

· 药物分析 ·

色谱分析前处理技术的新进展

陆 峰, 林培英, 杨根金(第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433)

摘要 目的: 介绍色谱分析前处理技术的新进展。方法: 将前处理技术大致分为样品制备技术和预处理、进样技术两大类, 并分别查阅近期的大量文献资料, 筛选、整理各方法的原理、与其他方法比较的技术优势、应用领域等内容。结果: 样品制备技术中的自动索氏提取、微波辅助溶剂萃取和加速溶剂萃取等 3 项技术主要适合于从中药等固态样品中彻底性地萃取待测总成分; 预处理、进样技术中的固相萃取、固相微萃取、支持液膜萃取、微孔膜液液萃取、液相微萃取、电萃取、逆流分配和膜萃取等 8 项技术主要适合于从生物体液等液态样品中选择性地萃取待测成分, 以备用于色谱进样。结论: 许多分析工作者在色谱分析前处理技术领域内做了大量工作, 并取得了进展。将来的趋势是发展少用有毒有机溶剂、简单快速便宜、适应特殊需求、能处理复杂介质中的痕量成分的方法, 并发展方法的联用与自动化。只有克服前处理这 | “瓶颈” 技术, 色谱分析才能实现真正意义上的飞跃。

关键词: 前处理技术; 色谱分析; 进展

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-0111(2002)02-0091-04

色谱技术日新月异, 除了新方法不断涌现, 传统色谱方法也在多机制分离、多种方法联用、多种检测、自动化、智能化等方向上有新的进展。分析方法对灵敏度、选择性和速度要求的不断提高, 促使样品前处理技术必须跟上色谱发展的步伐。但目前的色谱分析前处理技术却相对落后。最常用的有机溶剂萃取方法很难同时高效地完成净化、浓缩、预分离的任务, 而且通常存在步骤繁琐费时、溶剂昂贵、较难自动化或联用、萃取效率低、液态样品易乳化等缺陷。因此, 很多分析工作者在这一领域内做了大量工作, 而且取得了许多新的进展。

本文对近期发展的前处理新技术作一综述, 包括样品制备 (sample preparation) 技术和预处理、进样 (pretreatment, sampling) 技术等。

1 样品制备 (sample preparation) 技术

系指从固体样品中萃取待测成分的技术, 我们熟悉的常规方法有渗漉、水蒸汽蒸馏、索氏提取、超声提取、超临界流体萃取等技术, 此处不作赘述。

1.1 自动索氏提取 (automated soxhlet extraction)

经典的索氏提取已有上百年历史, 时间证明它是一种行之有效的办法, 并常作为新萃取方法的参照标准。自动索氏萃取实际上是热溶剂沥漉和索氏萃取的结合^[1]: 样品放入套筒中, 先浸入沸腾的溶剂, 使之有一个快速的初始萃取, 然后提起套筒, 溶剂回流进行索氏萃取。自动索氏提取溶剂用量比索氏萃取少约一半; 萃取时间短。

1.2 微波辅助溶剂萃取 (microwave assisted solvent extraction, MASE)

目前微波加热技术已成为气相、液相萃取的辅助手段。如在气相萃取中, 微波加热 1min 可达到平衡, 而静态顶空萃取需要 30min。

MASE 是微波辅助萃取的主要应用领域, 在 MASE 中样品置于不吸收微波的容器中, 用微波加热, 引起萃取。根据萃取溶剂的种类可分为两种方式: ①吸收微波的高偶极常数溶剂, 样品置于高压容器中, 加热到高于沸点的温度, 稍加压以抑制溶剂挥发; ②不吸收微波的低偶极常数溶剂, 容器敞开不升压, 样品通过内含的高偶极常数的物质吸收微波能量升温。这种局部加热方式比其它热溶剂萃取温和得多, 很适合于热敏或对热不稳定的物质。

MASE 的特点是: ①溶剂用量少; ②可以根据吸收微波能力的大小选择不同的萃取溶剂, 控制样品与溶剂间的热交换; ③萃取时间短, 例如同样用己烷萃取薄荷叶^[2], 扫描电镜的结果显示, MASE 萃取 20s 对叶面腺体的破坏程度, 要大于索氏萃取 6h 的程度; ④可同时萃取多个样品。

最近发展的动态 MASE^[3], 由于萃取时随时引入的新鲜溶剂, 使得萃取效率更高, 导出的萃取液与 SPE 或 HPLC 联用、检测, 其装置易自动化。

1.3 加速溶剂萃取 (accelerated solvent extraction, ASE)

ASE 是将样品放在密封容器中, 加热到高于沸

点的温度(通常 50~ 200 °C),引起容器中压力升高(通常 1 500~ 2 000psi),同时给予一定压力使溶剂不气化,从而大大提高萃取速度^[4]。高温比室温具有如下优势:增加待测物的溶解度、增加扩散速度、降低溶质与基质活性点位间的相互作用、降低溶剂的粘度、降低溶剂与基质间的表面张力等。高压可以使溶剂保持液态,并迫使溶剂进入常压下无法接触到的基质内部。

ASE 的优点有:溶剂用量少;萃取时间短;回收率、精度与索氏萃取相当。ASE 已被应用于环境样品中的农药、多环芳烃等的萃取。

2 预处理、进样(pretreatment, sampling)技术

系指从液体样品中选择性地萃取待测成分,以备色谱进样的技术。

2.1 固相萃取(solid phase extraction, SPE)

SPE 最早在 20 世纪 70 年代提出,至今已发展成为许多领域样品预处理的标准模式,商品化程度极高。其基本原理是基于样品在两相之间的分配差异,即在固相和液相之间的分配不同。SPE 保留或洗脱的机制取决于被分析物与固相表面的活性基团,以及被分析物与液相之间的分子间作用力。SPE 有两种洗脱模式,一种是被分析物与固相之间的亲和力比其与所存在的生物介质的亲和力更强,因而被保留,然后用一种对被分析物亲和力更强的溶剂洗脱;另一种是存在的生物介质与被分析物间的亲和力较被分析物与固相之间亲和力更强,则分析物被直接洗脱。通常使用前一种洗脱方式。

现代 SPE 方法采用长约 2~ 3cm 的聚丙烯小柱,内装各种填料。除了经典的柱管式 SPE 外,圆盘式 SPE 的使用也日渐广泛^[5]。圆盘式 SPE 使用一张扁平过滤膜,厚度 < 1mm,直径 4~ 96mm。它与柱管式 SPE 比较,具有相对较大的横截面,固定相薄,这就使流速增大,萃取速度也增大,特别适合环境样品如水中痕量有机物的分析、尿中药物代谢物的分析等,可以通过增大样品体积来提高检测灵敏度。

SPE 的填料种类繁多,其中吸附型的有:活性炭、硅胶、硅藻土、硅酸镁、氧化铝等。化学键合相硅胶中,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-二乙烯苯共聚物等。相对于键合相填料,聚合物可适用于全部 pH 范围,因而用途更广。

除了这些与 HPLC 使用的固定相类似的填料外,一种原理与分子排阻色谱大致相同的限入性介

质^[6]和一种原理与免疫亲和色谱类似的分子印迹吸附剂^[7],正成为固相萃取的新型固定相,这些都是体液样品分析前处理的有效手段。

2.2 固相微萃取(solid phase micro-extraction, SPME)

SPME 采用一种略似进样器的装置^[8],用一根涂布多聚物固定相的熔融石英纤维从液/气态基质中萃取待测物;然后将富集了待测物的纤维直接转移到色谱仪中,通过一定的方式解吸附,然后进行分离分析。

SPME 可分为顶空 SPME 和直接 SPME 两种模式。直接 SPME 适合于气体基质或干净的水基质;顶空 SPME 适合于任何基质,尤其是直接 SPME 无法处理的脏水、油脂、血液、污泥、土壤等^[9]。

SPME 技术目前应用最活跃的领域是环境样品、食品和临床。技术上,SPME 已由初期的与 GC 联用发展到与 HPLC 联用,溶剂解吸取代了 SPME - GC 的热解吸,因此适用范围将更广^[10]。

SPME 具有不使用有毒有机溶剂;集采样、萃取、浓缩、进样于一体,避免引入多步误差;进样空白值小;简单快速等优点。

2.3 支持液膜萃取(supported liquid membrane extraction, SLME)

SLME 是一种透析与液液萃取结合的技术,它采用一层渗透性聚四氟乙烯薄膜分开两种溶液,薄膜中的微孔由溶剂饱和后固定在两个扁平的模块之间^[11]。两模块上各有一圈螺旋形的流体槽,与独立的流体泵连接。通过选择合适的溶液,化合物就可以选择性地从一个供方溶液萃取进入另一个受方溶液。一般来说,待萃取物在供方溶液中呈离子状态,可与另一试剂结合形成非离子状态的萃取活性形式,这样就可以被有机液膜相萃取;然后这些非离子化合物通过扩散作用进入受方溶液,又恢复离子状态,此时控制受体溶液的状态使之呈无法反萃取的非活性形式,即完成萃取。

SLME 实际上是由上下两层水相与中间的有机相夹层组成的“三明治式”三相萃取系统,可以看成是“液液萃取-透析-液液萃取”三步的结合。该技术的核心是固定在聚四氟乙烯膜的微孔中的有机液相,该液膜形成一个屏障,穿过屏障才可以进入后面的分析系统。

SLME 相对 SPE 具有一些优势:选择性比采用 C₁₈的 SPE 强,可以萃取很强极性的化合物;富集能力强,尤其适合于复杂介质中的痕量成分富集;几乎

不消耗有机溶剂, 比较易与色谱联用等。当然它也存在一些弱势, 即无法离子化、非极性的化合物不可以用 SLME 技术。SLME 技术可用于血浆中的胺、水中的金属离子、环境样品中的酸性杀虫剂等的萃取^[12]。

2.4 微孔膜液液萃取(microporous membrane liquid-liquid extraction, MMLLE)

MMLLE 是在 SLME 基础上发展起来的^[13], 它由“三明治式”改为两相萃取, 构造与 SLME 类似, 也是由一张疏水膜将水相与有机相隔开, 水相流速快而有机相流速慢, 因此富集作用较强。MMLLE 较适合萃取较脏样品中的痕量弱极性化合物, 这正好与 SLME 互补。MMLLE 的溶剂用量少、无乳化现象、且易自动化。它还可以直接与气相色谱联用, 步骤少, 引入误差小, 但选择性相对较差, 因此最好采用 GC 的专属检测器。

2.5 液相微萃取(liquid phase micro-extraction, LPME)

LPME 是 SLME 技术的简易、微型化, 它采用一根疏水性聚丙烯中空多孔纤维(80cm 长, 内径 600 μ m, 壁厚 200 μ m, 孔径 0.2 μ m) 取代了扁平膜^[14]。纤维通常先用有机溶剂饱和, 然后供方溶液在纤维外流动, 受方溶液在纤维内流动, 实现萃取的机制与 SLME 相同, 这样就可以把最终的萃取液浓缩至更小的体积(1~2 μ l, 而膜式 SLME 的受方溶液体积至少为 10~15 μ l), 而这一体积正适合与之在线联用的填充毛细管柱液相色谱、毛细管电泳、气相色谱等的进样, 可以获得更低的检测限。

LPME 可以实现 50~100 倍的样品富集^[15]。因为大分子、杂质等进不了纤维孔, 自然就无法进入受方溶液, 因此净化样品的功能突出。LPME 纤维因是一次性使用, 不会引起交叉污染, 且成本与 SPE 的相当。LPME 的一次萃取时间约 40min, 但可以平行展开, 因此萃取效率较高, 尤其适合大批量样品的处理。LPME 几乎不消耗有机溶剂, 尤其适合生物体液等较脏样品中的酸、碱等离子性化合物^[16]。

2.6 电萃取(electro-extraction, EE)

普通液液萃取采用机械搅动加速萃取, 而 EE 中待萃取成分从有机供体相到水受体相的质量转移由施加电场加速。有机供体相的体积可以大到几百微升, 水或缓冲液受体相的体积一般仅为内径 75 μ m 的熔融石英毛细管的体积, 质量转移只需 10min。Vlis 等将 EE 设计成 SPE 和 HPLC 之间的接口^[17], 因此同时具有自动进样器的功能, 省去了

SPE 后续的有机溶剂挥发、溶质再溶解等繁琐步骤。

2.7 逆流分配(counter-current distribution, CCD)

CCD 是逆流色谱原理的一种形式, 它可以提供相当于 1 000 次以上的液液萃取平衡步骤, 所以特别适合于分配系数小的化合物。CCD 的基本过程就是流动相不断地以微滴的方式流过液态固定相, 待测物在两相间平衡一段时间后, 逆流流向, 泵入新鲜的萃取溶剂, 即可从固定相中萃取出待测物^[18]。该法适用的萃取样品浓度为 ppb⁻ ppm 级, 其最大优势是可以从大体积样品中得到很小体积的萃取液, 浓缩比约为 50~100 倍。选定合适的萃取溶剂, 逆流分配色谱可以成为制备化学对照品的较简易手段。

CCD 的优点是载样量大至 1~4g, 回收率高, 非破坏性, 易于放射示踪, 避免了代谢物的自动氧化, 可以用于制备结构鉴定用的药物代谢产物; 但其分离能力低, 不易直接监测, 速度慢。

2.8 膜萃取(membrane extraction, ME)

膜萃取技术因其萃取免用有机溶剂而成为前处理技术领域的一大热点^[19]。前面提到的 SLME、MMLLE、LPME 等技术, 其实都属于运用液液萃取原理的广义的膜技术。此处的 ME 仅指狭义的、萃取介质为气态的膜技术。

ME 通常使用硅酮膜, 具有化学惰性、热稳定性和特有的通透性。ME 大致过程是利用膜将气体样品基质中的待测物萃取进入膜孔中, 然后在膜的另一侧, 由气体将待测物带入后续的吸附剂接口。接口一般包括吸附剂捕集装置、加热线圈和电源。捕集装置可以是一段毛细管或 SPME 纤维, 上面涂布的聚合物控制收集的选择性, 还可以富集并减少成分损失。

ME 技术分为扁平膜和中空纤维膜两种类型, 但它们都需要吸附剂接口^[20]。扁平膜厚约 0.25 μ m, 无法自身支持, 需要有上下模块支撑, 且不易与载气连接, 但它响应快, 记忆效应短。纤维膜可以自身支撑, 易与载气连接, 但由于壁厚 > 100 μ m, 响应慢, 记忆效应也长^[21]。

ME 是一种可以连续、快速地监控环境、工业等样品中有机化合物的样品前处理技术, 具有不使用溶剂、构造简单、步骤单一等优点。它在挥发性有机物的测定方面已有很成功的例子, 如果升高温度或用高密度气体作载气, 还可以分析半挥发物质。随着多聚物技术的发展, 膜与吸附剂配合优化后, ME 的选择性和专一性将得到提高, 其应用范围也将不断扩大。

上述 8 种预处理技术, 根据萃取介质的物态可以分为固态介质的 SPE、SPME, 液态介质的 SLME、MMLLE、LPME、EE、CCD 和气态介质的 ME 等。

3 小结

色谱分析前处理技术的发展可以采用两条途径, 一是老方法的自动化、商品化, 二是采用新原理的新方法。以上介绍的新技术, 其原理不难理解, 但都需要特殊装置或材料, 实现起来有一定的技术难度。尽管如此, 这一领域的研究仍大有可为。

将来的趋势必定是发展很少乃至不用有毒有机溶剂的方法; 发展简单快速便宜的方法, 操作步骤很少, 尽量能集采样、萃取、净化、浓缩、预分离、进样于一身, 并适合野外、原位等特殊需求; 发展能处理复杂介质、痕量成分、特殊性质(如高极性、热不稳定性、难挥发性等)成分的方法, 发展方法的联用与自动化等等。因为只有克服了前处理这一“瓶颈”, 色谱分析乃至其它分析过程才能实现真正意义上的飞跃。

参考文献:

- [1] Majors RE. The changing role of extraction in preparation of solid samples[J]. LC- GC Int'l, 1996, 9(10): 638.
- [2] Pare JR, Belanger JM, Stafford SS. Microwave- assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory. TrAC, 1994, 13(4): 176.
- [3] Ericson M, Colmsjo A. Dynamic microwave- assisted extraction. J Chromatogr, 2000, 877: 141.
- [4] Richter BE, Jones BA, Ezzel JL, *et al.* Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. Anal Chem, 1996, 68(6): 1033.
- [5] Majors RE. New approaches to sample preparation. LC- GC Int'l, 1995, 8(3): 128.
- [6] Van der Hoeven RAM, Hofte AJP, Frenay M, *et al.* Liquid chromatography- mass spectrometry with on- line solid phase extraction by a restricted access C₁₈ column for direct plasma and urine injection. J Chromatogr, 1997, 762(1- 2): 193.
- [7] Owen PK, Karlsson L, Lutz ESM, *et al.* Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis. TrAC, 1999, 18(3):

146.

- [8] Zhang Z, Pawliszyn J. Headspace solid phase microextraction. Anal Chem, 1993, 65(14): 1843.
- [9] 陆 峰. 固相微萃取技术的原理、应用及发展. 国外医学药学分册, 1998, 25(3): 173.
- [10] Lord H, Pawliszyn J. Evolution of SPME technology. J Chromatogr, 2000, 885: 153.
- [11] Knutsson M, Nilve G, Mathiasson L, *et al.* Supported liquid membranes for sampling and sample preparation of pesticides in water. J Chromatogr, 1996, 754(1- 2): 197.
- [12] Jonsson JA, Mathiasson L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. TrAC, 1999, 18(5): 318.
- [13] Shen Y, Jonsson JA, Mathiasson L. On- line microporous membrane liquid- liquid extraction for sample pretreatment combined with CGC applied to local anaesthetics in blood plasma. Anal Chem, 1998, 70(5): 946.
- [14] Thordarson E, Palmarsdottir S, Mathiasson L, *et al.* Sample preparation using a miniaturized supported liquid membrane device connected on- line to packed capillary liquid chromatography. Anal Chem, 1996, 68(15): 2559.
- [15] Pedersen- Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid- liquid- liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. Anal Chem, 1999, 71(14): 2650.
- [16] Rasmussen KE, Pedersen- Bjergaard S, Krogh M, *et al.* Development of a simple in- vial liquid- phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary GC, CE and HPLC. J Chromatogr, 2000, 873(1): 3.
- [17] van der Vlis E, Mazereeuw M. Development of a needle device for on- line electroextraction- liquid chromatography. J Chromatogr, 1996, 741(1): 13.
- [18] Liu Y, Lopez- Avila V, Alcaraz, *et al.* Centrifugal partition chromatographic extraction of phenols and organochlorine pesticides from water samples. Anal Chem, 1994, 66(24): 4483.
- [19] Pawliszyn J. New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. TrAC, 1995, 14(3): 113.
- [20] Yang MJ, Pawliszyn J. Membrane extraction with a sorbent interface. LC- GC Int'l, 1996, 9(5): 283.
- [21] Segal A, Gorecki T, M ussche P, *et al.* Development of membrane extraction with a sorbent interface- micro GC system for field analysis. J Chromatogr, 2000, 873(1): 13.

收稿日期: 2001- 11- 15

差示分光光度法测定苯酚滴耳液中苯酚的含量

战克勤, 张军红, 朱美华, 山广志(山东省潍坊市人民医院, 潍坊 261041)

摘要 目的: 建立差示光谱法测定苯酚的含量, 排除辅料的干扰。方法: 在波长 288nm 处以苯酚在水和 0.1mol·L⁻¹NaOH 溶液中不同的紫外光谱, 测得差示吸收值(ΔA)为定量依据。结果: 平均回收率为 99.8%, RSD = 0.12%。结论: 方法简单准确。

关键词 差示分光光度法; 苯酚; 含量测定

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1006- 0111(2002)02- 0094- 02