



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 2.8

Interacties en selectiviteit

Bij gebruik van apolaire fasen (RP-SPE) geldt dat voornamelijk zwakke interactiekrachten (2 Kcal/mol), zoals dispersie of van der Waals krachten, een rol spelen. De reden dat het retentievermogen van de meeste RP-SPE materialen toch tamelijk groot is komt doordat deze krachten meestal cumulatief zijn. De vaste fasen die in dit geval worden gebruikt bestaan uit gemodificeerd silica (b.v., C-18 → C-1, PH, CN, CH) of polymere materialen (b.v. SDB). De analieten zullen in het algemeen een relatief apolair karakter hebben, terwijl de matrix in veel gevallen een polair c.q. 'waterig' karakter heeft. Elutie van de analieten zal plaats vinden met methanol of een oplosmiddel met nog hogere elutiesterkte, dit afhankelijk van de oplosbaarheid van de analieten en de interacties hiervan met de vaste fase.

Bij gebruik van NP-SPE op een polaire vaste fase spelen polaire interacties zoals dipool-dipool en H-brug vorming een belangrijke rol. NP-SPE kan gebruikt worden voor analiet(en) die goed of redelijk goed oplosbaar zijn in organische oplosmiddelen. De matrix bestaat in dit geval veelal uit een extract van de analiet(en) in een geschikt organisch oplosmiddel zoals dichloormethaan, hexaan of ethylacetaat. Het gevolg hiervan is dat NP-SPE vaak wordt toegepast in combinatie met een LLE procedure om de selectiviteit van de totale analyse te verbeteren. Als vaste fasen worden zowel niet gemodificeerd silica en alumina gebruikt alsmede de chemisch

gemodificeerde polaire silica fasen. De elutie vindt plaats door organische oplosmiddelen te gebruiken met een hoge elutiesterkte (meer polair).

Indien IE-SPE wordt toegepast zal het duidelijk zijn dat ionogene interacties een prominente plaats innemen. Deze electrostatische interacties zijn veel sterker (50-200 Kcal/Mol) dan de eerder besproken hydrofobe interacties waardoor analieten veel beter worden vastgehouden, maar waardoor ook de elutie veel moeilijker verloopt. IE fasen kunnen zowel op silica als op een polymeer zijn gebaseerd en op het oppervlak zijn of sterke of zwakke ion-wisselingsgroepen aanwezig. De analieten moeten een ionogeen of ioniseerbaar karakter hebben, terwijl deze in het algemeen in een waterige matrix met een lage ionsterkte (< 0,1 M) aanwezig moeten zijn. Verder is het belangrijk dat in het monster geen tegenionen met een hoge selectiviteit aanwezig zijn. Elutie van de analieten kan plaatsvinden door de pH te veranderen of door het toevoegen van een geschikte buffer, met een hoge(re) ionsterkte of het gebruik van meer selectieve tegenionen.

In de praktijk zijn het echter vaak meervoudige interacties die het retentiemechanisme van een verbinding verklaren. Een bekend voorbeeld is de combinatie van apolaire en ionogene interacties. Dit heeft vaak als voordeel dat het doorbraakvolume van de analieten toeneemt, maar als nadeel dat het elutievolume eveneens toeneemt.

Silanol activiteit:

Een belangrijk probleem bij het gebruik van gemodificeerde silica materialen is dat zelfs na een zeer goed uitgevoerde afschermings (endcappen) procedure slechts maximaal 70% van alle vrije silanol

groepen afgeschermd kan worden, hetgeen betekent dat er nog voldoende groepen over blijven die tijdens een extractie kunnen storen. De pKa van een silanolgroep is niet eenvoudig vast te stellen omdat deze sterk wordt beïnvloed door zijn omgeving. Wel kan worden gesteld dat bij een pH < 2 silica ongeladen en bij een pH > 2 silica negatief geladen is en dat de lading toeneemt bij hogere pH. Omdat de interactiekrachten van ionogene bindingen groter zijn dan van hydrofobe interacties, levert dit meestal een complex retentiemechanisme op. Het gevolg hiervan is dat het retentiedrag moeilijk is te voorspellen en dat piekverbreding en piektailing kan optreden.

Om de ongewenste invloeden van de aanwezige residuele silanolgroepen te verminderen kunnen silica fasen, zoals gezegd, worden afgeschermd. Dit kan gebeuren met behulp van een covalente reactie of met behulp van een dynamische reactie. Reagentia die in dit laatste geval worden gebruikt zijn triethylamine of ammoniumacetaat. Een ander alternatief is het aanpassen van de pH. Dit kan op twee manieren gebeuren: bij een pH van < 4 waardoor silica zelf ongeladen is of het kiezen van een pH waarbij de analiet(en) geen lading meer hebben. Belangrijk is dan dat er geen pH wordt gekozen waarbij de analiet(en) instabiel zijn. Een mogelijkheid die de laatste paar jaar steeds belangrijker wordt is het kiezen van de juiste vaste fase, dit omdat fabrikanten tegenwoordig speciaal zuur- of base-gedeactiveerde materialen op de markt brengen.

Indien het niet mogelijk is om de activiteit van de silanolgroepen in voldoende mate terug te dringen is het mogelijk om de ionsterkte, van de conditionerings- en wasvloei-

fen en van het monster te verhogen zodat er geen competitie met de vrije silanolgroepen meer kan optreden. Een voorbeeld om de activiteit van de vrije silanolgroepen te verminderen is beschreven voor de extractie van chloorpromazine met behulp van een C-18 cartridge. De vaste fase wordt eerst geactiveerd met methanol gevolgd door een conditionering met een waterige oplossing van tetramethylammonium hydroxide (TMAH). Het doel van deze stap is om de silanolgroepen te neutraliseren en de analiet(en) alleen met behulp van niet-specifieke hydrofobe interacties vast te houden. Hierna wordt het monster opgebracht en wordt er met water gewassen. Aan beide vloeistoffen wordt TMAH toegevoegd om te voorkomen dat het amine van de cartridge wordt gespoeld. In de volgende stap wordt de cartridge onder stikstof gedroogd en wordt de analiet met chloroform geëluëerd. Chloroform is gekozen in dit geval om dat TMAH hierin slecht oplost. Een selectieve opzuivering vindt vervolgens plaats met behulp van een geactiveerde silica cartridge.

De aanwezigheid van vrije silanolgroepen is niet altijd een nadeel in SPE procedures, in een aantal gevallen kan dit worden gebruikt om het doorbraakvolume te verhogen of om de selectiviteit te verbeteren. Om gebruik te kunnen maken van de aanwezige vrije silanolgroepen moet een niet afgeschermd silica fase worden gebruikt en moet de pH van de conditionerings buffer minimaal 3 zijn. Om reproduceerbaar te kunnen werken is het belangrijk dat een buffer wordt toegepast en niet alleen aangezuurd water. Een aardig voorbeeld hiervan is de extractie van salbutamol vanuit plasma. In dit geval wordt niet gemodificeerd silica gebruikt en wordt de cartridge geactiveerd en geconditioneerd met methanol en een geschikte buffer. Vervolgens wordt het monster opgebracht en wordt salbutamol vastgehouden door ionogene interacties met de aanwezige silanolgroepen. Het wassen van de cartridge

gebeurt achtereenvolgens met water en acetonitril. Acetonitril kan in dit geval worden gebruikt omdat de analiet door ionogene interacties wordt vastgehouden, waardoor het organisch oplosmiddel in staat is verbindingen die door hydrofobe interacties worden vastgehouden te verwijderen. Elutie van salbutamol gebeurt met methanol dat 0,5% ammonium acetaat bevat.

Hergebruik van fasen:

Indien cartridges worden bewaard in hun originele (vacuüm) verpakking kunnen ze gedurende lange tijd worden bewaard. Indien de verpakking is geopend is het belangrijk dat de-activering onder invloed van vocht wordt vermeden. Eén van de mogelijkheden is het verwijderen van de lucht uit de verpakking en vervolgens het bewaren onder vacuüm.

SPE cartridges kunnen zoals gezegd worden hergebruikt, door ze na een elutie opnieuw te conditioneren / activeren, maar bij de extractie van volbloed of andere monsters die hoge concentraties aan eiwitten of vetachtige verbindingen bevatten is dit zeker niet aan te bevelen.

In de literatuur wordt een procedure beschreven die gebruikt kan worden om C-18 cartridges te regenereren nadat deze gebruikt zijn voor de extractie van peptiden uit biologisch materiaal. Allereerst worden de cartridges gewassen met 4 ml methanol of acetonitril, gevolgd door 4 ml 8 M ureum en 4 ml water. Hierna kan de hele procedure van activering en conditionering weer opnieuw worden uitgevoerd. Een voorbeeld is beschreven voor het peptide oxytocine. Dit kan bijvoorbeeld vanuit een celcultuur worden geëxtraheerd met behulp van RP-SPE. Zonder verlies in recovery kan een cartridge 5 maal worden gebruikt. De regeneratie vindt in dit geval plaats met 3 ml methanol.

2.9 Methode ontwikkeling

Bij het ontwikkelen van een SPE procedure voor analiet(en) met een

molecuulgewicht van < 500 kunnen de volgende richtlijnen worden toegepast:

1. Bestudeer de literatuur of er voor de analiet(en), of verbindingen met een vergelijkbare structuur, al SPE f LC procedures zijn beschreven. De aard van de functionele groepen en de totale polariteit van het molecuul zijn hierbij de belangrijkste factoren.
2. Bestudeer de fysisch-chemische eigenschappen van de analiet(en). Het gaat hier bijvoorbeeld om de oplosbaarheid en de ionisatie mogelijkheden van het molecuul. Kennis omtrent deze parameters geeft aan welk retentiemechanisme (b.v. ion-wisseling, hydrofobe interactie) er gebruikt kan worden.
3. De polariteit van de matrix bepaalt met name welke fase er gebruikt kan worden. Bij waterige monsters, met neutrale analiet(en), kan bijvoorbeeld het beste een hydrofobe interactie met behulp van een apolaire fase worden gebruikt.
4. Indien voor de analiet(en) al een LC methode beschikbaar is dan geeft de samenstelling van het LC eluens informatie omtrent de elutie condities die gebruikt kunnen worden.
5. Indien voor de LC scheiding een RP systeem wordt gebruikt, dan is het belangrijk om verschillende apolaire fasen uit te testen. De pH is in veel gevallen een belangrijke parameter om de retentie, en dus het doorbraakvolume, van een verbinding te regelen. In het algemeen wordt een sorbens gebruikt waarvan de polariteit ongeveer overeenkomt met die van de analiet(en) in het monster van tegenovergestelde polariteit. Dit betekent dat bij een relatief apolair molecuul, dat aanwezig is in een waterig monster, bij voorkeur een octyl (C-8) of een octadecyl (C-18) fase wordt gebruikt, dat relatief polaire wasvloeistoffen en een

relatief apolaire elutievloeistof worden toegepast.

6. Belangrijk is het om de recoveries van de analiet(en), zowel opgelost in water als in het monster met elkaar te vergelijken. Dit kan in een aantal gevallen grote verschillen geven doordat de analiet(en) een interactie aangaan met matrix componenten. Bekende voorbeelden zijn de binding van geneesmiddelen aan plasma eiwitten en de adsorptie van bestrijdingsmiddelen aan humus bestanddelen. In de meeste gevallen betekent dit dat de recoveries in echte monsters significant lager zijn dan in water. Het omgekeerde effect is echter ook waargenomen. Plasma eiwitten kunnen bijvoorbeeld actieve silanol groepen, aanwezig op het sorbens, afschermen waardoor de recoveries in plasma hoger zijn dan in water.
7. De elutie van de analiet(en) van de cartridge moet op een zodanige manier plaatsvinden dat het monster niet onnodig wordt verdund.
8. De hoeveelheid vaste fase kan aangepast worden aan het probleem. Wel moet opgemerkt worden dat meer sorbens natuurlijk

een grotere capaciteit met zich meebrengt, maar ook grotere elutievolumina. Dit is dan ook de reden dat vaak de voorkeur wordt gegeven aan 100 mg cartridges.

Andere factoren die belangrijk zijn bij het ontwikkelen van een SPE procedure zijn:

1. De zuivere standaard van de analiet(en) moet beschikbaar zijn.
2. Gegevens met betrekking tot de structuur en de fysisch-chemische eigenschappen van zowel de analiet(en) als de matrix moeten beschikbaar zijn. Verder is het belangrijk of de analiet(en) functionele groepen bevatten die voor de extractie gebruikt kunnen worden en of deze groepen anders zijn dan de functionele groepen die in de matrix aanwezig zijn. De concentratie of het concentratiegebied van de analiet(en) bepaalt mede het retentiemechanisme dat kan worden toegepast.
3. Het doel van de extractie moet vanaf het begin duidelijk zijn. Is het alleen verwijdering van storende componenten, is het een verbetering van de detectie of is het verwijderen van verbindingen die de levensduur van de analytische kolom verminderen?

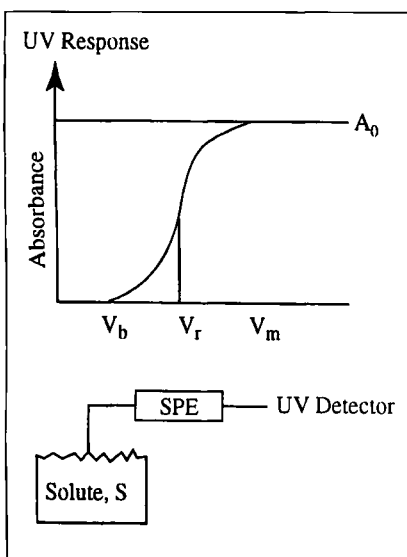
4. Allereerst moet een methode worden ontwikkeld voor de zuivere standaard om hiermee de detecteerbaarheid, gevoeligheid, lineariteit, reproduceerbaarheid, etc. te bepalen. Indien de extracten vervolgens met LC worden bepaald kunnen de gegevens van beide methoden met elkaar vergeleken worden.

5. Belangrijk is dat de selectiviteit op twee manieren wordt bekeken in SPE: Selectiviteit ten opzichte van de analiet(en), door het kiezen van de juiste vaste fase en additionele selectiviteit door het kiezen van de juiste elutievloeistof.

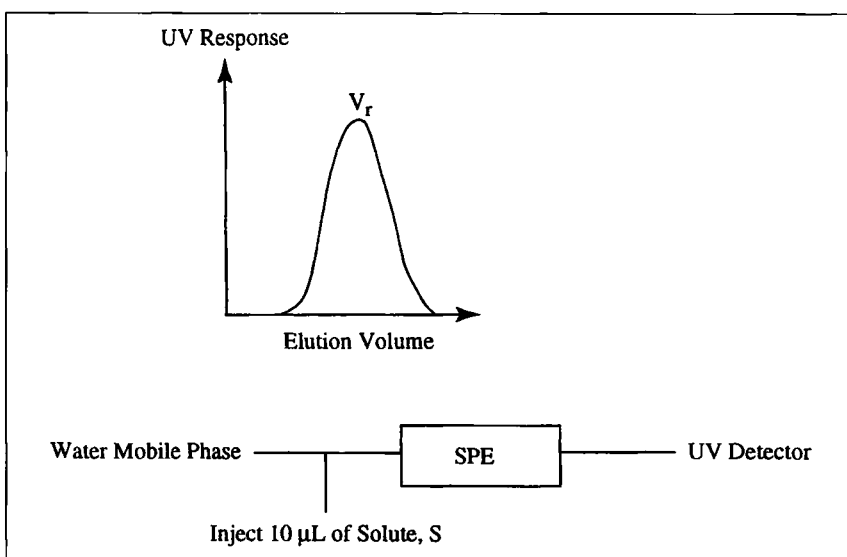
Om een SPE procedure te optimaliseren, kan een radioactief gelabelde verbinding worden gebruikt. Door de hoeveelheid radioactiviteit in de verschillende fracties te bepalen kan bijzonder snel een probleem worden gelokaliseerd of de exacte recovery worden bepaald.

Een alternatief voor het gebruik van radiogelabelde verbindingen is om een oplossing van de analiet door verschillende cartridges te laten lopen en vervolgens de verschillende fracties op aanwezigheid van de analiet te onderzoeken. De fasen die de analiet vasthouden worden in een volgende stap geëluëerd met

Figuur 4a



Figuur 4b



Figuur 4 Bepaling van doorbraakvolume met behulp van 'frontal chromatography' techniek (a) en bepaling van doorbraakvolume met behulp van elutie chromatografie (b).

1 ml hoeveelheden methanol, 0,1 M ammonia in methanol en 0,1 M ajijszuur in methanol en dit wordt net zo lang vol gehouden totdat er elutie plaatsvindt. Een derde mogelijkheid om recoveries te bepalen is door gebruik te maken van een 'nulmonster'. Dit is een monster dat al is geëxtraheerd en dus geen analiet(en) meer mag bevatten.

2.10 Doorbraakvolume en capaciteit

De hoeveelheid monster die op een cartridge gebracht kan worden is afhankelijk van een aantal parameters: de concentratie van alle verbindingen die in het monster aanwezig zijn, elutiesterkte van de matrix, keuze van de vaste fase, hoeveelheid van de vaste fase en capaciteitsfactor van de analiet(en).

Het doorbraakvolume en de capaciteit van de cartridges zijn hiervan de belangrijkste parameters. De capaciteit van de meeste commercieel verkrijgbare cartridges is, bij een goede keuze van de cartridge, zelden de beperkende factor. Het doorbraakvolume is vaak wel een kritische parameter. Deze parameter bepaalt de hoeveelheid monster, de hoeveelheid van de analiet in een gegeven hoeveelheid van een bepaald oplosmiddel, dat op de cartridge kan worden gebracht, zonder dat het doorbreekt (afgespoeld wordt).

Zie Figuur 4 hiernaast.

Er zijn een aantal manieren om het doorbraakvolume te bepalen. Eén van de mogelijkheden is om gebruik te maken van 'frontal chromatography' (FC). Bij FC wordt een monster continu over de cartridge geleid, tot het moment dat de verbindingen in dit monster in het eluens verschijnen (Figuur 4A). Het doorbraakvolume kan met behulp van een eenvoudige opstelling, als weergegeven in Figuur 4A, worden bepaald. De analiet (S) wordt in een relatief hoge concentratie opgelost in een geschikt oplosmiddel en deze op-

Schema 1 Methode ontwikkeling matrix afhankelijke SPE

Waterige matrix	----->	RP, IP of IE SPE
Polaire organische matrix	----->	Na verdunnen met water: RP, IP of IE SPE
Apolaire organische matrix	----->	NP SPE
Vaste matrix	----->	Solubiliseren door verdunnen met geschikt oplosmiddel en vervolgens kiezen uit één van de hierboven genoemde categorieën

Schema 2 Methode ontwikkeling analiet afhankelijke SPE

Geïoniseerde analiet	----->	IS, IP of IE SPE
Polaire analiet	----->	NP SPE
Apolaire analiet	----->	RP SPE

lossing wordt via de cartridge naar een UV detector gepompt. Indien er geen cartridge aanwezig is dan wordt de absorptie van de analiet op A_0 gesteld. In het begin zal de analiet volledig worden vastgehouden op de cartridge en zal er geen signaal zijn. Op een bepaald moment wordt de analiet niet meer volledig vastgehouden en zal deze gaan doorbreken (V_b) en zal de absorptie toenemen totdat deze gelijk is aan A_0 (V_m). V_b wordt meestal gedefinieerd als zijnde 1% van A_0 en V_m als 99% van A_0 . In het ideale geval is de gevonden doorbraakcurve logaritmisch van vorm en komt het buigpunt overeen met het retentievolumen (V_r). V_r is een bekende grootte uit de LC en kan als volgt worden bepaald:

$$V_r = V_0 (1 + k')$$

Dit betekent dat V_b ook berekend kan worden indien de k' van de analiet in water bekend is. De k' in water kan vaak worden berekend door extrapolatie. Dit omdat er meestal een lineair verband bestaat tussen de $\log k'$ en het percentage modifier. Een berekening kan op de volgende manier worden uitgevoerd, aannemende dat een 100 mg C-18 cartridge wordt gebruikt met een porositeit van 0,65. V_0 is voor een 100 mg cartridge ongeveer 120 μ l.

$$V_r = V_0 (1 + k')$$

$$V_b = V_r - 2\sigma_v$$

$$\sigma_v = V_0 (1 + k') / \sqrt{N}$$

Een aardige waarde voor N, voor SPE cartridges, is ca. 20. Dit betekent dat een verbinding met een k' van 10 in water het doorbraakvolume slechts 0,7 ml is en dat dit voor een component met een k' van 100 in de buurt van de 7 ml ligt.

2.11 Algemene methode ontwikkeling

SPE procedures kunnen worden onderverdeeld in methoden waarbij voornamelijk de eigenschappen van de analiet(en) een belangrijke rol spelen en methoden waarbij ook de matrix een belangrijke rol speelt. In de schema's 1 en 2 (zie hierboven) is aangegeven wanneer, als richtlijn, voor welke vorm van SPE kan worden gekozen. In het algemeen kan gezegd worden dat voor neutrale verbindingen RP en (NP) de meeste geschikte vormen zijn, terwijl voor geladen verbindingen IS (ion-onderdrukking), IP (ion-paar) en IE (ion-wisseling) het meest voor de hand liggen.

In de praktijk ligt het vaak iets genuanceerder. Indien bijvoorbeeld een monster opgezuiverd moet worden waarin de verontreinigingen polairder zijn dan de analiet(en) wordt een RP systeem gebruikt,



omdat dan de verontreinigingen sterker vastgehouden zullen worden door de vaste fase dan de analiet(en). Meestal worden de analiet(en) vastgehouden op de cartridge terwijl de interfererende componenten van de kolom worden gespoeld. Soms is het echter verstandiger om de omgekeerde methode toe te passen. Een voorbeeld is de opzuivering van een relatief hydrofoob peptide als cyclosporine. Het (plasma) monster wordt allereerst over een C-18 kolommetje geleid. Zowel het cyclosporine als een aantal verontreinigingen worden nu vastgehouden. In de volgende stap worden de vastgehouden verbindingen geëluëerd met een mengsel van ethylacetaat en methanol en dit eluens wordt op een niet-gemodificeerde silica cartridge gebracht, waarop alleen de relatief polaire verontreinigingen worden vastgehouden en waarop de analiet moleculen niet worden tegengehouden.

Een parameter die niet over het hoofd gezien mag worden is de invloed van macromoleculen (b.v. eiwitten, polymeren) op het extractieproces. Vaak worden sorbentia gebruikt met een poriegrootte van 60 Å, veel eiwitten zijn bijvoorbeeld zo groot dat ze nu de poriën niet kunnen binnendringen. Dit betekent dat aan eiwit gebonden analieten dus niet vast worden gehouden, maar

met het dood volume zullen elueren. In dit soort gevallen moet van te voren worden bestudeerd of het met de toegepaste SPE procedure mogelijk is om de bindingen tussen de analiet en de macromoleculen los te maken zodat een normale SPE kan worden uitgevoerd. Een ander probleem dat zich kan voordoen is de hoge ionsterkte van sommige monsters (b.v. urine). Bij gebruik van RP-SPE zal dit meestal geen probleem opleveren, maar bij toepassing van IP en IE-SPE geeft dit meestal aanleiding tot bijzonder lage recoveries. De extractie van weefselhomogenaten met een hoog vetgehalte brengt weer andere problemen met zich mee. Omdat deze monsters in het algemeen goed in organische oplosmiddelen oplossen, wordt nu vaak voor adsorptie SPE (niet gemodificeerd silica) gekozen. Op deze manier worden de analiet(en) vastgehouden, terwijl de vetten in het geheel niet worden vastgehouden.

De extractie van weinig polaire analiet(en) in een vaste of halfvaste (b.v. weefselhomogenaat) matrix kunnen worden uitgevoerd door het monster eerst te homogeniseren met methanol, isopropanol of acetonitril. Dit mengsel vervolgens te verdunnen met een geschikte buffer totdat het percentage aan organische vloeistof ongeveer 25% is, waarna RP-SPE

kan worden toegepast. Indien het noodzakelijk is om NP-SPE te gebruiken kan het monster gehomogeniseerd worden met hexaan, dichloormethaan of chloroform. Bij de extractie van vetachtige monsters moet men er rekening mee houden dat bij lage temperatuur vetten vaak precipiteren. Water oplosbare analiet(en) die meestal worden geëxtraheerd met behulp van NP-SPE kunnen ook worden opgezuiverd met RP-SPE door 5-10% van een anorganisch zout toe te voegen aan de waterige matrix. Door hydratie van de ionen zal de hoeveelheid water die voor het solubiliseren van de analiet moleculen beschikbaar is sterk verminderen (uitzout effect) en dit heeft een verminderde oplosbaarheid van de analiet(en) tot gevolg.

Bij het beschrijven van de methode ontwikkeling worden de hoeveelheden die van de verschillende vloeistoffen worden gebruikt uitgedrukt in cartridgevolumina. De vuistregel is dat het cartridgevolume van 50-100 mg cartridges 1 ml is, dat voor 500 mg cartridges een volume van 3 ml wordt aangehouden, en dat het cartridge volume van de 1.000 mg systemen 6 ml is.

De verschillende vormen van SPE zullen een volgende maal in detail worden besproken.