Quantitative High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry," *Clin. Biochem.*, vol. 38, no. 4, pp. 328-334, 2005, DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.
- [165] P. Panuwet et al., "Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 46, no. 2, pp. 93-105, 2016, DOI: 10.1080/10408347.2014.980775.
- [166] A. Furey; M. Moriarty; V. Bane; B. Kinsella; M. Lehane, "Ion Suppression; a Critical Review on Causes, Evaluation, Prevention and Applications," *Talanta*, vol. 115, pp. 104-122, 2013, DOI: 10.1016/j.talanta.2013.03.048.
- [167] L. K. Sørensen; J. B. Hasselstrøm, "Sensitive Determination of Cannabinoids in Whole Blood by LC-MS-MS After Rapid Removal of Phospholipids by Filtration," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 41, no. 5, pp. 382-391, 2017, DOI: 10.1093/jat/bkx030.

- [168] J. Carmical; S. Brown, "The Impact of Phospholipids and Phospholipid Removal on Bioanalytical Method Performance," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 30, no. 5, pp. 710-720, 2016, DOI: 10.1002/bmc.3686.
- [169] H. Trufelli; P. Palma; G. Famiglini; A. Cappiello, "An Overview of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 30, no. 3, pp. 491-509, 2011, DOI: 10.1002/mas.20298.
- [170] A. van Eeckhaut; K. Lanckmans; S. Sarre; I. Smolders; Y. Michotte, "Validation of Bioanalytical LC-MS/MS Assays: Evaluation of Matrix Effects," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 23, pp. 2198-2207, 2009, DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.01.003.
- [171] B. K. Matuszewski; M. L. Constanzer; C. M. Chavez-Eng, "Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 13, pp. 3019-3030, 2003, DOI: 10.1021/ac020361s.
- [172] S. Souverain; S. Rudaz; J. L. Veuthey, "Protein Precipitation for the Analysis of a Drug Cocktail in Plasma By LC-ESI-MS," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 35, no. 4, pp. 913-920, 2004, DOI: 10.1016/j.jpba.2004.03.005.
- [173] M. Wood et al., "Quantitative Analysis of Multiple Illicit Drugs in Preserved Oral Fluid By Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Forensic Sci. Int.*, vol. 150, no. 2-3, pp. 227-238, 2005, DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.11.027.
- [174] M. E. I. Badawy; M. A. M. El-Nouby; P. K. Kimani; L. W. Lim; E. I. Rabea, "A Review of the Modern Principles and Applications of Solid-Phase Extraction Techniques in Chromatographic Analysis," *Anal. Sci.*, vol. 38, no. 12, pp. 1457-1487, 2022, DOI: 10.1007/s44211-022-00190-8.
- [175] S. Moldoveanu; V. David, "Modern Sample Preparation for Chromatography," 2 ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2021, ISBN: 9780128214053.
- [176] F. Rigano; P. Q. Tranchida; P. Dugo; L. Mondello, "High-Performance Liquid Chromatography Combined With Electron Ionization Mass Spectrometry: A Review," *Trends Analyt. Chem.*, vol. 118, pp. 112-122, 2019, DOI: 10.1016/j.trac.2019.05.032.
- [177] P. Keski-Rahkonen et al., "LC-MS Analysis of Estradiol in Human Serum and Endometrial Tissue: Comparison of Electrospray Ionization, Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Atmospheric Pressure Photoionization," *J. Mass Spectrom.*, vol. 48, no. 9, pp. 1050-1058, 2013, DOI: 10.1002/jms.3252.
- [178] T. Galaon; C. Vacaresteanu; D. F. Anghel; V. David, "Simultaneous ESI-APCI+ Ionization and Fragmentation Pathways for Nine Benzodiazepines and Zolpidem Using Single Quadrupole LC-MS," *Drug Test. Anal.*, vol. 6, no. 5, pp. 439-450, 2014, DOI: 10.1002/dta.1526.
- [179] N. Ferreirós; S. Labocha; C. Walter; J. Lötsch; G. Geisslinger, "Simultaneous and Sensitive LC-MS/MS Determination of Tetrahydrocannabinol and Metabolites in Human Plasma," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 4, pp. 1399-1406, 2013, DOI: 10.1007/s00216-012-6501-x.
- [180] S. Sullinger; K. Bryand; S. Kerrigan, "Identification of Suvorexant in Urine Using Liquid Chromatography-Quadrupole/Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC-Q/TOF-MS)," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 41, no. 3, pp. 224-229, 2017, DOI: 10.1093/jat/bkw132.

- [181] E. Jones; S. Michael; G. S. Sittampalam, "Basics of Assay Equipment and Instrumentation for High Throughput Screening," in *Assay Guidance Manual*, Bethesda, MD, USA: Eli Lilly and Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk92014#free-full-text>
- [182] G. C. Kalogerakis; H. K. Boparai; M. I. Yang; B. E. Sleep, "A High-Throughput and Cost-Effective Microplate Reader Method for Measuring Persulfates (Peroxydisulfate and Peroxymonosulfate)," *Talanta*, vol. 240, Art. no. 123170, 2022, DOI: 10.1016/j.talanta.2021.123170.
- [183] M. Brezovska; J. Jampilek; R. Opatrilova, "A Review of HPLC Methods Used for Determining the Presence of Meloxicam," *Curr. Pharm. Anal.*, vol. 9, no. 1, pp. 69-76, 2013, DOI: 10.2174/157341213804806179.
- [184] Automationspraxis, "Was ist Automation? Wissenswertes rund um Automatisierung und Industrieautomation," Konradin-Verlag, Leinfelden-Echterdingen, DE, 2023. Abgerufen: 20.08.2024. [Online]: <https://automationspraxis.industrie.de/industrie-4-0/was-ist-automation-wissenswertes-rund-um-automatisierung-und-industrieautomation/>
- [185] Gabler Wirtschaftslexikon „Automatisierung“, Springer Gabler Verlag, Wiesbaden, DE. Abgerufen: 20.08.2024. [Online]: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/automatisierung-27138/version-250801>
- [186] Deutsches Institut für Normung, "Internationales Elektrotechnisches Wörterbuch – Teil 351: Leittechnik (IEC 60050-351:2013)," DIN IEC 60050-351:2014-09, Beuth Verlag, Berlin, DE, 2014.
- [187] VDI, "Montage- und Handhabungstechnik; Handhabungsfunktionen, Handhabungseinrichtungen; Begriffe, Definitionen, Symbole," VDI 2860, VDI Verein Deutscher Ingenieure e.V., Düsseldorf, DE, 1990.
- [188] K. Thurow; S. Junginger, "Devices and Systems for Laboratory Automation," 1 ed., Weinheim, DE: Wiley-VCH, 2023, ISBN: 9783527348329.
- [189] H. A. F. Almurib; H. F. Al-Qrimli; N. Kumar, "A Review of Application Industrial Robotic Design," in *Proc. 2011 Ninth International Conference on ICT and Knowledge Engineering*, Bangkok, Thailand, 2012, pp. 105-112, DOI: 10.1109/ictke.2012.6152387.
- [190] M. Wilson, "Implementation of Robot Systems," 1 ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2015, ISBN: 9780124047334.
- [191] G. Cook, "Mobile Robots: Navigation, Control and Remote Sensing," 1 ed., Hoboken, NJ, USA; Piscataway, NJ, USA: Wiley, 2011, ISBN: 9780470630211.
- [192] K. Thurow et al., "Integrating Mobile Robots Into Automated Laboratory Processes: A Suitable Workflow Management System," *SLAS Technol.*, vol. 26, no. 2, pp. 232-235, 2021, DOI: 10.1177/2472630320967620.
- [193] J. Hertzberg; K. Lingemann; A. Nüchter, "Mobile Roboter: Eine Einführung aus Sicht der Informatik," 1 ed., Berlin, Heidelberg, DE: Springer Vieweg, 2012, ISBN: 9783642017261.
- [194] A. Pott; T. Dietz, "Typen und Einsatzbereiche von Industrierobotern," in *Industrielle Robotersysteme*, 1 ed., Wiesbaden, DE: Springer Vieweg, 2019, pp. 17-34, DOI: 10.1007/978-3-658-25345-5_2.

- [195] B. Siciliano; O. Khatib, Eds., "Springer Handbook of Robotics," 1 ed., Berlin, Heidelberg, DE: Springer-Verlag, 2008, ISBN: 9783540239574.
- [196] Y. Yasar; S. A; K. Korkut; I. I., "Design and Kinematic Analysis of a RPR Robot Arm," *Int. J. Innov. Res. Eng. Manag.*, vol. 3, no. 6, pp. 490-493, 2016, DOI: 10.21276/ijirem.2016.3.6.7.
- [197] H. Fleischer et al., "Application of a Dual-Arm Robot in Complex Sample Preparation and Measurement Processes," *J. Lab. Autom.*, vol. 21, no. 5, pp. 671-681, 2016, DOI: 10.1177/2211068216637352.
- [198] Internationale Organisation für Normung, "Robots and Robotic Devices — Collaborative Robots," ISO/TS 15066:2016, ISO Internationale Organisation für Normung, Genf, CH, 2024. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://www.iso.org/standard/62996.html>
- [199] H.-J. Buxbaum, Ed., "Mensch-Roboter-Kollaboration," 1 ed., Wiesbaden, DE: Springer Gabler, 2020, ISBN: 9783658283063.
- [200] F. Kong; L. Yuan; Y. F. Zheng; W. Chen, "Automatic Liquid Handling for Life Science: A Critical Review of the Current State of the Art," *J. Lab. Autom.*, vol. 17, no. 3, pp. 169-185, 2012, DOI: 10.1177/2211068211435302.
- [201] R. A. Felder, "Modular Workcells: Modern Methods for Laboratory Automation," *Clin. Chim. Acta*, vol. 278, no. 2, pp. 257-267, 1998, DOI: 10.1016/s0009-8981(98)00151-x.
- [202] K. Thurow, "Automation for Life Science Laboratories," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 182, pp. 3-22, 2022, DOI: 10.1007/10_2021_170.
- [203] M. A. Capelle; T. Arvinte, "High-Throughput Formulation Screening of Therapeutic Proteins," *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 5, no. 2-3, pp. 71-79, 2008, DOI: 10.1016/j.ddtec.2009.03.003.
- [204] J. T. Y. Wu; S. Dreger; E. Y. W. Chow, "Developing an Automated Enzyme Immunoassay for High-Throughput Screening of Bovine Serum Antibodies to Neospora Caninum," *J. Lab. Autom.*, vol. 8, no. 1, pp. 46-50, 2003, DOI: 10.1016/s1535-5535(04)00241-2.
- [205] J. L. Hendel; R. A. Gardner; D. I. R. Spencer, "Automation of Immunoglobulin Glycosylation Analysis," *Exp. Suppl.*, vol. 112, pp. 173-204, 2021, DOI: 10.1007/978-3-030-76912-3_5.
- [206] K. Thurow, "System Concepts for Robots in Life Science Applications," *Applied Sciences*, vol. 12, no. 7, Art. no. 3257, 2022, DOI: 10.3390/app12073257.
- [207] H. Fleischer et al., "Flexible Automation System for Determination of Elemental Composition of Incrustations in Clogged Biliary Endoprostheses Using ICP-MS," *SLAS Technol.*, vol. 23, no. 1, pp. 83-96, 2018, DOI: 10.1177/2472630317727451.
- [208] H. Fleischer; S. Statkevych; J. Widmer; R. Stoll; T. Roddelkopf; K. Thurow, "Automated Robotic System for Sample Preparation and Measurement of Heavy Metals in Indoor Dust Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)," *Adv. Sci. Technol. Eng. Syst. J.*, vol. 7, no. 3, pp. 139-151, 2022, DOI: 10.25046/aj070316.
- [209] H. Fleischer; C. Lutter; A. Büttner; W. Mittelmeier; K. Thurow, "Semi-Automated Determination of Heavy Metals in Autopsy Tissue Using Robot-Assisted Sample Preparation and ICP-MS," *Molecules*, vol. 26, no. 13, Art. no. 3820, 2021, DOI: 10.3390/molecules26133820.
- [210] X. Chu; M. Klos; K. Thurow; H. Fleischer, "Efficient Application of Dual-Arm Robots in Analytical Measurements Using Motion Frames," in *Proc. 2018 IEEE International Instrumentation and*

- Measurement Technology Conference (I2MTC)*, Houston, TX, USA, 2018, pp. 1-6, DOI: 10.1109/i2mtc.2018.8409532.
- [211] X. Chu; H. Fleischer; T. Roddelkopf; N. Stoll; M. Klos; K. Thurow, "A LC-MS Integration Approach in Life Science Automation: Hardware Integration and Software Integration," in *Proc. 2015 IEEE International Conference on Automation Science and Engineering (CASE)*, Gothenburg, Sweden, 2015, pp. 979-984, DOI: 10.1109/CoASE.2015.7294226.
- [212] R. Viola; P. Carman; J. Walsh; D. Frankel; B. Rupp, "Automated Robotic Harvesting of Protein Crystals-Addressing a Critical Bottleneck or Instrumentation Overkill," *J. Struct. Funct. Genomics*, vol. 8, no. 4, pp. 145-152, 2007, DOI: 10.1007/s10969-007-9031-6.
- [213] S. K. Wong; Y. Lu; W. Heineman; J. Palmer; C. Courtney, "Fully Automated Solid Weighing Workstation," *J. Biomol. Screen.*, vol. 10, no. 5, pp. 524-531, 2005, DOI: 10.1177/1087057105275457.
- [214] F. F. Schmid et al., "Applicability of a Dual-Arm Robotic System for Automated Downstream Analysis of Epidermal Models," *Appl. In Vitro Toxicol.*, vol. 2, no. 2, pp. 118-125, 2016, DOI: 10.1089/aivt.2015.0027.
- [215] J. Frohm; V. Lindström; M. Winroth; J. Stahre, "Levels of Automation in Manufacturing," *Int. J. Hum. Factors Ergon.*, vol. 30, no. 3, pp. 181-207, 2008.
- [216] K. C. Menke, "Unit Automation in High Throughput Screening," in *High Throughput Screening. Methods in Molecular Biology*, W. P. Janzen, Ed., Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2002, pp. 195-211, DOI: 10.1385/1-59259-180-9:195.
- [217] C. D. Hawker, "Laboratory Automation: Total and Subtotal," *Clin. Lab. Med.*, vol. 27, no. 4, pp. 749-770, 2007, DOI: 10.1016/j.cll.2007.07.010.
- [218] C. D. Hawker, "Nonanalytic Laboratory Automation: A Quarter Century of Progress," *Clin. Chem.*, vol. 63, no. 6, pp. 1074-1082, 2017, DOI: 10.1373/clinchem.2017.272047.
- [219] G. Lippi; G. Da Rin, "Advantages and Limitations of Total Laboratory Automation: A Personal Overview," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 57, no. 6, pp. 802-811, 2019, DOI: 10.1515/cclm-2018-1323.
- [220] G. E. Hoffmann, "Concepts for the Third Generation of Laboratory Systems," *Clin. Chim. Acta*, vol. 278, no. 2, pp. 203-216, 1998, DOI: 10.1016/S0009-8981(98)00147-8.
- [221] K. Thurow, "Grundlagen und Konzepte der Laborautomation," *GIT-Laborfachzeitschrift*, vol. 2, no. 1, pp. 33-35, 2023. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://analyticalscience.wiley.com/content/article-do/grundlagen-und-konzepte-der-laborautomation>
- [222] G. S. Streitberg; L. Angel; K. A. Sikaris; P. T. Bwititi, "Automation in Clinical Biochemistry: Core, Peripheral, Stat, and Specialist Laboratories in Australia," *J. Lab. Autom.*, vol. 17, no. 5, pp. 387-394, 2012, DOI: 10.1177/2211068212448865.
- [223] J. P. Bhartiya; R. Yadav; S. K. Verma; M. K. Nandkeoliar, "Automation in Clinical Laboratories: An Overview," *Int. J. Biomed. Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 162-166, 2013.
- [224] C. Archetti; A. Montanelli; D. Finazzi; L. Caimi; E. Garrafa, "Clinical Laboratory Automation: A Case Study," *J. Public Health Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 31-36, 2017, DOI: 10.4081/jphr.2017.881.

- [225] C. B. Moraes et al., "Accelerating Drug Discovery Efforts for Trypanosomatidic Infections Using an Integrated Transnational Academic Drug Discovery Platform," *SLAS Discov.*, vol. 24, no. 3, pp. 346-361, 2019, DOI: 10.1177/2472555218823171.
- [226] M. Li, "Automation in the Bioanalytical Laboratory: What is the Future?," *Bioanalysis*, vol. 5, no. 23, pp. 2859-2861, 2013, DOI: 10.4155/bio.13.263.
- [227] D. Sun; W. Gao; H. Hu; S. Zhou, "Why 90% of Clinical Drug Development Fails and How to Improve it," *Acta Pharm. Sin. B.*, 2022, DOI: 10.1016/j.apsb.2022.02.002.
- [228] S. Simoens; I. Huys, "R&D Costs of New Medicines: A Landscape Analysis," *Front. Med.*, vol. 8, Art. no. 760762, 2021, DOI: 10.3389/fmed.2021.760762.
- [229] M. J. Wheeler, "Automated Immunoassay Analysers," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 38, no. Pt 3, pp. 217-229, 2001, DOI: 10.1258/0004563011900641.
- [230] S. Tickle et al., "A Fully Automated Primary Screening System for the Discovery of Therapeutic Antibodies Directly from B Cells," *J. Biomol. Screen.*, vol. 20, no. 4, pp. 492-497, 2015, DOI: 10.1177/1087057114564760.
- [231] Siemens Healthineers, "ADVIA Centaur XPT Immunoassay System," Siemens Healthineers, Erlangen, DE, 2022. Abgerufen: 19.11.2022. [Online]: <https://www.siemens-healthineers.com/immunoassay/systems/advia-centaur-xpt>
- [232] P. Najmabadi; A. A. Goldenberg; A. Emili, "Hardware Flexibility of Laboratory Automation Systems: Analysis and New Flexible Automation Architectures," *Clin. Lab. Med.*, vol. 27, no. 1, pp. 1-28, 2007, DOI: 10.1016/j.cl.2006.12.012.
- [233] J. D. Manley; T. J. Smith; J. Holden; R. Edwards; G. Liptrot, "Modular Approaches to Automation System Design Using Industrial Robots," *J. Lab. Autom.*, vol. 13, no. 1, pp. 13-23, 2008, DOI: 10.1016/j.jala.2007.09.003.
- [234] M. Christensen et al., "Automation Isn't Automatic," *Chem. Sci.*, vol. 12, no. 47, pp. 15473-15490, 2021, DOI: 10.1039/d1sc04588a.
- [235] Beckman Coulter Life Sciences, "Biomek i-Series Pipettierroboter," Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA, 2024. Abgerufen: 23.08.2024. [Online]: <https://www.beckman.de/liquid-handlers/biomek-i7/features>
- [236] D. A. Wells, "Automation Tools and Strategies for Bioanalysis," in *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation - Methods and Automation Strategies: Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2003, pp. 135-197, DOI: 10.1016/s1464-3456(03)80007-8.
- [237] K. Thurow, "Automating the Analytical Laboratory - What's next?," *Analytica*, München, DE, 21.03.–22.03.2022.
- [238] K. Thurow; A. Bach; S. Junginger, "Parallele Positive Pressure Festphasenextraktion - eine Übersicht," *BIOspektrum*, vol. 26, no. 5, pp. 550-552, 2020, DOI: 10.1007/s12268-020-1441-z.
- [239] M. G. O. Lorenz, "Liquid-Handling Robotic Workstations for Functional Genomics," *J. Lab. Autom.*, vol. 9, no. 4, pp. 262-267, 2004, DOI: 10.1016/j.jala.2004.03.010.
- [240] Tecan, "Need to Increase Your Throughput of Sars-CoV-2 ELISA Tests?," Tecan, Männedorf, CH, 2022. Abgerufen: 28.10.2022. [Online]: <https://www.tecan.com/serological-testing-for-covid-19>

- [241] Tecan, "Responding to a Pandemic," Tecan, Männedorf, CH, 2022. Abgerufen: 28.10.2022. [Online]: <https://www.tecan.com/tecan-journal/responding-to-a-pandemic>
- [242] D. Karp et al., "Ultra-Sensitive and Specific Detection of SARS-CoV-2 Antibodies Using the ADAP STAR Assay Ready Workstation," AN-2004-23 v1.0, Hamilton, Reno, NV, USA, 2020. Abgerufen: 17.12.2022. [Online]: https://assets-labs.hamiltoncompany.com/AN_ADAP-STAR-and-COVID-19-App-Note.pdf?v=1604359528
- [243] Hamilton, "ADAP STAR," Hamilton, Reno, NV, USA, 2024. Abgerufen: 24.08.2024. [Online]: <https://www.hamiltoncompany.com/automated-liquid-handling/assay-ready-workstations/adap-star>
- [244] Beckman Coulter Life Sciences, "Biomek NGenius Next Generation Library Prep System," Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA, 2022. Abgerufen: 23.08.2024. [Online]: <https://www.beckman.de/liquid-handlers/biomek-ngenius/>
- [245] Illumina, "Illumina DNA Prep," 770-2020-009-A DEU, Illumina, San Diego, CA, USA, 2020. Abgerufen: 23.08.2024. [Online]: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-770-2020-009-translations/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009-deu.pdf>
- [246] Beckman Coulter Life Sciences, "Biomek i-Series Automated Beckman Coulter AMPure XP PCR Purification System," AAG-233301.17, Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA, 2024. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://www.beckman.de/liquid-handlers/genomic-automated-workstations>
- [247] Tecan, "Freedom EVOlyzer - Fully Automated ELISA Processing," 394607 V3.0, 2022-08, Tecan, Männedorf, CH, 2022. Abgerufen: 24.08.2024. [Online]: <https://lifesciences.tecan.com/freedom-evolyzer>
- [248] Agilent Technologies, "Bravo Metabolomics Sample Prep Platform Getting Started Guide," G5589-90000 Revision B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 2019. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/publicG5589-90000B_Metabolomics_GettingStarted_UG_EN_Agilent.pdf
- [249] Hamilton, "Microlab Star V," Hamilton, Reno, NV, USA, 2024. Abgerufen: 24.08.2024. [Online]: <https://info.hamiltoncompany.com/view/598887408/10-11/>
- [250] Hamilton, "Small Devices," Hamilton, Reno, NV, USA, 2024. Abgerufen: 24.08.2024. [Online]: <https://www.hamiltoncompany.com/automated-liquid-handling/small-devices#specialized>
- [251] Beckman Coulter Life Sciences, "Biomek i-Series Automated Labware Positioners, Accessories, & Devices," B54477.AC, Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA, 2018. Abgerufen: 23.08.2024. [Online]: <https://www.beckman.de/liquid-handlers/biomek-i7/features>
- [252] Tecan, "Freedom EVO Platform," Tecan, Männedorf, CH, 2024. Abgerufen: 24.08.2024. [Online]: <https://lifesciences.tecan.com/freedom-evo-platform>
- [253] Agilent Technologies, "Bravo Automated Liquid Handling Platform," Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 2024. Abgerufen: 24.08.2024. [Online]: <https://www.agilent.com/en/product/automated-liquid-handling/automated-liquid-handling-platforms/bravo-automated-liquid-handling-platform>

- [254] B. Rochat, "Fully-Automated Systems and the Need for Global Approaches Should Exhort Clinical Labs to Reinvent Routine MS Analysis," *Bioanalysis*, vol. 10, no. 14, pp. 1129-1141, 2018, DOI: 10.4155/bio-2018-0074.
- [255] F. Steiner; C. Paul; M. W. Dong, "HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices," *LCGC North America*, vol. 37, no. 8, pp. 514-529, 2019. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://www.chromatographyonline.com/view/hplc-autosamplers-perspectives-principles-and-practices>
- [256] Y. Alnouti; K. Srinivasan; D. Waddell; H. Bi; O. Kavetskaia; A. I. Gusev, "Development and Application of a New on-Line Spe System Combined With LC-MS/MS Detection for High Throughput Direct Analysis of Pharmaceutical Compounds in Plasma," *J. Chromatogr. A*, vol. 1080, no. 2, pp. 99-106, 2005, DOI: 10.1016/j.chroma.2005.04.056.
- [257] L. Chen et al., "On-Line Coupling of Solid-Phase Extraction to Liquid Chromatography—a Review," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 47, no. 8, pp. 614-623, 2009, DOI: 10.1093/chromsci/47.8.614.
- [258] J. Pan; C. Zhang; Z. Zhang; G. Li, "Review of Online Coupling of Sample Preparation Techniques With Liquid Chromatography," *Anal. Chim. Acta*, vol. 815, pp. 1-15, 2014, DOI: 10.1016/j.aca.2014.01.017.
- [259] M. J. Berna; B. L. Ackermann; A. T. Murphy, "High-Throughput Chromatographic Approaches to Liquid Chromatographic/Tandem Mass Spectrometric Bioanalysis to Support Drug Discovery and Development," *Anal. Chim. Acta*, vol. 509, no. 1, pp. 1-9, 2004, DOI: 10.1016/j.aca.2003.12.023.
- [260] O. G. Cabrices; F. D. Foster; A. M. Taylor; L. A. Lee, "Prep-and-Shoot: The Completely Automated Workflow for the Hydrolysis and Analysis of Urine Samples by LC/MS/MS," 4/2014, Gerstel, Linthicum, MD, USA, 2014.
- [261] H.-Y. E. Yu et al., "Improving Laboratory Processes With Total Laboratory Automation," *Lab. Med.*, vol. 50, no. 1, pp. 96-102, 2019, DOI: 10.1093/labmed/lmy031.
- [262] A. Tzortzopoulos; V. Raftopoulos; M. A. Talias, "Performance Characteristics of Automated Clinical Chemistry Analyzers Using Commercial Assay Reagents Contributing to Quality Assurance and Clinical Decision in a Hospital Laboratory," *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 80, no. 1, pp. 46-54, 2020, DOI: 10.1080/00365513.2019.1695282.
- [263] W. Zhang et al., "Total Laboratory Automation and Three Shifts Reduce Turnaround Time of Cerebrospinal Fluid Culture Results in the Chinese Clinical Microbiology Laboratory," *Front. Cell Infect. Microbiol.*, vol. 11, Art. no. 765504, 2021, DOI: 10.3389/fcimb.2021.765504.
- [264] M. Bruegel; D. Nagel; M. Funk; P. Fuhrmann; J. Zander; D. Teupser, "Comparison of Five Automated Hematology Analyzers in a University Hospital Setting: Abbott Cell-Dyn Sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000, and Sysmex XN-2000," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 53, no. 7, pp. 1057-1071, 2015, DOI: 10.1515/cclm-2014-0945.
- [265] A. Dasgupta; A. Wahed, "Instrumentation and Analytical Methods," in *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*, Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2014, pp. 1-18, DOI: 10.1016/b978-0-12-407821-5.00001-2.

- [266] A. Dasgupta; A. Wahed, "Lipid Metabolism and Disorders," in *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*, Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2014, pp. 85-105, DOI: 10.1016/b978-0-12-407821-5.00006-1.
- [267] A. Dasgupta; A. Wahed, "Water, Homeostasis, Electrolytes, and Acid–Base Balance," in *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*, Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2014, pp. 67-84, DOI: 10.1016/b978-0-12-407821-5.00005-x.
- [268] A. S. Levey et al., "National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification," *Ann. Internal Med.*, vol. 139, no. 2, pp. 137-147, 2003, DOI: 10.7326/0003-4819-139-2-200307150-00013.
- [269] A. Dasgupta; A. Wahed, "Renal Function Tests," in *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*, Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2014, pp. 197-212, DOI: 10.1016/b978-0-12-407821-5.00011-5.
- [270] S. E. Melanson; N. I. Lindeman; P. Jarolim, "Selecting Automation for the Clinical Chemistry Laboratory," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 131, no. 7, pp. 1063-1069, 2007, DOI: 10.5858/2007-131-1063-SAFTCC.
- [271] CAP Today, "Chemistry and Immunoassay Analyzer," CAP Today, Northfield, IL, USA, 2022. Abgerufen: 17.12.2022, [Online]: https://www.captodayonline.com/2022/ProductGuides/07-22_CAPTODAY_ChemImmuno_MidHighVolume.pdf
- [272] Beckman Coulter, "Klinisch-Chemisches Analysensystem AU680," Beckman Coulter, Brea, CA, USA, 2022. Abgerufen: 27.10.2022. [Online]: <https://www.beckmancoulter.com/de/products/chemistry/au680>
- [273] Abbott, "Abbott Alinity M System Overview," Abbott, Chicago, IL, USA, 2022. Abgerufen: 27.10.2022. [Online]: <https://www.molecular.abbott/int/en/products/infectious-disease/alinity-m-product-overview>
- [274] Abbott, "Alinity SARS-CoV-2 Assay," Abbott, Chicago, IL, USA, 2022. Abgerufen: 27.10.2022. [Online]: <https://www.molecular.abbott/int/en/alinity-m-sars-cov-2-assay>
- [275] G. A. Perchetti et al., "Performance Characteristics of the Abbott Alinity M SARS-CoV-2 Assay," *J. Clin. Virol.*, vol. 140, Art. no. 104869, 2021, DOI: 10.1016/j.jcv.2021.104869.
- [276] Becton Dickinson, "BD Kiestra™ Total Lab Automation (TLA) System," Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA, 2024. Abgerufen: 25.10.2022. [Online]: <https://www.bd.com/en-us/products-and-solutions/products/product-families/bd-kiestra-total-lab-automation-tla-system>
- [277] Thermo Fisher Scientific, "Cascadion™ SM Klinischer Analysensystem," Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 2022. Abgerufen: 27.10.2022. [Online]: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/99990000>
- [278] S. C. Benton et al., "Evaluation of the 25-Hydroxy Vitamin D Assay on a Fully Automated Liquid Chromatography Mass Spectrometry System, the Thermo Scientific Cascadion SM Clinical Analyzer With the Cascadion 25-Hydroxy Vitamin D Assay in a Routine Clinical Laboratory," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 58, no. 6, pp. 1010-1017, 2020, DOI: 10.1515/cclm-2019-0834.

- [279] N. Rupp; K. Peschke; M. Köppl; D. Drissner; T. Zuchner, "Establishment of Low-Cost Laboratory Automation Processes Using Autolt and 4-Axis Robots," *SLAS Technol.*, vol. 27, no. 5, pp. 312-318, 2022, DOI: 10.1016/j.slant.2022.07.001.
- [280] Beckman Coulter, "Hardware Reference Manual - Biomek i Series Automated Workstation," B54474AB, Beckman Coulter, Brea, CA, USA, 2017.
- [281] A. Bach; S. Mikkat; H. Fleischer; M. A. Tlili; T. Roddelkopf; K. Thurow, "Automated Optic Calibration to Optimize Pipetting Accuracy and Precision in a Liquid Handling System," in *Proc. 2024 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*, Glasgow, United Kingdom, 2024, pp. 1-6, DOI: 10.1109/I2MTC60896.2024.10560812.
- [282] S. Kromidas, "Validierung in der Analytik," 2 ed., Weinheim, DE: Wiley-VCH, 2011, ISBN: 9783527329397.
- [283] Deutsches Institut für Normung, "Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung," DIN 32645, Beuth Verlag, Berlin, DE, 2008.
- [284] Deutsches Institut für Normung, "Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen—Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:2019)," DIN ISO 5725-2:2022-05, Beuth Verlag, Berlin, DE, 2022.
- [285] H. Fleischer; K. Ramani; K. Thurow, "Sample preparation and measurement of cholesterol in pig bile using SPE and GC/MS," *Am. Lab.*, vol. 51, no. 2, 2019.
- [286] H. Fleischer; T. Roddelkopf; R. Stoll; K. Thurow, "Automated Analytical Measurement System for Determination of Cholesterol in Pig Bile," in *Proc. 2019 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*, Auckland, New Zealand, 2019, pp. 1-6, DOI: 10.1109/i2mtc.2019.8826917.
- [287] H. Fleischer; A. Bach; A. Reichelt; B. Wijayawardena; M. Kheradmand; K. Thurow, "Automated Sample Pretreatment and Measurement of Benzodiazepines in Serum Using a Biomek i7 Hybrid Workstation and LC-MS/MS," in *Proc. 2022 IEEE 18th International Conference on Automation Science and Engineering (CASE)*, Mexico City, Mexico, 2022, pp. 2423-2428, DOI: 10.1109/case49997.2022.9926726.
- [288] A. Bach; H. Fleischer; B. Wijayawardena; K. Thurow, "Automation System for the Flexible Sample Preparation for Quantification of Δ^9 -THC-D3, THC-OH and THC-COOH from Serum, Saliva and Urine," *Applied Sciences*, vol. 12, no. 6, Art. no. 2838, 2022, DOI: 10.3390/app12062838.
- [289] W. Funk; V. Dammann; G. Donnevert, "Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie: Anwendungen in der Umwelt-, Lebensmittel- und Werkstoffanalytik, Biotechnologie und Medizintechnik," 2 ed., Weinheim, DE: Wiley-VCH, 2005, ISBN: 9783527311125.
- [290] A. Bach; H. Fleischer; K. Thurow, "Comparison of Miniaturized Chromatographic Columns and 96-Well Plates for Automated Antibody Purification under Economic and Sustainable Aspects," *Separations*, vol. 10, no. 8, Art. no. 447, 2023, DOI: 10.3390/separations10080447.
- [291] W. Zeng; D. G. Musson; A. L. Fisher; A. Q. Wang, "A New Approach for Evaluating Carryover and Its Influence on Quantitation in High-Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass

- Spectrometry Assay," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 20, no. 4, pp. 635-640, 2006, DOI: 10.1002/rcm.2353.
- [292] C. C. Chan; H. Lam; X. M. Zhang, Eds., "Practical Approaches to Method Validation and Essential Instrument Qualification," 1 ed., Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2010, ISBN: 9780470630716.
- [293] S. M. Moosavi; S. Ghassabian, "Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability," in *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*, M. T. Stauffer, Ed., London, UK: InTech Open, 2018, pp. 109-127, DOI: 10.5772/intechopen.72932.
- [294] H. P. Becker, "Investition und Finanzierung," 5 ed., Wiesbaden, DE: Gabler Verlag, 2011, ISBN: 9783834931405.
- [295] G. Wöhe; U. Döhring, "Einführung in die Allgemeine Betriebswirtschaftslehre," 25 ed., München, DE: Vahlen, 2013, ISBN: 9783800646876.
- [296] Bundesministerium der Finanzen, "AfA-Tabellen," Bundesministerium der Finanzen, Referat Digitale Kommunikation & Social Media, Berlin, DE, 2023. Abgerufen: 28.08.2023. [Online]: https://www.bundesfinanzministerium.de/Web/DE/Themen/Steuern/Steuerverwaltung-Steuerrecht/Betriebspruefung/AfA_Tabellen/afa_tabellen.html
- [297] Europäische Zentralbank, "Entwicklung des Zinssatzes der Europäischen Zentralbank für das Hauptrefinanzierungsgeschäft von 1999 bis 2023 (Stand: August 2023) [Graph], EZB, 2. August 2023," Statista, Hamburg, DE, 2023. Abgerufen: 28.08.2023. [Online]: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/201216/umfrage/ezb-zinssatz-fuer-das-hauptrefinanzierungsgeschaefit-seit-1999/>
- [298] Bundesrepublik Deutschland Finanzagentur, "Bundesobligationen: DE000BU25018," Bundesrepublik Deutschland Finanzagentur, Frankfurt am Main, DE, 2023. Abgerufen: 29.08.2023. [Online]: <https://www.deutsche-finanzagentur.de/bundeswertpapiere/bundeswertpapierarten/bundesobligationen>
- [299] Bioscientia, "Cannabinoide (LC-MS)(Serum)," Bioscientia Healthcare, Ingelheim, DE, 2023. Abgerufen: 11.08.2023. [Online]: https://www.bioscientia.info/diagnostik-app/de/labortests/cannabinoide-lc-ms/?a=listing&leistung_nr=5743
- [300] Kassenärztliche Bundesvereinigung, "Bestimmung von Substanzen mittels DC, GC und/oder HPLC und anschließender Massenspektrometrie," Kassenärztliche Bundesvereinigung, Berlin, DE, 2023. Abgerufen: 11.08.2023. [Online]: https://www.kbv.de/tools/ebm/html/32314_2902474486191061654848.html
- [301] Bioscientia, "Midazolam (LC-MS/MS)(Serum)," Bioscientia Healthcare, Ingelheim, DE, 2023. Abgerufen: 11.08.2023. [Online]: https://www.bioscientia.info/diagnostik-app/de/labortests/midazolam-lc-msms/?a=listing&leistung_nr=15534#
- [302] Gebührenordnung für Ärzte, "Untersuchung von exogenen Giften mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie, Bestätigungsanalyse, je Untersuchung," GOÄ 4210, Abrechnungsstelle.com, Düsseldorf, DE, 2023. Abgerufen: 11.08.2023. [Online]: <https://abrechnungsstelle.com/goae/goae-4210/>

- [303] Landeslabor Berlin-Brandenburg, "Anreicherung von Stoffen aus Wasser mittels Festphasenextraktion (4.1.4.23)," Leistungsverzeichnis (Preisliste) 2019, Landeslabor Berlin-Brandenburg, Berlin, 2019. Abgerufen: 11.08.2023. [Online]: https://www.landeslabor.berlin-brandenburg.de/media_fast/bb1.a.3937.de/Preisliste2019_v181213i.pdf
- [304] Gebührenordnung für Ärzte, "Quantitative Bestimmung von Antikörpern mittels anderer Methoden," GOÄ 4408-4409, Abrechnungsstelle.com, Düsseldorf, DE, 2023. Abgerufen: 11.08.2023. [Online]: <https://abrechnungsstelle.com/goae/goae-4408-4409/>
- [305] L. H. Keith; L. U. Gron; J. L. Young, "Green Analytical Methodologies," *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 6, pp. 2695-2708, 2007, DOI: 10.1021/cr068359e.
- [306] M. de la Guardia; S. Armenta, "Green Analytical Chemistry: Theory and Practice," 1 ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2010, ISBN: 9780444537102.
- [307] R. A. Sheldon, "Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 6, no. 1, pp. 32-48, 2018, DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b03505.
- [308] J. Płotka-Wasyłka, "A New Tool for the Evaluation of the Analytical Procedure: Green Analytical Procedure Index," *Talanta*, vol. 181, pp. 204-209, 2018, DOI: 10.1016/j.talanta.2018.01.013.
- [309] F. Pena-Pereira; W. Wojnowski; M. Tobiszewski, "AGREE-Analytical GREENness Metric Approach and Software," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 14, pp. 10076-10082, 2020, DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01887.
- [310] A. Gałuszka; Z. Migaszewski; J. Namieśnik, "The 12 Principles of Green Analytical Chemistry and the SIGNIFICANCE Mnemonic of Green Analytical Practices," *Trends Analyt. Chem.*, vol. 50, pp. 78-84, 2013, DOI: 10.1016/j.trac.2013.04.010.
- [311] H. M. Schneider; J. A. Buzacott; T. Rücker, "Operative Produktionsplanung und -steuerung. Konzepte und Modelle des Informations- und Materialflusses in komplexen Fertigungssystemen," 1 ed., München, DE: Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2005, ISBN: 3486576917.
- [312] A. Chaytor, "Benzodiazepines," in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2007, pp. 1-3, DOI: 10.1016/b978-008055232-3.61068-2.
- [313] K. Persona; K. Madej; P. Knihnicki; W. Piekoszewski, "Analytical Methodologies for the Determination of Benzodiazepines in Biological Samples," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 113, pp. 239-264, 2015, DOI: 10.1016/j.jpba.2015.02.017.
- [314] H. Bönisch, "Pharmakologie der Benzodiazepine," *Pharm. Unserer Zeit*, vol. 36, no. 3, pp. 186-194, 2007, DOI: 10.1002/pauz.200600216.
- [315] E. Sigel; M. E. Steinmann, "Structure, Function, and Modulation of GABA(a) Receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 48, pp. 40224-40231, 2012, DOI: 10.1074/jbc.R112.386664.
- [316] K. R. Manchester; L. Waters; S. Haider; P. D. Maskell, "The Blood-to-Plasma Ratio and Predicted GABA(a)-Binding Affinity of Designer Benzodiazepines," *Forensic Toxicol.*, vol. 40, pp. 349-356, 2022, DOI: 10.1007/s11419-022-00616-y.
- [317] E. Sigel; M. Ernst, "The Benzodiazepine Binding Sites of GABA_A Receptors," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 39, no. 7, pp. 659-671, 2018, DOI: 10.1016/j.tips.2018.03.006.

- [318] V. F. Samanidou; M. N. Uddin; I. N. Papadoyannis, "Benzodiazepines: Sample Preparation and HPLC Methods for Their Determination in Biological Samples," *Bioanalysis*, vol. 1, no. 4, pp. 755-784, 2009, DOI: 10.4155/bio.09.43.
- [319] H. Brandenberger; R. A. A. Maes, Eds., "Analytical Toxicology for Clinical, Forensic and Pharmaceutical Chemists," Berlin, DE: De Gruyter, 1997, ISBN: 9783110107319.
- [320] T. Blencowe; K. Vimpari; P. Lillsunde, "Benzodiazepine Whole Blood Concentrations in Cases With Positive Oral Fluid on-Site Screening Test Results Using the Drugwipe® Single for Benzodiazepines," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 35, no. 6, pp. 349-356, 2011, DOI: 10.1093/anatox/35.6.349.
- [321] C.G. Bounds, P. Patel, "Benzodiazepines," StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island, FL, USA. Abgerufen: 28.08.2024. [Online]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470159/>
- [322] Z. Qriouet; Z. Qmichou; N. Bouchoutrouch; H. Mahi; Y. Cherrah; H. Sefrioui, "Analytical Methods Used for the Detection and Quantification of Benzodiazepines," *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2019, Art. no. 2035492, 2019, DOI: 10.1155/2019/2035492.
- [323] B. E. Smink et al., "The Concentration of Oxazepam and Oxazepam Glucuronide in Oral Fluid, Blood and Serum After Controlled Administration of 15 and 30 mg Oxazepam," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 66, no. 4, pp. 556-560, 2008, DOI: 10.1111/j.1365-2125.2008.03252.x.
- [324] S. Vogliardi; M. Tucci; G. Stocchero; S. D. Ferrara; D. Favretto, "Sample Preparation Methods for Determination of Drugs of Abuse in Hair Samples: A Review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 857, pp. 1-27, 2015, DOI: 10.1016/j.aca.2014.06.053.
- [325] W. Schramm; R. H. Smith; P. A. Craig; D. A. Kidwell, "Drugs of Abuse in Saliva: A Review," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1-9, 1992, DOI: 10.1093/jat/16.1.1.
- [326] V. F. Samanidou; A. P. Pechlivanidou; I. N. Papadoyannis, "Development of a Validated HPLC Method for the Determination of Four 1,4-Benzodiazepines in Human Biological Fluids," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 5, pp. 679-687, 2007, DOI: 10.1002/jssc.200600365.
- [327] Y. J. Xue; J. B. Akinsanya; J. Liu; S. E. Unger, "A Simplified Protein Precipitation/Mixed-Mode Cation-Exchange Solid-Phase Extraction, Followed by High-Speed Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, for the Determination of a Basic Drug in Human Plasma," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 20, no. 18, pp. 2660-2668, 2006, DOI: 10.1002/rcm.2645.
- [328] P. W. Dalsgaard et al., "Quantitative Analysis of 30 Drugs in Whole Blood By SPE and UHPLC-TOF-MS," *J. Forensic Sci. Criminol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1-7, 2013, DOI: 10.15744/2348-9804.1.101.
- [329] L. Kristoffersen; M. Langødegård; K. I. Gaare; I. Amundsen; M. N. Terland; D. H. Strand, "Determination of 12 Commonly Found Compounds in DUID Cases in Whole Blood Using Fully Automated Supported Liquid Extraction and UHPLC-MS/MS," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1093-1094, pp. 8-23, 2018, DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.06.050.
- [330] M. Nakamura; T. Ohmori; Y. Itoh; M. Terashita; K. Hirano, "Simultaneous Determination of Benzodiazepines and Their Metabolites in Human Serum By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using a High-Resolution Octadecyl Silica Column Compatible With Aqueous Compounds," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 23, no. 4, pp. 357-364, 2009, DOI: 10.1002/bmc.1122.

- [331] G. Behnke; N. B. Tiscione; J. Rakus; L. Richards-Waugh, "Validation of the Neogen ELISA Benzodiazepine Kit using Clonazepam as the Target Molecule for Blood and Urine," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 43, no. 5, pp. 399-405, 2019, DOI: 10.1093/jat/bkz010.
- [332] W. Huang; D. E. Moody, "Immunoassay Detection of Benzodiazepines and Benzodiazepine Metabolites in Blood," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 19, no. 6, pp. 333-342, 1995, DOI: 10.1093/jat/19.6.333.
- [333] M. D. Krasowski; A. F. Pizon; M. G. Siam; S. Giannoutsos; M. Iyer; S. Ekins, "Using Molecular Similarity to Highlight the Challenges of Routine Immunoassay-Based Drug of Abuse/Toxicology Screening in Emergency Medicine," *BMC Emerg. Med.*, vol. 9, no. 5, 2009, DOI: 10.1186/1471-227X-9-5.
- [334] A. Allqvist; A. Wennerholm; J. O. Svensson; R. A. Mirghani, "Simultaneous Quantification of Alprazolam, 4- and Alpha-Hydroxyalprazolam in Plasma Samples Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 814, no. 1, pp. 127-131, 2005, DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.10.012.
- [335] Phenomenex, "General Methods and User Guide Strata X," Phenomenex, Torrance, CA, USA, 2023. Abgerufen: 21.08.2023. [Online]: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/b64a4b7b-c690-4398-8e7b-7091ab6737e3.pdf>
- [336] L. O. Hanuš; S. M. Meyer; E. Muñoz; O. Tagliatalata-Scafati; G. Appendino, "Phytocannabinoids: A Unified Critical Inventory," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 33, no. 12, pp. 1357-1392, 2016, DOI: 10.1039/c6np00074f.
- [337] Vereinte Nationen, "World Drug Report 2021," Sales No. E.21.XI.8, United Nations, Wien, AT, 2021. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html>
- [338] R. A. Gustafson; E. T. Moolchan; A. Barnes; B. Levine; M. A. Huestis, "Validated Method for the Simultaneous Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), 11-Hydroxy-THC and 11-Nor-9-Carboxy-THC in Human Plasma Using Solid Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry With Positive Chemical Ionization," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 798, no. 1, pp. 145-154, 2003, DOI: 10.1016/j.jchromb.2003.09.022.
- [339] K. Watanabe; S. Yamaori; T. Funahashi; T. Kimura; I. Yamamoto, "Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Tetrahydrocannabinols and Cannabinol By Human Hepatic Microsomes," *Life Sci.*, vol. 80, no. 15, pp. 1415-1419, 2007, DOI: 10.1016/j.lfs.2006.12.032.
- [340] H. Lowe; N. Toyang; B. Steele; J. Bryant; W. Ngwa, "The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 17, Art. no. 9472, 2021, DOI: 10.3390/ijms22179472.
- [341] G. M. Allan et al., "Systematic Review of Systematic Reviews for Medical Cannabinoids," *Can. Fam. Physician*, vol. 64, no. 2, pp. 78-94, 2018.
- [342] T. W. Klein; C. A. Newton; H. Friedman, "Cannabinoids and the Immune System," *Pain Res. Manag.*, vol. 6, no. 2, pp. 95-101, 2001, DOI: 10.1155/2001/326867.
- [343] M. Schulz; A. Schmoltdt; H. Andresen-Streichert; S. Iwersen-Bergmann, "Revisited: Therapeutic and Toxic Blood Concentrations of More Than 1100 Drugs and Other Xenobiotics," *Crit. Care*, vol. 24, no. 1, Art. no. 195, 2020, DOI: 10.1186/s13054-020-02915-5.

- [344] E. Jagerdeo; J. E. Schaff; M. A. Montgomery; M. A. LeBeau, "A Semi-Automated Solid-Phase Extraction Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Tetrahydrocannabinol and Metabolites in Whole Blood," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 23, no. 17, pp. 2697-2705, 2009, DOI: 10.1002/rcm.4174.
- [345] A. G. Verstraete, "Detection Times of Drugs of Abuse in Blood, Urine, and Oral Fluid," *Ther. Drug Monit.*, vol. 26, no. 2, pp. 200-205, 2004, DOI: 10.1097/00007691-200404000-00020.
- [346] L. Lemberger; S. D. Silberstein; J. Axelrod; I. J. Kopin, "Marihuana: Studies on the Disposition and Metabolism of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Man," *Science*, vol. 170, no. 3964, pp. 1320-1322, 1970, DOI: 10.1126/science.170.3964.1320.
- [347] M. E. Wall; B. M. Sadler; D. Brine; H. Taylor; M. Perez-Reyes, "Metabolism, Disposition, and Kinetics of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Men and Women," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 34, no. 3, pp. 352-363, 1983, DOI: 10.1038/clpt.1983.179.
- [348] D. Lee; M. A. Huestis, "Current Knowledge on Cannabinoids in Oral Fluid," *Drug Test. Anal.*, vol. 6, no. 1-2, pp. 88-111, 2014, DOI: 10.1002/dta.1514.
- [349] M. A. Huestis; E. J. Cone, "Differentiating New Marijuana Use From Residual Drug Excretion in Occasional Marijuana Users," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 22, no. 6, pp. 445-454, 1998, DOI: 10.1093/jat/22.6.445.
- [350] H. Teixeira; A. Verstraete; P. Proença; F. Corte-Real; P. Monsanto; D. N. Vieira, "Validated Method for the Simultaneous Determination of Δ^9 -THC and Δ^9 -THC-COOH in Oral Fluid, Urine and Whole Blood Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry With Electrospray Ionization," *Forensic Sci. Int.*, vol. 170, no. 2-3, pp. 148-155, 2007, DOI: 10.1016/j.forsciint.2007.03.026.
- [351] P. L. Williams; A. C. Moffat, "Identification in Human Urine of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-11-oic Acid Glucuronide: A Tetrahydrocannabinol Metabolite," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 32, no. 1, pp. 445-448, 2011, DOI: 10.1111/j.2042-7158.1980.tb12966.x.
- [352] G. Milman et al., "Disposition of Cannabinoids in Oral Fluid After Controlled Around-the-Clock Oral THC Administration," *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 8, pp. 1261-1269, 2010, DOI: 10.1373/clinchem.2009.141853.
- [353] I. Shah; B. Al-Dabbagh; A. E. Salem; S. A. A. Hamid; N. Muhammad; D. P. Naughton, "A Review of Bioanalytical Techniques for Evaluation of Cannabis (Marijuana, Weed, Hashish) in Human Hair," *BMC Chem.*, vol. 13, Art. no. 106, 2019, DOI: 10.1186/s13065-019-0627-2.
- [354] S. W. Toennes; S. Hanisch; W. Pogoda; C. Wunder; A. Paulke, "Pitfall in Cannabinoid Analysis—Detection of a Previously Unrecognized Interfering Compound in Human Serum," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 2, pp. 463-470, 2015, DOI: 10.1007/s00216-014-8301-y.
- [355] O. Aizpurua-Olaizola; I. Zarandona; L. Ortiz; P. Navarro; N. Etxebarria; A. Usobiaga, "Simultaneous Quantification of Major Cannabinoids and Metabolites in Human Urine and Plasma By HPLC-MS/MS and Enzyme-Alkaline Hydrolysis," *Drug Test. Anal.*, vol. 9, no. 4, pp. 626-633, 2017, DOI: 10.1002/dta.1998.
- [356] T. Breindahl; K. Andreasen, "Determination of 11-Nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Urine Using High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass

- Spectrometry," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 732, no. 1, pp. 155-164, 1999, DOI: 10.1016/s0378-4347(99)00276-5.
- [357] N. Badawi; K. W. Simonsen; A. Steentoft; I. M. Bernhoft; K. Linnet, "Simultaneous Screening and Quantification of 29 Drugs of Abuse in Oral Fluid By Solid-Phase Extraction and Ultraperformance LC-MS/MS," *Clin. Chem.*, vol. 55, no. 11, pp. 2004-2018, 2009, DOI: 10.1373/clinchem.2008.122341.
- [358] M. Concheiro; A. de Castro; Ó. Quintela; A. Cruz; M. López-Rivadulla, "Determination of Illicit and Medicinal Drugs and Their Metabolites in Oral Fluid and Preserved Oral Fluid By Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, no. 6, pp. 2329-2338, 2008, DOI: 10.1007/s00216-008-2135-4.
- [359] C. Coulter; M. Garnier; C. Moore, "Analysis of Tetrahydrocannabinol and its Metabolite, 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid, in Oral Fluid Using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 36, no. 6, pp. 413-417, 2012, DOI: 10.1093/jat/bks039.
- [360] T. D. Freijo; S. E. Harris; S. V. Kala, "A Rapid Quantitative Method for the Analysis of Synthetic Cannabinoids by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 38, no. 8, pp. 466-478, 2014, DOI: 10.1093/jat/bku092.
- [361] K. Purschke; S. Heini; O. Lerch; F. Erdmann; F. Veit, "Development and Validation of an Automated Liquid-Liquid Extraction GC/MS Method for the Determination of THC, 11-OH-THC, and Free THC-Carboxylic Acid (THC-COOH) From Blood Serum," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 16, pp. 4379-4388, 2016, DOI: 10.1007/s00216-016-9537-5.
- [362] S. Kneisel; V. Auwärter, "Analysis of 30 Synthetic Cannabinoids in Serum By Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry After Liquid-Liquid Extraction," *J. Mass Spectrom.*, vol. 47, no. 7, pp. 825-835, 2012, DOI: 10.1002/jms.3020.
- [363] N. B. Tiscione; R. Miller; X. Shan; J. Sprague; D. T. Yeatman, "An Efficient, Robust Method for the Determination of Cannabinoids in Whole Blood by LC-MS-MS," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 40, no. 8, pp. 639-648, 2016, DOI: 10.1093/jat/bkw063.
- [364] O. Quintela; D. M. Andrenyak; A. M. Hoggan; D. J. Crouch, "A Validated Method for the Detection of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and 11-Nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Oral Fluid Samples by Liquid Chromatography Coupled With Quadrupole–Time-of-Flight Mass Spectrometry," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 31, no. 3, pp. 157-164, 2007, DOI: 10.1093/jat/31.3.157.
- [365] H. M. E. Lund; E. L. Øiestad; H. Gjerde; A. S. Christophersen, "Drugs of Abuse in Oral Fluid Collected By Two Different Sample Kits – Stability Testing and Validation Using Ultra Performance Tandem Mass Spectrometry Analysis," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 879, no. 30, pp. 3367-3377, 2011, DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.09.002.
- [366] Biotage, "Automated Extraction of Synthetic Cannabinoids (SPICE) from Urine using ISOLUTE® SLE+ Prior to LC-MS/MS," AN793, Biotage, Uppsala, SE, 2013.
- [367] K. B. Scheidweiler; N. A. Desrosiers; M. A. Huestis, "Simultaneous Quantification of Free and Glucuronidated Cannabinoids in Human Urine By Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry," *Clin. Chim. Acta*, vol. 413, no. 23-24, pp. 1839-1847, 2012, DOI: 10.1016/j.cca.2012.06.034.

- [368] E. Bakke; G. Høiseth; H. Furuhaugen; T. Berg; M. Arnestad; H. Gjerde, "Oral Fluid to Blood Concentration Ratios of Different Psychoactive Drugs in Samples From Suspected Drugged Drivers," *Ther. Drug Monit.*, vol. 42, no. 5, pp. 795-800, 2020, DOI: 10.1097/ftd.0000000000000760.
- [369] A. Valen; Å. M. Leere Øiestad; D. H. Strand; R. Skari; T. Berg, "Determination of 21 Drugs in Oral Fluid Using Fully Automated Supported Liquid Extraction and UHPLC-MS/MS," *Drug Test. Anal.*, vol. 9, no. 5, pp. 808-823, 2017, DOI: 10.1002/dta.2045.
- [370] D. M. Sartore; J. L. Costa; F. M. Lanças; Á. J. Santos-Neto, "Packed in-Tube SPME-LC-MS/MS for Fast and Straightforward Analysis of Cannabinoids and Metabolites in Human Urine," *Electrophoresis*, vol. 43, no. 15, pp. 1555-1566, 2022, DOI: 10.1002/elps.202100389.
- [371] D. M. Sartore; D. A. Vargas Medina; J. L. Costa; F. M. Lanças; Á. J. Santos-Neto, "Automated Microextraction By Packed Sorbent of Cannabinoids From Human Urine Using a Lab-Made Device Packed With Molecularly Imprinted Polymer," *Talanta*, vol. 219, Art. no. 121185, 2020, DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121185.
- [372] N. De Giovanni; D. Marchetti, "A Systematic Review of Solid-Phase Microextraction Applications in the Forensic Context," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 44, no. 3, pp. 268-297, 2020, DOI: 10.1093/jat/bkz077.
- [373] D. Andersen; B. Rasmussen; K. Linnet, "Validation of a Fully Automated Robotic Setup for Preparation of Whole Blood Samples for LC-MS Toxicology Analysis," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 36, no. 4, pp. 280-287, 2012, DOI: 10.1093/jat/bks014.
- [374] C. Giroud; A. Ménétrey; M. Augsburger; T. Buclin; P. Sanchez-Mazas; P. Mangin, " Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC and Δ^9 -THCCOOH Plasma or Serum to Whole Blood Concentrations Distribution Ratios in Blood Samples Taken From Living and Dead People," *Forensic Sci. Int.*, vol. 123, no. 2-3, pp. 159-164, 2001, DOI: 10.1016/s0379-0738(01)00538-2.
- [375] D. M. Schwoppe; K. B. Scheidweiler; M. A. Huestis, "Direct Quantification of Cannabinoids and Cannabinoid Glucuronides in Whole Blood By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 401, no. 4, pp. 1273-1283, 2011, DOI: 10.1007/s00216-011-5197-7.
- [376] J. A. Hubbard et al., "Validation of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method to Detect Cannabinoids in Whole Blood and Breath," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 58, no. 5, pp. 673-681, 2020, DOI: 10.1515/cclm-2019-0600.
- [377] M. J. Rumpler, "Quantitative Analysis of 11-Nor-9-Carboxy-Tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in Urine By LC-MS/MS Following a Simple Filtration," *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 957, pp. 77-83, 2014, DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.02.056.
- [378] P. V. Robandt; K. L. Klette; M. Sibum, "Automated Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of 11-Nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Human Urine Specimens: Application to a High-Throughput Urine Analysis Laboratory," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 33, no. 8, pp. 456-460, 2009, DOI: 10.1093/jat/33.8.456.
- [379] E. Jagerdeo; M. A. Montgomery; R. P. Karas; M. Sibum, "A Fast Method for Screening and/or Quantitation of Tetrahydrocannabinol and Metabolites in Urine By Automated SPE/LC/MS/MS," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 1, pp. 329-338, 2010, DOI: 10.1007/s00216-010-3918-y.

- [380] Tecan, "Sample Preparation With the AC Extraction Plate: Extraction of Urinary THC Metabolites for LC-MSMS Quantification," 398180 V1.0. 02-2014, Tecan, Männedorf, CH, 2014.
- [381] M. Dziadosz; M. Klintschar; J. Teske, "Simple Protein Precipitation-Based Analysis of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and Its Metabolites in Human Serum By Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry," *Forensic Toxicol.*, vol. 35, no. 1, pp. 190-194, 2017, DOI: 10.1007/s11419-016-0344-7.
- [382] J. P. Weller; M. Wolf; S. Szidat, "Enhanced Selectivity in the Determination of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and Two Major Metabolites in Serum Using Ion-Trap GC-MS-MS," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 24, no. 5, pp. 359-364, 2000, DOI: 10.1093/jat/24.5.359.
- [383] J. D. Pope; M. J. Black; O. H. Drummer; H. G. Schneider, "Urine Toxicology Screening By Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry in a Quaternary Hospital Setting," *Clin. Biochem.*, vol. 95, pp. 66-72, 2021, DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2021.05.004.
- [384] P. D. Lee; Y. J. Chang; K. L. Lin; Y. Z. Chang, "Simultaneous Determination of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and 11-Nor-9-Carboxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol in Oral Fluid Using Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, no. 2, pp. 851-859, 2012, DOI: 10.1007/s00216-011-5439-8.
- [385] G. Milman et al., "Cannabinoids and Metabolites in Expectorated Oral Fluid After 8 Days of Controlled Around-the-Clock Oral THC Administration," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 401, no. 2, pp. 599-607, 2011, DOI: 10.1007/s00216-011-5066-4.
- [386] M. Sergi; E. Bafile; D. Compagnone; R. Curini; G. D'Ascenzo; F. S. Romolo, "Multiclass Analysis of Illicit Drugs in Plasma and Oral Fluids By LC-MS/MS," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, no. 2, pp. 709-718, 2009, DOI: 10.1007/s00216-008-2456-3.
- [387] R. Kronstrand; L. Brinkhagen; C. Birath-Karlsson; M. Roman; M. Josefsson, "LC-QTOF-MS as a Superior Strategy to Immunoassay for the Comprehensive Analysis of Synthetic Cannabinoids in Urine," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 15, pp. 3599-3609, 2014, DOI: 10.1007/s00216-013-7574-x.
- [388] C. Cattell; A. Mcmillan; M. Evans; S. Grosse; M. Parkin, "Automating DUID Methods Using Robotics for Rapid High Throughput Sample Preparation – Analysis of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and Its Major Metabolite Δ 9-Tetrahydrocannabinol Acid in Whole Blood," *Toxicol. Anal. et Clin.*, vol. 34, no. 3, p. S100, 2022, DOI: 10.1016/j.toxac.2022.06.154.
- [389] Phenomenex, "THC and Metabolite in Plasma by LC/MS/MS on Gemini C18 5 μ m 50 x 3.0," 17901, Phenomenex, Torrance, CA, 2022. Abgerufen: 02.02.2022. [Online]: <https://www.phenomenex.com/applications/single?appid=17901>
- [390] Phenomenex, "Solid Phase Extraction (SPE) Microelution 96-Well Plates - General Methods and Support," Phenomenex, Torrance, CA, USA, 2022. Abgerufen: 02.02.2022. [Online]: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/29d4eb6b-2f38-40e0-b8fc-bd214669b2fe.pdf>
- [391] W. K. Seifert, "Carboxylic Acids in Petroleum and Sediments," in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1 ed., L. Zechmeister; W. Herz; H. Grisebach; G. W. Kirby, Eds., Wien, AT: Springer-Verlag, 1975, pp. 1-49, DOI: 10.1007/978-3-7091-7083-0_1.

- [392] A. Chahardoli; F. Jalilian; Z. Memariani; M. H. Farzaei; Y. Shokoohinia, "Analysis of Organic Acids," in *Recent Advances in Natural Products Analysis*, A. S. Silva; S. F. Nabavi; M. Saeedi; S. M. Nabavi, Eds., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2020, pp. 767-823, DOI: 10.1016/b978-0-12-816455-6.00026-3.
- [393] N. Nghiem; S. Kleff; S. Schwegmann, "Succinic Acid: Technology Development and Commercialization," *Fermentation*, vol. 3, no. 2, Art. no. 26, 2017, DOI: 10.3390/fermentation3020026.
- [394] R. Sieber; U. Bütikofer; J. O. Bosset, "Benzoic Acid as a Natural Compound in Cultured Dairy Products and Cheese," *Int. Dairy J.*, vol. 5, no. 3, pp. 227-246, 1995, DOI: 10.1016/0958-6946(94)00005-a.
- [395] A. Del Olmo; J. Calzada; M. Nuñez, "Benzoic Acid and Its Derivatives as Naturally Occurring Compounds in Foods and as Additives: Uses, Exposure, and Controversy," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 14, pp. 3084-3103, 2017, DOI: 10.1080/10408398.2015.1087964.
- [396] S. S. Yun et al., "Naturally Occurring Benzoic, Sorbic, and Propionic Acid in Vegetables," *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, vol. 12, no. 3, pp. 167-174, 2019, DOI: 10.1080/19393210.2019.1579760.
- [397] B. Heimhuber; K. Herrmann, "Benzoic, Phenylacetic, 3-Phenylpropionic and Cinnamic Acids as Well as Benzoyl Glucoses in Some Fruits and Vegetables," *Deutsche Lebensmittelrundschau*, vol. 86, pp. 205-209, 1990.
- [398] B. B. Kefi; S. Baccouri; R. Torkhani; S. Koumba; P. Martin; N. M'Hamdi, "Application of Response Surface Methodology to Optimize Solid-Phase Extraction of Benzoic Acid and Sorbic Acid from Food Drinks," *Foods*, vol. 11, no. 9, Art. no. 1257, 2022, DOI: 10.3390/foods11091257.
- [399] L. Angiolillo; A. Conte; M. A. Del Nobile, "Food Additives: Natural Preservatives," in *Encyclopedia of Food Safety*, Y. Motarjemi, Ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2014, pp. 474-476, DOI: 10.1016/b978-0-12-378612-8.00438-8.
- [400] J. W. Lee; M.-S. Han; S. Choi; J. Yi; T. W. Lee; S. Y. Lee, "Organic Acids: Succinic and Malic Acids," in *Comprehensive Biotechnology*, 2 ed., M. Moo-Young, Ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2011, pp. 149-161, DOI: 10.1016/b978-0-08-088504-9.00183-5.
- [401] P. Makoś; A. Fernandes; G. Boczkaj, "Method for the Determination of Carboxylic Acids in Industrial Effluents Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction With Injection Port Derivatization Gas Chromatography-Mass Spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1517, pp. 26-34, 2017, DOI: 10.1016/j.chroma.2017.08.045.
- [402] P. Christensen; M. Kristensen; H. C. B. Hansen; O. K. Borggaard; J. H. Christensen, "A Retrospective Quantification Study of Benzoic Acid, Ibuprofen, and Mecoprop in Danish Groundwater Samples," *Environ. Adv.*, vol. 7, Art. no. 100180, 2022, DOI: 10.1016/j.envadv.2022.100180.
- [403] H. Barchanska; M. Sajdak; K. Szczyпка; A. Swientek; M. Tworek; M. Kurek, "Atrazine, Triketone Herbicides, and Their Degradation Products in Sediment, Soil and Surface Water Samples in Poland," *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, vol. 24, no. 1, pp. 644-658, 2017, DOI: 10.1007/s11356-016-7798-3.

- [404] G. O. Bosire; J. C. Ngila; H. Parshotam, "Comparison of Three Solid Phase Materials for the Extraction of Carboxylic Acids from River Water Followed By 2D GC × GC-TOFMS Determination," *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2016, Art. no. 6396938, 2016, DOI: 10.1155/2016/6396938.
- [405] M. T. García-Córcoles et al., "Chromatographic Methods for the Determination of Emerging Contaminants in Natural Water and Wastewater Samples: A Review," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 49, no. 2, pp. 160-186, 2019, DOI: 10.1080/10408347.2018.1496010.
- [406] A. Wibbertmann; J. Kiehlhorn; G. Koennecker; I. Mangelsdorf; C. Melber, "Benzoic Acid and Sodium Benzoate," Genf, CH: World Health Organization, 2000, ISBN: 924153026X.
- [407] Europäisches Parlament, "Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe," ABl. L 354 vom 31.12.2008, Amt für Veröffentlichungen der Europäischen Union, Luxemburg, LU, 2024. Abgerufen: 29.08.2024. [Online]: <https://op.europa.eu/de/publication-detail/-/publication/6209fb5f-160d-11ec-b4fe-01aa75ed71a1>
- [408] J. Burana-Osot; L. Arunsingharat; M. Naksuk; S. Naungnamjai; T. Saetun, "Validation of a HPLC Method for the Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Noodles," *Chiang Mai J. Sci.*, vol. 41, no. 2, pp. 370-382, 2014.
- [409] G. Karasová; J. Lehotay; E. Klodzinska; R. Gadzała-Kopciuch; B. Buszewski, "Comparison of Several Extraction Methods for the Isolation of Benzoic Acid Derivatives From *Melissa Officinalis*," *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 29, no. 11, pp. 1633-1644, 2006, DOI: 10.1080/10826070600678365.
- [410] R. J. Robbins; S. R. Bean, "Development of a Quantitative High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection Measurement System for Phenolic Acids," *J. Chromatogr. A*, vol. 1038, no. 1-2, pp. 97-105, 2004, DOI: 10.1016/j.chroma.2004.03.009.
- [411] R. E. Alumbaugh; L. M. Gieg; J. A. Field, "Determination of Alkylbenzene Metabolites in Groundwater By Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1042, no. 1-2, pp. 89-97, 2004, DOI: 10.1016/j.chroma.2004.05.031.
- [412] S. Godin et al., "An LC-MS/MS Method for a Comprehensive Determination of Metabolites of BTEX Anaerobic Degradation in Bacterial Cultures and Groundwater," *Water*, vol. 12, no. 7, Art. no. 1869, 2020, DOI: 10.3390/w12071869.
- [413] H. Fleischer; S. Horn; A. Bach; T. Roddelkopf; K. Thurow, "Automated Determination of Benzoic Acids in Water Samples Using a Biomek i7 Hybrid Workstation, Positive Pressure Solid Phase Extraction and LC with UV Detection," in *Proc. 2023 IEEE 19th International Conference on Automation Science and Engineering (CASE)*, Auckland, New Zealand, 2023, pp. 1-7, DOI: 10.1109/case56687.2023.10260590.
- [414] A. B. Kapingidza; K. Kowal; M. Chruszcz, "Antigen-Antibody Complexes," in *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins*, U. Hoeger; J. Harris, Eds., Cham, CH: Springer Nature Switzerland, 2020, pp. 465-497, DOI: 10.1007/978-3-030-41769-7_19.
- [415] E. Liddell, "Antibodies," in *The Immunoassay Handbook*, 4 ed., D. Wild, Ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2013, pp. 245-265, DOI: 10.1016/b978-0-08-097037-0.00017-8.

- [416] C. Schütt; B. Bröker, "Grundwissen Immunologie," 3 ed., Heidelberg, DE: Spektrum Akademischer Verlag, 2011, ISBN: 9783827426468.
- [417] G. Walsh, "Biopharmaceutical Benchmarks 2018," *Nat. Biotechnol.*, vol. 36, no. 12, pp. 1136-1145, 2018, DOI: 10.1038/nbt.4305.
- [418] T. A. Waldmann, "Immunotherapy: Past, Present and Future," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 3, pp. 269-277, 2003, DOI: 10.1038/nm0303-269.
- [419] R. M. Lu et al., "Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases," *J. Biomed. Sci.*, vol. 27, Art. no. 1, 2020, DOI: 10.1186/s12929-019-0592-z.
- [420] S. Chandra, "Top 20 Prescription Drugs Based on 2022 Total Revenue," PharmaShots, Uttar Pradesh, IN, 2022. Abgerufen: 04.08.2024. [Online]: <https://pharmashots.com/16397/top-20-prescription-drugs-based-on-2022-total-revenue>
- [421] H. Gremmels et al., "Real-Life Validation of the Panbio™ COVID-19 Antigen Rapid Test (Abbott) in Community-Dwelling Subjects With Symptoms of Potential SARS-CoV-2 Infection," *EClinicalMedicine*, vol. 31, Art. no. 100677, 2021, DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100677.
- [422] Q. Shi; Y. Sun, "Protein A-Based Ligands for Affinity Chromatography of Antibodies," *Chin. J. Chem. Eng.*, vol. 30, pp. 194-203, 2021, DOI: 10.1016/j.cjche.2020.12.001.
- [423] C. S. Pavia; G. P. Wormser, "Passive Immunization and Its Rebirth in the Era of the COVID-19 Pandemic," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 57, no. 3, Art. no. 106275, 2021, DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106275.
- [424] M. Tomita; K. Tsumoto, "Hybridoma Technologies for Antibody Production," *Immunotherapy*, vol. 3, no. 3, pp. 371-380, 2011, DOI: 10.2217/imt.11.4.
- [425] L. Ledsgaard; M. Kilstrup; A. Karatt-Vellatt; J. McCafferty; A. H. Laustsen, "Basics of Antibody Phage Display Technology," *Toxins*, vol. 10, no. 6, Art. no. 236, 2018, DOI: 10.3390/toxins10060236.
- [426] A. Pedrioli; A. Oxenius, "Single B Cell Technologies for Monoclonal Antibody Discovery," *Trends Immunol.*, vol. 42, no. 12, pp. 1143-1158, 2021, DOI: 10.1016/j.it.2021.10.008.
- [427] A. A. Shukla; J. Thömmes, "Recent Advances in Large-Scale Production of Monoclonal Antibodies and Related Proteins," *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 5, pp. 253-261, 2010, DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.02.001.
- [428] J. R. Birch; A. J. Racher, "Antibody Production," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, no. 5-6, pp. 671-685, 2006, DOI: 10.1016/j.addr.2005.12.006.
- [429] P. Gronemeyer; R. Ditz; J. Strube, "Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing," *Bioengineering (Basel)*, vol. 1, no. 4, pp. 188-212, 2014, DOI: 10.3390/bioengineering1040188.
- [430] Cytiva, "Predictor Plates," Cytiva, Uppsala, SE, 2024. Abgerufen: 04.08.2024. [Online]: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/prepacked-columns/affinity-antibody/predictor-mabselect-prisma-filter-plates-96-well-p-09651>
- [431] Biotage, "Protein A Phytip Columns," PPS607, Biotage, Uppsala, SE, 2020. Abgerufen: 04.08.2024. [Online]:

- <https://selekt.biotage.com/hubfs/Biomolecules/DOCUMENTS/PPS607%20PhyTip%20Protein%20A.pdf?hsLang=en>
- [432] Tecan, "True Parallel Protein Purification With PhyTip Columns Using the Freedom Evo and Multichannel Arm 96," 396301 V1.0, Tecan, Männedorf, CH, 2010.
- [433] K. M. Łacki, "High-Throughput Process Development of Chromatography Steps: Advantages and Limitations of Different Formats Used," *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 10, pp. 1192-1202, 2012, DOI: 10.1002/biot.201100475.
- [434] A. A. Shukla; S. Rameez; L. S. Wolfe; N. Oien, "High-Throughput Process Development for Biopharmaceuticals," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 165, pp. 401-441, 2018, DOI: 10.1007/10_2017_20.
- [435] G. R. Bolton; K. K. Mehta, "The Role of More Than 40 Years of Improvement in Protein A Chromatography in the Growth of the Therapeutic Antibody Industry," *Biotechnol. Prog.*, vol. 32, no. 5, pp. 1193-1202, 2016, DOI: 10.1002/btpr.2324.
- [436] J.-C. Janson, Ed., "Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications," 3 ed., Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2011, ISBN: 9780471746614.
- [437] Cytiva, "Purification of Monoclonal Antibodies Using Modern Chromatography Media and Membranes," CY13545, Cytiva, Uppsala, SE, 2020.
- [438] A. T. Hanke; M. Ottens, "Purifying Biopharmaceuticals: Knowledge-Based Chromatographic Process Development," *Trends Biotechnol.*, vol. 32, no. 4, pp. 210-220, 2014, DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.02.001.
- [439] V. Brenac Brochier; V. Ravault, "High Throughput Development of a Non Protein A Monoclonal Antibody Purification Process Using Mini-Columns and Bio-Layer Interferometry," *Eng. Life Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 152-159, 2016, DOI: 10.1002/elsc.201400244.
- [440] D. L. Wensel; B. D. Kelley; J. L. Coffman, "High-Throughput Screening of Chromatographic Separations: III. Monoclonal Antibodies on Ceramic Hydroxyapatite," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 100, no. 5, pp. 839-854, 2008, DOI: 10.1002/bit.21906.
- [441] S. Chhatre; D. G. Bracewell; N. J. Titchener-Hooker, "A Microscale Approach for Predicting the Performance of Chromatography Columns Used to Recover Therapeutic Polyclonal Antibodies," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 45, pp. 7806-7815, 2009, DOI: 10.1016/j.chroma.2009.09.038.
- [442] J. Hopp; R. Pritchett; M. Darlucio; J. Ma; J. H. Chou, "Development of a High Throughput Protein a Well-Plate Purification Method for Monoclonal Antibodies," *Biotechnol. Prog.*, vol. 25, no. 5, pp. 1427-1432, 2009, DOI: 10.1002/btpr.247.
- [443] J. Feliciano et al., "Evaluating High-Throughput Scale-Down Chromatography Platforms for Increased Process Understanding," *Eng. Life Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 169-178, 2016, DOI: 10.1002/elsc.201400241.
- [444] H. Ketha; R. J. Singh, "Quantitation of Albumin in Urine By Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1378, pp. 31-36, 2016, DOI: 10.1007/978-1-4939-3182-8_4.
- [445] A. C. Robotham; J. F. Kelly, "LC-MS Characterization of Antibody-Based Therapeutics," in *Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics*, A.

- Matte, Ed., Amsterdam, NL; New York, NY, USA: Elsevier, 2020, pp. 1-33, DOI: 10.1016/b978-0-08-103019-6.00001-1.
- [446] J. Dong; N. Migliore; S. J. Mehrman; J. Cunningham; M. J. Lewis; P. Hu, "High-Throughput, Automated Protein A Purification Platform With Multiattribute LC-MS Analysis for Advanced Cell Culture Process Monitoring," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 17, pp. 8673-8679, 2016, DOI: 10.1021/acs.analchem.6b01956.
- [447] A. B. Bos; P. Luan; J. N. Duque; D. Reilly; P. D. Harms; A. W. Wong, "Optimization and Automation of an End-to-end High Throughput Microscale Transient Protein Production Process," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 112, no. 9, pp. 1832-1842, 2015, DOI: 10.1002/bit.25601.
- [448] Cytiva, "Capacity and Performance of MabSelect Prisma Protein A Chromatography Resin," CY14008-02Jun20-AN, Cytiva, Uppsala, SE, 2020.
- [449] Cytiva, "High-Throughput Process Development With Predictor Plates," CY16051-24Feb21-HB, Cytiva, Uppsala, SE, 2021.
- [450] Tecan, "Microscale Purification of Monoclonal Antibodies on the Fluent Automation Workstation," 401771 V1.0, Tecan, Männedorf, CH, 2020.
- [451] S. Sommerfeld; J. Strube, "Challenges in Biotechnology Production - Generic Processes and Process Optimization for Monoclonal Antibodies," *Chem. Eng. Process.*, vol. 44, no. 10, pp. 1123-1137, 2005, DOI: 10.1016/j.cep.2005.03.006.
- [452] F. Li; N. Vijayasankaran; A. Y. Shen; R. Kiss; A. Amanullah, "Cell Culture Processes for Monoclonal Antibody Production," *MAbs*, vol. 2, no. 5, pp. 466-479, 2010, DOI: 10.4161/mabs.2.5.12720.
- [453] B. Kelley, "Very Large Scale Monoclonal Antibody Purification: The Case for Conventional Unit Operations," *Biotechnol. Prog.*, vol. 23, no. 5, pp. 995-1008, 2007, DOI: 10.1021/bp070117s.
- [454] PubChem, "Δ9-Trans-Tetrahydrocannabinol," National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA, 2022. Abgerufen: 20.11.2022. [Online]: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/delta9-trans-Tetrahydrocannabinol>
- [455] CAS Commonchemistry, "Benzoic Acid," American Chemical Society, Columbus, OH, USA, 2022. Abgerufen: 20.11.2022. [Online]: <https://commonchemistry.cas.org/detail?ref=65-85-0>
- [456] Gelbe Liste, "Alprazolam," Gelbe Liste, Langen, DE, 2022. Abgerufen: 20.11.2022. [Online]: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Alprazolam_3236
- [457] L. Backman, "Protein Chemistry," 1 ed., Berlin, DE; Boston, MA, USA: De Gruyter, 2020, ISBN: 9783110566185.
- [458] H. Yao et al., "Molecular Architecture of the Sars-CoV-2 Virus," *Cell*, vol. 183, no. 3, pp. 730-738, 2020, DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.018.
- [459] V. U. Weiss et al., "Virus-Like Particle Size and Molecular Weight/Mass Determination Applying Gas-Phase Electrophoresis (Native nES GEMMA)," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 411, no. 23, pp. 5951-5962, 2019, DOI: 10.1007/s00216-019-01998-6.
- [460] D. Z. Keifer; E. E. Pierson; J. A. Hogan; G. J. Bedwell; P. E. Prevelige; M. F. Jarrold, "Charge Detection Mass Spectrometry of Bacteriophage P22 Procapsid Distributions Above 20 MDa," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 28, no. 5, pp. 483-488, 2014, DOI: 10.1002/rcm.6809.

- [461] C. S. Kaddis et al., "Sizing Large Proteins and Protein Complexes By Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Ion Mobility," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 18, no. 7, pp. 1206-1216, 2007, DOI: 10.1016/j.jasms.2007.02.015.
- [462] P. von Sengbusch, "Struktur von Nukleinsäuren," in *Molekular- und Zellbiologie*, Berlin, Heidelberg, DE: Springer, 1979, pp. 13-22, DOI: 10.1007/978-3-642-67358-0_2.
- [463] R. L. P. Adams; J. T. Knowler; D. P. Leader, "The Biochemistry of the Nucleic Acids," 10 ed., London, UK; New York, NY, USA: Chapman and Hall, 1986, ISBN: 9789401083218.
- [464] G. Yusupova; M. Yusupov, "Ribosome Biochemistry in Crystal Structure Determination," *RNA*, vol. 21, no. 4, pp. 771-773, 2015, DOI: 10.1261/rna.050039.115.
- [465] P. M. Schmidt et al., "A Robust Robotic High-Throughput Antibody Purification Platform," *J. Chromatogr. A*, vol. 1455, pp. 9-19, 2016, DOI: 10.1016/j.chroma.2016.05.076.
- [466] Tecan, "Antibody Purification," 400514 V1.0, Tecan, Männedorf, CH, 2017.
- [467] F. Holenstein et al., "Automated Harvesting and 2-Step Purification of Unclarified Mammalian Cell-Culture Broths Containing Antibodies," *J. Chromatogr. A*, vol. 1418, pp. 103-109, 2015, DOI: 10.1016/j.chroma.2015.09.040.
- [468] X. Yang et al., "Development of a Robust and Semi-Automated Two-Step Antibody Purification Process," *MAbs*, vol. 13, no. 1, Art. no. e2000348, 2021, DOI: 10.1080/19420862.2021.2000348.
- [469] N. Sanaie; D. Cecchini; J. Pieracci, "Applying High-Throughput Methods to Develop a Purification Process for a Highly Glycosylated Protein," *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 10, pp. 1242-1255, 2012, DOI: 10.1002/biot.201200170.
- [470] T. Bergander; K. Nilsson-Välimaa; K. Oberg; K. M. Lacki, "High-Throughput Process Development: Determination of Dynamic Binding Capacity Using Microtiter Filter Plates Filled With Chromatography Resin," *Biotechnol. Prog.*, vol. 24, no. 3, pp. 632-639, 2008, DOI: 10.1021/bp0704687.
- [471] J. L. Coffman; J. F. Kramarczyk; B. D. Kelley, "High-Throughput Screening of Chromatographic Separations: I. Method Development and Column Modeling," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 100, no. 4, pp. 605-618, 2008, DOI: 10.1002/bit.21904.
- [472] Tecan, "Phytip Columns Processed on the Tecan Freedom Evo for Complete Automation of High-Throughput Protein Purification and Sample Preparation," 396241 V1.0, Tecan, Männedorf, CH, 2010.
- [473] K. K. Jain, "The Handbook of Biomarkers," 2 ed. New York, NY, USA: Humana Press, 2017, ISBN:978-1-4939-7431-3.

10. Anhang

10.1 Bioanalytische Probenvorbereitung

Table 10.1: Übersicht Molekulargewicht verschiedener Verbindungen

Molekülgruppe	Molekül	Molekulargewicht	Ref.
Kleine Moleküle	THC	314,5 Da	[454]
	Benzoessäure	122,12 Da	[455]
	Alprazolam	308,765	[456]
Proteine	Myoglobin (kleines globuläres Protein in allen Tieren vorhanden)	17 kDa	[457]
	Fibronectin (fibröses Protein, in Extrazellulärem Raum)	250 kDa	[457]
	Tropoelastin	72 kDa	[457]
	Seidenfibroin, schwere Kette	390 kDa	[457]
	Tubulin	50-53 kDa	[457]
	Actin	42 kDa	[457]
	Thymosin	5 kDa	[457]
	Filamin	280 kDa	[457]
	Myosin 2 (Muskulatur)	520 kDa	[457]
	SARS-CoV-2-Virus, S-Protein	660 kDa	[458]
Enzym	Beta-Galaktosidase	931 kDa	[459]
Antikörper	IgG (Monomer)	147 kDa	[459]
Virus	Bacteriophage P22 VLP	19,84 MDa	[460]
	Hepatitis B Virus (HBV) T4 VLP	4,006 MDa	[461]
DNA	DNA	1 Basenpaar, 650 Da	[462]
	Mitochondriale DNA (Maus)	9,5 MDa	[463]
	Menschliche DNA	3 Milliarden Basenpaare; 1.950.000 MDa	[462]
	Escherichia coli	1.900 MDa	[463]
	Hamophilus Influenzae	800 MDa	[463]
	Ribosomen (Bakterien)	2,5 MDa	[464]
	Ribosomen (Mensch)	4,5 MDa	[464]

10.2 Anhang Systemkonzept

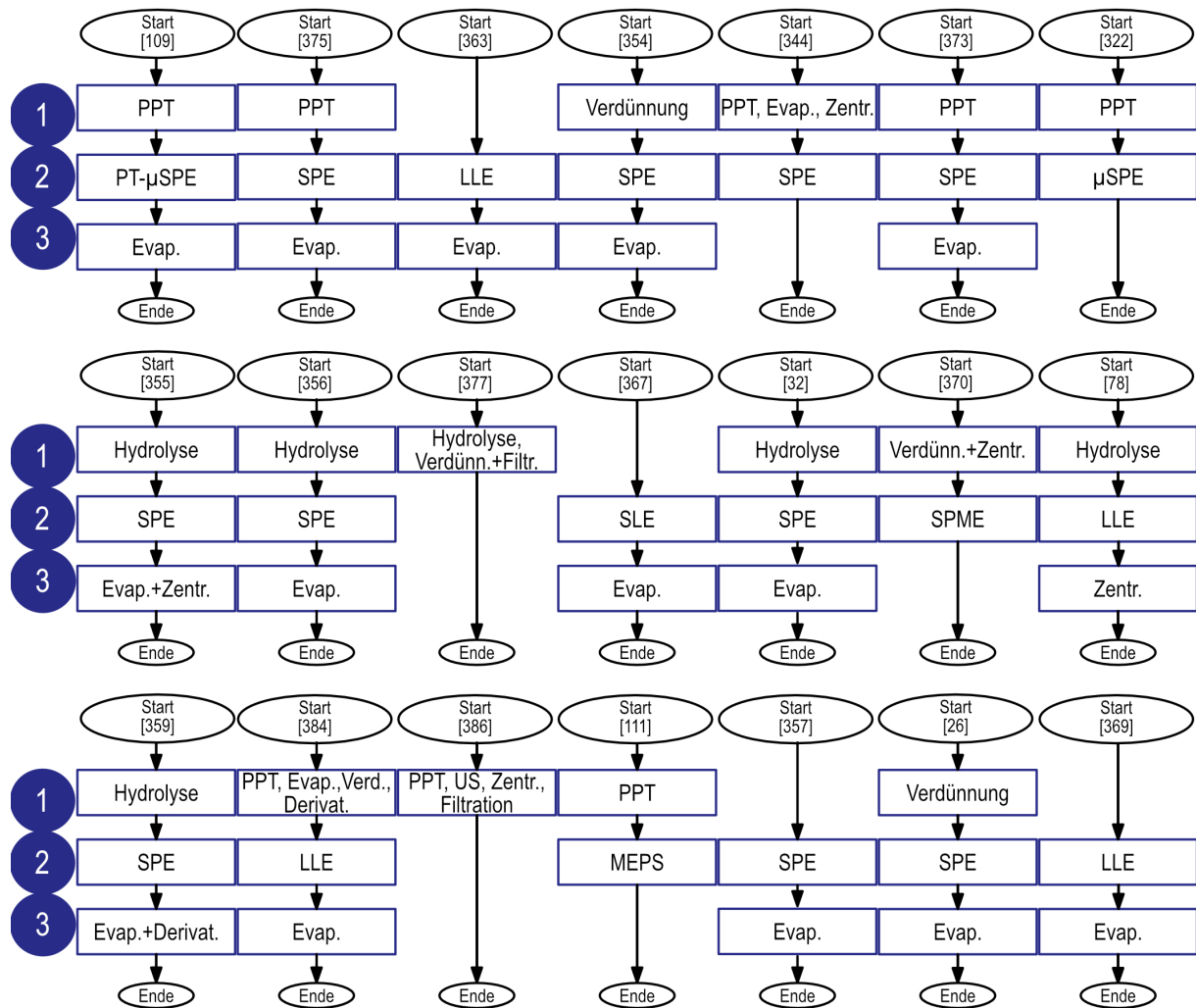


Abbildung 10.1: Übertragung der dreistufigen Gliederung auf ausgewählte Beispiele von Probenvorbereitungsmethoden in der Literatur

Tabelle 10.2: Robotische Funktionen und dafür benötigte Module

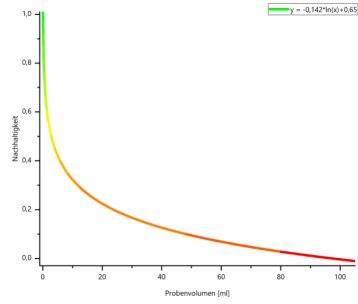
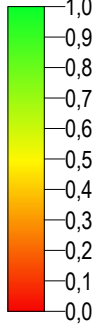
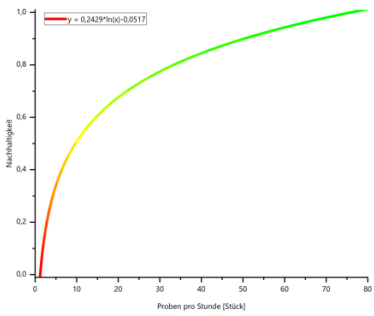
Aufgabe/ Funktion	Benötigtes Modul
Transport von Labware	Greifer
Transfer von Flüssigkeiten	Pipettierkopf
Bearbeitung von Einzelgefäßen	Einzelkanal-Pipettierkopf
Transport von Einzelgefäßen	Adapter, im MTP-Standardformat
Parallele Bearbeitung von 96 Proben	Mehrkanal-Pipettierkopf
Durchstechung von Septen	Fixed Tips
SPE/ Überdruck	Überdruckeinheit, mind. 4.000 mbar
Bereitstellung großer Lösungsmittelvolumina	Quarter Reservoir, bis zu 12,5 ml
Lager Labware	Ausreichende Anzahl an Positionen
Vollständige Entnahme von Flüssigkeiten aus Vials und MTP	Anschrägen der Labware, 3D Tilting ALP
Bearbeitung von miniaturisierten chromatographischen Säulen	Modul, zur Bearbeitung von miniaturisierten chromatographischen Säulen, z.B. RoboColumn ALP, Te-Chrom Modul
Homogenisieren von Flüssigkeiten in MTP und Vials	Shaker, geeignet für MTP und Einzelvials, mind. 1.500 rpm
Kühlung von Flüssigkeiten, z.B. IS, Essigsäure	Integrierbares Kühlmodul
Zentrifugieren	Integrierbare Zentrifuge, mind. 3.000 rpm
Inkubieren	Integrierbarer Inkubator, mind. 60°C

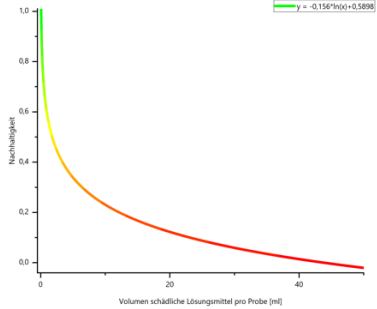
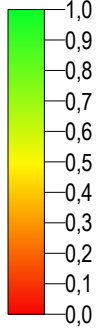
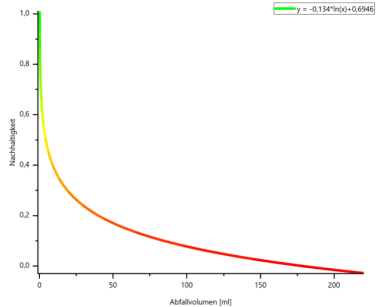
10.3 Anhang Bewertung des Automationssystems

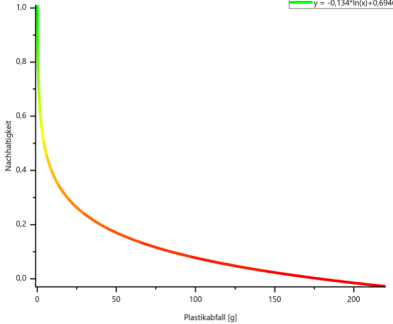
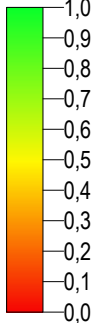
Tabelle 10.3: Zusammenhang zwischen prozessabhängigen Faktoren und Probenzahl n_R

prozessabhängige Faktoren	Probenzahl n_R	Ref.
Bearbeitbare Positionen in Rack 6	6	[209]
Bearbeitbare Positionen in Rack 6 bearbeitbare Positionen (von 12 freien Positionen)	6	[285]
Bearbeitbare Positionen in Rack 24	24	[286]
hohe Durchlaufzeit (zeitintensive Prozesse)	6	[282]
hohe Durchlaufzeit (zeitintensive Prozesse)	16	[290]
kurze Durchlaufzeit	24	[287]
kurze Durchlaufzeit	25	[288]
Mit zunehmender Probenzahl steigt die Präzision durch den umgekehrt proportionalen Zusammenhang der Näherung der Standardabweichung und der Wurzel der Probenzahl. Eine Abwägung zwischen Aufwand und zusätzlichem Nutzen von höheren Probenzahlen, führt zur Begrenzung von n_R auf maximal 25 Proben.	$\sigma \approx 1/\sqrt{n_R} \leq n_R \leq 25$	[289]

Tabelle 10.4: Nachhaltigkeitsbewertung

Prinzip	Kategorie Nachhaltigkeit	Funktion zur Normalisierung	Punkteschema			normalisiert nach
			Wert	Wert normalisiert	Farbcode	
5	Miniaturisierung und Automatisierung	automatisch, miniaturisiert	100%	1	≅ grün	[309]
		halbautomatisch, miniaturisiert	75%	0,75	≅ grün	
		manuell, miniaturisiert	50%	0,5	≅ gelb	
		automatisch, nicht miniaturisiert	50%	0,5	≅ gelb	
		halbautomatisch, nicht miniaturisiert	25%	0,25	≅ orange	
		manuell, nicht miniaturisiert	0%	0	≅ rot	
2	Probenvolumen	$\text{Normalisierung des Probenvolumens} = -0,142 \cdot \ln(V_{\text{Probe pro Probe in ml}}) + 0,65$ 	100 µl	≅ 1	≅ grün	[309]
			2,5 ml	≅ 0,5	≅ gelb	
			100 ml	≅ 0	≅ rot	
12	Mitarbeiter-sicherheit	$1 - \frac{\text{Anwesenheitszeit}}{\text{Anwesenheitszeit} + \text{Durchlaufzeit}}$ 	100%	1	≅ grün	-
			50%	0,5	≅ gelb	
			0%	0	≅ rot	
8	Durchlaufzeit (DLZ) pro Probe	$\text{Normalisierung Durchlaufzeit pro Probe} = 0,2429 \cdot \ln(\text{Anzahl Proben pro Stunde aus DLZ in Stück}) - 0,0517$ 	70 Proben/h	≅ 1	≅ grün	[309]
			50 Proben/h	≅ 0,9	≅ grün	
			10 Proben/h	≅ 0,5	≅ gelb	
			1 Probe/h	≅ 0	≅ rot	

Prinzip	Kategorie Nachhaltigkeit	Funktion zur Normalisierung	Wert	Wert normalisiert	Farbcode	normalisiert nach
11	Einsatz schädlicher Lösungsmittel	<p><i>Normalisierung Gefahrstoffe</i> $= -0,156$ $\cdot \ln(V_{\text{schädliche Lösungsmittel in ml}})$ pro Probe $+ 0,5898$</p> 	70 µl	≅ 1	≅ grün	[309]
			1,8 ml	≅ 0,5	≅ gelb	
			44 ml	≅ 0	≅ rot	
10-12	Einsatz wiederverwendbarer Lösungsmittel	<p>$\frac{V_{\text{Gesamt}} - V_{\text{Probe}} - V_{\text{schädliche Lösungsmittel}}}{V_{\text{Gesamt}}}$</p> 	100%	1	≅ grün	-
			50%	0,5	≅ gelb	
			0%	0	≅ rot	
7	Abfallvolumen	<p><i>Normalisierung des Abfallvolumens</i> $= -0,134 \cdot \ln(V_{\text{Abfall in ml pro Probe}})$ $+ 0,6946$</p> 	0,1 ml	≅ 1	≅ grün	[309]
			10 ml	≅ 0,4	≅ gelb	
			25 ml	≅ 0,25	≅ orange	
			100 ml	≅ 0,1	≅ rot	

Prinzip	Kategorie Nachhaltigkeit	Funktion zur Normalisierung	Wert	Wert normalisiert	Farbcode	normalisiert nach
7	Plastikabfall	$\text{Normalisierung der Abfallmenge} \\ = -0,134 \\ \cdot \ln(\text{Plastikabfall in g pro Probe}) \\ + 0,6946$ 	0,1 g	$\cong 1$	\cong grün	[309]
			10 g	$\cong 0,4$	\cong gelb	
			25 g	$\cong 0,25$	\cong orange	
			100 g	$\cong 0,1$	\cong rot	
7	Wiederverwendbare Labware	$\frac{\text{Anzahl wiederverwendbare Labware}}{\text{Gesamtanzahl Labware}}$ 	100%	1	\cong grün	-
			50%	0,5	\cong orange	
			0%	0	\cong rot	

10.4 Anhang Benzodiazepine

10.4.1 Methoden und Parameter Benzodiazepine

Tabelle 10.5: Probenvorbereitungsmethoden Benzodiazepine Literatur

Ref.	Matrix	Analyten	Analytik	LOD	LOQ	R	CV	Automatisierung	PPT	Extraktion	Evaporation
[334]	Plasma	Benzodiazepine ¹⁷	LC-MS	-	0,05 ng/ml	> 82%	2-18%	manuell	Zentrifugation, Fällung auf Kartusche	SPE, Oasis HLB SPE Kartusche	Vakuumzentrifuge
[330]	Serum	Benzodiazepine ¹⁸	LC-MS/MS, ESI+	0,3-11,4 ng/ml	0,8-38,1 ng/ml	> 45,8%	2,3-10,4%	manuell	-	SPE, Oasis HLB SPE Kartusche	N ₂
[326]	Plasma	Benzodiazepine ¹⁹	LC-UV-Vis	3,3-10,2 ng in 20 µl -> 165-510 ng/ml	-	81-115%	-	manuell	PPT (ACN, Zentrifugation)	SPE	N ₂
[327]	Plasma	Drugs of Abuse	LC-MS/MS, ESI+	-	-	80%	< 14,4%	halb-automatisch, Tecan Genesis	PPT (1%FA ACN/MeOH)	SPE, MCX µElution 96-Well Extraction Plate	-
[328]	Vollblut	Drugs of Abuse ²⁰	LC-QTOF-MS, ESI+	0,001-0,0263 mg/kg	0,005-0,05 mg/kg	41-97%	2-18% (bei LOQ)	halb-automatisch, Tecan Freedom EVO 200	Verdünnung + Zentrifugation	SPE, Strata X-C	N ₂
[108]	Vollblut	Drugs of Abuse ²¹	LC-MS/MS	-	0,001-0,02 mg/kg	35-84%	6-37%	automatisch, Tecan Freedom EVO 200	Verdünnung + Zentrifugation	SPE, Strata X-C	N ₂
[329]	Vollblut	Drugs of Abuse ²²	LC-MS/MS	-	0,6-90 ng/ml	88-93%	1,3-4,3%	automatisch, Tecan Freedom EVO 200	-	SLE, Isolute 96-Well SLE+ Platte	N ₂

¹⁷ Alprazolam, 4-Hydroxy-Alprazolam, alpha-Hydroxy-Alprazolam

¹⁸ Flurazepam, Bromazepam, Chlordiazepoxid, Nitrazepam, Clonazepam, Flunitrazepam, Estazolam, Clobazam, Lorazepam, Alprazolam, Triazolam, Brotizolam, Fludiazepam, Diazepam, Quazepam, Prazepam, 7-Aminonitrazepam, 7-Aminoclonazepam, 7-Acetamidonitrazepam, N-Desmethyloclobazam, N-Desmethyldiazepam

¹⁹ Alprazolam, Bromazepam, Diazepam, Flunitrazepam

²⁰ Alprazolam, Amphetamin, Benzoyllecgonin, Bromazepam, Cathine, Cathinon, Chlordiazepoxid, Clonazepam, 7-Aminoclonazepam, Kokain, Kodein, Diazepam, Nordiazepam, 7-Aminonitrazepam, Flunitrazepam, 7-Aminoflunitrazepam, Ketamin, Ketobemidon, 6-MAM, MDA, MDMA, Methamphetamin, Methadon, Morphin, Nitrazepam, Oxazepam, Temazepam, Tramadol, O-Desmethyltramadol, Zolpidem

²¹ Alprazolam, Amphetamin, Benzoyllecgonin, Bromazepam, Cathin, Cathinon, Chlordiazepoxid, Clonazepam, 7-Aminoclonazepam, Kokain, Kodein, Diazepam, Flunitrazepam, 7-Aminoflunitrazepam, Ketamin, Ketobemidon, 6-MAM, MDA, MDMA, Methamphetamin, Methadon, Morphin, Nitrazepam, Nordiazepam, 7-Aminonitrazepam, Oxazepam, Temazepam, Tramadol, O-Desmethyltramadol, Zolpidem, Zopiclon

²² Tetrahydrocannabinol, Amphetamin, Methamphetamin, MDMA, Clonazepam, Diazepam, Nordiazepam, Oxazepam, Alprazolam, Nitrazepam, Morphin, Codein,

Tabelle 10.6: Probenvorbereitungsmethode Extraktion von Benzodiazepinen Strata X Platten

Schritt	Beschreibung	Volumen/ Druck	Zeit [s]
1	Konditionieren: Transfer von Methanol in Wells der Strata X 96-Well-MTP (30 mg, 1ml)	900 µl	-
2	Druckaufgabe	650/1.400 mbar	40
3	Equilibrierung: Transfer von Wasser auf Strata X 96-Well-MTP	900 µl	-
4	Druckaufgabe	1.000/2.000 mbar	45
5	Probenaufgabe: Transfer der Serumprobe auf Strata X 96-Well-MTP	1.000 µl	-
6	Druckaufgabe	800/1.600 mbar	360
7	Waschen 1: Transfer von H ₂ O auf Strata X 96-Well-MTP	900 µl	-
8	Druckaufgabe	800/1.600 mbar	300
9	Waschen 2: Transfer H ₂ O/MeOH (85:15) auf Strata X 96-Well-MTP	900 µl	-
10	Druckaufgabe	800/1.600 mbar	180
11	Trocknen der Kartusche: Druckaufgabe	1.000/2.000 mbar	900
12	Eluieren: Transfer Acetonitril auf Strata X 96-Well-MTP	500 µl	-
13	Druckaufgabe	250/1.500 mbar	60
14	2x Wiederholung der Schritte 12 und 13	-	-
15	Bestimmung der Benzodiazepin Konzentration mittels LC-MS/MS	-	-

Tabelle 10.7: Probenvorbereitungsmethode Extraktion von Benzodiazepinen Strata X Kartuschen

Schritt	Beschreibung	Volumen/ Druck/ relative Zentrifugalbeschleunigung	Zeit [s]
1	Transfer des Fällungsreagenzes (Acetonitril) in Standard 1,5 ml Vial	750 µl	-
2	Transfer des internen Standards (2 ppm deuterierte Benzodiazepine) in Standard 1,5 ml Vial	50 µl	-
3	Transfer der Serumprobe in Standard 1,5 ml Vial	200 µl	-
4	Schütteln des in Standard 1,5 ml Vials	1.500 rpm	60
5	Zentrifugieren des Standard 1,5 ml Vials	3.000 rpm	240
6	Konditionieren: Transfer von Methanol in Kartusche (Strata X, 30 mg, 1ml)	900 µl	-
7	Druckaufgabe auf Kartusche	650/4.000 mbar	40
8	Equilibrierung: Transfer von Wasser in Kartusche	900 µl	-
9	Probenaufgabe: Transfer des Überstands, Transfer von Wasser in Kartusche	100 µl/ 900 µl	-
10	Druckaufgabe auf Kartusche	800/4.000 mbar	60
11	5x Wiederholung der Schritte 8, 9 und 10	-	-
12	Waschen 1: Transfer von H ₂ O in Kartusche	900 µl	-
13	Druckaufgabe auf Kartusche	800/4.000 mbar	300
14	Waschen 2: Transfer H ₂ O/MeOH (85:15) in Kartusche	900 µl	-
15	Druckaufgabe auf Kartusche	800/4.000 mbar	180
16	Trocknen der Kartusche: Druckaufgabe	1.000/4.000 mbar	900
17	Eluieren: Transfer Acetonitril auf Kartusche	250 µl	-
18	Druckaufgabe auf Kartusche	800/4.000 mbar	90
19	2x Wiederholung der Schritte 17 und 18	-	-
20	Bestimmung der Benzodiazepin Konzentration mittels LC-MS/MS	-	-

Tabelle 10.8: Materialverzeichnis Benzodiazepine mit Strata X Platten (192)

Strata X 96-Well-MTP	Bezeichnung	Hersteller/Verkäufer	Artikelnummer	Menge	Einheit
Pipettenspitzen	Biomek i-series Pipettenspitze 1070 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85971	16	[Stück]
Labware	Aluminium Rack	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	8	[Stück]
	Eppendorf Rack	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	8	[Stück]
	Greiner 96-Well Mikrotiterplatte 0,5 ml	VWR International, Radnor, USA	391-3605	2	[Stück]
	Quarter Reservoir Sterile Divided by Length + Frame, 40 µL	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	372788	4	[Stück]
	Standard 1.5 ml Vials	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0716	192	[Stück]
	Eppendorf Vials 1,5 ml (Safe Lock)	Eppendorf AG, Hamburg, DE	EP0030121880	192	[Stück]
	Strata X Polymeric Reversed Phase 96-Well Platte, 30 mg, 1 ml	Phenomenex, Torrance, USA	8E-S100-TGB	2	[Stück]
	Greiner 96-Well Mikrotiterplatte 2 ml	VWR International, Radnor, USA	736-0133	2	[Stück]
	Vial Caps	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0731	192	[Stück]
Geräte	Biomek i7	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B87585	1	[Stück]
	Postive Pressure Unit	amplius GmbH, Rostock, DE	70757112	1	[Stück]
	Quarter Reservoir	amplius GmbH, Rostock, DE	40222010	1	[Stück]
Flüssigkeiten	100 ppb Mix IS Benzodiazepine	-	-	9.600	[µl]
	MeOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	172.800	[µl]
	Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	8825.2	192.000	[µl]
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	345.600	[µl]
	Wasser/Methanol (85:15)	-	-	172.800	[µl]
	Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	-	[µl]
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	-	[µl]
	Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	8825.2	-	[µl]
	Clonazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	C-907-1ML	-	[µl]
	Diazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	D-907-1ML	-	[µl]
	Lorazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	L-901-1ML	-	[µl]
	Midazolam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	M-908-1ML	-	[µl]
	Oxazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	O-902-1ML	-	[µl]
	Temazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-907-1ML	-	[µl]
	Clonazepam-d4, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	C-905-1ML	-	[µl]
	Alprazolam, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	A-903-1ML	-	[µl]
	Nordiazepam, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	N-905-1ML	-	[µl]
	Diazepam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	D-902-1ML	-	[µl]
	Lorazepam-d4 , 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	L-902-1ML	-	[µl]
	Midazolam-d4 Maleat, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	M-918-1ML	-	[µl]
	Nordiazepam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	N-903-1ML	-	[µl]
	Oxazepam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	O-901-1ML	-	[µl]
	Temazepam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-902-1ML	-	[µl]
	Alprazolam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	A-902-1ML	-	[µl]
	Schweineserum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	P9783	19.200	[µl]

Tabelle 10.9: Materialverzeichnis Benzodiazepine Strata X Kartuschen (72)

Strata X Kartuschen	Bezeichnung	Hersteller/Verkäufer	Artikelnummer	Menge	Einheit	
Pipettenspitzen	Biomek i-series Pipettenspitze 90 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85881	72	[Stück]	
	Biomek i-series Pipettenspitze 230 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85903	394	[Stück]	
	Biomek i-series Pipettenspitze 1070 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85971	770	[Stück]	
Labware	Aluminium Rack, Interner Stand	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	1	[Stück]	
	Aluminium Rack, Elution in 1.5 ml Standard Vials	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	3	[Stück]	
	Eppendorf Rack, Gegengewicht Zentrifuge	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	1	[Stück]	
	Eppendorf Rack, PPT	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	3	[Stück]	
	Positive Pressure Rack (SPE), Kartuschen (1 ml)	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	3	[Stück]	
	Spacer Adapter	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	3	[Stück]	
	Spritzenaufsatz	RS Components GmbH; Frankfurt am Main, Germany	505-7427	72	[Stück]	
	Quarter Reservoir Sterile Divided by Length + Frame, 40 µL	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	372788	4	[Stück]	
	Standard 1.5 ml Vials	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0716	144	[Stück]	
	Eppendorf Vials 1,5 ml (Safe Lock)	Eppendorf AG, Hamburg, DE	EP0030121880	72	[Stück]	
	Strata X Polymeric Reversed Phase Kartuschen, 30 mg, 1 ml	Phenomenex, Torrance, USA	8B-S100-TAL	72	[Stück]	
	Vial Caps	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0731	72	[Stück]	
	Geräte	Biomek i7	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B87585	1	[Stück]
		Peltier Temperier- und Schüttelposition für Biomek® 4000, FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93942	1	[Stück]
		Peltier Temperierposition für Biomek® 4000, FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93938	1	[Stück]
Positive Pressure Unit		amplius GmbH, Rostock, DE	70757112	1	[Stück]	
VSpin		Agilent Technologies, Santa Clara, USA	G5582AA/GA	1	[Stück]	
Self-Refilling Quarter Reservoir		amplius GmbH, Rostock, DE	40222010	1	[Stück]	
Flüssigkeiten	2 ppm Mix IS Benzodiazepine	-	-	3.600	[µl]	
	Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	64.800	[µl]	
	Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	8825.2	90.000	[µl]	
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	129.600	[µl]	
	Wasser/Methanol (85:15)	-	-	64.800	[µl]	
	Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	-	[µl]	
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	-	[µl]	
	Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	8825.2	-	[µl]	
	Clonazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	C-907-1ML	-	[µl]	
	Diazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	D-907-1ML	-	[µl]	
	Lorazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	L-901-1ML	-	[µl]	
	Midazolam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	M-908-1ML	-	[µl]	
	Oxazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	O-902-1ML	-	[µl]	
	Temazepam, 1mg/ml in Methanol, 1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-907-1ML	-	[µl]	
	Clonazepam-d4, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	C-905-1ML	-	[µl]	
	Alprazolam, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	A-903-1ML	-	[µl]	
	Nordiazepam, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	N-905-1ML	-	[µl]	
	Diazepam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	D-902-1ML	-	[µl]	
	Lorazepam-d4, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	L-902-1ML	-	[µl]	
	Midazolam-d4 Maleat, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	M-918-1ML	-	[µl]	
	Nordiazepam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	N-903-1ML	-	[µl]	
	Oxazepam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	O-901-1ML	-	[µl]	
	Temazepam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-902-1ML	-	[µl]	
	Alprazolam-d5, 100 µg/ml in Methanol, 1ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	A-902-1ML	-	[µl]	
	Schweineserum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	P9783	14.400	[µl]	

10.4.2 Analytik Benzodiazepine

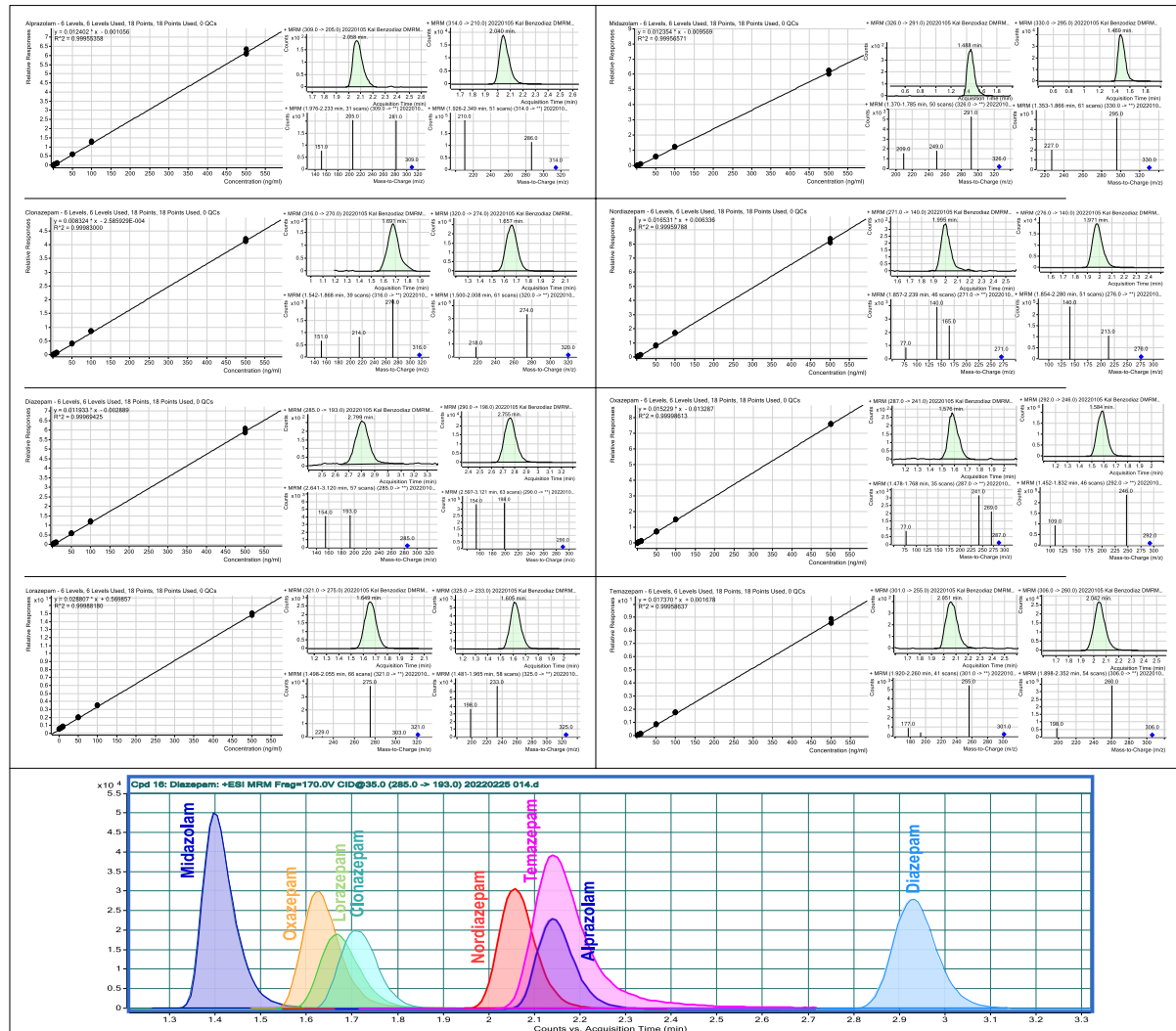


Abbildung 10.2: Kalibrierkurven, Chromatogramme Benzodiazepine mittels LC-MS/MS

Tabelle 10.10: Überblick LC-MS/MS System und Parameter Benzodiazepine²³

Analytik Benzodiazepine		
LC-MS/MS System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	Degasser	G4225A
	Quaternäre Pumpe	G1311A
	Autosampler	G1367C
	Säulenofen	G1316B
	Triple Quadrupol MS	G6410A
LC Parameter	Säule	Zorbax RRHT StableBond C18, 4,6 x 50 mm, 1,8 Micron, P.N. 822975-902 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
	Vorsäule	UHPLC Guard 3PK, Zorbax SB-C18 4,6 x 5mm, 1.8 Micron, P.N. 820750-902 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
	Injektionsvolumen	10 µl
	Needle Wash	Methanol
	Temperatur	45 °C
	Mobile Phase A	Wasser mit 0,1% Ameisensäure
	Mobile Phase B	Acetonitril
	Gradientenelution	0 min: 40/60 Mobile Phase A/Mobile Phase B 3 min: 0/100 Mobile Phase A/Mobile Phase B 7,5 min: 40/60 Mobile Phase A/Mobile Phase B 11 min: Stop Time
Flussrate	0,5 ml/min	
MS Parameter	Ionisierung	ESI +
	Gas Temperatur	350°C
	Gas Flow	10 l/min
	Nebulizer Pressure	3,45 Bar
	Capillary Voltage	2.500 V
	dynamic Multiple Reaction Monitoring (dMRM)	
Kalibrierung	Kalibrierbereich	1–500 ng/ml
	Zielkonzentration Analyten	80 ng/ml
	Zielkonzentration Interner Standard	100 ng/ml

Tabelle 10.11: dMRM Parameter Benzodiazepine²⁴

Analyt	Vorläufer Ion [M+H ⁺]	Fragmentor Spannung [V]	Produkt Ion [M+H ⁺]	Collision Energy [V]	ISTD	Vorläufer Ion [M+H ⁺]	Fragmentor Spannung [V]	Produkt Ion [M+H ⁺]	Collision Energy [V]
Alprazolam	309	160	281	25	Alprazolam D5	314	150	210	50
			205	45				286	25
			151	75				-	-
Clonazepam	316	150	270	25	Clonazepam D4	320	140	274	25
			214	40				218	45
			151	85				-	-
Diazepam	285	170	154	30	Diazepam D5	290	160	198	35
			193	35				154	30
			89	75				-	-
Lorazepam	321	120	275	20	Lorazepam D4	325	120	233	30
			303	10				198	50
			229	30				-	-
Midazolam	326	180	291	25	Midazolam D4	330	180	295	30
			249	40				227	40
			209	35				-	-
Nordiazepam	271	150	140	30	Nordiazepam D5	276	140	140	35
			165	30				213	30
			77	70				-	-
Oxazepam	287	80	241	20	Oxazepam D5	292	130	246	20
			269	10				109	35
			77	65				-	-
Temazepam	301	120	255	20	Temazepam D5	306	130	260	20
			177	45				198	40
			193	35				-	-

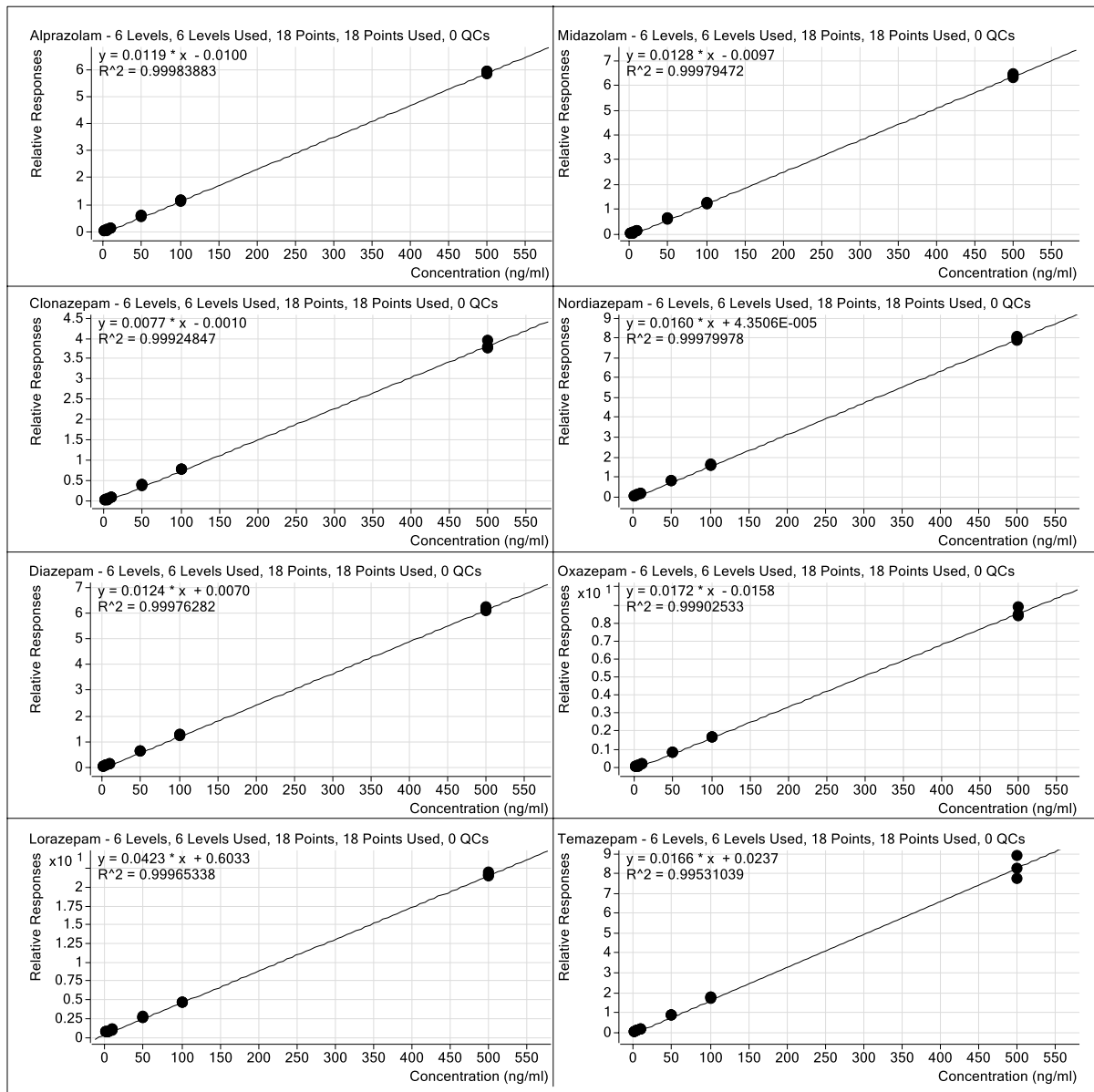


Abbildung 10.3: Kalibrierkurven Benzodiazepine aus Serum 1-500 ng/ml

10.4.3 Ergebnisse Benzodiazepine Platten

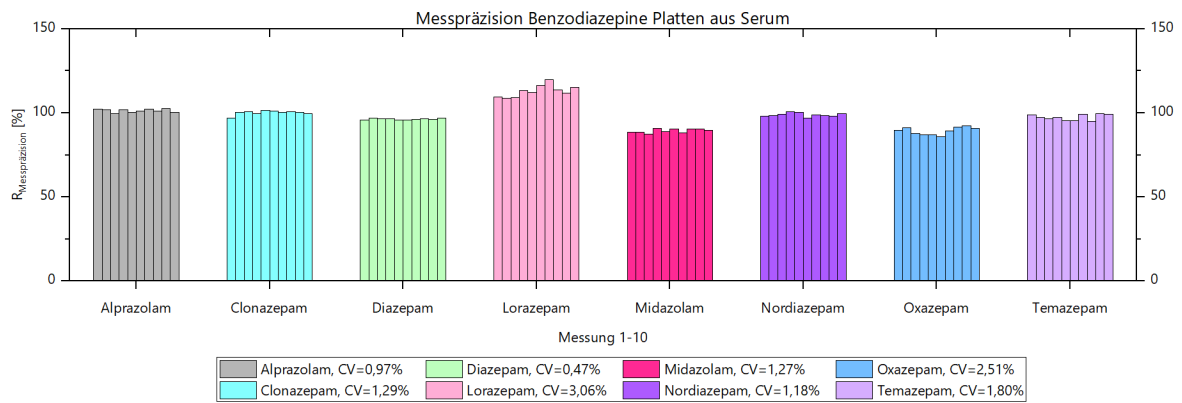


Abbildung 10.4: Messpräzision Benzodiazepine Strata X Platten

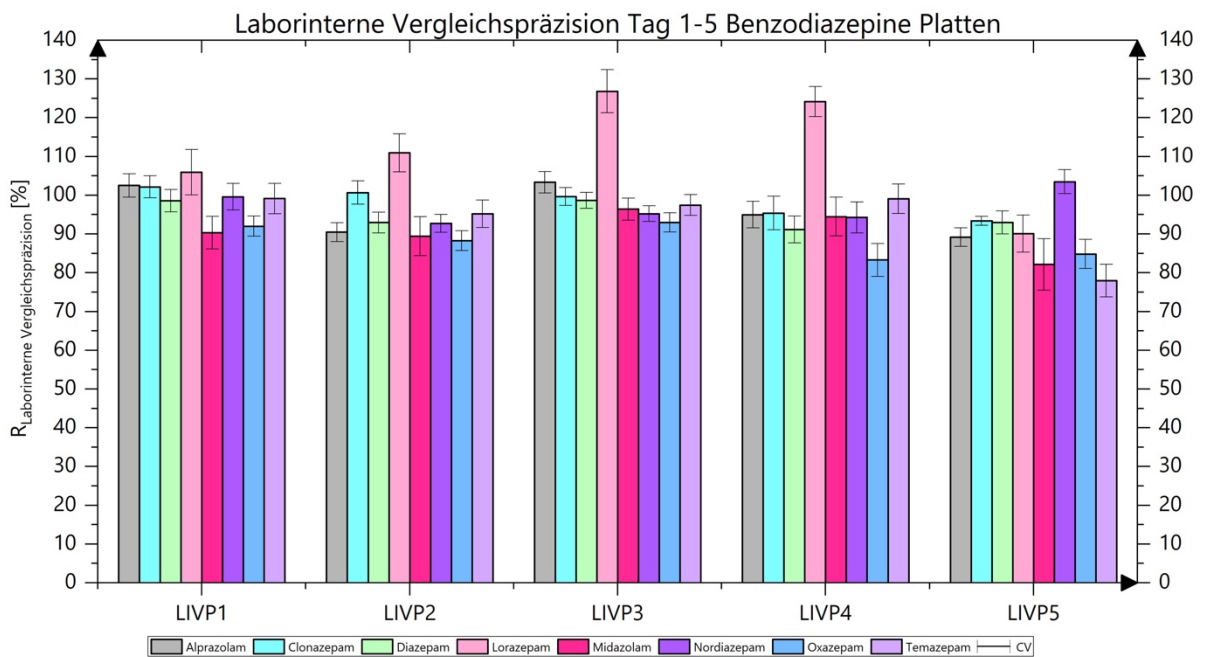


Abbildung 10.5: Laborinterne Vergleichspräzision Benzodiazepine Strata X Platten

Tabelle 10.12: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Platten²⁵ Teil 1

Ergebnisse Benzodiazepine 1	Alprazolam				Clonazepam				Diazepam						
	Spanne								Spanne						
	Proben- anzahl	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]		
Wiederfindungsrate	24	101,64	2,67	96,50	106,09	101,74	3,04	94,35	106,49	97,69	2,68	92,46	103,32		
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	102,54	3,01			102,17	2,87			98,57	2,87				
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	90,48	2,44			100,68	2,98			92,96	2,67				
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	103,35	2,78			99,66	2,31			98,66	2,07				
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	94,98	3,43			95,40	4,33			91,15	3,48				
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	89,19	2,38			93,39	1,17			92,97	3,00				
Messpräzision	10	101,33	0,97			100,08	1,29			96,31	0,47				
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [ng/ml]	24	81,31	2,17			81,39	2,47			78,15	2,09				
LOD [ng/ml]	10	3,29				7,01				4,04					
LOQ [ng/ml]	10	11,63				24,62				14,23					
LOD _m [ng/ml]	10	3,29				7,01				4,04					
LOQ _m [ng/ml]	10	11,63				24,62				14,23					

Tabelle 10.13: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Platten²⁶ Teil 2

Ergebnisse Benzodiazepine 2	Lorazepam				Midazolam				Nordiazepam						
	Spanne								Spanne						
	Proben- anzahl	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]		
Wiederfindungsrate	24	106,21	5,92	95,10	119,73	89,33	3,96	82,41	97,25	99,58	2,98	94,40	104,98		
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	105,93	5,89			90,33	4,23			99,60	3,41				
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	110,92	4,88			89,42	5,05			92,75	2,32				
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	126,82	5,55			96,40	2,83			95,24	2,01				
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	124,17	3,90			94,50	5,00			94,26	3,98				
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	90,10	4,80			82,13	6,61			103,47	3,09				
Messpräzision	10	112,97	3,06			89,33	1,27			98,92	1,18				
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [ng/ml]	24	84,97	5,03			71,46	2,83			79,66	2,37				
LOD [ng/ml]	10	4,76				3,83				3,64					
LOQ [ng/ml]	10	16,77				13,50				12,84					
LOD _m [ng/ml]	10	4,76				3,83				3,64					
LOQ _m [ng/ml]	10	16,77				13,50				12,84					

²⁵ [287]²⁶ [287]

Tabelle 10.14: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Platten²⁷ Teil 3

Ergebnisse Benzodiazepine 3	Oxazepam					Temazepam					
	Spanne										
	Proben- anzahl	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	-	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	-	Max [%]
Wiederfindungsrate	24	91,18	3,02	83,87	-	96,07	98,74	3,36	91,45	-	105,59
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	92,01	2,61				99,14	3,91			
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	88,30	2,56				95,22	3,54			
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	92,99	2,49				97,47	2,72			
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	83,29	4,26				99,06	3,80			
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	84,84	3,74				77,96	4,20			
Messpräzision	10	89,33	2,51				97,40	1,80			
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [ng/ml]	24	72,95	2,21				78,99	2,66			
LOD [ng/ml]	10	8,01					17,60				
LOQ [ng/ml]	10	28,10					61,22				
LOD _m [ng/ml]	10	8,01					17,60				
LOQ _m [ng/ml]	10	28,10					61,22				

10.4.4 Ergebnisse Benzodiazepine Kartuschen

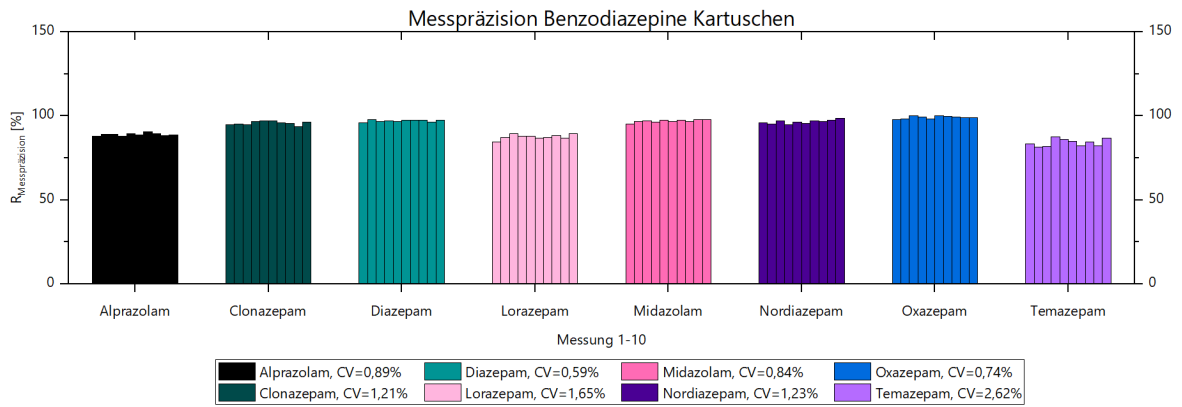


Abbildung 10.6: Messpräzision Benzodiazepine Strata X Kartuschen

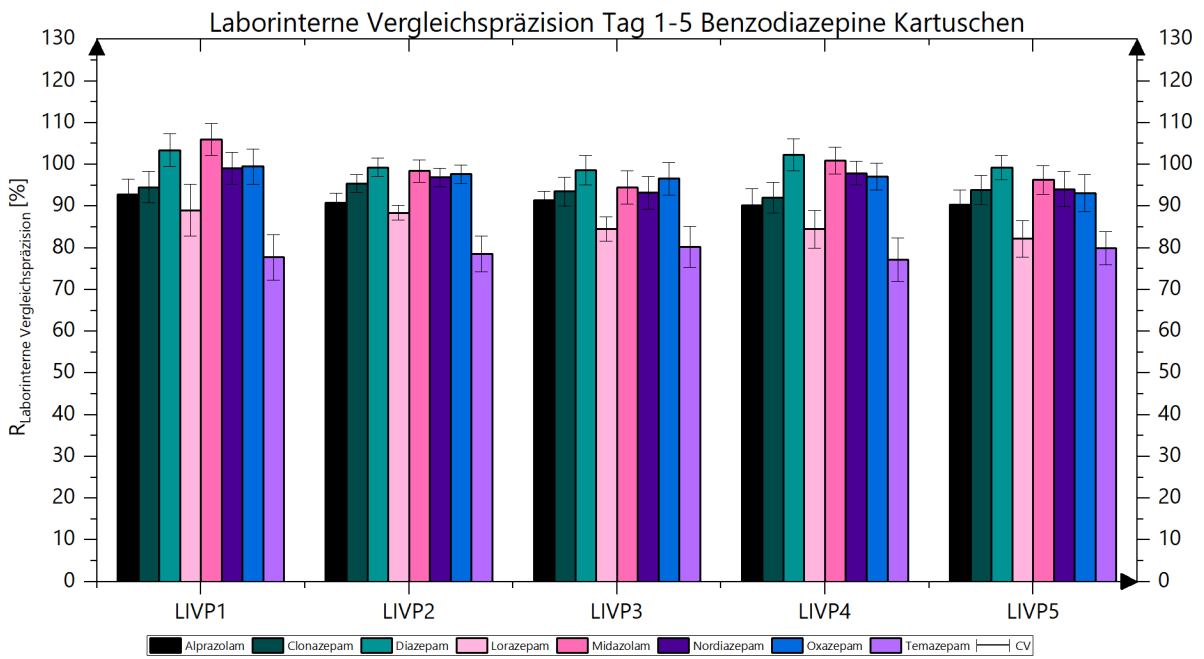


Abbildung 10.7: Laborinterne Vergleichspräzision Benzodiazepine Strata X Kartuschen

Tabelle 10.15: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Kartuschen Teil 1

Ergebnisse Benzodiazepine 1	Alprazolam				Clonazepam				Diazepam			
	Spanne				Spanne				Spanne			
	Proben- anzahl	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%] - Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%] - Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%] - Max [%]		
Wiederfindungsrate	24	82,29	2,65	78,30 - 86,94	83,65	2,68	78,74 - 86,88	93,43	2,26	88,84 - 97,52		
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	92,80	3,71		94,56	3,76		103,41	3,92			
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	90,86	2,26		95,44	2,14		99,32	2,29			
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	91,48	2,09		93,52	3,42		98,60	3,51			
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	90,22	3,91		92,10	3,68		102,26	3,85			
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	90,41	3,54		93,88	3,58		99,21	2,92			
Messpräzision	10	88,94	0,89		95,71	1,21		97,08	0,59			
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [ng/ml]	24	65,83	1,75		66,92	1,79		74,74	1,69			
LOD [ng/ml]	10	4,42			2,73			3,66				
LOQ [ng/ml]	10	15,96			9,87			13,22				
LOD _m [ng/ml]	10	22,09			13,63			18,28				
LOQ _m [ng/ml]	10	79,80			49,34			66,10				

Tabelle 10.16: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Kartuschen Teil 2

Ergebnisse Benzodiazepine 2	Lorazepam				Midazolam				Nordiazepam			
	Spanne				Spanne				Spanne			
	Proben- anzahl	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%] - Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%] - Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%] - Max [%]		
Wiederfindungsrate	24	85,11	3,08	79,74 - 90,47	90,75	2,47	86,74 - 96,82	91,52	2,45	87,97 - 95,42		
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	89,05	6,19		105,98	3,87		99,02	3,83			
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	88,43	1,71		98,41	2,65		96,89	2,21			
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	84,51	2,89		94,48	4,02		93,19	3,96			
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	84,47	4,51		100,96	3,25		97,89	2,84			
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	82,21	4,38		96,28	3,44		94,08	4,25			
Messpräzision	10	87,54	1,65		96,89	0,84		96,45	1,23			
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [ng/ml]	24	68,09	2,10		72,60	1,79		73,21	1,79			
LOD [ng/ml]	10	2,27			4,36			4,19				
LOQ [ng/ml]	10	8,23			15,74			15,15				
LOD _m [ng/ml]	10	11,36			21,78			20,96				
LOQ _m [ng/ml]	10	41,17			78,72			75,76				

Tabelle 10.17: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzodiazepine Kartuschen Teil 3

Ergebnisse Benzodiazepine 3	Oxazepam					Temazepam				
	Proben- anzahl	Mittelwert [%]	CV [%]	Spanne		Mittelwert [%]	CV [%]	Spanne		
				Min [%]	Max [%]			Min [%]	Max [%]	
Wiederfindungsrate	24	88,89	3,30	82,68	- 92,89	71,38	6,09	63,09	- 77,26	
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	99,51	4,24			77,75	5,43			
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	97,67	2,21			78,60	4,32			
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	96,59	3,94			80,26	4,85			
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	97,05	3,24			77,19	5,25			
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	93,14	4,49			79,97	4,01			
Messpräzision	10	99,10	0,74			84,17	2,62			
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [ng/ml]	24	71,11	2,34			57,10	3,48			
LOD [ng/ml]	10	0,78				4,25				
LOQ [ng/ml]	10	2,83				15,37				
LOD _m [ng/ml]	10	3,89				21,26				
LOQ _m [ng/ml]	10	14,13				76,83				

10.4.5 Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzodiazepine

Tabelle 10.18: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzodiazepine

	Automatisiert Strata X 96-Well-MTP	Automatisiert Strata X Kartusche	Manuell Strata X 96-Well- MTP	Manuell Strata X Kartusche	Einheit
Probenanzahl	192	72	192	72	[Stück]
Jährliche Betriebskosten	1.853.613,67 €	512.515,96 €	2.343.629,80 €	968.016,35 €	[€]
inkl. Materialkosten von:	1.782.711,50 €	460.134,79 €	1.860.331,10 €	487.201,55 €	[€]
inkl. Personalkosten von:	58.000,00 €	39.440,00 €	476.320,00 €	473.760,00 €	[€]
inkl. Energiekosten von:	1.950,17 €	1.989,17 €	1.978,70 €	2.054,81 €	[€]
inkl. Instandhaltungskosten von:	10.952,00 €	10.952,00 €	5.000 €	5.000 €	[€]
Jährliche Abschreibung (5 Jahre, linear)	83.830,16 €	103.615,19 €	0,00 €	0,00 €	[€]
Jährliche kalkulatorische Zinsen (4%)	8.383,02 €	10.361,52 €	0,00 €	0,00 €	[€]
Gesamtkosten pro Jahr	1.945.826,85 €	626.492,67 €	2.343.629,80 €	968.016,35 €	[€]
Durchlaufzeit	4,10	6,15	4,00	6,00	[Stunden]
Vor- und Nachbereitungszeit [h]	0,58	0,58	0,58	0,58	[Stunden]
Probenanzahl pro Jahr	240.000	61.200	249.600	64.800	[Stück]
Kosten pro Probe	8,11 €	10,24 €	9,39 €	14,94 €	[€]
NPV (5 Jahre, 2,4%)	7.377.483,79 €	862.936,05 €	6.617.685,90 €	42.714,19 €	[€]
Amortisationsdauer	0,25	1,75	0,00	0,00 €	[Jahre]

10.4.6 Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzodiazepine

Tabelle 10.19: Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzodiazepine nicht normalisiert

Kategorie Nachhaltigkeit	Automatisiert 192 Proben Strata X Platten	Automatisiert 72 Proben Strata X Kartuschen	Manuell 192 Proben Strata X Platten	Manuell 72 Proben Strata X Kartuschen
Miniaturisierung und Automatisierung [%]	50	50	0	0
Probenvolumen [ml]	1	0,20	1	0,20
Mitarbeitersicherheit [%]	88	91	0	0
Durchlaufzeit pro Probe [Proben/h]	46	11	48	12
Einsatz schädlicher Lösungsmittel [ml]	2,04	2,33	2,04	2,33
Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel [%]	46	74	46	74
Abfallvolumen [ml]	5,60	9,60	5,60	9,60
Plastikabfall [g]	34,96	52,14	34,96	52,14
Wiederverwendbare Labware [%]	19	18	19	18

10.5 Anhang Cannabinoide

10.5.1 Methoden und Parameter Cannabinoide

Tabelle 10.20: Methoden Cannabinoide aus Blut, Plasma, Serum

Methode	Analyten	Analytik	LOD	LOQ	R	CV	Automatisierung	Hydrolyse, PPT	Extraktion	Derivatisierung, Evaporation
[109]	THC, Cannabidiol	LC-MS/MS	-	10 ng/ml	-	< 15%	manuell	PPT, Evap ²⁸ N ₂ , RK ²⁹ 500 µl Ammoniumacetat	PT-µSPE	Evap. N ₂ , RK 50µl ACN/H ₂ O
[381]	THC, THC-OH, THC-COOH	LC-MS/MS	< 0,65 ng/ml	< 0,82 ng/ml	> 79%	±15%	manuell	PPT	-	-
[375]	THC, THC-OH, THC-COOH + weitere	LC-MS/MS	-	1	> 51%	< 10,5%	manuell	PPT	SPE	Evap. N ₂ , RK 150µl MeOH/ACN/H ₂ O
[363]	THC, THC-OH, THC-COOH	LC-MS/MS	1-5 ng/ml	1-5 ng/ml	-	< 14%	manuell	-	LLE	Evap. N ₂ , RK 50µl MeOH/H ₂ O
[354]	THC, THC-OH, THC-COOH	LC-MS/MS, ESI	-	0,2-0,6 ng/ml	> 95%	< 11%	halbautomatisch, Gilson ASPEC GX274	Verdünnung + Zugabe IS (manuell)	SPE, Bakerbond (500mg/3ml)	Evap., RK 100µl ACN/MeOH/H ₂ O
[344]	THC, THC-OH, THC-COOH + weitere	LC-MS/MS, ESI, MRM	< 1,1 ng/ml	< 3,2 ng/ml	-	-	halbautomatisch	PPT; Evap., RK 50 µl ACN + 1ml Puffer, Zentrifugation	online-SPE	-
[373]	THC	LC-MS/MS	0,2 ng/ml	0,5 ng/ml	66%	6,3-9,5%	automatisch, Tecan Freedom EVO 200	PPT	SPE, Strata X-C 96-Well Plate 30mg	Evap., RK 40µl EtOH/Puffer
[388]	THC, THC-COOH	LC-MS/MS	-	1	-	< 8%	automatisch, Brand/Hamilton	PPT (Platte, Waters), Evap., RK	SPE, C18 µElutionsplatte	RK

²⁸ Evap.=Evaporation

²⁹ RK=Rekonstitution

Tabelle 10.21: Methoden Cannabinoide aus Urin

Methode	Analyten	Analytik	LOD ng/ml	LOQ ng/ml	R	CV	Automatisierung	Hydrolyse	Extraktion	Evaporation
[355]	THC, THC-OH, THC-COOH	LC-MS/MS	0,2-0,4	0,5-1	71-78%	< 12%	manuell	beta-Glukuronidase + NaOH	SPE, Strata C18E (200 mg/3ml)	Evap. N ₂ + RK 60 µl MeOH + Zentrifugation (5min; 12.000g)
[356]	THC-COOH	LC-MS (ESI+), SIR	15	-	95%	2,2-4,3%	manuell	NaOH	SPE, C18, (15mg/3ml)	Evap.in Wasserbad, RK
[377]	THC-COOH	LC-MS/MS	-	< 5	A: 98-101%; B: 75-119%	A: 106%; B: 27,7%	manuell	NaOH	Verdünnung + Filtration A oder B	-
[367]	THC, THC-OH, THC-COOH	LC-MS/MS (ESI±), MRM	0,5-1	1-2	80,5-118%	3-10%	manuell	-	SLE	Evap. N ₂ +RK, Zentrifugation in mobiler Phase, Entnahme des Überstands, Injektion
[350]	THC, THC-OH, THC-COOH	LC-MS/MS, ESI	0,5, THC-OH: 20	2; THC-OH: 25	75-89%, THC-OH: 37-39%	3-10%, THC-OH: 3-12%	manuell	KOH	SPE, Bond Elut LRC (300mg/10ml)	Evap.+ RK 100 µl ACN/H ₂ O
[32]	37 synthetische Cannabinoide	LC-MS/MS (ESI+)	0,1-1	0,25-1	65-99%	1,4-12,1%	halbautomatisch, Zymark Rapid Trace	beta-Glukuronidase	SPE	Evap. N ₂ , RK 150 µl MeOH/H ₂ O AF, FA
[378]	THC-COOH	LC-MS/MS, ESI +, MRM	2	2	-	0,58-7,4%	halbautomatisch, Spark Holland (Emmen, Niederlande)	KOH	SPE, C8	-
[370]	THC, THC-OH, THC-COOH, THC-COOH-glu, CBD, CBN, THCV	LC-MS/MS	-	10-25	-	< 15%	halbautomatisch, In-Tube SPME gekoppelte LC-MS/MS	Verdünnung mit ACN, Zentrifugation	In-Tube SPME	-
[78]	THC, THC-OH, THC-COOH, CBG, CBD, CBN, THCV, THCV-COOH	LC-MS/MS (ESI+)	1-2	-	86-118%	3-13%	halbautomatisch, Tecan EVO 100	beta-Glukuronidase, Zentrifugation	LLE	Zentrifugation
[74]	THC-COOH	LC-MS/MS	2	5	85,70%	3,70%	halbautomatisch, Zymark Rapid Trace	NaOH	SPE, C18, (15mg/3ml)	Evap. N ₂ , RK 100 µl MeOH/H ₂ O

Tabelle 10.22: Methoden Cannabinoide aus Speichel

Methode	Analyten	Analytik	LOD ng/ml	LOQ ng/ml	R	CV	Automatisierung	Hydrolyse, PPT	Extraktion	Derivatisierung, Evaporation
[359]	THC, THC-COOH	LC-MS/MS ESI+	< 0,6	< 1	34-92%	< 6,5%	manuell	NaOH, Puffer	SPE	Evap.N ₂ , Derivat., Evap., RK. 25µl ACN/H ₂ O
[384]	THC, THC-COOH	LC-MS/MS	< 0,005	< 0,01	88,5- 93,3%	1,9-3,3%	manuell	PPT, Evap.N ₂ ; RK 100µl Puffer, Derivat.	LLE	Evap.N ₂ , RK. 50µl MeOH
[386]	THC, THC-COOH, Drugs of Abuse	LC-MS/MS; ESI+, ESI-	1,1	3,5-3,7	68,5- 79,3%	-	manuell	PPT, US, Zentrifugation	Filtration, 0,45µm PTFE	-
[111]	THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, CBN	LC-MS/MS, ESI+, ESI-	< 0,12	< 0,4	50-105%	< 11%	manuell	PPT	MEPS	-
[357]	THC und 29 Drugs of Abuse	LC-MS/MS, ESI+, MRM;	-	0,5	94,7- 112%	4,5- 12,2%	halbautomatisch, Gilson ASPEC XL	-	SPE	Evap.N ₂ , RK 200µl MeOH/Puffer
[26]	THC, THC-COOH	GC-MS	1	2	65-85%	< 15%	halbautomatisch, Zymark Rapid Trace	Zugabe IS +Puffer manuell	SPE, Clean Screen (130mg/3ml)	Evap.N ₂ , Derivat.
[358]	THC, Bestimmung von Drugs of Abuse	LC-MS/MS, ESI +	1	-	37%	1,9-13%	halbautomatisch, Gilson ASPEC XL	Zugabe IS +Puffer manuell	SPE	Evap.N ₂ , RK. 50µl H ₂ O/ACN
[369]	THC, Drugs of Abuse	LC-MS/MS, ESI+, MRM	0,189	0,189	23-51%	9,4- 51,7% (abhängig von Proben- nahme- Kit)	automatisch, Tecan Freedom EVO	Zugabe IS manuell	SLE	Evap., RK. 100µl ACN/H ₂ O

Tabelle 10.23: Probenvorbereitungsmethode Bestimmung von Cannabinoiden aus Serum

Schritt	Beschreibung	Volumen/ Druck/ relative Zentrifugalbeschleunigung	Zeit [s]
1	Transfer des Fällungsreagenzes (Methanol) in Standard 1,5 ml Vial	500 µl	-
2	Transfer des Fällungsreagenzes (0,2M ZnSO ₄) in Standard 1,5 ml Vial	200 µl	-
3	Transfer des internen Standards in Standard 1,5 ml Vial	50 µl	-
4	Transfer der Serumprobe in Standard 1,5 ml Vial	200 µl	-
5	Schütteln des in Standard 1,5 ml Vials	1.500 rpm	60
6	Zentrifugieren des in Standard 1,5 ml Vials	3.000 rpm	240
7	Konditionieren: Transfer von Methanol in die Wells der µElutionsplatte (Strata X-C µElutionsplatte, 2 mg, 96-Well Platte)	200 µl	-
8	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.000 mbar	60
9	Equilibrierung: Transfer von H ₂ O in die Wells der µElutionsplatte	200 µl	-
10	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.000 mbar	90
11	Probenaufgabe: Transfer des Überstands in die Wells der µElutionsplatte	400 µl	-
12	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	1.000/2.000 mbar	180
13	Waschen 1: Transfer von 0,1 N Essigsäure-Lösung in die Wells der µElutionsplatte	200 µl	-
14	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.500 mbar	120
15	Waschen 2: Transfer 0,1 N Essigsäure in 30% Acetonitril in die Wells der µElutionsplatte	200 µl	-
16	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.500 mbar	120
17	Trocknen: Druckaufgabe auf µElutionsplatte	1.000/2.000 mbar	600
18	Eluieren: Transfer 2% Essigsäure in Acetonitril in die Wells der µElutionsplatte	25 µl	-
19	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.500 mbar	90
20	2x Wiederholung der Schritte 18 und 19	-	-
21	Verdünnung des Eluats: Transfer Eluat in Standard 1,5 ml Vials	25 µl	-
22	Verdünnung des Eluats: Transfer H ₂ O in Standard 1,5 ml Vials	50 µl	-
23	Bestimmung der Cannabinoidkonzentration mittels LC-QTOF-MS	-	-

Tabelle 10.24: Probenvorbereitungsmethode Bestimmung von Cannabinoiden aus Urin

Schritt	Beschreibung	Volumen/ Druck/ relative Zentrifugalbeschleunigung	Zeit [s]
1	Transfer der Urinprobe	800 µl	-
2	Transfer des internen Standards	50 µl	-
3	Transfer 10 M NaOH	20 µl	-
4	Inkubation	60°C	900
5	Transfer gekühlte Essigsäure-Lösung	195 µl	-
6	Konditionieren: Transfer von Methanol in die Wells der µElutionsplatte (Strata X-C µElutionsplatte, 2 mg, 96-Well Platte)	200 µl	-
7	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.000 mbar	60
8	Equilibrierung: Transfer von H ₂ O in die Wells der µElutionsplatte	200 µl	-
9	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.000 mbar	90
10	Probenaufgabe: Transfer der hydrolysierten Probe in die Wells der µElutionsplatte	600 µl	-
11	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	1.000/2.000 mbar	180
12	Waschen 1: Transfer von 0,1 N Essigsäure-Lösung in die Wells der µElutionsplatte	200 µl	-
13	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.500 mbar	120
14	Waschen 2: Transfer 0,1 N Essigsäure in 30% Acetonitril in die Wells der µElutionsplatte	200 µl	-
15	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.500 mbar	120
16	Trocknen: Druckaufgabe auf µElutionsplatte	1.000/2.000 mbar	600
17	Eluieren: Transfer 2% Essigsäure in Acetonitril in die Wells der µElutionsplatte	55 µl	-
18	Druckaufgabe auf µElutionsplatte	500/1.500 mbar	90
19	2x Wiederholung der Schritte 17 und 18	-	-
20	Verdünnung des Eluats: Transfer Eluat in Standard 1,5 ml Vials	40 µl	-
21	Verdünnung des Eluats: Transfer H ₂ O in Standard 1,5 ml Vials	40 µl	-
22	Bestimmung der Cannabinoidkonzentration mittels LC-QTOF-MS	-	-

Tabelle 10.25: Probenvorbereitungsmethode Bestimmung von Cannabinoiden aus Speichel

Schritt	Beschreibung	Volumen/ Druck/ relative Zentrifugalbeschleunigung	Zeit [s]
1	Konditionieren: Transfer von Methanol in die Wells der μ Elutionsplatte (Strata X-C μ Elutionsplatte, 2 mg, 96-Well Platte)	200 μ l	-
2	Druckaufgabe auf μ Elutionsplatte	500/1.000 mbar	60
3	Equilibrierung: Transfer von H ₂ O in die Wells der μ Elutionsplatte	200 μ l	-
4	Druckaufgabe auf μ Elutionsplatte	500/1.000 mbar	90
5	Probenaufgabe: Transfer der Speichelprobe in die Wells der μ Elutionsplatte	400 μ l	-
6	Transfer des internen Standards in die Wells der μ Elutionsplatte	50 μ l	-
7	Druckaufgabe auf μ Elutionsplatte	1.000/2.000 mbar	180
8	Waschen 1: Transfer von 0,1 N Essigsäure-Lösung in die Wells der μ Elutionsplatte	200 μ l	-
9	Druckaufgabe auf μ Elutionsplatte	500/1.500 mbar	120
10	Waschen 2: Transfer 0,1 N Essigsäure in 30% Acetonitril in die Wells der μ Elutionsplatte	200 μ l	-
11	Druckaufgabe auf μ Elutionsplatte	500/1.500 mbar	120
12	Trocknen: Druckaufgabe auf μ Elutionsplatte	1.000/2.000 mbar	600
13	Eluieren: Transfer 2% Essigsäure in Acetonitril in die Wells der μ Elutionsplatte	55 μ l	-
14	Druckaufgabe auf μ Elutionsplatte	500/1.500 mbar	90
15	2x Wiederholung der Schritte 13 und 14	-	-
16	Verdünnung des Eluats: Transfer Eluat in Standard 1,5 ml Vials	40 μ l	-
17	Verdünnung des Eluats: Transfer H ₂ O in Standard 1,5 ml Vials	40 μ l	-
18	Bestimmung der Cannabinoidkonzentration mittels LC-QTOF-MS	-	-

Tabelle 10.26: Materialverzeichnis Cannabinoide aus Serum

Strata X 96-Well-MTP	Bezeichnung	Hersteller/Verkäufer	Artikelnummer	Menge	Einheit
Pipettenspitzen	Biomek i-series Pipettenspitze 90 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85881	480	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 230 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85903	672	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 1070 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85971	192	[Stück]
Labware	Rack 1,5 ml Standard Vials	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	5	[Stück]
	Aluminium Rack	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	5	[Stück]
	Eppendorf Rack	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	4	[Stück]
	Greiner Multiwell Plate Lid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	L4537	1	[Stück]
	Greiner 96-Well-MTP 0,2 ml	VWR International, Radnor, USA	391-3605	1	[Stück]
	GC-Vials Agilent braun 1.5 ml	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0716	120	[Stück]
	Agilent GC-Vial 300 µl (GC Vial mit fixem Insert)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	9301-0978	96	[Stück]
	Eppendorf Vials 1,5 ml (Safe Lock)	Eppendorf AG, Hamburg, DE	EP0030121880	96	[Stück]
	Strata® X-C µElution 96-Well SPE plate	Phenomenex, Torrance, USA	8B-S005-TAK	1	[Stück]
	96-Well Collection Plate, 350 µL Conical	Phenomenex, Torrance, USA	AH0-7192	1	[Stück]
	Vial Caps	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0731	96	[Stück]
Geräte	Biomek i7	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B87585	1	[Stück]
	Peltier Temperier- und Schüttelposition für Biomek® 4000, FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93942	1	[Stück]
	Peltier Temperierposition für Biomek® 4000, FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93938	1	[Stück]
	Postive Pressure Extractor	amplus GmbH, Rostock, DE	70757112	1	[Stück]
	VSpin Zentrifuge	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	G5582AA/GA	1	[Stück]
	3D-Tilting ALP	amplus GmbH, Rostock, DE	20161910	1	[Stück]
	Self-Refilling Quarter Reservoir	amplus GmbH, Rostock, DE	40222010	1	[Stück]
Flüssigkeiten	Interner Standard (357 ppb)	selbst angesetzt	-	4.800	[µl]
	Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	7342.1	67.200	[µl]
	0,2 M Zinksulfat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	H-083	19.200	[µl]
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	24.000	[µl]
	2% Essigsäure in Acetonitril	selbst angesetzt	-	4.800	[µl]
	0,1 N Essigsäure in Acetonitril	selbst angesetzt	-	19.200	[µl]
	30% Acetonitril in 0,1 N Essigsäure	selbst angesetzt	-	19.200	[µl]
	Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	-	[µl]
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	-	[µl]
	Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	8825.2	-	[µl]
	Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	3738.2	-	[µl]
	11-nor-9-Carboxy-D9-THC-D3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-004	-	[µl]
	11-Hydroxy-D9-THC-D3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-006	-	[µl]
	11-nor-9-Carboxy-D9-THC	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-006	-	[µl]
	11-Hydroxy-D9-THC	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	H-026	-	[µl]
	D9-THC-D3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-003	-	[µl]
	Schweineserum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	P9783	19.200	[µl]

Tabelle 10.27: Materialverzeichnis Cannabinoide aus Urin

Cannabinoide Urin	Bezeichnung	Hersteller/Verkäufer	Artikelnummer	96 Proben	Einheit
Pipettenspitzen	Biomek i-series Pipettenspitze 90 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85881	400	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 230 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85903	128	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 1070 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85971	192	[Stück]
Labware	Aluminium Rack	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	5	[Stück]
	Eppendorf Rack	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	4	[Stück]
	Quarter Reservoir Inserts + Frame mit 2 Inserts	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	372788	6	[Stück]
	Greiner Multiwell Plate Lid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	L4537	3	[Stück]
	Greiner 96-Well-MTP 0,2 ml	VWR International, Radnor, USA	391-3605	1	[Stück]
	GC-Vials Agilent braun 1.5 ml	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0716	21	[Stück]
	Agilent GC-Vial 300 µl (GC Vial mit fixem Insert)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	9301-0978	96	[Stück]
	Eppendorf Vials 1,5 ml (Safe Lock)	Eppendorf AG, Hamburg, DE	EP0030121880	96	[Stück]
	Strata® X-C µElution 96-Well SPE plate	Phenomenex, Torrance, USA	8B-S005-TAK	1	[Stück]
	96-Well Collection Plate, 350 µL Conical	Phenomenex, Torrance, USA	AH0-7192	1	[Stück]
	Nunc 48-Well Cell Culture Plate	Thermo Fisher Scientific	150787	2	[Stück]
	Vial Caps	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0731	96	[Stück]
Geräte	Biomek i7	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B87585	1	[Stück]
	Peltier Temperier- und Schüttelposition für Biomek® 4000, FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93942	1	[Stück]
	Peltier Temperierposition für Biomek® 4000, FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93938	1	[Stück]
	Positive Pressure Extractor	amplus GmbH, Rostock, DE	70757112	1	[Stück]
	VSpin Zentrifuge	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	G5582AA/GA	1	[Stück]
	3D-Tilting ALP	amplus GmbH, Rostock, DE	20161910	1	[Stück]
	Inkubator	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A84583	1	[Stück]
	Self-Refilling Quarter Reservoir	amplus GmbH, Rostock, DE	40222010	1	[Stück]
Flüssigkeiten	Interner Standard (780 ppb, ACN 2% HAc)	-	-	4.800	[µl]
	10 N Natriumhydroxid	-	-	1.920	[µl]
	Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	3738.2	18.720	[µl]
	Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	7342.1	19.200	[µl]
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	23.040	[µl]
	2% Essigsäure in Acetonitril	-	-	10.560	[µl]
	0,1 N Essigsäure in Acetonitril	-	-	19.200	[µl]
	30% Acetonitril in 0,1 N Essigsäure	-	-	19.200	[µl]
	Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	-	[µl]
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	-	[µl]
	Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	8825.2	-	[µl]
	Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	3738.2	-	[µl]
	11-nor-9-Carboxy-D9-THC-D3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-004	-	[µl]
	11-Hydroxy-D9-THC-D3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-006	-	[µl]
	11-nor-9-Carboxy-D9-THC	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-006	-	[µl]
	11-Hydroxy-D9-THC	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	H-026	-	[µl]
	D9-THC-D3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-003	-	[µl]
	Sigmatrix Urine Diluent	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	SAE0074	76.800	[µl]

Tabelle 10.28: Materialverzeichnis Cannabinoide aus Speichel

Cannabinoide Speichel	Bezeichnung	Hersteller/Verkäufer	Artikelnummer	96 Proben	Einheit
Pipettenspitzen	Biomek i-series Pipettenspitze 90 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85881	480	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 230 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85903	384	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 1070 µl	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85971	96	[Stück]
Labware	Quarter Reservoir Inserts + Frame	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	372788	5	[Stück]
	Aluminium Rack	amplius GmbH, Rostock, DE	-	4	[Stück]
	Eppendorf Rack	amplius GmbH, Rostock, DE	-	4	[Stück]
	Greiner Multiwell Plate Lid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	L4537	1	[Stück]
	Greiner 96-Well-MTP 0.2 ml	VWR International, Radnor, USA	391-3605	1	[Stück]
	Vials, with fixed inserts	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5188-6592	96	[Stück]
	Vials, 1.5 mL High Recovery, amber	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5183-2073	4	[Stück]
	Vial Caps	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0731	96	[Stück]
	Eppendorf Vials 1,5 ml (Safe Lock)	Eppendorf AG, Hamburg, DE	EP0030121880	96	[Stück]
	Strata® X-C µElution 96-Well SPE plate	Phenomenex, Torrance, USA	8M-S029-4GA	1	[Stück]
	96-Well Collection Plate, 350 µL Conical	Phenomenex, Torrance, USA	AH0-7192	1	[Stück]
Geräte	Biomek i7 Hybrid (MC+Span-8)	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B87585	1	[Stück]
	Peltier Temperierposition für Biomek® 4000, FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93938	1	[Stück]
	Positive Pressure Extractor	amplius GmbH, Rostock, DE	70757112	1	[Stück]
	Self-Refilling Quarter Reservoir	amplius GmbH, Rostock, DE	40222010	1	[Stück]
Flüssigkeiten	Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	-	[µl]
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	-	[µl]
	Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	8825.2	-	[µl]
	Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	3738.2	-	[µl]
	11-nor-9-Carboxy-D9-THC-D3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-004	-	[µl]
	11-Hydroxy-D9-THC-D3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-006	-	[µl]
	11-nor-9-Carboxy-D9-THC	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-006	-	[µl]
	11-Hydroxy-D9-THC	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	H-026	-	[µl]
	D9-THC-D3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	T-003	-	[µl]
	Artificial Saliva for pharmaceutical research	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	SAE0149	38.400	[µl]
	730 ppb Mix THC in MeOH (IS)	selbst angesetzt	-	4.800	[µl]
	Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	19.200	[µl]
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	23.040	[µl]
	2% Essigsäure in Acetonitril	selbst angesetzt	-	10.560	[µl]
	0,1 N Essigsäure in Acetonitril	selbst angesetzt	-	19.200	[µl]
	30% Acetonitril in 0,1 N Essigsäure	selbst angesetzt	-	19.200	[µl]

10.5.2 Analytik Cannabinoide

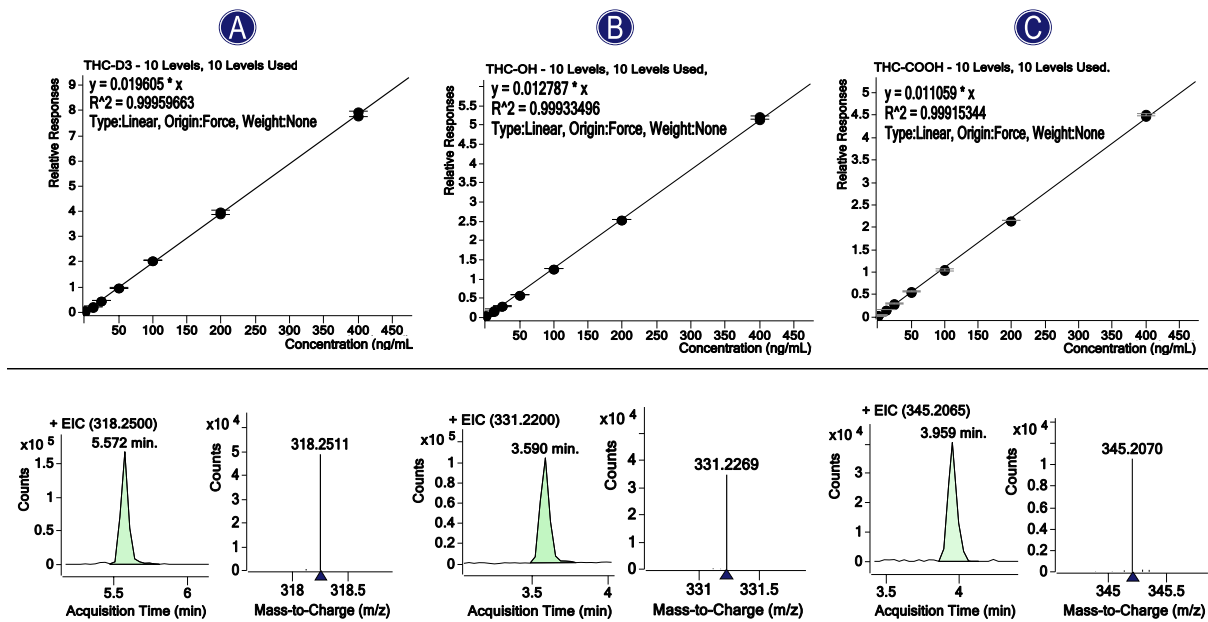
Abbildung 10.8: Kalibrierkurven, Chromatogramme und Massenspektren für (A) Δ^9 -THC-D₃; (B) THC-OH; (C) THC-COOH

Tabelle 10.29: Parameter Analytik Cannabinoide

Analytik Cannabinoide		
LC-QTOF-MS System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	Degasser	G4225A
	Binäre Pumpe	G1312B
	Multisampler	G7167B
	Säulenofen	G1316B
	QTOF MS	G6540A
LC Parameter	Säule	Zorbax Extend C18, Rapid Resolution HAT, 2.1 × 50 mm, 1.8-micron, 600 bar, P.N. 727700-902 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
	Inline Filter	Universal In-line Filter; ø2,1 mm; 0,2 µm Porengröße, P.N. 5067-1551 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
	Injektionsvolumen	10 µl
	Needle Wash	60/40 Methanol/Wasser
	Temperatur	50°C
	Mobile Phase A	5mM Ammoniumformiat mit 0,1% Ameisensäure in Wasser
	Mobile Phase B	5mM Ammoniumformiat mit 0,1% Ameisensäure in Methanol
	Gradientenelution	0 min: 35/65 Mobile Phase A/Mobile Phase B 0,1 min: 5/95 Mobile Phase A/Mobile Phase B 6,5 min: 35/65 Mobile Phase A/Mobile Phase B, Re-Equilibration 10 min: Stop Time
Flussrate	0,4 ml/min	
MS Parameter	Ionisierung	ESI +
	Gas Temperatur	350°C
	Drying Gas Flow	13 l/min
	Sheath Gas Flow	11 l/min
	Capillary Voltage	4.500V
	Nozzle Voltage	500 V
	Fragmentor Voltage 1	120 V
	Fragmentor Voltage 2	150 V
	Masse 1 Reference Mass Correction	m/z 121
	Masse 2 Reference Mass Correction	m/z 922
	Kalibrierung	Kalibrierbereich
Zielkonzentration Cannabinoide Serum		50 ng/ml
Zielkonzentration Cannabinoide Speichel		166 ng/ml
Zielkonzentration THC, THC-OH Urin		100 ng/ml
Zielkonzentration THC-COOH Urin		200 ng/ml
R ²		> 0,999
Stabilität der Proben	mind. 24 h	

10.5.3 Ergebnisse Cannabinoide

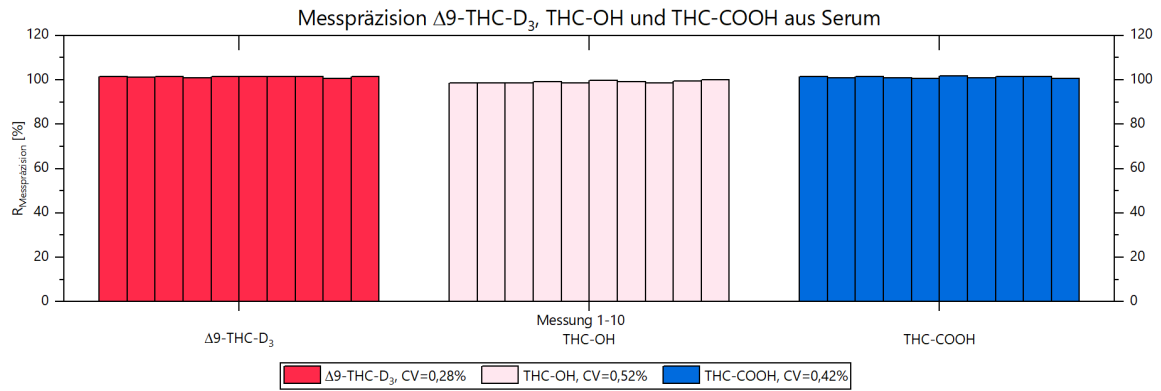


Abbildung 10.9: Messpräzision Cannabinoide Serum

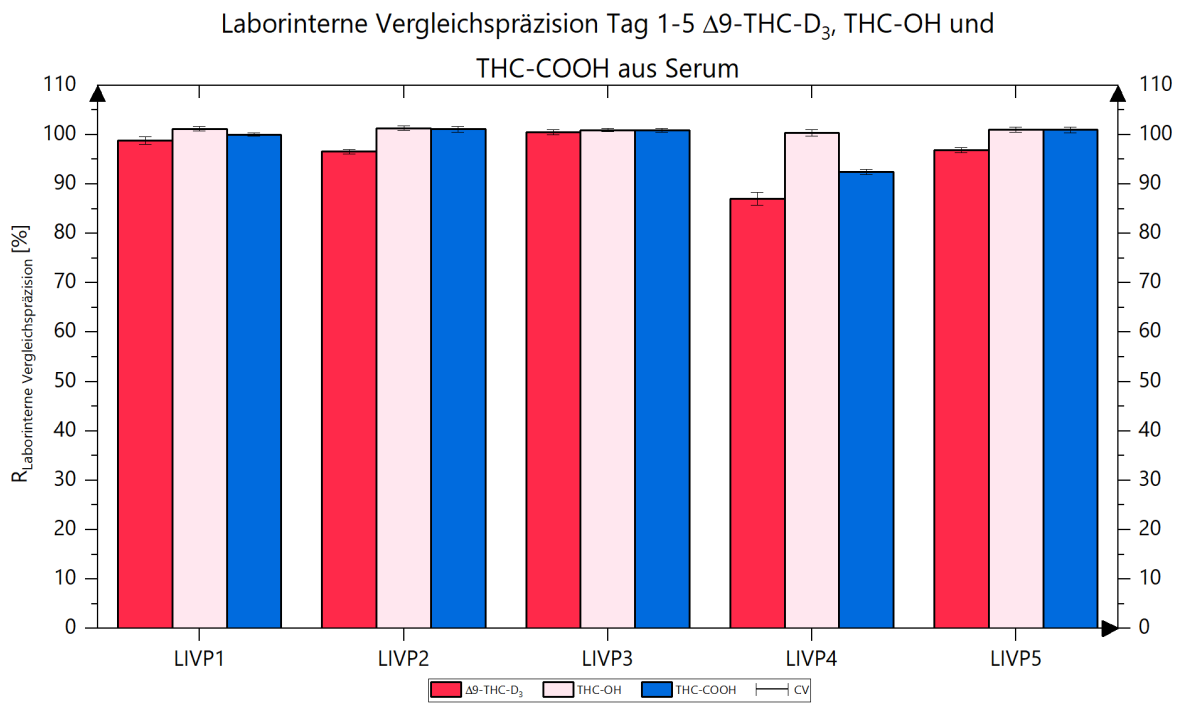


Abbildung 10.10: Laborinterne Vergleichspräzision Cannabinoide Serum

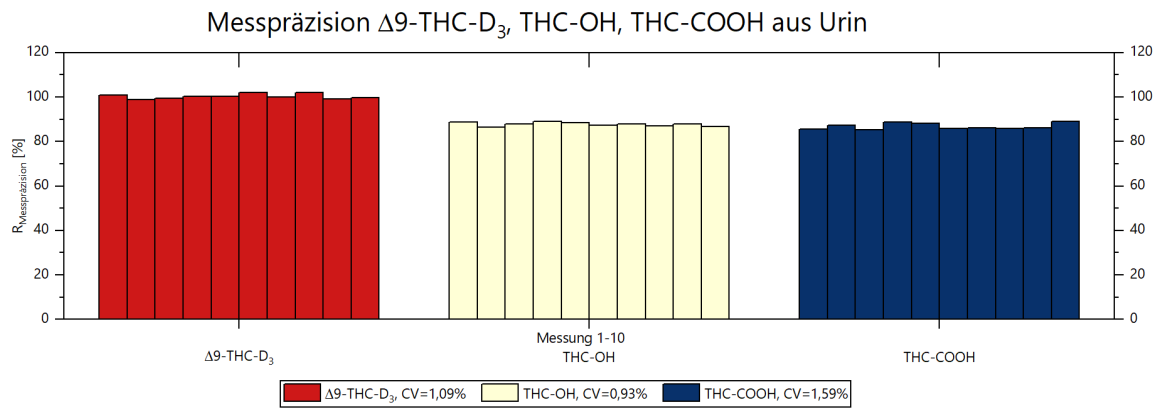


Abbildung 10.11: Messpräzision Cannabinoide Urin

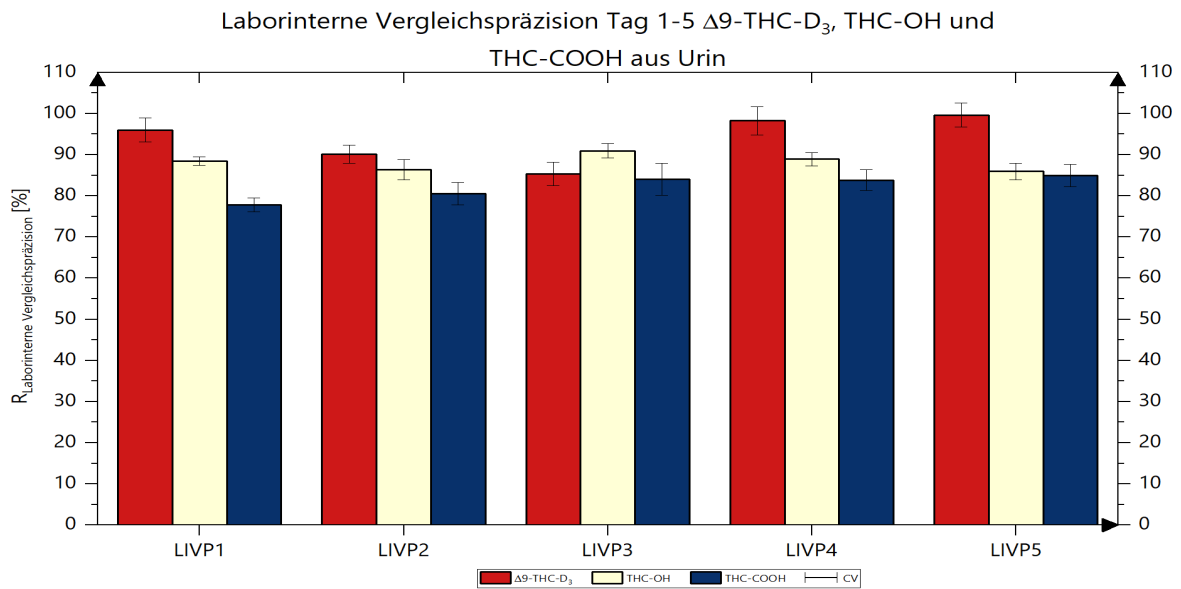


Abbildung 10.12: Laborinterne Vergleichspräzision Cannabinoide Urin

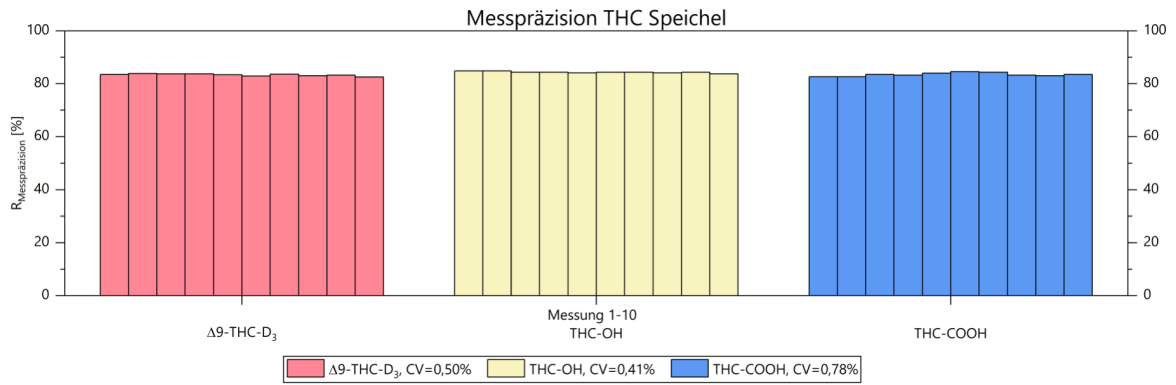


Abbildung 10.13: Messpräzision Cannabinoide Speichel

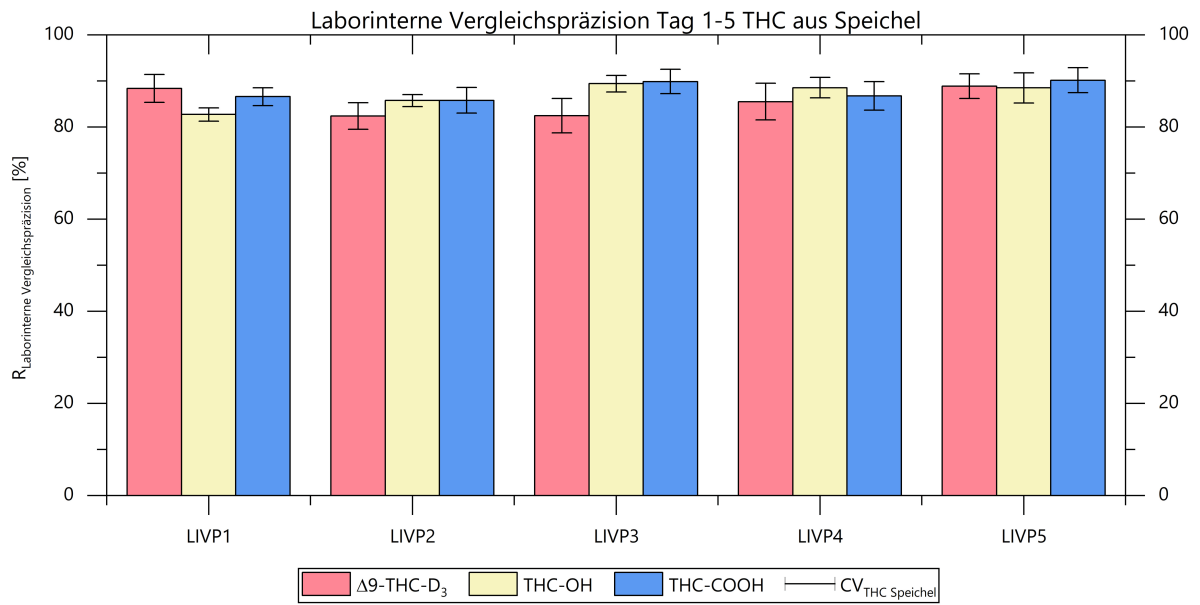


Abbildung 10.14: Laborinterne Vergleichspräzision Cannabinoide Speichel

Tabelle 10.30: Ergebnisse Δ^9 -THC-D₃, THC-OH und THC-COOH aus Serum³⁰

Serum	Δ^9 -THC-D ₃				THC-OH				THC-COOH			
	n	Spanne			Spanne			Spanne				
Mittelwert [%]		CV [%]	Min [%] - Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%] - Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%] - Max [%]			
Wiederfindungsrate	25	101,21	0,86	100,12 - 104,15	99,54	1,51	96,41 - 101,45	100,65	0,52	99,69 - 101,75		
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	94,28	2,73		98,38	2,99		101,28	1,61			
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	101,01	0,51		100,42	0,44		100,79	0,62			
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	100,66	0,58		99,93	0,96		100,62	1,52			
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	99,11	1,24		103,11	0,80		102,25	3,11			
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	102,74	2,00		101,29	2,05		100,72	1,84			
Messpräzision	25	101,27	0,28		99,05	0,52		101,17	0,42			
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [ng/ml]	25	50,61	0,43		49,77	0,75		50,33	0,26			
LOD [ng/ml]	10	0,087			0,196			0,503				
LOQ [ng/ml]	10	0,099			0,215			0,554				
LOD(method.) [ng/ml]	10	0,156			0,349			0,896				
LOQ(method.) [ng/ml]	10	0,176			0,384			0,987				

Tabelle 10.31. Ergebnisse Δ^9 -THC- D_3 , THC-OH, THC-COOH aus Urin³¹

Urin	Δ^9 -THC- D_3					THC-OH					THC-COOH					
	n	Spanne		Min [%]	Max [%]	Spanne		Min [%]	Max [%]	Spanne		Min [%]	Max [%]			
Mittelwert [%]		CV [%]	Mittelwert [%]			CV [%]	Mittelwert [%]			CV [%]						
Wiederfindungsrate	25	83,86	3,64	77,54	-	87,53	91,09	1,85	88,91	-	94,53	83,54	3,57	79,04	-	92,66
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	96,02	2,97				88,46	1,03				77,85	1,66			
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	90,09	2,22				86,43	2,46				80,53	2,78			
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	85,34	2,82				90,97	1,74				84,09	3,89			
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	98,24	3,42				88,91	1,60				83,84	2,51			
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	99,64	2,92				85,95	2,03				84,96	2,76			
Messpräzision	10	100,29	1,09				87,72	0,93				86,82	1,59			
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [ng/ml]	25	83,86	3,05				91,09	1,69				167,08	5,96			
LOD [ng/ml]	10	0,081					0,232					0,482				
LOQ [ng/ml]	10	0,228					0,571					1,089				
LOD (method.) [ng/ml]	10	0,040					0,113					0,235				
LOQ (method.) [ng/ml]	10	0,111					0,279					0,531				

Tabelle 10.32: Ergebnisse Δ^9 -THC- D_3 , THC-OH, THC-COOH aus Speichel³²

Speichel	Δ^9 -THC- D_3					THC-OH					THC-COOH				
	nl	Spanne				Spanne				Spanne					
Mittelwert [%]		CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]			
Wiederfindungsrate	25	98,15	3,85	89,62 - 104,85	103,22	1,36	100,68 - 105,47	104,08	2,48	98,22 - 108,34					
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	106,48	3,02		99,67	1,45		104,33	1,94						
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	99,27	2,90		103,31	1,32		103,38	2,76						
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	99,36	3,74		107,73	1,79		108,29	2,66						
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	103,02	3,97		106,68	2,22		104,53	3,12						
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	107,08	2,69		106,63	2,69		108,62	2,70						
Messpräzision	25	100,45	0,50		101,62	0,41		100,59	0,78						
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [ng/ml]	25	162,93	6,27		171,34	2,32		172,78	4,28						
LOD [ng/ml]	10	0,068			0,596			1,712							
LOQ [ng/ml]	10	0,149			1,405			4,086							
LOD (method.) [ng/ml]	10	0,037			0,328			0,942							
LOQ (method.) [ng/ml]	10	0,082			0,773			2,247							

10.5.4 Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Cannabinoide

Tabelle 10.33: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Cannabinoide

	Automatisiert Serum	Automatisiert Urin	Automatisiert Speichel	Manuell Serum	Manuell Urin	Manuell Speichel
Probenanzahl	96	96	96	96	96	96
Betriebskosten	485.620,61 €	447.767,25 €	1.090.638,90 €	1.033.559,37 €	1.060.667,50 €	997.267,42 €
inkl. Materialkosten von:	437.813,81 €	399.991,83 €	987.401,33 €	554.564,15 €	577.624,11€	531.677,64 €
inkl. Personalkosten von:	34.800,00 €	34.800,00 €	90.480,00 €	471.960,00 €	476.000,00 €	458.640,00 €
inkl. Energiekosten von:	2.054,81 €	2.023,42 €	1.805,57 €	2.035,21 €	2.043,39 €	1.949,78 €
inkl. Instandhaltungskosten von:	10.952,00 €	10.952,00 €	10.952,00 €	5.000,00 €	5.000,00 €	5.000,00 €
Jährliche Abschreibung (5 Jahre, linear)	106.162,65 €	107.377,05 €	85.597,15 €	0,00 €	0,00 €	0,00 €
Jährliche kalkulatorische Zinsen (4%)	10.616,27 €	10.737,71 €	8.559,72 €	0,00 €	0,00 €	0,00 €
Gesamtkosten pro Jahr	602.399,53 €	565.882,00 €	1.184.795,77 €	1.033.559,37 €	1.060.667,50 €	997.267,42 €
Durchlaufzeit [h]	7,20	7,09	2,43	5,63	5,37	4,88
Vor- und Nachbereitungszeit [h]	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58
Probenanzahl pro Jahr [Stück]	72.000	72.000	187.200	91.200	96.000	100.800
Kosten pro Probe	8,37 €	7,86 €	6,33 €	11,33 €	11,05 €	9,89 €
NPV (5 Jahre, 2,4%)	1.016.799,58 €	1.180.871,26 €	5.373.039,36 €	699.894,22 €	863.879,93 €	1.449.564,47 €
Amortisationsdauer [Jahre]	1,60	1,46	0,34	0,00	0,00	0,00

10.5.5 Ergebnisse Nachhaltigkeit Cannabinoide

Tabelle 10.34: Ergebnisse Nachhaltigkeit Cannabinoide nicht normalisiert

Kategorie Nachhaltigkeit	Automatisiert 96 Proben Serum	Automatisiert 96 Proben Urin	Automatisiert 96 Proben Speichel	Manuell 96 Proben Serum	Manuell 96 Proben Urin	Manuell 96 Proben Speichel
Miniaturisierung und Automatisierung [%]	100	100	100	50	50	50
Probenvolumen [ml]	0,20	0,80	0,40	0,20	0,80	0,40
Mitarbeitersicherheit [%]	93	92	82	0	0	0
Durchlaufzeit pro Probe [Proben/h]	13	13	39	17	17	19
Einsatz schädlicher Lösungsmittel [ml]	0,86	0,64	0,42	0,86	0,64	0,42
Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel [%]	43	29	41	43	29	41
Abfallvolumen [ml]	1,85	2,03	1,40	1,85	2,03	1,40
Plastikabfall [g]	23,42	17,82	17,02	23,42	17,82	17,02
Wiederverwendbare Labware [%]	20	22	16	20	22	16

10.6 Anhang Benzoesäuren

10.6.1 Methoden und Parameter Benzoesäuren

Tabelle 10.35: Probenvorbereitungsmethoden Benzoesäuren

Methode	Matrix	Analyten	Analytik	LOD	LOQ	R	CV	Automatisierung	PPT	Extraktion	Evaporation
[410]	Wasser, Wein (für versch. Lebensmittel)	16 Phenolsäuren, inkl. 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure	LC-DAD, Phenomenex Luna C18 Säule, 270 nm	10-30 ng/ml	-	79-87%	-	manuell	Filtration	LLE	N ₂
[408]	Nudeln	Benzoesäure	LC-DAD; Gemini C18; 234 nm	420 ng/ml	1.140 ng/ml	86-102%	1,8-2,4%	manuell	Zerkleinern, Trocknen, Homogenisieren, Wiegen, Lösen Vortexen	LLE	-
[412]	Grundwasser	o-Toluylsäure, m-Toluylsäure, p-Toluylsäure, Weinsäure, Benzoesäure, Benzyl-Bernsteinsäure; Phenyl-Bernsteinsäuren, 2-(1-Phenylethyl)-Bernsteinsäure, 2-(2-Methylbenzyl)-Bernsteinsäure, 2-(3-Methylbenzyl)-Bernsteinsäure, 2-(4-Methylbenzyl)-Bernsteinsäure	LC-MS/MS, ESI	0,1 ng/ml	-	86-109%	-	manuell	Filtration	-	-
[411]	Grundwasser	Methylbenzylsuccinat (o-, m-, p-Toluat), Benzylsuccinat, Ethylbenzylsuccinat	LC-MS/MS	0,007-0,022 ng/ml	0,15 ng/ml	80-106%	2-4%	manuell	Filtration	SPE	N ₂

Tabelle 10.36: Probenvorbereitungsmethode Bestimmung von Benzoesäuren aus Wasserproben

Schritt	Beschreibung	Volumen/ Druck/ relative Zentrifugalbeschleunigung	Zeit [s]
1	Equilibrierung: Transfer von Methanol in Kartusche (Strata X-A, 200 mg, 3ml)	900 µl	-
2	Druckaufgabe auf Kartusche	500/4.000 mbar	40
3	Konditionieren: Transfer von Wasser in Kartusche	900 µl	-
4	Druckaufgabe auf Kartusche	500/4.000 mbar	45
5	Druckaufgabe auf Kartusche	1.000/4.000 mbar	25
6	Probenaufgabe: Transfer der Wasserprobe	2.500 µl	-
7	Druckaufgabe auf Kartusche	800/4.000 mbar	200
8	4x Wiederholung der Schritte 6 und 7	-	-
9	Waschen 1: Transfer von Ammoniumacetat-Puffer pH 6,7 in Kartusche	900 µl	-
10	Druckaufgabe auf Kartusche	800/4.000 mbar	60
11	Waschen 2: Transfer MeOH in Kartusche	900 µl	-
12	Druckaufgabe auf Kartusche	800/4.000 mbar	30
13	Trocknen der Kartusche: Druckaufgabe	1.000/4.000 mbar	600
14	Eluieren: Transfer MeOH:HCOOH (95:5) auf Kartusche	500 µl	-
15	Druckaufgabe auf Kartusche	300/4.000 mbar	45
16	Druckaufgabe auf Kartusche	400/4.000 mbar	45
17	Druckaufgabe auf Kartusche	600/4.000 mbar	30
18	2x Wiederholung der Schritte 16 und 17	-	-
19	Zugabe des internen Standards (C _{final} =5 ppm trans-Zimtsäure)	-	-
20	Bestimmung der Benzoesäurekonzentration mittels LC-DAD	-	-

Tabelle 10.37: Materialverzeichnis Benzoesäuren aus Wasser

Benzoessäuren	Bezeichnung	Hersteller/Verkäufer	Artikelnummer	96 Proben	Einheit
Pipettenspitzen	Biomek i-series Pipettenspitze 90 µl	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85881	96	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 230 µl	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85903	192	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 1070 µl	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85971	512	[Stück]
Labware	Aluminium Rack, 1.5 ml Interner Standard	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	1	[Stück]
	Aluminium Rack, Elution	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	4	[Stück]
	Wheaton Vial Rack	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	4	[Stück]
	Positive Pressure Rack (SPE), Kartuschen 3 ml	amplus GmbH, Rostock, DE	530240003	4	[Stück]
	Spacer Adapter	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	4	[Stück]
	Spritzenaufsatz	RS Components GmbH, Frankfurt am Main, Germany	505-7427	96	[Stück]
	Wheaton Glas Vials 12 ml	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE	Z188727	96	[Stück]
	Quarter Reservoir Sterile Divided by Length + Frame , 40 µL	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	372788	4	[Stück]
	Standard 1.5 ml Vials	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0716	96	[Stück]
	Strata X-A Kartuschen, 200 mg, 3 ml	Phenomenex, Torrance, USA	8B-S123-FBJ	96	[Stück]
	Vial Caps	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	5182-0731	96	[Stück]
Geräte	Biomek i7	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B87585	1	[Stück]
	Static Peltier für Biomek 4.000 FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93938	1	[Stück]
	Postive Pressure Unit	amplus GmbH, Rostock, DE	70757112	1	[Stück]
	Self-Refilling Quarter Reservoir	amplus GmbH, Rostock, DE	40222010	1	[Stück]
Flüssigkeiten	Standard (5 ppm trans-Zimtsäure)	selbst angesetzt	-	4.800	[µl]
	Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	172.800	[µl]
	25 mM Ammoniumacetatpuffer pH 6.7	selbst angesetzt	-	86.400	[µl]
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	86.400	[µl]
	Methanol:Ameisensäure (95:5)	selbst angesetzt	-	96.000	[µl]
	Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	7342.1	-	
	Entionisiertes Wasser	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	W4502	-	
	Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	8825.2	-	
	Benzoessäure (Benzoic Acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	242381	-	
	o-Toluylsäure (2-Methylbenzoic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	T36404	-	
	m-Toluylsäure (3-Methylbenzoic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	T36609	-	
	p-Toluylsäure (4-Methylbenzoic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	T36803	-	
	2,3-Dimethylbenzoessäure (2,3-Dimethylbenzoic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	138150-25G	-	
	2,4-Dimethylbenzoessäure (2,4-Dimethylbenzoic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	138169-10G	-	
	2,5-Dimethylbenzoessäure (2,5-Dimethylbenzoic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	138177	-	
	2,6-Dimethylbenzoessäure (2,6-Dimethylbenzoic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	156906	-	
	3,4-Dimethylbenzoessäure (3,4-Dimethylbenzoic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	R163007-25MG	-	
	3,5-Dimethylbenzoessäure (3,5-Dimethylbenzoic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	D149608-25G	-	
	DL-Benzylbernsteinsäure (DL-Benzylsuccinic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	B8011	-	
	trans-Zimtsäure (trans-cinnamic acid)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	C80857	-	
	Ammoniumacetat (Ammonium acetate)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	631-61-8	-	
	Kaliumdihydrogenphosphat (Potassium dihydrogen phosphate)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	3904.1	-	
	Benzoessäuren in Wasser (Probe, c=1ppm)	selbst angesetzt	-	9.600	[µl]

10.6.2 Analytik Benzoesäuren

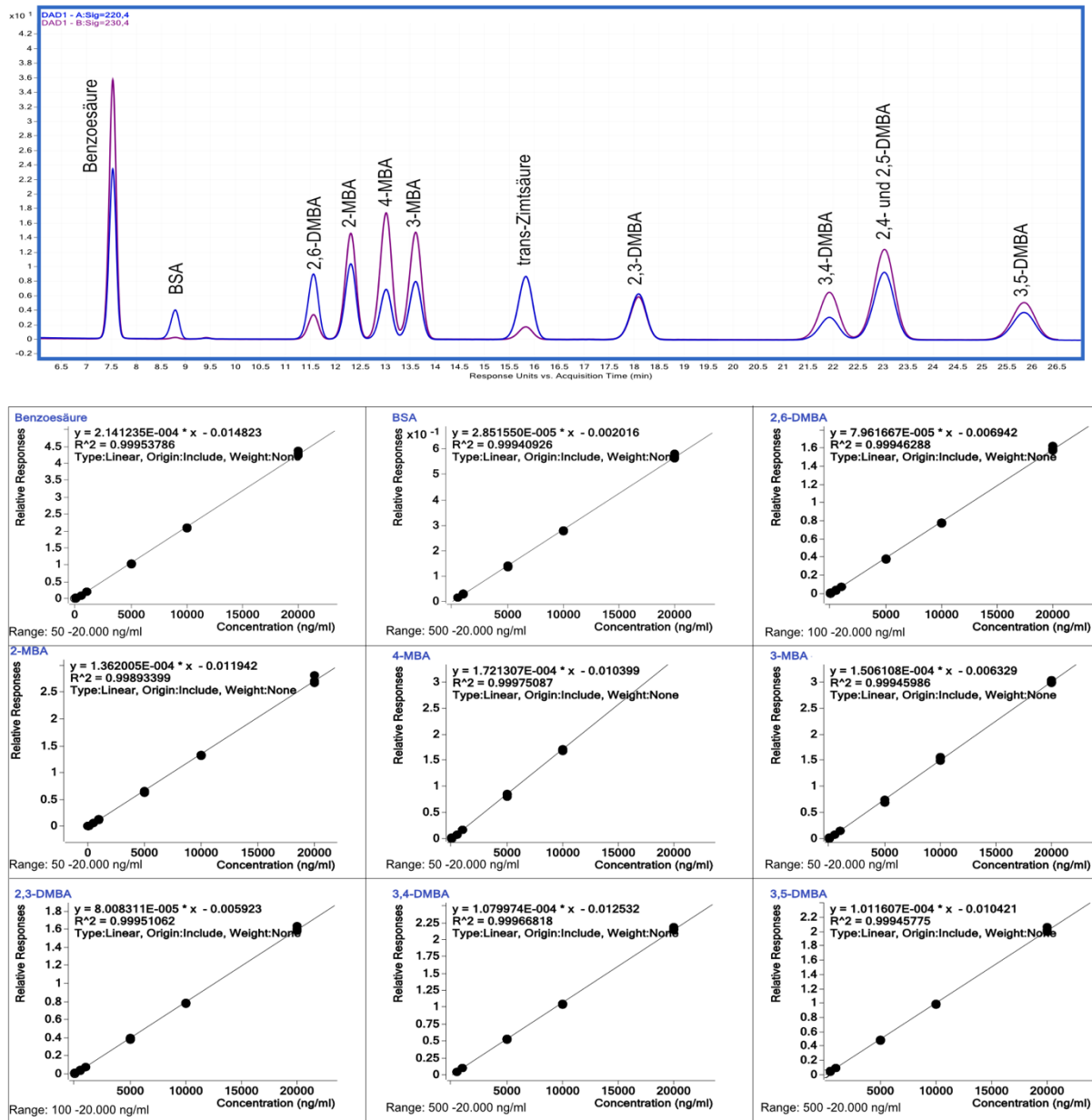


Abbildung 10.15: Chromatogramm (2 Wellenlängen) und Kalibrierkurven Benzoesäuren

Tabelle 10.38: Analytik Parameter Benzoesäuren³³

Analytik Benzoesäuren		
LC-DAD System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	Degasser	G4225A
	Binäre Pumpe	G1312B
	Multisampler	G7167A
	Säulenofen	G1316A
	Dioden-Array-Detektor (DAD)	G1315C
LC Parameter	Säule	Luna-Phenyl-Hexyl-Säule, 4,6 x 150mm, 3 µm, P.N. 00F-4256-E0, H21-093672 (Phenomenex, Torrance, USA)
	Injektionsvolumen	10 µl
	Needle Wash	Methanol
	Temperatur	25°C
	Flussrate	1 ml/min
	Mobile Phase A	20 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)- Puffer, pH 2,6
	Mobile Phase B	Acetonitril
DAD	Wellenlänge 1, Bandbreite	230 nm, 4 nm
	Wellenlänge 2, Bandbreite	220 nm, 4 nm
	Referenzwellenlänge, Bandbreite	360 nm, 100 nm
	Peakbreite	0,1 min (2 s Response Time) (2.5 Hz)
Kalibrierung	Kalibrierbereich Benzoesäure, 2-MBA, 4-MBA, 3-MBA	50–20.000 ng/ml
	Kalibrierbereich 2,6-DMBA; 2,3-DMBA	100–20.000 ng/ml
	Kalibrierbereich BSA; 3,4-DMBA; 3,5-DMBA	500–20.000 ng/ml
	Kalibrierbereich 2,4-DMBA; 2,5-DMBA	keine Basislinientrennung mit Chromatographie erreicht
	R ²	> 0,99
	Zielkonzentration Benzoesäuren	10 µg/ml
	Konzentration Standard (trans-Zimtsäure)	5 µg/ml

10.6.3 Ergebnisse Benzoessäuren

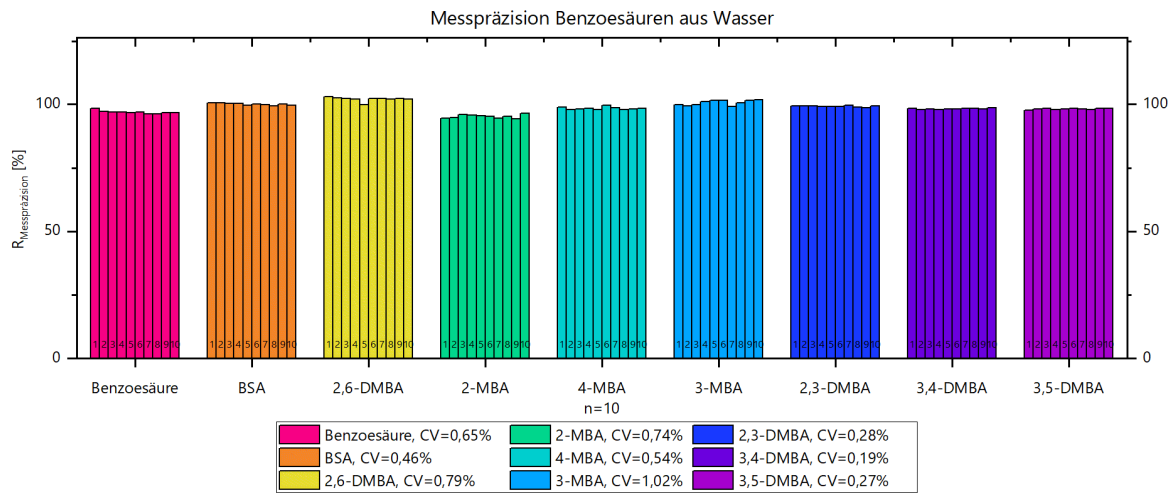


Abbildung 10.16: Messpräzision Benzoessäuren

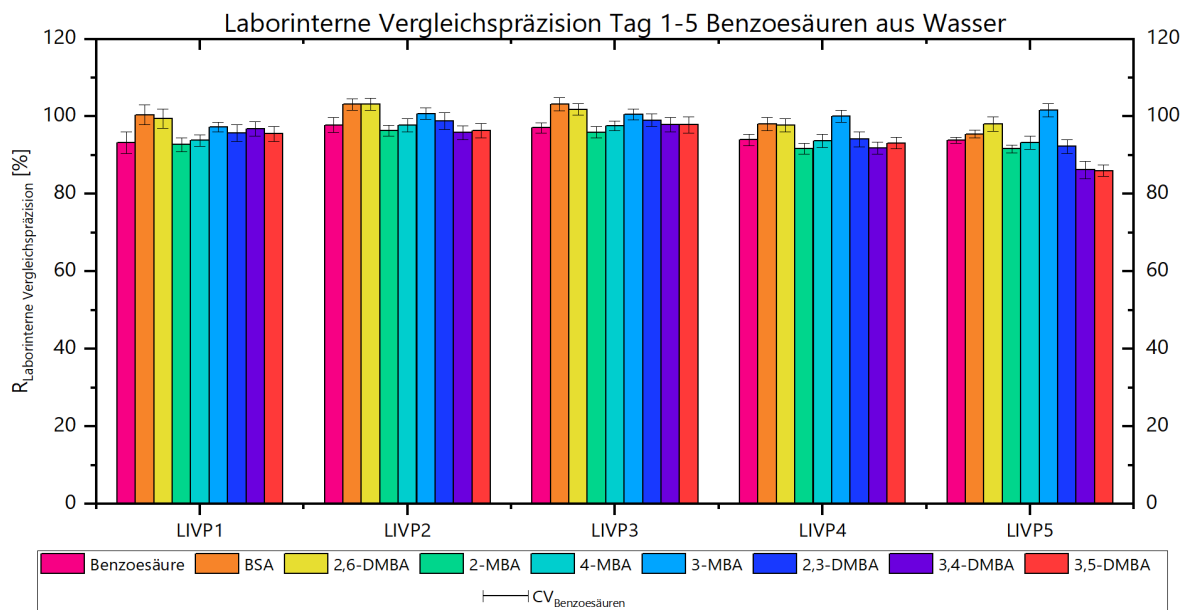


Abbildung 10.17: Laborinterne Vergleichspräzision Benzoessäuren

Tabelle 10.39: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzooesäuren³⁴ Teil 1

Ergebnisse Benzooesäuren 1	Benzooesäure					BSA					2,6-DMBA				
	Spanne					Spanne					Spanne				
	n	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]		
Wiederfindungsrate	24	93,46	1,68	91,13	95,84	96,75	2,30	93,26	100,34	97,13	1,92	94,20	100,42		
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	93,25	2,76			100,41	2,59			99,37	2,48				
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	97,76	1,95			103,08	1,47			103,13	1,60				
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	97,05	1,35			103,11	1,66			101,81	1,43				
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	93,93	1,53			98,03	1,71			97,70	1,75				
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	93,83	0,84			95,45	0,97			97,97	1,86				
Messpräzision	10	96,91	0,65			100,08	0,46			102,08	0,79				
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [$\mu\text{g/ml}$]	24	9,35	0,16			9,68	0,22			9,71	0,19				
LOD [ng/ml]	10	336,40				125,53				103,76					
LOQ [ng/ml]	10	561,71				137,28				117,83					
LOD(method.) [ng/ml]	10	33,64				12,55				10,38					
LOQ(method.) [ng/ml]	10	56,17				13,73				11,78					

Tabelle 10.40: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzooesäuren³⁵ Teil 2

Ergebnisse Benzooesäuren 2	2-MBA					4-MBA					3-MBA				
	Spanne					Spanne					Spanne				
	n	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]		
Wiederfindungsrate	24	91,33	1,95	87,63	94,32	93,41	1,82	89,84	96,25	99,55	1,57	97,14	102,01		
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	92,71	1,78			93,76	1,44			97,23	1,29				
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	96,32	1,40			97,71	1,72			100,73	1,44				
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	95,92	1,49			97,53	1,25			100,52	1,41				
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	91,68	1,37			93,71	1,73			100,00	1,58				
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	91,61	1,01			93,19	1,69			101,63	1,70				
Messpräzision	10	95,24	0,74			98,47	0,54			100,65	1,02				
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [$\mu\text{g/ml}$]	24	9,13	0,18			9,34	0,17			9,95	0,16				
LOD [ng/ml]	10	124,35				103,07				71,45					
LOQ [ng/ml]	10	140,71				137,26				117,66					
LOD(method.) [ng/ml]	10	12,44				10,31				7,15					
LOQ(method.) [ng/ml]	10	14,07				13,73				11,77					

³⁴ [413]³⁵ [413]

Tabelle 10.41: Zusammenfassung Ergebnisse Validierung Benzoessäuren³⁶ Teil 3

Ergebnisse Benzoessäuren 3	2,3-DMBA				3,4-DMBA				3,5-DMBA				
	Spanne				Spanne				Spanne				
	n	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]	Mittelwert [%]	CV [%]	Min [%]	Max [%]
Wiederfindungsrate	24	93,50	2,11	89,13	96,44	91,68	1,83	88,07	95,58	92,34	1,86	88,06	94,84
Laborinterne Vergleichspräzision 1	10	95,70	2,19			96,76	1,85			95,49	1,92		
Laborinterne Vergleichspräzision 2	10	98,78	2,12			95,79	1,81			96,33	1,86		
Laborinterne Vergleichspräzision 3	10	99,02	1,58			97,85	1,81			97,81	2,06		
Laborinterne Vergleichspräzision 4	10	94,07	1,92			91,85	1,52			93,12	1,48		
Laborinterne Vergleichspräzision 5	10	92,27	1,79			86,18	2,24			85,98	1,46		
Messpräzision	10	99,23	0,28			98,26	0,19			98,15	0,27		
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [$\mu\text{g/ml}$]	24	9,35	0,20			9,17	0,17			9,23	0,17		
LOD [ng/ml]	10	102,36				294,36				332,07			
LOQ [ng/ml]	10	105,41				397,54				505,26			
LOD(method.) [ng/ml]	10	10,24				29,44				33,21			
LOQ(method.) [ng/ml]	10	10,54				39,75				50,53			

10.6.4 Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzoesäuren

Tabelle 10.42: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Benzoesäuren

	Automatisiert Strata X-A 96 Benzoesäuren	Manuell Strata X-A 96 Benzoesäuren	Einheit
Probenanzahl	96	96	[Stück]
Betriebskosten	627.171,48 €	1.075.764,89 €	[€]
inkl. Materialkosten von:	577.115,70 €	613.185,43 €	[€]
inkl. Personalkosten von:	37.120,00 €	455.600,00 €	[€]
inkl. Energiekosten von:	1.983,78 €	1.979,47 €	[€]
inkl. Instandhaltungskosten von:	10.952,00 €	5.000,00 €	[€]
Jährliche Abschreibung (5 Jahre, linear)	86.480,58 €	0,00 €	[€]
Jährliche kalkulatorische Zinsen (4%)	8.648,06 €	0,00 €	[€]
Gesamtkosten pro Jahr	722.300,12 €	1.075.764,89 €	[€]
Durchlaufzeit	6,52	6,12	[Stunden]
Vor- und Nachbereitungszeit	0,58	0,58	[Stunden]
Probenanzahl pro Jahr	76.800	81.600	[Stück]
Kosten pro Probe	9,40 €	13,18 €	[€]
NPV (5 Jahre, 2,4%)	2.500.024,30 €	1.679.164,59 €	[€]
Amortisationsdauer	0,69	0,00	[Jahre]

10.6.5 Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzoesäuren

Tabelle 10.43: Ergebnisse Nachhaltigkeit Benzoesäuren nicht normalisiert

Kategorie Nachhaltigkeit	Automatisiert 96 Proben Strata X-A	Manuell 96 Proben Strata X-A
Miniaturisierung und Automatisierung [%]	50	0
Probenvolumen [ml]	10	10
Mitarbeitersicherheit [%]	92	0
Durchlaufzeit pro Probe [Proben/h]	14	15
Einsatz schädlicher Lösungsmittel [ml]	2,85	2,85
Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel [%]	12	12
Abfallvolumen [ml]	14,65	14,65
Plastikabfall [g]	26,75	26,75
Wiederverwendbare Labware [%]	31	31

10.7 Anhang Antikörper

10.7.1 Methoden und Parameter Antikörper

Tabelle 10.44: Probenvorbereitungsmethoden Antikörper

Methode	Matrix	Analyten	Analytik	R	CV	Automatisierung	Format	Chromatographie	Anwendung
[443]	CHO Zellüberstand	mAB	UV280nm	-	-	Tecan Freedom EVO Workstation (für gepackte Pipettenspitzen und miniaturisierte Säulen)	miniaturisierte Säulen, gepackte Pipettenspitzen, 96-Well Filterplatte	AC (Protein A)	Vergleich Labware Formate
[439]	CHO Zellüberstand	mAB	UV280nm	87-102%	-	Tecan Freedom EVO 150 Workstation	miniaturisierte Säulen	CEX, mixed mode Chromatography	Screening: Prozessbedingungen, Auswahl Sorbent 1x, Dynamische Bindungskapazität
[465]	zellfreier Zellkulturüberstand	mAB	UV280nm	nach 2 Chromatographie Schritten: mAB1 > 68%; mAB2 > 65%	mAB1 ±1,7%; mAB2 ±2,3%	Perkin JANUS-VariSpan ALH	miniaturisierte Säulen	AC, SEC	Proteinaufreinigung
[450]	Zellkulturüberstand	mAB	UV280nm	mAB1:65-92%; mAB2: 75-107%	-	Tecan Fluent 1080 Automation Workstation	miniaturisierte Säulen	AC, SEC	Vergleich mini+ auto mit Labscale
[466]	Zellkulturüberstand	IgG mAB	Absorption	-	-	Tecan Freedom EVO 200 Workstation	miniaturisierte Säulen	AEC, CEC	Vergleich mini + auto mit Labscale
[467]	Zellkulturüberstand	Rekombinante Antikörper	UV280nm	37-85%	-	In-line Tandem Chromatographie	2 chromatographische Säulen	AEC, SEC	Prozessvalidierung
[468]	CHO Zellkulturüberstand	mAB	UV280nm	> 72%	-	Protein-Maker Chromatography System, AKTA Pure Instrument (halbautomatisierte Methode)	Säulen	AC, SEC	Proteinaufreinigung
[469]	CHO Zellkulturüberstand	Glykosyliertes Protein	UV280nm	-	-	Caliper Sciclone G3	96-Well Filterplatte	CEC, HIC	Prozessentwicklung
[470]	-	IgG	UV280nm	-	-	manuell	96-Well Filterplatte	AEC (MabSelect SuRe)	Prozessentwicklung
[471]	Zellkulturüberstand	monoklonale Antikörper	UV320nm, UV280nm, UV214nm	> 90%	-	Tecan Genesis 150 zur Dosierung des Adsorbionsmittels	96-Well Filterplatte	HIC, CEC	Prozessentwicklung
[440]	CHO Zellkulturüberstand	monoklonale Antikörper	UV280nm	102%	±3,9%	Tecan Genesis 100 Workstation	96-Well Filterplatte	HIC (AC, IEC, HIC), keramisches Hydroxyapatit	Prozessentwicklung
[446]	Zellkulturüberstand	mAB	UV280nm, LC-MS	80%	-	Tecan Freedom EVO Workstation	96-Well Filterplatte	AC	Prozessmonitoring
[442]	CHO Zellüberstand	IgG1 mAB	UV 278-280 nm	65-70%	-	manuell	96-Well Filterplatte	IEC	Prozessentwicklung
[441]	Schafserum	mAB	UV 280 nm	-	-	Perkin MultiProbe II EX	gepackte Pipettenspitzen	IEC	Optimierung von pH-Wert und Puffer
[447]	Säugetierzellen	mAB	LC-MS, UV 280 nm	77%	-	Tecan Freedom EVO Workstation	gepackte Pipettenspitzen	AC	Prozessmonitoring
[472]	Hybridoma Überstand	IgG mAB	UV 214 nm	104%	3%	Tecan Freedom EVO 200 Workstation	gepackte Pipettenspitzen	AC (Protein G)	Automatisierung, Einzelkanal-Pipetten
[432]	0.5% Tween-20 in PBS	His-tagged ubiquitin	UV 280 nm	74%%	10%	Tecan Freedom EVO 200 Workstation	gepackte Pipettenspitzen	IMAC	Automatisierung, 96-Multichannel-Kopf

Tabelle 10.45: Probenvorbereitungsmethode IgG-Aufreinigung RoboColumns

RoboColumns	Schritt	Beschreibung	Volumen/Druck/relative Zentrifugalbeschleunigung	Zeit [s]
Entfernung der Zellen	1	Zentrifugation der 12-Well Zellkulturplatte (c=1 mg/ml IgG in DMEM + Zellen)	3.000 rpm	240
Equilibrieren (2.400 µl)	2	Transfer PBS-Puffer	600 µl	-
	3	4x Wiederholung des Schritts	-	-
Probenaufgabe (600 µl)	4	Transfer des Überstands (c= 1mg/ml)	600 µl	-
	5	Inkubation	-	900
Waschen 1 (1.000 µl)	6	Transfer PBS-Puffer	500 µl	-
	7	Inkubation	-	90
	8	2x Wiederholung des Schritts	-	-
Waschen 2 (40 µl)	9	Transfer Natriumacetat-Puffer pH 6	40 µl	-
	10	Inkubation	-	90
Eluieren (600µl)	11	Transfer Natriumacetat-Puffer pH 3,5	600 µl	-
	12	Inkubation ³⁷	-	240
UV280	13	Schütteln der Deepwell Platte	-	60
	14	Transfer Proben, Fraktionen, Blanks auf 384-Well UV Star MTP	100 µl	-
	15	Quantifizierung mit UV280 nm	-	-
Aufreinigung der RoboColumns	16	Transfer Natriumacetat-Puffer pH 3,5	600 µl	-
	17	Inkubation	-	240
Strip	18	Transfer 0,1 M Essigsäure	200 µl	-
Clean	19	Transfer 0,5 M NaOH	600 µl	-
Repeat	20	Wiederholung des Prozesses 24x	-	-
Transfer Storage Solution	21	Transfer 20% Ethanol in H ₂ O	400 µl	-

³⁷ Fakultativ: Wiederholung Schritt 12 + 13 („Nachelution“)

Tabelle 10.46: Probenvorbereitungsmethode IgG-Aufreinigung PreDictor Plates

PreDictor Plates	Schritt	Beschreibung	Volumen/ Druck/ relative Zentrifugalbeschleunigung	Zeit [s]
Entfernung der Zellen	1	Zentrifugation der 12-Well Zellkulturplatte (c=2 mg/ml IgG in DMEM + Zellen)	3.000 rpm	240
Remove Storage Solution	2	Druckaufgabe	500/4.000 mbar	60
	3	Abtupfen	-	-
Equilibrieren (600 µl)	4	Transfer PBS-Puffer	200 µl	-
	5	Schütteln	1.100 rpm	60
	6	Druckaufgabe	650/4.000 mbar	20
	7	Abtupfen	-	-
	8	3x Wiederholung der Schritte 4-7	-	-
Probenaufgabe (200 µl)	9	Transfer des Überstands (c= 2mg/ml)	200 µl	-
	10	Schütteln + Inkubation	1.100 rpm	7.200
	11	Druckaufgabe	650/4.000 mbar	20
	12	Abtupfen	-	-
Waschen 1 (330 µl)	13	Transfer PBS-Puffer	330 µl	-
	14	Schütteln	1.100 rpm	60
	15	Druckaufgabe	650/4.000 mbar	20
	16	Abtupfen	-	-
Waschen 2 (40 µl)	17	Transfer Natriumacetat-Puffer pH 6	40 µl	-
	18	Schütteln	1.100 rpm	60
	19	Druckaufgabe	650/4.000 mbar	20
	20	Abtupfen	-	-
Eluieren (400 µl)	21	Transfer Natriumacetat-Puffer pH 3,5	200 µl	-
	22	Schütteln	1.100 rpm	120
	23	Druckaufgabe	650/4.000 mbar	30
	24	Abtupfen	-	-
	25	2x Wiederholung der Schritte 17-20	-	-
Transfer Storage Solution (400 µl)	26	Transfer 20% Ethanol in H ₂ O	400 µl	-
UV280	27	Schütteln der Elutionsplatte	-	60
	28	Transfer Proben, Blanks auf 384-Well UV Star MTP	100 µl	-
	29	Quantifizierung mit UV280 nm	-	-

Tabelle 10.47: Materialverzeichnis IgG mit RoboColumns

i7 RoboColumns	Bezeichnung	Hersteller/Verkäufer	Artikelnummer	288 Proben	Einheit
Pipettenspitzen	Span-8 Stainless Steel Fixed Probe, 60mm	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	719808	8	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 230 µl	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85903	288	[Stück]
Labware	PreDictor RoboColumn MabSelect PrismA, 200 µl	Cytiva Sweden, Uppsala, SE	17549833	96	[Stück]
	Aluminium-Rack	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	1	[Stück]
	Quarter Reservoir Sterile Divided by Length + Frame , 40 µL	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	372788	6	[Stück]
	96-Deepwell Platte Brand 1,1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	BR701352	3	[Stück]
	Sarstedt 12-Well Zellkulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht, DE	833921005	9	[Stück]
	Greiner Multiwell Plate Lids	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	L4537	1	[Stück]
	Greiner UV-Star 384-Well Mikrotiterplatte, 110 µl, flat, µclear	Greiner Bio One; Frickenhausen, DE	781801	1	[Stück]
Geräte	Biomek i7	Beckmann Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B87585	1	[Stück]
	Peltier Temperier- und Schüttelposition für Biomek® 4000, FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93942	1	[Stück]
	VSpin Zentrifuge	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	G5582AA/GA	1	[Stück]
	RoboColumn Unit	amplius GmbH, Rostock, DE	80177211	1	[Stück]
	3D-Tilting ALP	amplius GmbH, Rostock, DE	20161910	1	[Stück]
	Self-Refilling Quarter Reservoir	amplius GmbH, Rostock, DE	40222010	1	[Stück]
Flüssigkeiten	Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	D8537-500ML	979.200	[µl]
	Natriumacetat-Puffer pH 6	selbst angesetzt	-	11.520	[µl]
	Natriumacetat-Puffer pH 3,5	selbst angesetzt	-	172.800	[µl]
	0,5 M Natriumhydroxid	selbst angesetzt	-	172.800	[µl]
	0,1 M Essigsäurelösung	selbst angesetzt	-	57.600	[µl]
	Ethanol:Wasser (20:80)	selbst angesetzt	-	38.400	[µl]
Probe	IgG in DMEM (c=1 mg/ml + Zellen)	selbst angesetzt	-	172.800	[µl]

Tabelle 10.48: Materialverzeichnis IgG mit PreDictor Plates

i7 PreDictor Plates	Bezeichnung	Hersteller/Verkäufer	Artikelnummer	192 Proben	Einheit
Pipettenspitzen	Span-8 Stainless Steel Fixed Probe, 60mm	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	719808	8	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 90 µl	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85881	96	[Stück]
	Biomek i-series Pipettenspitze 230 µl	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B85903	768	[Stück]
Labware	Aluminium Rack, Interner Stand	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	1	[Stück]
	Platte Blotting, Greiner 96-Well Mikrotiterplatte	VWR International, Radnor, USA	786201	14	[Stück]
	Greiner 96-Well-MTP 0,2 ml V-bottom, clear, round	VWR International, Radnor, USA	651101	1	[Stück]
	Spacer Adapter 2 (Filter Adapter 24/96)	amplus GmbH, Rostock, DE	520020814	2	[Stück]
	Adapter Tuchhalter	Eigenkonstruktion celisca, Rostock, DE	-	14	[Stück]
	Full Reservoir 300 ml	Thermo Fisher Scientific	1200-1300	3	[Stück]
	Quarter Reservoir Sterile Divided by Length + Frame, 40 µL	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	372788	4	[Stück]
	PreDictor Plates Mab Select PrismA, 6µl	Cytiva Sweden, Uppsala, SE	17549830	2	[Stück]
	96-Deepwell Platte Brand 1,1 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	BR701352	2	[Stück]
	Sarstedt 12-Well Zellkulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht, DE	833.921.005	2	[Stück]
	Greiner Multiwell Plate Lids	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	L4537	2	[Stück]
	Greiner UV-Star 384-Well Mikrotiterplatte, 110 µl, flat, µclear	Greiner Bio One; Frickenhausen, DE	781801	1	[Stück]
	Tücher (Blotting)	VWR International, Radnor, USA	115-0600	14	[Stück]
Geräte	Biomek i7	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA	B87585	1	[Stück]
	Peltier Temperier- und Schüttelposition für Biomek® 4000, FXp, NXp	Inheco Industrial Heating & Cooling GmbH, Martinsried, DE	A93942	2	[Stück]
	VSpin Zentrifuge	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	G5582AA/GA	1	[Stück]
	Positive Pressure Unit	amplus GmbH, Rostock, DE	70757112	1	[Stück]
	3D-Tilting ALP	amplus GmbH, Rostock, DE	20161910	1	[Stück]
	Self-Refilling Quarter Reservoir	amplus GmbH, Rostock, DE	40222010	1	[Stück]
Flüssigkeiten	Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	D8537-500ML	178.560	[µl]
	Natriumacetat-Puffer pH 6	selbst angesetzt	-	7.680	[µl]
	Natriumacetat-Puffer pH 3,5	selbst angesetzt	-	76.800	[µl]
	Ethanol:Wasser (20:80)	selbst angesetzt	-	76.800	[µl]
Probe	IgG in DMEM c=2 mg/ml + Zellen	selbst angesetzt	-	38.400	[µl]

10.7.2 Analytik Antikörper

Tabelle 10.49: Methodenparameter IgG

Analytik IgG		
Spektrophotometer	Pherastar	BMG Labtech, Ortenberg, DE
	Optische Modul	Filter Extinktion 280 nm
Kalibrierung	Kalibrierbereich	0,0625-2 mg/ml
	Regressionskoeffizient R^2	0,997
	Zielkonzentration IgG	1 mg/ml

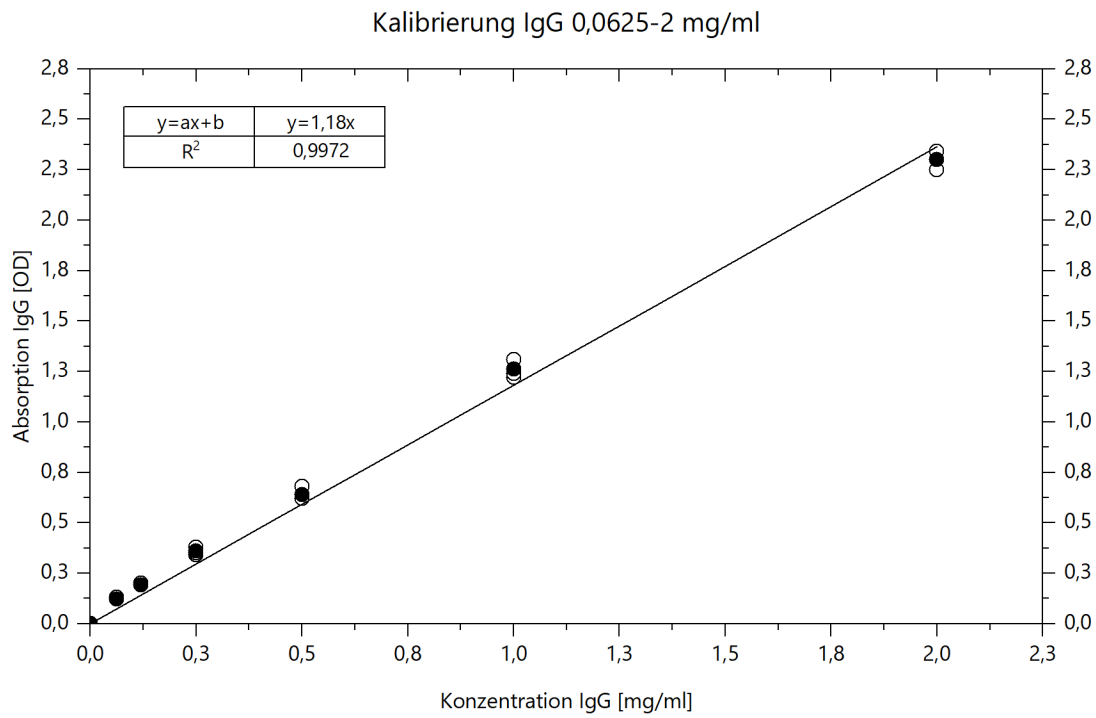


Abbildung 10.18: Kalibrierkurve IgG

10.7.3 Ergebnisse Antikörper

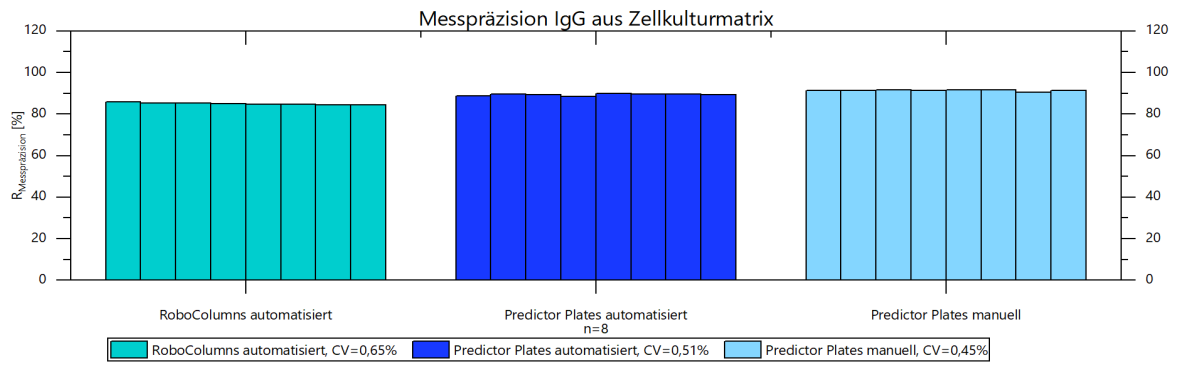


Abbildung 10.19: Messpräzision IgG aus Zellkulturmatrix

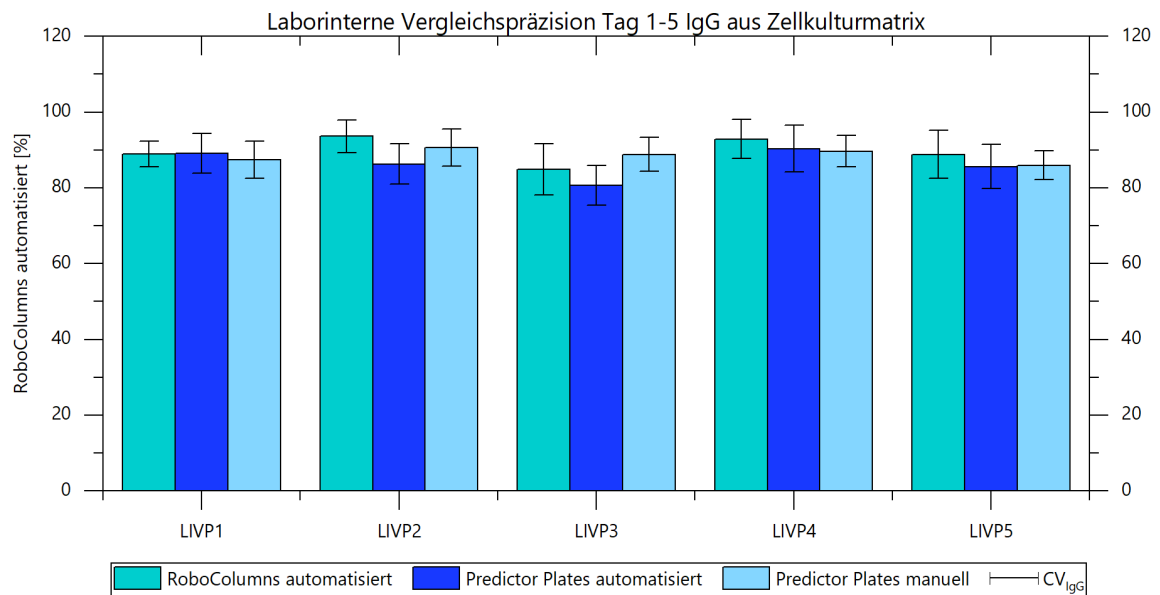


Abbildung 10.20: Laborinterne Vergleichspräzision IgG

Tabelle 10.50: Zusammenfassung der Ergebnisse Antikörperaufreinigung³⁸

Antikörper IgG	RoboColumns automatisiert					PreDictor Plates automatisiert					PreDictor Plates manuell					
	n	Spanne		Spanne		Mittelwert [%]	CV [%]	Spanne		Mittelwert [%]	CV [%]	Spanne		Mittelwert [%]	CV [%]	Spanne
Mittelwert [%]		CV [%]	Min [%]	Max [%]	Min [%]			Max [%]	Min [%]			Max [%]	Min [%]			Max [%]
Wiederfindungsrate	16	90,85	5,28	82,4	-	99,13	84,71	6,24	74,38	-	96,62	90,09	5,68	81,99	-	98,76
Laborinterne Vergleichspräzision 1	8	88,90	3,39				89,16	5,24				87,40	4,90			
Laborinterne Vergleichspräzision 2	8	93,64	4,34				86,27	5,35				90,60	4,86			
Laborinterne Vergleichspräzision 3	8	84,85	6,74				80,61	5,24				88,81	4,47			
Laborinterne Vergleichspräzision 4	8	92,88	5,16				90,32	6,19				89,69	4,09			
Laborinterne Vergleichspräzision 5	8	88,83	6,32				85,64	5,76				85,98	3,87			
Messpräzision	8	84,98	0,65				89,30	0,51				91,31	0,45			
Wiederholpräzision \bar{x} / σ [mg/ml]	16	0,91	0,048				0,85	0,053				0,90	0,051			
LOD [mg/ml]	8	0,03					0,03					0,04				
LOQ [mg/ml]	8	0,07					0,08					0,10				
LOD(method.)[mg/ml]	8	-					0,06					0,08				
LOQ(method.)[mg/ml]	8	-					0,17					0,20				

10.7.4 Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Antikörper

Tabelle 10.51: Ergebnisse Wirtschaftlichkeit Antikörper

	RoboColumns automatisiert	PreDictor Plates automatisiert	PreDictor Plates manuell	Einheit
Probenanzahl	288	192	192	[Stück]
Betriebskosten	33.501,80 €	891.602,65 €	1.290.901,49 €	[€]
inkl. Materialkosten von:	16.128,96 €	808.988,81 €	815.458,01 €	[€]
inkl. Personalkosten von:	4.640,00 €	55.680,00 €	468.480,00 €	[€]
inkl. Energiekosten von:	1.780,83 €	15.981,84 €	1.963,48 €	[€]
inkl. Instandhaltungskosten von:	10.952,00 €	10.952,00 €	5.000,00 €	[€]
Jährliche Abschreibung (5 Jahre, linear)	108.981,01 €	104.980,78 €	0,00 €	[€]
Jährliche kalkulatorische Zinsen (4%)	10.898,10 €	10.498,08 €	0,00 €	[€]
Gesamtkosten pro Jahr	153.380,91 €	1.007.081,50 €	1.290.901,49 €	[€]
Durchlaufzeit	46,80	4,42	4,30	[Stunden]
Vor- und Nachbereitungszeit	0,58	0,58	0,58	[Stunden]
Probenanzahl pro Jahr	28.800	230.400	230.400	[Stück]
Kosten pro Probe	5,33 €	4,37 €	5,60 €	[€]
NPV (5 Jahre, 2,4%)	539.890,48 €	9.178.332,19 €	8.380.852,76 €	[€]
Amortisationsdauer	2,34	0,25	0,00	[Jahre]

10.7.5 Ergebnisse Nachhaltigkeit Antikörper

Tabelle 10.52: Ergebnisse Nachhaltigkeit Antikörper nicht normalisiert

Kategorie Nachhaltigkeit	Automatisiert 288 Proben RoboColumns	Automatisiert 192 Proben PreDictor Plates	Manuell 192 Proben PreDictor Plates
Miniaturisierung und Automatisierung [%]	50	100	50
Probenvolumen [ml]	0,60	0,20	0,20
Mitarbeitersicherheit [%]	99	88	0
Durchlaufzeit pro Probe [Proben/h]	6	43	44
Einsatz schädlicher Lösungsmittel [ml]	0,65	0,08	0,08
Einsatz umweltfreundlicher Lösungsmittel [%]	83	91	91
Abfallvolumen [ml]	7,42	2,57	2,57
Plastikabfall [g]	4,20	8,62	8,62
Wiederverwendbare Labware [%]	27	4	4

11. Veröffentlichungen

1. A. Bach et al., "Flexible Automation System for Parameter Screening and Small-Scale Protein Purification Applied to Colostrum Samples," in *Proc. 2024 IEEE 20th International Conference on Automation Science and Engineering (CASE)*, Bari, Italy, 2024, pp. 1-6, DOI: 10.1109/CASE59546.2024.10711677.
2. A. Bach; S. Mikkat; H. Fleischer; M. A. Tlili; T. Roddelkopf; K. Thurow, "Automated Optic Calibration to Optimize Pipetting Accuracy and Precision in a Liquid Handling System," in *Proc. 2024 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*, Glasgow, United Kingdom, 2024, pp. 1-6, DOI: 10.1109/I2MTC60896.2024.10560812.
3. A. Bach; H. Fleischer; K. Thurow, "Comparison of Miniaturized Chromatographic Columns and 96-Well Plates for Automated Antibody Purification under Economic and Sustainable Aspects," *Separations*, vol. 10, no. 8, Art. no. 447, 2023, DOI: 10.3390/separations10080447.
4. H. Fleischer; S. Horn; A. Bach; T. Roddelkopf; K. Thurow, "Automated Determination of Benzoic Acids in Water Samples Using a Biomek i7 Hybrid Workstation, Positive Pressure Solid Phase Extraction and LC with UV Detection," in *Proc. 2023 IEEE 19th International Conference on Automation Science and Engineering (CASE)*, Auckland, New Zealand, 2023, pp. 1-7, DOI: 10.1109/case56687.2023.10260590.
5. H. Fleischer; A. Bach; A. Reichelt; B. Wijayawardena; M. Kheradmand; K. Thurow, "Automated Sample Pretreatment and Measurement of Benzodiazepines in Serum Using a Biomek i7 Hybrid Workstation and LC-MS/MS," in *Proc. 2022 IEEE 18th International Conference on Automation Science and Engineering (CASE)*, Mexico City, Mexico, 2022, pp. 2423-2428, DOI: 10.1109/case49997.2022.9926726.
6. A. Bach; H. Fleischer; B. Wijayawardena; K. Thurow, "Automation System for the Flexible Sample Preparation for Quantification of Δ^9 -THC-D3, THC-OH and THC-COOH from Serum, Saliva and Urine," *Applied Sciences*, vol. 12, no. 6, Art. no. 2838, 2022, DOI: 10.3390/app12062838.
7. A. Bach; H. Fleischer; B. Wijayawardena; K. Thurow, "Optimization of Automated Sample Preparation for Vitamin D Determination on a Biomek i7 Workstation," *SLAS Technol.*, vol. 26, no. 6, pp. 615-629, 2021, DOI: 10.1177/24726303211030291.