

- 国科学技术出版社,1991. 985.
- [17] Laganh * A , D'Ascenzo G , Fago G , et al. Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in crops by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/diode array detection [J]. *Chromatographia* ,1997 ,46 :256 ~ 264.
- [18] Molina C , Honing M , Barcelo D. Determination of organophosphorous pesticides in water by SPE followed by LC/ high flow pneumatically assisted electrospray MS [J]. *Anal Chem* ,1994 ,66(24) :4444 ~ 4449.
- [19] Henry K. ROTICH, 张卓勇, 赵进英等. 环境水中甲基对硫磷、对硫磷和辛硫磷农药残留的 SPE-HPLC 分析 [J]. *分析测试学报*, 2002, 21(5) :50 ~ 53.
- [20] 陶宏亮, 关燕萍, 苏晓峰, 等. SPE-HPLC 用于蔬菜中甲基对硫磷和对硫磷同时测定 [J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(1) :46 ~ 49.
- [21] 徐远金, 李永库. 液相色谱-电喷雾质谱联用法测定蔬菜中 7 种有机磷农药残留量 [J]. *分析测试学报*, 2006, 25(4) :36 ~ 40.
- [22] 刘莹莹, 丁时超, 杜文, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定烟草中有机磷农药的残留量 [J]. *色谱*, 2006, 24(2) :174 ~ 176.
- [23] 林维宣, 李继业, 王玫, 等. 双柱净化-高效液相色谱法测定糙米中拟除虫菊酯农药残留量的研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2001, 11(1) :31 ~ 32.
- [24] 戴华, 黄志强, 陈新焕. 蜂蜜中氟胺氰菊酯残留量的 HPLC 测定方法 [J]. *农药*, 2000, 39(12) :21 ~ 22.
- [25] 温裕云, 弓振斌, 姚剑敏. 柱后光化学反应荧光检测高效液相色谱法测定茶叶中的五种菊酯类农药残留 [J]. *分析化学*, 2005, 33(3) :301 ~ 304.
- [26] Yang S S, Smetena I. Determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in tobacco using high performance liquid chromatography with post column reaction and Fluorescence detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, 664 :289 ~ 294.
- [27] Murugaved B, Kent J, De Luca V S J. Utilization of a benchtop mass spectrometer with capillary supercritical fluid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1993, 633 :195 ~ 2135.
- [28] 董顺玲, 胡家焱, 何志强, 等. 中药材中氨基甲酸酯类农药残留量的反相高效液相色谱法 [J]. *药物分析杂志*, 2002, 22(3) :178 ~ 182.
- [29] 杨红, 陈如东, 朱红梅, 等. 紫甘蓝中氨基甲酸酯类农药多残留分析方法研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2005, 28(1) :103 ~ 106.
- [30] 陈剑刚, 赵倩铃, 连宗衍, 等. 高效液相色谱-质谱法分析测定水中氨基甲酸酯 [J]. *分析化学*, 2005, 33(8) :1167 ~ 1170.
- [31] 徐远金, 李永库. 中药材中氨基甲酸酯类农药的高效液相色谱-质谱分析 [J]. *理化检验-化学分册*, 2006, 42(11) :877 ~ 880.

固相萃取技术及其在体内药物分析中的应用

朱静燕, 钱晓萍 (南京医科大学附属苏州医院 苏州 215008)

摘要: 目的 了解固相萃取技术的新进展及其在体内药物分析中的应用情况。方法 介绍固相萃取基本原理、填料种类和自动化操作等, 并对该技术在体内药物分析中的应用进行综述。结果与结论 固相萃取技术萃取回收率高、易于自动化, 能有效去处样品中的杂质, 适于体内药物分析中生物样品的预处理。

关键词: 固相萃取; 体内药物分析

中图分类号: R927.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3765(2007)010-0115-03

生物样本的分析过程包括采样、样本贮存、样本制备、待测物的分离和鉴别以及最后的定量分析。在这一系列过程中, 样本制备始终是最为复杂、繁琐却又最为关键的一步。因在此期间, 需要对样本进行分离、净化和浓集^[1-2]。

目前, 国内应用最多的是液-液萃取 (LLE) 的方法, 其优点在于依赖于不同的有机溶剂而产生的较强的选择性, 但是, 这种方法也存在一些不可避免的缺点。例如, 耗时较长, 需要样本的量较大, 处理时采用大量有机溶剂, 易形成乳化, 造成样本的损失^[1]。

近年来, 由于高效液相色谱, 特别是反相高效液相色谱的成功应用, 人们利用色谱理论, 采用装有不同填料的小柱进行样本制备的固相萃取 (亦称液-固萃取) 技术 (SPE) 日益受到

重视。1971 年, Broich 等人首次将该技术用于尿中滥用药物的提取^[3]。20 世纪 80 年代以来, 随着硅胶键合相等新型固相吸附剂的不断开发, 固相萃取法有了迅速的发展^[4]。由于它大大地缩短了样本制备时间, 所需样品量少, 避免了乳化现象, 而且便于自动化操作等优点, 使其成为生物样品预处理中具有发展优势的技术之一^[5-7]。本文旨在介绍固相萃取技术基本原理、填料种类、自动化操作及近年来其在体内药物分析中的应用。

1 SPE 基本原理

将不同的填料作为固定相装入微型小柱, 当含有药物的生物样品溶液通过时, 由于受到“吸附”或“分配”或“离子交换”或其它亲和力作用, 药物或杂质被保留在固定相上, 用适当的溶剂洗除杂质, 再用适当溶剂洗脱药物。洗脱方式有两种: 一种是药物比杂质与固定相之间的亲和力更强, 因而被保留, 然后用一种对药物亲和力更强的溶剂洗脱; 另一种是杂质

较药物与固定相之间亲和力更强,则药物被直接洗脱。通常使用的是前一种模式^[8]。

2 SPE 填料种类及萃取机制

SPE 技术的核心是填料,填料种类繁多,可分成亲脂型、亲水型和离子交换型3类。其中吸附型的有:活性炭、硅胶、硅藻土、硅酸镁、氧化铝等。就化学键合相硅胶而言,正相的有:氨基、腈基、二醇基等;反相的有:C₁、C₂、C₆、C₈、C₁₈、腈基、环己基、苯基等;离子交换的有:季胺、氨基、二氨基、苯磺酸基、羧基等。此外还有聚合物,如苯乙烯-二乙烯苯共聚物、XAD-2 及 PRP-1 等^[1]。人们可以根据需要选择填料自行装柱,而众多的商品化小柱为分析的便利及精密提供了可靠的保证。目前,世界上多个公司都生产 SPE 柱,如 Analytichemint 公司的 BondElut、Waters 公司的 Sep-Pak、Oasis 系列小柱。国产的有河北津杨滤材厂的 PT 系列。多孔树脂柱国外商品主要有 Amberlite XAD 系列和日本三菱化成公司的 DiaionHP 系列,其中的 XAD-1-XAD-5、HP-O-50 为非极性树脂,XAD-6-XAD-8 为中等极性树脂,XAD-9-XAD-12 为极性树脂。国产品主要有天津试剂二厂的 GDX-101-GDX-203 系列,上海试剂一厂的 401~404 系列等品种^[9]。

根据所采用固相萃取剂的种类,可将固相萃取法分为3类:正相、反相和离子交换固相萃取。在生物药物分析中,常用的是反相和离子交换固相萃取。固相萃取的作用机制主要包括非极性作用(色散作用)、极性作用(氢键作用、偶极矩和诱导偶极作用等)、离子作用和共价作用等。目前随着新型固相萃取剂的应用,由于可以综合应用多种作用机制,从而提高了各种固相萃取方法的应用范围^[10]。

3 SPE 技术新展

SPE 技术固有的优势使其在生物样本分析中有着越来越广泛的应用,关于其新型固定相萃取剂和自动化操作设备的研究与应用方面有了一定的新进展。

3.1 新型固相萃取剂

当前,固相萃取剂的开发有几个侧重点:一是扩大萃取剂的适用范围,即提高固相萃取的通用性。因此,将极性、非极性基团、离子(阴、阳)交换基团或高分子树脂混合使用的混合型吸附剂成为目前研究的热点,已开发的产品有 Varian 的 Bond-ElutCertify I, II, IST 公司的 Isololute-Corfirm HAX/HCX, J. T. Baker 的 Narc-1, -2 等。混合型吸附剂能综合运用氢键、极性、非极性以及离子间相互作用等多种作用力,使各种吸附剂在性能上相互补充,因此适用范围更广,可用于各种化合物的萃取浓缩。如以氯甲基化的高分子树脂 PS-DVB 合用,不仅可提取强极性化合物,同时 pH 适应范围广,还能够用于萃取离子型化合物^[11];又如将未封尾的 C₁₈ 硅胶混合,通过增加键合硅胶表面未修饰的硅醇基数目,加强离子萃取剂与分析物的次级吸附作用,从而扩大 C₁₈ 柱的极性范围^[12]。二是固相萃取的填料更具有选择性^[1]。苯基硼酸(PBA)键合相硅胶被用于选择性地萃取血浆中的一系列β-拮抗剂^[13]。其作用机理在于药物与填料以共价键结合,较为专属地保留该类含醇羟基的药物。双硫脲或二硫代氨基甲酸盐键合硅胶,其作用机理为离子交换,可选择性地保留重金属^[14]。内表面反相吸附剂(ISRP)最先用于 HPLC,该种填料

孔隙的内表面经化学修饰,而外表面不经修饰,处理血样时无需转移或沉淀蛋白,因为蛋白质等大分子不能渗入孔隙内部,很快被洗脱,而小分子药物则进入孔隙内部被保留^[15,16]。将填料表面经化学修饰后,结合金属离子,形成金属离子覆盖相。该种固相通过药物与金属离子之间形成复合物,从而保留药物。Vander Vlies 等^[17]利用 Fe³⁺ 覆盖的 8-羟基喹啉键合硅胶,专属地将阿霉素从血浆中萃取出来。环糊精键合的硅胶与药物结合,可形成分子排阻型复合物滞留药物。Agarwd 等^[18]成功地用β-环糊精键合硅胶萃取了一系列磺胺类药物。

3.2 SPE 自动化操作

众所周知,体内药物分析中的样品量相当大,这就决定了如果不设法实现自动化,大量的重复操作不可避免的由人工完成,这个过程是繁杂、费时而又耗费人力的。因此,即使是 SPE 这种单个操作相对省时的前处理技术,大力开发其自动化技术,也是十分必要的。

早期的自动化固相萃取系统是逐个连续进样的。当一个样品完成洗脱过程后,另一个样品才可以进样,耗时较长。进入上世纪 90 年代以后,自动化的平行操作固相系统得到了推广。使用这样的装置,固相萃取的速度远远超过了人工操作。自动化程度高、可与 HPLC 或 LC-MS 联用,从而实现样品在线预处理的特点使得固相萃取技术在组合化学、药物筛选等高通量领域得以广泛应用^[19,20]。全自动的 SPE 通过柱切换技术,采用六通阀与 HPLC 或者 LC-MS 联用,这种系统也被认为是预柱或双柱系统。目前开发出一系列商品化仪器,例如荷兰 Spark 公司的 Prospect, Merck 公司的 OSP-2, Gilson 公司的 ASPEC XL。这些仪器自动化程度高,在分析上一个样品的同时,已经开始自动制备下一个样品。

4 SPE 在体内药物分析中的应用

随着技术的日益完善,固相萃取以其高效、萃取率高、操作简便等优点在体内药物分析中应用不断增多,丰富了生物样品预处理的方法。SPE 与液-液萃取相比,操作简单,耗时短,节省试剂,无污染,因此,很多分析工作者尝试采用这种方法,获得了良好的效果。刘蕾等^[21]在测定人血浆中地塞米松浓度时,使用 Oasis HLB C₁₈ 固相萃取小柱预处理血浆样品,简便、快速,只需要经过简单的固相萃取,每一样品的分析时间只需 9 分钟,并且节省试剂,回收率高,符合临床上对人血浆中的地塞米松的浓度测定要求。单忠敏等^[22]在进行血浆中皮质醇研究时,没有采用国内普遍应用的二氯甲烷提取标本,放射免疫法测定含量的方法,由于工作人员接触有毒试剂,同位素也会污染环境,而且只能单一测一种物质,改用固相萃取技术,应用高效液相色谱法可同时测定血浆中的可的松和皮质醇两种物质,分离效果令人满意。进行生物样本预处理时引入杂质少、回收率高是 SPE 的优点之一。李冬梅等^[23]在测定血浆中的抗癫痫药物时,采取了固相萃取的预处理方法,较之传统的液-液萃取方法简单,用时少:比较同一血浆经两种方法提取后的含量测定色谱图,可见 SPE 的样品杂质明显减少,因此可减轻对色谱柱的污染,延长其使用寿命。刘一钊等^[24]在对索他洛尔进行血药浓度测定时,首先采用文献报道的液-液萃取法进行前处理,发现不仅索他洛尔的萃取回收率低,而且样品处理后的沉淀杂质较多,易堵塞色谱柱造成柱

压升高。因此,尝试采用 ODS C₁₈ 固相萃取小柱处理样品,沉淀杂质明显减少,其最低检测限达到 0.01 μg · mL⁻¹,低、中、高浓度样品的萃取回收率分别达到了 100.75%、91.05%、94.14%,符合生物利用度和血药浓度监测的要求。在处理一些在有机溶剂中溶解度不好而很难应用液-液提取法的药物时,SPE 有着得天独厚的优势。法莫替丁在甲醇中微溶,在丙酮中极微溶解,在水或氯仿中几乎不溶,由于这些化学性质,其血药浓度测定预处理较困难,贺玲等^[25]在进行法莫替丁肠溶片血药浓度测定时,采用 Waters Oasis 固相萃取小柱进行样品预处理,回收率高,而且回收稳定。同时,由于固相萃取小柱的高回收率和重现性,其日内、日间精密度均较高,没有影响到由于难于找到内标而采用外标法定量的测定结果,使其完全适用于体内法莫替丁的药代动力学的研究。

某些药物的体内血药浓度低,一般的液-液萃取难以达到相应的灵敏度要求,固相萃取法作为一种能同时完成样品纯化和浓缩富集的有效手段,在这类药物的生物样品前处理中发挥了重要的作用。向大雄等^[26]在进行犬血浆中葛根素含量研究时,使用了固相萃取方法,因为葛根素口服吸收差,体内血药浓度低,采用 Waters 公司的 Oasis HLB 萃取小柱对生物样本进行前处理,简便、快速、回收率高,对样品进行了富集,大大提高了仪器的检测灵敏度。谭力等^[27]在入血浆中依那普利浓度测定研究时,鉴于依那普利体内含量极低的特点,建立了用固相萃取高效液相色谱法的方法,采用 YWG C₁₈ 固定相填料自行装填固相小柱,固相萃取起到了很好的富集的作用,并考察了不同 pH 条件下过柱洗脱进样对回收率的影响,以及使用 HCl 及石油醚洗涤对依那普利在固相小柱上保留的影响,方法优化后使其符合了测定要求。

5 结语

SPE 技术的出现使生物样本处理过程大为简化,自动化 SPE 的使用真正实现了生物样本的在线分析,以其高效、高选择性、高度自动化的特点广泛用于体内药物分析中各种生物样品的分离和纯化。但是,应该看到的是,固相萃取技术在使萃取剂更具有选择性和通用性方面仍然存在一定差距,自动化的预处理技术的应用还不够广泛,应该进一步研究。随着这项技术的逐渐成熟,在体内药物分析样本处理中所处的地位会越来越重要。

参考文献

- [1] 高立勤,刘文英. 固相萃取技术及其在生物样本分析中的应用与进展[J]. 药学进展, 1997, 21(1): 8.
- [2] 孙怀玉,卢霞,孙敏耀,等. HPLC 法分析生物样品的前处理技术[J]. 化学分析计量, 2001, 10(3): 36.
- [3] Broich JR, Hoffman DB, Goldner SJ, et al. Liquid. solid extraction of lyophilized biological material for forensic analysis. I. Application to urine samples for detection of drugs of abuse[J]. J. Chromatogr, 1971, 63: 309.
- [4] Huang TH, Wall J, Kabra P. Improved solid. phase extraction and liquid chromatography with electrochemical detection of urinary catecholamine and 5-S-1-cysteinylnl-1-dopa[J]. J. Chromatogr, 1988, 452: 409.
- [5] 高立勤,刘文英,邢久东. 固相萃取反向冲洗一反相 HPLC 法测定血浆中醋氯芬酸浓度[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(4): 219.
- [6] 康建,蒲菲菲,刘亚革,等. 固相萃取反相高效液相色谱法测定人血浆麦考酚酸浓度[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(5): 331.
- [7] 陈勇川,臧雷,穆海川. 固相萃取高效液相色谱法测定人血浆中伊贝沙坦浓度[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(3): 196.
- [8] 柳洁,何碧英,孙俊红. 固相萃取 GC/MS 法测定血中 25 种有机磷农药的方法研究[J]. 现代预防医学, 2005, 32(9): 1240.
- [9] 朱霁红. 固相萃取法在毒(药)物分析中的应用[J]. 中国药物依赖性杂志 2000, 9(4).
- [10] 王洪允,江驷,胡蓓,等. 固相萃取技术进展及在生物药物分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(3): 236.
- [11] Honer E, O'Keeffe M, Desbrow C, et al. A novel sorbent for the determination of clenbuterol in bovine liver[J]. Analyst, 1998, 123(12): 2517.
- [12] Mandrioli R, Albani F, Casamenti C, et al. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 762(2): 109.
- [13] Martin P, Leadbetter B, Wilson D. Immobilized phenylboronic acids for the selective extraction of B-blocking drugs from aqueous solution and plasma[J]. J Pharm Biomed Anal 1993; 11(45): 307.
- [14] Liu ZS, Huang S D. Determination of copper and cadmium in sea water by preconcentration and electrothermal atomic absorption spectrometry[J]. Anal Chim Acta 1992; 267: 31.
- [15] Fujii J, Inotsume N, Nakano M. Rapid determination of serum oxotamide levels with on-line precolumn solid-phase extraction[J]. J Chromatogr 1990; 530: 469.
- [16] Van Zijtveld J. Pouwelse AV, Groen CP. Application of an internal surface reversed. phase column for the automated determination of flucyclozuron residues[J]. J Chromatogr 1992; 600: 211.
- [17] Vande Vlies E, Irth H, Tjaden UR, et al. High-performance liquid chromatography determination of doxorubicin after on line trace enrichment on iron (III)-loaded 8-hydroxyquinoline-bonded silica[J]. Anal Chim Acta 1992; 271: 69.
- [18] Agarwal VK. Solid phase extraction of sulfonamides using cyclogond-I cartridge[J]. J Liq Chromatogr 1991; 14(4): 699.
- [19] Zhizhina GP. Blyukhtemva NV. Effect of metal ions and xenobiotics on endogenous oxidation of DNA[J]. Biochemistry (Mosk), 1997, 62(1): 88.
- [20] Saris CP, Damman SJ, van den Ende AM, et al. ³²P-postlabelling analysis of alkylphosphotriesters in DNA[J]. IARC Sci Publ, 1993, 124: 127.
- [21] 刘蕾,付逸龙,殷琦,等. SPE. HPLC. MS 测定人血浆中地赛米松浓度[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(9): 705.
- [22] 单忠敏,徐凤铎,宋力,等. 应用固相萃取技术同时测定血浆中皮质醇和可的松[J]. 中国优生与遗传杂志, 1997, 5(4): 29.
- [23] 李冬梅,丁学开,梁民琦,等. 固相萃取用于血浆中抗癫痫药物的提取[J]. 中国现代应用药学杂志, 1999, 16(6): 56.
- [24] 刘一钊,周述香,张勇等. SPE. HPLC 测定索他洛尔血药浓度[J]. 中国药师, 2005, 8(6): 488.
- [25] 贺玲,张洪,曾秀燕,等. 法莫替丁肠溶片的血浓度测定及其在人体的药代动力学研究[J]. 中国药物与临床, 2004, 4(5): 253.
- [26] 向大雄,张杰,李焕德,等. HPLC 法测定犬血浆中葛根素含量[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(6): 599.
- [27] 谭力,袁倚盛,张昕,等. 固相萃取高效液相色谱法测定人血浆中依那普利浓度[J]. 药学学报, 1997, 32(11) B: 857.