



Bio-farmaceutische bepaling van geneesmiddelen

Deel IIc

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

Vervolg 2.1

Zowel bij SPE als LC worden inderdaad dezelfde vaste fasen gebruikt, alleen zijn er enkele belangrijke verschillen en deze komen met name voort uit het feit dat het doel van een SPE anders is dan van een LC bepaling. De bedoeling van LC is meestal om een verbinding, op een betrouwbare manier, kwantitatief te bepalen. Hiervoor is het belangrijk dat de verbinding een k' heeft van 2-8. Bij SPE hebben we echter te maken met een alles of niets (on/off) mechanisme. Bij SPE moet de verbinding in eerste instantie vaak een k' hebben die zo groot mogelijk en vervolgens zo klein mogelijk is. SPE wordt daarom ook wel digitale LC genoemd. Een belangrijk gevolg hiervan is dat bij LC gewerkt wordt met goed gedefinieerde fasen (b.v. silanol groepen die afgeschermd zijn) om te voorkomen dat er een complex retentiemechanisme ontstaat waardoor piekvervorming (b.v. tailing) kan optreden. Bij SPE is het enige dat van belang is dat een verbinding wordt vastgehouden en het maakt niet uit hoe dat gebeurt. Het gevolg is dat hier vaak niet of slecht afgeschermden fasen gebruikt worden. Een ander verschil is dat bij LC, in principe, alleen schone monsters mogen worden bepaald, terwijl bij SPE smerige monsters behandeld moeten worden. Het gevolg is dat in LC 3-5 μm deeltjes worden gebruikt met een relatief kleine porie diameter en dat in SPE 40-80 μm deeltjes worden toegepast met een grotere porie diameter. Dit laatste om verstoppingen te voorkomen. Een ander verschil is dat LC kolommen voor vele analyses moeten worden gebruikt en dat SPE cartridges, bij

voorkeur, slechts eenmalig worden gebruikt, hierdoor worden er goedkopere materialen in SPE cartridges gebruikt. Omdat de lengte van het pakkingsbed in SPE systemen aanzienlijk korter is, de deeltjes groter zijn en het bed minder homogeen is gepakt, is de efficiëntie van SPE cartridges veel lager ($N < 100$) dan van LC kolommen.

2.2 Principes en procedures

SPE procedures zijn tamelijk eenvoudig: een handmatig of commercieel gepakte cartridge, met hierin de juiste hoeveelheid van een geschikt sorbens, wordt gesolvateerd en geconditioneerd met de juiste vloeistoffen waarna het monster wordt opgebracht. Vervolgens wordt de cartridge gewassen en de analiet(en) worden (selectief) van de cartridge geëluëerd met (meestal) minder dan 1 ml elutievlloeistof. In veel gevallen worden de cartridges gepakt van 100-1000 mg sorbens met een deeltjesgrootte van 40-80 μm en een poriegrootte van 600 nm. Een algemene regel is dat op chemisch gebonden silica fasen ongeveer 1-5% van het sorbent gewicht aan verbindingen kan worden vastgehouden, dat maximaal 20 bed volumina (ca. 120 μl per 100 mg sorbens) aan wasvloeistof mogen worden gebruikt en dat elutie kan gebeuren met minder dan vijf bed volumina.

SPE procedures kunnen voor een aantal doeleinden worden gebruikt: monster concentrering (verrijking), monster opzuivering door het verwijderen van interfererende verbindingen en 'kolom vernielers', ontzouten van monsters, bewaren en opslag van monsters, fase verandering of uitwisseling van oplosmiddel, bescherming van chromatografische scheidingskolom en/of detectiesysteem en dragermateriaal voor *in situ* derivatiseringen. 'Kolom vernielers' zijn ondermeer

hydrofobe verbindingen (b.v. vet, olie, smeer), polymere componenten en vaste deeltjes die na injectie de kwaliteit van de analytische kolom dramatisch verslechteren.

Vanzelfsprekend heeft SPE, en dan met name off-line SPE, ook een aantal nadelen. De belangrijkste hiervan zijn: niet optimale gevoeligheid omdat slechts een aliquot wordt geïnjecteerd, monsterverliezen tijdens de indamp en/of droogdamp stappen, batch-tot-batch variaties in de cartridges, irreversibele adsorptie aan het cartridge materiaal en/of de frits en problemen ten gevolge van verontreinigingen (contaminaties). Andere nadelen van SPE zijn dat bevroren en weer ontdooide monsters soms vaste deeltjes (b.v. fibrine uit biologische monsters) kunnen bevatten die de cartridges verstopen, maar door toepassing van speciale frits kan dit probleem tot een minimum worden beperkt.

Er is de afgelopen jaren veel gepubliceerd over de principes, uitvoering en toepassingen van SPE. De meeste fabrikanten van SPE materialen hebben ook handboeken op de markt gebracht waarin veel informatie is te vinden. Enkele willekeurige voorbeelden hiervan zijn:

- *Sorbent Extraction Technology Handbook, Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA*
- *Sorbent Extraction for Sample Preparation, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ*
- *Solid Phase Extraction Application Guide and Bibliography, Waters Chromatography, Milford, MA*

De meest recente handboeken op dit gebied waarin bijzonder veel praktische informatie is te vinden zijn:

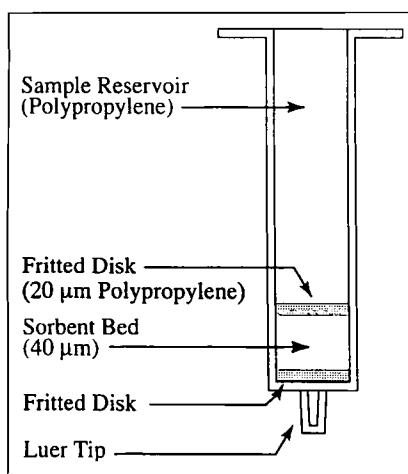
- *N. Simpson, Solid Phase Extraction: Principles, Strategies,*

and Applications, Marcel Dekker, New York, 1997

- E.M. Thurman, M.S. Mills, *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*, Wiley Interscience, New York, 1998

2.3 Uitvoering en apparatuur

SPE cartridges zijn in een grote verscheidenheid aan vormen, maten en uitvoeringen verkrijgbaar. De meest toegepast vorm is in Figuur 1 te zien. Behalve deze 'spuit-vormige' (syringe) cartridges zijn er ook cylinder-vormige cartridges, schijf-vormige (disks) SPE systemen en gecoate fibers verkrijgbaar.



Figuur 1: Vaste-fase extractie cartridge.

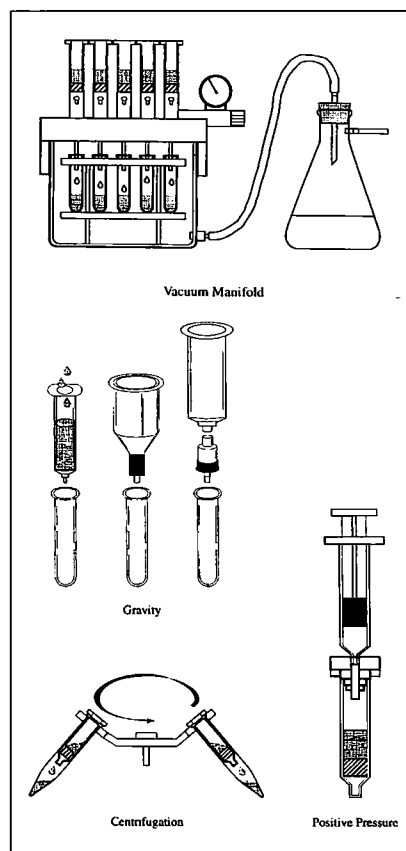
Iedere cartridge bestaat uit een houder (body) die meestal gemaakt is van medisch zuiver polyethyleen of polypropyleen. Verder zijn er meestal een tweetal frits (10-20 µm poriën) aanwezig, eveneens gemaakt van polyethyleen / polypropyleen, Teflon of roestvast staal, waartussen het sorbens is gepakt. De frits zijn zo gemaakt dat ze weinig weerstand hebben. Behalve de polyethyleen / polypropyleen cartridges zijn er ook glazen cartridges verkrijgbaar met Teflon of titaan frits. Deze cartridges worden met name toegepast als de weekmakers (aanwezig in kunststof materialen) de bepaling kunnen verstoren of wanneer er irreversibele adsorpties aan polyethyleen / polypropyleen plaatsvinden. Er is aangetoond dat de polymeerhouder, behalve weekmakers, tijdens de ex-

tractie C-10 tot C-28 alkenen (resten van het polymerisatie proces) kan afgeven. Verder blijkt dat op silica gebaseerde materialen, behalve sporen verontreinigingen, ook een redelijke hoeveelheid dimethyloctadecylsilanol kan afgeven. Deze silanol verbinding, en kleinere hoeveelheden van andere silanol verbindingen zijn waarschijnlijk tijdens de extractie door hydrolyse ontstaan. Verder is aangetoond dat de hoeveelheden die vrijkomen van deze storende verbindingen, niet alleen sterk afhangt van de fabrikant maar ook van de batch die wordt gebruikt. Daarom is het uitvoeren van blanco extracties een noodzaak tijdens de ontwikkeling van iedere SPE procedure.

Onderaan een cartridge bevindt zich een universele luer tip zodat de cartridge met veel van de beschikbare vacuüm systemen kan worden gecombineerd. Het gebruik van luer tips biedt tevens de mogelijkheid dat er een injectienaald op aangesloten kan worden of dat de cartridge direct kan worden gekoppeld met een filter of een andere container. De hoeveelheid sorbens in een cartridge varieert van 10 mg tot 10 g en het volume dat op een cartridge gebracht kan worden loopt uiteen van 1 tot 25 ml. De meeste cartridges kunnen, via een speciale adaptor, worden uitgerust met reservoir zodat volumina tot ongeveer 100 ml in bewerking kunnen worden genomen.

SPE cartridges zijn in het algemeen op een zodanige manier gepakt dat de vloeistoffen, die tijdens een extractie worden gebruikt, niet door middel van de zwaartekracht door de cartridge lopen. Dit betekent dat of met behulp van positieve druk (b.v. gasdruk, plastic spuit) of negatieve druk (b.v. vacuüm, plastic spuit) of door centrifugeren de vloeistoffen door de cartridge geperst moeten worden (Figuur 2). De elutie onder vacuüm kan worden uitgevoerd bij een druk van ca. 25 mm Hg. Door het gebruik van speciaal ontwikkelde systemen, kunnen bij alle drie de methoden, meervoudige extracties

worden uitgevoerd. In de vacuüm manifolds kunnen meestal verschillende rekjes / bakjes worden geplaatst waarmee de vloeistoffen worden opgevangen. In de wat meer geavanceerde systemen is een kraansysteem aanwezig waardoor de stroomsnelheid over alle cartridges hetzelfde is en soms is er een tweede vacuümvat aanwezig dat gebruikt kan worden om spoel- en wasvloeistoffen af te voeren.



Figuur 2: Transport van vloeistoffen over SPE cartridges.

Het nadeel van het gebruik van een vacuüm manifold is dat in het algemeen maximaal 16-24 monsters gelijktijdig in bewerking kunnen worden opgelost door een 96-well microtiterplaat systeem te gebruiken. Microtiter platen worden al sinds jaar en dag gebruikt voor immunoassays, maar de toepassing bij SPE procedures is relatief nieuw. Het zal duidelijk zijn dat deze systemen het mogelijk maken om 96 extracties gelijktijdig uit te voeren.

Er worden in dit geval blokken of platen gebruikt die disks of kleine cartridges bevatten in een matrix van 8 bij 12.

De snelheid waarmee de verschillende vloeistoffen door de verschillende SPE systemen worden geperst is in een aantal gevallen een kritische parameter voor het verkrijgen van hoge recoveries en reproduceerbare resultaten. Het is daarom verstandig, zeker indien relatief hoge snelheden worden gebruikt een grafiek te maken waarin het debiet wordt uitgezet tegen de recovery. Vuistregels bij het gebruik van SPE systemen zijn dat de verschillende activerings, conditionerings, was en elutie vloeistoffen met een debiet van 5-10 ml/min over NP en RP fasen kunnen worden geleid en dat bij IE materialen een debiet van 1-5 ml/min is aan te bevelen. Het opbrengen van het monster kan het beste gebeuren bij een debiet van 1-2 ml/min. Een stelregel is verder dat bij gebruik van membranen hogere debieten kunnen worden (20-50 ml/min) gebruikt dan bij traditioneel gepakte cartridges. In Tabel 1 (zie hieronder) zijn enkele algemene richtlijnen gegeven voor de debieten die gebruikt kunnen worden.

Om schonere extracten te verkrijgen, of om verstoppingen te voorkomen kunnen filters worden gebruikt. Deze filters kunnen vaak rechtsreeks aan de luer tip van de cartridge worden gekoppeld. Om storende deeltjes te verwijderen kunnen 0,45 µm Nylon Acrodisc syringe filters goede diensten bewijzen. In combinatie van membraan-extractie disks kunnen er dieptefilters (depth filters) worden toegepast die er voor zorgen dat vaste deeltjes en macromoleculen de poriën van het membraan niet kunnen verstopen.

Een SPE kan zoals gezegd om verschillende redenen worden uitgevoerd. Het is daarom van groot belang dat alvorens een SPE procedure wordt ontwikkeld het doel van de extractie duidelijk is. Indien een SPE wordt gebruikt om een monster te concentreren kan de volgende procedure worden gevolgd: de analiet wordt zo goed mogelijk vastgehouden op het sorbens, de analiet wordt vervolgens geëluëerd in een zo klein mogelijk volume en het eluens wordt tot slot verder geconcentreerd.

Indien het voornaamste doel is om een monster op te schonen kan dezelfde procedure worden gevolgd, maar nu kunnen een drietal procedures worden gevolgd: interfererende verbindingen worden vastgehouden terwijl de analiet geen retentie vertoont, analiet wordt vastgehouden terwijl de interfererende verbindingen geen retentie vertonen en zowel de analiet als de interfererende verbindingen worden vastgehouden, en met behulp van een geschikte wasvloeistof worden of de analiet of de interfererende verbindingen verwijderd.

Hieruit blijkt dat het dus niet altijd zo is dat de analiet vastgehouden moet worden op het sorbens. In het geval sterk polaire verbindingen moeten worden bepaald is het niet altijd mogelijk om deze goed vast te houden, zeker niet op een hydrofobe fase. In dat geval is het beter om eerst de interfererende verbindingen te verwijderen en eventueel in een tweede stap het monster te concentreren.

2.4 Volgorde van handelingen

In principe bestaat iedere SPE procedure uit vijf stappen: activeren van de cartridge, conditioneren van de car-

tridge, opbrengen van het monster, wassen (opzuiveren) van het monster en elueren van de analiet(en).

De volgorde van handelingen in een SPE procedure is nagenoeg altijd hetzelfde, ongeacht het feit of polaire of apolaire sorbentia worden gebruikt en onafhankelijk van de procedure die wordt toegepast.

De genoemde vijf basisstappen zijn:

Activering (wetting) van de cartridge met een organisch oplosmiddel (b.v. methanol). Deze stap is noodzakelijk omdat SPE cartridges in het algemeen in een vacuüm verpakking, en dus droog, worden afgeleverd. Activering van een chemisch gebonden (hydrofobe) silica fase heeft als doel de lucht die nog in de cartridges aanwezig is te verwijderen en vervolgens om de koolstofketens te solvateren. Op deze manier wordt een groot oppervlak gevormd waardoor een efficiënte extractie kan plaatsvinden.

Een derde belangrijke reden is het verwijderen van allerlei resten die tijdens het produceren van de cartridges kunnen zijn achtergebleven en de bepaling zouden kunnen verstoren. Een eerste visuele controle van de cartridges alvorens aan de activering wordt begonnen kan al veel problemen voorkomen. Alle op silica gebaseerde fasen horen wit te zijn terwijl op SDB (styreen divinylbenzeen) gebaseerde fasen slechts een licht gele tint mogen hebben. Het niet op de juiste wijze uitvoeren van deze stap heeft meestal lage recoveries tot gevolg, door een verminderde retentie van de analiet(en) op de cartridge en/of interferenties in het chromatogram die niet in verband gebracht kunnen worden met het oorspronkelijke monster. Bij het gebruik van hydrofobe sorbentia is methanol zonder meer de beste keus, terwijl bij polaire sorbentia behalve methanol ook hexaan gebruikt kan worden om onzuiverheden van de kolom te verwijderen.

Wordt vervolgd.

Tabel 1 Richtlijnen voor debieten tijdens vaste-fase extracties

Hoeveelheid vaste fase (mg)	50-100	200-500	500-1000
Cartridge volume (ml)	1	3	6
Debiet (ml/min)	1-5	5-15	15-40