

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
7. Juni 2012 (07.06.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/073148 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 35/10 (2006.01) G01N 30/00 (2006.01)
G01N 1/38 (2006.01) G01N 30/06 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01) H01J 49/04 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB2011/055211

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. November 2011 (21.11.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
02007/10 30. November 2010 (30.11.2010) CH

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): CAMAG AG [CH/CH]; Sonnenmattstrasse 11,
CH-4132 Muttenz (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LOPPACHER,
Matthias [CH/CH]; Bristenweg 26, CH-4054 Basel (CH).
ALTMEYER, Manuel [CH/CH]; Säntisstrasse 23, CH-
8640 Rapperswil (CH). FANKHAUSER, Christoph
[CH/CH]; Lärchenstrasse 2, CH-4416 Bubendorf (CH).
SCHRANZ, Urs [CH/CH]; Hofmattweg 3a, CH-4144
Arlesheim (CH).

(74) Anwalt: INDUSTRIEBERATUNG MAIER AG;
Gewerbestrasse 10, Postfach, CH-4450 Sissach (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

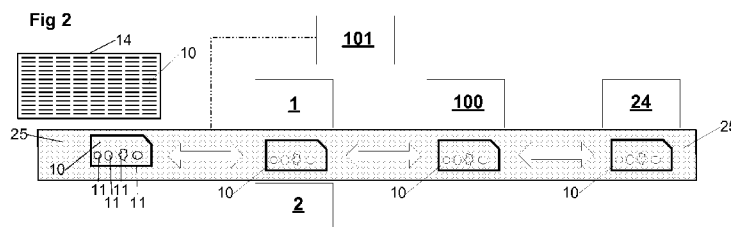
(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR AUTOMATICALLY DETECTING SUBSTANCES FOR ANALYSES

(54) Bezeichnung : VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR AUTOMATISCHEN ERFASSUNG VON SUBSTANZEN FÜR
ANALYSEN



(57) Abstract: A fully automatic extraction and analysis system for biologically active samples significantly simplifies the analysis of, for example, DMS samples and has significant advantages over the manual technology and the partially automated technology (punching out). The described extraction system is the first economical alternative to conventional blood analysis and supports the spread of said time-, cost-, and animal-saving technology in pharmacology and toxicology.

(57) Zusammenfassung: Ein vollautomatisches Extraktions- und Analysesystem für biologisch aktive Proben vereinfacht die Analyse z.B. von DMS-Proben entscheidend und weist gegenüber der manuellen wie auch der teilweise automatisierten Technik (ausstanzen) entscheidende Vorteile auf. Das beschriebene Extraktionssystem ist die erste ökonomische Alternative zur konventionellen Blutanalyse und unterstützt die Verbreitung dieser zeit-, kosten- und tiersparenden Technik in der Pharmakologie und Toxikologie.



WO 2012/073148 A1

Verfahren und Vorrichtung zur automatischen Erfassung von Substanzen für Analysen

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtung zur automatischen Erfassung von Substanzen für Analysen gemäss Oberbegriff des Patentanspruchs 1.

In der Medikamentenentwicklung ist das Screening grosser Mengen von Blutproben eine unverzichtbare Untersuchungsmethode wie auch durch die Anforderungen der regulierenden Behörden absolute Bedingung. In den letzten Jahren hat die Analyse von Dried Blod Spots (DBS) wegen ihren grossen Vorteilen gegenüber konventionellen Blutproben die Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Insbesondere die signifikante Reduktion des benötigten Blutvolumens sowie das einfachere Versenden und Lagern führen zu einer deutlichen Einsparung bei den Gesamtkosten für Blutanalysen.

Zusätzlich kann durch die geringere Menge an benötigtem Blut der Verbrauch von Versuchstieren deutlich gesenkt werden, was in Einklang mit den 3R Anforderungen für Tierversuche geht (replacement, reduction, refinement). Für DBS-Analysen werden typischerweise pro Messung nur 15 μ l Blut benötigt,

welches auf ein Filterpapier aufgetragen (sogenannte DBS-Karten), getrocknet, versendet und in einem zentralen Labor mit einem Massenspektrometer (MS) analysiert wird. Vor der MS-Analyse muss die Blutprobe aus der DBS-Karte extrahiert werden. Das stellt momentan noch einen entscheidenden Aufwand zum Nachteil der DBS-Technik dar, da dieser Prozess bis heute noch nicht automatisiert ist. Die heute bekannte DBS-Analyse ist zeit- und kostenaufwendig und die Vorteile dieser Methode kommen noch nicht voll zur Geltung. Ein vollautomatisches System für die Extraktion von DBS-Karten mit direkter Kopplung zum MS ist daher für die Blut analysierende Industrie von grösstem Interesse.

Das Verfahren hat sich bewährt und wird heute genauso für andere Substanzproben, wie z.B. Knochenmark, Gehirn- und Gelenkflüssigkeiten, Sperma, Stuhl, Urin, Blutplasma etc. ebenfalls angewendet, welche allgemein mit „Dried Matrix Spot (DMS)“ bezeichnet werden. Speziell für eingetrocknete biologische Proben, welche in Tropfenform aufgetragen wurden sind die bekannten Verfahren aufwendig, zeitraubend und für einige Analysen zu rudimentär um präzise und verlässliche

Daten zu gewährleisten. Um die Proben zu transportieren und z.B. in Reagenzgläsern den Messgeräten zuzuführen, müssen diese normalerweise in Lösung, Emulsion oder in verdünnter Mischungsform vorliegen. Solche Proben enthalten relativ kleine Anteile der gesuchten und zu beurteilenden Substanzen. Speziell im Drogenscreening oder bei Dopingprüfungen, aber auch bei allen andern routinemässigen Untersuchungen wäre es wünschenswert, zur Messung möglichst nur die gewünschten Substanzen in möglichst haltbarer Form ähnlich der oben beschriebenen DBS-Proben zu haben, um präzise Messungen in kurzer Zeit durchführen zu können und den Aufwand für Transport und Lagerung minimal zu halten. Solche Proben können platzsparend aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert werden.

In der Schweizer Patentanmeldung Nr. CH-01166/09 wird ein Verfahren und die zugehörige Vorrichtung vorgestellt, mit deren Hilfe für flüssige, hochviskose, getrocknete, koagulierte oder eingedickte, in fester Form vorliegende, eingetrocknete und biologisch aktive, oder zur Stabilisation mit Schutzkolloiden versetzte Proben erfasst werden können. Vorrichtung und Methode

eignen sich auch für die Analyse von Mikroskopieschnitten, welche Substanzen in entsprechenden Konzentration enthalten. Auch kleine Mengen wie auch Konzentrationen der zu prüfenden Substanzen werden damit zuverlässig und genau analysiert.

Ein Problem der bisherigen Verfahren stellt in der Praxis die grosse Anzahl der zu analysierenden Proben dar, welche in kurzer Zeit analysiert werden sollten. Den Labors fehlt schlicht die Zeit genügend Proben zu analysieren, um in der Folge aussagekräftige Statistiken aufstellen zu können. Gerade bei klinischen Untersuchungen müsste man eine Vielzahl von Proben messen, um statistische Werte zu haben und darauf basierend mit einiger Sicherheit eine Aussage machen zu können.

Das Ausstanzen der DBS-Disks wird heute, wie Fig 1 schematisch darstellt, manuell durchgeführt. Weil das Verfahren manuell aufwendig ist und der Aufwand dadurch zuviel Zeit in Anspruch nimmt, hat sich dieses Vorgehen und Verfahren noch nicht wirklich durchgesetzt. Durch das wachsende Interesse an der DBS-Technologie wurden automatische Ausstanzgeräte

eingeführt (BSD robotics, Perkin Elmer). Die hier vorgestellte Methode für DBS wird auch für DMS erfolgreich eingesetzt. Diese Systeme stanzen automatisch eine Disk von z.B. 3.2 mm Durchmesser aus einer DBS-Karte in ein kleines Glassgefäß (Vial). Das Extraktionsmittel muss dann hinzugefügt, die Probe mit einem Schüttler oder Ultraschall zwecks besserer Extrahierbarkeit behandelt und danach noch dem MS zugeführt werden. Das zeitaufwändige Verfahren mag Grund sein, dass bis jetzt nur wenige Gruppen über eine Online-Extraktion von DBS-Karten berichtet haben.

Andere Techniken wie das Ausstanzen der Disks und Verpacken in Kartuschen mit nachfolgender Extraktion oder die „desorption electrospray ionisation“ (DESI) wurden von der Industrie untersucht, aber keine der Techniken weist die entsprechende Empfindlichkeit, oder Einfachheit auf, welche angestrebt wird und erforderlich ist.

Trotz wachsendem Interesse der Pharmamulties an der DBS-Technik existiert bis dato kein vollautomatisches System, bei welchem der Benutzer die DBS-Karten ohne weitere Interaktion dem System zur zuverlässigen und präzisen Analyse übergeben kann.

Die vorliegende Erfindung stellt sich nunmehr die Aufgabe ein automatisiertes Verfahren und eine Vorrichtung zur automatischen Erfassung von Proben, welche typischerweise aus einer Matrix z.B. Blut und anderen Substanzen besteht, für Analysen der eingangs genannten Art derart zu verbessern, dass die Vorteile bekannter Verfahren und Vorrichtungen erhalten bleiben, jedoch schnell und ohne Handarbeit eine Vielzahl von Proben verarbeitet und deren Daten erfasst werden können.

Diese Aufgabe löst das Gerät mit den Merkmalen des Patentanspruches 1. Weitere erfindungsgemäße Merkmale gehen aus den abhängigen Ansprüchen hervor und deren Vorteile sind in der nachfolgenden Beschreibung erläutert.

In der Zeichnung zeigt:

Fig 1 Systematische Darstellung eines manuellen Verfahrens

Fig 2 Systematische Darstellung eines automatisierten Verfahrens

Fig 3 Platte mit Proben.

Fig 4 Ansicht eines Greifers mit Platte.

Fig 5 Seitenansicht eines Greifers.

Fig 6 Extraktionskopf, Probe und Gegenextraktionskopf

Fig 7 Schnitt durch Extraktionskopf, Spüle und Gegenextraktionskopf

Die Figuren stellen mögliche Ausführungsbeispiele dar, welche in der nachfolgenden Beschreibung erläutert werden.

Ein Robotersystem hier kurz „Robotik“ 25 genannt und in Fig 2 schematisch dargestellt, wird zum Handling der DMS-Karten mit einem für die Automatisierung geeigneten neu entwickelten Greifer 15 ausgerüstet, welcher eine Platte 10 dem Magazin 14 entnimmt und einem Extraktionskopf 1 / Gegenextraktionskopf 2, einem Messkopf 100 zur optischen Erkennung der DMS-Karten und dem Auftragekopf 24 zuführt, was die zeitsparende, zuverlässige und reproduzierbare Analyse von mehreren Hundert DMS-Karten in kurzer Zeit ohne menschliche Interaktion erlaubt.

Ein mögliches System sieht wie folgt aus: In einem oder mehreren Racks eines Magazins 14 (Fig 2) sind Platten 10 gelagert. Eine mögliche Ausführungsform entspricht in etwa einem System, wie es früher für die Lagerung von Diapositiven für die Analoge Projektion verwendet wurde. Durch die hohen Anforderungen im Bereich der Zuverlässigkeit sind jedoch die Transportsysteme welche für die Diapositiv-Projektion verwendet wurden viel zu unzuverlässig und erlauben zudem nur den Transport zu einer Station ausserhalb der Racks. Durchgebogene Kartonrahmen erlaubten mit solchen Systemen nur ungenügende Zuverlässigkeiten. Die

Racks wurden daher so optimiert, dass die den Diapositiven entsprechenden Platten nicht herausgeschoben werden, sondern mit einem speziell entwickelten Greifer 15 an einer oder mehreren Seiten, idealer Weise an drei Seiten, gegriffen werden. Die Robotik 25 führt den Greifer 15, welcher die Platten 10 fest und flach hält und nach Bedarf zu den Stationen Messkopf 100, Extraktionskopf 1 / Gegenextraktionskopf 2 und Auftragekopf 24 zu- und weggeführt (fig 2).

Eine Ausführungsform der Racks stellt die mehrseitige Führung, z.B. links und rechts dar, wobei ausserhalb dieser Führung im äusseren Bereich des Rahmens der Platten 10 genügend Platz für das sichere Greifen der Platten 10 vorhanden ist. Die beschriebene Ausführungsform stellt nur eine mögliche Variante dar. Ein Greifen findet mit dem speziell entwickelten Greifer nicht nur punktuell statt sondern mindestens auf einer Linie oder länglichen Fläche sowie zusätzlich mittels eines speziellen Musters wie z.B. Rippen, Spitzen oder allgemein Erhöhungen, welche auf dem Greifer in einem Teilbereich angeordnet sind statt. Die Platten werden so einerseits durch die Erhöhungen in einem Teilbereich fest fixiert und andererseits

durch die Linien oder länglichen Flächen geführt. Der Greifer nimmt somit zwei klare Funktionen wahr: Die **Führung, welche** enorm wichtig ist für Platten 10 welche nicht formsteif flach sind. Solche Platten 10 werden durch die Führung des Greifers 15 in einen ebenen und flachen Zustand gebracht und gehalten. Flache und ebene Platten 10 oder flächig gehaltene Platten 10 sind in den nachfolgenden Stationen zuverlässiger und einfacher zu verarbeiten.

Die **Fixierung, welche** die Platten 10 absolut fest halten muss, ist wichtig für die zuverlässige Funktion der Robotik 25. Es ist eine absolut erforderliche Bedingung, um die Platten von der Entnahme aus dem Rack durch die Robotik 25 bis zur Rückführung in das Rack sicher im Greifer zu halten und die Platten an den einzelnen Stationen präzise positionieren zu können. Zu diesem Zweck dringen Rippen, Spitzen oder anderweitige Erhöhungen 16 des Greifers 15 (Fig 5) oberflächlich in die Platten 10 ein.

Bekanntes Greifersysteme weisen diesbezüglich Defizite in der Führung und/oder in der Fixierung auf. Deshalb wurde bei der Entwicklung des hier

vorgestellten Greifers 15, der Führung und der Fixierung der Platten 10 spezielle Aufmerksamkeit gewidmet.

Der Messkopf 100 analysiert die optischen Eigenschaften der Platte. Eine einfache Ausführungsform ist ein punktueller optischer Sensor, welcher optische Eigenschaften, Form und Position der Probe 11 erkennt. Er misst auch die Helligkeit der Probe 11 als ganzes oder in vielen Punkten, Absorption und Fluoreszenz, aufgebrachte Markierungen und Barcodes misst, an einen Mikroprozessor 101 zur weiteren Analyse und Berechnung von Parametern weitergibt. Im allgemeinen wird eine Digitalkamera verwendet, welche alle diese Funktionen wahrnehmen kann. Eine leistungsfähigere Variante stellt die Verwendung einer Digitalkamera mit integrierter Auswerteelektronik, einer sogenannten Smartcam, dar, welche es erlaubt diese Parameter direkt in der Kamera zu berechnen und an den Mikroprozessor 101 oder ein weiterverarbeitendes System weiterzureichen. Es hat sich gezeigt, dass die Position und Form der Proben auf der Platte 10, die Helligkeit und die Homogenität der Helligkeit von entscheidender Wichtigkeit sind. Einerseits gibt es

für die Proben 11 auf der Platte 10 Akzeptanzkriterien und andererseits ist es wichtig, dass Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 2 im Zentrum der Probe 11 angesetzt werden. Die Automatisierung dieser Schritte bringt gegenüber manuellen Methoden grosse Vorteile, indem die durch die Robotik 25 geführte und den Messkopf 100 kontrollierte Positionierung viel präziser und zuverlässiger erfolgen wird. Man vermeidet dadurch viele Messfehler, die im manuellen Verfahren entstehen können. Würde die Probe 11 z.B. nur teilweise oder am Rand getroffen resultierte ein zu kleiner oder verfälschter Messwert, was insbesondere in der Medikamentenentwicklung fatale Folgen haben kann. Der Messkopf liefert an die Robotik die genauen Positionsdaten der Proben 11, was eine präzise Ausrichtung des Extraktionskopfs 1 und Gegenextraktionskopfes 2 zu einer Probe 11 auf der Platte 10 erlaubt und zuverlässigere Messdaten garantiert.

Im Weiteren kann der Messkopf 100 folgende Aufgaben übernehmen: Einlesen von Barcodes zur Verifizierung der Probenidentität, Identifizierung von z.B. angekreuzten Checkboxen auf der Platte 10, welche die Spots als nicht verwendbar oder gar Ausschuss

bezeichnen. An sich können sämtliche optisch erkennbaren Markierungen wie auch Text erkannt werden. Wird als Messkopf 100 eine Smartcam eingesetzt, können die Daten direkt ausgewertet werden. Benutzt man einen einfachen Messkopf 100, werden die Rohdaten dem Mikroprozessor 100 zugeführt, welcher sie auswertet und entsprechende Signale an die Robotik 25 weiter gibt. Wird ein einfacher Messkopf 100 eingesetzt der ohne flächige optische Erkennung misst, wie z.B. einem Punkt oder Strichsensor wird die Platte 10 mit der Probe 11 relativ zum Messkopf 100 für eine Vielzahl von Messungen bewegt. Die Messungen werden dann durch den Mikroprozessor 101 rechnerisch zu einem Gesamten zusammengefügt, sodass die entsprechenden Informationen aus dem errechneten Gesamten abgeleitet werden können. Es ist möglich den Messkopf 100 zu den Platten 10 mit den Proben 11 zu bringen oder durch die Robotik 25 die Platten 10 mit den Proben 11 zum Messkopf zu bringen. Je nach Möglichkeiten der Robotik 25 kann auf eine Bewegung des Messkopfes 100 verzichtet werden.

Nachdem der Mikroprozessor 100 vom Messkopf 100 den Input für die genaue gewünschte Position der Probe 10 relativ zum Extraktionskopf 1 und

Gegenextraktionskopf 2 erhalten hat, wird mittels der Robotik 25 und/oder der Extraktionskopfbewegung die Platte 10 mit der Probe 11, der Extraktionskopf 1 und der Gegenextraktionskopf 2 optimal aufeinander ausgerichtet. Im zusammengefügt Zustand isolieren Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 2 nun einen Bereich der Probe 11.

Versuche haben gezeigt, dass es von Vorteil sein kann, wenn Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 2 auf eine kontrollierte Distanz zusammengeführt werden und Platte 10 und Probe 11 nicht mittels Druck vollständig bis zum entsprechenden Gegendruck einklemmen (Fig 5). Dies soll und wird das Ausstanzen der Probe 11 auf der Platte 10 verhindern. Die kontrollierte Zusammenführung von Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 2 kann z.B. mit einem Anschlag oder mit der präzisen, durch den Mikroprozessor 101 gesteuerten und kontrollierten, Robotik 25 erfolgen.

Wenn die Probe 11 nun zwischen Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 2 positioniert ist (Fig 6), wird sie durch Flüssigkeit, welche über eine Zuleitung 8 zufließt und über eine Ableitung 9

abfließt möglichst homogen durchströmt. Optimalerweise wird die Probe 11 zusätzlich auf einem möglichst langen Pfad durchströmt. Eine möglichst weit voneinander entfernte Anordnung von Zuleitung 8 und Ableitung 9 oder eine Zuleitung 8 auf dem Extraktionskopf 1 und eine Ableitung 9 auf dem Gegenextraktionskopf 2 (durch die Probe 11) sind gute Lösungen, wobei die Kombination der beiden Massnahmen die bevorzugte Lösung darstellt.

Für die Analyse wird ein sog. DMS-MS (Dried Matrix Spot Massenspektrometer) System verwendet. D.h. das Extrat der Dried Matrix Sports (DMS) wird an ein Massenspektrometer (MS) weitergeleitet. Die Vorteile des vollautomatischen DMS-MS Systems sind folgende:

- Keine zeitaufwendigen manuellen Prozesse.
- Reduktion Falschmessungen aufgrund von Fehlern des Personals.
- Online-Extraktionen mit kleinen Volumen (konzentrierte Proben).
- Verbesserte Detektionsempfindlichkeit (Messung geringerer Konzentrationen möglich).
- System mit Probenidentifikation (Barcodeleser).

- Schnelle und einfache Extraktion direkt in das Massenspektrometer.
- Kleinere Mengen an teurem internem Standard notwendig.

Das der Erfindung zugrunde liegende vollautomatische Verfahren mit dem DMS-MS Extraktionssystem wird die Analyse von DMS-Proben entscheidend vereinfachen und weist gegenüber der manuellen wie auch der teilweise automatisierten Technik (ausstanzen) entscheidende Vorteile auf.

Das beschriebene Extraktionssystem ist die erste ökonomische Alternative zur konventionellen Blutanalyse und wird die Verbreitung dieser zeit-, kosten- und tiersparenden Technik in der Pharmakologie und Toxikologie unterstützen.

Einklemm- & Dichtprozess (Fig 6):

Die sich auf der Platte 10 befindliche Probe 11 wird zwischen Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 1 eingeklemmt. Durch die Komprimierung des Bereichs der Probe 11 auf und in der Platte 10 im Bereich wo die Dichtkante 4 zu liegen kommt, entsteht für Flüssigkeiten und bevorzugterweise auch für Gase eine dichte in sich

geschlossene Dichtlinie, womit die Probe 11 vom Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 2 bis auf Zuleitung 8 und Ableitung 9 räumlich dicht umschlossen wird. Die erwähnte Komprimierung der Dicke im Bereich der Dichtlinie kann je nach den Eigenschaften wie Härte, Dichte, Elastizität und Duktilität der Probe 11 und der Platte 10 nur in geringem Masse von 100% auf z.B. 50%, zu hohem Masse von z.B. 100% auf 10% der ursprünglichen Dicke oder gar bis auf praktisch 0% womit nur noch geringste Mengen des Materials von Probe 11 und Platte 10 sich im Bereich der Dichtlinie zwischen Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 2 befinden. Es hat sich gezeigt, dass die Komprimierung je nach benötigter Druckfestigkeit experimentell optimiert werden muss.

Platten & Probe

Vielfach bestehen die Platten 10 z.B. aus Filterpapieren, auf denen sich die Proben 11 z.B. in einem ungefähren Durchmesser von ca. 7mm, das Papier durchdringenden Fleck bilden (Z.B. DBS: dried blood spots, DPS: dried plasma spots, DUS: dried urine spots oder allgemein DMS: Dried Matrix Spots für eingetrocknete Flecken irgendwelcher Flüssigkeiten). Eingetrocknete Proben 10 von

Bluttropfen, Blutplasmotropfen oder Urintropfen, kann die erwähnte Dichtlinie in diesem Fall z.B. mit einem 4mm Kreis umfassen, welcher idealerweise im Zentrum des Flecks gewählt wird. Dies ist jedoch nicht in jedem Fall von Bedeutung, gibt doch die Analyse im Messkopf darüber Auskunft, wo sich die beste Probe 11 befindet und steuert die Anlage über die Robotik 25 genau dort hin. Es sind jedoch praktisch alle Formen von Flecken verwendbar. Auch die Grösse der Flecken und der von der Dichtlinie umschlossenen Fläche kann je nach Anwendung variieren, Beispielhaft <1mm Ausdehnung bis >10mm für Dicken der Platte 10 von z.B. 0.5mm. Das Verhältnis der vom Durchmesser von der Dichtlinie umschlossenen Fläche zur Dicke der Platte 10 ist jedoch grösser als 0.5, bevorzugterweise grösser als 1, wobei zu grösseren Verhältnissen bis über 100 vom Prozess her keine Grenzen gesetzt sind. Versuche haben gezeigt, dass im Bereich 2 bis 10, was z.B. bei einer Dicke von 0.5mm und im Falle einer kreisförmigen Dichtlinie einem Durchmesser von 1 bis 5 mm sehr gute und reproduzierbare Resultate erreicht werden.

Blutflecken sind nur eine von vielen Möglichkeiten, wie eine solche Probe aussehen könnte. Als Platte

10 können verschiedenste Materialien verwendet werden, idealerweise sind diese Materialien jedoch komprimierbar und die Probe 11 kann zumindest teilweise aufgesaugt werden. Als Probe 11 werden in der Bioanalytik z.B. Blut, Blutplasma, Urin oder sämtliche anderen erdenklichen biologischen Flüssigkeiten auf Platten 10 aufgebracht und eintrocknet. Das Eintrocknen wird im genannten Fall als Konservierung verwendet, welche es erlaubt diese biologischen Proben ohne Kühlung aufzubewahren, zu transportieren und erst nach Tagen, Wochen oder gar Monaten zu analysieren, ohne dass dies die Analytik beeinträchtigt, wobei die maximale Lagerungsdauer natürlich zuletzt von der verwendeten Probe abhängt.

Extraktionsprozess

Die zwischen Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 2 bis auf Zuleitung 8 und Ableitung 9 dicht im Hohlraum 3 umfasste Probe 11 auf der Platte 10 (Fig 6) wird nun mittels einer Flüssigkeit, welche durch die Zuleitung 8 eingeleitet zumindest teilweise durchströmt. Dabei werden Teile der Probe 11 und eventuell auch Teile der Platte 10 herauslöst. Danach verlässt die Flüssigkeit mit diesen herausgelösten Teilen den

Hohlraum 3 durch die Ableitung 9. Anstelle der Flüssigkeit kann ebenso auch ein Gas, gesättigter Dampf, eine Kombinationen der beiden oder ein beliebiges nicht festes Medium angewendet werden, welches dazu geeignet ist, diese Teile der Probe 11 welche von Interesse sind zu extrahieren. Es kann auch von Vorteil sein, ein Medium zu verwenden, welches sich über die Zeit ändert, was im Falle von Lösungsmitteln eine sich ändernden Mischung, einem sogenannten Gradienten entspricht. Z.B. wenn die Probe schlecht löslich ist, können die Extraktionsbedingungen angepasst werden: Sehr langsam oder via viele kurze schnelle von Wartezeiten gefolgte Fliesbewegungen oder mit erhöhter Temperatur, welche es erlauben mehr der gewünschten Substanzen aus der Probe 11 herauszulösen, was im analytischen Sinne die Effizienz der Extraktion und schlussendlich die Recovery erhöht.

Weiterreichung des Extrakts

Das Medium, welches Teile der Probe 11 und allenfalls der Platte 10 enthält wird nun durch die Ableitung 9 weitergereicht, es wird Extrakt genannt. Dieses Extrakt besitzt idealerweise die Teile der Probe 11, welche analytisch von Interesse

sind (gewünschte Substanzen), wobei das Extrakt immer eine oder mehrere Substanzen beinhalten kann. Andere Teile der Probe 11 oder der Platte 10 welche an sich unnötig und störend sind (Matrix) sollten auf das Minimum reduziert werden. Dieses Extrakt wird nun nach und nach durch neues Medium, welches durch die Zuleitung 8 in den Hohlraum eingebracht wird und danach diesen durch die Ableitung 9 wieder verlässt weitergeschoben. Das Extrakt kann einerseits durch eine unterschiedliche Zusammensetzung des Mediums, welches als erstes durch die Zuleitung 8 die Probe 11 durchströmt zum Medium welches diese im weiteren Verlauf durchströmt wie auch durch eine variierende Konzentration der gewünschten Substanzen eine inhomogene Zusammensetzung aufweisen. Anfangs stellt sich meist eine steigende Konzentration ein (Vorlauf), dann folgt die gewünschte Konzentration, welche in eine sinkende Konzentration (Nachlauf) übergeht.

Eine Möglichkeit ist nun, dass das Extrakt jeder Probe in ein oder mehrere Flaschen, sogenannte Vials abgefüllt wird. Typischerweise wird pro Probe ein Vial mit dem entsprechenden Extrakt gefüllt und die Vials in Racks von z.B. 96 Vials zur

Weiterverarbeitung weiter an gängige Autosampler zur Analyse mit anderen nachfolgenden Methoden wie z.B. HPLC, HPLC-MS, HPLC-MS-MS direkt MS oder MS-MS, GC, NMR oder anderen geeigneten analytischen Methoden übergeben.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Extrakt via ein Ventil in einen Behälter oder Speicher was z.B. eine Kapillare sein kann, weitertransportiert wird und nach Umschaltung dieses Ventils aus diesem Speicher wieder herausbefördert und an die nachfolgende Station direkt weitergereicht wird, z.B. durch eine Kapillare welche direkt mit dem nachfolgenden analytischen Gerät verbunden ist. Es stellt sich nun je nach Konzentration der gewünschten Substanzen das Problem, dass die Konzentration für die nachfolgende Methode zu niedrig oder zu hoch sein kann. Im ersten Fall müssen die Extraktionsbedingungen optimiert werden, im zweiten Fall ist eine Verdünnung nötig.

Verdünnung

Weist das Extrakt für die nachfolgende Methode eine zu hohe Konzentration der gewünschten Substanzen auf muss es verdünnt werden, da jedoch im Extrakt auch Matrix vorhanden ist, stellt eine Verdünnung

mit reinem Medium nur eine unzureichende Lösung des Problems dar. Idealerweise müsste z.B. ein 1:10 verdünntes Extrakt bei gleicher Gesamtmenge einen Zehntel der gewünschten Substanzen und dieselbe Menge an Matrix und allfälliger weiterer Substanzen wie eine unverdünnte Probe enthalten. Dies ist deswegen wichtig, da die Matrix das Messverhalten der nachfolgenden Methoden häufig wesentlich beeinflusst. In diesem Fall müsste daher nur ein Zehntel des Extrakts der zu analysierenden Probe 11 mit neun Zehnteln einer Probe, welche alle Substanzen der Matrix, aber nichts der gesuchten Substanz enthält, eine sogenannte Blindprobe, gemischt werden.

Dies kann am Beispiel der **Kaffeeextraktion** von koffeinhaltigem Kaffee (CAF) und solchem ohne Koffein (DECAF) veranschaulicht werden. Allgemein wird der Kaffee ähnlich wie unsere Proben durch eine durchströmende Flüssigkeit extrahiert und am Anfang der Extraktion kommt sehr starker Kaffee und nach und nach immer schwächerer Kaffee, was beim Kaffee bei normalen Mengen einem mittel konzentrierten normalen Kaffee (NORM) in einer Kaffeetasche entspricht und bei geringen Mengen einem sehr konzentrierten Ristretto (RIST) in einer

z.B. zehnmal kleineren Ristrettotasse. Wenn wir nun den Koffeingehalt eines NORM CAF in einer Kaffeetasse bestimmen wollen aber unsere Methode der Analyse so empfindlich ist, dass sie bei dieser Konzentration von Koffein bereits in Sättigung geht, können wir nicht einfach ein RIST CAF mit Wasser auf Kaffeetassenmenge verdünnen, da diese Verdünnung eine ganz andere Zusammensetzung als der NORM CAF hätte und die Messung dabei auch sehr unterschiedlich herauskäme. An sich müssten wir eine Tasse NORM CAF mit neun Tassen NORM DECAF mischen und daraus eine Tasse entnehmen und darin die Koffeinkonzentration messen. Wir würden also total zehn Tassen Kaffee benötigen, was für die Messung eine zu grosse Menge wäre. Wenn wir aber aus einer Tasse NORM CAF (Substanz, also Koffein plus Matrix) einen Zehntel und aus einer Tasse NORM DECAF (nur Matrix) neun Zehntel entnehmen und in einer dritten Tasse zusammenmischen, funktioniert dies. Natürlich unter der Voraussetzung, dass der Kaffee in den Tassen homogen vorhanden ist.

Die homogene Mischung ist bei unserer beschriebenen Extraktion der Probe 11 das Problem, da üblicherweise das Extrakt in Leitungen (sehr dünnen Kapillaren) weitergeleitet wird und es sich nicht

automatisch homogen mischt, sodass wir auch keinen repräsentativen Zehntel des Extrakts der Probe und neun Zehntel des Extrakts der Blindprobe auf einfache Weise entnehmen können. Wie beim Kaffee muss daher vor der Entnahme des Zehntels eine Mischung der gesamten Extraktion der Probe 11 stattfinden, idealerweise auch vor der Entnahme der neun Zehntel der Blindprobe. Wird eine Verdünnung auf ein Hundertstel angestrebt, ist die Mischung der Blindprobe nicht mehr von so grosser Wichtigkeit, da sowieso bis auf ein Prozent das gesamte Extrakt der Blindprobe verwendet wird, es kann daher vernachlässigt werden, allerdings kommt dann der homogenen Mischung des Extrakts der Probe 11 eine sehr grosse Bedeutung zu, da von dieser nur ein Prozent verwendet wird.

Wir füllen daher eine erste Extraktion einer Blindprobe in einen ersten Speicher, mischen den gesamten Inhalt des ersten Speichers homogen, z.B. mit einem im Speicher eingebauten Magnetrührer, füllen nun eine zweite Extraktion einer Probe 11 in einen zweiten Speicher, mischen den gesamten Inhalt des zweiten Speichers homogen und entnehmen nun aus dem ersten Speicher neun Zehntel und aus dem zweiten Speicher einen Zehntel, führen diesen

Zehntel und die neun Zehntel zusammen und analysieren das Gesamte. Das Gesamte kann nochmals gemischt werden, sofern die nachfolgende Analyse dies nicht automatisch ausgleicht und unnötig macht.

Es ist genauso möglich eine erste Extraktion in einen ersten Speicher zu füllen und zu mischen, neun Zehntel daraus in einen zweiten Speicher zu transferieren und danach eine zweite Extraktion in diesen ersten Speicher zu füllen und zu mischen und einen Zehntel zu entnehmen und in einen dritten Speicher zu transferieren und dann den Inhalt des zweiten und dritten Speichers gemeinsam an die nachfolgende Analysemethode weiterzuleiten, wobei der zweite und der dritte Speicher auch in einem Speicher zusammengefasst werden können. Werden der zweite und dritte Speicher nicht zusammengefasst kann das Mischverhältnis auch erst durch entsprechende Entnahmemengen aus dem zweiten und dritten Speichern erzeugt werden. Das Gesamte kann nochmals gemischt werden, sofern die nachfolgende Analyse dies nicht automatisch ausgleicht. Mit dieser Methode kann jedes beliebige Verdünnungsverhältnis unter Beibehaltung der gewünschten Gesamtmenge erreicht werden.

Zurück zum Beispiel der **Kaffeextraktion** von koffeinhaltigem Kaffee (CAF) und solchem ohne Koffein (DECAF): Anstelle von ganzen Tassen Kaffee der Typen DECAF und CAF, welche nach der Extraktion so zusammengefügt werden, dass eine entsprechend verdünnte Koffeinkonzentration in der resultierenden Tasse entsteht, gibt es eine weitere sehr interessante Variante dieses Resultat direkt zu erreichen. Nehmen wir der Einfachheit halber an, dass eine Kaffeextraktion Hundert Sekunden dauert. Bei der Extraktion des CAF gehen wir wie folgt vor: Pro zehn Sekunden halten wir eine erste leere Tasse immer nur eine Sekunde unter die Kaffeemaschine und fangen so in zehn mal einer Sekunde nur einen Zehntel des Kaffees vom Typ CAF auf, der Rest geht in die Auffangschale und verloren, danach kommt die Extraktion des DECAF wo wir eine zweite Tasse pro zehn Sekunden neun Sekunden unter die Kaffeemaschine halten und fangen so in zehn mal neun Sekunden neun Zehntel des Kaffees vom Typ DECAF auf; nun werden die Inhalte der ersten und zweiten Tasse zusammengebracht und können gemessen werden. Wenn als zweite Tasse abermals die erste Tasse verwendet wird, erübrigt sich das zusammenbringen. Falls nötig kann die daraus

resultierende Kaffeetasse mit der zehnmal geringeren Konzentration an Koffein vor der Messung noch umgerührt, also gemischt werden. Durch entsprechende zeitliche Intervalle kann jeder beliebige Koffeingehalt des Kaffees der resultierenden Tasse erreicht werden.

Die anhand des Kaffees beschriebene Möglichkeit um eine beliebige gewünschte Verdünnung einer Probe 11 zu erreichen wird **Choppen** respektive Zerstückeln des Extrakts genannt. Wird z.B. 100µl über eine Zeit von 100 Sekunden extrahiert, kann wie folgt vorgegangen werden: Von der Extraktion der Blindprobe werden die µl 1-4, 6-14, 16-24, 26-34, 36-44, 46-54, 56-64, 66-74, 76-84, 86-94, 96-100 werden in den ersten Speicher gefüllt und die µl 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 verworfen sodass der erste Speicher mit 90µl gefüllt ist. Von der Extraktion der Probe 11 werden während der Extraktion die folgenden µl in den zweiten Speicher gefüllt: µl 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 und die µl 1-4, 6-14, 16-24, 26-34, 36-44, 46-54, 56-64, 66-74, 76-84, 86-94, 96-100 werden verworfen. Auf diese Weise sind im ersten Speicher 90 µl der Extraktion der Blindprobe und im zweiten Speicher 10µl der Extraktion der Probe. Durch das

Choppen respektive Zerstückeln der 100 μ l enthält auch der zweite Speicher in seinen 10 μ l ein repräsentatives Extraktionsprofil der ursprünglichen 100 μ l Extraktion. Es ist von Vorteil den ersten wie auch den zweiten Speicher nicht wesentlich grösser zu machen als dies für die zu speichernden Volumen nötig ist.

Wird das Choppen oder Zerstückeln mit noch mehr Schritten ausgeführt, entspricht das kleinere Volumen der Probe 11 noch genauer einem Teil aus dem gesamten Extraktionsprofil von 100 μ l. Durch eine Stückelung mit einem anderen Verhältnis als 1 μ l zu 9 μ l kann eine Probe 11 mit einer Blindprobe in jedem beliebigen Volumenverhältnis verdünnt werden, wobei das Gesamtvolumen trotzdem konstant gehalten werden kann. Das Zusammenführen des ersten und zweiten Speichers bringt Probe 11 und Blindprobe wieder zusammen und erlaubt die nachfolgende Analyse der verdünnten Probe 11. Es wäre ebenso möglich, das Extrakt der Probe 11 anstatt in den zweiten Speicher direkt in den ersten Speicher hinter das Extrakt der Blindprobe zu füllen.

Das beschriebene Choppen respektive Zerstückeln erlaubt somit eine beliebige Verdünnung der Probe

11 mit Blindprobe bei gleichbleibender Menge an Gesamtextrakt. In der Analytik kommt es immer wieder vor, dass zu hohe Konzentrationen von Proben 11 vorliegen, welche nicht gemessen werden können, da die finale Analytik bei so grossen Messsignalen sättigt und falsche Resultate liefert. Mit den beschriebenen Möglichkeiten der Verdünnung kann dieses Problem optimal gelöst werden, was von sehr grosser Bedeutung ist.

Im Falle von DBS Proben in der Pharmakokinetik besteht die Probe 11 aus Blut eines Probanden, welcher z.B. ein Medikament eingenommen hat, wobei die Medikamentenspuren im Blut die gewünschten Substanzen sind und einer Blindprobe die bis auf den Fakt, dass das Blut von einem Probanden stammt der kein Medikament eingenommen hat und somit keine Medikamentenspuren enthält, aber ansonsten zur Probe 11 identisch ist.

Eine allfällige übrigbleibende Inhomogenität, welche durch die zeitlich nacheinander getätigte Ausspülung mehrerer Speicher entsteht, kann durch einen weiteren Mischer nach dem Zusammenführen der Inhalte der Speicher auf einfache Weise kompensiert werden. Typischerweise ist hier nur ein passiver

Mischer, nötig, welcher primär durch eine Verwirbelung den Flüssigkeitsstrom mischt.

Im Falle von Flüssigkeiten, wie dies z.B. in der HPLC, HPLC-MS, HPLC-MS-MS, MS oder MS-MS der Fall ist, wird durch eine erste Hochdruckpumpe, welche die Flüssigkeit in die Zuleitung 8 des Extraktionskopfs 1 befördert und diese dann als Extrakt bis in die Speicher . Aus dem Speicher wird das Extrakt in den Flüssigkeitskreislauf der nachfolgenden Methoden eingeschleuft und durch dessen Förderpumpen zum Analysegerät weiter befördert. Im Falle von anderen Medien gestaltet sich die Sache ähnlich nur werden anstelle von Hochdruckpumpen Fördersysteme für die entsprechenden Medien wie Gase und Dämpfe verwendet.

Das hier vorgestellte, vollautomatische DMS-MS Extraktionssystem vereinfacht die Analyse von DMS-Proben entscheidend und weist gegenüber der manuellen wie auch der teilweise automatisierten Technik (ausstanzen) entscheidende Vorteile auf.

Das beschriebene Extraktionssystem ist die erste ökonomische Alternative zur konventionellen Blutanalyse und unterstützt die Verbreitung dieser

zeit-, kosten- und tiersparenden Technik in der Pharmakologie und Toxikologie.

Die Anlage mit der dieses Verfahren durchgeführt wird besteht aus den Teilen, welche im Oberbegriff des Anspruches 12 aufgeführt sind. Im Magazin 14 ist eine Vielzahl von Platten 10 eingeordnet. Typischerweise bestehen Platten aus einem stabileren Rahmen, welcher ein flexibles absorbierendes Material stützt. Eine gängige Ausführungsform ist ein Kartonrahmen mit einem fließblattähnlichen flexiblen, absorbierenden und sehr saugfähigen Material. Eine stabilere Ausführung des Rahmens kann aus entsprechend haltbarerem und stärker belastbarem Material wie z.B. Kunststoff bestehen.

Der Messkopf 100 besteht aus einem optischen Sensor, wie z.B. einen Punktsensor. Eine hochstehendere Ausführung ist ein Mehrpunktsensor oder eine digitale Kamera (Smartcam), welche eine interne Auswertung mittels eines Mikroprozessors 101 je nach Datenmengen z.B. vom Typ FPGA beinhalten kann. Zusätzlich kann der Messkopf 100 mit einer Beleuchtung ausgerüstet werden, um unabhängig vom Umgebungslicht die optischen

Eigenschaften von Objekten, welche dem Messkopf 100 zugeführt werden, messen zu können.

Die Robitik 25 hat die Aufgabe, die Platten 10 und die Proben 11 gemäss Anspruch 1, den Verfahrensschritten a) bis j) zu bewegen und richtig zu positionieren.

Die Spüle 20 (Fig 7) ist ein zusätzliches, den Formen des Extraktionskopfes 1 und des Gegenextraktionskopfes 2 angepasster Teil, welcher zwischen Extraktionskopf 1 und Gegenextraktionskopf 2 gebracht wird und mit diesen zusammen einen geschlossenen oder zumindest partiell geschlossenen Hohlraum bildet. Eine Spülflüssigkeit kann über die Zuleitung 8, Ableitung 9 oder einen Einlass 21 der Spüle 20 in den Hohlraum gebracht werden. Um den Hohlraum nach dem Reinigungsprozess ganz zu leeren, wird über eine Gasleitung 23 der Hohlraum ausgeblasen, ausgesaugt oder getrocknet. Um den Extraktionskopf 1 und den Gegenextraktionskopf 2 sauber zu spülen, werden die Medien der Spülflüssigkeit kontrolliert in den Hohlraum gebracht, was mit hohem Druck geschehen kann, verbleiben dort eine gewünschte Zeit und werden sodann über Ableitung 9 oder Auslass 22 mittels Gas ausgeblasen oder ausgesaugt. Das Leeren des

Hohlraums erfolgt über Ableitung 9 oder einen in der Spüle 20 vorgesehenen Auslass 22. Unterstützend werden Spülmittelreste über Auslass 22 abgesaugt und der Hohlraum zwischen 1,2 und 20 z.B. von einströmendem Gas getrocknet. Es kann von Vorteil sein, wenn die Spüle so konstruiert ist, dass sie den Extraktionskopf 1 und den Gegenextraktionskopf 2, welche in einigem Abstand voneinander angeordnet sind, nur ausserhalb des Bereichs in dem sie mit der Platte 10 und Probe 11 in Kontakt kommen berührt. In dieser Anordnung dichtet die Spüle 20 den für den Waschprozess erweiterten Hohlraum 3 gegen den Extraktionskopf 1 aussen und die Fläche des Gegenextraktionskopfes 2 (Fig 6) ab. Diese Anordnung ermöglicht ebenfalls die Reinigung im Bereich der Dichtkante 4. Die Spüle 20 steht als Einrichtungsteil bereit und kann bei bedarf durch die Robotik 25 dem Extraktionskopf 1 und dem Gegenextraktionskopf 2 zugeführt werden.

Der Mikroprozessor 101 ist, die Einheit, welche die Steuerung der Gesamtanlage vornimmt. Typischerweise eine SPS oder sonstige Elektronikkomponente mit einer Recheneinheit und einer Firmware oder Software. Es bestehen Verbindungen zu weiteren Komponenten des Systems.

Der Auftragekopf 24 ist, ein System, welches einen Internen Standard in flüssiger Form auf die Probe 11 aufbringt. Ein Interner Standard ist eine zur Substanz sich sehr ähnliche verhaltende Referenzsubstanz, welche in der MS Analyse klar von der Substanz unterschieden werden kann. Mit der Messung des Internen Standards kann die Absolute Messintensität der MS-Analyse geeicht werden, wenn die Menge des Internen Standards genau bekannt ist. Dies kann in flüssiger Form z.B. mittels Sprühen, Vernebeln, Mikrotropfen, Prozessen aus der Drucktechnologie wie Inkjet, Pipejet oder elektrischen Feldern erfolgen. Der bevorzugte Prozess ist die Aufsprühung mit Luft, da die genauen aufgebracht Mengen sehr präzise vorgenommen werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur automatischen Erfassung

biologischer Substanzen für Analysen auf Platten (10) aufgebracht Proben (11),

dadurch gekennzeichnet, dass

- a) in einem Magazin (14) in dem eine grosse Anzahl Platten (10) gelagert sind,
- b) ein Greifer (15) jeweils eine Platte (10) im Magazin (14) fasst und zur Erkennung einem Messkopf (100) zuführt,
- c) der Messkopf (100) mittels Sensoren die Position und die Form der Proben (11) erkennt,
- d) Ein Mikroprozessor (101) deren Position und Form analysiert,
- e) Die relative Ausrichtung eines Extraktionskopfes (1) und eines Gegenextraktionskopfes (2) zur Platte (10) durch den Mikroprozessor (101) eingestellt wird,
- f) Der Extraktionskopf (1) und der Gegenextraktionskopf (2) die gewünschten Substanzen und möglichst wenig störende Matrix aus der Probe (11) extrahiert,

- g) der Extraktionskopf (1) und der Gegenextraktionskopf (2) von Rückständen gereinigt wird,
 - h) der Messkopf (100) mit der nächsten Probe (11) zusammen geführt wird,
 - i) der Ablauf des Prozesses sich von c) bis h) mit der neuen Probe wiederholt bis alle gewünschten Proben (11) auf einer Platte (10) verarbeitet sind,
 - j) der Greifer (15) die Platte (10) ins Magazin (14) zurück führt,
 - k) der Vorgang nach b) bis j) wiederholt wird, bis alle gewünschten Platten (10) eines Magazins (14) geprüft sind,
 - l) nach jedem Extraktionsprozess gemäss f die gewünschten Substanzen und Matrix zur Weiterverarbeitung weitergereicht werden.
2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Messkopf (100) einen auf der Platte (10) vorhandenen Erkennungscode erfasst und die Probenidentität sicher stellt,
3. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Messkopf (100) nach dem

Extraktionsprozess gemäss f die optischen Eigenschaften der Probe (10) auf korrekten Verfahrensablauf überprüft.

4. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aus einer Probe (11) extrahierten gewünschten Substanzen und Matrix zur Weiterverarbeitung in einem Behälter zwischengelagert werden und danach mit gängigen Autosamplern weiterverarbeitet werden können.
5. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aus der Probe (11) extrahierten gewünschten Substanzen und Matrix zur Weiterverarbeitung in einem Speicher zwischengelagert werden und danach an das weiterverarbeitende System weitergereicht werden.
6. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aus der Probe (11) extrahierten gewünschten Substanzen und Matrix zur Weiterverarbeitung in einer „Trapping Column“ temporär die gewünschten Substanzen absorbiert werden und danach durch ein anderes Lösungsmittel wieder von dieser „Trapping

Column" losgelöst werden und an das weiterverarbeitende System weitergereicht werden.

7. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aus der Probe (11) extrahierten gewünschten Substanzen und Matrix zur Weiterverarbeitung in einem ersten Speicher zwischengelagert werden, eine weitere Extraktion gemäss f aus einer Blindprobe in mindestens einem weiteren Speicher zwischengelagert werden und danach die Inhalte der verschiedenen Speicher in einem solchen Verhältnis zusammengebracht werden, dass die gewünschten Substanzen in verdünnter Form und die Matrix in unverdünnter Form weitergereicht werden können.
8. Verfahren nach Anspruch 7 dadurch gekennzeichnet, dass die Extraktionen aus der Probe (11) und einer Blindprobe vor dem Zusammenbringen so aufbereitet ist, dass auch bei der Verwendung von nur einem Bruchteil einer der Extraktion dieser Bruchteil eine identische Zusammensetzung der gesamten Extraktion aus welcher er entstanden ist, darstellt.

9. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass über ein Auftragekopf (24) nach der Erkennung der Proben (10) gemäss c ein Interner Standard als Referenz auf die Probe (10) aufgebracht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9 dadurch gekennzeichnet, dass der Interne Standard aufgesprüht wird und die Probe (10) mindestens teilweise durchdringt.
11. Verfahren nach Anspruch 7, 8, 9 oder 10 dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Speicher unterschiedlicher Grösse verwendet werden.
12. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass die** Anlage ein Magazin (14) für die Platten (10), einen Greifer (15), einen Messkopf (100) mit einem Extraktionskopf (1) und einem Gegenextraktionskopf (2), einen Mikroprozessor (101), sowie eine Robotik (25) aufweist.
13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Extraktionskopf (1) mit dem Gegenextraktionskopf (2) und der dazwischen liegenden Platte (10) mit der Probe (11) einen mit Dichtkante (4) umfangenden

Hohlraum (3) bilden, wobei dieser Hohlraum (3) mit einer Zuleitung(8) sowie einer Ableitung (9) versehen ist und der Hohlraum (3) in geschlossenem Zustand von einer Dichtlinie umfassen ist, welche durch die Dichtkante (4) des Extraktionskopfs (1), die eingeklemmte Probe (11) und die flach auf dem Gegenextraktionskopf (2) liegende Platte (10), so dass der Extraktionskopf (1) mit Probe (11), Platte (10) und Gegenextraktionskopf (2) im zusammengeführten Zustand einen vollständig abgeschlossenen und gegen aussen isolierten Hohlraum (3) bilden.

14. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Platten (10) im Magazin (14) eingeordnet sind.
15. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Platten (10) aus flexiblem absorbierendem Material bestehen.
16. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Greifer (15) die Platten (10) mindestens zu einem wesentlichen Teil an ihren Längsseiten mit geeigneten Mitteln führend und fixierend greift und hält.

17. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Greifer (15) die Platten (10) mindestens zu einem wesentlichen Teil an ihren Breitseiten mit geeigneten Mitteln führend und fixierend greift und hält.
18. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Greifer (15) die Platten (10) zu einem wesentlichen Teil an ihren Längs- und Breitseiten mit geeigneten Mitteln führend und fixierend greift und hält.
19. Vorrichtung nach Anspruch 16, 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Greifer (15) Strukturen aufweist, welche in das Material der Platten (10) an deren Oberfläche eindringen und die Platten (10) flach halten.
20. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Spüle (20) mindestens eine der folgenden Vorrichtungen aufweist: einen Auslass (22), einen Einlass (21), und/oder eine Zuführung (23).
21. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das der Messkopf (100) mindestens einen der folgenden optischen Sensoren aufweist: einen

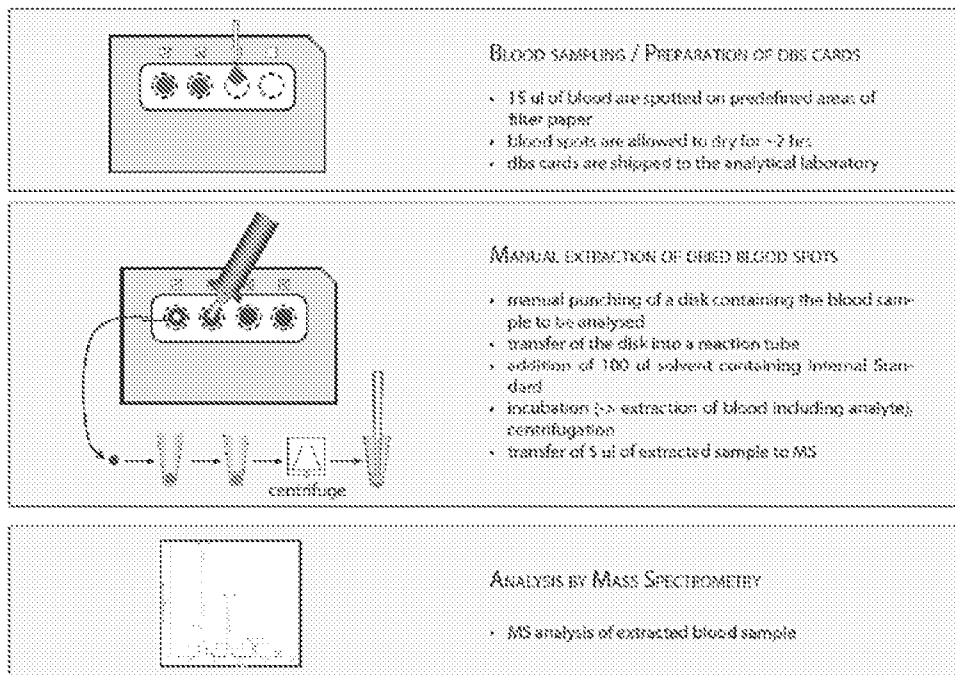
Spotpositions-Sensor, einen Helligkeitssensor, einen Kontursensor, einen Barcodeerkennungssensor.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, der Messkopf (100) einen alle Funktionen wahrnehmenden Sensor aufweist.
23. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Distanz zwischen dem Extraktionskopf (1) und dem Gegenextraktionskopf (2) im geschlossenen Zustand im Bereich der Dichtlinie der Dichtkante (4) eine präzise Distanz grösser als Null Millimeter und kleiner als die halbe Plattendicke aufweist.

Zeichnung

1 / 06

Fig 1



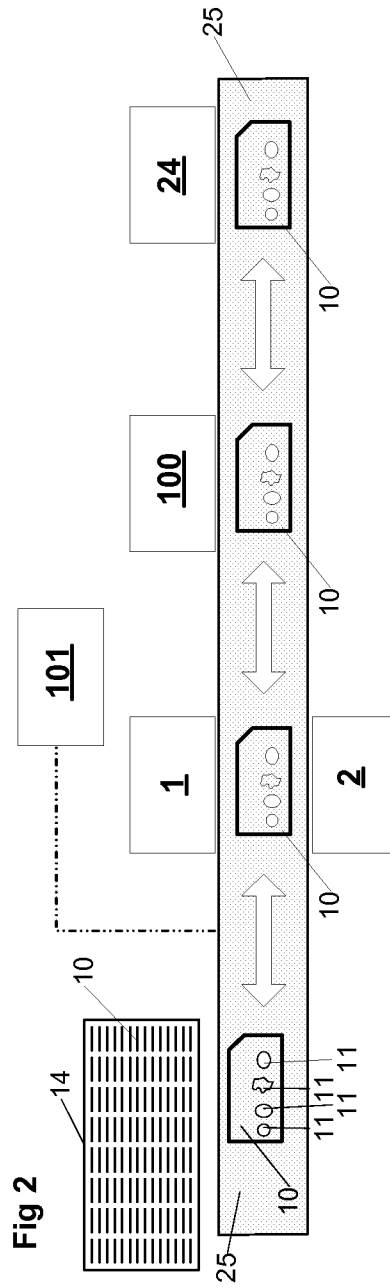


Fig 3

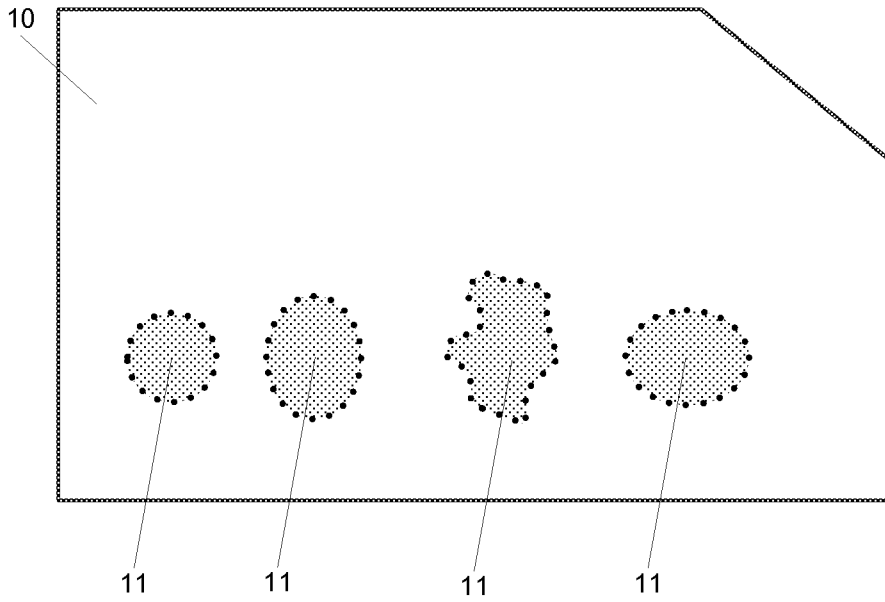


Fig 4

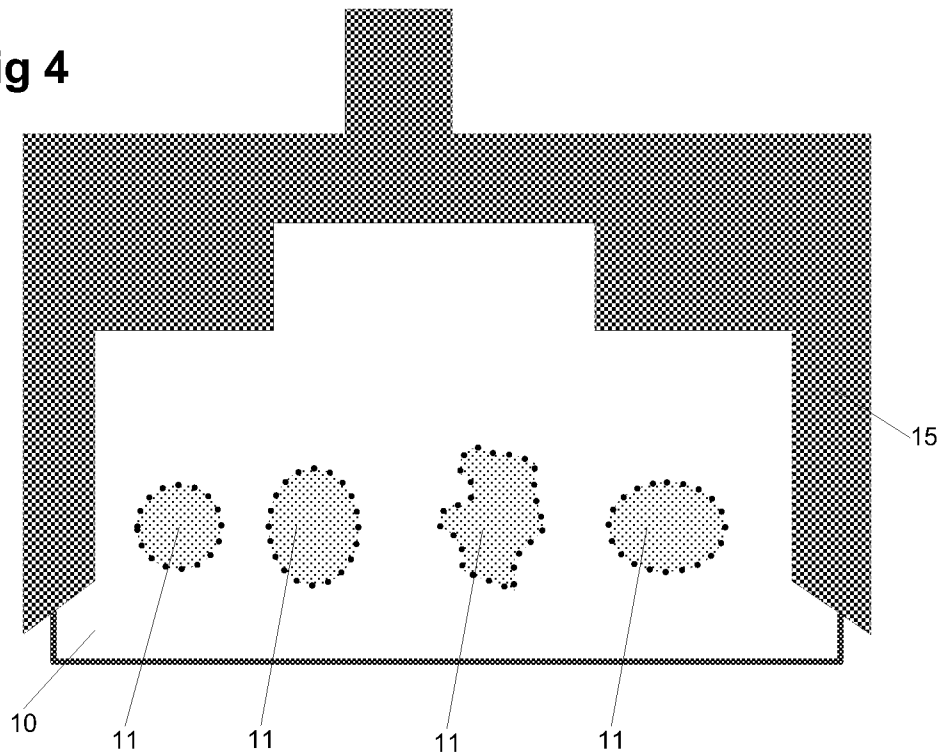
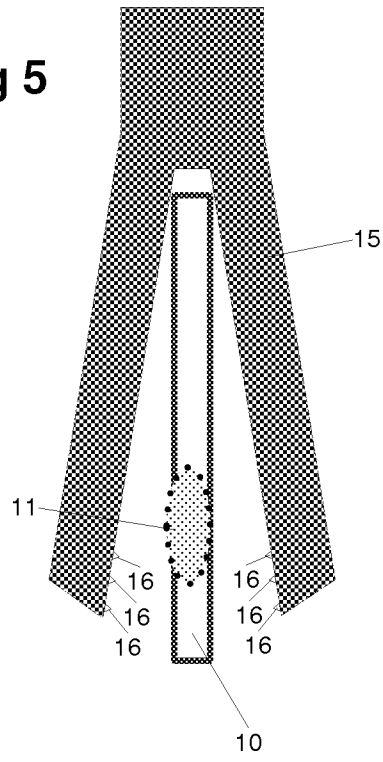
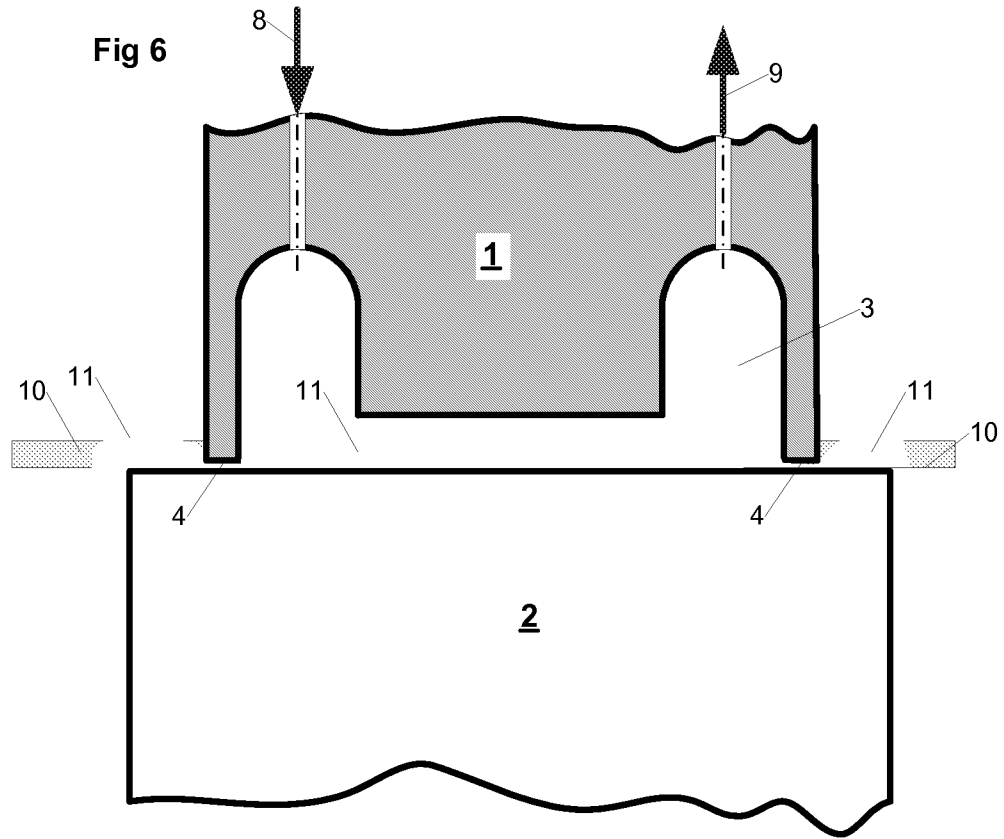
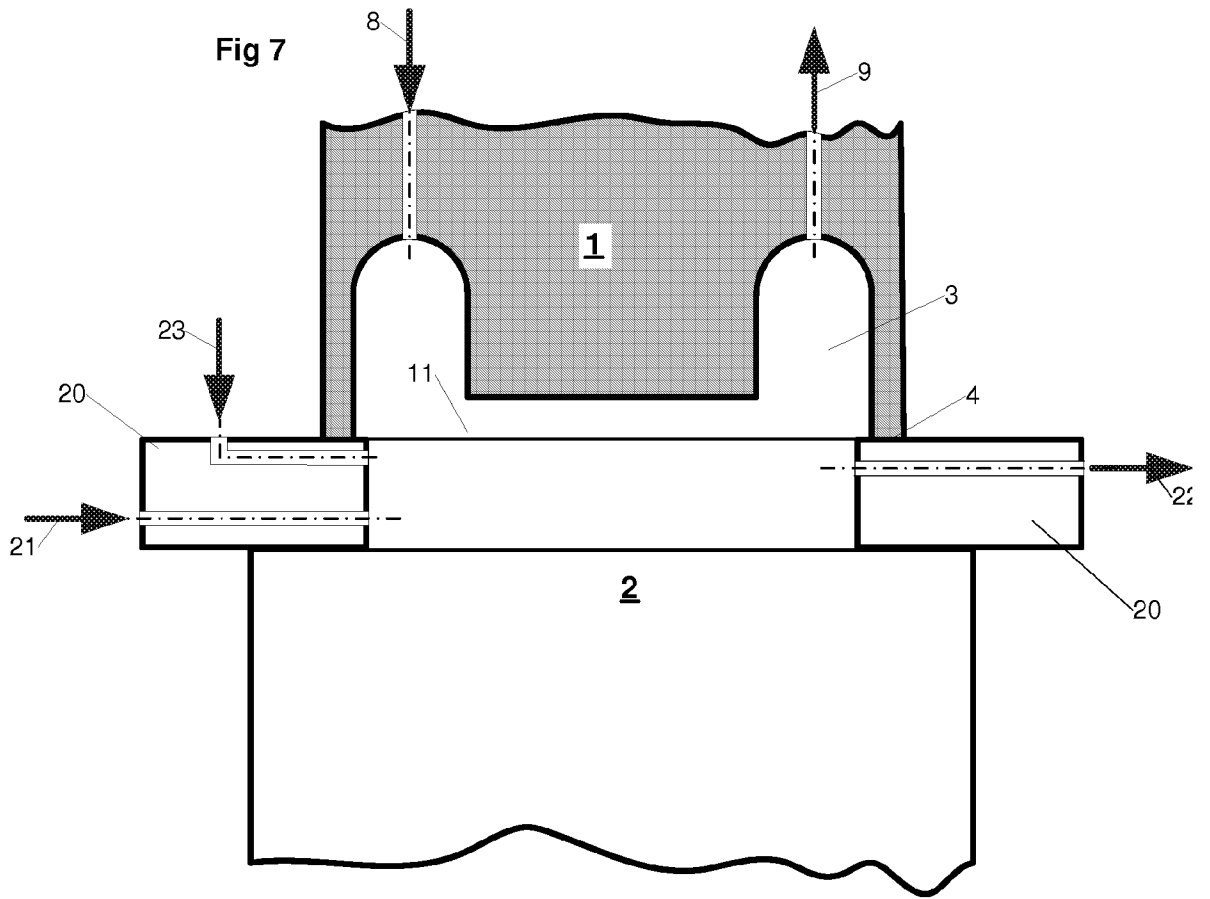


Fig 5







INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2011/055211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N35/10 G01N1/38 H01J49/04 ADD. G01N35/00 G01N1/40 G01N30/00 G01N30/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N H01J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 641 682 A (PAGELS WILLIAM [US] ET AL) 24 June 1997 (1997-06-24) column 1, lines 6-13; figures 1,2 column 2, lines 39-58 column 3, line 39 - column 6, line 60 column 9, line 1 - column 11, line 7 ----- -/--	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
22 February 2012	29/02/2012	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer van Lith, Joris	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/055211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PAUL ABU-RABIE ET AL: "Direct Quantitative Bioanalysis of Drugs in Dried Blood Spot Samples Using a Thin-Layer Chromatography Mass Spectrometer Interface", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 81, no. 24, 15 December 2009 (2009-12-15), pages 10275-10284, XP55018149, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac901985e Einführung und Absatz "Direct Extraction and Direct Analysis Using the TLC-MS interface"figure 2</p> <p>-----</p>	1-23
Y	<p>HEINRICH LUFTMANN: "A simple device for the extraction of TLC spots: direct coupling with an electrospray mass spectrometer", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 378, no. 4, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 964-968, XP55018167, ISSN: 1618-2642, DOI: 10.1007/s00216-003-2293-3 Absatz "Construction and mode of action"figures 1-3</p> <p>-----</p>	1-23
Y	<p>GARY J. VAN BERKEL ET AL: "Application of a Liquid Extraction Based Sealing Surface Sampling Probe for Mass Spectrometric Analysis of Dried Blood Spots and Mouse Whole-Body Thin Tissue Sections", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 81, no. 21, 1 November 2009 (2009-11-01), pages 9146-9152, XP55018157, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac901712b Einführung und Absatz "Operation of the SSSP"</p> <p>-----</p>	1-23
A	<p>JULIEN DÉGLON ET AL: "On-line desorption of dried blood spot: A novel approach for the direct LC/MS analysis of [mu]-whole blood samples", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, vol. 49, no. 4, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 1034-1039, XP55018176, ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/j.jpba.2009.02.001 Einführung und Absätze "DBS sample processing" und "System description"figure 1</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/055211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2011/010265 A1 (CAMAG [CH]; LOPPACHER MATTHIAS [CH]; REICH EIKE [CH]) 27 January 2011 (2011-01-27) page 12, lines 7-16; figures 5,6 -----	1-23
X,P	Matthias Loppacher ET AL: "Direct extraction/analysis of Dried Blood Spots(DBS): A fully automated system including spot localization, internal standard (IS) application and multiple batch analysis", 9 June 2011 (2011-06-09), XP55018154, Denver Retrieved from the Internet: URL: http://www.camag.com/downloads/protected/DBS_MS_500/ASMS_2011_A%20fully%20automated%20system%20including%20spot%20localization.pdf [retrieved on 2012-02-01] the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2011/055211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5641682	A	24-06-1997	NONE

WO 2011010265	A1	27-01-2011	CH 701526 A2 31-01-2011
			WO 2011010265 A1 27-01-2011

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/IB2011/055211

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. G01N35/10 G01N1/38 H01J49/04
 ADD. G01N35/00 G01N1/40 G01N30/00 G01N30/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

G01N H01J

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 641 682 A (PAGELS WILLIAM [US] ET AL) 24. Juni 1997 (1997-06-24) Spalte 1, Zeilen 6-13; Abbildungen 1,2 Spalte 2, Zeilen 39-58 Spalte 3, Zeile 39 - Spalte 6, Zeile 60 Spalte 9, Zeile 1 - Spalte 11, Zeile 7 ----- -/--	1-23



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 2012

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/02/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Lith, Joris

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/IB2011/055211

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>PAUL ABU-RABIE ET AL: "Direct Quantitative Bioanalysis of Drugs in Dried Blood Spot Samples Using a Thin-Layer Chromatography Mass Spectrometer Interface", ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 81, Nr. 24, 15. Dezember 2009 (2009-12-15), Seiten 10275-10284, XP55018149, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac901985e Einführung und Absatz "Direct Extraction and Direct Analysis Using the TLC-MS interface"Abbildung 2</p> <p>-----</p>	1-23
Y	<p>HEINRICH LUFTMANN: "A simple device for the extraction of TLC spots: direct coupling with an electrospray mass spectrometer", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 378, Nr. 4, 1. Februar 2004 (2004-02-01), Seiten 964-968, XP55018167, ISSN: 1618-2642, DOI: 10.1007/s00216-003-2293-3 Absatz "Construction and mode of action"Abbildungen 1-3</p> <p>-----</p>	1-23
Y	<p>GARY J. VAN BERKEL ET AL: "Application of a Liquid Extraction Based Sealing Surface Sampling Probe for Mass Spectrometric Analysis of Dried Blood Spots and Mouse Whole-Body Thin Tissue Sections", ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 81, Nr. 21, 1. November 2009 (2009-11-01), Seiten 9146-9152, XP55018157, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac901712b Einführung und Absatz "Operation of the SSSP"</p> <p>-----</p>	1-23
A	<p>JULIEN DÉGLON ET AL: "On-line desorption of dried blood spot: A novel approach for the direct LC/MS analysis of [mu]-whole blood samples", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, Bd. 49, Nr. 4, 1. Mai 2009 (2009-05-01), Seiten 1034-1039, XP55018176, ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/j.jpba.2009.02.001 Einführung und Absätze "DBS sample processing" und "System description"Abbildung 1</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/IB2011/055211

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	<p>WO 2011/010265 A1 (CAMAG [CH]; LOPPACHER MATTHIAS [CH]; REICH EIKE [CH]) 27. Januar 2011 (2011-01-27) Seite 12, Zeilen 7-16; Abbildungen 5,6 -----</p>	1-23
X,P	<p>Matthias Loppacher ET AL: "Direct extraction/analysis of Dried Blood Spots(DBS): A fully automated system including spot localization, internal standard (IS) application and multiple batch analysis", 9. Juni 2011 (2011-06-09), XP55018154, Denver Gefunden im Internet: URL:http://www.camag.com/downloads/protected/DBS_MS_500/ASMS_2011_A%20fully%20automated%20system%20including%20spot%20localization.pdf [gefunden am 2012-02-01] das ganze Dokument -----</p>	1-23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/IB2011/055211

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5641682	A	24-06-1997	KEINE	

WO 2011010265	A1	27-01-2011	CH 701526 A2	31-01-2011
			WO 2011010265 A1	27-01-2011
