



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 2.4

Activering van niet gemodificeerde silica fasen moet zeker niet met methanol gebeuren omdat dit oplosmiddel de vaste fase deactiveert, een oplosmiddel met een polariteit als dichloormethaan is hiervoor beter geschikt. Belangrijk is dat de cartridge niet droog komt te staan tijdens deze stap.

Dit betekent indien de overmaat oplosmiddel wordt verwijderd door een stroom lucht of stikstof, dit met grote voorzichtigheid moet gebeuren. Een alternatief voor het verwijderen van de overmaat oplosmiddel is het spoelen van de cartridge met 1 bedvolume (120 µl per 100 mg sorbens) water of buffer.

Conditionering (equilibrering) van de cartridge is noodzakelijk omdat het activeren in veel gevallen plaats vindt met een organisch oplosmiddel dat een hoge elutiesterkte heeft. Conditionering gebeurt, indien een apolaire fase wordt gebruikt in combinatie met een polaire matrix, door het wassen van de cartridge met water, of liever nog, met een geschikte buffer. Deze stap is nodig om de overmaat organische vloeistof die in de eerste stap is gebruikt te verwijderen en om de polariteit van de vloeistof in de poriën zoveel mogelijk gelijk te maken aan die van de matrix. Dit betekent dat de fysisch-chemische eigenschappen van het oplosmiddel dat in deze stap gebruikt wordt, zoveel mogelijk moet lijken op die van de matrix (b.v. polariteit, ionsterkte, pH).

Het is belangrijk dat bij het opbrengen van het monster de cartridge zodanig is geconditioneerd dat er

geen gradiënt (b.v. pH, polariteit) over de cartridge ontstaat. Dit om te voorkomen dat de recovery van monster tot monster verschillend is. Ook tijdens deze stap mag de cartridge niet droog komen te staan.

Het *opbrengen van het monster* is de volgende stap. In deze stap wordt het monster door de cartridge geperst, worden de analiet(en) en/of interferende componenten vastgehouden en wordt de overmaat vloeistof naar een afvalvat gespoeld. Om de recovery te verhogen kan in een aantal gevallen de in de cartridge achtergebleven vloeistof, door verdampen, worden verwijderd. Op deze manier kan een betere (ad)sorptie worden verkregen. Bij de extractie van vluchtige componenten moet dit echter zeer zorgvuldig gebeuren. Het debiet waarmee het monster wordt opgebracht (1-5 ml/min) mag niet te hoog zijn, omdat anders de analiet(en) niet goed worden vastgehouden door het sorbens. Een debiet van 1 ml/min is vaak het optimum. Met name indien ion-wisselings (IE) SPE wordt toegepast is het debiet een kritische parameter. Dit omdat de kinetiek die bij deze interactie betrokken is relatief traag is.

Omdat de verschillende vloeistoffen met behulp van een relatief klein drukverschil over de cartridge worden geperst kan het debiet van cartridge tot cartridge verschillend zijn. Dit hangt samen met de deeltjes-grootte verdeling of de manier waarop de individuele cartridges zijn gepakt. In sommige gevallen is het noodzakelijk om de vloeistofstroom op een bepaald moment te onderbreken of te stoppen om te voorkomen dat het sorbensbed uitdroogt. Het debiet over de cartridge moet nauwkeurig worden gecontroleerd, bijvoorbeeld door het aanpassen van het vacuüm, omdat bij een te groot debiet de recoveries signifi-

cant zullen dalen. In die gevallen dat de analiet(en) sterk aan matrix componenten zijn gebonden is het belangrijk om een relatief laag debiet te gebruiken.

Viskeuze monsters moeten voordat deze opgebracht worden, eerst worden verdund en monsters die vaste deeltjes bevatten moeten eerst worden gecentrifugeerd. Deze stappen zijn noodzakelijk om te voorkomen dat de snelheid tijdens de SPE procedure dramatisch afneemt of dat de cartridge zelfs volledig verstopt. Inhomogene monsters zoals volbloed kunnen met SPE worden behandeld mits de erythrocyten eerst worden gelyseerd en het monster wordt gecentrifugeerd om de aanwezige membranen te verwijderen. Tegenwoordig zijn er dieptefilters verkrijgbaar die bovenop de SPE cartridge gelegd kunnen worden om verstoppingen te voorkomen. Wanneer grote volumina (> 100 ml) monster worden opgebracht, kan het voorkomen dat de solvatatie van de vaste fase afneemt tijdens het opbrengen van het monster, waardoor lagere recoveries worden verkregen. Dit probleem kan voorkomen worden door 1-3% activeringsvloeistof (b.v. methanol) aan het monster toe te voegen. Op deze manier zal het evenwicht tussen het sorbens en de mobiele fase bewaard blijven.

Het wassen van het monster in de cartridge kan gebeuren met water, of liever, met een geschikte buffer, of een serie oplosmiddelen met toenemende elutiesterkte. Wassen is belangrijk om selectief die verbindingen te verwijderen die kunnen storen tijdens de hieropvolgende chromatografische analyse. De elutiesterkte van een oplosmiddel kan aangepast worden door de polariteit, pH of ionsterkte te veranderen. Voor een optimale wasstap moet de elutiesterkte zodanig worden geko-

zen dat de analiet(en) nog net op de vaste fase blijven zitten, maar dat de interfererende componenten er wel afkomen.

Waterige buffers, of water zelf, kunnen worden gebruikt om monsters te onteiwitten of om zouten te verwijderen. Hydrofobe interacties worden tijdens deze stap in het algemeen niet verstoord, maar afhankelijk van de pH en de ionsterkte kunnen polaire interacties wel worden beïnvloed. Bij het gebruik van hydrofobe sorbentia is het allereerst belangrijk om alle componenten te verwijderen die polairder zijn dan de analiet(en), zonder dat de analiet moleculen zelf elueren. Voor de minder polaire verbindingen geldt dat deze na elutie van de analiet(en) meestal op de kolom achterblijven. Organische oplosmiddelen worden gebruikt om de genoemde storende verbindingen te verwijderen en, om afhankelijk van de oplosmiddelsterkte en de aanwezige hydrofobe en polaire / ionogene interacties te verbreken. De hoeveelheid en de polariteit van de wasvloeistof die gebruikt kan worden hangt sterk af van de k' waarde van de analiet(en) en de interferenten. Bij de bespreking van de elutie van de analiet(en) worden hierover meer details gegeven.

Drogen van de cartridge is een stap die gebruikt kan worden om de overmaat vloeistof of buffer die in de poriën is achtergebleven te verwijderen. Verder is het, na het drogen van de cartridge, mogelijk om om te schakelen van een polaire naar een apolaire vloeistof, of omgekeerd. Belangrijk is dat het drogen niet mag plaatsvinden tijdens het activeren, conditioneren en het opbrengen van het monster, omdat dan verliezen kunnen optreden van vluchtige componenten of dat irreversibele adsorpties kunnen plaatsvinden. In veel gevallen heeft het drogen van de cartridge tot gevolg dat de monsters gedurende langere tijd bewaard kunnen worden. Het water dat gebonden is in de poriën van de vaste fase kan worden verwijderd door de cartridge onder

vacuüm (25 mm Hg) te drogen gedurende ten minste 15 min.

Elutie van de analiet(en) vindt plaats met een geschikt eluens, waarna het eluens wordt verzameld in een geschikte container voor verdere verwerking (b.v. concentrering, injectie). Elutie kan plaats vinden door de pH aan te passen (in het geval van geladen verbindingen) of door een organisch oplosmiddel te gebruiken in het geval hydrofobe interacties moeten worden verbroken. Het volume waarmee de analiet(en) geëluëerd worden moet zo klein mogelijk worden gehouden om verdunning van het monster te voorkomen. Indien het retentie / elutie mechanisme bekend is, is het mogelijk het elutievolume beperkt te houden tot twee bed volumina. Een algemene regel is dat het bed volume van de meeste vaste fasen in de orde van 1,0-1,2 µl/mg sorbens ligt.

De hoeveelheid elutievloeistof die nodig is hangt af van het doodvolume (V_0) van de vaste fase en de k' waarde van de analiet(en). Voor een chemisch gebonden silica fase met 60 µm deeltjes geldt dat het doodvolume ongeveer 120 µl / 100 mg vaste fase is. Als aangenomen wordt dat er een 500 mg cartridge wordt gebruikt en de k' waarde van de analiet(en), tijdens de elutiestap, 2-3 is kan het elutievolume worden berekend met behulp van de volgende formule:

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

In deze vergelijking geeft V_r het maximum volume van de eluerende piek weer. V_r is in dit geval dus 2,4 ml ($[5 \times 120 \mu\text{l}] \times [1+3] = 2400 \mu\text{l} = 2,4 \text{ ml}$). Dit betekent weer dat om 100% recovery te krijgen het elutievolume ongeveer $2 \times 2,4 \gg 5 \text{ ml}$ is. Alleen indien de k' waarde van de eluerende pieken $\ll 1$ is, kan met een elutievolume van 2,5 ml worden volstaan.

Een aardige methode om een cartridge voor te bereiden op de elutie

van een monster is om na de laatste wasstap de cartridge te centrifugeren en 50 µl van de elutievloeistof toe te voegen en weer te centrifugeren. Deze stap zorgt ervoor dat de restanten van de laatste wasstap verwijderd worden zodat deze niet tijdens de analyse kunnen storen.

De keuze van de beste elutievloeistof hangt ondermeer af van te hierop volgende analyse stap. Indien LC wordt gebruikt kunnen het best polaire oplosmiddelen (b.v. acetonitril, methanol) worden gebruikt en indien GC wordt gebruikt liggen apolaire oplosmiddelen (b.v. ethylacetaat, chloroform, hexaan) meer voor de hand. Indien de overgang van een waterig milieu naar hexaan gewenst is, kan ethylacetaat als intermediair worden gebruikt.

Meer details omtrent de verschillende stappen van een SPE procedure is te vinden in de sectie methode ontwikkeling.

De laatste stap van een SPE procedure is dat een aliquot van de elutievloeistof in het chromatografisch systeem wordt geïnjecteerd of dat de elutievloeistof eerst wordt verdampd en dat het residu vervolgens wordt opgenomen in een geschikt oplosmiddel.

De oplosmiddelen die in de verschillende stappen worden gebruikt kunnen door de cartridge worden geperst met behulp van positieve of negatieve druk of door gebruik te maken van de centrifugaal kracht. De capaciteit van het sorbens in de SPE cartridge hangt af van het type fase dat wordt gebruikt. Worden silica gebonden fasen gebruikt dan is de capaciteit meestal 10-20 mg organisch materiaal per g sorbens. Dit getal geeft de totale hoeveelheid organisch materiaal – inclusief analiet(en) en matrix componenten – dat wordt geadsorbeerd. Dit betekent dat ofschoon de concentratie van de analiet(en) vaak in het ng/ml tot µg/ml gebied ligt, de cartridge minimaal 100 mg sorbens moet bevat-

Tabel 2 Samenvatting van stappen in SPE

Stap		Sorbens	
Apolair	Polair	Ion-wisseling	
Activeren	MeOH gevolgd door Water	Hexaan, chloroform	MeOH / ACN gevolgd door een buffer
Wassen	Water, buffer of oplosmiddel met zwakke elutiesterkte	Oplosmiddel van het monster of apolair organisch oplosmiddel	Buffer met juiste pH
Elueren	MeOH, aceton, ACN ethylacetaat, chloroform, zure/basische MeOH, THF, of combinatie van bovenstaande (Maximaal 50% modifier kan worden toegevoegd)	Aceton, ACN, isopropanol, MeOH, water, buffer, of combinatie van bovenstaande selectieve tegenionen	Buffer met andere pH, oplossing met hoge ionsterkte of buffer met meer

ACN, acetonitril; MeOH, methanol; THF, tetrahydrofuraan

ten. Voor biologische monsters gaat op dat 100 mg cartridges gebruikt kunnen worden voor de extractie van 1 ml plasma of urine monsters.

Een korte samenvatting van de verschillende stappen van een SPE procedure is gegeven in Tabel 2 hierboven.

2.5 Vaste fasen

Het aantal sorbentia dat voor SPE gebruikt kan worden neemt nog steeds toe. Een overzicht van veel gebruikte fasen is gegeven in de Tabel 3. De sorbentia die in SPE gebruikt worden kunnen op verschillende manieren worden ingedeeld. Eén van de mogelijkheden is: chemisch gebonden silica fasen die zowel in de RP, NP als IE mode gebruikt kunnen worden, silicagel, Florisil en alumina fasen die gebruikt kunnen worden in de adsorptie-, NP- en IE-mode, polymeren die met name geschikt zijn voor RP en IE extracties, chemisch gebonden polymeren die net als de chemisch gebonden silica fasen zowel in de RP, NP als IE mode gebruikt kunnen worden, exclusie fasen voor het

scheiden op basis van molecuulgrootte en speciale fasen voor het extraheren van specifieke groepen van verbindingen (b.v. mengfasen) (zie tabel 3a hieronder).

Vaste fasen voor SPE worden gekarakteriseerd door een aantal parameters die met elkaar de eigenschappen van de fase en de toepassingsmogelijkheden bepalen. De belang-

rijkste hiervan zijn: functionaliteit, pH stabiliteit, oplosmiddel stabiliteit, capaciteit, specifiek oppervlak, porie grootte en deeltjes grootte (zie tabel 3b op pagina 20).

Het belang van de functionaliteit spreekt voor zich: de polariteit van de fase alsmede de hierop aanwezige functionele groepen bepalen welke interacties er tussen de fase en de analiet(en) kunnen plaatsvinden.

Een heel belangrijke parameter is de pH stabiliteit van de fase. Op silicagel gebaseerde fasen zijn, in principe, alleen stabiel bij een $2 < \text{pH} < 8$. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat in SPE de pH minder kritisch is dan bij LC, omdat in het eerste geval het sorbens slechts eenmalig wordt gebruikt. Eén van de voordelen van alumina en polymere fasen, ten opzichte van silica fasen, is dat deze fasen stabiel zijn bij een $1 < \text{pH} < 13$. Behalve ontleding onder invloed van de zuursterkte, kan het oplosmiddel zelf ook voor destabilisering van de fase zorgen. Zo zal water de activiteit van niet gemodificeerd silica en alumina materialen sterk beïnvloeden, terwijl water geen invloed heeft op de stabiliteit van chemisch gebonden silica fasen. De capaciteit van de verschillende vaste fasen is sterk verschillend. Zo is de capaciteit van chemisch gebon-

Tabel 3a Vaste fasen die voor SPE toegepast worden

Apolaire fasen	Polaire fasen en zwakke ion-wisselaars	Sterke ion-wisselaars
Methyl (C-1)	Cyanopropyl (CN)	Propylsulfonzuur (SCX-P)
Ethyl (C-2)	Diol (2OH)	Benzeensulfonzuur (SCX-B)
Butyl (C-4)	Aminopropyl (NH ₂)	Kwaternaire ammonium
Hexyl (C-6)	Primair / secundair amine (PSA)	verbindingen (SAX)
Octyl (C-8)	Propylcarbonzuur (CBA)	
Cyclohexyl (CH)	Silica (SiOH)	
Fenyl (PH)	Kieselguhr (SiOH)	
Difenyl (2PH)		
Octadecyl (C-18)		
Graphitized carbon	Florisil (Mg ₂ SiO ₃)	
Copolymers (SDB)	Alumina (AlOH)	

Tabel 3b Toepassing van vaste fasen voor SPE

Apolaire fasen

Methyl	Weinig stabiel, weinig retentie, redelijk beschikbaar
Ethyl	Weinig stabiel, weinig retentie, redelijk beschikbaar
Butyl	Beperkte stabiliteit, redelijke retentie, goede beschikbaarheid Geschikt voor hydrofobe macromoleculen (b.v. eiwitten, peptiden) Bijzonder geschikt voor RP-IP toepassingen
Cyanopropyl	Redelijk stabiel, redelijk-goede retentie, goede beschikbaarheid Andere selectiviteit in vergelijking met C-18 Bruikbaar in NP en RP mode Snelle evenwichtsinstellingen
Hexyl	Beperkte stabiliteit, redelijk-goede retentie, goede beschikbaarheid
Octyl	Redelijk-goede stabiliteit, goede retentie, goede beschikbaarheid Ideale fase voor hydrofiele macromoleculen (b.v. peptiden/ eiwitten)
Cyclohexyl	Redelijk stabiel, redelijk -goede retentie, goede beschikbaarheid
Fenyl	Stabiel, goede retentie, goede beschikbaarheid Andere selectiviteit in vergelijking met C-18 Bijzonder geschikt voor aromatische verbindingen
Octadecyl	Stabiel, goede retentie, zeer goede beschikbaarheid In veel gevallen de meest geschikte fase
SDB	Copolymeer van styreen en divinylbenzeen, zeer sterke retentie Stabiel bij $0 < \text{pH} < 12$, goede piekvorm, lange levensduur Laag schotelgetal
Koolstof	Zeer sterke retentie, stabiel bij $0 < \text{pH} < 14$ Relatief duur, vervuult snel

Polaire fasen en zwakke ion-wisselaars

Silica	Deactivering door water, weinig stabiel ($2 < \text{pH} < 8$) Geschikt voor adsorptie en NP toepassingen
Alumina	Deactivering door water, weinig stabiel ($2 < \text{pH} < 12$) Geschikt voor adsorptie en NP toepassingen
Cyanopropyl	Redelijk stabiel, redelijk-goede retentie, goede beschikbaarheid Andere selectiviteit in vergelijking met C-18 en silica / alumina Bruikbaar in NP en RP mode Snelle evenwichtsinstellingen
Diol	Geschikt voor de scheiding van polyolen
Aminopropyl	Weinig stabiel, matige retentie, beperkte beschikbaarheid Bruikbaar in NP en RP mode en als zwakke ion-wisselaar Geschikt voor scheiding van koolhydraten

Amine	Zwakke ion-wisselaar geschikt voor sterke zuren
Carbonzuur	Zwakke ion-wisselaar geschikt voor sterke basen

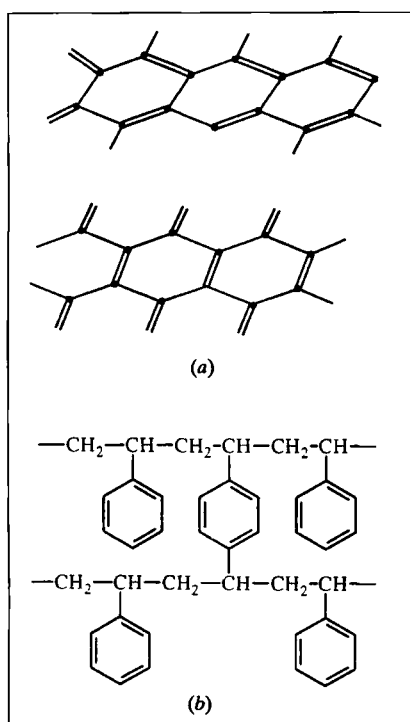
Sterke ion-wisselaars

Sulfonzuur	Geschikt voor zwakke basen Zowel gebaseerd op silica als op SDB
Kwaternaire ammonium	Geschikt voor zwakke zuren Zowel gebaseerd op silica als op SDB

den silica fasen beduidend lager dan die van niet gemodificeerd silicagel en hebben SDB (copolymere van styreen en divinylbenzeen) vaak een 2-3 maal hogere capaciteit. Het specifiek oppervlak van de organische polymeren is in de orde van $600-1.200 \text{ m}^2/\text{g}$. De capaciteit van een sorbens wordt bepaald door een aantal parameters waaronder het specifiek oppervlak van het materiaal. Het specifiek oppervlak wordt op zijn beurt weer bepaald door de poriegrootte en de deeltjesgrootte. De deeltjesgrootte en de poriegrootte zijn weer belangrijk voor de efficiëntie (schotelgetal-N) en de tegendruk in het systeem. De tegendruk in het systeem is een factor die mede bepalend is voor het debiet dat gebruikt kan worden. Om verstoppingen te voorkomen mag de poriegrootte ook weer niet te klein worden gekozen. Dit betekent dat voor iedere extractie opnieuw het juiste compromis tussen al deze parameters moet worden gevonden.

In aanvulling op de chemisch gemodificeerde silica fasen, die nog steeds het meest worden toegepast, worden de polymere fasen steeds belangrijker. Voorbeelden hiervan zijn de neutrale en macroporeuze polymeren, met een groot oppervlak, die gebruikt kunnen worden voor het vasthouden van organische verbindingen aanwezig in een polaire (waterige) matrix. Ieder deeltje bestaat uit een groot aantal sterk gecrosslinkte microdeeltjes, waardoor een groot oppervlak ontstaat met een redelijk uniforme poriegrootte verdeling.

De apolaire, op styreen-gebaseerde polymeren (Figuur 3), zijn met name geschikt voor de extractie van niet al te polaire verbindingen vanuit waterige oplossingen. Dit komt omdat de aanwezige aromaatringen zorgen voor additionele electron-donor interacties tussen de vaste fase en de dubbele-bindingen in de analiet moleculen. Om de weerstand tegen massa overdracht te verminderen worden deze materialen vaak beladen met



Figuur 3: Structuur van geactiveerde koolstof (a) en styreen-divinylbenzeen co-polymeren (b).

hydrofiele groepen (b.v. sulfonaat) waardoor waterige monsters effectiever kunnen worden geëxtraheerd. De op acrylaat-gebaseerde polymeren, die polairder zijn dan de SDB fasen, zijn vooral geschikt voor de extractie van meer polaire verbindingen vanuit een apolaire matrix of de extractie van apolaire verbindingen vanuit een polair monster. Een belangrijk voordeel van het gebruik van polymere fasen is dat deze materialen bij alle pH waarden tussen 1 en 13 stabiel zijn.

De grafiet-achtige koolstof fasen (Figuur 3 hierboven) worden tegenwoordig weer regelmatig gebruikt voor de gelijktijdige extractie van zure, basische en neutrale verbindingen of voor de extractie van polaire moleculen. De extractie is niet alleen gebaseerd op hydrofobe interacties maar ook op dipool en anion IE interacties. Dit omdat op het oppervlak van grafiet-achtig koolstof zowel geladen als ongeladen zuurstof-groepen aanwezig zijn. Dit betekent dat dit materiaal als een gemengde (mixed-mode) fase kan worden beschouwd.

2.6 Problemen

Problemen die zich voordoen bij de uitvoering van een SPE zijn: het drooglopen van de cartridge waardoor de capaciteit sterk kan verminderen, het oplossen van de silica bij het gebruik van extreme pH waarden, de aanwezigheid van lucht in het pakkingsbed waardoor verschillen in het debiet en het stromingspatroon kunnen ontstaan en de vorming van kanaaltjes (channeling) in het pakkingsbed waardoor het monster door de cartridge kan stromen zonder in contact te komen met het sorbens. Kanaalvorming is verantwoordelijk voor een inhomogeen debiet over de cartridge en voor een verminderde reproduceerbaarheid en capaciteit.

Een ander probleem kan voortkomen uit het feit dat niet reproduceerbare resultaten worden verkregen omdat SPE cartridges van verschillende fabrikanten zich niet altijd hetzelfde gedragen. Dit kan ondermeer verklaard worden doordat: er verschillende silica materialen als basis worden gebruikt, de chemie waarmee een gebonden fase wordt gemaakt verschillend is, de (koolstof) belading niet gelijk is en er op een verschillende manier ge-endcapt is.

Met name de koolstofbelading van de verschillende materialen loopt uiteen. Voor een C-2 fase ligt dit in de orde van 5%, terwijl dit voor een C-18 fase tot 20% kan oplopen. De koolstofbelading is zo belangrijk omdat deze mede bepaalt met hoeveel monster een cartridge beladen kan worden. Voor IE materialen is niet de koolstofbelading maar de IE capaciteit (meq/g) bepalend. Voor SPE materialen ligt dit in de orde van 0,5-1,5 meq/g.

Dat er verschillen in de recovery kunnen optreden als verschillende soorten silica worden gebruikt ligt voor de hand, en is besproken in deel IIa van deze serie. Deze verschillen van fabrikant-tot-fabrikant of zelfs van batch-tot-batch hebben te maken met een verschil in de

gemiddelde deeltjesgrootte, deeltjesgrootte verdeling, gemiddelde poriegrootte of poriegrootte verdeling. De poriegrootte van de meeste gebonden silica materialen is 60 Å. Er zijn echter ook materialen beschikbaar met een poriegrootte van 275-300 Å, maar deze worden met name gebruikt voor de exclusie van verbindingen met een moleculairgewicht van > 2.000 Da.

Een ander probleem dat zich kan voordoen is het optreden van verstoppingen. Afhankelijk van de oorzaak zijn er verschillende manieren op dit te voorkomen. De meest universele manier is de toepassing van diepte (depth) filters. Deze filters kunnen boven op het sorbensbed worden gelegd en zijn in veel gevallen afdoende. Indien eiwitten aanwezig zijn is het regelmatig noodzakelijk om een andere procedure te volgen. In dit geval kan er 0,25 ml 2 M zoutzuur worden toegevoegd aan eiwit bevattende monsters, die vervolgens bij 1.000 g gedurende 10 min (4 °C) worden gecentrifugeerd. Behalve zoutzuur kunnen ook trifluorazijnzuur (TFA) en fosforzuur worden gebruikt. Vaak geeft echter 10% TFA de beste resultaten. Tijdens deze stap worden niet alleen de analiet-eiwit bindingen verbroken, maar worden eiwitten ook gedenuatureerd en neergeslagen. Behalve zuren kunnen ook organische oplosmiddelen worden gebruikt om eiwit problemen op te lossen of te voorkomen. Een voordeel van het gebruik van aceton boven acetonitril en methanol is dat hiervan grotere hoeveelheden gebruikt kunnen worden zonder dat de eiwitten neerslaan. Een probleem bij het gebruik van eiwitprecipitatie procedures is dat er occlusie van de analiet kan plaatsvinden. Het is daarom belangrijk dat goed wordt uitgezocht welk reagens er moet worden gebruikt. Het probleem bij het gebruik van methanol en acetonitril is dat er toch regelmatig verstoppingen optreden.

Indien zich problemen voordoen zijn er een aantal parameters die achter-

Tabel 4 Interacties op polaire en apolaire fasen

Fase		Interactie		
		Apolair	polair	IE
Octadecyl	C-18	Primair	-	Mogelijk
Octyl	C-8	Primair	Secundair	Mogelijk
Cyclohexyl	CH	Primair	Secundair	Mogelijk
Fenyl	PH	Primair	Prim./Sec.	Mogelijk
Cyano	CN	Primair	Prim./Sec.	Mogelijk
Diol	2OH	primair	Prim./Sec.	Mogelijk

Primair, primaire interactie op de functionele groep; Secundair, secundaire interactie op de silica matrix; Mogelijk, mogelijke silanol interactie (afhankelijk van de pH)

eenvolgens getest kunnen worden om te achterhalen waar het eigenlijke probleem zich bevindt:

Bestudeer of inderdaad het meest geschikte fasensysteem is gekozen aan de hand van de volgende parameters: polariteit van de matrix en de pH, oplosbaarheid van de analiet(en), capaciteit van de cartridge, optreden van secundaire interacties en polariteit van het eluens en de pH. Vervolgens kunnen de volgende parameters worden gecontroleerd: activerings en conditionerings procedures, mengbaarheid van de verschillende vloeistoffen, optreden van kanaalvorming, controle van het debiet en vluchtigheid van de analieten.

De hierboven genoemde lijst van mogelijke oorzaken is zeker niet volledig, maar aan de hand hiervan kan in de meeste gevallen de oplossing van het probleem worden gevonden.

2.7 Retentiemechanismen

De retentiemechanismen in SPE zijn natuurlijk hetzelfde als in LC. Omdat echter het doel van de analyse totaal verschillend is, is het belang van de diverse interacties wel anders. In LC wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van een enkelvoudig en uniform retentiemechanisme waarbij alleen, of voornamelijk, primaire interacties een rol spelen. In SPE is het van belang dat een verbinding op een

bepaald moment zo goed mogelijk wordt vastgehouden en het maakt dan niet of dit met primaire, secundaire of een combinatie van primaire en secundaire interacties gebeurt. Dit betekent dat secundaire interactiekrachten zoals H-brugvorming door vrije silanol groepen en ionogene interacties, die in LC zoveel mogelijk worden vermeden, in SPE een essentiële rol spelen (zie tabel 4 hierboven).

2.8 Interacties en selectiviteit

Bij SPE zijn de interacties tussen de analiet(en) en het sorbens met name afhankelijk van: de fysisch-chemische eigenschappen van de analiet(en); de fysisch-chemische eigenschappen van het sorbens en de fysisch-chemische eigenschappen van de matrix.

Met andere woorden in alle gevallen spelen de functionele groepen die verantwoordelijk zijn voor de interacties tussen de analiet(en), het

sorbens en de matrix (b.v. H-brugvorming, electrostatische interacties, van der Waals krachten) een alles overheersende rol. Voorbeelden zijn de H-brugvormende eigenschappen van amino, carboxyl, fenol en thiol groepen, de dispersie of van der Waals interacties van alkyl en aromaat groepen, de electrostatische interacties van sulfonaat en kwaternaire ammoniumgroepen en de dipool-geïnduceerde dipool interacties van cyano groepen. In werkelijkheid is het echter vaak zo dat analieten vast gehouden zullen worden door meervoudige interacties omdat verschillende functionele groepen aan de analiet of op het sorbens aanwezig zijn. Andere interacties die een rol kunnen spelen zijn exclusie krachten, ionogene interacties en in sommige gevallen covalente bindingen. De hoeveelheid energie die bij de verschillende interacties betrokken is verschilt sterk van elkaar (zie tabel 5 hieronder). De van der Waals interacties behoren in het algemeen tot de zwakste en minst selectieve interacties, terwijl de covalente bindingen tot de sterkste en meest selectieve interacties behoren. Het voordeel van een sterkere interactie tussen de analiet(en) en het sorbens is een groter doorbraakvolume, maar het nadeel is dat het elutievolume ook groter wordt. Meervoudige interacties geven vaak aanleiding tot een groter doorbraakvolume, en dus ook weer tot een groter elutievolume.

Wordt vervolgd

Tabel 5 Interactiekrachten in SPE

Interactie	Kracht	Bindings energie (kcal/mol)
Apolair	Van der Waals / dispersie	1-5
Polair	Dipool-geïnduceerde dipool	5-10
	Dipool-dipool	5-15
	H-brug vorming	
Ionogeen	Electrostatisch	50-200
Covalent		200-800