固相萃取技术及其在体内药物分析中的应用

周爱然
（齐鲁制药有限公司 山东 济南 250100）

【摘 要】固相萃取技术是化学学科常用的技术，主要是以固体吸附剂吸附液体样品中含有的目标化合物，将目标化合物和样品基体、干扰化合物分离，以实现分离与富集。固相萃取技术属于样品前处理手段，现已广泛用于实验室中，本文对固相萃取技术及其在体内药物分析中的应用作研究。

【关键词】固相萃取技术；萃取机制；体内药物分析

Solid phase extraction and its application in in vivo drug analysis

Airan Zhou
(Qilu Pharmaceutical Co., LTD., Jinan,Shandong,250100)

[Abstract]Solid phase extraction (SPE) is a commonly used technology in chemistry. It mainly uses solid adsorbent to adsorb target compounds contained in liquid samples, and separates target compounds from sample matrix and interference compounds to achieve separation and enrichment. Solid phase extraction (SPE) is a method of sample pretreatment, which has been widely used in laboratory.

[Key words]Solid phase extraction; Extraction mechanism; In vivo drug analysis

固相萃取技术是生物样品预处理手段，是样本制备的重要技术，关系着生物样本的有效分析结果，是整个分析过程中的关键一环，尤其是样本分离和净化、富集等环节。固相萃取技术可有效缩短生物样本制备时间，通常少量的样本即可实现萃取，可有效防止样本制备过程中出现乳化的问题，整个制备过程的自动化程度高，用于样品预处理的优势明显。

1 固相萃取技术概述

1.1 基本原理

固相萃取是随着新型固相吸附剂的大量研发发展的一种技术，比如硅胶键合相使固相萃取技术发展有着质的飞跃。固相萃取技术基本原理主要是采用不同的填料为固定相，再将填料装在微型小柱，如果生物样品中含有药物成分，则样品溶液通过微柱时，会产生吸附、分配或者离子交换等作用，由于亲和力作用使药物或者杂质留在固定相上，随后再以对应溶剂对杂质进行洗除，并用溶剂对药物进行洗脱。可采用的洗脱方式有两种，常用的洗脱方式是药物的亲和力强于杂质和固定相，能够被有效保留，采用溶剂进行洗脱，需要注意的是洗脱溶剂的药物亲和力强；再者是杂质的亲和力强于药物和固定相，这种情况下药物能直接洗脱。

1.2 萃取机制

1.2.1 反相固相萃取

反相固相萃取机制一般进行水溶液里中等级性待测物萃取，也可以进行非极性待测物萃取，苯基和碳 18、碳 8 等是这种萃取的常用固定相。样品碳氢键和硅胶表面具有官能团，官能团能以范德华力进行吸附，这时极性溶液中含有的待测物会留在固定相里，以非极性溶剂能对待测物进行洗脱。一般含有药物成分的样品主要是水溶性血浆和尿液等，或者部分组织液等，中等极性、非极性待测物通常采用反相固相萃取机制做预处理。硅醇基存在于键合硅胶固定相中，具有未键合的特点，如果 pH 值超过 4，则硅醇基会变成离子形式，并以这种形式存在，能进行阳离子交换，产生二级相互作用，可保留强极性干扰物，并能对待测物进行吸附。如果调节洗脱液 pH 值，通常会对二级相互作用造成不同程度的破坏，对待测物进行有效洗脱。

1.2.2 正相固相萃取

正相固相萃取机制一般对中等极性至非极性基质的待测物进行萃取，通常氰基、氨基等是常用的固定相。正相小柱里留存的待测物情况与极性官能团密切相关，并与吸附剂表面极性官能团有关系，其互相作用与待测物检测结果密切相关。

1.2.3 离子交换固相萃取

离子交换固相萃取是一种常用于带电荷离子化合物萃取的技术，主要是待测物和硅胶带电基团之间存在静电吸引，能有效实现离子交换固相萃取[1]。水溶液中的待测物需要吸引到离子交换键合相里，实际检测时样品的 pH 值要进行严格的调节，以确保待测物与键合相的官能团呈带电离子状态，说明 pH 值和适宜离子强度、待测物含量等是离子交换固相萃取的关键条件。离子交换固相萃取主要是采用阴离子填料，比如硅胶上键合卤化季铵盐，也有部分萃取用阳离子填料，比如羧酸等，通常能获得良好的萃取效果。

2 固相萃取技术实验装置

2.1 固相萃取小柱

固相萃取小柱是目前应用非常广泛的萃取装置，通常采用的材料是聚丙烯，出口采用 Luer 氏接口，根据萃取实况接上针头，把流出的液体接收到接收管里。小柱中的筛板材料主要是多孔四氟乙烯或者聚丙烯，也可以采用不锈钢，一般孔径在 10μm-20μm，储液的体积通常在 0.5ml-60ml 之间，填料量主要在 35mg-10g 之间，如果样品量少，则调整为填料量小的固相萃取小柱，这能有效保证固相萃取效果[2]。

2.2 固相萃取滤头

固相萃取滤头一般选择圆片滤头，这种滤头的截面积较大，测定过程中有较高的流速，整个萃取过程快，能有效缩短萃取时间，通常用于临床小样品预处理，比如血清、血浆等待测物处理，能起到良好的萃取效果。

2.3 固相萃取涂布纤维

固相萃取采用涂布纤维一般用于固相微萃取，采用涂布纤维对细小固体进行聚合物固定相涂布，通常涂布在固体融溶硅胶纤维上，纤维浸入溶液，待测物会在涂层中进行扩散和分配。随后将纤维取出，采用强溶剂对待测物进行洗脱，洗脱处理后进行测定。

2.4 固相萃取仪器

固相萃取仪器较多，通常液体样品在固相萃取的小柱后，加压状态下可促使液体样品流到固定相。萃取过程中采用注射器对液体样本进行加压处理，如果样本的黏稠度较高，则用真空抽滤进行处理，通常抽滤装置包括单管和多管，要根据固相萃取情况选择适宜的抽滤装置。一般体内药物分析样品的数量较多，通常选择多管系统的效果显著，这种系统包括玻璃缸和活动支架、流量控制阀、真空减压阀、真空表与真空泵等仪器构成，通常流出液通过活动支架的专用管进行收集，能有效收集到流出液[3]。

3 固相萃取技术实验方法

3.1 选择小柱 / 滤膜

固相萃取技术要注重选择小柱 / 滤膜，要了解待测物理化性质，严格掌握样品基质，根据实际情况采用对待测物保留程度强的固定相。如果待测物具有负电荷，则采用阴离子交换填料进行处理；如果带有正电荷，则以阳离子交换填料进行处理；待测物带的电荷为中性电荷时，通常采用反相填料进行萃取。小柱 / 滤膜选择时，要注重其大小和规格，综合评价待测样品的浓度等，选择符合待测物的固相萃取小柱 / 滤膜。如果待测物的浓度低，则要尽量选择填料较少的固定相，这能对较大体积待测物进行固相萃取。

3.2 活化

固相萃取前要对待测物进行活化，采用溶剂对小柱进行冲洗，以 5ml-10ml 溶剂对滤膜进行冲洗。通常采用甲醇等有机溶剂对填料进行冲洗，这种水溶性溶剂能对填料进行有效的清洗，甲醇对吸附剂表面能进行有效的湿润，从而渗透至非极性硅胶键合相，这时硅胶的水湿润程度加快，再采用水或者缓冲液对硅胶进行冲洗[4]。在进行加样前对固相萃取填料进行湿润和有效保持，因为填料干燥会导致待测物的保留值明显减少，但是各个小柱干燥程度并不统一，这时会对回收率重现性造成较大的影响。

3.3 加样

固相萃取加样时，通常是采用 0.1mol/L 酸、碱进行调节，促使样品的 pH 值＜ 3，或者使 pH 值超过 9，将样品进行离心处理，完成后获取上层液进行萃取。以甲醇对蛋白质进行沉淀，沉淀完成后获取上清液，采用水或者缓冲液对样品进行稀释，稀释处理后开始萃取。采用酸或者无机盐促使蛋白质沉淀，随后获取上清液，对上清液的 pH 值进行有效调节，处理完成后进行萃取。可以采用超声波对样品进行 15min 的处理，再给样品中添加水和缓冲液，随后获取上清液进行萃取[5]。通常尿液样品中含有的药物浓度高，再给尿液样品进行加样前，要先采用水或者缓冲液对样品进行稀释，或者采用酸、碱水解反应对药物和蛋白质结合进行破坏，随后对样品中的待测物进行萃取。注意在萃取时，调整流速在每分钟 2ml-4ml，因为流速过快对待测物和固定相结合会造成较大影响。

3.4 填料清洗

固相萃取要注重对填料的清洗，这主要是针对反相固相萃取技术，通常清洗溶剂主要是水或者缓冲液，可以给清洗液中添加适量的有机溶剂或无机盐等物质进行 pH 值调节。注意添加到小柱中的清洗液要小于一个小柱容积，采用 5ml-10ml 的滤膜为宜，这对样品顺利萃取有着积极作用，可防止待测物中产生明显的杂质[6]。

3.5 待测物洗脱

固相萃取时要对待测物进行洗脱，通常选择 5ml-10ml 的离子强度较低，不过能有效清洗待测物上的洗脱溶剂。如果要灵敏度高，要将洗脱液挥干，以流动相对残留物进行重组，处理好后进样，这能有效提高待测物的灵敏度。通常体内样品在接受洗脱后会含有一定的水分，采用冷冻干燥法对体内样品进行处理，如果固相萃取填料的保留能力较弱，则可以采用小体积和较弱洗脱液清洗待测物，随后以极性较强 HPLC 分析柱对洗脱物进行分析，比如采用碳 18 柱进行分析，如果待测物具有可电离的特点，对 pH 值进行调节，这时能有效的阻止样品出现离子化的情况，有效提升待测物的反相固相萃取填料的保留水平，在洗脱时对 pH 值进行调节，促使待测物离子化，随后以较弱溶剂对待测物进行洗脱，将洗脱液收集后，对 pH 值进行有效调节，这时待测物在 HPLC 分析过程中能获得最佳分离效果。整个洗脱过程中要对流速适当减慢，以两次小体积洗脱进行处理，这样获得的回收率高于一次大体积洗脱，可有效提高固相萃取效率。

4 固相萃取技术分析体内药物实践

固相萃取技术可对体内药物进行分析，通常待测物包括皮质激素类和多西他赛、熊去氧胆酸、茚地那韦、吲哚布芬、地尔硫卓及其代谢物、硫氮卓酮、二氮胺苯乙酸、尿卟啉、丁胺苯丙酮、新型人生长激素分泌类似物、可卡因及其代谢物、麦考酚酸以及缬沙坦等，主要基质有头发、血浆和血清、尿、胎粪、全血与肝组织等，固相萃取填料类型有碳 18、强阴离子交换柱和碳 8、SAX、Oasis HLB、Bond-Elut Certify、Abselut、碳 2 等，能对待测物进行有效的检测。目前采用的固相萃取填料有较强的优势，这种填料在加样前基质被抽干，也能获得较好的回收率、重现性，同时 pH 值 0-14 状态下能实现有效的固相萃取，通常可以采用简单快速的方法，对极性或者非极性的待测物进行有效提取，实际萃取过程中具有较大容量因子，这时能有效减少填料使用量。

5 小结

固相萃取技术通常引入外源性杂质的情况极少，发生乳化现象的风险低，所以具有较高的萃取回收率，整个萃取过程的自动化程度高，能使样品中的杂质有效减少，各种有机溶剂用量随之明显减少，用于人体生物样品前处理的优势明显。

参考文献：

[1] 刘炉英 , 刘锦辉 , 胡小刚 . 基于核酸适配体修饰复合纳米纤维的分散固相萃取技术在赭曲霉毒素 A 检测中的应用 [J]. 分析化学 ,2021,49(12):2096-2105

[2] 田介峰 , 罗学军 , 李冉 , 等 . 固相萃取技术在安神滴丸质量标准研究中的应用及思考 [J]. 天津药学 ,2021,33(04):16-20+55

[3] 严敏鸣 , 张静余 , 杨卫军 , 等 . 超高效液相色谱 - 串联四极杆质谱结合分散固相萃取技术测定禽蛋中五氯苯酚残留量 [J]. 食品安全质量检测学报 ,2020,11(24):9130-9139

[4] 张俊伟 , 金瑛 , 姜英子 . 磁固相萃取技术在药物分析中的应用研究进展 [J]. 延边大学医学学报 ,2020,43(01):70-73

[5] 叶学敏 , 董丹琪 , 邵华 , 等 . Fe_3O_4@SiO_2@C_(14)mimBF_4 磁性固相萃取技术用于水中磺胺类药物分析 [J]. 浙江工业大学学报 ,2020,48(05):514-519+556

[6] 王嘉琦 , 曹英华 , 朱琳娜 , 等 . HLB 固相萃取技术 HPLC 法测定地表水中 9 种酚类化合物 [J]. 分析仪器 ,2020,(04):38-41