



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

Bij het optimaliseren van een RP-IP extractie wordt in eerste instantie het percentage modifier aangepast en vervolgens de pH. Indien nu niet voldoende retentie of te weinig selectiviteit wordt verkregen kan een IP reagens worden toegevoegd. De concentratie van het IP reagens moet relatief laag worden gehouden. Indien een IP reagens wordt toegevoegd moet in een aantal gevallen de ionsterkte van de buffer worden verlaagd. Bij de meeste RP-IP extracties is de keuze van de pH belangrijker dan het type tegenion.

B. Polaire fasen (IE, NP en RP extracties)

Polaire fasen zijn voornamelijk gebaseerd op silicagel en aluminiumoxide en ze worden toegepast voor de extractie van matig polaire en polaire analieten. Van de chemisch gebonden silica fasen is de cyanopropyl fase misschien wel de meest aantrekkelijke. Deze fase is redelijk stabiel en kan zowel in de NP als RP mode worden gebruikt. Een andere fase met een relatief breed toepassingsgebied is de aminopropyl fase, deze kan behalve in de NP en RP mode ook als zwakke IE fase worden gebruikt. Het is echter niet aan te raden om deze fase te gebruiken in aanwezigheid van aldehyden en ketonen. Doordat het retentiemechanisme op deze fase nogal complex is, kunnen er extracties op uitgevoerd worden die niet mogelijk zijn met de traditionele RP en NP fasen. Verder zijn er ook enkele aparte polaire fasen beschikbaar. Een bekend voorbeeld is difenylboorzuur fase, die speciaal is ontwikkeld voor de

extractie van coplanaire vicinale hydroxylgroepen. Behalve deze gemodificeerde silica fasen, wordt ook niet gemodificeerd silica gebruikt in SPE. Het probleem bij deze vorm van adsorptie chromatografie is dat de vaste fase snel wordt gedeactiveerd in aanwezigheid van water.

Methode ontwikkeling

Het ontwikkelen van een NP-SPE gaat op dezelfde manier als is beschreven voor RP extracties. Allereerst moet weer de invloed van de matrix worden bepaald, waarna de beste fase voor de analiet(en) kan worden gekozen. Voor NP extracties kunnen het beste gemodificeerde silica materialen worden getest (2OH, CN, NH₂). In een beperkt aantal gevallen kan niet gemodificeerd silica goede diensten bewijzen. Een algemene procedure om de vaste fase te kiezen kan zijn:

- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume van een apolair oplosmiddel (b.v. hexaan, chloroform),
- opbrengen van de matrix en/of het monster op de cartridge en laten doorlopen,
- wassen van de cartridge met een cartridge volume van een apolair oplosmiddel,
- elueren van de cartridge met 2 x 0,5 ml van een polair oplosmiddel (b.v. aceton, acetonitril, isopropanol, methanol).

Als hiermee bepaald is welke fase de laagste achtergrond geeft en welke de beste recovery voor de analiet(en) geeft kan er een fase worden uitgekozen die verder wordt geoptimaliseerd.

Permanent geladen fasen

Permanent geladen fasen worden ondermeer gebruikt voor IE extracties. De opzuivering van hydrofiele verbindingen, hetgeen vaak moeilijk

is met behulp van een LLE procedure, kan met IE-SPE meestal goed worden uitgevoerd. IE-SPE is een techniek met een hoge selectiviteit / specificiteit en capaciteit. De vaste fasen die gebruikt worden bestaan uit permeabele hydrofiele polymeren of uit hydrofiele polymeren die aan silica zijn gebonden. Op het oppervlak van deze fasen zitten positief of negatief geladen groepen. Er zijn twee soorten IE materialen: zwakke (niet permanent geladen) en sterke (permanent geladen) fasen. De vuistregel is dat voor de extractie van zwakke zuren en basen een sterke ion-wisselaar wordt gebruikt en voor de isolatie van sterke zuren en basen een zwakke ion-wisselaar.

Ook bij dit type extracties moet eerst weer de invloed van de matrix worden vastgesteld. Een probleem bij het gebruik van IE fasen is vaak dat deze gecombineerd moet worden met een andere monsterbewerkingsstap (b.v. precipitatie, LLE) omdat de capaciteit van polymere IE materialen beperkt is. Dit is met name een probleem indien de matrix veel ionogene componenten bevat, of indien er veel lipofiele verbindingen aanwezig zijn, die geadsorbeerd kunnen worden aan het basispolymeer waardoor de IE plaatsen afgeschermd worden. Bij IE-SPE worden de aanwezige tegenionen (geadsorbeerd aan de vaste fase) uitgewisseld tegen monsterionen die dezelfde lading hebben. Neutrale moleculen en ionen die dezelfde lading hebben als de kolom worden niet vastgehouden. Door nu de ionsterkte en/of de pH te veranderen kunnen de analiet-ionen van de cartridge worden gespoeld. De belangrijkste parameters bij IE scheidingen zijn:

- *Ionogene vorm van de fase:* De meeste fasen zijn verkrijgbaar in verschillende vormen, die in elkaar omgezet kunnen worden. In principe moet de ionogene samenstelling van de vaste fase minder

selectiviteit voor de functionele groep dan voor de analiet-ionen vertonen.

- *Cross-linking van de polymere fase:* SDB polymeren zijn tamelijk rigide polymeren en de porositeit hangt af van de mate van hydratatie van de matrix. Deze wordt geregeld door de mate van hydratatie van de aanwezige functionele groepen. Zwelling van de matrix vermindert als de ionsterkte van het oplosmiddel toeneemt of als meer van een apolair oplosmiddel wordt toegevoegd. De zwelling van de vaste fase hangt ook af van de vorm waarin het polymeer aanwezig is en van de hydrofiele eigenschappen van de aanwezige functionele groepen.
- *Ion-uitwisselings capaciteit van de fase.*
- *Mogelijkheid om water vast te houden en de vorm en grootte van de deeltjes.*

Voor basische verbindingen kan gekozen worden voor een benzeen-sulfonaat (SCX-B) of een carbonzuur (CBA) fase. De procedure is als volgt:

- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume methanol,
- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume water,
- op de juiste pH brengen, door een buffer met een lage ionsterkte ($<0,1$ M) te gebruiken, van de matrix of het monster (bijvoorbeeld kunnen de pH waarden 4, 6 en 8 worden getest), opbrengen op de cartridge en door laten lopen,
- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume water,
- elueren met $2 \times 0,5$ ml buffer met een hoge ionsterkte of met een hogere pH. Het toevoegen van maximaal 50% aan methanol kan de elutie aanzienlijk verbeteren.

Voor zure verbindingen kan gekozen worden tussen een kwaternaire ammonium (SAX) en een primair of secundair amine (PSA) fase. De procedure is dan als volgt:

- spoelen van de cartridge met

- 1 cartridge volume methanol,
- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume water,
- op de juiste pH brengen, door een buffer met een lage ionsterkte ($<0,1$ M) te gebruiken, van de matrix of het monster (bijvoorbeeld kunnen de pH waarden 6, 9 en 12 worden getest), opbrengen op de cartridge en door laten lopen,
- spoelen van de cartridge met 1 cartridge volume water,
- elueren met $2 \times 0,5$ ml buffer met een hoge ionsterkte of met een lagere pH. Het toevoegen van maximaal 50% aan methanol kan de elutie aanzienlijk verbeteren.

Ook in dit geval kan nu de keus van het fasesysteem verder worden geoptimaliseerd.

Bij het opzetten van een geschikt IE systeem is het van groot belang dat zowel de lading van de fase als van de analieten in ogenschouw wordt genomen. Voor de analieten geldt, zoals in Deel I en II al is besproken, dat indien de pH minimaal 2 eenheden van de pKa is verwijderd, de verbinding voor minimaal 99% in de gedissocieerde of niet-gedissocieerde vorm aanwezig is.

De selectiviteit in IE-SPE wordt niet alleen bepaald door de keuze van de vaste fase maar ook door de affiniteit die het tegen-ion heeft met het sorbens. Bij SAX fasen bijvoorbeeld hebben citraat ionen een 250 maal betere selectiviteit dan acetaat ionen en voor SCX fasen hebben calcium ionen een duidelijk hogere selectiviteit dan lithium ionen. Bij het kiezen van de juiste fase is het ook van groot belang of een op silica gebaseerd IE materiaal wordt gebruikt (beperkte pH stabiliteit) of een fase die op een polymeer (b.v. SDB) is gebaseerd.

2.12 Oplossen van problemen

Ook na een goed uitgevoerde SPE procedure is het mogelijk dat er storende componenten in de elutiefractionen zitten, die tijdens de hierop

volgende LC scheiding kunnen storen. Een oplossing hiervoor kan zijn om de wasstappen aan te passen om hiermee storende verbindingen te verwijderen. Indien dit niet mogelijk is kan het verstandig zijn om een tweede SPE procedure uit te voeren. Dit kan op verschillende manieren gebeuren: de twee SPE procedures kunnen onafhankelijk van elkaar worden uitgevoerd, maar ook is het mogelijk om een tweetal cartridges, via een koppelstuk, op elkaar te plaatsen en zo in een keer een dubbele extractie uit te voeren. Een aardig voorbeeld is de bepaling van tricyclische antidepressiva, zwakke en tamelijk lipofiele basen, in plasma. De analieten worden vastgehouden op een ethyl (C-2) cartridge en de storende verbindingen worden verwijderd door te wassen met een oplossing van verdunde natronloog. Chloroform wordt gebruikt om de analieten van de cartridge te elueren en om deze vervolgens op een cyanopropyl (CN) cartridge te brengen. Op de CN cartridge wordt het monster verder opgezuiverd en geëluëerd met behulp van de mobiele fase die ook gebruikt wordt voor de hierop volgende LC scheiding.

Een andere mogelijkheid is om een SPE procedure te combineren met een LLE stap. Een voorbeeld is de extractie van prilocaïne, een zwakke base, vanuit plasma met behulp van toluen. De organische fase wordt vervolgens over een diol (2OH) cartridge geleid, waarna de cartridge wordt gewassen met acetonitril. Tot slot wordt de analiet geëluëerd met de mobiele fase die ook voor de LC scheiding wordt gebruikt.

Een overzicht van enkele relatief vaak voorkomende problemen en de meest voor de hand liggende oorzaken hiervan is hieronder weergegeven. Oplossingen voor veel van de hierna genoemde problemen zijn hierboven al aan de orde geweest.

Lage recoveries van de analiet(en) door slechte retentie van de analieten door: slechte activering / condi-

tionering van de cartridge, verkeerde polariteit van het sorbens (analieten hebben een te lage activiteit voor het sorbens) of veranderende solvatatie van het sorbens tijdens het opbrengen van een grote hoeveelheid monster.

Lage recoveries van de analiet(en) door te sterke sorptie aan het sorbens door: verkeerde polariteit van het sorbens (analieten hebben een te grote affiniteit voor het sorbens), doordat de sterkte van de elutie-vloeistof niet hoog genoeg is om de analiet interacties te verbreken, een te klein elutievolume, of dat de analiet(en) irreversibel geadsorbeerd zijn aan het sorbens.

Slecht reproduceerbare extracties door: indrogen van de cartridge nog voordat het monster is opgebracht, een te kleine capaciteit van de cartridge, een te hoog debiet tijdens de extractie- en/of de elutiestap, te hoge oplosbaarheid van de analiet in het monster (doorbraak van de analiet), niet met elkaar mengbare vloeistoffen zijn gebruikt tijdens de extractieprocedure, te hoge elutiestrkte van de wasvloeistoffen of te klein elutievolume.

Restanten water in elutievloeistof na RP-SPE doordat: de cartridge niet voldoende is gedroogd na afloop van de laatste wasstap.

Weinig schone extracten (aanwezigheid van interfererende verbindingen) doordat: interfererende verbindingen worden meegeëxtraheerd, oplosmiddelen zijn niet zuiver of interfererende verbindingen komen uit het sorbens.

Monsterverliezen tijdens het verdampen van het oplosmiddel (bij gebruik van vacuüm systeem) doordat: het vacuüm te hoog is, het vacuüm te snel wordt opgeheven of de cartridge wordt verwijderd alvorens het vacuüm volledig is opgeheven.

Laag debiet of verstopte cartridge door: de aanwezigheid van vaste deeltjes in het monster, een te visceuze monsteroplossing, een te laag vacuüm of een niet geschikte vacuümslang.

Lage recoveries van eiwitten bij gebruik van vaste fasen met 600 nm poriën omdat: eiwitten te groot zijn om de poriën van de vaste fase binnen te dringen, eiwitten worden irreversibel geadsorbeerd aan de vaste fase of eiwitten denatureren in de poriën.

2.13 Conclusies

De *toepassingsmogelijkheden* van de verschillende vormen van SPE kunnen als volgt worden samengevat:

RP-SPE: Apolaire – matig polaire analieten, apolaire – matig polaire vaste fasen, retentie vanuit een polaire matrix en elutie vanuit een apolair medium.

NP-SPE: Matig polaire-polaire analieten, matig polaire-polaire vaste fasen, retentie vanuit een apolaire matrix en elutie vanuit een matig polair-polair medium.

IE-SPE: Geladen analieten, geladen vaste fasen, retentie – zowel analiet als vaste fase in geladen vorm in combinatie met een lage ionsterkte en tegenionen met een lage selectiviteit en elutie – analiet of vaste fase in de neutrale vorm in combinatie met en/of een hoge ionsterkte en/of tegenionen met een hoge selectiviteit.

Met betrekking tot de *methode ontwikkeling* kunnen de volgende samenvattende opmerkingen worden gemaakt. Dat er allereerst naar de analytische eisen moet worden gekeken (b.v. wat voor oplosmiddel(en) zijn er nodig, wat is de concentratie van de analiet(en), wat voor clean-up moet er plaatsvinden). Vervolgens moet alle beschikbare informatie worden opgezocht (b.v.

literatuur van fabrikanten, beschreven LC procedures, chromatografische eigenschappen). Karakterisering, ofwel bepalen van de fysisch-chemische eigenschappen, van zowel de analiet als de matrix is de volgende stap. Belangrijk hierbij is om structuurelementen te zoeken die gebruikt kunnen worden om de recovery en/of selectiviteit van de extractie te verbeteren. De volgende stap is het kiezen van het meest geschikte retentiemechanisme en de hierbij horende vaste fase. Alvorens met de extractie te beginnen moet het monster zodanig worden aangepast (e.g., solubiliseren, pH aanpassen) dat het op de cartridge kan worden gebracht. De methode ontwikkeling begint vervolgens met het extraheren van standaarden om het doorbraakvolume te bepalen en om vast te stellen welke was- en elutievloeistoffen, en hoeveel hiervan, gebruikt kunnen worden. De laatste stappen bestaan uit het extraheren van echte monsters, waaronder gefortificeerde en blanco extracties.

Indien er tijdens een SPE procedure *problemen* ontstaan zijn er een aantal zaken die gecontroleerd moeten worden. Allereerst moet gecontroleerd worden of aan een aantal basisvoorwaarden is voldaan: Keuze fase-systeem, oplosbaarheden van de analieten, capaciteit van de vaste fase en aan- of afwezigheid van secundaire interacties. Vervolgens moeten een aantal andere parameters worden gecontroleerd: Zijn de juiste activerings / conditoneringsstappen gebruikt, treden er geen problemen op met de mengbaarheid van de matrix, was- en elutievloeistoffen en zijn er geen problemen met de vluchtigheid van de analieten. Indien niet direct een oplossing kan worden gevonden is het vaak verstandig om te kijken of dezelfde analieten wel met behulp van LC kunnen worden bepaald of kan de extractie worden uitgevoerd met behulp van structuuranalogen.

Introduction

The Dutch Laboratory for Drugs and Doping performs urine analysis on drugs of abuse for prisons, detoxification centers, hospital emergency testing and workplace testing. In 2001 the total number of immunoassay screenings was approximately 100,000 of which approximately 15,000 concerned opiates. Confirmation analysis of opiates is performed using gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). For GC-MS analysis enzymatic hydrolysis and solid phase extraction of the urine sample is necessary. The current procedure requires a 5 hours incubation period, which reduces sample throughput. Enzymatic hydrolysis of opiates in urine is well documented in literature, with different results

Objective

To develop an efficient, fast and easy to use enzymatic hydrolysis sample pretreatment step for GC-MS confirmation of opiates in urine drug analysis.

Materials

- β -glucuronidases
 - Helix Pomatia H-1, β -D-glucuronide glucuronosohydrolase partially purified powder, Sigma G0751
 - Escherichia coli IX-A, β -D-glucuronide glucuronosohydrolase lyophilized powder, Sigma G7396
 - Escherichia coli K12 (Rnase negative), β -D-glucuronoside glucuronosohydrolase, EC3.2.1.31, in 50% glycerol, Roche (1585665)
- Morphine-3- β -D-Glucuronide, Sigma M-6886
- Morphine HCl.3H₂O, Bufa 224010
- GC-MS
 - HP 5890 Series II
 - HP 5971 MSD
 - Column HP-5-MSm 12 m, 0.25 mm id, 0.33 μ m film
- SPE
 - 3 mL Baker NARC-II™ cartridges
 - Manual vacuum SPE manifold

Methods

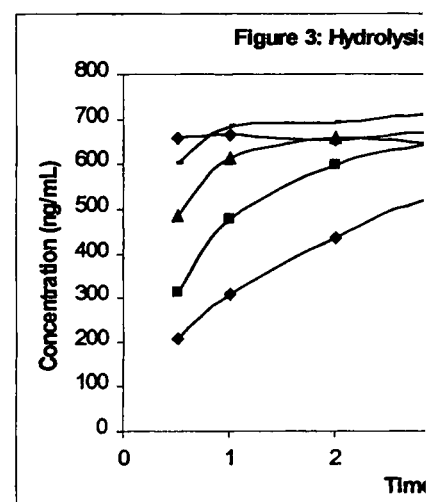
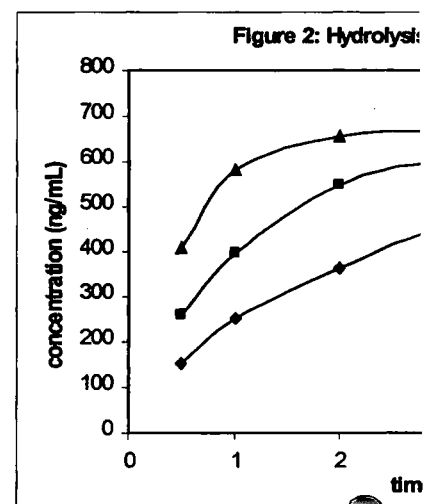
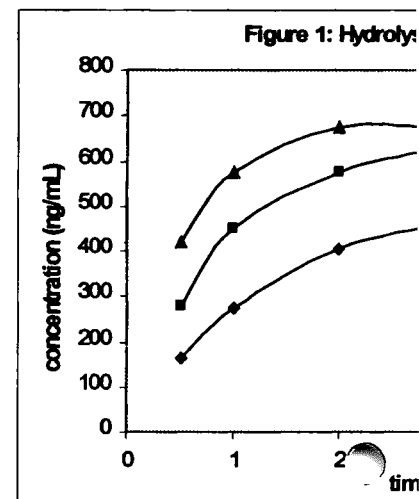
- To 1 mL urine 50 μ L internal standard (15 μ g/mL nalorphine in methanol) was added, followed by the enzyme and buffer. The capped tubes were incubated in a water bath. After incubation, 3 mL 0.5 M phosphate buffer pH=7 was added followed by a solid phase extraction. The eluent was dried and the residue derivatised with 50 μ L BSTFA + 1% TMS.
- Reagents
 - Morphine stock solution (10.0 μ g/mL) was prepared in methanol.
 - Morphine standards 1000, 500, 250 and 100 ng/mL were made in blanc urine.
 - Morphine-3- β -D-Glucuronide standard 872 μ g/L was made in blanc urine.
 - Enzyme Pomatia solution 10,000 U/mL was made in water.
 - Enzyme E-Coli IX-A solution 10,000 U/mL was made in 0.075 M phosphate buffer pH=6.8.
- GC-MS instrument settings
 - Helium flow : 1 mL/min
 - Splitless injection : 1 μ L
 - Injector temperature : 250°C
 - Detector temperature : 280°C
 - Temperature program : 160°C (1 min.), rate 10°C/min, to 260°C (0 min.), rate 50°C/min to 325°C (0.7 min.).

Experimental

Four methods of hydrolysis were compared:

- A. 1250, 2500 and 5000 Units enzyme Pomatia added to 1.0 mL morphine-3- β -D-glucuronide standard followed by 500 μ L acetate buffer pH=5.0 and water to make a total volume of 2 mL. All three concentrations were hydrolysed in a 60°C water bath for 0.5, 1, 2, 3 and 5 hours.
- B. 1250, 2500 and 5000 Units enzyme E Coli IX in 0.075 M phosphate buffer pH=6.8 added to 1.0 mL morphine-3- β -D-glucuronide standard followed by 0.075 M phosphate buffer pH=6.8 to make en total volume of 2 mL. All three concentrations were hydrolysed in a 37°C water bath for 0.5, 1, 2, 3 and 5 hours.
- C. 25, 50, 100, 150 and 400 μ L enzyme E Coli K12 pH=6.0 added to 1.0 mL morphine-3- β -D-glucuronide standard followed by 0.2 M phosphate buffer pH=6.3 to make en total volume of 2 mL. All five volumes were hydrolysed in a 47°C water bath for 0.5, 1, 2, 3 and 5 hours.
- D. 1 mL 37% hydrochloric acid added to 1.0 mL morphine-3- β -D-glucuronide standard, 1 hour at 100°C

Results

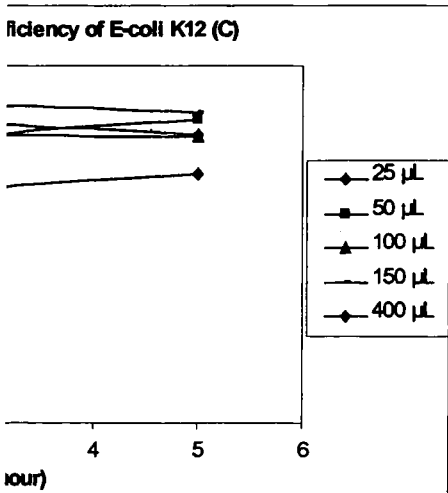
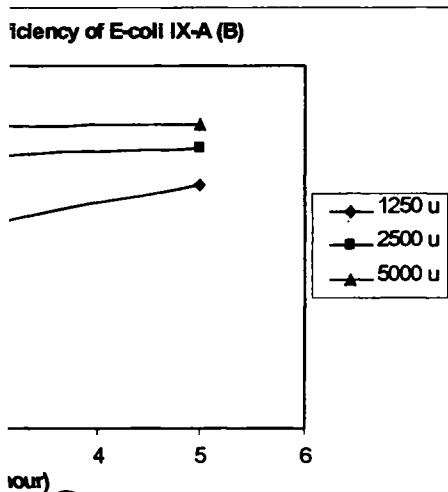
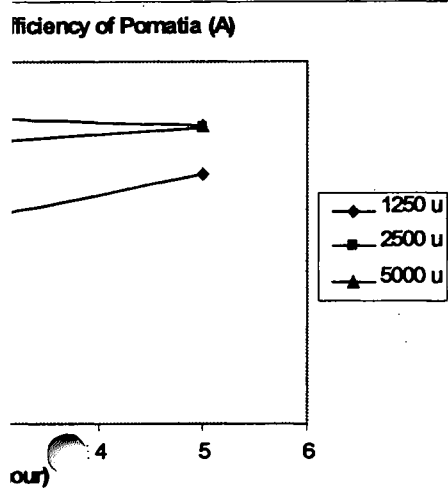


S; FAST, FASTER, FASTEST

angen and A.C.G. Egberts

Drugs and Doping
pital, PO Box 90107, 5000 LA Tilburg, The Netherlands
ager@zamb.tsz.nl

Extrac



Discussion

The efficiency of the enzymatic hydrolysis methods A, B and C were compared with the efficiency of the acid hydrolysis D. Maximum hydrolysis efficiency of the enzymatic methods is about 80 % which is comparable to the efficiency of the acid hydrolysis.

The optimal working conditions – temperature, required buffer and pH – were obtained from the manufacturer. The enzymes Pomatia (A) and E-coli IX-A (B) were provided in powdered form with a given activity. To add a constant amount of enzyme, the enzyme must be accurately weighted or a solution in water or buffer must be made and added to each tube. We used enzymes dissolved in buffer (E-coli IX-A) and water (Pomatia). In daily practice, this solution must be stored in a refrigerator or frozen. It seems that the activity of solutions of the powdered enzymes during storage decreases (no data provided). The enzyme E-Coli K12 (C) remains stable for 18 hours at 45°C. At 48°C, it loses 20% of its original activity within 2 hours. The optimum is 47°C. E-Coli K12 in 50% glycerol can be stored during 12 months at 2-8°C according to the manufacturer.

Figure 1 shows that the maximum hydrolysis efficiency from Pomatia was reached after two hours by adding 5000 units enzyme to each tube (2 mL 2500 U/mL).

Figure 2 shows that the maximum hydrolysis efficiency of E-Coli IX-A is reached after 2 hours by adding 5000 units (2 mL 2500 U/mL).

The activity of the powdered enzymes is given in Sigma- or modified Fishman units. This is defined as the release of phenolphthalein from its glucuronide at the right pH. The activity of the E-Coli K12 (C) is defined as specific activity. This is the enzyme activity that increases the rate of release of 1 µM 4-nitrophenol from 4-nitrophenyl-β-D-glucuronide (4NPG) at a temperature of 25°C and pH=7.0. The specific activity of E-Coli K12 is approximately 10 U/mg at 25°C and 20 U/mg at 37°C. The strength of the solution is at least 200 U/mL at 37°C. This activity definition is not comparable with the definition of the activity from the powdered enzymes. Therefore in case of E-Coli K12 we have used volume instead of activity units as unit of amount.

As can be seen in figure 3 the maximum hydrolysis efficiency when adding 100 µL E-Coli K12 is reached between 1 and 2 hours. Adding 150 µL, the maximum efficiency will be reached in less than one hour.

Conclusions

The results show that all enzymes reduce incubation time for enzymatic hydrolysis in confirmatory urine analysis of opiates dramatically compared to our current procedure. The liquid state of E-Coli K12 makes it easy to use in contrasts with the powdered enzymes. The advised phosphate buffer has a low buffering capacity. If the urine has a low pH (<5.3), first 25 µL 1 M KOH must be added followed by the buffer to reach the optimum pH. The proposed method was transferred to an automated solid phase extraction system (Gilson Aspec XL4) and validated according to regulatory guidelines. The method is suitable for confirmatory urine analysis of opiates for prisons, detoxification centres and hospital emergency testing.

Literature

1. A.C. Moffet, et al. Clarke's Isolation and Identification of drugs. 2nd ed. 1986. The Pharmaceutical Press, London. p 623-624, 835-836.
2. Zhen Lin, Pierre Lafolie and Olof Beck. Evaluation of analytical procedures for urinary codeine and morphine measurements. *J. Anal. Toxicol.* 18: 129-133 (1994).
3. Robert W. Romberg and Liewen Lee. Comparison of hydrolysis rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and β-glucuronidase. *J. Anal. Toxicol.* 19: 157-162 (1995).
4. Roche. β-Glucuronidase isolated from *Escherichia coli* K 12 (Rnase negative) β-D-Glucuronosid glucuronosohydrolase, EC 3.2.1.31, Version 3, November 1999.