

(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
21. Juli 2011 (21.07.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/085791 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 30/06 (2006.01) B01J 19/10 (2006.01)
B01F 11/02 (2006.01) B06B 1/00 (2006.01)
B02C 19/18 (2006.01) B06B 3/00 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/007823

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Dezember 2010 (21.12.2010)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
1955/09 21. Dezember 2009 (21.12.2009) CH

(72) Erfinder; und

(71) Anmelder : DÖBELIN, Werner [CH/CH]; Grellinger-
strasse 4, CH-4153 Reinach (CH).

(74) Anwalt: WÜSTEFELD, Regine; Hintere Grabenstrasse
26, 72070 Tübingen (DE).

(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, RO, RS, RU, 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, 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).

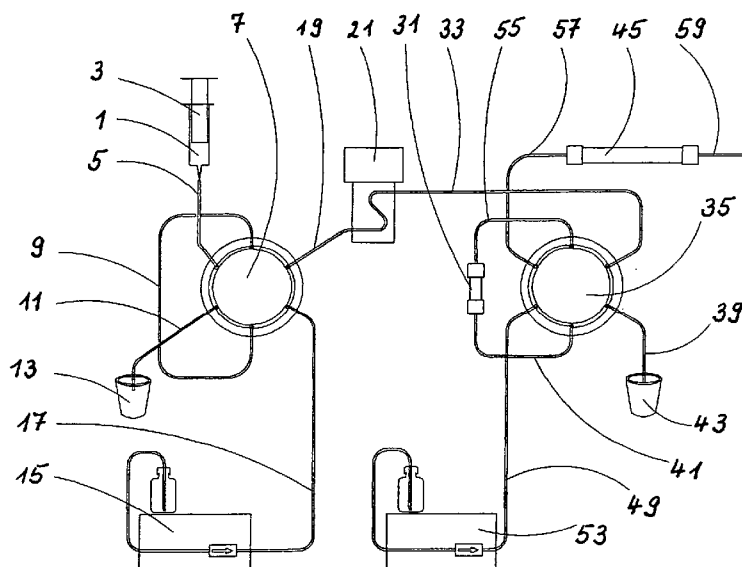
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: METHOD FOR REAL-TIME SAMPLE PREPARATION IN THE HPLC HIGH-PRESSURE AREA WITH THE AID OF ULTRASOUND

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR ONLINE-PROBENAUFBEREITUNG IM HPLC-HOCHDRUCKBEREICH MIT HILFE VON ULTRASCHALL

Fig. 1



(57) Abstract: The invention relates to a high-performance liquid chromatography (HPLC) system, comprising a sample receptacle, an HPLC column (31, 45) in the form of a separating column (45), upstream of which at least one precolumn (31) is arranged, at least one capillary connecting line, and a detector. An ultrasound device (21) is arranged between the sample receptacle and the at least one precolumn (31) and is brought in contact with the or at least one of the capillary connecting line(s). The invention further relates to a method for preparing samples in an HPLC system, wherein the fractions of the sample are finely distributed and homogenized by the ultrasound device (21) or cells in the sample are sufficiently destroyed or the sample is broken down before the sample reaches the at least one precolumn (31). The invention further relates to the use of the HPLC system and method to examine biological, biochemical, pharmaceutical, medical, or environmental samples, in particular for break-down in the protein and molecular range, for protein systems or cell cultures,

and for pharmacokinetics or pharmacodynamics.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2011/085791 A1



Die Erfindung betrifft ein Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)- System, mit einer Probeaufnahme, einer HPLC-Säule (31, 45) in Form einer Trennsäule (45), der zumindest eine Vorsäule (31) vorgeschaltet ist, zumindest einer kapillaren Verbindungsleitung und einem Detektor. Zwischen der Probeaufnahme und der zumindest einen Vorsäule (31) ist eine Ultraschallvorrichtung (21) angeordnet und mit der oder mit zumindest einer der kapillaren Verbindungsleitungen in Kontakt gebracht. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Probenaufbereitung in einem HPLC-System, bei dem die Anteile der Probe durch die Ultraschallvorrichtung (21) feinverteilt und homogenisiert oder in der Probe befindliche Zellen ausreichend zerstört werden oder die Probe aufgeschlossen wird, bevor sie die zumindest eine Vorsäule (31) erreicht. Die Erfindung betrifft ebenso die Verwendung des HPLC-Systems und Verfahrens zur Untersuchung von biologischen, biochemischen, pharmazeutischen, medizinischen oder Umweltprouben, insbesondere für den Aufschluß im Protein- und Molekularbereich, für Proteinsysteme oder Zellkulturen sowie für die Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik.

10 **Verfahren zur Online-Probenaufbereitung im HPLC Hochdruckbereich
mit Hilfe von Ultraschall**

- 15 Die Erfindung betrifft ein Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-System, mit einer Probenaufnahme, zumindest einer Trennsäule und einem Detektor, wobei die Probenaufnahme mit der zumindest einen Trennsäule durch zumindest eine kapillare Verbindungsleitung verbunden ist.
- 20 Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wird als chromatographisches Trennverfahren in der Analytik in den verschiedensten Bereichen eingesetzt. Dazu gehören die pharmazeutische Forschung und Entwicklung, die Qualitätssicherung, der weite Bereich der Biowissenschaften, auch als „Life Sciences“ bezeichnet, sowie umwelttechnische Fragestellungen.
- 25 Wichtig für die Qualität einer HPLC-Untersuchung ist bereits die Probenvorbereitung bzw. -aufbereitung. Hier werden seit langem große Anstrengungen unternommen, um mit geringem Aufwand möglichst exakte und reproduzierbare Resultate zu erhalten. Gerade die Aufarbeitung von biologischen oder medizinischen Proben und Umweltproben ist oft mit sehr großem Aufwand verbunden, damit die
- 30 Probe für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie geeignet ist und dementsprechend in ein HPLC-System injiziert werden kann. Das Probenhandling von der Probenentnahme über die Probenverteilung, Probenaufarbeitung, Probenlage-

rung bis zur Injektion der Probe in das HPLC-System birgt eine Vielzahl von möglichen Fehlern, welche das analytische Resultat verfälschen oder gar unbrauchbar machen. Jede Vereinfachung der Probeaufarbeitung minimiert die Fehlermöglichkeit.

5

Um sicher zu stellen, daß sich zu untersuchende Proben im allgemeinen und speziell biologische oder Umweltproben für die Injektion in einen Hochleistungsflüssigkeitschromatographen eignen, sind herkömmlich Aufarbeitungsmethoden, wie Zentrifugieren, Fällern, Filtern, Extrahieren, Lösen, Derivatisieren, etc. bekannt.

10 Dabei sind insbesondere im Bereich der Filtration erhebliche Anstrengungen unternommen worden, um Filtrationssysteme zur Probenaufbereitung für eine große Volumenbandbreite bereitzustellen. Neben der Vielzahl möglicher Volumina, die zu untersuchen sein können, ist hinsichtlich der Probenaufbereitung auch noch zwischen Einzel- und Mehrfachproben sowie automatisierten Systemen zu unterscheiden. Insbesondere ist es bekannt, mit Spritzenvorsatzfiltern zu arbeiten, die
15 speziell für automatisierte HPLC-Systeme neu entworfen werden mußten. Hier sind mehrschichtige Vorfilter bekanntgeworden, die unter anderem mit Glasfasern ausgestattet sind, um einen höheren Durchsatz, verbunden mit schnelleren Fließraten, gewährleisten zu können. Solche Mehrschichtfilter halten Partikel in der
20 Größenordnung von > 40 bis $1\mu\text{m}$ zurück.

Im Bereich der Extraktion ist es bekannt, lösungsmittelverträgliche Filtermedien in Form von Membranen einzusetzen. Hier besteht das Problem von Artefakten bedingt durch extrahierbare Bestandteile der Filter. Außerdem können die Membranen je nach Art mittels elektrostatischer, ionischer, kovalenter, Wasserstoff-
25 oder sonstiger Bindung mit der zu untersuchenden Probe in Wechselwirkung treten, was ebenfalls zu Verfälschungen führen kann.

Auch wenn die Probenaufbereitung durch Zentrifugieren grundsätzlich als eine schnelle, d.h. zeitsparende und einfache Methode bewertet wird, ist sie nicht frei von Nachteilen. Bei dem Zentrifugieren wird mit Zentrifugalkräften von bis zu
30 14 000 g gearbeitet. Hier kommt es darauf an, durch spezielle Dichtungsmethoden Leckagen zu verhindern. Da auch für diese Art der Probenaufbereitung Filter-

membranen eingesetzt werden, muß zusätzlich dafür Sorge getragen werden, daß der Eintrag von unerwünschten, extrahierbaren Bestandteilen verhindert wird.

Mit den genannten Maßnahmen kann z.B. keine ausreichende Vorbereitung für solche Proben gewährleistet werden, welche verklumpen oder zur Verklumpung neigen. Diese können nach wie vor die HPLC-Säule verstopfen. Bei Blutproben mit intakten roten Blutkörperchen verstopfen die normalen analytischen HPLC-Säulen schon aufgrund der Größe dieser Blutkörperchen. Außerdem sind allgemein Moleküle zu nennen, welche bevorzugt aneinanderhaften und dadurch oft nur schlecht mit chromatographischen Mitteln getrennt werden können.

Davon ausgehend lag der Erfindung daher die Aufgabe zugrunde, ein System zur Probenbehandlung bereitzustellen, mit dem diese negativen Auswirkungen mit vernünftigem Aufwand verringert und neue Anwendungen ermöglicht werden können, so daß insbesondere auch biologische, biochemische, pharmazeutische, medizinische und/oder Umweltproben direkt nach der Probenentnahme, gegebenenfalls nach einer Zwischenlagerung, in ein HPLC-System injiziert und mit hoher Qualität analysiert werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-System gelöst, das eine Probenaufnahme, zumindest eine HPLC-Säule und einen Detektor aufweist, wobei die Probenaufnahme mit der zumindest einen HPLC-Säule durch zumindest eine kapillare Verbindungsleitung verbunden ist. In dem Bereich zwischen der Probenaufnahme und der zumindest einen HPLC-Säule ist eine Ultraschallvorrichtung angeordnet und mit der oder mit zumindest einer der kapillaren Verbindungsleitungen in Kontakt gebracht.

Der Begriff HPLC-Säule ist dabei ganz allgemein zu verstehen und umfaßt jegliche Art der in einem HPLC-System verwendbaren und verwendeten Säulen. Zunächst ist in dem einfachsten Fall unter der HPLC-Säule eine Trennsäule zu verstehen. Das HPLC-System kann dabei in Normalphase oder Umkehrphase betrie-

ben werden. Die Methode der Umkehrphase als der gängigsten HPLC-Methode wird üblicherweise als „reversed phase“ bezeichnet und mit RP abgekürzt.

Üblich ist es auch, der eigentlichen Trennsäule eine oder mehrere Vorsäulen vorzuschalten. Diese haben einerseits die Aufgabe, Verunreinigungen von der Trennsäule als Hauptsäule abhalten und sie können andererseits dem Aufkonzentrieren dienen. Im Rahmen der hier dargestellten erfindungsgemäßen Lehre wird zunächst nicht zwischen Vorsäule und Trennsäule unterschieden. Wenn die Ultraschallvorrichtung in dem Bereich zwischen der Probenaufnahme und der zumindest einen HPLC-Säule angeordnet ist, so kann sie entweder vor der Trennsäule angeordnet sein oder vor der ersten Vorsäule, je nachdem, ob und wie viele Vorsäulen vorgesehen sind.

Da es die Aufgabe der Ultraschallvorrichtung ist, eine möglichst homogenisierte Probe zu erzeugen, welche die zumindest eine HPLC-Säule passiert, ohne diese zu verstopfen, oder andererseits auch, Zellen in der Probe zu zerstören, um innere Zellbestandteile einer Analyse zugänglich zu machen, ist es erfindungsgemäß sinnvoll, die Ultraschallvorrichtung vor der jeweils ersten HPLC-Säule anzuordnen, d.h. vor der Trennsäule oder vor der ersten Vorsäule.

Erfindungsgemäß wirkt die Ultraschallenergie direkt auf und in die Probe. Dies dient der Homogenisierung der Probe, die in der Probe enthaltenen Komponenten werden zerkleinert und die Eigenschaft(en) der Probe insoweit verändert, daß eine Verstopfung der zumindest einen HPLC-Säule vermieden wird. Grundsätzlich wird dadurch eine wesentliche Verbesserung und Vereinfachung der Analytik erzielt.

Wenn die Probe nach der Injektion im Hochdruckbereich durch die zumindest eine Verbindungskapillare geführt bzw. gepumpt wird, welche in Kontakt mit der Ultraschallvorrichtung gebracht ist, so sollte die Verbindungskapillare in dem Sinne starr mit dem Ultraschallkopf der Ultraschallvorrichtung verbunden sein, daß die Ultraschallschwingung möglichst vollständig auf die Verbindungskapillare übertragen wird und die Ultraschallenergie auf diese Weise direkt und möglichst vollständig auf die Probe einwirken kann. Die Probe gelangt dadurch homogenisiert und optimiert auf die zumindest eine HPLC-Säule. Die HPLC Säule

verstopft nicht oder deutlich weniger. Die Lebensdauer der HPLC-Säule(n) verlängert sich und die Trennleistung der HPLC-Trennsäule kann sich verbessern.

Bei einem HPLC-System, das als HPLC-Säulen neben einer Trennsäule auch
5 noch eine oder mehrere Vorsäulen aufweist, die der Trennsäule vorgeschaltet ist
oder sind, ist die Ultraschallvorrichtung in dem Bereich zwischen der Probenauf-
nahme und der zumindest einen Vorsäule angeordnet. Bei dem Vorhandensein
von mehreren Vorsäulen ist die Ultraschallvorrichtung grundsätzlich auch vor der
ersten Vorsäule angeordnet. Nur auf diese Weise kann sie die ihr erfindungsge-
10 mäß zukommende Wirkung vollständig entfalten.

Gemäß einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen HPLC-Systems
kann die zumindest eine kapillare Verbindungsleitung im wesentlichen drei Ab-
schnitte aufweisen oder aus zumindest drei Kapillaren bestehen, die jeweils mit-
15 einander verbunden sind. Üblicherweise werden solche Verbindungen von Kapil-
laren in dem HPLC-System über sogenannte Fittings erreicht, die an sich bekannt
sind. Der erste Abschnitt der kapillaren Verbindungsleitung oder die erste Kapil-
lare führt dann von der Probenaufnahme zu der Ultraschallvorrichtung. Der zweite
Abschnitt oder die zweite Kapillare ist in Kontakt mit der Ultraschallvorrichtung
20 gebracht und der dritte Abschnitt oder die dritte Kapillare mit der zumindest einen
HPLC-Säule verbunden, welche dann, wenn nur eine HPLC-Säule in dem HPLC-
System vorhanden ist, die Trennsäule ist. Sind mehrere HPLC-Säulen vorhanden,
ist es eine Vorsäule.

25 Gemäß einer weiteren Ausführungsform weist die Ultraschallvorrichtung einen
Ultraschallkopf auf und der zweite Abschnitt der kapillaren Verbindungsleitung
oder die zweite Kapillare ist durch Aufwickeln auf den Ultraschallkopf in Kontakt
mit der Ultraschallvorrichtung gebracht. Die beiden weiteren Abschnitte der ka-
pillaren Verbindungsleitung oder die beiden weiteren Kapillaren sind demgegen-
30 über flexibel gehalten.

Auf diese Weise kann der Teil der kapillaren Verbindungsleitung, welcher durch
Aufwickeln direkt mit dem Ultraschallkopf in Verbindung steht, diese Ultra-

schallenergie gut aufnehmen und in das Innere der Kapillare weiterleiten. Es geht aber keine Ultraschallenergie verloren, da die beiden jeweils zu der Ultraschallvorrichtung führenden Teile der Kapillare flexibel gehalten sind. Dadurch wird die Ultraschallschwingung in diesen Bereichen gedämpft und nicht weitergeleitet.

5

Der Werkstoff für die Kapillare(n) kann ausgewählt sein aus Metall, das in einer Variante im Kapillarinnern zusätzlich mit Glasfasern beschichtet sein kann und/oder Kunststoff.

10 Dabei kann das Metall ausgewählt sein aus Edelstahl, rostfreiem Stahl oder Titan und/oder der Kunststoff kann ausgewählt sein aus Polyetheretherketon (PEEK), Polytetrafluorethylen (PTFE), insbesondere Teflon, und/oder Fluorpolymeren, insbesondere Ethylen-Tetrafluorethylen (ETFE).

15 Die zu verwendenden Kapillaren müssen grundsätzlich hochdrucktauglich sein. Bevorzugte Kapillarstärken ergeben sich daher für den Fachmann je nach dem verwendeten Material aus der Anforderung, dem jeweiligen Druck des Systems standhalten zu müssen. Als bevorzugte Kapillarstärken können als Außendurchmesser ca. 1/32'' bis 1/8'' und als Innendurchmesser 0.25 – 2mm, bevorzugt
20 1/16'' als Außendurchmesser und 0.25 bis 0.75 mm, besonders bevorzugt 0.5 mm als Innendurchmesser genannt werden.

Die Erfindung betrifft ebenso ein Verfahren zur Probenaufbereitung in einem HPLC-System, bei dem die Probe über eine Probenaufnahme in das HPLC-
25 System injiziert und über zumindest eine kapillare Verbindungsleitung zu zumindest einer HPLC-Säule geführt wird. Dabei wird die Probe mit einer Ultraschallvorrichtung in Kontakt gebracht, durch welche ihre Anteile feinverteilt und homogenisiert werden, bevor die Probe die zumindest eine HPLC-Säule erreicht.

30 Auch hier ist der Begriff der HPLC-Säule so zu verstehen, daß er sowohl die Trennsäule als auch die Vorsäule umfaßt, je nachdem, ob das HPLC-System eine oder mehrere Säulen, davon regelmäßig zumindest eine Vorsäule, aufweist.

- Übliche Ultraschallfrequenzen der Ultraschallvorrichtung liegen im Bereich von ca. 10 – 60 kHz. Erfindungsgemäß werden 20 bis 50 kHz, besonders bevorzugt ca. 30 kHz verwendet. Um eine ausreichende Homogenisierung der Probe, gegebenenfalls eine ausreichende Zellzerstörung und/oder ein Aufschließen der Probe zu gewährleisten, ist nicht nur die Frequenz, sondern auch die Amplitude zu beachten. Die Ultraschall-Energie bzw. der Energiefluß wird über die Amplitude gesteuert. Als weiteres Maß ist die Verweilzeit der Probe in dem Ultraschallbereich, d.h. die wirksame Weglänge zu nennen, die unter anderem von der Flußrate und der Verweilzeit der Kapillare in direktem Kontakt mit dem Ultraschallkopf abhängt. Außerdem kann Ultraschall als kontinuierlicher Schall oder gepulst angewendet werden. Erfindungsgemäß wird bevorzugt gepulster Ultraschall mit einer Pulsweite von 10-100% verwendet.
- 15 Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, daß die Probe nach der Ultraschallvorrichtung zunächst zumindest eine HPLC-Säule in Form einer Vorsäule passiert, die der weiteren HPLC-Säule in Form einer Trennsäule vorgeschaltet wird. Darin eingeschlossen ist der Fall, daß mehr als eine Vorsäule vorgeschaltet wird.
- 20 Besonders bevorzugt ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, wenn die Probenaufnahme in das HPLC-System direkt von einer Probenentnahme aus einem Körper oder Medium oder aus einem Probenvorrat erfolgt. Dann kann der erfindungsgemäße Vorteil der Ultraschall-Zerkleinerung besonders effektiv und zeitsparend ausgenutzt werden. Eine aufwendige Probenvorbereitung, wie sie im Stand der Technik erforderlich ist, kann ganz entfallen.
- 25 Ein Körper oder eine Zellkultur oder eine sonstige Probe, aus dem oder aus der die direkte Probenentnahme erfolgt, kann beispielsweise der eines kleinen Tieres oder Kindes sein. Dann kommt ein weiterer Vorteil zum Tragen, der noch durch die Verwendung einer besonders ausgeführten Pipettenspitze verstärkt werden kann, wie sie mit der WO-A-2010/084180 bekanntgeworden ist. Dieser Vorteil besteht in den kleinen Probenmengen, welche für die Durchführung der HPLC-Analyse benötigt werden. Einerseits hängt dies damit zusammen, daß die üblichen
- 30

Vor- und Aufbereitungsschritte für die Probe zusätzliches Probenvolumen benötigen, was hier entfällt. Andererseits kann das Probenvolumen noch durch die genannte Pipettenspitze besonders schonend und in kleinsten Mengen so aus dem Körper oder Medium entnommen werden, daß die Pipettenspitze selbst bereits zur
5 Injektion in die HPLC-System verwendet werden kann.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des HPLC-Systems, wie vorstehend in verschiedenen Ausführungsformen beschrieben und das entsprechende Verfahren zur Probenaufbereitung in dem HPLC-System zur Untersuchung von biologischen, biochemischen, pharmazeutischen, medizinischen und/oder Umweltproben.
10

Hier hat man es besonders mit störenden Einflüssen der Probe zu tun, die oft durch eine Vorbehandlung gar nicht zu eliminieren sind. Dazu gehört ganz besonders die Analyse von Blutproben mit intakten roten Blutkörperchen. Aber auch
15 ohne den Hintergrund störender Einflüsse läßt sich das HPLC-System erfindungsgemäß z.B. für Aufschlußverfahren im Protein- und Molekularbereich, für Proteinsysteme oder Zellkulturen sowie für die Pharmakokinetik und/oder Pharmakodynamik einsetzen.

20

Im folgenden soll die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels und der beigefügten Zeichnung näher erläutert werden.

25 Es zeigen:

Fig. 1: Ein schematisch dargestelltes HPLC-System mit Ultraschallvorrichtung und Vorsäulenschaltung mit einer Vorsäule,

30 Fig. 2: eine schematische Darstellung der Ultraschallvorrichtung, und

Fig. 3: ein schematisch dargestelltes HPLC-System mit Ultraschallvorrichtung und Vorsäulenschaltung mit drei Vorsäulen.

5 Zur Erläuterung der erfindungsgemäßen Probenaufbereitung bei einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-System mit Hilfe von Ultraschall ist in Fig. 1 ein HPLC-System dargestellt, daß sowohl im Normalmodus wie im reversed phase-Modus arbeiten kann. Die Ultraschallbehandlung einer zu untersuchenden Probe 1 ist davon ganz unabhängig und soll nachfolgend näher erläutert
10 werden.

Außerdem gelten die nachfolgenden Ausführungen nicht nur für die Anwendung im Bereich der üblichen HPLC-Trennverfahren. Die erfindungsgemäße Ausgestaltung des HPLC-Systems, d.h. im wesentlichen die Probenvorbereitung vor dem Passieren der Säule(n), hat sich genauso im Bereich der Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC oder UHPLC) als einsetzbar und geeignet erwiesen. Die UPLC unterscheidet sich dabei von dem herkömmlichen HPLC-Trennverfahren durch einen höheren Probendurchsatz, der im wesentlichen bedingt ist durch eine im UPLC-Verfahren erreichte höhere Trennleistung. Grundsätzlich bezeichnet die UPLC ein HPLC-Trennverfahren mit stark gesteigerter
15 Leistung. Diese Definition wird auch im Rahmen dieser Ausführungen zugrundegelegt.

Das in Fig. 1 dargestellte HPLC-System weist einen Probenaufnahmebereich auf, in den eine Probe 1, die zumindest einen zu untersuchenden Analyten aufweist, direkt aus einem Probenbehälter 3 transportiert wird. Der Probenbehälter 3 weist in diesem Ausführungsbeispiel eine spezielle Ausgestaltung auf, die besonders vorteilhaft, aber nicht zwangsläufig erforderlich ist, um die vorliegende Erfindung auszuführen. Daher wird auf diese spezielle Gestaltung des Probenbehälters 3
25 weiter unten noch einmal separat ausführlicher eingegangen.

30 In dem Probenaufnahmebereich befindet sich eine Eingangsleitung 5, die mit einem Ventil 7 verbunden ist, so daß die Probe 1 bei entsprechender Schaltung des

Ventils 7 aus dem Probenbehälter 3 in eine Probenschlaufe 9 gelangt. Eine Überlaufleitung 11 sorgt dafür, daß ein Probenüberlauf in einen dafür vorgesehenen Abfallbehälter 13 fließen kann. Durch ein Umschalten des Ventils 7 erfolgt dann die Injektion der Probe 1 in den Vorsäulenbereich des HPLC-Systems. Dafür ist
5 eine HPLC-Ladepumpe 15 vorgesehen, durch welche die in der Probenschlaufe 9 befindliche Probe 1 über eine Leitung 17 und bei entsprechender Schaltung des Ventils 7 in einen ersten Leitungsabschnitt 19 einer kapillaren Verbindungsleitung geführt wird und von dort zu der erfindungsgemäßen Probenaufbereitung zu einer
Ultraschallvorrichtung 21 gelangt.

10

Diese Ultraschallvorrichtung 21 ist in Fig. 2 noch einmal näher dargestellt. Sie weist einen Ultraschalltreiber 23, einen Ultraschalladapter 25 und einen Ultraschallkopf 27 auf. Die Bewegungsrichtung des so erzeugten Ultraschalls verläuft axial auf der in Fig. 2 mit der Bezugsziffer 28 bezeichneten Achse. Auf den Ultraschallkopf 27 ist ein zweiter Leitungsabschnitt 29 der Verbindungsleitung aufgewickelt und durch dieses Aufwickeln im wesentlichen starr, aber lösbar mit dem
15 Ultraschallkopf 27 gekoppelt. Dadurch wird erreicht, daß die Ultraschallenergie direkt auf die Probe 1 wirkt, welche über den ersten Leitungsabschnitt 19 in diesen zweiten Leitungsabschnitt 29 geführt wird, bedingt durch die Windungen des zweiten Leitungsabschnitt 29 in dem Bereich des Ultraschallkopfs 27 verweilt und
20 diesen mehrmals passiert. Die Anzahl der Wicklungen des zweiten Leitungsabschnitts 29 ist somit auch ein Maß für die Verweilzeit der Probe 1 in dem Ultraschallbereich. Die Wicklungen sind so gewählt, daß die Probe 1 durch die Ultraschall-Behandlung gut homogenisiert wird, d.h. feste, agglomerierte oder verklumpte Bestandteile in der Probe werden durch die Ultraschalleinwirkung
25 ausreichend zerstört. Die Bestandteile der Probe 1 gelangen auf diese Weise feinverteilt und optimiert auf eine im Ausführungsbeispiel mit der Bezugsziffer 31 bezeichnete HPLC-Vorsäule. Es hat sich gezeigt, daß die HPLC-Vorsäule 31 dadurch nicht oder bedeutend weniger verstopft als ohne Ultraschall-Behandlung.
30 Die Lebensdauer der HPLC-Vorsäule 31 verlängern sich somit erheblich.
Die Verwendung des erfindungsgemäßen HPLC-Systems beschränkt sich jedoch nicht auf diesen Einsatzbereich. Bei Aufschlüssen im Protein- und Molekularbe-

reich, bei Proteinsystemen oder Zellkulturen werden die Zellen bzw. Moleküle zum Platzen gebracht und aufgeschlossen. Dies konnte insbesondere im Bereich der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik neue Untersuchungsmethoden erschließen. So wurden mit dem HPLC-System Untersuchungen im Bereich der

5 Wirksamkeitsprüfung von Arzneimittelwirkstoffen durchgeführt, die so vorher nicht möglich waren und die grundsätzlich darauf basieren, Zellen zum Zwecke der Untersuchung geeignet zu zerstören. Diese Methode wird im Bereich der Pharmakokinetik bzw. Pharmakodynamik eingesetzt, um bei bestimmten, in Zellen wirksamen Wirkstoffen prüfen und ermitteln zu können, wieviel davon in den

10 zu untersuchenden Zellen enthalten, d.h. tatsächlich in die Zellen eingedrungen ist. Hier wird der Untersuchung eine Zellkultur in Form einer konzentrierten Zellmatrix zugrundegelegt, die etwa 10 x kleiner ist als Vollblut. Diese Zellmatrix wird pipettiert, in das HPLC-System injiziert, die Zellen werden zum Platzen gebracht und der dadurch freigestzte Wirkstoff kann bestimmt werden. Durch die

15 vorherige Herstellung der aufkonzentrierten Zellmatrix kann nun zweifelsfrei sichergestellt werden, daß sich die bestimmten Konzentrationen an Wirkstoff tatsächlich in der Zelle befunden haben, bzw. relativ fest an der äußeren Zellwand gebunden waren, so daß sie durch die vorherigen Schritte des Aufkonzentrierens und Waschens nicht abgelöst werden konnten.

20

Die Ultraschallvorrichtung, welche für die vorstehend beschriebenen Untersuchungen verwendet wurde, hatte eine Ultraschallfrequenz 30 kHz verwendet. Die Ultraschall-Energie bzw. der Energiefluß wurde über die Amplitude gesteuert. Außerdem wurde ein gepulster Ultraschall mit einer Pulsweite verwendet, die zu

25 Testzwecken von 10-100% variiert wurde. Eine weitere wichtige Größe war die Verweilzeit der Probe in dem Ultraschallbereich, d.h. die wirksame Weglänge, welche die Probe in dem Ultraschallbereich zurücklegte, pro Zeiteinheit. Hier spielt die Flußrate für die Verweilzeit der Kapillare in direktem Kontakt mit dem Ultraschallkopf und die jeweils gewählte Kapillare selbst, d.h. deren Innendurch-

30 messer eine Rolle.

Bei den Testversuchen wurden Flußraten eingestellt, die eine Verweilzeit der Proben je nach durchgeführtem Versuch von 5 – 30 s ermöglichten. Insbesondere

wurden dabei Wicklungszahlen der Kapillare 29 um den Ultraschallkopf 27 von 25 - 35 Wicklungen getestet. Insbesondere wurden die Versuche so eingestellt, daß sich bei einer Wicklungszahl von 30 und einer Flußrate von 100 – 300 µl pro min eine Verweilzeit von ca. 20 s im Ultraschallbereich ergab.

5

Nach dem Passieren der Ultraschallvorrichtung 21, d.h. im wesentlichen des Ultraschallkopfes 27, geht die Verbindungsleitung in einen dritten Leitungsabschnitt 33 über, durch welchen die Probe 1 nach dem Passieren eines Ventils 35 über eine weitere Leitung 37 zu der schon genannten HPLC-Vorsäule 31 geführt wird.

10 Erster Leitungsabschnitt 19, zweiter Leitungsabschnitt 29, in welchem die Probe 1 durch Passieren der Wicklungen um den Ultraschallkopf 27 in Kontakt mit dem Ultraschall gebracht wird, und der dritte Leitungsabschnitt 33 sind im Ausführungsbeispiel einstückig ausgebildet.

Hinsichtlich der zu verwendenden Kapillaren ist grundsätzlich zu beachten, daß
15 sie hochdrucktauglich sein müssen. Als bevorzugtes Kapillarmaterial hat sich im Rahmen der Testversuche PEEK ergeben. Andere Kunststoffmaterialien und Kapillaren aus Stahl oder Titan können aber auch verwendet werden.

Hier wurden zumeist dünnwandige, hochdrucktaugliche PEEK-Kapillaren mit einem Außendurchmesser ca. 1/16'' und einem Innendurchmesser von 0.5 mm
20 verwendet.

Je nach Einsatzzweck können weitere Kapillarstärken mit einem Außendurchmesser von 1/32'' und 1/8'' und einem Innendurchmesser von 0.25 – 0.75 mm oder größer eingesetzt werden.

Dabei sind der erste Leitungsabschnitt 19 und der dritte Leitungsabschnitt 33
25 flexibel angebracht und gehalten, um dadurch die Ultraschallschwingung zu dämpfen und nicht weiterzuleiten.

Der zumindest eine Analyt in der Probe 1 wird nun von der HPLC-Vorsäule 31 zurückgehalten. Weitere, nicht zurückgehaltene Komponenten der Probe 1 werden
30 von der HPLC-Ladepumpe 15 weiter über Ausgangsleitungen 39 und 41 in einen zweiten Abfallbehälter 43 gespült. Auf diese Weise wird der zumindest eine Analyt in der Probe 1 auf der HPLC-Vorsäule 31 das erste Mal gereinigt, aufkonzent-

triert und von störenden Komponenten getrennt. Der zumindest eine Analyt in der Probe 1, welcher sich nun noch auf der HPLC-Vorsäule 31 befindet, wird nun zu einer analytischen Trennsäule 45 weitergeleitet. Dazu wird über ein Ventil 47 sowie Leitungen 49 und 41 eine HPLC-Pumpe 53 betätigt, und die Probe 1 fließt über Leitungen 55 und 57 zu der analytischen Trennsäule 45. Dort wird sie erneut von störenden Komponenten getrennt, welche sich in der Probe 1 befinden, um dann über eine Leitung 59 in einen in den Fig. nicht mehr dargestellten spezifischen Detektor zu gelangen.

Im Rahmen dieses Ausführungsbeispiels wurde ein MS-MS-Detektor verwendet. Der Einsatz der MS-MS-Kopplung durch ein Triple-Quad-Gerät ermöglicht es, möglichst viel Informationen aus den zu untersuchenden Proben zu gewinnen. Durch diese Methode konnten Bruchstücke von Molekülen gemessen werden. Alternativ dazu können beliebige HPLC-Detektoren verwendet werden.

Um das beschriebene HPLC-System näher zu testen, wurden bevorzugt biologische Proben aus dem Bereich Blut, Plasma, Urin und Liquor eingesetzt und direkt nach Probenentnahme injiziert. Das HPLC-System war außerdem mit einem Massenspektrometer gekoppelt. Dies wird im Rahmen der Versuchserläuterung nur insoweit berücksichtigt, als ein erfolgreiches Analysieren der Proben mit dem Massenspektrometer, nach der chromatographischen Auftrennung über die HPLC, bei der direkten Einspritzung dieser biologischen Proben überhaupt erst möglich war und überraschend zu erfolgreichen, nicht durch Artefakte zu Fehlpeaks oder in sonstiger Weise verfälschten Meßergebnissen führte.

Bei den durchgeführten Untersuchungen war außerdem zu berücksichtigen, daß die untersuchten Proben, vor allem Blutproben, die von Mäusen genommen waren, nur in einer sehr kleinen Menge für die jeweilige Analyse zur Verfügung standen.

Es ist noch einmal darauf hinzuweisen, dass unter einem direkten Einspritzen der untersuchten Proben im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere ein Einspritzen verstanden wird, das die herkömmlichen Vorbereitungsschritte bei der Untersuchung einer Probe, wie das Eindosieren in eine Probenschlaufe durch Ent-

nahme aus einem Probengefäß und die dadurch notwendigen Waschschriffe der mit den Proben in Berührung gekommenen Teile vermeidet. Es ist auch keine vorherige Festphasenextraktion oder ein sonstiger, üblicher Vorbereitungsschritt erforderlich.

5

Für das direkte Einspritzen wird ein in den Fig. der Zeichnung nicht näher dargestellter Probenbehälter verwendet, auf den noch einmal näher eingegangen werden soll. Dieser Probenbehälter, wie er durch die WO-A-2010/084180/ offenbart worden ist, auf die hier vollumfänglich Bezug genommen wird, weist eine Pipettenspitze auf, welche sowohl pipettenseitig als auch probenseitig ein offenes Ende aufweist. Im Inneren der Pipettenspitze befindet sich eine mit einer Kapillaröffnung versehene Innenstützhülse. Das probenseitige Ende der Pipettenspitze ist druckdicht in eine stirnseitig mit einer Membran verschlossenen Verschlulshülse eingepreßt. Die Verschlulshülse mit der in ihr befindlichen Pipettenspitze wird in
10 eine Haltevorrichtung eingespannt, wobei Haltebacken zum Festhalten der Verschlulshülse und der Pipettenspitze dienen. An einem Vorschubsystem sind axial in die Pipettenspitze einführbare Kapillarnadeln angeordnet. Auf diese Weise können für eine Analyse an sich ausreichende kleinste Probenmengen erhalten und direkt in die erfindungsgemäÙe HPLC-Vorrichtung injiziert werden. Durch
15 die Ultraschallbehandlung wird ein Probenverlust vermieden. Unter dem Begriff „kleinste Probenmengen“ sind solche Mengen von 1 - 50 µl, bevorzugt von 5 - 10 µl zu verstehen und reichen für die Analyse aus.

Bei dem Injizieren der Probe 1 mittels dieses Probenbehälters wird durch die Pi-
25 pettenspitze die Probenschlaufe des HPLC-Injektionssystems geschlossen. Die Probenschlaufe ist austauschbar und der Probenbehälter, in dem die Probe 1 vorbereitet und mit dessen Pipettenspitze sie injiziert wird, ist ein Einmalartikel, d.h., er kann nach dem Injizieren entsorgt werden.

Für ein automatisiertes Messen können vorbereitete Boxen mit 54 Probenbehäl-
30 tern verwendet werden, die über die weiter oben genannten Pipetten befüllt werden. Sie können entweder aufbewahrt oder direkt für eine Messung verwendet werden. Die Pipetten sind in der oben genannten WO-A-2010/084180 beschrie-

ben. Der so für die Messung vorbereitete Probenbehälter ist einseitig durch eine Verschluss-hülse verschlossen. Auf der anderen Seite befindet sich die Stützhülse.

Bei den nachfolgend beschriebenen Versuchsbeispielen wurden der eigentlichen
5 Trennsäule 45 eine bis drei Vorsäulen 37 vorgeschaltet. Die Kriterien, nach denen erfindungsgemäß eine, zwei oder drei Vorsäulen 37 verwendet wurden, gelten allgemein und insbesondere auch für alle nachfolgend erläuterten HPLC-Untersuchungen und sollen nachfolgend kurz allgemein dargestellt werden.

10 Dabei ist die Verwendung von einer oder mehreren Vorsäulen nicht zwangsläufig erforderlich, hat sich jedoch als sinnvoll erwiesen, um Verunreinigungen möglichst von der eigentlichen Trennsäule 45 als Hauptsäule abzuhalten. Die Anzahl hängt von dem zu untersuchenden System ab.

15 Eine einstufige Vorsäulenschaltung 37 wurde dann gewählt, wenn die zu untersuchende Probe direkt, ohne vorherige Probenaufbereitung in das HPLC-System injiziert werden konnte. Dies hängt grundsätzlich von der Natur der zu untersuchenden Analyten ab. Bei einer solchen einstufigen Vorsäulenschaltung 37 wird die zu untersuchende Probe direkt, ohne vorherige Probenaufbereitungsschritte, in
20 das HPLC-System injiziert und die beschriebene Pipette bzw. Pipettenspitze stellt eine anschließend wegwerfbare Probenschleife dar. Bei Verwendung des weiter oben beschriebenen Sets von z.B. 54 Pipetten kann die Messung vollautomatisch erfolgen. Dann werden die Pipetten bzw. Pipettenspitzen automatisch nach jeder Injektion ausgetauscht. Bei den Versuchen wurde ein Druck von 2.500 psi, ent-
25 sprechend 170 bar, angewendet. Höhere Drücke sind grundsätzlich möglich.

Wenn im übrigen die Vorsäulenschaltung 37 mit dem erfindungsgemäßen Ultraschallmodul 21 als einstufige Vorsäulenschaltung 37 erläutert worden ist, so ist dies bedingt durch die Tatsache, daß es wesentlich auf das Ultraschallmodul an-
30 kommt, daß für die Zwecke der vorliegenden Erfindung am einfachsten anhand der einstufigen Vorsäulenschaltung 37 erläutert werden kann. Dies ist daher nicht einschränkend zu verstehen. Für den Fachmann auf diesem Gebiet ergibt sich oh-

ne weiteres, daß die dargestellten Grundsätze für das erfindungsgemäße Ultraschallmodul 21 genauso bei Anwendung einer zwei- und mehrstufigen Vorsäulenschaltung zur Anwendung kommen können.

- 5 Eine zweistufige Vorsäulenschaltung, wie Fig. 3 sie zeigt, hat sich dann als sinnvoll erwiesen, wenn sich ein Festphasen-Extraktionsschritt über eine SPE-Vorsäule (solid phase extraction, SPE-Säule) in Verbindung mit einer RAM-Vorsäule 31' als sinnvoll erwies. Dies ist z.B. bei (Blut-) Serum und Plasma-Proben der Fall. Die schon beschriebene Pipette bzw. Pipettenspitze wird wieder
10 als anschließend wegwerfbare Probenschleife verwendet. Bei vollautomatischer Messung dient das Set von 54 Pipetten als Injektionssystem. Die Pipetten bzw. Pipettenspitzen werden automatisch - wie schon beschrieben - nach jeder Injektion ausgetauscht. Bei den Versuchen wurde wieder ein Druck von 2.500 psi, entsprechend 170 bar, angewendet, wobei höhere Drücke grundsätzlich möglich sind.
- 15 Diese zweistufige Vorsäulenschaltung wurde in zwei Ausführungen verwendet, einmal in Form der üblichen HPLC mit den für die einstufige Vorsäulenschaltung schon genannten Drücken, und zum anderen in der Ausführung als UPLC mit einem Arbeitsdruck von bis zu 20.000 psi. Die UPLC wird weiter unten noch näher erläutert.
- 20 Eine zweistufige Vorsäulenschaltung kann daher dann angezeigt sein, wenn ein zweiphasiger Reinigungsschritt erforderlich wird, z.B. einmal über eine SPE-Vorsäule und des weiteren zusätzlich auf einer RAM-Säule. Unter RAM-Säulen werden vorliegend Säulen aus „Restricted Access Materialien“ auf der Basis von Kieselgel mit hydrophoben Gruppen verstanden. Kombiniert mit dem reversed
25 phase-Modus des HPLC-Systems war so ein Aufschluß von Molekülen mit der Bestimmung der Größen von Bruchteilen von Molekülen möglich.

Ein Einsatz der genannten RAM-Säulen im Rahmen der vorliegend untersuchten Proben wurde insbesondere deshalb als erforderlich erachtet, weil es sich vor-
30 zugsweise um biologische Proben handelte.

RAM-Säulen sind dazu geeignet, hydrophobe Analyten mit geringem Molekulargewicht aus nicht vorbehandelten Proben, insbesondere biologischen Proben, di-

rekt zu extrahieren und anzureichern. Als solche biologischen Proben sind hämolyisiertes Blut, Plasma, Serum, Milch, Fermentationsbrühe, Zellüberstände (supernatants) oder Lebensmittelhomogenate zu nennen.

- 5 Ein Beispiel für ihre Anwendung ist die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführte Studie zur Bestimmung von Bosentan und drei seiner Metabolite direkt aus dem Blut in Form einer HPLC-MS-Untersuchung. Dabei wurden die Blutproben auf einer RAM-Säule, wie sie von der Firma Merck in Darmstadt, Deutschland, im Handel erhältlich ist, gereinigt, auf einer C₁₈-Vorsäule aufkonzentriert und auf einer C₆-Phenyl-HPLC-Säule getrennt. Die HPLC-Durchflußrate auf der genannten analytischen Trennsäule 45 betrug im Ausführungsbeispiel 300 µl/min. Grundsätzlich sind deutlich kleinere, aber auch höhere Flußraten genauso möglich. Als Detektor wurde ein MS-MS-Detektor verwendet.
- 10
- 15 Bei den Versuchsdurchläufen im Rahmen der HPLC/UPLC-Studien wurden für die Trennsäule 45 Partikel mit einem Teilchendurchmesser von 2 – 5 µm als Säulenmaterial verwendet. Dadurch konnten sowohl die Geschwindigkeit als auch die Leistungsfähigkeit, d.h. die Trennleistung der Säule 45 verbessert werden. Der für diese Variante erforderliche höhere Arbeitsdruck konnte insbesondere durch Verwendung der zuvor beschriebenen Pipetten für das HPLC bzw. UPLC-Injektionssystem durch Verwendung geeigneter Pumpen und Ventile ermöglicht werden. Hinsichtlich der Ventile wurden Hochdruckventile verwendet, die für einen Arbeitsdruck von bis zu 20.000 psi ausgelegt waren.
- 20 Insbesondere hat es sich gezeigt, daß die Analysenzeit im Rahmen des UPLC-Trennverfahrens durch die Kombination der vorgenannten Pipetten, bzw. Pipettenspitzen, in Verbindung mit der erfindungsgemäßen Ultraschallvorrichtung besonders günstig verkürzt werden konnte. Durch das besondere Pipettensystem wird ein schneller, direkter Probengeber bereitgestellt. Zur vollständigen Entfaltung von dessen Vorteilen kommt es jedoch erst, wenn die erfindungsgemäße Ultraschallvorrichtung mit diesem direkten Probengeber gekoppelt wird. Die Ultraschallvorrichtung macht eine direkte Probenaufgabe ohne vorherige Aufbereitung der Probe überhaupt erst problemlos möglich und damit sinnvoll.
- 25
- 30

Patentansprüche

5

1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-System, mit einer Probenaufnahme, zumindest einer HPLC-Säule (31, 45) und einem Detektor, wobei die Probenaufnahme mit der zumindest einen HPLC-Säule (31, 45) durch zumindest eine kapillare Verbindungsleitung verbunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Bereich zwischen der Probenaufnahme und der zumindest einen HPLC-Säule (31, 45) eine Ultraschallvorrichtung angeordnet und mit der oder mit zumindest einer der kapillaren Verbindungsleitungen in Kontakt gebracht ist.
10
2. HPLC-System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die HPLC-Säule (31, 45) eine Trennsäule (45) ist, der zumindest eine Vorsäule (31) vorgeschaltet ist, und daß die Ultraschallvorrichtung (21) in dem Bereich zwischen der Probenaufnahme und der zumindest einen Vorsäule (31) angeordnet ist.
15
3. HPLC-System nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die zumindest eine kapillare Verbindungsleitung im wesentlichen drei Abschnitte aufweist oder daß die kapillare Verbindungsleitung aus zumindest drei Kapillaren besteht, die jeweils miteinander verbunden sind, von denen der erste Abschnitt (19) oder die erste Kapillare von der Probenaufnahme zu der Ultraschallvorrichtung (21) führt, der zweite Abschnitt (29) oder die zweite Kapillare in Kontakt mit der Ultraschallvorrichtung (21) gebracht ist, und der dritte Abschnitt (33) oder die dritte Kapillare mit der zumindest einen HPLC-Säule (31, 45) oder der Trennsäule (45) verbunden ist.
20
25
30

4. HPLC-System nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Ultraschallvorrichtung (21) einen Ultraschallkopf (27) aufweist, daß der zweite Abschnitt (29) der kapillaren Verbindungsleitung oder die zweite Kapillare durch Aufwickeln auf den Ultraschallkopf (27) in Kontakt mit der Ultraschallvorrichtung gebracht ist, und daß die beiden weiteren Abschnitte der kapillaren Verbindungsleitung (19, 33) oder die beiden weiteren Kapillaren flexibel gehalten sind.
5
5. HPLC-System nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch einen Werkstoff für die Kapillare(n), der ausgewählt ist aus Metall, im Kapillarinnern mit Glasfasern beschichtetem Metall und/oder Kunststoff.
10
6. HPLC-System nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Metall ausgewählt ist aus Edelstahl, rostfreiem Stahl oder Titan, und/oder daß der Kunststoff ausgewählt ist aus Polyetheretherketon (PEEK), Polytetrafluorethylen (PTFE), insbesondere Teflon, und/oder Fluorpolymeren, insbesondere Ethylen-Tetrafluorethylen (ETFE).
15
7. Verfahren zur Probenaufbereitung in einem HPLC-System, bei dem die Probe über eine Probenaufnahme in das HPLC-System injiziert und über zumindest eine kapillare Verbindungsleitung zu zumindest einer HPLC-Säule (31, 45) geführt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe dabei mit einer Ultraschallvorrichtung (21) in Kontakt gebracht wird, durch welche ihre Anteile feinverteilt und homogenisiert und/oder in der Probe befindliche Zellen ausreichend zerstört werden und/oder die Probe aufgeschlossen wird, bevor sie die zumindest eine HPLC-Säule (31, 45) erreicht.
20
25
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine gepulste Ultraschallwelle mit einer Frequenz zwischen 10 und 60 kHz, vorzugsweise 20 bis 50 kHz, besonders bevorzugt 30 kHz verwendet wird.
30

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe in der zumindest einen kapillaren Verbindungsleitung ca. 5 bis 30 s in Kontakt mit dem Ultraschall gehalten wird.
- 5 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe nach der Ultraschallvorrichtung (21) zunächst zumindest eine HPLC-Säule (31, 45) in Form einer Vorsäule (31) passiert, die der weiteren HPLC-Säule (31, 45) in Form einer Trennsäule (45) vorgeschaltet wird.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenaufnahme in das HPLC-System direkt von einer Probenentnahme aus einem Körper oder Medium oder aus einem Probenvorrat erfolgt.
- 15 11. Verwendung eines HPLC-Systems nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder des Verfahrens zur Probenaufbereitung nach einem der Ansprüche 7 bis 10 zur Untersuchung von biologischen, biochemischen, pharmazeutischen, medizinischen und/oder Umweltproben.
- 20 12. Verwendung nach Anspruch 11 zur Analyse von Blutproben mit intakten roten Blutkörperchen, für den Aufschluß im Protein- und Molekularbereich, für Proteinsysteme oder Zellkulturen sowie für die Pharmakokinetik und/oder Pharmakodynamik.

Fig. 1

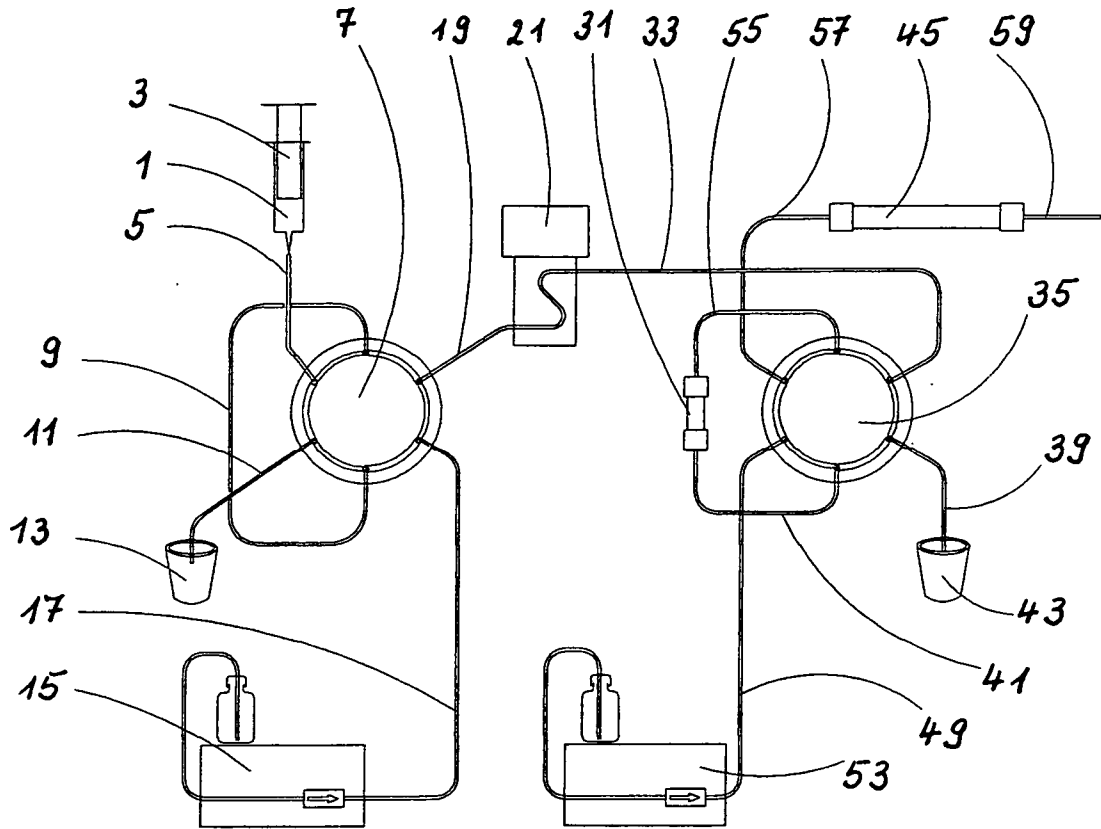


Fig. 2

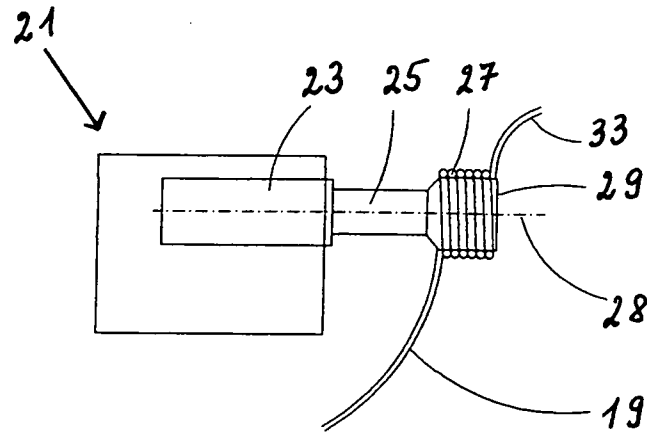
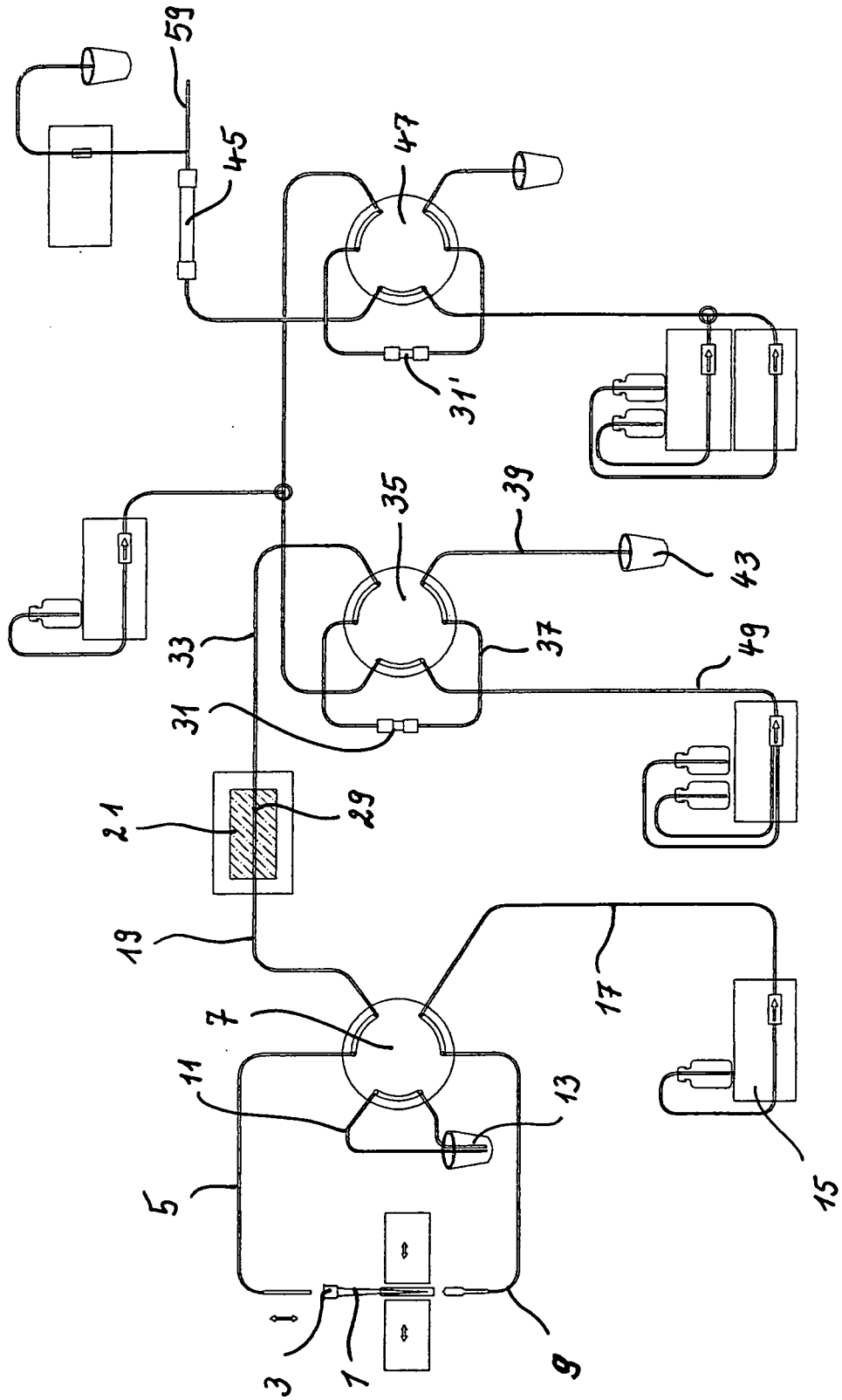


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/007823

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. G01N30/06 B01F11/02 B02C19/18 G01N1/28 B01J19/10
 B06B1/00 B06B3/00
 ADD.
 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 B01F B02C B01J B06B

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, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2007/277596 A1 (KIM EUN-HEE [KR] ET AL) 6 December 2007 (2007-12-06) abstract paragraphs [0013], [0051] paragraphs [0056] - [0059] figure 6	1,3,7-9, 11,12 2,4-6,10
X Y	US 2004/054286 A1 (AUDAIN VAUGHN A [US] ET AL) 18 March 2004 (2004-03-18) abstract paragraphs [0040] - [0043] paragraphs [0048] - [0053] figures 2-4	7-9,12, 13 10,11
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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 13 April 2011	Date of mailing of the international search report 21/04/2011
--	--

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 Bravin, Michel
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/007823

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 553 054 A2 (SLAGTERIERNES FORSKNINGSINST [DK]) 28 July 1993 (1993-07-28) abstract figures 1,2	2,10
Y	----- WO 2007/038003 A1 (WATERS INVESTMENTS LTD [US]; BUCHANAN JOHN [US]; DELLAROVERE DENNIS [U] 5 April 2007 (2007-04-05) abstract page 2, line 9 - page 3, line 13 page 4, line 23 - page 5, line 6 page 6, line 9 - line 18 page 8, line 22 - page 10, line 17 figures 2a-2b	5,6
Y	----- JP 2001 340452 A (NAGAURA YOSHIKI) 11 December 2001 (2001-12-11) abstract figure 1	4
Y	----- JP 11 230970 A (HITACHI LTD) 27 August 1999 (1999-08-27) abstract figure 1	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2010/007823

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007277596 A1	06-12-2007	WO 2006080761 A1	03-08-2006
US 2004054286 A1	18-03-2004	NONE	
EP 0553054 A2	28-07-1993	DK 8092 A	23-07-1993
WO 2007038003 A1	05-04-2007	EP 1926538 A1	04-06-2008
		JP 2009508729 T	05-03-2009
		US 2010230954 A1	16-09-2010
JP 2001340452 A	11-12-2001	NONE	
JP 11230970 A	27-08-1999	JP 3418329 B2	23-06-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2010/007823

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N30/06 B01F11/02 B02C19/18 G01N1/28 B01J19/10 B06B1/00 B06B3/00 ADD. Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N B01F B02C B01J B06B 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, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X Y	US 2007/277596 A1 (KIM EUN-HEE [KR] ET AL) 6. Dezember 2007 (2007-12-06) Zusammenfassung Absätze [0013], [0051] Absätze [0056] - [0059] Abbildung 6 -----	1,3,7-9, 11,12 2,4-6,10
X Y	US 2004/054286 A1 (AUDAIN VAUGHN A [US] ET AL) 18. März 2004 (2004-03-18) Zusammenfassung Absätze [0040] - [0043] Absätze [0048] - [0053] Abbildungen 2-4 ----- -/--	7-9,12, 13 10,11
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> 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		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
13. April 2011		21/04/2011
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 Bravin, Michel

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 553 054 A2 (SLAGTERIERNES FORSKNINGSINST [DK]) 28. Juli 1993 (1993-07-28) Zusammenfassung Abbildungen 1,2	2,10
Y	----- WO 2007/038003 A1 (WATERS INVESTMENTS LTD [US]; BUCHANAN JOHN [US]; DELLAROVERE DENNIS [U]) 5. April 2007 (2007-04-05) Zusammenfassung Seite 2, Zeile 9 - Seite 3, Zeile 13 Seite 4, Zeile 23 - Seite 5, Zeile 6 Seite 6, Zeile 9 - Zeile 18 Seite 8, Zeile 22 - Seite 10, Zeile 17 Abbildungen 2a-2b	5,6
Y	----- JP 2001 340452 A (NAGAURA YOSHIKI) 11. Dezember 2001 (2001-12-11) Zusammenfassung Abbildung 1	4
Y	----- JP 11 230970 A (HITACHI LTD) 27. August 1999 (1999-08-27) Zusammenfassung Abbildung 1	11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/007823

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2007277596 A1	06-12-2007	WO 2006080761 A1	03-08-2006
US 2004054286 A1	18-03-2004	KEINE	
EP 0553054 A2	28-07-1993	DK 8092 A	23-07-1993
WO 2007038003 A1	05-04-2007	EP 1926538 A1	04-06-2008
		JP 2009508729 T	05-03-2009
		US 2010230954 A1	16-09-2010
JP 2001340452 A	11-12-2001	KEINE	
JP 11230970 A	27-08-1999	JP 3418329 B2	23-06-2003