

## Bio-analytische strategieën met behulp van hoge druk vloeistofchromatografie: deel I

H. Lingeman  
 vakgroep Analytische Chemie, Vrije Universiteit, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam

In deel I van dit overzicht komen de algemene aspecten, chromatografie en detectie, aan de orde, terwijl in deel II de monstervoorbewerking, derivatisering en conclusies besproken zullen worden.

De bepaling van organische verbindingen in een complexe biologische matrix neemt een belangrijke plaats in binnen de analytische chemie. Het aantal technieken dat hierbij gebruikt kan worden neemt nog steeds toe. Hierdoor wordt de behoefte aan duidelijke strategieën om een geschikte keuze te maken uit de vele mogelijkheden steeds dringender. De combinaties van een chromatografische scheidingsmethode en een geschikte detectietechniek nemen hierbij een zeer belangrijke plaats in. Vandaar dat geprobeerd zal worden om een strategische aanpak te geven voor de bepaling van biologisch actieve verbindingen met behulp van (hoge prestatie) vloeistofchromatografie.

### Inleiding

Bij de ontwikkeling van een bepalingsmethode moet allereerst de doelstelling worden geformuleerd omdat deze mede bepaalt welke technieken kunnen worden toegepast. Belangrijke vragen hierbij zijn:

- Welke verbinding(en) moet(en) bepaald worden?
- Wat is er bekend over de fysisch-chemische eigenschappen van de verbindingen?
- Moet(en) behalve de biologisch actieve verbinding(en) ook de metabolieten worden bepaald?
- Moet er kwalitatief, semi-kwantitatief of kwantitatief worden gemeten?
- Wat zijn de vereiste minimaal te

detecteren hoeveelheden?

- In welke matrix moeten de verbindingen worden bepaald?
- Hoeveel monsters moeten worden gemeten?

Op basis van de beantwoording van ondermeer deze vragen kunnen keuzen worden gemaakt ten aanzien van de te gebruiken technieken (Tabel I).

TABEL I  
 BIO-ANALYSE MET BEHULP VAN VLOEISTOFCHROMATOGRAPHISCHE TECHNIEKEN

Monstervoorbewerking	Derivatisering	Chromatografie	Derivatisering	Detectie
Chemische modificatie		Normaal-fase		Absorptie
Covalente labelling		Omkeer-fase		Amperometrie
Dehydratatie	Voorkoloms	Ion-onderdrukking	Nokoloms	Fluorescentie
Dialyse		Ion-paar		Laser-geïnduceerde fluorescentie
Electroforese		Micellair		Chemiluminescentie
Enzym inhibitie		Ionenwisseling		Massaspectrometrie
Homogenisatie / solubilisatie				Diode-array
Hydrolyse				Brekingsindex
Invriezen		Affiniteit		E.a.
Microgolffstraling		Hydrofobe interactie		
Precipitatie		(Gelpermeatie)		
Ultrafiltratie				
Vaste stof-vloeistof isolatie				
Vloeistof-vloeistof extractie				
Vriedrogen				
E.a.				

### Chromatografie

In het algemeen is het de bedoeling om de te analyseren verbinding (analyet) met grote nauwkeurigheid kwantitatief te bepalen, waarbij selectiviteit en gevoeligheid de meest belangrijke parameters zijn [1]. (Hoge prestatie) vloeistofchromatografie (LC) is veruit de meest toegepaste chromatografische techniek binnen de kwantitatieve bio-analyse. Daarom is in dit artikel de aandacht voornamelijk gericht op de mogelijkheden van LC bio-analyse.

### Vloeistofchromatografie

De LC systemen die gebruikt worden in de bio-analyse verschillen niet wezenlijk van die in de andere takken van de analytische chemie. Het is aan te bevelen om een beschermingskolom tussen het injectiesysteem en de analytische kolom te gebruiken om de laatste te beschermen tegen eiwitresten en andere deeltjes die de poriën van de analytische kolom zouden kunnen verstopten. Het interne volume van de beschermingskolom moet voldoende klein zijn om extra bandverbreding te voorkomen. Dit kan bereikt worden door de volume-verhouding van de

beschermings- en analytische kolom niet groter dan 1 op 25 te kiezen. Bij goed gekozen dimensies van de beschermingskolom zal er dan slechts een gering verlies in resolutie (< 5%) plaatsvinden, en zijn de pieksymmetrie en capaciteitsfactor vergelijkbaar met een systeem waarin geen beschermingskolom wordt gebruikt.

Een belangrijke keuze die gemaakt moet worden is welk fasen-systeem er gebruikt moet worden. De scheiding met behulp van LC is gebaseerd op één van de volgende mechanismen: adsorptie aan vaste oppervlakken, verdeling over twee niet-mengbare fasen, of interactie met een op een vast oppervlak aanwezige ionogene functies [2].

De volgende fasen-systemen kunnen worden onderscheiden (Tabel II):

- Adsorptie LC met polaire stationaire fasen (b.v. silica, alumina) in combinatie met niet-polaire loopmiddelen;

- Normaal-fase (NP) LC met silica dat gemodificeerd is met polaire en/of hydrofiële functionele groepen eveneens in combinatie met niet-polaire loopmiddelen;
- Omkeer-fase (RP) LC met niet-polaire stationaire fasen, zowel op silica gebaseerd als polymeer, in combinatie met polaire loopmiddelen;
- Ionenwisselings (IE) LC op macromoleculaire organische materialen die ionogene groepen bevatten of op niet-gemodificeerde polaire stationaire fasen met ionogene groepen op het oppervlak;
- Ion-paar (IP) LC met behulp van permanent geladen tegenionen hetgeen op verschillende manieren kan worden uitgevoerd: vloeistof-vast adsorptie en vloeistof-vloeistof verdeling, zowel in de RP als in de NP modus.

TABEL II

VLOEISTOFCHROMATOGRAFISCHE SYSTEMEN VOOR DE SCHEIDING VAN LAAG MOLECULAIRE VERBINDINGEN

Verbinding oplosbaar in waterig milieu					
	Ionogeen (zuur, basisch, amfoteer)			Niet-ionogeen	
Type Chromatografie	RP-IS(*1)	RP-IP(*2)	IE(*3)	RP(*4)	Verdeling
Stationaire Fase	Apolair	Apolair	Polair(*5)	Apolair	Hydrofiel
Mobiele Fase	Moderator/ Wa. buffer	Moderator/ Wa. buffer + IP-agens	Wa. buffer	Moderator/ Water	Moderator Water

Verbinding oplosbaar in organisch milieu					
	Ionogeen			Niet-ionogeen	
Type Chromatografie	RP-IS(*1)	Verdeling	RP-IP(*2)	RP(*4)	Adsorptie (Verdeling)
Stationaire Fase	Apolair	Hydrofiel	Apolair	Apolair	Polair (Hydrofiel)
Mobiele Fase	Moderator/ Wa. buffer	Moderator Water + Buffer	Moderator/ Wa. buffer + IP-agens	Moderator/ Water	Organisch Oplosmiddel

\*1, Ion-onderdrukking; \*2, Ion-paar; \*3, Ionenwisseling; \*4, Omkeer-fase; \*5, Geïoniseerde functies moeten aanwezig zijn. Moderator mag gelezen worden als methanol of acetonitril.

De keuze van het fasen-systeem is gebaseerd op de fysisch-chemische eigenschappen van de analiet(en) (Tabel II) [2]. Ion-onderdrukings (IS) LC wordt gebruikt voor de RP-LC van zwakke zuren en basen. IP-LC wordt toegepast voor de bepaling van geladen verbindingen en heeft over het algemeen de voorkeur boven IE-LC omdat hierbij de kolommen vrij snel 'vergiftigd' kunnen worden. De evenwichtsinstelling bij IP-LC, die afhankelijk van het type IP-vormer is, kan soms langdurig zijn. Voor neutrale verbindingen wordt in principe RP-LC op chemisch gemodificeerd silica (met name op octyl en cyanopropyl) toegepast. Indien een meer hydrofobe fase moet worden gebruikt of indien bij extreme pH waarden ( $< 2$  of  $> 8$ ) moet worden gewerkt, worden meestal polymere fasen (b.v. PRP-1, PLRP-S) gebruikt. In bijzondere gevallen (b.v. voor sterk polaire neutrale verbindingen) wordt NP-LC gebruikt voornamelijk met niet gemodificeerd silica als stationaire fase.

De populariteit van de RP stationaire fasen voor de scheiding van niet-ionogene verbindingen heeft te maken met de snelle evenwichtsinstelling, de uitstekende stabiliteit, de goede reproduceerbaarheid, de pieksymmetrie en het grote toepassingsgebied.

De beperkte stabiliteit en reproduceerbaarheid van NP-LC, alsmede de slechte piekvorm die vaak inherent is aan de analyse van ongeladen verbindingen op polaire stationaire fasen (b.v. silica, alumina) zijn de belangrijkste nadelen van NP-LC.

De polaire en hydrofiele stationaire fasen (b.v. diol, cyano) zijn in het bijzonder geschikt voor de scheiding van een aantal groepen van niet-ionogene verbindingen maar kunnen niet zonder meer gebruikt worden voor de bepaling van geladen verbindingen. Voordelen van de diol fase boven het gebruik van niet gemodificeerd silica zijn de geschiktheid voor de bepaling van poly-alcoholen en het feit dat dit materiaal minder

gevoelig is voor deactivering door water. De cyanopropyl fase kan zowel in combinatie met waterige (RP) als met uit organische oplosmiddelen (NP) bestaande loopmiddelen worden toegepast [1,2].

Bij de analyse van met name ionogene verbindingen (b.v. stikstof basen) met op silica gebaseerde stationaire fasen wordt vaak een slechte pieksymmetrie waargenomen. Dit resulteert in problemen met de resolutie en de kwantificeerbaarheid van die verbindingen. Mogelijke oplossingen zijn:

- de toepassing van IS technieken die echter alleen maar in een beperkt pH gebied kunnen worden toegepast;
- het gebruik van 'tailing' onderdrukkende reagentia die echter over het algemeen de levensduur van het LC systeem aanzienlijk bekorten;
- het toevoegen van een IP vormend reagens aan het loopmiddel, hetgeen resulteert in een relatief gecompliceerd systeem met meestal een langdurige evenwichtsinstelling;
- het gebruik van niet-gemodificeerd silica in combinatie met waterige loopmiddelen [3];
- het gebruik van polymere stationaire fasen [3].

Aan de laatste twee mogelijkheden wordt vaak de voorkeur gegeven.

TABEL III

MOGELIJKE DETECTOREN IN DE VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE

Detectietechniek	Toepassingsgebied	Detectiegrenzen
Vlamionisatie	Universeel	µg
Geleidbaarheid	Breed	µg
Kernspinresonantie	Breed	µg
Brekingsindex	Universeel	µg
Absorptie	Breed	ng
Infrarood	Breed	ng
Stikstof-fosfor	Breed - nauw	ng - pg
Elektroneninvangst	Breed - nauw	pg
Atoomabsorptie / emissie	Nauw	pg
Massaspectrometrie	Kwalitatief	ng
	Kwantitatief	ng - pg
Amperometrie	Nauw	pg
Fluorescentie	Nauw	pg
Laser fluorescentie	Nauw	fg
Chemiluminescentie	Nauw	fg

Detectie

Eén van de problemen van LC is dat er nog geen voldoende gevoelige en universele detector beschikbaar is (Tabel III).

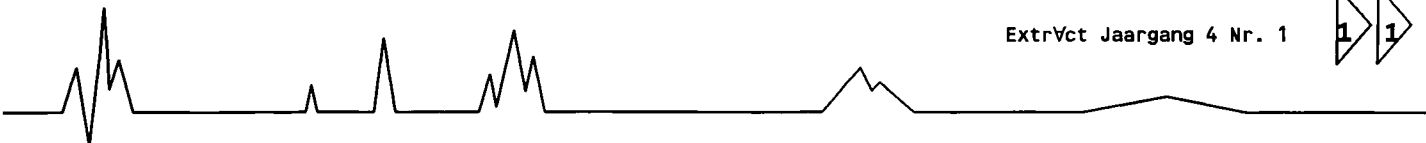
Er is echter een grote verscheidenheid aan detectiesystemen, variërend van selectief (b.v. amperometrische) tot universeel (b.v. brekingsindex) en van ongevoelig (b.v. geleidbaarheid) tot gevoelig (b.v. laser fluorescentie). Dit betekent dat uit het grote aantal detectiemogelijkheden een keuze gemaakt moet worden [1]. De geringe toepasbaarheid van de selectieve detectoren kan overwonnen worden door de verbinding met een geschikt reagens te derivatiseren.

Eén-golflengte absorptie detectoren (UV-Vis) bieden nauwelijks mogelijkheden voor de in-lijn identificatie van verbindingen. Door gebruikmaking van tweegolflengte of meer-golflengte detectoren, en door het meten van absorptieverhoudingen bij twee of meer golflengten kan een indruk over de identiteit (en de zuiverheid) van verbindingen worden verkregen. Met de moderne meergolflengte detectoren (b.v. de fotodiode-array - DA) is het mogelijk in zeer korte tijd het volledige spectrum van een verbinding te krijgen [4,5].

Voor fluorescentiedetectoren bestaan tegenwoordig dezelfde mogelijkheden [2], terwijl voor amperometrische detectoren (AMP) het in-lijn opnemen van cyclische voltammogrammen eveneens tot de mogelijkheden behoort [6].

Karakterisering van analieten kan dus bij absorptie- en fluorescentiedetectoren geschieden door combinatie van een aantal parameters zoals: retentietijd, absorptie/fluorescentie intensiteit, absorptie/excitatie-emissie spectrum. De DAD is geschikt om snel enige structuurinformatie omtrent de verbinding te verkrijgen, terwijl massaspectrometrische (MS) technieken bij uitstek gebruikt worden om structuurbevestiging te verkrijgen [7].

De keuze van het detectiesysteem hangt voornamelijk af van de vereiste bepalingsgrens en van de structuur van de analiet. Indien de vereiste bepalings-



grens in het  $\mu\text{g/ml}$  tot het hoge  $\text{ng/ml}$  gebied ligt, kan over het algemeen UV-Vis detectie worden toegepast bij alifatische, geconjugeerde en aromatische verbindingen, waarbij voor geconjugeerde en aromatische farmaca golflengten boven de 250 nm kunnen worden gebruikt, terwijl voor alifatische verbindingen golflengten tussen de 200 en 250 nm moeten worden gebruikt.

Het gebruik van golflengten beneden de 280 nm is relatief ongunstig omdat hier veel storing van endogene verbindingen kan optreden. Met een geschikte keuze van het eluens en een goed gekozen monster voorbereiding is het echter wel mogelijk om golflengten tussen de 200 en 210 nm te gebruiken [8]. In dit golflengtegebied hebben alifatische verbindingen relatief hoge molaire extincties. Het is belangrijk om op te merken dat het absorptiemaximum van de analiet niet de optimale detectiegolflengte behoeft te zijn omdat bij deze golflengte de achtergrond ook erg hoog kan zijn. In het algemeen kan gesteld worden dat de achtergrond van de biologische matrix lager zal zijn bij langere golflengten, maar dat bij deze golflengten de molaire extincties van de analieten ook lager zijn. Er zal altijd een compromis gevonden moeten worden om de maximale signaal-ruis-verhouding te verkrijgen. Een uitstekend hulpmiddel hierbij is het DAspectrum van de biologische matrix [4,5].

Indien de vereiste bepalingsgrens in het  $\text{ng/ml}$  tot het hoge  $\text{pg/ml}$  gebied ligt, kan over het algemeen voor geconjugeerde en aromatische verbindingen nog steeds UV-Vis detectie worden gebruikt terwijl voor alifatische verbindingen een andere oplossing moet worden gezocht.

Wanneer een nog lagere bepalingsgrens vereist is, is het noodzakelijk om meer gevoelige en dus meer selectieve detectietechnieken te gaan gebruiken, dat wil zeggen AMP, (laser-geïnduceerde) fluorescentie, of in een aantal gevallen MS detectie.

Oxidatieve of reductieve AMP detectie kan alleen worden toegepast indien het molecuul structurelementen bevat die geoxideerd of gereduceerd kunnen worden bij een acceptabele potentiaal. Amperometrie is de meest toegepaste vorm van

elektrochemische detectie waarbij voor routinematige toepassing, de reductieve modus het minste storingen geeft. Het verdient de voorkeur om bij relatief lage potentialen te werken zodat storingen door eluenscomponenten en interfererende bestanddelen uit de matrix vermeden kunnen worden. De bepalingsgrenzen kunnen in het lage  $\text{pg/ml}$  gebied liggen.

Met behulp van fluorescentiedetectie kunnen eveneens detectiegrenzen worden bereikt in het lage  $\text{pg/ml}$  gebied terwijl met behulp van laser-geïnduceerde fluorescentie (LIF) detectie ongeveer twee tot vier orden lagere detectiegrenzen kunnen worden bereikt [9]. Bij LIF detectie wordt in plaats van een conventionele xenon lamp een continue laser als lichtbron gebruikt. Het monster wordt bestraald met een bundel, die een hoog vermogen heeft, en die zeer monochromatisch en coherent is. De praktische voordelen zijn dan ook dat de bundel zeer nauwkeurig op de doorstroomcel gericht kan worden waardoor minder verliezen optreden. Er is (nog) geen commercieel verkrijgbare apparatuur voorhanden. Het is echter relatief eenvoudig om een detectiesysteem voor LIF te bouwen [9]. Zo'n systeem bestaat uit een laser, enkele lenzen, een conventionele doorstroomcel, een interferentiefilter of monochromator, en een fotomultiplicatorbuis. Doordat continue lasers met één of meerdere lasing golflengten in het UV-Vis gedeelte van het spectrum worden gebruikt, kunnen er maar een beperkt aantal analieten direct worden geanalyseerd. Dit betekent dat derivatisering van de analiet in veel gevallen onvermijdelijk is.

MS detectie kan in principe voor de meeste verbindingen worden toegepast waarbij de bepalingsgrenzen in het  $\text{ng/ml}$  tot het hoge  $\text{pg/ml}$  gebied liggen. Inlijn detectie met behulp van een massaspectrometer vergt altijd een interface [7]. De interfaces leggen soms beperkingen op aan de toepasbaarheid. Het vaak toegepaste 'thermospray' interface is met name geschikt voor waterige mobiele fasen met lage moderator gehalten en geeft piekintensiteiten die sterk analiet afhankelijk zijn. Een nadeel van het 'thermospray' interface, en van de meeste andere interfaces, is dat geen electron 'impact spectra' kunnen worden



verkregen. Het resultaat is dat een vergelijking met literatuur spectra eigenlijk alleen mogelijk is door gebruik te maken van het 'particle beam' interface. Er moet opgemerkt worden dat gecombineerde LC/MS nog altijd sterk in ontwikkeling is.

#### Optimalisatie van de bepalingsgrens

Indien de vereiste bepalingsgrens met de eerder gekozen combinatie van methoden en technieken niet bereikt kan worden, kan de volgende strategie gevolgd worden:

- 1 optimalisering van het LC systeem;
- 2 optimalisering van de detectiecondities;
- 3 toepassing van een meer gevoelige detectietechniek;
- 4 introductie van een derivatiseringstechniek;
- 5 optimalisering van de gehele bio-analytische procedure.

In de laatste stap wordt met name aandacht besteed aan verhoging van de selectiviteit door middel van optimalisering van de monstervoorbewerkingprocedure.

Onder optimalisering van het LC systeem ten behoeve van een betere bepalingsgrens wordt verstaan het gebruik van de juiste kolomdimensies, de juiste deeltjesgrootte en de juiste mobiele fase [10]. In het algemeen wordt gebruik gemaakt van concentratie-gevoelige detectoren. Daarom moet de verdunningsfactor in de kolom zo klein mogelijk worden gehouden.

Deze verdunningsfactor,  $C_{max}/C_0$ , wordt gegeven door:

$$\frac{C_{max}}{C_0} = \frac{4 V_0 \sqrt{N}}{\pi d_c^2 \epsilon L (1 + k') (\sqrt{2\pi})}$$

waarin  $V_0$  het injectie-volume is,  $N$  het schotelgetal,  $d_c$  de inwendige diameter en  $L$  de lengte,  $\epsilon$  de porositeit, en  $k'$  de capaciteitsfactor. Hieruit kan onder andere worden afgeleid, dat 10 cm kolommen met een inwendige diameter van 3 mm gepakt met 3 of 5  $\mu\text{m}$  deeltjes de voorkeur genieten boven 4.6 mm kolommen gepakt met 5 of 10  $\mu\text{m}$  deeltjes. Verdere miniaturisering van de kolom is meestal

niet wenselijk, omdat de in de totale procedure gebruikte volumes onhandelbaar klein worden.

Een tweede aspect is de keuze van de meest geschikte eluenssamenstelling. De moderator (b.v. methanol, acetonitril) en de pH beïnvloeden niet alleen de retentie van het farmacon maar eveneens de retentie van interfererende componenten zodat het in het algemeen de moeite loont om gebruik te maken van de verschillen in proton-donor of proton-acceptor eigenschappen van de moderator. Ook kunnen door het toevoegen van een IP reagens goede resultaten bereikt worden als daardoor de retentie van interfererende componenten anders beïnvloed wordt dan die van de analiet [11].

#### Literatuur

- [ 1 ] H. Lingeman, R.D. McDowall en U.A.Th. Brinkman, Trends Anal. Chem., 10 (1991) 48.
- [ 2 ] A. Mulshoff en H. Lingeman, Fluorescence Detection in Chromatography, in S.G. Schulman (Ed.), 'Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications', Part I, Wiley, New York, 1985.
- [ 3 ] H. Lingeman en W.J.M. Underberg, Trends Anal. Chem., 7 (1988) 346.
- [ 4 ] J.K. Strasters, H.A.H. Billiet, L. de Galan, B.G.M. Vandeginste en G. Kateman, J. Chromatogr., 385 (1987) 181.
- [ 5 ] A.F. Fell, B.J. Clark en H.P. Scott, J. Chromatogr., 273 (1983) 3.
- [ 6 ] J.A. Lisman, W.J.M. Underberg en H. Lingeman, in H. Lingeman en W.J.M. Underberg (Eds.), 'Detection-Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography', Dekker, New York, 1990.
- [ 7 ] J. van der Greef, H. Lingeman, W.M.A. Niessen en U.R. Tjaden, in D.D. Breimer en P. Speiser (Eds.), 'Topics in Pharmaceutical Sciences 1987', Elsevier, Amsterdam, 1987.
- [ 8 ] U.R. Tjaden, H. Lingeman, R.A.M. van der Hoeven, J.A.C. Bierman, H.J.E.M. Reeuwijk en J. van der Greef, Chromatographia, 24 (1987) 597.
- [ 9 ] C.M.B. van den Beld en H. Lingeman, in W.R.G. Baeyens, D. De Keukeleire en K. Korkidis (Eds.), 'Luminescence Techniques in Chemical and Biomedical Analysis', Dekker, New York, 1990.
- [ 10 ] P.J. Schoenmakers, 'Optimization of Chromatographic Selectivity', J. Chromatogr. Libr., Vol. 35, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [ 11 ] H. Lingeman, J.A. Haverhals, H.J.E.M. Reeuwijk, U.R. Tjaden en J. van der Greef, Chromatographia, 24 (1987) 886.