



## Bio-farmaceutische bepaling van geneesmiddelen

Deel IIc, vervolg

H. Lingeman  
Afdeling Analytische Chemie en  
Toegepaste Spectroscopie  
Vrije Universiteit, De Boelelaan 1083,  
1081 HV Amsterdam

### Vervolg 2.11

#### A. Apolaire fasen (RP extracties):

Apolaire fasen worden gebruikt voor RP extracties onder zure, basische en neutrale condities en worden, in principe, gebruikt voor de extractie van ongeladen analieten. In het geval van geladen verbindingen kunnen de IS of IP variant worden gebruikt. Analieten worden voornamelijk door middel van van der Waals, dipool geïnduceerde dipool, of  $\pi$ -interacties aan de fase gebonden. Er worden met name op silica gebaseerde en polymere fasen gebruikt.

#### Chemisch gemodificeerde silica fasen:

SPE op apolaire fasen wordt in verreweg de meeste gevallen uitgevoerd op chemisch gebonden silica fasen. Dit heeft een aantal redenen, waarvan de belangrijkste zijn: goed reproduceerbare resultaten, goede stabiliteit en inerte van de fasen, goed

gedefinieerd retentiemechanisme, beschikbaarheid van grote verscheidenheid aan commercieel verkrijgbare cartridges, groot toepassingsgebied en groot aantal toepassingen dat al beschreven is.

De keuze van de juiste vaste fase hangt af van de relatieve interactie tussen de analiet en de mobiele fase en de interactie tussen de analiet en de vaste fase en om een goede selectiviteit te krijgen moet de sterkte van de elutievlloeistof zo laag mogelijk worden gehouden. Dit betekent bijvoorbeeld dat indien gekozen kan worden tussen een C-8 en een C-18 fase, de octylfase de voorkeur heeft omdat dan een elutievlloeistof kan worden gebruikt met een lager percentage aan organische modifier (dus een kleinere elutiesterkte). Een probleem bij het gebruik van silica fasen kan zijn dat tijdens de extractie kationen vrijkomen van de vaste fase die dan kunnen complexeren met de analiet(en). Het toevoegen van EDTA en/of citraat kan dit probleem vaak voorkomen. Om irreversibele adsorpties aan vrije silanol groepen te voorkomen kan de vaste fase worden verzadigd met een surfactant (b.v. cetrimide).

#### Polymere fasen:

De meest gebruikte polymere fasen zijn afgeleid van het copolymeer van styreen en divinylbenzeen (b.v. PRP-1, PLRP-S, XAD, SDB) (Tabel 6).

Amberlite XAD-2, een neutrale hydrofobe vorm van XAD, heeft als positieve eigenschappen dat het weinig zwelt en krimpt bij hydratatie/ dehydratatie en omdat het macroporeus is kan het gebruikt worden voor de opzuivering van urine en plasma monsters. De interacties op deze fase zijn vaak enigszins sterker dan op C-18 silica. Een belangrijk voordeel, ten opzichte van silica fasen, is dat XAD polymeren bij alle pH waarden tussen 1 en 13 gebruikt kunnen worden en daarom veel toegepast worden bij de gelijktijdige extractie van zure, basische en neutrale verbindingen. Verder zijn er geen residuele silanolgroepen aanwezig die voor storende interacties kunnen zorgen. Met name voor de extractie van zeer polaire fase 2 metabolieten (b.v. glucuroniden, sulfaten) geeft dit type fase goede resultaten. Een nadeel kan zijn dat het activeren / conditioneren van de cartridge voor gebruik tamelijk veel tijd kost. Behalve in de boven-

Tabel 6 Eigenschappen van XAD materialen

Type	Samenstelling	Karakter	Porie-diameter (nm)	Specifiek oppervlak (m <sup>2</sup> /g)	Specifiek porie-volume (ml/g)	Vloeistof-opname (g/g)
XAD-1	SDB	hydrofoob	20	100	0.7	-
XAD-2	SDB	hydrofoob	9	295	0.7	0.7
XAD-4	SDB	hydrofoob	5	750	1.0	1.1
XAD-7	methylacrylaat polymeer	matig hydrofiel	8	450	1.1	2.1
XAD-8	methylacrylaatpolymeer	matig hydrofiel	25	140	0.8	1.3
XAD-12 polaire N-O groepen	hydrofiel	1300	22	0.8	-	-

genoemde vorm is dit materiaal ook verkrijgbaar als sterk gecrosslinkte sferische deeltjes (b.v. PRP-1, PLRP-S, SDB). Deze materialen hebben een sterk verbeterde chemische weerstand waardoor het gecombineerd kan worden met de meeste organische vloeistoffen en het ook onder hogedruk toegepast kan worden. Het belangrijkste nadeel van deze copolymeren is dat de efficiëntie beperkt is. Het toevoegen van 1% dichloormethaan kan dit aanzienlijk verbeteren omdat hierdoor het materiaal iets zal gaan zwellen.

Een organisch polymeer die de laatste paar jaar steeds vaker wordt toegepast is geactiveerde koolstof. Koolstof, dat in verschillende vormen kan voorkomen is als sorbens hydrofober dan C-18 en SDB. Grafiet-achtig koolstof (graphitized carbon) wordt gemaakt door koolstof tot 3.000 °C te verhitten in een inerte omgeving. Het resultaat is dat verontreinigingen zoals teer en vluchtige componenten verwijderd worden en er een kristallijne structuur ontstaat. Een speciale vorm is het macroporeuze grafiet-achtig koolstof. Dit materiaal wordt verkregen door een silica matrix te impregneren met een fenol-formaldehyde of fenol-hexamine mengsel. Het gevolg hiervan is dat de interactiekrachten anders zijn dan op de meeste koolstof fasen door de aanwezigheid van actieve plaatsen, waardoor er behalve hydrofobe interacties ook  $\pi$ - en dipool interacties aanwezig zijn. Het activeren van koolstof fasen kan gebeuren door de cartridge achtereenvolgens te spoelen met chloroform, methanol en water. Hierna kan het monster opgebracht worden, kan er met een waterige vloeistof worden gewassen gevolgd door hexaan om de restanten water te verwijderen. Elutie kan bijvoorbeeld plaatsvinden met een mengsel van chloroform en methanol.

Een belangrijk aspect bij het gebruik van organische polymeren, in het algemeen, is dat deze een groter specifiek oppervlak hebben (600-1200 m<sup>2</sup>/g).

### **Methode ontwikkeling voor neutrale verbindingen:**

Indien niet bekend is welke fase gebruikt moet worden, kunnen het beste 3 fasen met een verschillend interactiemechanisme (b.v. C-18, PH, CN) worden getest. Een algemene procedure om te bepalen welke fase het laagste achtergrondsignaal, afkomstig van de matrix, geeft is:

- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume methanol,
- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume water,
- opbrengen van de matrix op de cartridge en deze door laten lopen,
- wassen van de cartridge met 1 cartridge volume water,
- elueren met 2 x 0,5 ml methanol,
- injecteren van een aliquot in een geschikt LC systeem.

Om nu de meest geschikte fase te vinden voor de extractie van de analiet, worden dezelfde 3 fasen op de volgende manier getest:

- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume methanol,
- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume water,
- opbrengen van de analiet (in een waterige oplossing) op de cartridge en deze door laten lopen,
- wassen van de cartridge met 1 cartridge volume water,
- elueren met 2 x 0,5 ml methanol,
- injecteren van een aliquot in een geschikt LC systeem.

Aan de hand van de nu verkregen gegevens kan het fase systeem worden gekozen en verder geoptimaliseerd.

Om voortijdig elueren van de analieten van de cartridge te voorkomen kan het beste een wasvloeistof worden gekozen waarbij de  $k'$  van de analiet(en) in de orde van  $3 < k' < 10$  ligt. Indien een LC bepaling bekend is van deze verbinding dan kan als wasvloeistof het eluens dat tijdens de LC scheiding wordt gebruikt worden gekozen. Meestal is het nu mogelijk om met 5-10 bed volumina

te wassen. Indien de analiet(en) hierbij te vroeg van de kolom komen moet een wasvloeistof worden gekozen met 10% minder aan organische modifier.

De elutievloeistof moet zodanig worden gekozen dat de analiet(en) net elueren – de  $k'$  moet ongeveer 2 zijn – terwijl lipofiele en sterk hydrofobe verbindingen nog op de kolom blijven zitten. Het voordeel van deze benadering is dat relatief schone monsters worden verkregen, maar het nadeel is dat een relatief groot volume nodig is. Dit betekent weer dat een concentreringsstap nodig is. Omdat verdamping van waterige monsters nogal tijdrovend is, is vriesdrogen vaak een goed alternatief. Indien de normale elutievloeistoffen (b.v. acetonitril, methanol) niet krachtig genoeg zijn, kan een mengsel (1:1) met dichloormethaan of ethylacetaat worden gebruikt. Bij gebruik van dit soort elutievloeistoffen is het wel belangrijk dat de cartridge eerst wordt gedroogd om alle sporen water uit de silica matrix te verwijderen. De reden is dat apolaire vloeistoffen als dichloormethaan niet in staat zijn om voor een goede bevochtiging van de vaste fase te zorgen waardoor slechte recoveries kunnen worden verkregen.

Een uiterst belangrijke stap tijdens de ontwikkeling van iedere SPE procedure is het uitvoeren van blanco extracties, dit om er zeker van te zijn dat er geen storende componenten vrijkomen uit de cartridge, de frits en/of de vaste fase. Indien er een probleem wordt verwacht kan de cartridge worden gespoeld met een organisch oplosmiddel (b.v. methanol, acetonitril) of verdund zuur (b.v. 0,01 M salpeterzuur).

### **Methode ontwikkeling voor geladen verbindingen**

RP-SPE kan eveneens worden gebruikt voor de extractie van geladen verbindingen. Een verandering van de pH van de was- of elutievloeistoffen zal bij zure, basische en amfotere verbindingen een ver-

andering in de lading tot gevolg hebben en dus in de retentie als RP-SPE wordt gebruikt. De regel is dat geladen verbindingen relatief hydrofiel zijn (kleine  $k'$ ) en dat ongeladen verbindingen relatief hydrofoob zijn (grote  $k'$ ).

Als gevolg hiervan is de keuze van de buffer erg belangrijk en dit betekent weer dat een fosfaat of een acetaat buffer niet zo maar gebruikt kan worden (Tabel 7). Dit houdt in dat voor iedere pH een geschikte buffer gevonden moet worden. Citraat buffers hebben het nadeel dat ze corrosie van roestvast staal kunnen veroorzaken. Ammonia en formiaat buffers zijn relatief vluchtig en TRIS en diethylamine buffers zijn niet altijd zuiver. Een andere belangrijke parameter kan de eigen absorptie van de buffer ionen zijn.

Het opzetten van een methode gaat ongeveer op dezelfde manier als het ontwikkelen van een RP-SPE methode voor neutrale verbindingen. Er zijn echter enkele belangrijke verschillen:

- De keuze van het type buffer ionen, de ionsterkte en de pH komen nu veel kritischer. Het type buffer ionen is belangrijk voor de buffer

**Tabel 7** Buffers voor vaste-fase extracties

Buffer	pKa	Buffer bereik
Fosfaat	2,1	1,1-3,1
Citraat	3,1	2,1-4,1
Formiaat	3,8	2,8-4,8
Citraat	4,7	3,7-5,7
Citraat	5,4	4,4-6,4
Fosfaat	7,2	6,2-8,2
TRIS	8,3	7,3-9,3
Ammonia	9,2	8,2-10,2
Boraat	9,2	8,2-10,2
Diethylamine	10,5	9,5-11,5
Fosfaat	12,3	11,3-13,3

capaciteit en eventuele secundaire effecten. Terwijl de pH misschien wel de belangrijkste retentie bepalende factor is.

- Sporen van metalen die in de vaste fase aanwezig zijn, kunnen complexen vormen met bepaalde anionen (b.v. citraat, fosfaat) waardoor een te klein doorbraakvolume of een te groot elutievolume wordt verkregen.
- Omdat de meeste zouten beter oplosbaar zijn in methanol dan in acetonitril, heeft methanol vaak de voorkeur bij dit soort extracties.
- Door additionele secundaire interacties is bandverbreding eerder een probleem dan bij de extractie van neutrale verbindingen. Dit komt ondermeer door interactie van de aanwezige vrije silanol groepen met basische verbindingen. Acetaat ionen kunnen worden gebruikt om de aanwezige basische groepen op de vaste fase af te schermen, terwijl een eenvoudig symmetrisch primair amine (b.v. triethylamine, tributylamine) gebruikt kan worden om de zure groepen af te schermen (zie Deel IIa).

De extractie van zwakke zuren en/of basen kan het beste gebeuren met behulp van RP-IS SPE, waarbij de pH zo laag mogelijk gehouden moet worden. Indien zowel zure als basische functies aanwezig zijn, wordt een pH van 3-4 gekozen en wordt indien nodig een IP reagens toegevoegd om de retentie van de geladen verbindingen te regelen.

RP-IP SPE heeft enkele voordelen ten opzichte van de eerder besproken technieken: betere retentie voor polaire ionen, betere resolutie bij de extractie van mengsels van zure, basische en neutrale verbindingen en meer mogelijkheden om de retentie te variëren.

Er zijn echter ook een aantal nadelen verbonden aan RP-IP SPE: de evenwichtsinstellingen op de cartridge kunnen lang duren, waardoor de debieten laag moeten worden

gehouden en het is een tamelijk ingewikkeld systeem dat moeilijker is te optimaliseren en daarom ook vaak relatief veel tijd vraagt.

RP-IP SPE wordt uitgevoerd door aan de conditionerings- en wasvloeistoffen, en soms aan het elutie-middel, een IP reagens toe te voegen. Veel gebruikte IP reagentia zijn alkylsulfonaten voor de extractie van basische verbindingen en kwaternaire ammoniumverbindingen voor de extractie van zure verbindingen. De retentie van de analieten in een IP systeem hangt af van de volgende parameters: keuze van het IP reagens (tegen ion), grootte en vorm van het IP reagens, concentratie van het IP reagens, keuze van de organische modifier, percentage van de organische modifier, pH, keuze bufferionen, ionsterkte, temperatuur en de vaste fase.

De algemene regel is dat des te hydrofober het tegenion is en des te hoger de concentratie hiervan, des te beter het IP vastgehouden zal worden. Het toevoegen van een organische modifier heeft hier hetzelfde effect als bij gewone RP-SPE. De pH is van invloed op de lading van de analiet(en) en bepaalt in welke mate het IP gevormd kan worden. Bufferionen kunnen in sommige gevallen zelf ook als IP reagens dienen, terwijl hoge bufferionen concentraties uitzouteffecten teweeg kunnen brengen.

*Wordt vervolgd*