

## 固相萃取技术在药物分析中的应用

李佩<sup>1</sup>, 李银峰<sup>2</sup>, 王杰晶<sup>3</sup>, 张园园<sup>1</sup>, 靳朝东<sup>2\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

3. 河南大学 药学院, 河南 开封 475001

**摘要:** 固相萃取技术是一种在 20 世纪 70 年代初发展起来的样品预处理分离富集技术, 具有操作简单、省时, 易实现自动化等优点, 广泛应用在制药、食品、环境、商检、化工等领域。固相萃取技术与高效液相色谱 (HPLC) 或液相色谱 (LC)、质谱 (MS) 法等分离检测手段联用, 从而实现样品在线预处理, 使其在组合化学、高通量筛选等药学领域的应用日益增多。简要介绍了固相萃取技术在化学药、中药及天然药物、生物药中的应用。

**关键词:** 固相萃取; 样品预处理; 药物分析; 化学药; 天然药物

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)02-0261-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.040

## Application of solid-phase extraction technology in pharmaceutical analysis

LI Pei<sup>1</sup>, LI Yin-feng<sup>2</sup>, WANG Jie-jing<sup>3</sup>, ZHANG Yuan-yuan<sup>1</sup>, JIN Chao-dong<sup>2</sup>

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Center for Instrumentation Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. College of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475001, China

**Abstract:** Solid phase extraction technology is a sample pretreatment and enrichment technology, developed in the early 1970s, with the advantages of simple procedure, short time, and easy automation, etc. It is widely used in the fields of pharmacy, food, environment, commercial inspection, chemical industry, and so on. Solid phase extraction technology, combined with the separation detection methods of high performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography (LC), or mass spectrometry (MS), could accomplish the online sample pretreatment and increase its application in combinatorial chemistry and high flux screening of pharmacy. This review briefly introduces the application of solid phase extraction technology in pharmaceutical chemicals, traditional Chinese medicine, natural medicine, and biological medicine.

**Key words:** solid phase extraction; sample pretreatment; pharmaceutical analysis; pharmaceutical chemicals; natural medicine

固相萃取法 (solid-phase extraction, SPE) 又称液固萃取法, 以选择性吸附与选择性洗脱的液相色谱分离原理对样品进行分离和纯化, 是一种用途广泛而且越来越受欢迎的样品前处理技术。目前, 国内应用最多的是液-液萃取法, 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, 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<sup>[1]</sup>。近年来, 由于高效液相色谱 (HPLC), 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) 日益受到重视<sup>[2]</sup>。1971 年, Broich 等<sup>[3]</sup>首次将该技术应用于尿中滥用药物的提取。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开发, 固相萃取技术有了迅速的发展<sup>[4]</sup>。

固相萃取技术凭借溶剂用量少、操作简单、选择性高、重现性好的优势, 已发展成为分离和浓缩各种样品中痕量分析物质的一种强有力的工具<sup>[5]</sup>, 广泛应用于药物分析<sup>[6]</sup>、毒物分析<sup>[7]</sup>、环境检测<sup>[8]</sup>等方面。本文就其在化学药、中药与天然药物以及生物药中的应用做一综述。

收稿日期: 2012-10-10

作者简介: 李佩 (1987—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析。E-mail: lipei621852@163.com

\*通信作者 靳朝东, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药物分析。Tel: (022)23006877 E-mail: jincd@tjipr.com

## 1 化学药检测

Cudjoe 等<sup>[9]</sup>采用不需要真空泵的新型 96 孔固相萃取盘结合 LC-MS/MS, 建立了测定苯二氮䓬类化合物(去甲安定、安定、氯羟去甲安定、去甲羟安定)的测定方法。固相萃取盘是十八烷基键合硅胶, 以硅胶为吸附剂, 规格为 96 孔板, 粒径为 12  $\mu\text{m}$ 。液相色谱条件是岛津(LC-10, AD)液相色谱仪, 体积流量为 0.5 mL/min, 流动相 A 为乙腈-水(10:90, 并含 0.1%的醋酸), 流动相 B 为乙腈-水(90:10, 并含 0.1%的醋酸), 梯度洗脱程序: 0~5 min, 100% A~100% B, 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。利用机器自动取样器在 96 孔固相萃取盘中对萃取物平行操作。3 种提取基质分别为磷酸盐缓冲液、尿液、血浆。用 96 孔固相萃取盘对样品预处理的时间均为 0.94 min。3 种基质重现性 RSD 值均不大于 9%。所有基质的检出限和定量限范围分别为 0.02~0.15、0.2~2.0 ng/mL, 线性范围为 0.2~500 ng/mL。该固相萃取盘可以重复利用, 因此降低了样品预处理的成本。该方法与传统的 SPE 方法相比, 不需要真空泵, 实验条件简化、新颖而实用。

Wan 等<sup>[10]</sup>使用在线 SPE 提取和 LC-MS/MS 联用技术对人血浆中哌嗪嘧啶酮衍生物 ABT-925 进行定量分析。采用 Thermo Aquasil C<sub>18</sub> (50 mm×3 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 流动相为乙腈-水-甲酸(50:50:0.1), 体积流量为 0.35 mL/min, 柱温为室温。线性范围为 0.010 2~5.24  $\mu\text{g/mL}$ , 线性相关系数为 0.999 1。样品和内标物的回收率分别为 81.6%、73.0%。在 0.010 2、0.025 6、0.160、0.999、4.16、5.24  $\mu\text{g/mL}$  浓度下测定样品的准确度和精密度, RSD 值均小于 0.1%。ABT-925 在 -20  $^{\circ}\text{C}$  下至少可以保存 604 d, 因此对 ABT-925 解冻和在室温下的稳定性进行了考察。先将样品解冻, 再在室温放置一段时间, 最后放回 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱, 浓度按标准曲线计算。大约室温放置 34.5 h 后, 浓度没有明显变化。系统滞后也是考察在线 SPE 方法学的一个重要方面, 在该实验中, 主要的影响因素是萃取柱。重复测定空白样品 6 次, 得到的主峰面积小于定量限主峰面积的 14%。该方法已经用于 ABT-925 的 II 期临床试验。简单的自动样品处理过程, 减少了失误, 降低了实验失败的几率。由此可见, 一个灵敏度高, 专属性强, 重现性好的检测人血浆中 ABT-925 的方法已被开发利用。

Kang 等<sup>[11]</sup>用静电纺丝聚苯乙烯纳米纤维填料

制成的微型小柱, 可用于分离分析地西洋类药物及其在人和狗的血浆中的主要代谢产物。采用的色谱条件为 AB C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 检测波长为 230 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量为 20  $\mu\text{L}$ , 柱温为室温。被吸附在固定相上的样品用 50  $\mu\text{L}$  甲醇可洗脱, 并通过 HPLC 结合紫外检测器进行测定。用该柱对 0.5 mL 血浆样品预处理, 处理时间少于 10 min。在血浆中地西洋的检测限可达 1  $\mu\text{g/L}$ 。该方法与传统方法相比, 快速简单, 灵敏度高, 提高了检测限, 减少了样品的预处理时间, 可应用于治疗药物的检测和药理学研究。

固相萃取技术与传统的液-液萃取法相比, 操作简便, 节省溶剂, 提高了提取率, 不易产生乳化, 并且可以实现样品处理的自动化。该技术与 LC-MS 结合, 已成为化学药样品预处理的主要工具。

## 2 中药及天然药物

中药及天然药物是我国具有国际优势的产业之一, 但因其所含成分复杂, 一直没有在国际市场上得到应有的地位。为了提高中药及天然药物的疗效, 减低毒副作用, 选用合理的提取分离技术是非常重要的。近年来固相萃取技术在中药及天然药物有效成分分析方面的应用越来越受到人们的重视<sup>[12-13]</sup>。

郭怀忠等<sup>[14]</sup>对藿香正气水样品前处理的《中国药典》2005 年版方法进行改进, 建立采用 SPE-HPLC 法测定藿香正气水中厚朴酚与和厚朴酚含量。采用 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为甲醇-水-乙腈-冰醋酸(70:25:5:0.25), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 294 nm, 柱温为室温。SPE-HPLC 法测得厚朴酚质量浓度在 4.0~80  $\mu\text{g/mL}$  ( $r=0.999 8$ ), 和厚朴酚质量浓度在 2.0~40  $\mu\text{g/mL}$  ( $r=0.999 8$ ) 与其峰面积线性关系良好。厚朴酚的平均回收率为 99.9% (RSD 为 0.7%,  $n=5$ ), 和厚朴酚的平均回收率为 99.5% (RSD 为 0.5%,  $n=5$ )。萃取小柱选用极性吸附剂硅胶, 将杂质保留在吸附剂上, 首选将待分析物洗脱下来, 简化了操作步骤, 取得了满意效果。该方法环保、简便、准确, 重现性好, 能有效控制藿香正气水的质量。

张峰等<sup>[15]</sup>研究出一种较为简单快速的样品纯化富集方法, 先采用 OEG 填料, 然后用 ODS 填料作为固定相对白花蛇舌草水提醇沉后的样品进行纯化, 从白花蛇舌草水提物中有效地排除或减少糖类、黄酮类等多种成分的干扰, 对环烯醚萜苷类成分进行选择性的富集, 并用超高液相色谱法对富集后的

各个阶段产物进行了色谱表征。色谱条件为超高液相色谱系统, PDA 检测器, 色谱柱为 Waters 公司的 ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (键合相为 ODS) (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 30 °C, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为乙腈, 梯度洗脱程序: 0~3 min, 2% B; 3~20 min, 2%~10% B; 20~20.5 min, 10%~12% B; 20.5~26 min, 12%~15% B; 26~35 min, 15%~28% B。体积流量为 0.25 mL/min, 检测波长为 200~400 nm, 进样量为 10 μL。采用 OEG 柱可初步实现对环烯醚萜苷类成分的富集, 但仍有大量非环烯醚萜苷成分 (糖类等) 一起流出。因此, 再串联一根 ODS 柱, 利用糖类与环烯醚萜苷类成分在 ODS 柱上保留的差别, 实现对环烯醚萜苷类成分的选择性富集。该方法为白花蛇舌草中环烯醚萜苷类成分建立了相对简便高效的萃取流程, 为其高通量制备奠定了基础。采用先 OEG 柱、后 ODS 柱的串联顺序进行固相萃取, 可使主要含环烯醚萜苷类成分的产物从前者水相洗脱后直接上样到后者, 无须浓缩步骤, 减少了因样品转移造成的目标成分流失, 且操作简单、选择性好。

张朋美等<sup>[16]</sup>采用固相萃取法分离金莲花中生物碱并用高效液相色谱测定, 分离测得 4 种生物碱。采用的是 C<sub>18</sub> 反相色谱柱, 流动相为甲醇, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 268 nm, 柱温为室温 (27~31 °C)。生物碱采用水提取, 经济实用。该法节省了很多有机萃取剂, 并在很大程度上避免使用有毒有害的有机萃取剂, 分离效果好。

Long 等<sup>[17]</sup>开发和优化出硅基强阳离子非水固相萃取法富集生物碱。在该方法中, 硅基强阳离子非水固相萃取柱被用来洗脱非生物碱化合物和从提取物中浓缩生物碱。该预处理样品方法结合 HPLC 定量检测了山茛菪中茛菪碱和莨菪碱的含量。采用的色谱条件为 Tigerkin C<sub>18</sub> 色谱柱, 体积流量为 1.0 mL/min, 波长范围为 190~400 nm, 柱温为 30 °C, 进样量 5 μL, 流动相 A 为 50 mmol/L 磷酸氢钠, 100 mmol/L 高氯酸钠和高氯酸的酸性缓冲盐 (pH = 2.33), 流动相 B 为乙腈, 流动相 C 为水, 梯度洗脱程序: 0~20 min, 10% B, 20% A, 70% C~30% B, 20% A, 50% C; 20~30 min, 30% B, 20% A, 50% C~50% B, 20% A, 30% C。东茛菪碱和莨菪碱的回收率分别为 98.51%、91.12%, RSD 值分别为 1.4%、1.6%, 分别在 0.01~0.8 mg/mL、0.01~0.4 mg/mL 范围内线性良好。强疏水性生物碱用含水性 SPE 法

很难富集, 但用非水固相萃取法却可以成功富集。

Martano 等<sup>[18]</sup>通过 SPE - GC - MS 联用技术测定培养基中 β-胡萝卜素的挥发性裂解产物。气相色谱条件为 DB-20 (WAX) 毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.50 μm), 进样口和柱温箱的初始温度分别为 260、65 °C。柱温箱的升温速率为 65~70 °C, 5 °C/min; 70~200 °C, 10 °C/min; 200 °C 保持 4 min; 200~220 °C, 10 °C/min; 220 °C 保持 4 min。运行中检测器温度为 320 °C, 载气为氦气, 气体流量为 1.0 mL/min, 不分流模式下自动进样, 样品进样量为 1.0 μL, 溶剂延迟设置为 8.0 min。浓度为 1.0 μg/mL 的培养基中样品回收率为 71.7%~95.7%。日内 (n=5) 和日间 (n=15) 回收率精密度分别小于 2.0%、4.8%。通过 4 种不同固相萃取小柱 (反相聚合物吸附剂小柱、弱阴离子交换小柱、氰基小柱、苯基小柱) 比较发现, 最高回收率由苯基固定相提取得到, 萃取主要基于苯环上的 π-π 键相互作用。因此, 苯基固定相适合于有 π 共轭系统的疏水性化合物, 如萃取疏水性芳香化合物三硝甲基苯 (TMT)。通过该方法第一次对处理溶液或初始细胞培养基中的挥发性物质进行了量化。

肖淑娟等<sup>[19]</sup>以木犀草素印迹聚合物作为固定相装填到硅胶柱中, 从花生壳提取物中分离富集出了木犀草素, 经检测分离效率达到了 96.2%, 比硅胶柱高出近 20%, 说明此方法具有良好的稳定性和选择性。且 MIPs - SPE 柱与普通的硅胶柱相比, 经过洗脱再生后可以反复使用多次, 证明了其良好的稳定性和一定的经济效益。

### 3 生物药

魏伯平等<sup>[20]</sup>建立了 SPE - LC - MS/MS 法测定重组人粒细胞刺激因子注射液中氨苄青霉素的残留。样品经过 HLB 固相萃取小柱净化、浓缩, 有效去除了杂质。采用的液相色谱条件是 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 体积流量 0.8 mL/min, 进样量 10 μL, 以乙腈 - 水, 甲酸调 pH 3.15 为流动相, 梯度洗脱: 0~4 min, 5%~80% B; 4~5 min, 80%~5% B; 5~6 min, 5% B。质谱采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式, 多反应监测 (MRM)。氨苄青霉素在 0.044 2~3.536 2 μg/L 线性关系良好 (r=0.999 5), 最低定量限为 0.044 2 μg/L, 回收率在 101.1%~106.7%, 批内、批间 RSD 值分别小于 5.8%、7.3%。结果表明此法准确可靠, 重复性好,

灵敏度高,为免疫制品中抗生素残留检测提供参考。

SPE 技术的出现使生物药样品预处理的过程大为简化,同时具有溶剂用量少,萃取率高,分析速度快等优点。但其在生物药方面的应用也有局限性,如专属性不强,不耐高温等,有待进一步改进。

#### 4 结语

固相萃取因其低污染,低消耗,萃取回收率高,易于自动化,已经被越来越多的科研工作者用于样品预处理中。与液-液萃取法相比较,SPE 是以固态吸附剂代替液-液法中的有机溶剂,SPE 需要更少的溶剂,相对减少了生成的溶剂废弃物。SPE 最重要的优点是它更易实现自动化,这一特点尤其受到瞩目,对于检测时限紧张,需要最大程度提高效率,同时减少消耗的资源应用方面的优势明显。分子印迹聚合物作为吸附剂,可以提高复杂成分的选择性,同时减少杂质成分对样品定量的干扰<sup>[21]</sup>。在近 30 年间发展迅速,尤其在药物分析中发挥越来越重要的作用。固相萃取已向更微量、更专属、更具选择性的方向发展,如固相微萃取、分子印迹固相微萃取技术的开发和应用。因此,新型分子印迹聚合物及萃取装置依然是研究热点。

#### 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): 8-13.
- [2] 朱静燕,钱晓萍. 固相萃取技术及其在体内药物分析中的应用 [J]. 海峡药学, 2007, 19(10): 115-117.
- [3] Broich J R, Hoffman D B, Goldner S J, *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(2): 309-312.
- [4] Huang T H, Wall J, Kabra P. Improved solid phase extraction and liquid chromatography with electrochemical detection of urinary catecholamine and 5-S-1-cysteinyll-1-dopa [J]. *J Chromatogr*, 1988, 452: 409.
- [5] Pullen S, Hock B. Development of enzyme immunoassays for the detection of pyrethroid insecticides 2 polyclonal antibodies for pyrethroid insecticides [J]. *Anal Lett*, 1995, 28(5): 781-795.
- [6] 王洪允,江 骥,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): 236-241.
- [7] 邸玉敏,朱 军,常 靖,等. 固相萃取技术(SPE)在苯丙胺类毒品分析中的应用 [J]. 中国法医学杂志, 2010, 25(2): 105-108.
- [8] Prieto A, Schrader S, Bauer C, *et al.* Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 685(2): 146-152.
- [9] Cudjoe E, Pawliszyn J A. New approach to the application of solid phase extraction disks with LC-MS/MS for the analysis of drugs on a 96-well plate format [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(4): 556-562.
- [10] Wan K, Rieser M, El-Shourbagy T. Quantitative determination of ABT-925 in human plasma by on-line SPE and LC-MS/MS: Validation and sample analysis in phase II studies [J]. *Pharmaceutics*, 2010, 2(2): 171-181.
- [11] Kang X J, Chen L Q, Wang Y. Design of packed-fiber solid-phase extraction device for analysis of the drug and its metabolite in plasma [J]. *Biomed Microdevices*, 2009, 11(4): 723-729.
- [12] 陈 蕾. 固相萃取技术在中药分析中的应用 [J]. 中国药事, 2012, 26(2): 159-161.
- [13] 郑振佳,王 晓,王明林,等. 固相萃取-快速分离液相-四级杆串联飞行时间质谱联用分析荷叶中的生物碱 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1066-1068.
- [14] 郭怀忠,张 斌,王 配,等. SPE-HPLC 法测定藿香正气水中厚朴酚与和厚朴酚的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 827-830.
- [15] 张 峰,郭志谋,章飞芳,等. 串联固相萃取法选择性富集白花蛇舌草中的环烯醚萜苷类成分 [J]. 色谱, 2009, 27(4): 436-441.
- [16] 张朋美,杨晓民,史建国,等. 高效液相色谱法测定金莲花中的生物碱 [J]. 河北北方学院学报, 2008, 24(1): 43.
- [17] Long Z, Wang C R, Guo Z M, *et al.* A non-aqueous solid phase extraction method for alkaloid enrichment and its application in the determination of hyoscyamine and scopolamine [J]. *Analyst*, 2012, 137(6): 1451-1457.
- [18] Martano G, Vogl C, Bojaxhi E, *et al.* Solid-phase extraction and GC-MS analysis of potentially genotoxic cleavage products of  $\beta$ -carotene in primary cell cultures [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(8): 2415-2426.
- [19] 肖淑娟,李红霞,于守武. 分子印迹固相萃取法提取花生壳中木犀草素 [J]. 化工进展, 2010, 29(2): 293-296.
- [20] 魏伯平,陈 霞,贺亚玲,等. 固相萃取-串联液质法测定重组人粒细胞刺激因子注射液中氨苄青霉素残留 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1905-1910.
- [21] Lasakova M, Jandera P. Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(5/6): 799-812.