



色谱分析的样品前处理基本原理

The Measure of Confidence



Agilent Technologies



目录

第 1 章	简介	1
第 2 章	样品类型及处理方法概览	9
第 3 章	采样的常规注意事项	17
第 4 章	固体材料的采样和样品处理	20
第 5 章	过滤	29
第 6 章	挥发性有机化合物的样品引入和样品前处理	35
第 7 章	液体样品的样品预处理	55
第 8 章	QuEChERS、盐析液-液萃取和相关技术	78
第 9 章	固相萃取 (SPE)	94
第 10 章	SPE 中的特殊技术	133
第 11 章	作为样品前处理技术的体积排阻色谱	160
第 12 章	作为样品前处理技术的色谱柱/快速色谱	170
第 13 章	作为样品前处理技术的柱切换 (在线 SPE)	172
第 14 章	固体样品的样品前处理方法	181
第 15 章	生物样品的样品前处理	195
第 16 章	生物分析中的样品前处理	227
第 17 章	LC/MS 的样品预处理	255
第 18 章	样品前处理中的膜技术	269
第 19 章	清除剂在样品前处理中的应用	281
第 20 章	HPLC 和 GC 分析的衍生化	286
第 21 章	“恰到好处”的样品前处理方法：已经验证的样品分析发展趋势	297
第 22 章	样品前处理的现状及未来	307
第 23 章	术语表	310
	索引	343
	基质/分析物索引	351

前言

因为色谱分析实验室的大多数样品都不可直接置于分析仪器中，因此几乎每个样品都需要进行一定方式的处理。样品前处理可简单如“稀释-上样”，也可复杂到需要多个处理步骤。分析周期是指从样品采集到最终完成分析和数据输出的所有步骤。虽然样品前处理是分析周期中的重要部分，但却未能像人们对分离和检测仪器以及数据处理那样，引起足够的重视。通常，样品前处理工作使用的是几十年的老技术，这些老技术通常手动且耗时，需要使用大量玻璃器皿和其他装置，甚至一些更老的技术会使用到大量溶剂，这些溶剂需要在后续分析中逐步处理掉，这将耗资巨大而且还会引发安全问题。在尝试简化分析物和/或从复杂基质中分离分析物时需要使用多个样品前处理步骤，所以可能会给含量分析带来误差，并影响分析物的回收率。

本书将介绍目前一些最常用的样品前处理技术。由于样品前处理技术包含许多样品处理方式（例如称量、溶解、萃取、捕集等），因此不可能涵盖每一个样品前处理方式。本书的初衷是做一本产品样本小手册，如非常受欢迎的《液相色谱产品样本：液相色谱柱与方法开发指南》（出版号 5990-7595CHCN），但很快篇幅就达 350 多页并涵盖许多不同的样品前处理技术。由于这本书是为安捷伦科技公司而撰写的，因此书中的许多方法都源自安捷伦化学产品，但为了保持全面性，我还介绍了一些安捷伦未涉及的其他技术。应用实例贯穿全书，并且许多实例都可从网络上查到。

由于本书主要是为色谱实验室而著并且篇幅有限，叙述范围仅限定在有机和生物样品的前处理上，虽然无机样品前处理在多种样品类型的色谱、尤其是光谱分析中也很重要，但本文中不作叙述。即便如此，本文中介绍的多种技术，如离子交换 SPE、液液萃取和微波辅助萃取均可用于无机样品，使无机样品在经过前处理后可进一步进行离子色谱分析或光谱测定。

本书的写作框架与传统形式略有不同。第 1 章介绍了样品前处理过程，第 2 章列出了本书后半部分将要详细介绍的主要方法。这样，读者无需费时通读各个章节，即可简要地了解用于气体、液体、混悬液、凝胶和固体物质的样品前处理方法。从而帮助读者直接找到适用其特定样品的前处理方法。随后的章节还会提及表格中的这些内容，但不会重复所有的信息。本书是按照样品前处理的流程（采样、运输、储存等多个步骤直至样品过滤，在某些例子中，还将介绍样品导入）进行叙述的。

各章节按样品类型进行编排，首先是气体样品（第 6 章），其次是液体样品（或投入液体形式中的样品）（第 7 - 12 章）、固体样品（第 14 章）、生物样品（核酸和蛋白质）（第 15 章）、生物体液/组织（第 16 章），然后是专题，例如质谱样品前处理、膜的应用、化学清除剂以及衍生化。最后，第 21 章将介绍 "Just Enough" 样品前处理的新概念，该技术是目前样品前处理的发展趋势，高度依赖于色谱/质谱联用技术的广泛使用。为帮助新手（以及一些专业人员！）了解样品前处理相关的术语，第 22 章还包含了术语表。

我希望您认真阅读，并希望书中的信息能为您打下坚实的基础，帮助您应对样品前处理的挑战。

Ronald E. Majors, Wilmington, DE

致谢

首先，我要感谢我的妻子 Carol，感谢她牺牲我们的部分退休时间让我来完成这本书，并感谢她在我著书过程中给予支持。我还要感谢我在安捷伦公司的上司 Helen Stimson，让我在即将退休前可以半休半工作，满足我对科学的热爱，尤其是对样品前处理技术的追求。我还要感谢安捷伦市场部的三位女士（Christine Cox、Anne Batchelor，尤其是为本书付出了巨大精力的 Nicole Goodman）帮助我出版这本书。特别要感谢安捷伦的同事们：感谢 Edward Elgart 校对全书；感谢 Gina Goggins 提出有用的建议并帮助查找用作实例的图表；感谢 Dennis Blevins 为大多数章节提供技术方面的详细反馈。另外，我还要感谢安捷伦样品前处理和色谱部门的同事，他们在阅读某些章节后提供了反馈。这些反馈帮助我增强了信息的有用性，他们的建议也帮助我进行了一些改进：Trisa Robarge、Nigel Simpson、Christophe Deckers、Bill Wilson、Jared Bushey、Limian Zheo、Michael Woodman、Sue Cohen、Tina Chambers、Jennifer Massi、Derick Lucas 以及 Bruce Richter，最后要特别感谢 Vanita Marshall，她帮助我协调所有的复审人员。

最后但同样重要的是，我要感谢 *LCGC No. America*，允许我使用多篇文章中的一些已出版信息和插图，这些文章来源于我的每月专栏、色谱柱观察以及样品前处理展望。

Ronald E. Majors, Wilmington, DE

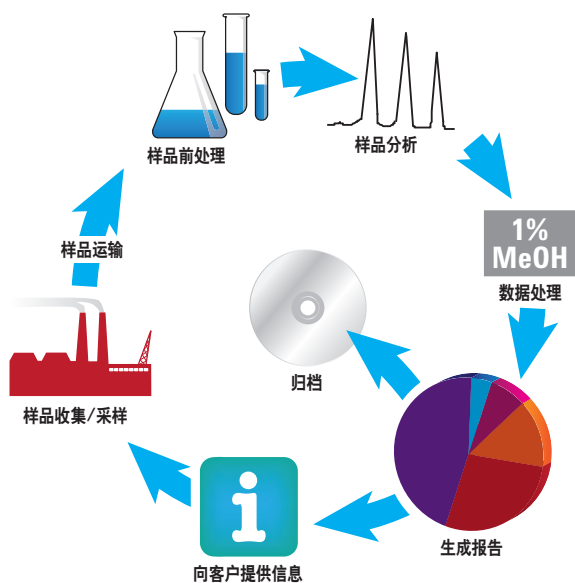


简介

图 1.1 展示了分析过程的主要阶段。合理选择检测技术只是成功开发应用的其中一个步骤。检测之前的所有步骤都同样重要。取样和样品前处理过程从样品收集开始，一直延展到测定。采样过程中合理的样品收集（称为初级采样）是最初涉及到样品的步骤，所采集的样品能否代表待研究的整批样品这一点极为重要。从采集地点到分析实验室，这些代表性样品的储存、保存和运输过程必须确保原始样品的理化性质不能发生任何改变。另一个挑战是合理地选择实验室样品本身（称为二级采样），因为最终用于分析的样品可能只是原始收集样品的一小部分，但必须是原始样品的子集。最后，样品前处理方法必须使样品成为适用于检测的形式，在此过程中尽量保证没有损失，而且二级样品不发生性状改变。所有这些预分析步骤对整个检测结果的准确度和可靠性的影响都大于测量本身。

图 1.1

样品分析工作流程图



样品前处理是色谱和光谱分析的重要组成部分。该过程的目的是获得具有代表性的、高重现性的均匀样品溶液，以便于注入色谱柱进行色谱分析，或注入 ICP-MS/原子吸收源，或于比色皿或核磁共振样品管中进行定性。样品前处理旨在获得满足以下条件的样品：(a) 干扰物相对较少；(b) 不会损伤色谱柱或仪器；以及 (c) 与所使用的分析方法匹配。进行色谱分析时，溶解样品的溶剂应该为 HPLC 的流动相，或可直接注入 GC 色谱柱而不影响样品的保留或分离度、固定相自身的稳定性，同时不能干扰测定。最好还能浓缩分析物和/或对它们进行衍生，以改善检测或分离。在光谱分析中，样品溶剂不应含有微粒，应与光谱源兼容，还应具有适当的黏度以保证能够流入喷雾器，实现在线方法分析。根据光谱分析的灵敏度，有时我们还需要预浓缩样品，在将样品引入仪器前使用色谱或液-液萃取法处理样品。

虽然色谱和光谱分析中使用的许多样品前处理方案都比较类似，但阐述这些样品前处理流程之间的各种不同之处不在本书的范围之内。因此，本手册的主题仅限于色谱分析中常规的样品前处理方法，且重点介绍领域是液相色谱 (LC)/高效液相色谱 (HPLC)/超高效液相色谱 (UHPLC)，以及气相色谱 (GC)。

表 1.1 汇总了分析周期中各种操作的详细描述。如果不特别注意所有这些操作，就可能会丧失样品的完整性，分析数据也会受到影响，质量下降，甚至变成无效数据。步骤 1-5，包括 1) 样品收集，2) 储存和保存，3) 样品运输，4) 初步的处理和实验室采样，以及 5) 称量或稀释，所有这些都是样品前处理的重要组成部分。虽然色谱分析中的所有这些步骤都会对最终方法的准确度、精密度和便利性产生重要影响，但限于篇幅，我们不能详细阐述所有这些内容。我们只在此简要介绍步骤 1 和 4 (样品收集和样品的初步处理)。如需了解步骤 2、3 和 5 的详细说明，请参阅参考文献 1-4。本书的大部分内容主要关于 **表 1.1** 中的步骤 6-9，它们组成了我们通常所说的样品预处理或样品前处理 (“样品制备”)。

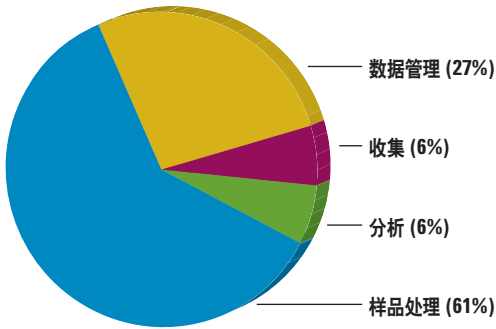
表 1.1

样品预处理选项		
步骤	选项	注释
1	样品采集	采用具有统计学有效性的方法获得代表性的样品。
2	样品储存和保存	使用合适的惰性密封容器；处理挥发性、不稳定性或反应活性物质时应特别小心；如有必要，应先对样品进行稳定性处理；生物样品可能需要冷藏或冷冻。
3	样品运输	将样品从采集地点运送到实验室是非常重要的一个环节。运送环境应确保样品完整性，要轻拿轻放，密封保存；时间对于样品也非常重要——正如上面的步骤 2 所述，不当的延误可能会导致样品降解。
4	样品的初步处理	样品必须以更有助于样品预处理（如干燥、过筛和研磨等）的形式存在；更细更分散的样品更具有代表性，也更易于溶解或萃取。
5	称量或定容稀释	对具有生物活性、反应活性、不稳定的物质要采取必要的预防措施，如稀释时使用经过校准的定容玻璃容器。
6	其他的样品处理方法	溶剂交换、脱盐、蒸发、冷冻干燥等。
7	去除颗粒	过滤、离心、固相萃取。
8	样品提取	液体样品（表 2.4）和固体样品（表 2.2 和 2.3）的前处理方法
9	衍生化	主要用于改善分析的检出限；有时可用于改善分离效果，但在分析循环中的增加额外步骤会延长分析时间、增加分析复杂性，还有可能导致样品损失（请参阅第 20 章）。

相对于主要为自动化过程的 GC 和 HPLC，样品前处理通常都通过手动操作完成。因此，与分离和数据分析相比，样品前处理的方法开发和常规分析所要花费的时间更多（见 **图 1.2**）。样品前处理可能涉及多种方法以及多个操作步骤，因此，它是色谱方法开发中的一个极具挑战性的部分。

图 1.2

典型色谱分析的运行时间

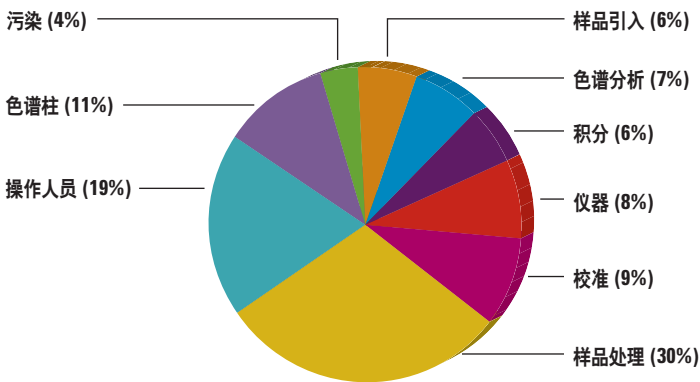


数据来自安捷伦科技公司的调查

最终，分析方法的精密度和准确性在大部分情况下都由样品前处理过程决定（见图 1.3），其中包括称量和稀释等操作。鉴于所有这些原因，我们必须预先仔细地设计样品前处理流程。

图 1.3

色谱分析的误差来源



数据来自安捷伦科技公司的调查

样品前处理的流程应能够通过最少的步骤定量回收分析物，并且应（如果可能）易于实现自动化。每种分析物的定量回收率都在 99% 以上有助于提升分析的灵敏度和精密度，但这并不意味着最终进样的样品中必须含有原始样品中的所有分析物。例如，在给定的分析方法中，一系列样品前处理步骤所得的中间馏分的等分样品也可用于进一步的样品前处理，或者用于进样。如果回收率不是 100%，样品前处理步骤就必须具有良好的重复性。当回收不完全时，可使用内标或进行加标回收有助于更好的定量。如图 1.3 所示，更少的样品前处理步骤加上自动化可减少分析所需的整体时间和工作量，从而降低了分析人员造成结果不精确或产生误差的可能性。因此，根据所用的色谱分析方法和检测的选择性，我们应该尽可能采用最少的样品前处理步骤。换句话说，为了达到分析目标，应根据分析系统其他部分（例如色谱、检测）的选择性进行充分的样品前处理，而充分的样品前处理过程可能涉及多个步骤和多种技术。这一概念将在第 21 章中详细阐述。

许多样品前处理技术已经实现自动化，并且通常相应的仪器已商品化。从使用机器人代替手工操作，到优化专门仪器实现特殊的样品前处理技术，自动化的途径各不相同。虽然自动化可能非常昂贵且耗费精力，但当需要分析的样品众多，以及分析每个样品所需的时间和工作量过大时，它就能发挥极大作用。一个样品前处理是否需要自动化通常基于分析成本、使用是否顺手方面的考虑；在某些情况下，还需要兼顾保证操作人员的安全（即尽量减小有毒物质或其他可能危害健康物质的暴露）。在此简述样品前处理仪器的自动化，对商品化仪器的细节不做赘述。所列主题的相关参考书请参阅参考文献 5-7。

表 1.2

既然您打算参考本书，在决定哪个前处理技术最适合您的样品之前，还需要考虑很多问题。**表 1.2** 是一张样品前处理工作表，它结合分析方法和样品前处理的目的提供了一些指南，包括分析物和基质等方面的问题。由于样品前处理方面的术语很多，本书附录提供了一个样品前处理术语表。相关缩略语和定义也可查阅此术语表。

样品前处理工作表		
样品前处理相关问题	实例/注意事项	注释
采用哪种分析测量技术?	LC-UV、LC/MS、GC/MS 等。	最终的样品必须与分析技术兼容。
您的最佳分析运行时间是多少?	1 min、10 min、0.5 h 或更长时间	样品前处理时间可能会超过运行时间；您还能进行批量样品分析吗?
为满足 LOD/LOQ 要求，需要达到什么水平的回收率?	仅为 100%，低于 100%	回收率达到 100% 是最理想的状态，但样品前处理步骤越多，损失样品的可能性就越大；即便如此，如果“损失”是可重现的，那么即使回收率相对较低，RSD 也是可以接受的。
采用哪种定量方法?	外标法还是内标法?	有可用的标准品吗？您能找到可与目标分析物分离的内标物吗？您是否需要多个内标物?
您所需要的准确度和精密度的多少?	同时考虑日间和日内数据值	对于痕量水平的 (例如亚 ppb 级) 样品，RSD 可能会大于预期值；必须在与样品相当的浓度水平下的测定方法的回收率、精密度和准确度 (至少 3 个浓度水平)。
样品基质是什么?	有机的、生物的、无机的、固体、半固体、液体、凝胶、气体等。	所选的样品前处理技术必须能够从基质中选择性地分离目标分析物。
关于样品基质您了解多少?	油性还是水性？盐分含量高、可挥发、不稳定；样品基质是极性的还是非极性的，是否是离子型或可离子化的?	必须尽早开始考虑哪种样品前处理技术能够最有效地区分分析物和基质的性质。

(接转下页)

样品前处理工作表

样品前处理相关问题	实例/注意事项	注释
样品的体积/质量是多少?	微升还是升, 毫克还是千克等。	必须具备满足样品处理量所需的设备和玻璃器皿。
哪些是样品主要的内源性干扰物?	干扰物更接近于样品基质还是更接近于分析物本身?	对于那些与目标分析物相似的干扰物, 可能需要采用一种以上的样品前处理技术进行纯化。
基质、干扰物和目标分析物上的哪些官能团会影响样品前处理技术的选择?	影响溶解性、极性、离子化状态 (pKa)	基质和干扰物的真实结构通常是未知的, 因此我们无法作出合理的判断。
关于分析物本身还有哪些已知信息?	水-辛醇分配系数、浓度范围、化学结构	可以使您将注意力转移到分析物本身, 并借助色谱和/或检测步骤从共提取的干扰物和基质组分中分离它们。
分析要求达到怎样的干扰去除程度?	取决于色谱分离和检测的选择性	在 LC/MS (和 MS-MS) 分析中必须避免离子抑制/增强效应; 对 UV 检测器及其他选择性较差的检测器, 需要更细致的样品前处理和更强的色谱选择性。
可能涉及到哪些样品前处理步骤?	稀释、净化、过滤、调节 pH 等。	可能是满足最佳的整体选择性所必需的, 但是每个附加步骤都可能导致分析物损失并影响分析的准确度/精密度。
实现最佳分析是否需要浓缩?	溶剂蒸发、吹扫捕集等。	虽然浓缩步骤会增加分析时间, 但它可能是达到 LOC/LOQ 所必需的。
分析物溶于哪种溶剂可获得最佳分析效果?	避免使用可能会引起 UV 干扰、MS 离子抑制、GC 固定相兼容性问题的溶剂或非挥发性溶剂	样品前处理最后一步的溶剂可能会受到限制; 通常采用蒸干之后用兼容溶剂复溶的方法, 但这会增加时间和步骤。
方法开发和常规分析有哪些可用资源?	高通量分析可能需要一定程度的自动化; 您的实验室是否具备合适的样品前处理工具?	样品前处理可能需要更多的人员, 因为与分析测量相比, 它通常耗费更多的人力和时间。

参考文献

1. Keith, L.H. (Ed.) *Principles of Environmental Sampling (ACS Professional Reference Book)*, 2nd Ed., American Chemical Society, Washington, DC, **1996**, ISBN-10: 0841231524 and ISBN-13: 978-0841231528
2. Pawliszyn, Janusz, (Ed.) *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*, Academic Press, Waltham, MA, **2012**, ISBN-10: 0123813735 and ISBN-13: 978-0123813732
3. Svarc-Gajic, Jaroslava (Ed.) *Sampling and Sample Preparation in Analytical Chemistry, (Chemistry Research and Applications: Chemical Engineering Methods and Technology)*, Nova Science Pub Inc., Hauppauge, NY, **2011**, ISBN-10: 1621002691 and ISBN-13: 978-1621002697
4. Conklin, Alfred R., Jr. *Field Sampling: Principle and Practices in Environmental Analysis*, Marcel-Dekker, New York, **2004**
5. Moldoveanu, S.C.; David, V. *Sample Preparation in Chromatography (J. Chromatography Library)*, Elsevier Science, San Diego, CA, **2002**
6. Wells, D.A. *High-Throughput Bioanalytical Sample Preparation: Methods and Automation Strategies*, Elsevier Science, San Diego, CA, **2003**, ISBN-10:044451029X and ISBN-13: 978-0444510297
7. Nickerson, B. (Ed.) *Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms: Challenges and Strategies for Sample Preparation and Extraction*, Springer, New York, **2011**, ISBN-10:1441996303 and ISBN-13:978-1441996305

样品类型及处理方法概览

样品基质可大致分为有机基质、生物基质，或无机基质，并可以进一步分为固体、半固体（包括霜剂、凝胶、悬浮液和胶质）、液体和气体基质。在色谱分析之前，几乎每一种基质都需要进行某种形式的样品前处理，即使仅仅是简单的稀释。

气体样品通常采用气相色谱而不是 HPLC 进行分析。采样罐收集、样品定量环直接取样、顶空采样和吹扫捕集等技术都可用于采集和进样气体样品。在第 6 章中，我们将简要介绍那些主要用于气体样品的取样/样品前处理技术。**表 2.1** 概述了气态挥发性样品的典型采样、样品引入和样品前处理流程。

表 2.1

气态样品采样和样品前处理的常用方法

样品前处理方法	技术原理	注释
随机采样	气态样品被吸入真空玻璃容器、球形金属容器或金属采样罐，或者被抽入注射器；也可将气体泵入塑料袋或其他惰性容器。	主要用于空气中的挥发性化合物；样品将被送至实验室，采用冷阱技术分离和浓缩分析物。
固相捕集	气态样品通过填充了吸附剂（例如硅胶、活性炭）的萃取管；然后用强溶剂将捕集的分析物洗脱下来。	用于空气中的半挥发性有机化合物；控制气体流速对于捕集效率极为重要；需要小心避免生成气溶胶，发生吸附剂过载，或者反应性分析物发生不可逆的吸附；常见的吸附剂包括硅胶、氧化铝、多孔聚合物（Tenax、聚氨酯泡沫）以及碳；使用化学或物理络合剂有助于改善捕集效率。
液体捕集	用对分析物具有良好溶解性的溶剂对气态样品进行起泡吸收法收集过；分析物对该溶剂的亲性和高于其对气态基质的亲和性。	流速应足够低，以避免产生泡沫或气溶胶；可以在溶剂中添加一些络合剂以辅助捕集；对于挥发性非常强的物质，可以降低温度；该过程有时被称为“撞击”。

(接转下页)

表 2.1 (接转下页)

气态样品采样和样品前处理的常用方法		
样品前处理方法	技术原理	注释
顶空采样	样品(固体或液体)被置于一个封闭的恒温玻璃样品瓶中,直至达到平衡;达到平衡时,分析物将以恒定的比例分配到气相和固相(或液相)中;采集气相样品注入 GC 进行分析。	主要用于测定传统 GC 技术难以处理的样品中的痕量挥发性物质;可以通过加热 (<100 °C)、盐析、调节 pH 值,以及其他方法来提高灵敏度;有时可加入水或溶剂以辅助样品溶解,以及/或者使基质中的有机物游离出来,尤其是对于土壤和沉积物样品;可以手动操作也可以实现自动化。
吹扫捕集(动态顶空)	样品(固体或液体)被置于密闭的恒温容器中,顶空蒸气随着惰性气流持续流出,其中的组分被后续固相萃取或冷阱捕集,通过热脱附进入 GC 进样口(热脱附)。	适用于分析物浓度过低或静态顶空(HS)采样(有时称为气相剥离)的分配系数不理想的情况;可积聚挥发性组分,直至其浓度足以用于热脱附和 GC 分析,因此灵敏度比静态 HS 更高;可以手动操作也可以实现自动化。
热脱附	与吹扫捕集和固相微萃取联用,用于挥发性分析物的浓缩;快速加热吸附剂,通过吹扫气体将浓缩的分析物转移到 GC 中。	典型的固体吸附剂包括 Tenax TA、玻璃微珠、Carbosieve、Carboxen 和 Carbotrap。根据特异性、穿透体积、水亲和性、柱床体积,以及可吸附/脱附的有机物范围来选择吸附剂;吸附剂应能够进行低温冷却以捕集挥发性有机物。
直接热萃取	动态顶空的一种,但是样品会被(受控制地)加热到更高的温度(高达 350 °C)。	系统必须由熔融石英制成,避免萃取的分析物与高温金属表面发生反应;应避免出现系统冷点;主要用于半挥发性化合物。
热裂解	非挥发性大分子样品(如聚合物、植物纤维)通过热降解使化学键断裂生成更小的、挥发性更高的分子,然后被吹扫进入 GC 或吸附阱(低温)进行分离和鉴定。	降解通常有其明确的机制,样品的裂解方式也是可预测的;可生成原始化合物的结构信息,或者用于谱图比较的“指纹图谱”;热裂解可在惰性气体或反应性气体环境中进行。
固相微萃取(SPME)	涂覆了聚合物固定相的熔融石英纤维被置于样品上方,或直接浸入液体样品;分析物将扩散并分配/吸附到固定相上;将纤维放入 GC 进样口即可对分析物进行热脱附,或使用液体将其洗脱进入色谱柱进行 HPLC 分析。	SPME 是一种平衡采样方法,可用于气体、固体(顶空采样)和液体(直接采样);有多种聚合物涂层可供选择(例如聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚丙烯酸酯、Carbowax-二乙烯基苯、Carboxen-PDMS);它可处理小型样品,方便携带,不使用任何有机溶剂;但有时可能会损失挥发性非常强的分析物,从而使定量出现问题。

对于易分解、热不稳定，或者在气态下易于吸附到金属表面的挥发性分析物，有时采用 HPLC 的分析效果更好。采用 HPLC 分析气体样品必须进行样品捕集。对于气体样品，我们可以：(a) 使其通过固体载体，然后使用可溶性液体进行洗脱；或者 (b) 将其通入可捕获分析物的液体。气体样品 HPLC 分析的一个实例是用于分析挥发性醛类和酮类的美国材料与试验协会 (ASTM) 方法 D5197-03，以及美国国家环境保护局方法 TO-11^{1,2}。在该实例中，空气样品通过涂覆了 2,4-二硝基苯肼的吸附阱，它可以将醛类和酮类定量转化为 2,4-二硝基苯腙。然后使用乙腈将这些 2,4-二硝基苯腙洗脱下来，并采用反相 HPLC 进行分离。

固体样品的前处理方法通常要求更加严格。固体（或半固体）样品通常必须制成液体形式，除非我们仅需要分析样品中的挥发性组分，在这种情况下，可使用顶空、吹扫捕集，或者热解吸技术（请参阅第 6 章）进行分离（或可能是浓缩）样品中的该部分组分。在某些情况下，样品很容易溶解，接下来即用于进样或进一步的前处理。在其他情况下，样品基质可能不溶于一般溶剂，这时我们就必须将分析物从固体基质中萃取出来。还有一些情况下，由于夹杂或吸附，分析物不容易从不溶性基质中被萃取出来。如果我们的目标分析物是固体样品中可用溶剂萃取的部分，就可以采用液-固萃取、超临界流体萃取、微波辅助萃取、索氏提取，或者加压流体萃取法（请参阅第 14 章）。在这些方法中，固体材料暴露于溶解性液体或超临界流体（通常为二氧化碳，一般都会添加甲醇等极性溶剂）中，有时还会加热和/或加压。最终溶于液体的样品组分应全部或部分浸出自样品。显然，样品的孔隙越多，固体样品研磨得越细，其中的组分就越容易萃取。

如果整个固体样品都需要分析，我们就需要采用更强的溶出技术或溶剂。例如，岩石样品或金属样品可能需要使用强酸进行分解以实现完全溶解，然后再进一步处理液化的样品，以分离出目标组分。**表 2.2** 列出了从固体样品中萃取分析物的一些传统方法，**表 2.3** 列出了最近出现的一些其他的样品前处理方法。定量萃取出所需分析物后，后续的液体馏分或直接进样到 HPLC 或 GC 仪中，或进行进一步的前处理。第 14 章详细介绍了固体样品的萃取，第 16 章则介绍了固体和半固体生物样品（例如组织）的萃取。

表 2.2

传统的固体样品前处理方法		
样品前处理方法	技术原理	注释
固液萃取	将样品置于封闭容器中，加入溶剂溶解/萃取/浸出目标分析物；通过过滤（有时称为“振荡/过滤”）分离。	有时可将溶剂加热至沸腾或使其回流以改善溶解性；需将样品处理为微小颗粒以辅助浸提；可通过手动或自动方式振摇样品；通过过滤、倾倒或离心进行。
索氏提取	将样品置于一次性的多孔容器（提取管）中；使不断冷凝回流的新鲜溶剂流过提取管并溶解分析物，持续地将分析物收集到烧瓶中（请参阅第 14 章）。	使用纯溶剂进行提取；样品在溶剂的沸点温度下必须稳定；提取过程缓慢，但可实现无人值守运行，直至提取完成；低成本；尤其适用于可自由流动的粉末；优异的回收率（是其他固相萃取方法回收率的比较标准）。
均质	将样品置于搅拌器或机械均质器中，加入溶剂，然后进行均质，直至样品成为微小颗粒；转移溶剂用于下一步处理。	适用于动植物组织、食品和环境样品；可使用有机或水性溶剂；可加入干冰或硅藻土增强样品的流动性；样品颗粒越小、越分散，萃取效果越好。
超声	利用超声在已处理成微小颗粒的固体材料表面产生强力震荡；直接方法：将专门设计的惰性声学工具（扬声器或探头等超声波发生器）直接放置到样品-溶剂混合物中；间接方法：将装有样品和溶剂的样品容器浸入超声水浴中进行超声处理。	超声处理有助于样品溶解；可通过加热提高萃取效率；安全；快速；尤其适用于粗颗粒物；采用间接法时可同时萃取多个样品；样品能够与溶剂充分接触。
溶解	使用溶剂处理样品，直接将样品变为溶液，该过程可能发生也可能不发生化学变化。	无机固体（例如矿物、金属）需要进行酸消解或碱消解以完成溶解；有机样品通常可直接溶于溶剂中；生物样品可能会溶解不完全；多种类型的样品都需要在溶解后进行过滤。

与气体或固体样品相比，用于色谱分析的液体样品更容易制备。

表 2.3

固体样品的现代萃取方法		
样品前处理方法	技术原理	注释
加压流体萃取 (PFE)/加速溶剂萃取 (ASE)	样品被置于一个封闭容器中并被加热到其沸点温度以上，使容器中的压力升高；将萃取的样品转移到样品瓶中以待进一步处理。	显著提高了液固萃取过程的速度；可实现自动化；所用容器应能承受高压；萃取所得的样品经过了稀释，需要进一步浓缩；由于使用了超压高温溶剂，要有相应的安全措施。
自动索氏提取	热溶剂浸出与索氏提取的结合：首先将装有样品的提取管浸入沸腾溶剂，然后拉升提取管，进行传统的索氏提取/回流溶剂冲洗，最后进行浓缩。	有半自动和全自动方法可供选择；与传统的索氏提取相比，溶剂用量更少；对溶剂进行回收利用；两步法缩短了提取时间。
超临界流体 (SF) 萃取	样品被置于流通式的容器中，超临界流体（例如 CO ₂ ）穿过样品；减压后，萃取的分析物被收集在溶剂中或捕集在吸附剂上，然后通过溶剂进行脱附。	既可手动操作也可实现自动化；可通过改变 SF 的密度（改变温度和/或压力）和加入溶剂改性剂来改变 SF 流体的“极性”；收集的样品通常经过了浓缩，并且萃取后通过挥发去除了 CO ₂ ，因此相对来说不容易发生污染；基质会影响萃取过程，因此方法开发的时间可能比其他现代方法更长。
微波辅助萃取	将样品置于开放或封闭容器的溶剂中，采用微波对其进行加热，使温度升高，萃取出分析物。	萃取溶剂的范围可从微波吸收 (MA) 到非微波吸收 (NMA)；使用 MA 时，将样品置于高压容器中并加热到远高于其沸点的温度（与 PFE/ASE 中的操作相同）；使用 NMA 时，容器中放置了微波吸收装置，因此溶剂被间接加热；针对微波炉中的有机溶剂 (MA/NMA) 和 MA 样品的高压采取一定的安全措施。

(接转下页)

固体样品的现代萃取方法

样品前处理方法	技术原理	注释
气相萃取	达到平衡之后，分析物将以恒定的比例分配到气相和固相中；静态顶空：在固体样品上方采集挥发性物质；动态顶空（吹扫捕集）：采用惰性气体不断顶空吹扫样品采集挥发性物质，通过固体介质捕集分析物，然后热脱附到 GC 中；在样品与气流之间增加一层选择性膜可提高采样的特异性。	适用于固体样品中挥发性分析物的顶空技术；可通过加热（通常 <100 °C）样品来加速挥发；有时可加入水或溶剂以辅助样品分散和/或使基质中的有机物变为游离态（尤其是对于土壤和沉积物样品）；静态和动态顶空技术均已实现了自动化；动态顶空技术灵敏度更高；可通过微波方式加热。
基质固相分散 (MSPD)	该技术采用键合相载体作为破坏样品基质结构的磨料，在混合样品的过程中，它还能作为“结合”溶剂辅助样品彻底分解。	将约 0.5 g 固体或粘性样品连同约 2 g SPE 吸附剂（例如 C18）一起置于研钵中，混合均匀；有时需加入溶剂辅助萃取；将混合物转移至纯化小柱并进行溶剂洗脱，有时还需在进样前通过 SPE 层进一步纯化；一种“固-固”萃取方法。

许多 HPLC 分析都基于“稀释-上样”流程，通过稀释降低溶解的分析物的浓度，以避免色谱柱过载或检测器饱和。通常，直接将液体样品进样到气相色谱仪中即可分离和检测挥发性化合物。在某些情况下，液体样品中的非挥发性化合物会在进样器、保留间隙管或者色谱柱柱头上沉积。我们需要采用特殊的 GC 条件来去除或消除发生这些情况的可能性。

表 2.4 列出了液体和悬浮液的常用样品前处理方法的概述。

表 2.4

液体和悬浊液的典型样品前处理方法		
样品前处理方法	技术原理	注释
固相萃取 (SPE)	与 HPLC 类似, 将样品加载到填充了固定相的萃取柱上, 并让液体通过萃取柱, 柱中填充的固定相可以选择性地去除分析物(或干扰物); 使用强溶剂可洗脱分析物; 在某些情况下, 干扰物将保留在固定相上, 分析物则会通过固定相, 不被保留(第 9 章)。	有多种固定相可供选择性地萃取您所需的无机、有机和生物分析物; 还有专门用于滥用药物、糖类、儿茶酚胺、金属离子、水中的痕量富集物, 以及许多其他种类化合物的固定相。
液液萃取	样品在具有最大溶解性差异且不相溶的两相间进行分配; 然后从其中一相中回收不含干扰物的分析物(第 7 章)。	小心乳浊液的形成 — 可通过加热、添加盐类等方法破乳; 使用不同的溶剂或添加剂(例如可调节 pH 的缓冲液、可调节离子强度的盐类、络合剂、离子对试剂等)可优化 K_D 值; 已有许多方法见诸文章; 对于低 K_D 值的样品可进行连续萃取。
稀释	使用与 HPLC 流动相或 GC 固定相兼容的溶剂稀释样品; 可避免色谱柱过载, 还可降低溶剂强度, 或将输出信号维持在检测器的线性范围内。	为了避免色谱峰过度展宽或变形, 稀释溶剂应能够与 HPLC 流动相互溶, 并且最好比 HPLC 流动相的极性更弱; “稀释-上样”法是一种适用于简单液体样品(例如药物制剂)的典型样品前处理方法; 采用 GC 分析时, 应避免使用太强或不兼容 GC 的溶剂, 以保护涂层固定相。
蒸发	常压下, 温和地加热样品并通入流动的空气或惰性气体去除液体; 低挥发性的液体, 可在真空下进行。	蒸发速度不宜太快; 爆沸会损失样品; 注意避免样品残留在容器壁上造成损失; 干燥时不要过度加热; 最好在惰性环境下(例如 N_2 中)进行; 最好采用旋转蒸发器; 有自动化的蒸发系统可供选择。
蒸馏	将样品加热到溶剂沸点, 然后冷凝和收集蒸气中的挥发性分析物。	主要用于易挥发的样品; 加热过度, 某些样品可能会分解; 对低蒸汽压的化合物, 采用真空蒸馏; 水蒸气蒸馏比较温和, 因为它能达到的最高温度仅为 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 。
微透析	将半透膜置于两种水性液相之间, 分析物就会根据浓度差异从一种液体迁移到另一种液体中。	需要采用 SPE 等富集技术来浓缩透析液; 微透析可用于检测活体动植物组织和发酵液中的胞外化学物质; 它可与微量液相色谱柱配合使用进行在线分析; 分子量截留膜的透析方法还可用于 HPLC 分析前在线去除蛋白质; 超滤和反渗透也有类似应用。

(接转下页)

液体和悬浊液的典型样品前处理方法

样品前处理方法	技术原理	注释
冻干法	冷冻水样，然后在真空下升华去除水分。	适用于非挥发性有机物；可处理大体积样品；可能会造成挥发性组分的损失；有利于热不稳定性物质（尤其是生物样品）的回收；可以浓缩无机物。
过滤	液体通过纸质、膜质过滤器或者 SPE 小柱/萃取盘，去除悬浮颗粒。	强烈建议使用该方法以避免 HPLC 出现背压问题出现并保护色谱柱；切勿让颗粒进入毛细管气相色谱柱（第 5 章）
离心	样品置于锥形离心管中，在高离心力下离心（数千到数十万倍重力）；倾出上清液。	离心是过滤的替代方法，用于去除颗粒；简单颗粒的去除一般不需要使用超速离心法。
沉降	样品在沉降池中静置时会发生沉降；沉降速率取决于斯托克斯半径。	过程非常慢；需要根据沉降速率手动回收不同浓度下不同大小的颗粒。
固相萃取 (SPME)	见表 2.1	见表 2.1
搅拌棒吸附萃取 (SBSE)	与 SPME 类似，不同之处在于其相比率更高；磁力搅拌棒通常装在玻璃容器中，其表面涂覆了一层聚合物固定相。将带涂层的搅拌棒置于液体或半流体样品中，分析物就会扩散并分配/吸附到固定相上；然后将搅拌棒从样品中取出并干燥。接下来，和 SPME 一样，采用特殊的脱附装置对分析物进行热脱附用于 GC 分析，或采用适合的溶剂洗脱分析物用于 HPLC 分析。	SBSE 也是一种平衡采样方法，但是由于带涂层的搅拌棒上附着更多的吸附剂，该技术的吸附容量（以及因此可获得的灵敏度）可超过 SPME 技术好几个数量级；SBSE 方法需要使用专门的大体积热脱附装置，而 SPME 则使用 GC 进样口进行热脱附。该技术比 SPME 更难实现自动化。

参考文献

1. *Compendium Method TO-11A: Determination of Formaldehyde in Ambient Air Using Adsorbent Cartridge Followed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, Center for Environmental Research Information, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, **1999**
2. Schneider, S., *Analysis of DNPH-Derivatized Aldehydes and Ketones Using the Agilent 1220 Infinity LC System with Diode Array Detector*（使用配备二极管阵列检测器的 Agilent 1220 Infinity 系统分析 DNPH 衍生的醛类和酮类），安捷伦应用简报，出版号 5991-1545EN，**2013 年**

采样的常规注意事项

分析周期的第一个阶段是采样（见**图 1.1**）。采样的目的是从一批原始样品中取出一部分质量或体积的样品，而原始样品既有可能是均质的，也有可能是混杂的。初级采样就是选择和收集待分析样品的过程。乍看之下，气体和液体的采样似乎非常容易，而固体采样则是一项棘手的任务。已有不少专著介绍了采样过程的理论和实践，以及如何收集到统计学上具有代表性的样品¹⁻⁴。初级采样的理论和方法并不在本章的讨论范围内，但它毋庸置疑是分析中最容易被忽略的误差来源之一。

遗憾的是，有时采样由那些缺乏正确采样技能的人员完成，实验室的分析化学家并未直接参与该过程，却要使用提供给他们们的样品进行准确、高精度的分析。在过去的几十年中，采样的理论和实践教育被严重忽视，尤其是对于那些非分析化学家。

采样方案最好是作为整体分析的一部分进行细致周密的开发。同样重要的是，在贯穿样品收集到报告生成的整个分析过程中，样品信息流都应和样品流相对应。例如，可以在收集样品时就开始样品追踪，并将它作为整个分析过程的一部分。必须通过适当的手段来识别收集到的初始样品（例如使用手写标签，应用可自动识别的条形码，用不褪色墨水标记样品容器，结合应用RFID设备，或者其他的记录手段等），以确保后面阶段的样品处理能够明确地追踪到初始样品。同样地，分析过程的每个阶段也都必须进行适当的样品和子样品追踪，以确保满足优良实验室规范（GLP）的要求。

样品运输和储存

一旦获得了初始样品，就必须将其送至分析实验室，且应确保它不会发生任何理化性质的改变。乍看之下，这似乎是一项无足轻重的简单任务，但如果待研究样品是动态的实体（例如含有挥发性、不稳定性，或反应性材料的样品），样品的运输就变得极具挑战性，尤其是在实验室与样品收集地点距离很远的情况下。即使我们获得了具有代表性的初级样品，运输过程中的样品变化也会使二级采样变得非常困难。采用相应的保存技术可尽量减小样品收集和分析之间可能产生的任何变化。通过采用适当的保存技术，可将发生吸附、扩散和挥发等物理变化，以及氧化和微生物降解等化学变化的可能性降至最低。样品收集到实验室样品前处理之间可以使用的保存技术实例包括：

- 选择适当采样容器
- 添加抗氧化剂和抗菌剂等化学稳定剂
- 冷藏或冷冻样品以避免热降解
- 样品在固相上的吸附情况

样品被带入实验室之后，在分析前将其储存于适合的条件以保持其完整性与样品前处理同等重要。热不稳定或挥发性的样品应保存在密封容器中，并在冰箱或冷冻箱中储存。液体样品直至分析前都应保存在阴凉避光处（避免阳光照射）。容易发生氧化或其他化学反应的样品在进一步的样品处理和/或分析之前应储存在真空干燥器中。

如需了解更多信息，参考文献 4-7 介绍了挥发性样品的采样和样品前处理，参考文献 5-7 介绍了水、空气和土壤样品的采样和样品前处理，参考文献 5、8 和 9 则介绍了生物样品的采样和样品前处理。通常，准备好的实验室标准品、替代样品以及空白样品必须参与整个保存、运输和存储过程，以确保整个过程保持了样品的完整性。近年来，工业和环境分析领域均呈现出样品分析过程越来越靠近采样或处理过程的趋势。例如，在目标地点的环境样品筛查中，便携式现场分析仪器的应用越来越广泛。同样地，分析测量方法向现场测量或在线检测的转变，可能会对未来的样品收集和样品分析产生深远影响。

参考文献

1. Svarc-Gajic, J. (Ed.) *Sampling and Sample Preparation in Analytical Chemistry, (Chemistry Research and Applications: Chemical Engineering Methods and Technology)*, Nova Science Pub Inc., Hauppauge, NY, **2011**, ISBN-10: 1621002691 and ISBN-13: 978-1621002697
2. Gy, P. *Sampling for Analytical Purposes*, Wiley, NY, **1998**, ISBN-10: 0471979562 and ISBN-13: 978-0471979562
3. Pitard, F.F. *Pierre Gy's Sampling Theory and Sampling Practice, Heterogeneity, Sampling Correctness, and Statistical Process Control*, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, **1993**, ISBN-10: 0849389178 and ISBN-13: 978-0849389177
4. Stoeppler, M. (Ed.) *Sampling and Sample Preparation: Practical Guide for Analytical Chemists*, Springer, NY, **1997**, ISBN-10: 3642644864 and ISBN-13: 978-3642644863
5. Pawliszyn, J. (Ed.) *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*, Academic Press, Waltham, MA, **2012**, ISBN-10:0123813735 and ISBN-13: 978-0123813732
6. Stoeppler, M. (Ed.), *Sampling and Sample Preparation: Practical Guide for Analytical Chemists*, Springer, Berlin, Germany, **2011**, ISBN-10: 3642644864 and ISBN-13: 978-3642644863
7. Pawliszyn, J. *Sampling and Sample Preparation in Field and Laboratory, Volume 37: Fundamentals and New Directions in Sample Preparation*, Elsevier Science, San Diego, CA, **2002**, ISBN-10: 0444505105 and ISBN-13: 978-0444505101
8. Ivanov, A.R.; Lazarev, A.V. (Eds.) *Sample Preparation in Biological Mass Spectrometry*, Springer, New York, **2011**, ISBN-10: 9400707584 and ISBN-13: 978-9400707580
9. Venkatesh Lyengar, G.; Subramanian, K.S.; Woittiez, J.R.W. *Elemental Analysis of Biological Samples: Principles and Practices*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1997**, ISBN-10: 0849354242 and ISBN-13: 978-0849354243

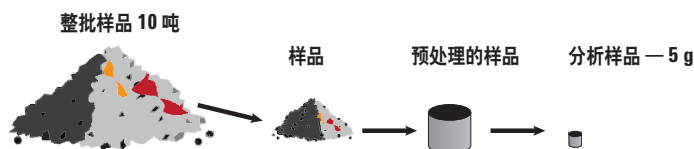
固体材料的采样和样品处理

如前文所述，采样过程极为重要，因为它能确保实际进样到色谱仪中的样品能够真正代表从现场、生产线、患者体内或空气中收集到的原始样品。本章中将提供采样过程的基础回顾，并讨论将样品制备为适于分析的形式可采用的各种方法。

采样

现实中的大多数固体材料都是异质的。几乎在所有分析中我们都需要获取具有代表性的固体材料样品，这样才能得到固体材料组成的满意答案。此类材料的合理采样是分析化学中极为重要的一个研究领域。如果一开始获得的样品就不具有代表性，随后的分析结果将是无效的，无论实验工作开展得多么仔细。如图 4.1 所示，怎样才能使分析所用的少量固体样品能够代表大量不均匀的整体样本？有两种方法：1) 取极少量的固体材料并将它们混合来代表整体样本，或者 2) 取数量足以代表整体样本组成的样品量，并将其研磨为均匀的粉末。对于第一种方法，从统计学方面来看，要获得具有代表性的样品比较困难，因为要获得足以代表整体材料的代表性样品，必须先获取数量极小的小型样品，而这一过程需要花费很长的时间。第二种方法是获取代表性样品最常用的方法。在质量减小操作阶段，样品中的每个颗粒进入次级采样样品中的概率都应该是相同的。明确的采样方案对于确保从初始样本中获取最佳样品极为重要。本节将介绍用于减小固体材料粒度的各种技术。

图 4.1



最终用于分析的样品必须能够代表初始批次的样品

减小粒度

我们通常需要将固体样品处理为微小颗粒的原因包括：

- 如果经过仔细混合，经细致研磨的样品会更加均匀，次级采样就能获得更具有代表性的样品，且采样的精密度和准确性更高
- 由于表面积更大，经细致研磨的样品溶解速度更快，也更容易萃取

表 4.1 介绍了减小粒度或研磨固体样品的常规方法。根据样品粒度的不同，有时我们还需要首先进行粗略的粒度减小操作，然后再进行精细的粒度减小操作。例如，将一堆胡萝卜切为足够小的小块，放入实验室搅拌器中搅拌为半固体的微粒，就是减小软质样品粒度的一种非常简单的方法。当材料更硬及初始粒度更大时，就需要使用破碎力度更强的方法。这类样品更适合采用实验室破碎仪、磨粉机、粉碎机和研磨机。粒度减小设备的选择取决于下列参数：

- 基于硬度区分的材料类型（硬质材料的莫氏硬度值，或者组织、塑料、植物材料、纸和皮革等样品的柔软度）
- 初始粒度（例如块状或粉末）
- 最终要达到的粒度（例如毫米级或微米级）
- 所需的样品数量或通量
- 可能影响后续分析的污染物

表 4.1.

减小固体样品粒径的方法	
减小粒径的方法	样品精细化是如何进行的
混合	使用机械搅拌器将半软性材料分割成小块；还可将不均匀样品混合成更均一样品。
切断	将样品机械化切割成小块的过程。
压碎*	碳化钨可变速颚式破碎机能够将大型硬质样品破碎成粒径较小的颗粒。
切割	切割粉碎机能够减小软质到中等硬度物质的粒径（粒径小于 100 μm）。
研磨*	手动和自动研钵与研杵是最常用的；可采用湿法研磨和干法研磨；能够获得粒径约 10 μm 的颗粒。
均质化	通过破碎和混合样品，使样品质地更均匀、更具一致性的过程。
浸渍	用撕扯、切断、切割等手段将软性物料分解成更小部分的过程。
碾磨*	使用盘式研磨机，物料通过旋转盘和固定盘之间可调节的间隙投放，直径小于 20 mm 的硬质样品通常可被粉碎到直径 100 μm。高速旋转粉碎机结合了冲击和剪切过程，可将软到中等硬度和含纤维的原料粉碎至 80 μm；球磨机使用玛瑙球、碳化钨球或带 PTFE 涂层的不锈钢球，并通过离心作用或行星齿轮作用的高能量研磨将原料粉碎至亚微米级；土壤粉碎机通过转动尼龙刷将样品抛向室壁，温和粉碎土壤、污泥、粘土及类似的干燥样品。
切碎	通过撕裂、切断、切割、切块等方式将肉类或蔬菜产品分解成更小部分的过程。
挤压	通常情况下，从半固体物质（如，植物、水果、肉类）中挤压液体的过程。
粉碎*	用电机驱动棒或振荡器来粉碎湿样或干样；可用带液氮的冷冻球磨机 N ₂ 处理有韧性的样品或玻璃化转变温度较低的样品。
筛分	将样品通过横截面积相同（3 μm - 123 μm 的正方形孔）的金属或塑料筛网，使颗粒分离成统一大小的过程；可采用湿法筛分和干法筛分。

*机械装置产生的大量热量和高剪切力，可能破坏某些样品（例如聚合物）完整性，从而导致分子量降低。

另一个需要做出选择的是减小样品粒度的操作应连续进行还是分批次进行。当然，该选择在一定程度上取决于初始样品的粒度，但是在某些情况下，下游的连续分析测量决定了必须使用连续的粒度减小操作。大多数的粒度减小技术都是在样品干燥的状态下操作的，但是对于某些样品（例如那些在研磨过程中易结块，或晶体结构可能会因为热效应而改变的样品），可以选择湿法（或浆法）研磨。这两种粒度减小操作是在有水或其他液体存在的条件下进行的。很明显，湿法研磨中的液体绝不能引起样品的任何化学或理化性质改变。湿法研磨通常不如干法研磨方便，它耗时更多，并且需要使用防漏的研磨容器。有时某些添加剂（例如干肥皂、表面活性剂和石墨）可辅助研磨过程。在一些特定的应用中，我们甚至可以使用特殊的研磨料、润滑剂和黏合剂混合物作为助磨剂。

由于所有的粒度减小操作多少都会涉及研磨过程，因此研磨工具的污染问题一直都是一个威胁。选择合适的研磨材料是我们必须作出的一项重要决定，所选材料的表面应具有与样品类似的组成，或者不会对分析造成干扰。用于制造粒度减小工器具的典型材料包括不锈钢、碳化钨、玛瑙、烧结氧化铝、硬质瓷和氧化锆。显然，我们应选择表面硬度大于样品硬度的工器具，这样可将样品污染降至最低。研磨工具的耐磨性对于其抗磨损性能很重要。研磨过程完全不损失微量样品是不可能的，因为一些材料会黏附到研磨工具表面。这些材料会在清洗过程中损失，除非在研磨之后清洗研磨工具表面，并回收清洗液中悬浮的固体颗粒。

粒度减小设备的相关细节信息不在本节范围之内。读者可参阅有关该主题文献¹⁻³和制造商文献。该领域最为活跃的公司包括莱驰科技（德国哈恩）、Spex SamplePrep（美国新泽西州麦塔成）、Fritsch（德国伊达尔奥伯施泰因）和标乐公司（美国伊利诺伊州布勒夫湖）。

减小粒度的实际操作

如果样品中含有热不稳定性或挥发性化合物，尽量减少研磨过程中的发热非常重要。有时，为了在研磨过程中保持样品冷却，可以在研钵或球磨机中直接加入干冰。请注意，制备干冰的二氧化碳应不含可能会污染样品的杂质。某些球磨机配备了冷却模块，可在研磨过程中进行冷却液循环。如前文所述，当需要低温来固化样品时，可在液氮的条件下在冷冻球磨机中磨碎样品。然后对材料进行过筛，使其进一步分散，获得更均匀的样品。

针对空气敏感的样品，一些磨粉机可配备外壳，使我们能够在研磨期间引入惰性气体。如果研磨材料可用于真空条件，有些磨粉机的研磨过程还可在真空条件下进行。

破碎岩石和其他坚硬样品的设备必须配备大功率马达，并利用旋转叶片、转子、转轮、皮带和齿轮的机械增益来完成减小样品粒度的任务。因此，这些设备通常都有安全隐患，操作时必须非常小心，尤其是将样品投入进料斗时。制造商已经在努力制造安全的产品，尽量避免操作者暴露在危险的环境中。大多数设备的门和盖子都配备了安全联锁装置，并且安装了安全开关，用于避免门在开启时意外启动或在运行状态下被打开。离心设备通常都配备了内置的电子制动器，一旦关闭设备，马达立即减速。研磨罐/钵及其支架通常采用夹钳固定，以防止它们在研磨过程中松动。

灰尘是另一项潜在危害。由于研磨和磨碎过程会产生微米和亚微米级的碎粒，而这些材料微粒可能会进入空气。微米级的颗粒尤其危险，因为它极易被人吸入并停留在肺中。通常制造商都会建立各种保护装置，例如捕集阱、过滤管，以及在可能生成灰尘的区域上方加盖。避免研磨、磨碎等工具表面造成的微粒损失同样非常重要。为了回收这些微粒，我们可能需要对工具表面进行冲洗。

使用实验室破碎机、磨粉机、粉碎机和研磨机处理硬质材料时，应采用少量进料的方式，而不要一次性投入所有样品，以防止驱动马达过载。为了防止设备损坏，大多数现代粒度减小设备都配备了过载保护电路。

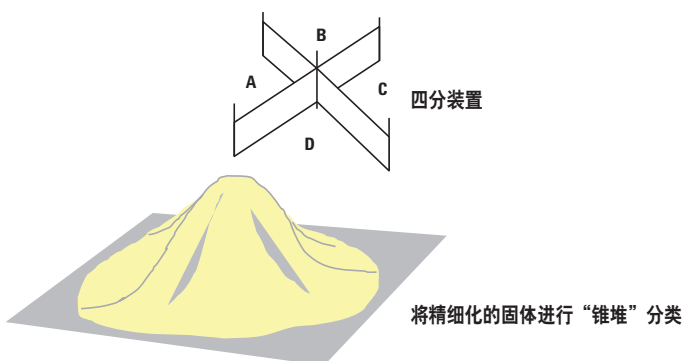
二级采样和样品尺寸缩减

样品研磨并混合好之后，我们可能还需要将它们进一步细分，以进行接下来的检测、评估或分析。为此，我们需要确保采样部分保持与初始样品相同的完整性。实施粒度减小操作之后，会出现另一个问题。虽然粒度相对均匀，但样品量可能会过多。采用前文所述的处理方法均有可能出现这种情况。无论我们实验室样品的来源和采样过程如何，一个常见的问题是样品量可能会多达数十、数百，甚至数千克。而我们所采用的分析技术只能分析十分之一克到几克的样品，因此必须进一步缩减样品尺寸。

样品尺寸缩减有时被称为缩分。正如我们已经提到的，通过采样获取真正具有代表性的样品用于分析一直以来都是得到准确且有用的信息的基础。在对采样和分析过程进行统计分析时，理解该步骤的重要性非常关键。当然，我们很少需要对材料的复杂分布进行详细的统计分析，但如果遇到这种情况，参考文献 1-3 可提供有用的研究出发点。分析人员面临的挑战是要在样品的粒度、密度，或者任何其他特性都不被歧视情况下对样品进行缩分。

堆锥四分法是样品尺寸缩减量最古老的方法之一。如图 4.2 所示，从一个固定的位置将已经处理为微小颗粒的固体样品倾倒在洁净的平面（塑料片）上，材料在中央处形成一个圆锥，颗粒从每个侧面均匀滑落，而无偏差。然后将四分装置从圆锥的最高点处向下按压，使其穿透圆锥，直至其到达下方的平面：

图 4.2
堆锥四分法



使用四分装置时，同样地，为了避免出现偏差，应保留对角区域的样品（例如 A 和 C），而舍弃它们之间的区域（B 和 D）。合并 A 部分和 C 部分，然后重复进行堆锥四分法过程，通常重复数次，直到获得足够用于最终分析的样品为止。

目前已经有广泛用于样品缩减的机械设备，其克服了之前相关难题。最常用的设备称为缩分器。缩分操作包括使用由分配槽组成的机械设备将自由流动的样品分离为几个等份。这些设备中构造最简单的是固定缩分器，但也有更复杂的设备。堆锥四分法和缩分器法都非常有效，但很繁琐。因此，人们开发出了自动化的实验室分样器（例如直线采样器或旋转缩分样品分样器等分样设备），用于将粒状粉末样品分为质量和数量完全相同的等份。这些实验室分样器通过重复分配和合并样品来完成该过程。通过这种方式，样品中的每个颗粒到达任意一个收集通道的几率都是相等，从而实现了真正的样品缩分。如需了解有关这些设备的更多信息，请参阅参考文献 1-3 和制造商的文献。

进一步减小粒度和分级

样品被粉碎并研磨为小颗粒之后，可能需要对研磨样品中的这些颗粒进行进一步分类。最常用的粒度筛选设备是机械筛，它以目数或正方形孔的尺寸（以毫米为单位）分类。这些颗粒通过一系列目数不同的筛进行分离。筛的目数决定了筛孔的直径。目数大的筛筛孔直径更小，也更细。如果您的样品全部通过了特定目数的筛，您可以确定样品中没有比由该目数所决定的直径更大的颗粒。如果您需要使样品颗粒恰好能够通过特定目数的筛而无法通过更大目数的筛，就必须再次研磨样品，直至它能全部通过。标准筛都是金属制的（全黄铜、不锈钢筛网/黄铜框架，以及全不锈钢），形状为圆形，但具有不同的直径。高耐受性的精密电铸筛是更优的选择，但它比标准筛贵很多。不会引入金属杂质的非金属筛（例如尼龙筛）也是一种选择。

可采用干法筛分和湿法筛分。喷水筛分设备可以将水喷入堆放的每个筛中，可使用标准试验筛实现快速分筛。对于粒度低至 5 μm 的极小颗粒，可在超声筛分装置中使用水或溶剂进行湿法筛分，这种装置能够轻柔地对颗粒进行有效的分筛，而无需进一步研磨。自动化的振筛仪简化了筛分过程，并且已有多种型号的商品化产品。

采样误差、采样馏分和粒度

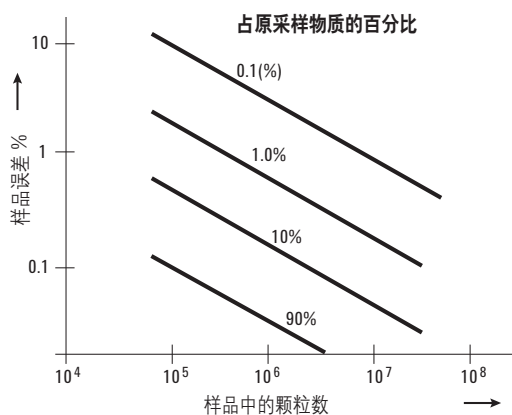
采样过程最关键的一点是要在减小粒度之后获得具有代表性的样品。但是我们如何才能知道所分析的样品具有代表性呢？唯一能够提供确切答案的方法是取大量样品进行重复分析，考察每次分析是否都能在实验误差范围之内或者在统计学意义上的某一可接受水平获得相同的答案。有时我们必须这样做，但通常这种处理方法非常费时费力，且成本较高。

为了保证采样具有整体有效性，我们应确保采样操作在可接受的限度之内。图 4.3⁴⁻⁵ 为我们供了所需的采样量指导。

图 4.3 所传达的第一条信息是一个常识，但这个过程不容忽视。对应于采集用于分析的原始样品的百分比用实线表示，清晰可见，采样量越大，采样误差就越小。由于我们不能使用数千克、很多克（哪怕是数百克）的样品进行分析，因此我们最多使用样品的 1.0%，甚至有可能是 0.1% 或更少。因此，我们必须顺应这些实线向右下降的规律，也就是说，尽量将样品研细，以得到最多的颗粒，从而在所用样品的百分比固定的情况下尽量减小采样误差。但“尽量研细”是指研磨到哪种程度呢？为了了解我们的样品数据处于图 4.3 的哪个位置，我们必须知道样品的粒度。理想情况下，我们必须自己测量其粒度，或者委托他人进行测定。或者，您所用的粒度减小设备的制造商能够提供适合您的样品和实验流程的粒度数据。知道粒度之后，我们就可以估计颗粒的数量和固定我们的数据在图 4.3 横坐标上的位置。接下来我们必须确定允许的采样误差，并获得对应的纵坐标值。这样我们就知道了应采用的采样百分比。

很显然，我们将时常需要进行权衡。如果采样误差是由于我们能够达到的最小粒度（最大数量的颗粒）引起的，而且该误差大得不可接受，那么我们就需要提升 2-3 倍的分析范围。换言之，为了彻底解决可能长期存在的问题，我们可以粉碎不同粒度的设备。或者，也可执行两次粒度减小操作（例如粉碎后再进行研磨）。图 4.3 所示的这类数据有助于我们了解样品尺寸缩减的限度，以便我们更好地控制结果。

图 4.3
采样百分比、颗粒数和采样误差⁴



干燥固体样品

送检的待分析固体样品常常是潮湿或湿润状态的。要实现可靠的分析，通常必须去除其中的水分和/或干燥样品直至其达到恒重。土壤等无机样品需要加热至 100-110 °C，以确保完全去除水分。疏水性的有机样品则很少需要加热处理，因为它们极少吸附水分。但是，固体有机样品可能会吸附有机气化物，而通过加热可以去除这些污染物。对于吸湿性或高反应活性样品（例如酸酐类样品），我们推荐在真空干燥器中进行干燥。在空气中加热会发生氧化的样品应在真空条件或氮气流下进行干燥。生物样品一般不应加热至 >100 °C，而且应避免使其高于环境温度，以免引起样品分解。敏感的生物化合物（例如酶）通常应在 <4 °C 的冷藏室中进行前处理，以尽量减少样品的分解。此类样品应始终维持这样的低温，直至 HPLC 分析步骤。冷冻干燥（冻干法）常被用于干燥热敏性样品（尤其是生物样品）以保持样品的完整性。冻干法的具体操作方法是首先快速冷冻样品，然后通过真空条件下的升华去除冻结的水分。

参考文献

1. Rhodes, M. (Ed.) *Introduction to Particle Technology*, 2nd Ed., John Wiley and Son, Chichester, U.K., **2008**, ISBN-978-0-470-01427-1 and ISBN-978-0-470-01428-8
2. Bhatt, B.; Agrawal, S.S. *Size Reduction and Size Separation, Pharmaceutical Engineering, NISCAIR National Science Digital Library* **2008**, URL: <http://nsdl.niscair.res.in/handle/123456789/750/revise+size+reduction.pdf>
3. Chen, B.; Nottingham, J.; Anderson, B.C. *Particle Size Reduction Studies on the Lab and Commercial Scale Using High and Low Energy Mills, American Pharmaceutical Review* **April 2012**, *15* (3)
4. Cross, R.F. *LCGC No. America* **2000**, *18* (5), pp 468-476
5. Hodges, R.J. *Analytical Sample Preparation – Problems for the Chemist*, presented to the Analytical Chemistry Group, Royal Australian Chemistry Institute, Melbourne, **June 1978**

过滤

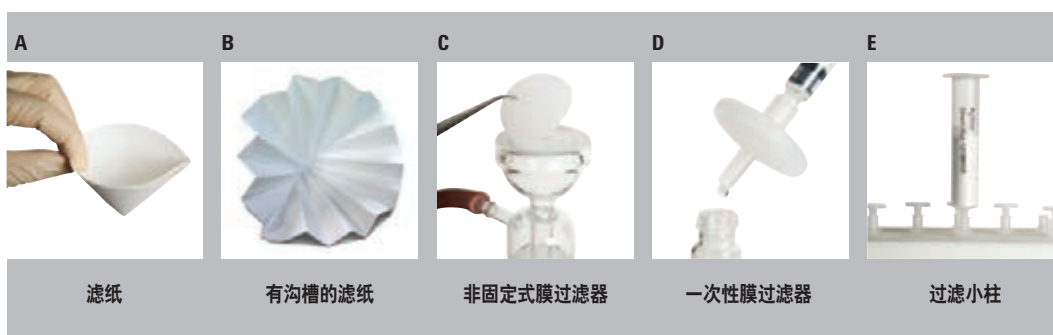
进样前应去除液体样品中的颗粒，因为它们会缩短色谱柱寿命。此外，颗粒还会对 HPLC 硬件（例如流路、旋转进样阀及进口滤芯）、GC 进样口、色谱柱和检测器造成不利影响。从样品中去除颗粒最常用的方法是过滤、离心和沉淀。**表 5.1** 列出了过滤的方法。

表 5.1

过滤介质	典型产品	推荐用途	注释
滤纸	纤维素	用于去除较大颗粒 (>40 μm)	当心滤纸纤维进入样品；确保滤纸的溶剂相容性
膜过滤器	再生纤维素、醋酸纤维素、尼龙、PTFE、聚丙烯、聚酯、聚醚砜、聚碳酸酯、聚乙烯吡咯烷酮	用于去除小颗粒 (>10 μm)	对于“脏”样品而言，可能需要使用预过滤器或深层过滤床以防止堵塞；最常用的孔径为 0.20 μm 至 2 μm ；避免溶剂不相容
专用膜	离子交换膜、亲和膜	可去除颗粒物质和基质干扰物	对于“脏”样品而言，可能需要使用预过滤器或深层过滤床以防止堵塞；避免溶剂不相容；主要目的是去除溶液中的生物分子
SPE 小柱	硅胶基和聚合物基		固定相颗粒可穿过小柱进入滤液；仅用于可萃取物较少的高纯度产物；当心堵塞
SPE 萃取盘	PTFE 膜和玻璃纤维膜		PTFE 膜容易损坏，需要小心操作；玻璃纤维萃取盘的结构刚性更大；可支持比小柱更高的流速通过大体积样品；当心堵塞

滤纸过滤法 (图 5.1A) 是一种相对直接的技术, 在该方法中, 半渗透性的滤纸屏障垂直于液流 (有时是气流) 放置。在实验室中, 我们通常将滤纸放置在过滤漏斗、赫氏漏斗或布氏漏斗中。滤纸的直径、形状和孔径多种多样。过滤介质的孔径越小, 滤液就越澄清, 但过滤所需时间也越长。真空过滤可以加速该过程。有沟槽的滤纸 (图 5.1B) 流速较快, 因为湿滤纸不会贴在过滤漏斗壁上。滤纸可根据其最终应用进行预处理。例如, 通过重量分析法对样品进行定量分析时, 需要使用无尘滤纸; 而分析对碱敏感的样品时, 则需要使用酸洗滤纸。

图 5.1
用于去除颗粒物质的常见过滤器类型



现在已经有了商品化的圆盘状膜过滤器 (图 5.1C), 它可以宽松地放置于商品化的过滤器支架/壳体中。但是, 大多数用户还是更喜欢配备 Luer 尖头或者微型尖头接头的一次性注射式过滤器 (图 5.1D)。这种过滤器的主体通常由医用级聚丙烯或聚碳酸酯壳体构成, 经过了伽玛射线杀菌, 并且可溶物含量极低。一些优级注射式过滤器甚至采用 LC 或 LC/MS 进行了产品批次测试, 以保证它们具有最高纯度。最新型的过滤器 (图 5.1E) 是过滤柱。在滤柱中, 滤膜位于注射器筒底部, 这种设置与常用的固相萃取装置类似 (请参阅第 9 章)。

使用注射式过滤器时, 将液体样品放入注射器中, 用较小的压力使样品通过滤膜。有多种材料、标称孔径和规格的滤膜可供选择, 相关技术参数请参阅制造商提供的产品使用说明。应根据样品的体积、溶剂类型, 以及需要去除的颗粒的大小来选择过滤器类型。

盘式膜过滤器具有更大的横截面积, 可提供良好的流动性, 并且能够将发生堵塞的可能性将至最低 (见表 5.2)。一般情况下, 大体积样品 (多达 50 mL) 选用直径 30 mm 的膜过滤器可得到很好的分离。滞留体积 (可能会在使用期间损失的滤液体积) 仅 50 μ L。对于体积较小的样品 (最多 30 mL), 可选用 25 mm 过滤器, 其具有中等横截面积 (3.5 cm^2), 滞留体积小于 50 μ L。对于更小体积 (最多 10 mL) 的样品, 我们强烈推荐选用滞留体积小于 10 μ L, 直径为 13 mm 的膜过滤器, 它是样品体积和滞留体积的最佳折衷方案。而对于那些体积少于 1 mL 的样品, 可使用 3 mm 过滤器。

表 5.2

直径 [mm]	样品量 [mL]	滞留体积 [μL]	有效过滤面积 [cm ²]
30	1-50	<50	5.1
25	1-30	<30	3.5
13	1-10	<10	0.75
3	<1	<7	0.0

对于大多数 HPLC 和离子色谱样品，我们推荐使用标称孔径为 0.20-2 μm 的过滤器。孔径值是近似值，膜的类型对过滤范围也有一定影响。样品过滤最常用的孔径是 0.20 和 0.45 μm。0.20 μm 孔径的滤膜可以去除极小的颗粒（以及大分子）。如果样品中含有胶体材料或大量微粒，则可能需要使用相当大的压力推动液体样品通过滤膜。有时，对于土壤萃取物或废水等类型的样品，我们需要在滤膜上方放置一个预过滤器或深层过滤床，以防止含有这类颗粒的样品堵塞滤膜。这类双层过滤器有时被称为二合一过滤器。

适用于大多数普通溶剂的典型高回收率膜过滤器材料包括再生纤维素 (RA)、醋酸纤维素 (CA)、硝酸纤维素、PTFE 和尼龙。再生纤维素是一种通用的过滤材料，因为它能够有效地用于水性和有机样品溶剂。它也是分析多环芳烃 (PAH) 和水溶性生物样品的理想选择。此外，由再生纤维素和醋酸纤维素等材料制成的膜过滤器具有极佳的样品过滤性能，且蛋白质吸附效应极低，用于生物样品时可获得出色的高蛋白质回收率。

我们通常使用离心过滤器对生物样品进行过滤。离心过滤器由带醋酸纤维素滤膜的聚丙烯离心管构成。血清、血浆或蛋白质样品经水相缓冲液稀释后在低速离心（最大离心力 16000 x g）的条件下由该过滤器过滤，可去除影响分析的颗粒物质。

选择滤膜时需要着重考虑的一点是其与溶剂的兼容性。滤膜制造商通常会提供有关其产品溶剂兼容性的详细信息和列表（表 5.3 就是典型的溶剂兼容性图表）。如果所使用的溶剂不合适，过滤器可能会溶解（或软化），滤液就会被污染。

表 5.3

膜过滤器的抗化学作用表					
物质	纤维素硝酸酯	醋酸纤维素	再生纤维素	尼龙 66	PTFE
1-己醇	+	+	+	+	+
1,4-二噁烷	--	--	+	na	0
乙酸, 10% 和 25%	+	0	+	--	+
丙酮	--	--	+	+	+
乙腈	--	--	+	+	--
脂肪烃	+	+	+	+	+
氨水, 1 M	+	+	+	+	+
芳香烃	+	+	+	na	+
苯	+	+	+	+	+
硼酸	+	+	0	0	+
四氯化碳	+	0	+	--	+
羧酸	+	+	+	--	+
氯乙酸	--	--	0	--	+
氯仿	+	0	+	+	0
环己烷	0	0	+	+	+
环己醇	+	+	+	+	+
二乙醚	0	0	+	+	0
二甲基甲酰胺	--	--	0	+	+
二甲基亚砷	--	--	0	na	+
乙醇 = 或 < 98%	--	+	+	+	+
乙酸乙酯	--	--	+	+	+
氯乙烷	0	0	+	+	+
乙二醇	0	+	+	+	+
甲酸, 25%	+	0	+	--	+
己烷	+	+	+	+	+
盐酸, 25%	+	+	+	--	+
异丙醇	+	+	+	+	+
甲醇	--	+	+	0	+
硝酸, 25%	0	0	+	--	+
戊烷	+	+	+	+	+
磷酸, 25%	+	+	+	0	+
磷酸, 45%	0	0	0	0	+
氢氧化钾, 1 M	--	--	0	--	+
盐溶液, 水溶液	+	+	+	+	0
氢氧化钠, 1 M	--	0	--	--	+
四氯乙烷	+	0	+	0	+
四氢呋喃	--	--	+	+	0
甲苯	+	+	+	+	+
三氯乙酸, 10%	+	--	--	0	+
三氯乙烷	+	0	+	0	+
三氯乙烯	0	0	0	0	0
二甲苯	+	+	+	+	+

图标

+ = 耐受性

-- = 不耐受

0 = 耐受性有限

na = 无数据

虽然更加昂贵的专用膜、固相萃取 (SPE) 盘和小柱的主要用途并不是样品过滤,但它们也能在去除化学干扰的同时去除样品中的颗粒。

在自动化的,尤其是高通量的实验室中,96孔流通过滤板是一种很常用的过滤器形式(见图 5.2)。这种形式的过滤器基本上是一个 8 x 12 的小型膜过滤器阵列,通常由聚丙烯制成。通常使用至少可同时处理 8 个孔的多通道移液枪上样。针对分析通量极高的情况,自动化 x-y-z 液体处理工作站的 96 通道移液功能仍可实现同时上样。对于 96 孔过滤板,还有各种孔径的不同滤膜可供选择。例如,安捷伦科技公司的 Captiva 96 孔板提供聚丙烯 (0.2、0.45 和 20 μm 孔径)、聚偏氟乙烯 (PVDF) 和玻璃纤维 (10 μm) 三种过滤材料供用户选择。还有一种尤其适用于从血浆中去除蛋白质和脂类物质的 96 孔板 — Captiva ND^{Lipids}, 其中 ND 表示无滴落 (non-drip) 的膜配置。如需了解有关该孔板的更多信息,请参阅第 16 章。

当需要处理大体积样品或没有自动化样品处理系统时,可以选用标准 SPE 柱形式的 Captiva 过滤柱(管)(见图 5.1E),其功能与 Captiva 96 孔板相同。体积为 3 mL 的深层过滤柱配有孔径 0.2 μm 和 0.45 μm 两种规格的过滤膜。专门设计的 Captiva 10 μm 玻璃纤维过滤柱对纯化含大颗粒的样品(如刚解冻的血浆)非常有效。该设计可以避免样品转移过程中可能出现的移液枪头堵塞的问题。

图 5.2

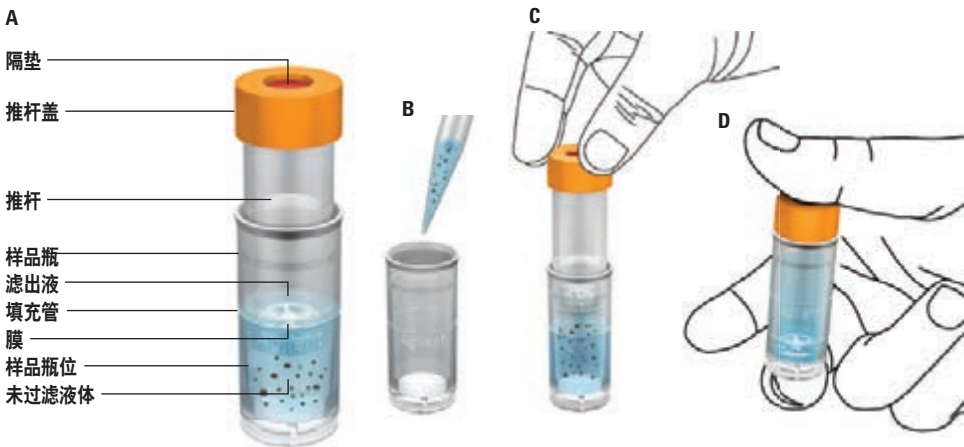
安装于真空歧管上的 Captiva 96 孔过滤板



图 5.3A 展示了一种独特的非注射式膜过滤器——滤瓶，它一次可以处理 0.4-1.0 mL 样品。它是一种预装的过滤装置，将注射式过滤器、注射器、自动进样器样品瓶、隔垫和瓶盖整合成为了一个单独的一次性部件。滤瓶包含两个主要部分：过滤室和推杆。推杆的设计底端为滤膜，顶端为一个预固定的带隔垫的瓶盖。待过滤的液体被置于过滤室中（底部）（**图 5.3B**），加入样品之后，应立即将推杆装入过滤室（**图 5.3C**）。推动推杆穿过滤室中的液体，施加在推杆组件上的正压力将驱使纯净的滤液向上进入推杆的储液室中（**图 5.3D**）。空气通过排气孔逸出直到蒸发密封垫闭合，实现了气密密封。接下来即可将滤瓶放入可容纳 12 x 32 mm 样品瓶的自动进样器转盘，用于自动进样分析。膜的材料包括：PTFE、聚丙烯、尼龙、PES、再生纤维素、醋酸纤维素，以及用于颗粒含量高的样品的附加深层过滤器。

图 5.3

使用滤瓶



挥发性有机化合物的样品引入和样品前处理

气体样品包括大量通常采用气相色谱分析的样品。挥发性有机化合物就是石油、石化产品、食品、香精香料以及环境样品中最常分析的一类化合物。本章概述了这类样品的收集和前处理并进行气相色谱（有时是液相色谱）的分析方法。

可以将挥发性样品分析的前端技术分为采样（样品收集）技术、样品前处理技术和样品引入（进样）技术。在分析之前明确区分这三个样品处理的概念非常有用。如在前面的第 3 章所讨论的，采样的作用不仅仅是获得样品，而且还要在样品引入或进行样品前处理之前保持其完整性。例如，用空气采样器或金属罐收集挥发性样品就是一个样品收集步骤。在本章中，我们将对采样技术进行简单概述。样品引入是指之前不经过任何处理就将样品直接导入 GC 仪器的过程。例如，将气体直接注入 GC 的进样口就是一个样品引入过程。同样，对于液体样品，如果通过程序升温汽化 (PTV) 进样口进行大体积进样，也可以认为这是一种样品引入技术。使用注射器在固体样品上方的空间中采样，然后直接注入 GC，同样也是样品引入过程。样品前处理过程是指样品引入 GC 之前，为满足 GC 要求而对样品进行的处理。例如，在样品引入 GC 之前，采用一个中间冷吸附阱实施动态顶空过程以浓缩目标分析物，即构成了样品前处理过程。对固体材料上吸附的极性化合物进行衍生，从而使其释放到气相环境中用于随后的采样，也是样品前处理过程。无论这一过程的名称是什么，最重要的是目标组分从收集点转移到 GC 色谱柱的过程中没有损失且未改变性状。

在第 2 章中，**表 2.1** 列出了 GC 实验室中最常用的进样和样品前处理方法。有时我们会将这些技术组合使用。例如，动态顶空进样就是顶空进样与吸附阱的结合，用气体吹扫固体或液体样品的顶空，将挥发性分析物浓缩在固体吸附剂上，最后充分加热吸附剂，使分析物热解吸并进入 GC 色谱柱。固相微萃取 (SPME) 可以用于顶空采样，随后分析物在 GC 进样口中进行热解吸。

本章余下的部分将详细介绍挥发性有机化合物 (VOC) 的样品及样品引入技术。半挥发性有机化合物同样可采用本章所讨论的几种技术进行处理，但也可以采用本书通篇涉及的其他技术（如液液萃取、SPE 等）进行处理。

气相色谱的样品进样口系统

很多书籍都以多个完整章节的篇幅¹⁻³详细讨论了气相色谱中的各种进样口系统。这里只是概述了其要点。将液体样品引入气相色谱进样口最常用的方法是使用微注射器穿过自封式橡胶隔垫进样。还可使用气密注射器对气体和蒸汽进样，但通常气体样品阀的重现性更好，也更常用。采用样品环或固定的内部体积，气体进样阀也可以提供自动化的便捷方法，或直接分析汽化气流。在所有情况下，我们目的都是让挥发性样品以尽可能最小的体积快速进入色谱柱。

在 GC 中，有两类常规进样口：1) 热进样口或汽化进样口，或 2) 冷进样口、冷却进样口。热进样口的温度通常为高于样品溶剂沸点 50 °C，而冷进样口的温度则低于溶剂沸点，可能为室温甚至更低，样品在该温度下浓缩后再在随后的运行过程中通过加热完全汽化。热进样口会立刻汽化样品，使其迅速到达色谱柱入口。但过高的温度可能会使样品发生降解，而样品体积过大则会产生过量蒸气，使进样口系统有限的体积过载。反灌现象是指过量蒸汽达到进样口顶部，在冷隔垫上凝结，然后反扩散到载气管线中，在冷却装置中凝结或通过隔垫吹扫管线排出，从而导致不良样品引入效果。

由于所有样品都是在低温下进入进样口，冷进样口最大限度减少了样品降解和样品差异带来的影响。**表 6.1** 对比了气相色谱中不同类型的进样口。最常用的毛细管色谱柱进样口是分流/不分流进样口。这种进样口可用于分流模式，减少到达色谱柱的样品量，从而得到非常窄的初始峰宽。它也能用于不分流模式，使灵敏度最大化。分流进样口是汽化进样口。样品在进样口汽化，向下流入衬管，然后在色谱柱和分流出口之间分流。“分流比”（即进入色谱柱的气体量与通过分流管线排出的气体量之比）决定了进入到色谱柱上的样品量。在分流出口处，样品的流速很高，因此，样品仅会短暂暴露在进样口的高温下，然后迅速被引入色谱柱。

表 6.1
气相色谱进样口比较

进样口	优点	缺点
填充柱直接进样	汽化进样口，可配合填充柱使用，最简便易用，价格最低	与毛细管柱（可为 0.53 mm 内径）不兼容，可能出现样品降解、针头歧视
分流/不分流： 分流模式	简单、通用的毛细管柱进样口，耐用，尤其适用于辅助进样器，能够保护色谱柱	可能出现样品歧视和样品降解
分流/不分流： 不分流模式	高灵敏度毛细管柱进样口，能够保护色谱柱	最高可能出现样品降解和回流，可能发生样品歧视，需要进行优化和维护
冷柱头	样品直接在色谱柱内沉积（从而获得高灵敏度），出现样品歧视的机率最小，惰性最高	可能发生样品过载，难以用于内径小于 0.25 mm 的色谱柱，难以自动化
程序升温汽化 进样口 (PTV)	冷柱头进样，最为灵活，样品降解率低，灵敏度高	复杂，需要优化多个参数，价格最高，可能损失挥发性物质（排空模式）

摘自参考文献 1

在不分流进样模式中，分流/不分流进样口的分流出口是关闭的。一般来说，全部样品蒸气都会进入色谱柱，但由于毛细管内的流速较低，初始样品带宽相当宽。所以我们通常都必须在柱头采用某种形式的样品聚焦。

冷柱头进样口使进入色谱柱的液体样品可以直接沉积。在进样过程中，进样口温度和柱温度都低于溶剂沸点。随后，这两处的温度都将升高，使样品汽化，并开始色谱分离。典型的冷柱头进样口通常具有低热弥散，有利于以往的加热和运行结束的冷却。当然，最困难的是使样品直接在细内径的毛细管柱内沉积。正如所预期的那样，冷柱头进样更适用于沸点范围较宽的样品中的热不稳定化合物。最大限度减少了样品差异和分解带来的不利影响。因为样品直接在色谱柱内沉积，所以灵敏度很高。冷柱头进样口用于沸点范围广或热不稳定样品的分析，以及痕量分析。

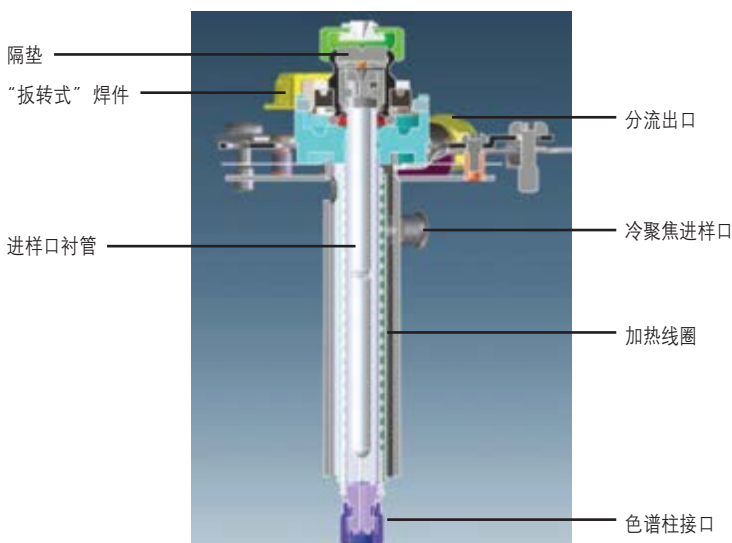
程序升温汽化 (PTV) 进样口是分流/不分流进样口和冷柱头进样口的结合。它结合了冷进样口、程序升温，配备了分流/吹扫放空和定时器/控制器单元。非挥发性的样品剩余物沉积在进样口内，不会迁移到色谱柱上，因此分析复杂样品时采用 PTV 进样可能效果更好。在样品进样过程中，样品沉积在填充衬管中，随着衬管温度升高，溶剂和样品组分汽化。汽化完成后，通过电子控制打开或关闭（或按一定顺序组合二者）分流出口。因此，这种进样口结合了分流或不分流进样与程序升温，优化了样品转移、溶剂放空，降低了由沸点差异引起的样品歧视、溶质降解，减少了分析过程中的鬼峰。

PTV 进样口是 Poy 及其同事⁴基于 Vogt 的早期研究成果开发的，^{5,6}Vogt 首次提出了程序升温样品引入的概念。样品在略低于其溶剂沸点的温度下被引入进样口衬管。低沸点溶剂持续汽化，并通过进样口分流管线排出。在较低的初始衬管温度下引入样品，消除了传统热进样技术的许多缺点。例如，先将样品引入到“冷”衬管上，然后再将衬管温度升高至传统热进样口的正常温度，能够最大限度地减小由沸点差异造成的样品歧视现象。与热进样口进样相比，减少了敏感化合物因为加热速度缓慢而造成的热降解。

图 6.1 所示的安捷伦多模式进样口示意图说明了 PTV 进样口的原理。从图中可以看出，PTV 进样口非常类似于经典的分流/不分流进样口。这种设计可以实现几种进样模式：热分流/不分流模式、冷分流/不分流模式（这些模式的脉冲形式）、大体积进样 (LVI) — 带有溶剂放空定时功能的溶剂放空模式（冷不分流模式的扩展形式，请参阅下一部分的内容）。可编程进样减慢了溶剂汽化的速度，能够最大限度地分析物转移至色谱柱中。载气通过无隔垫采样头连接，进入上部的衬管中。衬管的温度控制是 PTV 进样口正常运行的关键。衬管可以快速加热（使用加热线圈）或冷却（使用帕尔帖、液氮或液体二氧化碳冷却）。在进样模式下，样品由可变速进样器以可控的速度引入，进样口条件经过专门设置，使溶剂能够通过分流管线排出，而目标组分则被捕集和预浓缩。

图 6.1

安捷伦多模式进样口的示意图



大体积进样 (LVI) 技术

许多领域的气相色谱分析，尤其是环境、食品和生物样品的分析，都有降低检测限的需求。采用本书介绍的多种技术 [如液液萃取（第 7 章）、固相萃取（第 9-10 章）以及加压流体萃取（第 14 章）] 进行样品浓缩，是通过富集分析物浓度提高方法灵敏度途径之一。研发选择性更高的 GC 检测器（如电子捕获检测器、串联质谱检测器），是能够同时提高选择性和灵敏度的一种方法。通过增强整个 GC 系统内表面的惰性以降低系统背景，也可以降低检测限。

通过增加 GC 进样口注入的样品量，也可以改善检测限。但是，一般的毛细管色谱柱最多也只能容纳几微升的样品。利用“脉冲”不分流进样原理可实现多达 5 μL 的进样量。超过该进样体积可能导致系统污染、出现非重现性的结果、发生反灌和样品损失。

大体积进样 (LVI) 是一种降低检测限的方法。使用 LVI, 大量溶剂在样品转移至分析色谱柱之前汽化。有两种去除溶剂常用的 LVI 技术: 程序升温汽化 (PTV) 和带溶剂汽化出口的冷柱头进样 (COC-SVE)。二者均可采用 500 μL 或更大的进样体积, 极大改善了检测限, 可得到良好的色谱结果⁷。

PTV 技术已在前面的章节进行了讨论。在某些进样器配置中, 我们可以通过控制自动进样器进行特定次数的进样, 为色谱柱提供大量样品。为了说明该方法, **图 6.2** 展示了通过多次进样向进样口引入大体积样品的一个实例⁸。使用填充衬管, 通过每次 5 μL 的总共 5 次进样, 进样了总体积为 25 μL 的含农药样品。采用较小的体积多次进样可以确保大体积液体不会溢出衬管并进入色谱柱, 从而引起过载、峰分裂, 或损坏固定相。如**图 6.2** 所示, 0.01 ppm 的农药混合物样品获得了良好响应。

在 PTV 进样口中, 非挥发性样品组分和降解产物留在进样口后面, 最大限度减少了对色谱柱的污染。因此, 与冷柱头和分流/不分流进样口相比, PTV 进样口是复杂样品的最佳选择。样品中含有高挥发性目标分析物时, 不适合使用 PTV 进样口, 因为这些化合物可能随溶剂排出。根据经验, 化合物沸点应至少高于溶剂沸点 100 $^{\circ}\text{C}$, 才能成功地使用 PTV 进样口。

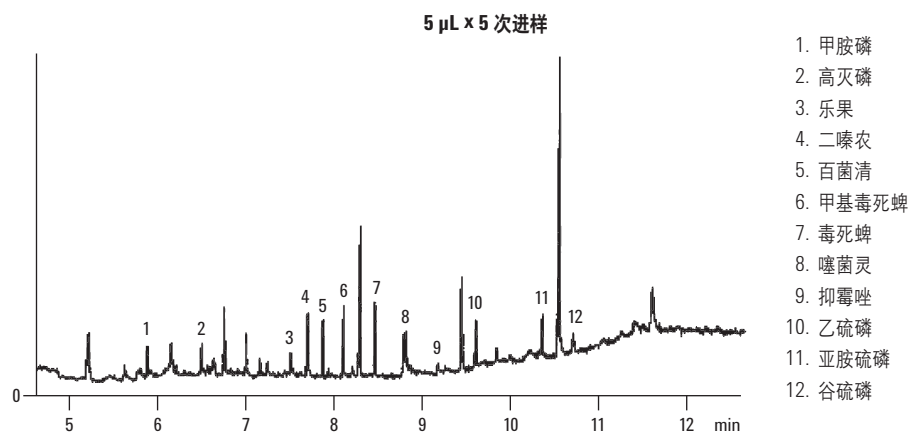
随着现代自动进样器 (例如完全可编程的 Agilent 7693) 的出现, 我们现在已经能够控制液体样品的进样速度, 这也将使重复进样更加完善。

在 COC-SVE 中, COC 进样口配备了一个置于分析柱之前的预柱组件, 由保留间隙管/预柱组合而成。预柱和分析柱之间由放空管线连接, 如**图 6.3** 所示。液体样品注入预柱后, 溶剂将汽化并通过放空管排出。所有条件设为将少量溶剂保留在预柱中。包括挥发性物质在内的样品组分会浓缩在这些少量的溶剂中。待大部分溶剂汽化之后, 放空管关闭, 并启动正常的升温程序。接下来, 汽化保留的样品, 并将其转入分析柱进行分离。几乎所有 GC 仪器都可以自动完成这一过程。

与 PTV 进样口相比, COC-SVE 增加了污染预柱的风险, 因为非挥发性化合物会保留在预柱上, 可能影响后续分离。因此, 可能需要更加频繁地更换预柱。这种进样口主要用于洁净基质 (如饮用水萃取物) 中的痕量分析。COC-SVE 进样口对于保留快速出峰的化合物非常有用, 将不稳定组分的降解降到了最低。PTV 进样口和 COC-SVE 进样口造成的样品差异都很小。

图 6.2

使用溶剂去除 PTV 进行大体积进样



仪器: 带电子气路控制和 PTV 进样口的 HP 6890;
带 HP G1513A 控制器的 HP G1916A 自动液体进样器;
HP1707A 化学工作站 (版本 A.04.02)

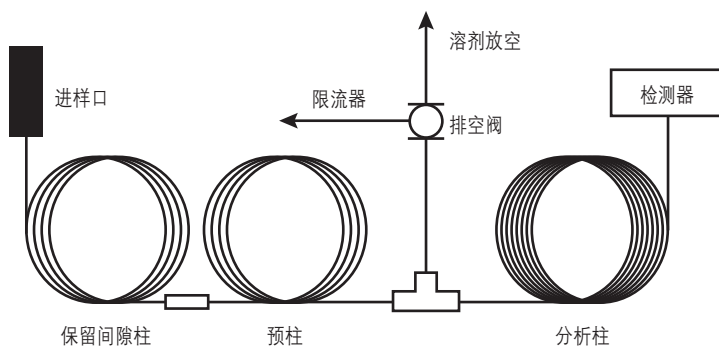
农药: 0.01 ppm

PTV 条件:

放空流速: 300 mL/min
吹扫流速: 在 3.5 min 时 50 mL/min, (4.7 min 时载气节省开启)
PTV 初始温度: 20 °C
PTV 初始时间: 1.1 min
PTV 升温速率: 700 °C/min
PTV 最终温度: 300 °C
进样延迟: 0.00 min
进样量: 25 μ L (进样 5 次, 每次 5 μ L)
色谱柱: HP-5ms, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m

图 6.3

带溶剂汽化出口硬件配置的冷柱头进样



顶空采样技术

静态顶空技术

顶空指的是液体和固体上方形成的蒸气。如果样品在密闭的加热容器中与气相达到热动态平衡状态，该分析方法称为静态顶空采样。如果惰性气体流经样品或流过样品之上，将捕集到的样品挥发性成分聚集在吸附阱或低温阱中，则该方法称为动态顶空或吹扫与捕集。由于只对挥发性物质进行采样，顶空分析尤其适用于复杂样品（如血液、塑料、化妆品）、固体材料、含高沸点非目标化合物的样品、高含水量样品，以及传统色谱方法难以处理的样品。这些基质都被留在下方，只有样品的挥发性部分存在于顶空中。顶空采样的校准方法是使用挥发性溶剂配制分析物溶液，然后将少量已知量的校准溶液注入密闭的顶空容器中，使全部溶液汽化。

静态顶空技术大体上来讲是一种非常简单的前进技术。样品置于适当大小的玻璃样品瓶中，以惰性隔垫密封。小心加热样品瓶，直至达到平衡温度。使用注射器手动采样或使用顶空进样器自动采样。压力平衡的顶空进样器能够使样品瓶保持固定的压力，该压力与色谱柱进样口处的压力相同，从而更好地实现定量，同时避免进样时基线出现波动。

但对于采用阀和样品环的系统（如 Agilent 7697），不需要加压选项，也没有必要进行加压。气体进样阀将顶空样品转移到 GC 仪器。使用毛细管色谱柱时，必须像进样液体样品时一样限制顶空样品的进样体积。因此，可以通过分流转移一部分样品。顶空进样体积较大时，采用热聚焦会使蒸气浓缩，在这种情况下，低温冷却也是一种可取的解决方案。

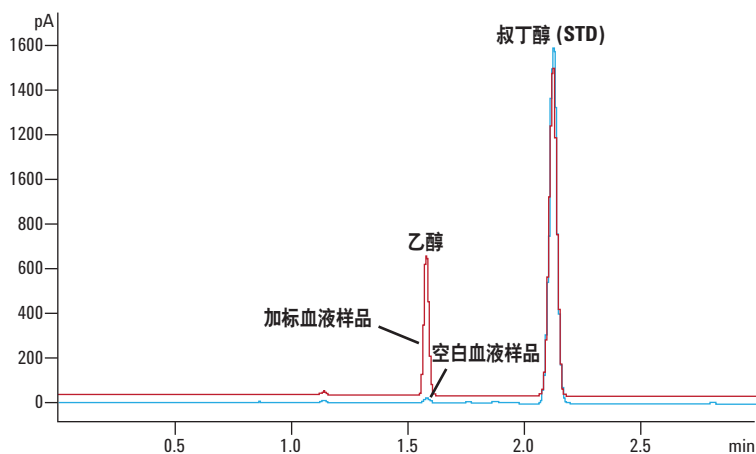
图 6.4 介绍了顶空进样在血液中乙醇分析中的一个典型应用实例。血液是很难处理的物质，而采用顶空进样分析血中挥发性成分（如乙醇）是一种非常简便易用的方法。在世界上的许多国家，乙醇浓度大于 80 mg/100 mL 血液即被视为中毒水平，某些国家规定的浓度甚至更低。采用顶空自动进样器在 20 mL 顶空样品瓶中进行顶空采样，然后进行 GC 分析，得到了 **图 6.4** 所示的空白血液和乙醇加标血液的叠加色谱图⁹。内标为叔丁醇。乙醇标准品的 5 点校准曲线在 10 mg/100 mL 到 160 mg/100 mL 的浓度范围内显示出良好的线性。该浓度范围内的重现性也非常优异：保留时间的平均 %RSD 为 0.03%，乙醇的峰面积平均值为 4.6%。

静态顶空方法比吹扫与捕集方法更简单，它所采用的顶空仪器没有那么复杂，样品中的较高水分含量对分析的影响更小，不需要使用吸附剂阱，挥发性样品组分不会发生穿透，而且可以重复采样。可以通过加热样品提高分析物的挥发性。在水性溶液中，某些情况下也可以通过调节 pH 值（使平衡向酸性或碱性物质的未解离形式移动）来提高灵敏度，或通过盐析来提高分析物的汽化物压力和降低有机物在水中溶解度。通过研磨增加固体样品的表面积有助于基质中的挥发性物质向外扩散。对于某些样品，加入水将引发活性位点争夺，置换出固体表面的某些有机物，从而提高顶空中这些挥发性物质的浓度。有时，我们需要通过衍生化反应使某些含有反应性官能团的化合物生成挥发性更强的化合物，以使其挥发到顶空中。例如，对于固体材料中被极性作用力紧密束缚的羧酸，通过生成羧酸甲酯就能将其释放出来。如需了解 GC 静态顶空采样的更多信息，请参阅参考文献 10。

静态顶空法的一个有效的改良方法，使用多次顶空萃取 (MHE) 系统对同一样品瓶中的样品进行多次萃取，这与吹扫与捕集技术（请参阅 *吹扫与捕集样品前处理*）类似但并不完全相同。静态顶空气相色谱中使用的 MHE 法是绝对定量法。大体上，该方法是逐步实施的动态顶空萃取，每一步都建立平衡条件。在一系列萃取步骤中，顶空中的分析物浓度以指数方式减小；根据数学推算，应该能够获得与原始样品中所含分析物总量成比例的总峰面积。MHE 最常用于测定无法使用校准标准品进行校准的复杂基质中的分析物含量。有两个例子可以阐释 MHE 在某些实际样品中的应用，它们分别是包装材料中可浸出化合物的测定¹¹ 以及聚合物中残留单体的测定¹²。读者如需了解这项技术的更多信息，包括一些数据的计算，可以参阅参考文献 13-15。

图 6.4

空白血液样品和加标血液样品的叠加顶空色谱图



气相色谱条件:

进样口设置: 200 °C, 分流比: 10:1
 色谱柱: DB-ALC2 0.32 mm × 30 m,
 1.2 μm (部件号 123-9234)
 色谱柱流量 (N₂): 12 mL/min, 恒流模式
 柱温程序: 40 °C (保持 7 min)
 温度: 250 °C
 FID 设置: H₂ 流速: 40 mL/min
 空气流速: 400 mL/min
 尾吹气流速 (N₂): 45 mL/min
 数据采集速率: 20 Hz

顶空条件:

温度: 柱温箱: 85 °C
 定量环: 85 °C
 传输线: 100 °C
 时间: 气相色谱循环时间: 15 min
 加压平衡时间: 0.1 min
 样品瓶平衡时间: 15 min
 进样时间: 0.5 min
 样品瓶: 填充模式: 限流加压
 加压速率: 20 psi/min
 吸样压力: 15 psi
 最终压力: 10 psi
 填充流速: 50.00 mL/min
 最终保持时间: 0.05 min
 填充模式: 高级
 提取后放空: 否

顶空固相微萃取 (HS-SPME)

在第 10 章中,我们将对 SPME 技术进行深入探讨,还将介绍根据用途不同对经典顶空实验进行改良的方案。SPME 是一种简单的无溶剂萃取技术,具有灵敏度高、重现性好且成本较低的优点^{16,17}。在该技术中,具有相涂层的熔融石英纤维会暴露在液体或固体样品上的顶空中。吸附在相上的分析物,在进样口进行热解吸,进而被转移到毛细管色谱柱中。在该技术中,我们可以根据分析物的特性,通过改变化学相的类型或涂层厚度来改变选择性。例如,对于环境样品中分配系数小、极性低的含氯化物和芳香性挥发有机物,需要使用较厚的非极性化学相以实现有效萃取。对于含有分配系数不同的多种分析物的样品,可以采用多层纤维。

SPME 顶空进样应用于解决“现实世界”分析问题的例子不胜枚举。犯罪实验室的研究人员开发出了一种简便、廉价、快速且灵敏的方法用于分析火灾残留物中的汽油¹⁸。采用具有 100 μm 聚硅氧烷涂层的 SPME 纤维进行 20 min 的静态顶空进样,仅使用 0.04 μL 汽油样品就获得了令人满意的色谱图(常规顶空进样需要使用 0.1 μL 的样品),并且节约了大量时间,成本也降低了一半。Brewer 等介绍了一种使用 SPME 顶空进样法进行法医毒理学分析的例子¹⁹。作者调查了两起交通事故,在其中一个案例中,传统顶空方法的尿样分析结果表明,司机血液中含有乙醇。但是,在大空气峰的尾部洗脱出了第二种未知化合物,该物质用质谱不容易鉴定。通过顶空 SPME-GC/MS,得到了较清晰的色谱图,鉴定出毗邻乙醇峰的洗脱物是达到了毒性级别的二氯甲烷。采用极性纤维(85 μm 聚丙烯酸酯膜)分析乙醇,能够达到比非极性膜(100 μm 聚二甲基硅氧烷)更高的灵敏度。在第二个案例中,受害者摄入了打火机油,使用 SPME-GC/MS 顶空方法对胃液进行分析,检测到了打火机油的存在,并由此追踪到了在受害者卧室里储存打火机油的容器。由于测量化合物是直链烷烃,在这个案例中非极性纤维发挥了很好的作用。

采用 SPME 顶空分析法分析各种土壤中 BTEX 和其他挥发性污染物结果显示,每种土壤释放这些挥发性物质的速率各不相同^{20,21}。加入溶剂和水是为了置换土壤表面的烃类化合物,从而更有效地释放这些化合物。包括纤维内衍生化的 SPME 采样方法被应用于样品瓶顶空中甲醛的测量,样品瓶中盛放的样品为已知含有甲醛的商品,包括发胶和层压刨花板²²。采样时间为 10-120 s,得到了非常干净的色谱图和高信噪比。该方法的甲醛检测限为 2ppb, RSD 为 6.7%。

主要的大型制药公司的化学家都根据美国药典 (USP) 方法 467,采用顶空 SPME 测定药物中的有机挥发性杂质²³。他们比较了顶空 SPME 和浸入 SPME 的精密度、准确度、检测限,发现这两者基本相同。1,4-二氧六烷的检测限为 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$,苯的检测限为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。所检测的大部分溶剂的精密度一般都在 2-3% 的范围内。作者更倾向于使用顶空进样法,因为这种方法能够延长 SPME 纤维的使用寿命。最后, Yang 和 Peppard²⁴使用 SPME 顶空进样法监测了水、研磨咖啡、果汁和黄油风味植物油中的 25 种加标的常见风味成分。

顶空 SDME

单滴微萃取 (SDME) 被认为是 SPME 的替代技术。在这项直观的技术中，溶剂的微液滴悬挂于传统的微注射器上，然后浸入与其不混溶的样品溶液中，或悬挂于样品上方的 HS 中（如图 6.5 所示）。顶空-单滴微萃取 (HS-SDME) 与传统的 HS 采样类似，都是从样品上方的蒸汽中对挥发性物质进行采样，因此能够避免来自样品基质的干扰。在 HS-SDME 中，SPME 中的纤维被同样能够根据选择性选择的微液滴代替。有多种方法和专门的设备能够达到这一目的。

SDME 中使用的萃取溶剂列于表 6.1。可以使用极性各不相同的多种溶剂。HS 采样应使用高沸点溶剂，以免采样过程中溶剂发生明显汽化。为了说明 HS-SDME 的应用，我们将展示制药行业中的残留溶剂 (RS) 的分析。美国药典规定了药品中 RS 的分析方法，包括液体直接进样法 (DLI) 和 HS 方法。

表 6.2

顶空 SDME 中用作微液滴的溶剂

正辛烷	甲苯	苯甲醇
正癸烷	邻二甲苯	乙二醇
十四烷	环己烷	邻苯二甲酸二乙酯
正十六烷	1-辛醇	

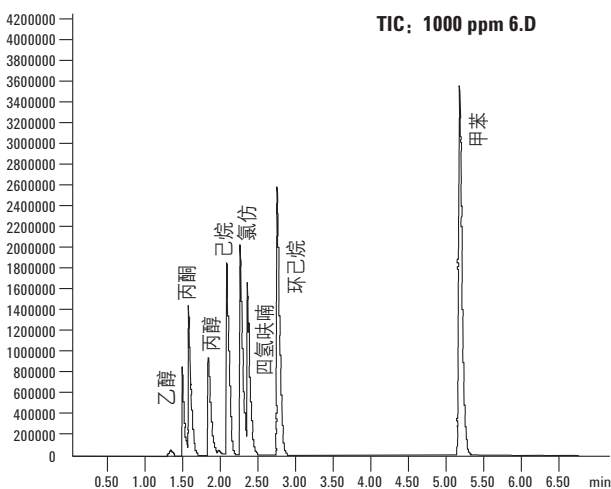
国际协调会议 (ICH) 把药物制剂中必须监测的 RS 分为了四类。第一类溶剂具有不可接受的毒性，在药物生产中应避免使用。虽然确证不存在该类溶剂是药物开发的一部分，但通常不会对其进行常规监测分析。第二类溶剂的毒性低于第一类溶剂，第三类溶剂“对人体健康有较低风险”，第四类溶剂的毒性还没有足够的毒理学数据支撑。后三类是最常分析的溶剂，且已经能使用 HS-SDME 进行分析。

图 6.5
顶空单滴微萃取的配置



Wood 及其同事²⁵ 研究了使用 HS-SDME 方法测定药物制剂中的 RS。ICH 中可用于液滴萃取的第二类萃取溶剂是 N-甲基吡咯烷酮 (NMP)，使用其进行 RS 分析的原因是它能与水互溶，可溶解多种药物，并且由于沸点相对较高 (202 °C)，它会在其他大部分残留溶剂洗脱之后洗脱。RS 分析中，NMP 作为背景被扣除，而那些与 NMP 共流出或者滞后流出的高沸点残留溶剂也不被检出。将 1 到 2 μL 的 NMP 加入到 HS 约一半高度的位置，如图 6.5 所示。经过一段特定的时间后，通常为 4 或 5 min，将液滴吸回注射器中，流经原始体积刻度，然后将其注入 GC 中。使用内标，可以通过 HS-SDME 定量分析多种 ICH 溶剂 (乙醇、丙酮、1-丙醇、正己烷、氯仿、四氢呋喃、环己烷和甲苯)。手动进样的 RSD 均值在 2.7% 左右，使用 GC/FID，其检测限 (LOD) 可小于 1 ppm。采用 GC/MS 自动进样，HS-SDME 检出限可达低 ppt 级，并且在所需的浓度范围内校正曲线呈线性 (例如，乙醇的 LOD 为 0.08 ppm，不使用内标时其校正曲线的 R_2 值大于 0.995)。HS-SDME 色谱如图 6.6 所示²⁵。值得一提的是未发现携带污染。

图 6.6
使用 SDME 和 GC/MS 测定残留溶剂



实验条件:

仪器: Agilent 6890 气相色谱仪和 Agilent 5973 质谱仪

色谱柱: 30 m HP-5ms

数据系统: 安捷伦化学工作站

微量进样针: Hamilton 1701, 10 μL , 气密性, 针尖型号 #2

气相色谱温度 (°C): 进样: 250
检测器: 280

气相色谱分流比: 10:1

自动进样: CTC Analytics CombiPAL

样品瓶: 20 mL

样品量: 10 mL
用 NMP 冲洗, 3 次, 6 μL

样品温度: 60 °C

搅拌速度: 750 rpm

平衡时间: 30 min

液滴体积: 1.0 μL

填充次数: 3

液滴排出速率: 0.2 $\mu\text{L}/\text{s}$

萃取时间: 5 min

吸回液滴体积: 1.2 μL

净化与捕集样品前处理

动态顶空进样装置能够持续地吸附液体或固体样品顶空的蒸气。样品上的气流（吹扫）将使分析物进一步挥发，这些分析物可以通过吸附剂或低温方法进行捕集。捕集过程将重聚焦（浓缩）挥发性物质，然后这些挥发性物质将通过热解吸再次挥发并进入气相色谱仪（请参阅热解吸和热萃取）。动态的净化与捕集方法对于因浓度过低而无法使用静态顶空方法进行测定的分析物来说尤其有用。净化与捕集（P&T），或者气相剥离过程通常是指吹扫气体通过一个多孔板，在液体样品表面之下鼓泡，产生细小的分散气泡的过程。P&T 所用的捕获器通常与气体样品使用捕获器相同。在 P&T 实验过程中需要小心避免挥发性分析物穿透吸附剂。另外，传输管线和阀应加热到分析物的沸点以上，以避免样品在进样器和 GC 仪器之间发生吸附或冷凝。现在市场上已经出现了许多动态顶空萃取的自动化系统。

选择适合的捕集阱是确保定量回收目标分析物的重要考虑因素。吸附剂（一般是玻璃管）内填充有多孔吸附材料（一般为 50 mg 至 1 g），它们可以是聚合物（例如 Tenax、聚苯乙烯或聚氨酯泡沫）、碳（石墨化碳黑、活性炭或碳分子筛）、硅胶或氧化铝。有时需要在使用之前净化聚合物材料，以去除其中的残留单体。Tenax 特别适合作为吸附剂，因为它是疏水性物质，不会对水产生保留，而且样品容量较高。碳材料也是出色的高容量捕集材料，但有时它会不可逆地吸附某些种类的分析物。硅胶和氧化铝材料具有高容量，但会吸收水份。这些含有吸附剂的捕集阱也可以用于离线的收集空气中的挥发性有机样品，然后送回实验室进行后续的分析。如前所述，分析物通过热脱附转移至 GC（请参阅热脱附和热萃取），有时还会同时采用低温手段进行冷捕集以重新聚集分析物。

捕集阱的一个特别重要的参数是穿透容量，其决定了有机物从捕集阱另一端流出而不再保留之前，捕集阱能够从气体样品中捕集到的有机物量。挥发性有机物能够极快地通过捕集阱，而半挥发或非挥发性有机物则会被吸附，不会流出。要捕集挥发性有机物，可以低温冷却捕集阱，或使用分析物穿透体积更高的其他吸附材料。

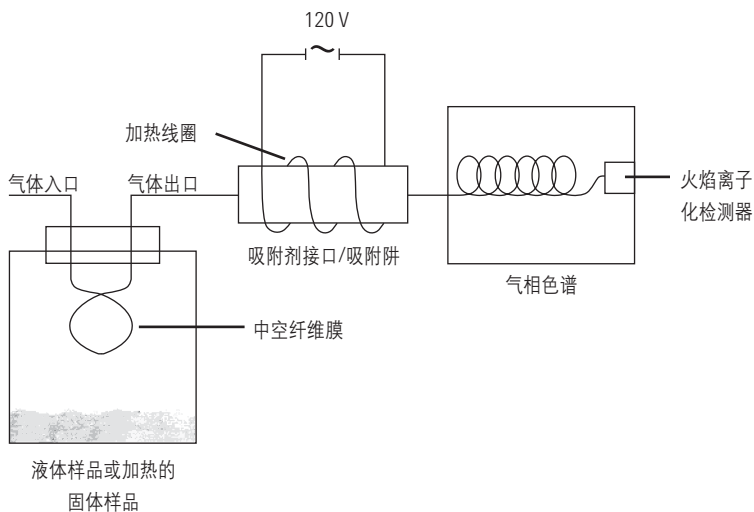
通常，在检测比主要组分挥发性更强的微量组分（如饮料中的香精）时，动态 HS 方法是最佳选择。P&T-GC 技术在测定生物体液（如尿液、血浆、唾液和组织匀浆）中的挥发性有机物时尤其有用。此外，美国国家环境保护局在 SW-846 方法 5030A 中规定，采用动态技术测定水中的低浓度挥发性有机物。环境分析中推荐使用吹扫与捕集方法进行分析的其他实例还包括：水、土壤和废弃物样品中的低浓度挥发性卤代化合物（方法 502.1）、饮用水中的挥发性芳香族化合物（方法 503.1）以及相同环境基质中的挥发性非卤代有机物（方法 8030A）。静态和动态顶空可以用于聚合物中的挥发性杂质、残留单体和其他添加剂的定性和/或定量测定。法医学分析中动态 HS 的一个有用应用是调查纵火催化剂，因为小分子量和中等分子量的石油馏分可以完全从火灾残留物中被吹扫捕集，但更大分子量的石油馏分回收率通常较低。

在称为吸附剂界面膜萃取 (MESI) 的动态顶空实验变化形式中，Pawliszyn 及其同事^{26,27} 在固体或液体样品的顶空中插入了硅胶中空纤维膜。整个实验设置如图 6.7 所示。膜萃取模块形成的界面能够将目标分析物有效地从样品基质中分离出来。在实验设置中，惰性气体通过膜内部。能够渗透到膜内的分析物通过膜经过顶空，然后被吹扫到捕集阱中。吸附剂界面萃取包括捕获器、加热线圈以及由计算机控制的带电源的加热开关。该模块将膜萃取模块物理连接到 GC 分离色谱柱。

当捕获器上积聚了足够的分析物，就会迅速热解吸而进入 GC 仪器。为了实现更大的吸附容量和更好的分析物聚焦，吸附剂界面可以在低温模式下操作。MESI 的灵敏度与捕获时间直接相关，并受到分析物在捕获器中的穿透时间的限制。MESI 技术已被应用于多种环境样品的分析，例如用于分析停车场雨水径流中的烃类化合物以及分析各种基质中的 BETX。

图 6.7

用于吸附剂接口膜萃取的气相色谱设置示意图



热解吸和热萃取

热解吸是一种广泛用于从固体样品或吸附剂中释放挥发性分析物的技术。该技术既可单独用于含挥发性物质的固体样品（如土壤中的石油烃类、磨细的聚合物中的添加剂等），也可与动态顶空方法（请参阅第 6.4 节）联用，使用惰性气体将挥发性物质从液体或固体样品中转移到吸附阱中。热萃取与它非常类似，不同的是挥发性物质转移（萃取）过程中不存在另一个捕获步骤。不需要进行样品前处理，也无需使用任何溶剂。在热萃取中，固体样品 (1-500mg) 被置于两个玻璃棉塞之间的热解吸管内。吹扫热解吸管去除所有痕量氧气之后，在热解吸管周围环绕预加热的加热器模块或加热线圈，使温度迅速升高，从而将挥发性和半挥发性物质从固体样品中热萃取出来。这些化合物被吹扫入 GC 仪器，然后在色谱柱头进行捕获。利用程序升温分离目标化合物。在挥发性化合物的热解吸中，热解吸温度很少超过 200 °C，而在热萃取中，温度可能高达 300 °C。温度超过 300 °C 时，物质可能会发生热裂解或高温分解。

在热解吸中，分析物完全解吸所需的时间受如下因素影响：样品基质、样品尺寸、分析物与固体表面相互作用力、解吸温度以及分析物扩散出样品的时间。通常，热解吸过程缓慢，会产生较宽的色谱峰。基于这个原因，我们常使用溶质追踪技术确保获得更好的色谱分离。直接（单级）热解吸被定义为将萃取的挥发性物质直接吹扫入 GC 色谱柱的方法；而二级热解吸采用冷捕获富集挥发性分析物到吸附剂上。无论哪种方法，为了避免热解吸或热萃取过程中的样品损失，通常都会使用加热传输管线，并且传输线最好采用惰性材料制成。

热解吸管通常用于痕量挥发性或半挥发性有机化合物的收集，也可以承装实验室中待萃取的固体样品。针对要采集的空气中的各类 VOC，解吸管中装入相对应的有机吸附剂（如 Tenax、活性炭、无机材料等）。通常使用某种类型的流量控制系统，将空气推入热解吸管，流量与时间呈函数关系。

现在已经有了能够自动处理已填充样品的热解吸管的热解吸仪器，其自动化处理包括热解吸管的加载/卸载，以及将热解吸管加热到足够高的温度以转移所有目标分析物。该过程基本上无需手动处理样品，不使用任何溶剂，因此不存在来自溶剂的分析干扰，也不必考虑溶剂处置成本。虽然单级热解吸已经实现，我们仍需对热解吸管的流出物进行重富集。采用毛细管低温富集、冷阱或电子冷却吸附阱等都可达到这一目的。出于对成本的考虑（液体制冷剂消耗），我们更倾向于后一种方法。吸附阱可以在反吹模式下快速重新加热，并且 99% 以上的分析物都能在数秒内完成热解吸。

热解吸广泛应用于各种含水量较少的固体样品的分析，包括植物、食品、药品、建筑材料、法医学样品和包装产品。其他重要的应用领域还包括环境监测、香精和香料、工业卫生品和化学战剂的分析。关于热解吸及其应用的总体概要，请参阅参考文献 28-30。

热解在样品前处理中的作用

热裂解是热萃取技术进一步发展的产物，它与其他热处理技术相比有一个重要区别。热裂解所采用的高温 (600-800 °C) 足以使固体样品分子的分子键完全断裂，从而形成更小、更简单的挥发性化合物。根据施加能量的大小，每个分子中的化学键能够以可预测的方式断裂。通过定性测定碎片，我们可以反推样品的分子结构。热裂解技术更像是一种破坏式分析技术，而非样品前处理技术，因为样品原本的分子结构已经因为加热发生了改变。热裂解经常被应用于聚合物样品的分析，这类样品由于分子量太大而无法使用气相色谱技术分析，而且它们在系统性的分析方法中常常会发生降解。

合成聚合物（如聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚酯）、天然聚合物（如纤维素和棉花等植物纤维，以及羊毛和蚕丝等动物纤维）、干油漆和化妆品样品，都是可以通过热裂解 GC 进行分析的实例。使用热裂解可以获得有关聚合物基本结构、聚合物缺陷、变异体和降解机制的重要信息。

通常，热裂解是在惰性气体环境中进行的，目的是为了确保热裂解可控和降解可预期。但热裂解也可以在反应性气体环境（如空气或氧气）中进行。这种气体环境下的降解机制与氦气中的降解机制相比差异很大。研究聚合物等材料，能够为燃烧学研究、毒理学研究和材料的大气稳定性评价提供很大帮助。首先在反应性环境中进行热裂解，排空反应气体后，热裂解产物被收集到吸附阱中。然后完成 GC 分析，使用气体开关让 GC 载气通过捕获器并且热解吸收的有机化合物使其进入 GC 仪器。

低温聚焦也可以用于浓缩和聚焦降解的挥发性碎片，以及补偿系统的死体积。低温聚焦可与吸附阱配合使用，也可配合可编程温度的柱上浓缩使用。如需了解热裂解 GC 的更多信息，请参阅参考文献 31。

结论

本章所涉及的与 GC 和 GC/MS 分析联用的挥发性分析物采样、样品引入和样品前处理方法均已存在多年，是公认的成熟方法。但时至今日，每年这些方法仍然能够解决许多实际问题、产生更多的应用实例、继续改进其软件和硬件，以及引入新的辅助技术，因此它们始终处在分析技术的最前沿。例如，在动态顶空实验中增加中空纤维膜，将 MESI 技术的选择性提高到了一个新的水平。自动化 LVI 方法的问世，让分析人员能够向毛细管 GC 仪器中引入更大量的液体样品。因此，毫无疑问，未来我们还将看到挥发性有机分析物样品处理方法学的更多改进。

参考文献

1. Grob, R.I.; Barry, E.F.(Eds.) *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th Ed., John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, **2004**, ISBN 0-471-22983-0
2. McNair, H.M.; *Miller, J.M.Basic Gas Chromatography*, 2nd Ed., John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, **2009**, ISBN 978-0-470-43954-8
3. Poole, C. *Gas Chromatography*, Elsevier, Oxford, U.K., **2012**, ISBN 978-0-12-385540-4
4. Poy, E.S.; Visani, F.; Terrosi, F. *J. Chromatogr.* **1981**, 217, 81
5. Vogt, W.; Jacob, K.; Obwexer, H.W. *J. Chromatogr.* **1979**, 174, 437
6. Vogt, W.; Jacob, K.; Ohnesorge, A.B.; Obwexer, H.W. *J. Chromatogr.* **1979**, 186, 197
7. Staniewski, J.; Rijks, J. *HRC* **1993**, 16, 182
8. Wilson, B.; Wylie, P.L.; Klee, M.S. *Large Volume Injection for Gas Chromatography Using a PTV Inlet*, Application Note #228-374, Hewlett-Packard, Wilmington, DE, **1997**
9. Li, X. 使用安捷伦 7820A GC 和 7697A 顶空进样器测定血液中的乙醇含量，应用简报出版号 5990-9021CHCN，安捷伦科技公司，美国加利福尼亚州圣克拉拉市，**2011 年**
10. Kolb, B.; Ettre, L.S. *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*, 2nd Ed., Wiley-VCH Inc., New York, **2006**, ISBN 0-471-74944-3
11. Firor, R.L.; Gudat, A.E. *The Determination of Extractables and Leachables in Pharmaceutical Packaging Materials Using Headspace GC/MS (用顶空 GC/MS 测定药品包装材料中的可萃取物和可浸出物)*，应用简报出版号 5989-5494EN，安捷伦科技公司，美国特拉华州威尔明顿，2006 年
12. Firor, R.L. *Residual Monomers in Polymers by Multiple Headspace Extraction Using the Agilent 7697A Headspace Sampler (使用 Agilent 7697A 顶空进样器对聚合物中的残留单体进行多次顶空萃取)*，应用简报出版号 5990-0342EN，安捷伦科技公司，美国特拉华州威尔明顿，**2012 年**
13. Kolb, B.; Ettre, L.S. *Chromatographia* **1991**, 32, 505-513
14. Zhu, J.Y.; Chai, X.-S. *Current Analytical Chemistry* **2005**, 1, 79-83
15. Gudat, A.E.; Brillante, S.M. *Multiple Headspace Extraction-Capillary Gas Chromatography for the Quantitative Determination of Volatiles in Solid Matrices (使用多次顶空萃取气相色谱法定量测定固体基质中的挥发性物质)*，应用简报出版号 5965-0978EN，安捷伦科技有限公司，美国特拉华州威尔明顿，**2000 年**

(接转下页)

参考文献 (接转上页)

16. Arthur, C.L.; Potter, D.W.; Buchholz, K.D.; Motlagh, S.; Pawliszyn, J. *LCGC* **1992**, 10, 656-661
17. Zhang, Z.; Yang, M.J.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 844-852A
18. Furton, K.G.; Almirall, J.R.; Bruna, J.C. J. *Forensic Sci.* **1996**, 41, 12-22
19. Brewer, W. E.; Galipo, R.C.; Morgan, S.L.; Habben, K.H.J. *Anal. Toxicology* **1997**, 21, 286-290
20. Pawliszyn, J. *SPME Theory and Practice*, Wiley-VCH Inc., New York, 1997, 161-170, ISBN 0-471-19034-9
21. Saraullo, A. Ph.D.Thesis, Univ. of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada
22. Martos, P.A.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 311-2320
23. Shaw, R.; Smith, A.-M.; Clark Nelson, L.; Scypinski, S. Hoffman-La Roche Inc., Nutley, NJ, Poster presentation, Amer.Assoc. of Pharmaceutical Sciences Conference, June, 1994
24. Yang, X.; Peppard, T. J. Agric. *Food Chemistry* **1994**, 42, 1925-1930
25. Wood, D.C.; Miller, J.M.; Christ, I. *LCGC No. America* **2004**, 22 (6), 516-522
26. Pratt, K.F.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2101-2106
27. Yang, M.J.; Pawliszyn, J. *LC/GC* **1996**, 14, 364-376
28. Wampler, T.P. *LC/GC* **1998**, 16 (9), 812-821
29. *Round-the-Clock, Online and Cryogen-free Monitoring of Hydrocarbons in Ambient Air Using Thermal Desorption-Gas Chromatography*, Technical Overview #5988-9254EN, Agilent Technologies, **2003** (采用热解吸气相色谱法全天候、在线且无用制冷剂地监测环境空气中的烃类, 技术概览, 出版号 5988-9254EN, 安捷伦科技公司, **2003** 年)
30. *Optimizing Analytical Performance and Extending the Application Range of Thermal Desorption for Monitoring Air Indoors and Inside Vehicle Cabins* (优化分析性能并扩展热解吸的应用范围至室内及车舱内空气的监测), 安捷伦技术概览 5988-9255EN, 安捷伦科技公司, **2003** 年
31. *Introduction to Pyrolysis-Capillary Gas Chromatography, CDS Analytical Solutions*, Publication Number 178, <http://www.cdsanalytical.com>

液体样品的样品预处理

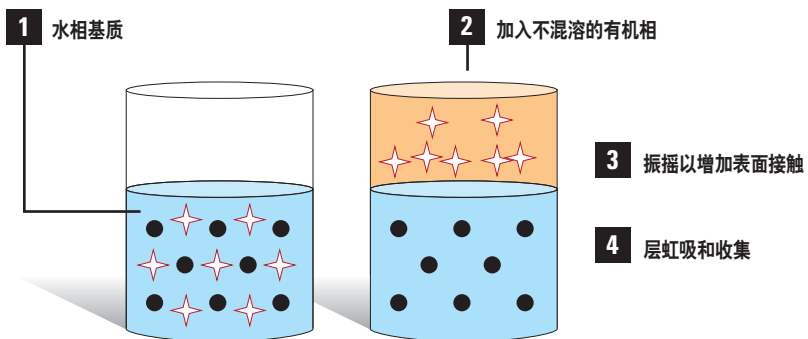
此前，第 2 章中的表 2.4 介绍了液体样品的前处理方法。大多数实验室只使用其中的几种方法。例如，蒸馏仅限于挥发性化合物，虽然真空蒸馏法也可将该技术扩展到用于环境样品中高沸点物质。冻干法通常只局限于通过去除水分实现生物样品的纯化和处理。本章将介绍大多数色谱实验室更常使用的液-液萃取方法。

液-液萃取 (LLE)

液-液萃取 (LLE) 在分析物与干扰物的分离方面非常有用，它是通过将样品在两种不混溶的液体或相之间进行分配而实现的 (图 7.1)。LLE 中的一相通常是水相，而第二相则是有机溶剂。亲水性化合物倾向于溶于极性的水相，而疏水性化合物则主要溶于有机溶剂中。通过蒸发溶剂可轻松回收萃取至有机相的分析物，而萃取至水相的分析物通常可以直接注入反相 HPLC 色谱柱进行分析。在某些情况下，必须将水相的溶剂更换为与色谱方法更兼容的其他溶剂。LLE 最常用的方法是使用分液漏斗 (图 7.2)，其顶部有一个用于加入两相的开口，底部有一个截止阀，用于分配完成之后选择性地移除底层液体。使用密度比水大因而沉于底层的有机溶剂 (例如二氯甲烷) 时，更适合使用分液漏斗。

图 7.1

典型的液液萃取



以下信息假设分析物将优先在有机相中富集，但当分析物是被萃取到水相中时，也可使用类似的方法。

图 7.2

在分液漏斗中进行的 LLE

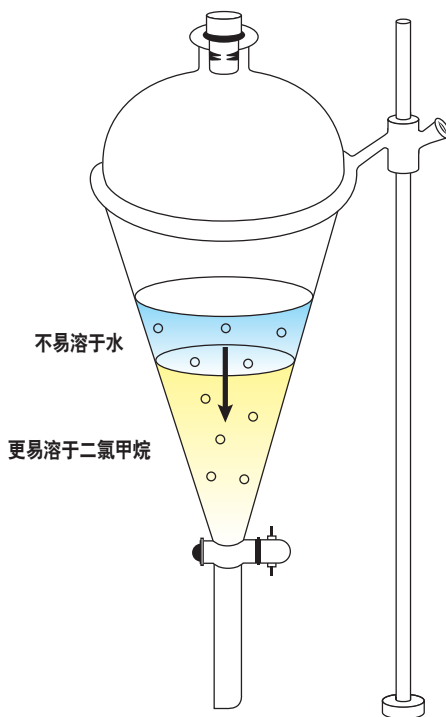
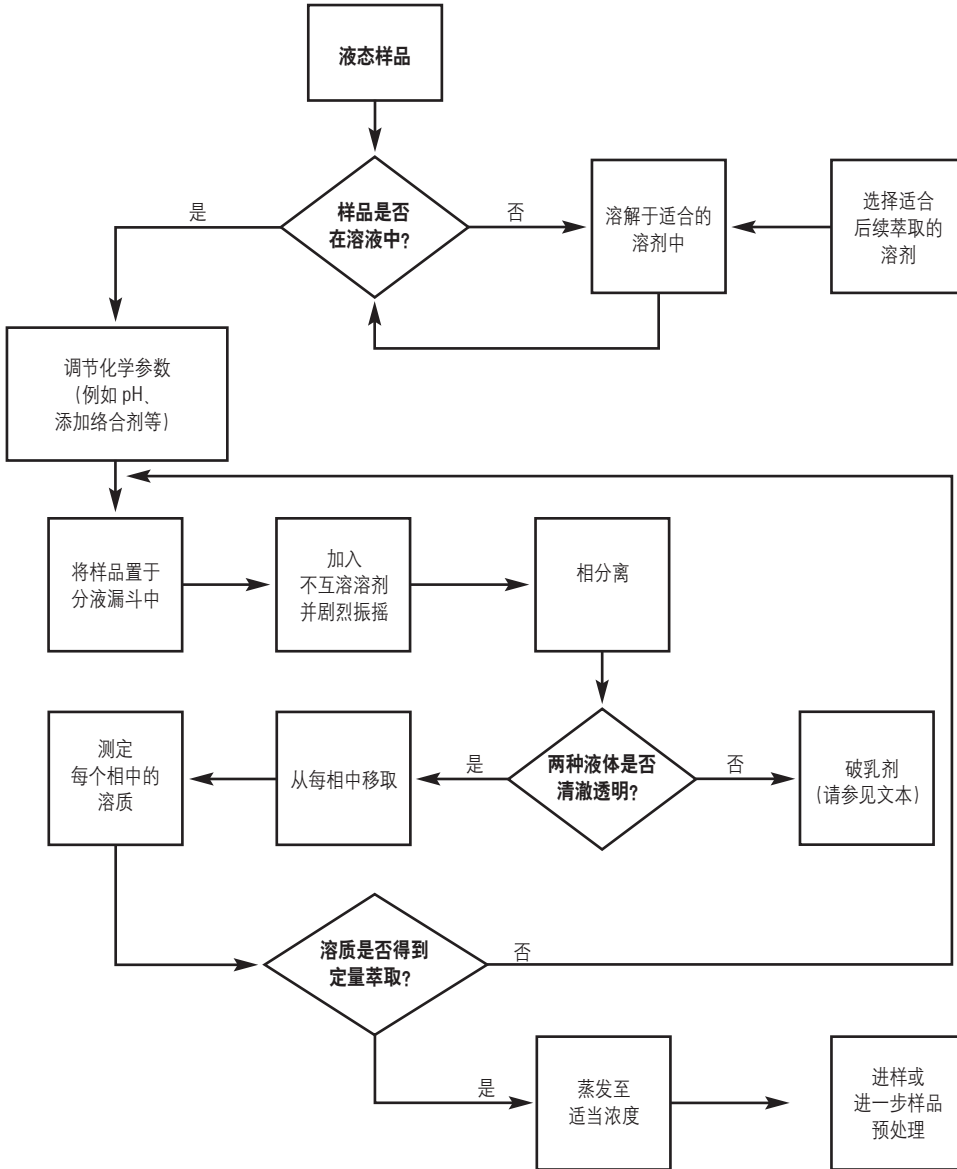


图 7.3 总结了 LLE 分离的工作流程步骤。由于萃取是一个效率有限的平衡过程，两相中都有可能保留大量的分析物。pH 的改变、离子对、络合作用等化学平衡都能用于增强分析物回收率和/或消除干扰。

图 7.3

液液萃取 (LLE) 步骤总结



选择的 LLE 有机溶剂应具有如下特点:

- 在水中的溶解性低 (<10%)
- 具有易于萃取后移除和浓缩的挥发性
- 与分析所使用的 HPLC 或 GC 检测技术兼容 (避免使用强紫外吸收的溶剂或可能导致 GC 检测问题的溶剂, 如使用电子捕获检测器时不应使用氯代溶剂)
- 具有可增强分析物在有机相中回收率的极性和氢键特性
- 高纯度, 最小化样品污染。

理论

根据能斯特分配定律, 任何中性、非解离的物质都会在两种不混溶的溶剂间进行分配, 以保持恒定的浓度比 (或更准确的说是活度比)。

$$K_D = C_o / C_{aq} \quad \text{公式 7.1}$$

其中, K_D 是分配常数, C_o 是有机相中的分析物浓度 (活度), C_{aq} 是水相中的分析物浓度 (活度)。

一个更有用的表达式是由公式 7.2 推导而来的萃取分析物分式 (E):

$$E = C_o V_o / (C_o V_o + C_{aq} V_{aq}) = K_D V / (1 + K_D V) \quad \text{公式 7.2}$$

其中, V_o 是有机相的体积, V_{aq} 是水相的体积, V 是相比率 V_o / V_{aq} 。

许多 LLE 流程都采用分液漏斗进行, 对于环境样品 (例如水), 每一相一般需要几十或几百毫升样品。而对于临床样品, 有时仅需要几毫升 (例如 1-3 mL) 样品。

对于一步萃取法，为了保持两相中的某一相的分析物回收率， K_D 必须足够大（例如 >10 ），因为相比率 V 的值必须保持在实际可操作的范围内（例如 $0.1 < V < 10$ （见公式 7.2）。在大多数采用分液漏斗的 LLE 流程中，要达到可定量的回收率（ $> 99\%$ ）需要两步或更多的萃取步骤。对于连续多次萃取，合并每个萃取步骤所得的分析物相溶液之后，

$$E = 1 - [1/(1 + K_D V)]^n \quad \text{公式 7.3}$$

其中， n 为萃取次数。例如，如果分析物的 $K_D = 5$ 且两相的体积相等 ($V=1$)，那么要达到 99% 的分析物回收率就需要萃取 3 次 ($n=3$)。可以采用一些方法来增加 K_D 值：

- 可以通过改变有机溶剂来增大 K_D 值
- 如果分析物是离子或可离子化的，我们可以通过抑制其离子化来增大 K_D 值，从而使其在有机相中的溶解性更强
- 分析物还能通过离子对效应被萃取至有机相中，前提是分析物经过离子化并且水相中添加了离子对试剂
- 通过加入惰性的中性盐（例如硫酸钠）实现的“盐析”可用于降低分析物在水相中的浓度。盐析萃取应用的相关解释请参考第 8 章

操作

表 7.1 列出了典型萃取溶剂的示例以及一些不适合（可与水混溶）的萃取溶剂。除了考虑混溶性之外，主要的选择标准是萃取溶剂与分析物极性相关的极性指数 P' ¹。当萃取溶剂的极性与分析物的极性相匹配时（相似相溶）， K_D 值最大。例如，从水样基质中萃取非极性分析物时，选用非极性（ P' 值较小的）¹⁻² 有机溶剂效果最好。选择最佳极性的有机溶剂最简便的方法是混合两种不同极性的溶剂（例如己烷和氯仿），然后测量 K_D 与有机相组成的关系³。接下来将 K_D 值最大的溶剂混合物用于 LLE 流程。通过改变有机溶剂的选择性还能进一步改变 k_D 值，从而改善分析物与干扰物的分离。溶剂选择性三角形² 内不同区域的溶剂具有不同的选择性；另请参阅⁴。请注意：有关极性指数 P' 和溶剂选择性三角形的进一步讨论不在本书的讨论范围，读者可以参阅前文引用的原始参考文献。

表 7.1

用于 LLE 的萃取溶剂		
水性溶剂	与水不互溶的有机溶剂	与水互溶的有机溶剂（不适用于传统 LLE）
纯水	脂肪烃（己烷、异辛烷、石油醚等）	醇类（小分子量）
酸性溶液	乙醚或其他醚类	酮类（小分子量）
碱性溶液	二氯甲烷	醛类（小分子量）
高盐（盐析效应）	氯仿	羧酸（小分子量）
络合剂（离子对、螯合、手性等）	乙酸乙酯及其他酯类	乙腈
上述两种或多种物质的组合	<ul style="list-style-type: none">• 脂肪酮（C6 及以上）• 脂肪醇（C6 及以上）• 甲苯，二甲苯（紫外吸收！）• 上述两种或多种物质的组合	<ul style="list-style-type: none">• 二甲基亚砜• 二氧六环

*第一列和第二列中的溶剂可随机两两配合使用；可与水互溶的有机溶剂（第三列）不能与水性溶剂配合使用进行传统的液液萃取。但是，添加高浓度的盐（盐析）或糖（请参见第 8 章）可能会降低某些溶剂对的互溶性（例如水和乙腈），从而使其分层。

溶剂萃取时，根据溶剂条件不同，可离子化的有机分析物通常可以被转移到任何一相。以水相溶液中有有机酸分析物的萃取为例，如果水相的 pH 值被调节到比分析物的 pK_a 值高至少 1.5 个 pH 单位时，分析物将离子化并倾向于进入水相，而极性较弱的干扰物则会被萃取至有机相中。如果降低水相溶液的 pH ($\ll pK_a$)，以致分析物不再离子化，则分析物将被萃取至有机相，而将极性较强的干扰物留在水相中。高 pH 萃取后紧跟低 pH 萃取的连续萃取法能够分离酸与极性比其更强和更弱的干扰物。请注意利用 pH 进行酸-碱萃取的原理在 LLE 和反相 HPLC 中是相同的。

如果分析物的 K_D 值不理想，可能需要增加萃取次数以改善回收率（**公式 7.3**）。对于可溶于有机相的分析物，在水相中加入另一种不混溶的有机溶剂以提取更多的溶质，然后将所有萃取液合并在一起。最终萃取溶剂的体积一定时，采用较小的体积进行多次萃取一般能够比采用单次大体积萃取更有效地定量去除溶质。

反萃取可用于进一步减少干扰物。例如，以之前的有机酸分析物为例。如果分析物首先在低 pH 条件被萃取入有机相，则极性干扰物（如亲水性中性物质、质子化的碱）将留在水相中。接下来如果使用新的高 pH 值水相缓冲液对有机相进行反萃取，已经离子化的有机酸将转移回水相，而非极性干扰物留在有机相中。后一个流程类似于前文所述的高 pH 萃取后紧跟低 pH 萃取的连续萃取法。因此，两步的反萃取法利用 pH 的变化去除了碱性和中性干扰物，而一步萃取法仅能去除这两种干扰中的一种，无法将两者都去除。

如果 K_D 值非常小（不是远大于 1）或所需的样品量很大，对分析物执行可定量回收分析物的多次提取就变得不现实。因为萃取步骤太多，且总的萃取物体积过大（**公式 7.3**）。此外，如果萃取过程很慢，建立平衡可能需要很长的时间。在这种情况下，可以使用连续液-液萃取法，在该方法中，新鲜的溶剂持续地循环流经水样。

我们已经介绍了使用比水重和比水轻的溶剂的连续萃取装置⁵。这些萃取装置能长时间运行（12-24 小时），可以实现定量萃取（回收率>99%），即使对于 K_D 值小的分析物也不例外。

为了实现更高效的 LLE，可以采用逆流分配装置，它能执行上千甚至更多的平衡步骤（但更加耗时费力）。该方法能够回收 K_D 值极小的分析物，同时能够将分析物与干扰物更好地分离。现在已经有了商品化的小规模实验室用装置。有关这些装置的更多信息，请参阅参考文献 6。

在某些情况下，LLE 能将萃取馏分中分析物的浓度提高至高于其在初始样品中的浓度。依据**公式 7.2**，降低有机溶剂的体积，使有机相-水相的体积比升高，能够增加分析物的浓度（假设接近完全萃取至有机相或 K_D 值较大）。例如，假设有 100 mL 水样，10 mL 有机溶剂，且 K_D 值较大（例如 $K_D > 1000$ ）。有机相中的分析物浓度将升高 10 倍。对于水相-有机相比率较大的溶剂，有机溶剂在水相中的微弱溶解性可能会明显降低有机溶剂的回收体积；采用有机溶剂预饱和和水溶剂可以避免该问题。请注意，当溶剂比 V_o/V_{aq} 较小时，对两相的物理操作（包括有机相的回收）会变得比较困难。

问题

与 LLE 相关的一些实际问题包括：

- 乳浊液的形成
- 分析物强烈吸附在颗粒上
- 分析物与高分子量化合物发生键合（如蛋白质-药物相互作用）
- 两相的相互溶解度差异

乳浊液的形成

乳化是某些样品（如脂肪基质）在特定溶剂条件下会产生问题。如果我们不能“破坏”乳浊液层，使水相和有机相之间形成清晰的边界，那么分析物回收率就会受到影响。以下方法可以“破坏”乳浊液：

- 向水相中加入盐
- 加热或冷却萃取容器
- 通过玻璃棉塞进行过滤
- 使用相分离滤纸过滤
- 添加少量其他有机溶剂
- 离心

分析物吸附

如果样品中存在颗粒，其吸附作用会导致分析物的回收率降低。在这种情况下，需要在过滤后用更强的溶剂清洗颗粒，以回收被吸附的分析物；该步骤所得的萃取物应该与 LLE 的分析物相合并。用于回收被吸附分析物的“更强的”溶剂可能涉及 pH 改变、离子强度增强或极性更强的有机溶剂的使用。

溶质结合

处理血浆样品时，LLE 需要定量回收的化合物可能会与蛋白质结合，从而导致回收率下降。检测生理体液中的药物和药物代谢物时，蛋白质结合的问题非常棘手。破坏血浆样品中蛋白质结合的技术包括：

- 添加表面活性剂
- 添加有机溶剂、变性剂或强酸
- 用水稀释
- 使用键合更强的化合物进行置换

不同相的相互溶解度

“不混溶的”溶剂具有较小但有限的相互溶解度，溶解的溶剂可以改变两相的相对体积。因此，最好使相与相彼此饱和，这样我们才能明确知道含有分析物相的体积，从而准确测定分析物回收率。最简单的饱和步骤是在不加入样品的情况下在分液漏斗中平衡两相，从而使其彼此饱和。接下来即可将等分的两相溶剂用于 LLE。溶剂在水中（或在溶剂的水中）的溶解度数值请参阅参考文献 7。

支持液相萃取 (SLE)

在前面的“问题”部分中，我们探讨了一些与传统 LLE 相关的问题。还有另一种已经出现了一段时间的方法，该方法成功避开了 LLE 的某些缺点，但尚未被人们所熟知，它就是支持液体萃取 (SLE，也被称为固相支持液相萃取、支持液-液萃取，或简单称为固-液萃取)。它的原理相对比较简单：采用高比表面积的化学惰性支持体——高度纯化的分级硅藻土来固定 LLE 实验中的水相。水非常容易吸附在硅藻土颗粒的表面。将干燥的固体吸附剂 (**图 7.4A**) 置于小柱或 96 孔板的孔中，这些装置与固相萃取 (SPE) 所使用的相同。如**图 7.4B** 所示，将水相样品 (例如稀释的血浆、饮用水等等) 加到干燥的吸附剂上，使其润湿 (经毛细作用分散和吸附) 硅藻土，在重力作用下该过程仅耗时 5-15 min。通常，我们需要对水样进行预处理 (例如调整 pH 值、添加离子对试剂、加入缓冲液等)，使分析物转换为易于萃取到有机溶剂中的适合形式，这一点与传统的 LLE 操作相同。现在也已经有了商业化的预缓冲 SLE 小柱。

接着，向小柱顶部添加少量不混溶的有机萃取溶剂，并使其在重力作用下 (有时需施加微弱的压力或真空) 渗透穿过固体支持的水相。因为水样已经广泛分散在固体支持物上，有机溶剂能够与水相的薄液膜紧密地接触，从而实现快速萃取 (平衡) (**图 7.4C**)。在 LLE 中，剧烈振摇分液漏斗时也会发生同样的紧密接触。这种振摇能使不混溶的有机溶剂分散成能够与周围的水相溶剂充分接触的微小液滴。LLE 的这种分散过程的缺点是可能会形成乳浊液和/或需要较长的时间才能将两相分离。此外，正如“乳浊液的形成”中所述，可能需要花费额外的时间来破坏乳浊液。

图 7.4 支持液相萃取过程

图 7.4A

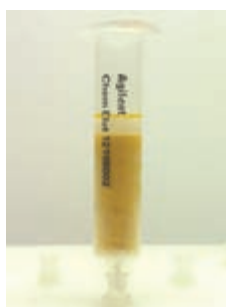
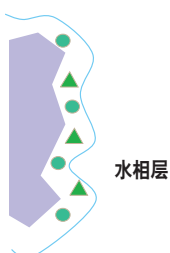
步骤 1 萃取前



图 7.4B

步骤 2 上样

- 目标分析物
- ▲ 不需要的基质化合物或干扰物

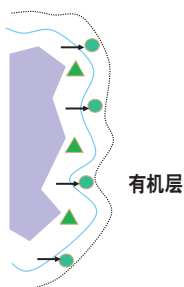


该过程的最后一步是从 SLE 装置的出口收集含有目标分析物的有机洗脱液 (图 7.4C)。将水相留在装置中。在出口滤芯处加装相分离过滤器, 确保有机洗脱液不受水相基质的污染。

图 7.4C

步骤 3 用有机溶剂萃取

- 目标分析物
- ▲ 不需要的基质化合物或干扰物



在 SLE 中，不需要进行剧烈的振摇，因此不会形成乳浊液。此外，水相和有机相紧密接触，能够实现非常有效的分配，因此分析物回收率有时会高于传统的 LLE。并且，SLE 过程相比传统的 LLE 过程需要的经验和实验技能更少，因而其实验的重现性更好。SLE 过程需要使用的玻璃器皿明显少于经典的 LLE 过程，并且免去了清洗弄脏的分液漏斗这一繁琐的步骤。整个 SLE 过程比使用分液漏斗的传统 LLE 更容易自动化。96 孔板 SLE 产品 (Combilute) 尤其适合使用 x-y-z 机器人的系统的自动化。提供各种预包装的自动化 SLE 产品（如安捷伦的 Chem Elut）。此外，针对需要定制 SLE 装置的用户，我们提供散装吸附剂，例如安捷伦的 Hydromatrix。

SLE 方法基本上可以复制任何成熟的 LLE 方法，只需一些小的调整。通常，每 1 mL 水样需要 1 g 硅藻土吸附剂。小柱尺寸由需要萃取的样品总体积决定。萃取的体积取决于目标分析物的浓度、可用样品的总体积和执行后续测定的分析系统的灵敏度。对于环境样品（例如水中的农药筛查），可以采用水容量高达 100 mL 的小柱体积。对于采用 LC-MS/MS（三重串联四极杆）分析的生物样品（例如血浆或尿液），由于 LC-MS/MS 具有优异的灵敏度，可采用较小的样品体积。例如，使用孔体积为 2 mL 的 96 孔板萃取 200-400 μL （最多 500 μL ）的血浆能达到 pg/mL 的灵敏度。对于有机萃取，有机溶剂的体积应该至少与水样的体积相等。一条经验法则是，为得到最大的回收率，最好使用至少两个柱体积的有机萃取溶剂。

几乎所有的非极性溶剂都可以用作不混溶的有机相。由于收集的馏分通常需要蒸发至干，应使用光谱级或更高级别的有机溶剂。任何含有非挥发性杂质的溶剂都不利于实现干净的萃取。可以使用纯有机溶剂或有机混合溶剂。表 7.2 列出了可兼容 SLE 的混合溶剂。每个溶剂对的右侧一列表示它们所能溶解的极性溶剂的最大百分比。超出水混溶性溶剂的最大百分比可能对净化产生不利影响，因为这可能会导致一些含有杂质的水相从硅藻土上剥离。

表 7.2

与 SLE 互容的溶剂混合物

混合物	水性溶剂的最大百分比	混合物	水性溶剂的最大百分比
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	20% MeOH	甲苯/THF	70% THF
CH ₂ Cl ₂ /丙酮	20% 丙酮	甲苯/DMF	30% DMF
CH ₂ Cl ₂ /DMF	10% DMF	EtOAc/DMF	10% DMF
CH ₂ Cl ₂ /DMA	10% DMA	EtOAc/THF	70% THF
CH ₂ Cl ₂ /NMP	20% NMP	EtOAc/IPA	60% IPA
CH ₂ Cl ₂ /THF	70% THF	EtOAc/MeOH	10% MeOH
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ CN	10% CH ₃ CN	Et ₂ O/THF	50% THF

摘自 Breitenbucher, J.G. et al. *J. Comb.Chem.* **2001**, 3, 528-533.

现在我们以蜂蜜中多种农药残留的确认这一具体应用为例，比较 SLE 和 LLE⁸。该应用在食品安全领域非常重要。蜜蜂带回蜂巢的花粉可能来自施加了各种农药的花朵。这些被污染的花粉可能导致蜜蜂数量减少或生成的被污染的蜂蜜。因为蜜蜂可以从许多不同的来源收集花粉，所以我们需要一个多残留分析方法检测蜂蜜中是否存在污染物。Picard 的研究检测了 17 种来自不同化学类别的农药和代谢物。使用 SLE 萃取农药，并将所得的结果与传统的 LLE 进行了比较。

首先，使用经典的 LLE 方法从蜂蜜中萃取农药。将 1 g 蜂蜜样品溶于 2 mL 水中。接下来，加入 6.5 mL 乙腈并机械振摇混合物 30 min。在本例中，蜂蜜中高浓度的糖类将发生与盐析效应类似的“糖析”效应（请参阅第 8 章中对盐析的解释），引起两种溶剂分层。离心分离有机层和水层。将有机层蒸发至 100 μL，并将其加入到 100 μL 水中。过滤该萃取液，并注入 LC-MS/MS 系统。对于 SLE 方法，加入 1.25 mL 水和 2.5 mL 乙腈进行机械搅拌 1 h 之前，先在 1 g 蜂蜜样品中加入替代物标准品。加入 1.25 mL 20% NaCl 溶液后，将混合物上样至 5 mL Chem Elut SLE 小柱上。等待 15 min 后，利用重力作用，使用 10 mL 乙酸乙酯洗脱分析物 2 次。萃取物在温和的氮气气流中蒸发至干，然后取 200 μL 转移至装有乙腈-水溶液 (10:90) 的样品瓶中，用于 LC-MS/MS 分析。无需进一步的纯化，即可采用 LC-MS/MS 的 ESI 模式分析萃取物。通过优化 LC 梯度成功分离了 17 种农药。采用 MRM 模式鉴定出了具有不同质量的共洗脱农药。

图 7.5 展示了分别采用 Chem Elut SLE 与经典 LLE 获得的回收率的比较。比较结果显示，SLE 萃取流程对大多数化合物的萃取效率与 LLE 相当或比 LLE 更高。我们还特别注意到，LLE 对 Ch、Ri 和 TOH 的回收率结果出乎意料地很差。SLE 方法在原始蜂蜜浓度为 0.1-20 ng/g 的范围内展示出良好的线性，相关系数范围为 0.921 到 0.999（具体数值取决于农药种类）。回收率远高于官方方法中指定的范围⁹。重现性在 8 到 27% 之间，在测定浓度的可接受范围内。文章分析了 100 多个原始蜂蜜样品以测试方法的稳定性。有关该方法的更多细节，请参阅参考文献 11。

图 7.5
农药回收率的比较：LLE 与 SLE



农药及其在回收率研究中的含量

农药名称	缩写	含量 (ng mL ⁻¹)	农药名称	缩写	含量 (ng mL ⁻¹)
酰嘧磺隆	Am	0.4	利谷隆	Li	2.0
阿特拉津	At	0.4	灭虫威	Mh	10.0
卡巴呋喃	Ca	0.4	甲硫威亚砷	MhS	20.0
绿麦隆	Ch	20.0	磺草唑胺	Mo	2.0
乙霉威	De	2.0	抗蚜威	Pi	0.4
乐果	Dm	2.0	玉嘧磺隆	Ri	0.4
氟虫腈	Fi	10.0	西玛津	Si	2.0
吡虫啉	Im	2.0	2-羟基特丁津	TOH	1.0
异噁唑草酮	Is	2.0			

与 LLE 相关的技术

液-液萃取 (LLE) 技术仍然是常规样品前处理最常用的技术之一。经典的 LLE 需要使用的溶剂通常有毒且用量非常大，而且 LLE 操作非常耗时。近年来，人们对于使用组合溶剂而且能节省样品的小型化分析方法越来越感兴趣；现在已经出现了关于小型化液相萃取新方法的报道。与经典的 LLE 相比，这些方法可实现更有效的样品富集、更快速的样品前处理和更简单的自动化。

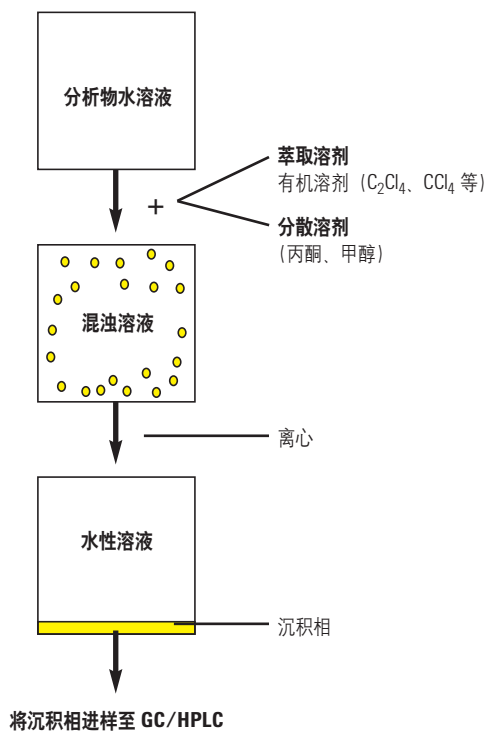
微萃取

微萃取是 LLE 的另一种形式，它使用的有机相:水相的相比率范围是 0.001-0.01。它所使用的有机溶剂体积相对较小，降低了分析物的回收率，但有机相中分析物的浓度明显升高。此外，溶剂的使用量大大减少。萃取过程在容量瓶中进行。选用密度比水小的有机溶剂，以便小体积的有机溶剂积累在容量瓶狭窄的颈瓶处，便于移取。可利用盐析效应来提高分析物在有机相中的浓度。需要使用内标，并且校准标准品应与样品一起进行萃取。请记住，正如在“不同相的互相溶解度”中所讨论的，为了确保萃取溶剂被其相对的溶剂所饱和，在将样品放入容量瓶之前，应使有机溶剂与水溶剂达到平衡。

微萃取的一个新的变化形式——分散液-液微萃取 (DLLME) 已经被成功应用于多种分析物-基质对的分离¹¹。该技术基于三组分溶剂系统。DLLME 所使用的容器通常是离心试管，使用注射器将适当的不混溶有机萃取剂混合物（通常为几微升，例如约 8 μL 四氯乙烯）和分散溶剂（例如约 1 mL 丙酮）快速注入含有目标分析物的水相溶液中（约 5 mL）（见 **图 7.6**）。分散溶剂的作用是确保有机相与水相互溶。快速混合溶剂时，会形成浑浊的溶液，它由完全分散进入水相的萃取溶剂的形成的微小颗粒（液滴）组成。由于溶液已经高度分散，无需再剧烈地摇晃。萃取几乎是瞬时完成的，远远快于通常需要 30 min 或更长时间的固相微萃取 (SPME) 和液相微萃取 (LPME)。接下来，离心全部混合物（以 6000 rpm 的转速离心 1.5 min），使有机萃取溶剂的微小液滴沉积下来。然后使用微注射器或微量移液枪头进行转移。含有目标分析物的有机溶液可以直接进样分析，也可蒸发后使用更合适的溶剂溶解后用于色谱分析。在最初的研究中¹¹，作者成功地实现了水样中多核芳香烃约 600-1100 倍的富集，并且回收率相当出色。更多信息，请参阅综述文章¹²。

图 7.6

传统 DLLME 的工作流程



(由托莱多大学的 Jared Anderson 提供)

Caldas 和他的同事们应用 DLLME 的一个实例¹³ 展示了采用 DLLME 萃取水样中的农药（克百威、异恶草松和戊唑醇）并进行 LC/MS/MS 分析的出色结果。在研究中，他们发现，采用 60 μL 的萃取溶剂（四氯化碳）、2 mL 的分散溶剂（乙腈）萃取 5 mL 经磷酸酸化 pH 为 2.0 的加标水样时，萃取效果最佳。由于乙腈的溶剂强度太大，不能用于他们的 LC 色谱柱，他们将溶剂蒸发至干并用 HPLC 级的甲醇溶解残留物。DLLME 方法开发的变量包括：分散溶剂的选择（图 7.7）及其体积、萃取溶剂及其体积的选择（图 7.8）、pH（如有必要）和离心速度。这三种农药的线性范围是 0.001-1.0 mg/L，定量限 (LOQ) 为 0.02 mg/L。总而言之，DLLME 技术简单、快速、回收率高、成本低且能提供出色的富集因子。

图 7.7

农药 DLLME 中分散溶剂的比较

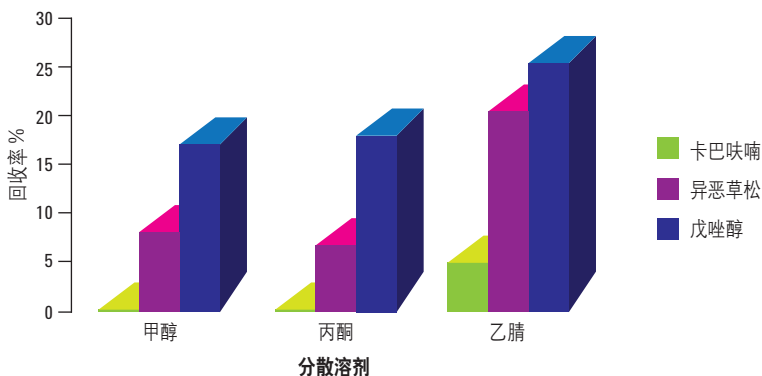
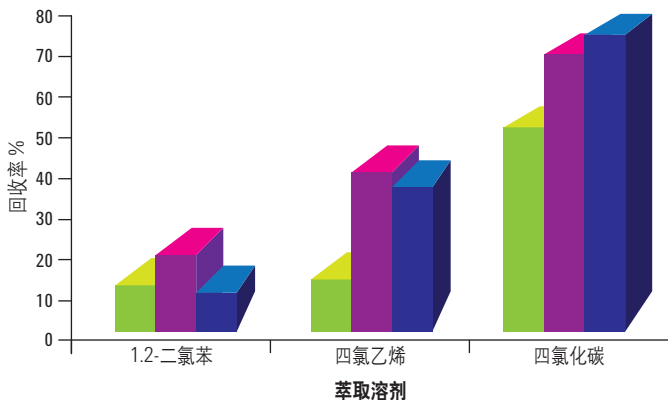


图 7.8

农药 DLLME 中萃取溶剂的比较



单滴微萃取 (SDME)

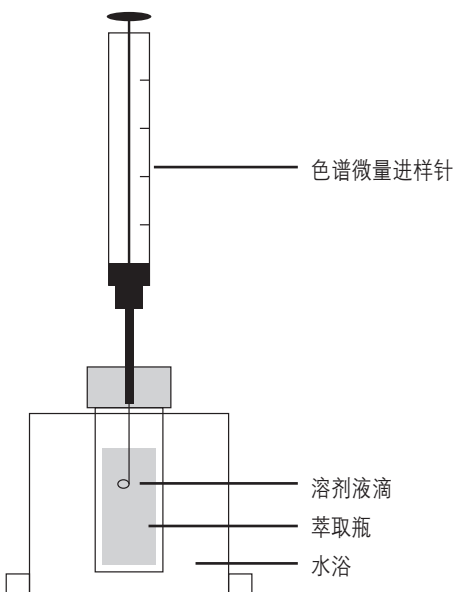
由 Pawliszyn 和他的合作者们¹⁵于 1990 年共同开发的固相微萃取 (SPME) 技术操作简单且成本相对较低, 如今已被广泛用于气相色谱的采样和样品前处理, 在一定的范围内还可用于液相色谱 (请参阅第 10 章, 固相微萃取)。在 SPME 中, 涂覆了固定相的纤维被置于溶液或顶空中, 然后分析物通过扩散和/或对流转移至固定相。浓缩的分析物经热脱附 (GC) 或液相萃取 (LC) 转移到色谱柱。该技术的普及已经带动了类似技术的发展。

这些技术的其中之一就是“单滴微萃取”(SDME) 技术, 它采用包含在 PTFE 棒或 GC 进样针针头末端的溶剂液滴取代了带涂层的纤维。分析物扩散进入该液滴的方式与进入 SPME 纤维的方式相似。最初由 Cantwell 和 Jeannot 发表的研究成果¹⁵基于 Liu 和 Dasgupta 的实验¹⁶。后者研究了气体分子到液体微滴的分配过程。

单滴微萃取也被称为溶剂微萃取、液相微萃取和液-液微萃取。在 Cantwell 和 Jeannot 最初的实验中¹⁶, 8 μL 不混溶的有机溶剂 (正辛烷) 液滴包含在杆状的、一端掏空的 PTFE 探头中。探头浸入 1 mL 样品瓶内的水样中, 同时对样品瓶进行磁力搅拌。因为 8 μL 体积太大而不能直接注入气相色谱, 所以作者采用了小份样品, 灵敏度受到了限制。但是, 在他们之后的出版物¹⁷以及 He 和 Lee 的类似研究中¹⁹, 通过使用 GC 进样针针头支撑液滴而将液滴尺寸降到了 1-2 μL 。接下来就能将整个液滴注入 GC。单滴微萃取实验的示意图如图 7.9 所示。

图 7.9

SDME 实验装置



在 SDME 中，要获得可重现的结果，必须精确控制某些实验参数。与 SPME 类似，SDME 流程并不能达到分配平衡，因此精确定时对于获得好的重现性非常关键。Cantwell 和 Jeannot¹⁵ 发现，即使仅完成了达到平衡所需的 38% 的萃取过程，他们仍能维持 1.5% 以内的相对标准偏差。请注意，SDME 实验中的富集因子一般都小于 100。表 7.3 列出了一些已经成功应用于 SDME 的有机溶剂。

顶空 SDME 实验装置

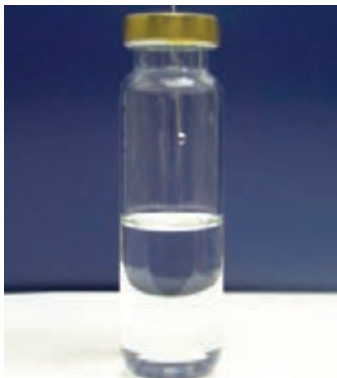


表 7.3

典型的 SDME 萃取溶剂

正己烷
正辛烷
异辛烷
环己烷
正十六烷
甲苯
氯仿
乙酸丁酯
二异丙醚

比较了 SDME 与 SPME 技术对水样中痕量有机污染物¹⁹ 和硝基芳烃类爆炸物²⁰ 的分析之后, 作者发现, 总体而言, 这两种技术在精度和分析时间上可相媲美。SDME 的优势是溶剂用量少, 并且可使用各种溶剂或混合溶剂, 因此在不同有机物质的萃取方面具有一定程度的选择性。SPME 的选择性由纤维的聚合物涂层的选择性决定。在 SDME 中, 溶剂快速蒸发, 而 SPME 的热脱附(溶剂在高温进样口中从聚合物上脱附)是一个缓慢的过程, 可能导致峰拖尾。SPME 的纤维必须不定期更换, 而 SDME 只使用标准的注射器。有时 SDME 中样品的搅拌或超声处理可能会导致悬挂液滴出现问题。可以采用静态萃取或动态萃取作为替代方法。如果液滴太大, 它有可能在搅拌时从注射器尖端掉落。与 SPME 不同, SDME 中的有机液滴可能会微溶于水样。其溶解程度取决于萃取溶剂的水溶性。萃取时间越长, 液滴尺寸减小得越多。大多数萃取实验的时间都低于 15 min, 因此溶解问题不会造成太大影响。另外, 实验中必须注意避免注射器针头的交叉污染。

SDME 的优势之一是样品提取物溶于极小体积(1 或 2 μL) 的有机溶剂中, 基本上可以直接进样至 HPLC 进样器。将 SPME 连接到 HPLC 涉及到复杂的仪器排布。许多分析物从 SPME 纤维溶出的速度非常慢, 导致其在转移到 HPLC 色谱柱的过程中造成初始谱带展宽。有一篇出版物介绍了应用单滴液相微萃取及 HPLC 分析去蛋白血浆和尿液中的金丝桃素的实验²¹。本文的作者并没有直接将液滴进样至 HPLC 进样器, 而是将其转移到了微量样品瓶中, 使用水相溶性溶剂(甲醇)将样品稀释至 30 μL 之后再进样至反相 HPLC 色谱柱。

在第 6 章中, 我们介绍了顶空-SDME 技术。与顶空-SPME 类似, 位于注射器针头底部的微液滴取代了纤维, 该微液滴暴露于样品瓶或其他密闭容器内的固体或液体样品的顶空中。图 7.9 右侧展示了顶空-SDME 的实验装置。读者可以参考第 6 章获取有关该技术的更多详细信息。

流动注射萃取 (FIE)

FIE 技术最初由 Karlberg 和 Thelander²² 提出，它的设计弥补了传统液-液萃取的缺点。在 FIE 中，水样被注入液流。然后在该液流中持续地加入分段的不混溶有机溶剂。分段的液流流经盘管时将发生分配，有机相与水相分离并被引导至流通池中用于测定。在某些情况下，我们会在段与段之间引入空气段，以使溶剂顺利通过，避免过度的混合。如今的系统已经发展到无需达到最终的相分离。与传统的 LLE 相比，FIE 使用的溶剂量显著减少，每次分析只需几百微升溶剂。该技术与原子吸收光谱仪或电感耦合等离子体光谱仪联用，已广泛用于金属离子的在线痕量富集。其他的连续流动液-液萃取技术似乎更具吸引力并且能达到更大的富集因子。

其他涉及 LLE 概念的技术

如今，人们对于不同构造的多孔膜（例如中空纤维膜、圆柱形膜以及平面膜）与各种液-液萃取技术的结合日益关注。基于聚合物的膜是样品与萃取溶剂之间的屏障。只有特定种类的物质能够穿过薄膜孔，这增加了萃取的选择性。这些技术将在第 18 章中详细介绍，这一章的重点是样品前处理中膜的使用。

QuEChERS 以及相关的盐析萃取技术最近获得了极大的关注，尤其是在水果和蔬菜样品中的农药萃取应用方面。

QuEChERS 技术将液-液萃取与分散固相萃取相结合，它与本章概述的传统 LLE 方法又有所不同。第 8 章将着重介绍 QuEChERS 和其他用于样品萃取的盐析技术。

参考文献

1. Snyder, L.R. *J. Chromatogr. Sci.* **1978**, 16, 223
2. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd Ed., Chapter 2 and Appendix I.2, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, **2010**
3. Snyder, L.R. *Chemtech* **1979**, 9, 750
4. Snyder, L.R. *Chemtech* **1980**, 10, 188
5. Ma T.S.; Horak, V. *Microscale Manipulations in Chemistry*, Wiley, New York, **1976**
6. Mandava N.B.; Ito, Y. (Eds.) *Countercurrent Chromatography: Theory and Practice*, Dekker, New York, **1988**
7. Riddick, J.D.; Bunger, W.B. *Organic Solvents*, Wiley-Interscience, New York, **1970**
8. Pirard, C. *Mass Spectrometry Laboratory*, University of Liege, Belgium, published in Agilent Technologies Application Note Si-01002, **August 2010**
9. REF:Commission Decision 2002/657/EC, Off. *J. Eur.Commun.* **August 12, 2002**
10. Pirard, C.; Widart, J.; Nguyen, B.K.; Deleuze, C.; Heudt, L.; Haubruge, E.; De Pauw, E.; Focant, J.-F. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1152 (1-2)*, 116-123
11. Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseini, M.-R. M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. *J. Chromatogr. A* **2006**, 16, 1-9
12. Rezaee, M.; Yamini, Y.; Faraji, M. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 2342-2357
13. Caldas, S.S.; Costa, F.P.; Primel, E.G. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *665 (1)*, 55-62
14. Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145
15. Jeannot, M.A.; Cantwell, F. F. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2236-2240
16. Liu, S.; Dasgupta, P.K. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2042-2049
17. Jeannot, M.A.; Cantwell, F.F. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 235-239
18. He, Y.; Lee, H.K. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4634-4640
19. Buszewski, B.; Ligor, T. *LCGC Europe* **2002**, 15 (2), 92-97
20. Psillakis, E.; Kalogerakis, N. *J. Chromatogr. A* **2001**, *938 (1-2)*, 113-120
21. Gioti, E.M.; Skalkos, D.C.; Fiamegos, Y.C.; Stalikas, C.D. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1093*, 1-10
22. Karlberg, B.; Thelander, S. *Anal. Chim. Acta* **1978**, *98*, 1-7

QuEChERS、盐析液-液萃取和相关技术

盐析萃取

液-液萃取 (LLE) 长期以来一直是分离在两种不混溶液体中溶解性不同的化合物的有效方法 (请参阅第 7 章)。这两种液体通常是水 (可能含有一些添加剂或 pH 经过了调整) 和非极性有机溶剂 (例如异辛烷或乙酸乙酯)。通常情况下, 极性化合物倾向于进入水层, 而非极性化合物会被萃取到有机层。使用与水不混溶的非极性有机溶剂的缺陷在于, 由于其介电常数较低, 使用它们萃取强极性或高度带电的溶质时效果不佳, 尤其是对于需要在非常低或非常高的 pH 条件下进行萃取的高度水溶性药物。极性更强的溶剂 (例如对这些极性更强的化合物具有更高溶解性的乙腈) 通常可与水互溶, 因此不能用于传统的 LLE。

人们早就知道, 向可与水混溶的有机溶剂与水的混合物中加入无机盐能够将溶剂从混合物中分离出来, 形成两相系统¹。许多可与水混溶的有机物 (例如丙酮、甲醇、乙醇和乙腈) 都能产生这种“盐析”现象。不同的盐会导致不同程度的相分离。盐析系统中所使用的强极性、可与水混溶的溶剂已经经过了大量的研究, 能够萃取或浓缩传统 LLE 溶剂无法萃取的多种分析物。这种盐析效应通常发生在高盐浓度条件下。在某些情况下, 使用高浓度的糖类也能实现“盐析”效应 (或许这种情况下更适合称为“糖析”)²。由于这种简单的萃取过程所得的萃取物不如其他样品前处理流程得到的萃取物纯净, 因此它在采用选择性较强的 GC 或 HPLC 检测方法时特别有用。

盐析萃取已被用于预浓缩水中的中等极性有机物。Leggett 及其同事的研究成果表明，使用乙腈/NaCl 盐析萃取法萃取水中的痕量爆炸化合物能够达到较高的回收率³。他们最初尝试使用二氯甲烷作为萃取溶剂进行传统的 LLE 萃取，结果发现，HMX 和 RDX 等亚硝胺类化合物的萃取效率相当低。在水中添加氯化钠略微改善了萃取结果，而使用乙腈进行盐析萃取时则获得了最佳的总体回收率。实际上，用于从水中分离 ng/L 水平硝基芳烃和硝胺类爆炸物的美国环境保护局方法 8330A 正是基于盐析萃取法⁴。该方法的步骤包括将 251 g 氯化钠加至含有 770 mL 水样的 1 L 容量瓶中。接下来加入 164 mL 乙腈并搅拌，然后进行相分离步骤。转移上层乙腈后，进行额外的小体积萃取和反萃取。最后，将一份样品注入反相 HPLC 色谱柱并使用氰基色谱柱进行进一步确认。

利用盐析效应进行的萃取在农药分析领域的应用越来越广泛。首先，使用乙腈和甲醇等可与水混溶的有机溶剂萃取各种植物性食品样品中的非离子型农药。根据 Luke 方法，丙酮-水 (65:35, v/v) 溶液也可用于此目的⁵。Mills 和他的同事们采用了多种类、多残留方法 (MRM)，使用乙腈萃取各种植物来源的食品样品中的非极性农药⁶。通过向乙腈萃取物中添加 NaCl 能使目标分析物被分配进入极性非常弱的石油醚中。使用乙腈萃取后接着进行盐析的方法被证明更适用于萃取植物性样品中的非极性和极性农药，现在该方法也已经被多个监管机构采用⁷。但是，萃取物还是相当“脏”。

1993 年，美国农业部（宾夕法尼亚州温德穆尔）的 Anastassiades、Lehotay 及其同事⁸进一步优化了乙腈萃取法，他们采用了在 NaCl 盐析之后添加干燥剂 ($MgSO_4$) 的方法，这样就能除去水分并迫使农药进入乙腈相。“QuEChERS”（发音“catchers”，意为“捕手”）技术的名称由英文 Quick（快速）、Easy（简便）、Cheap（经济）、Effective（高效）、Rugged（耐用）和 Safe（安全）的缩写组成，一问世就迅速获得了广泛的关注⁹。以下几页的内容将介绍 QuEChERS 技术。

QuEChERS，简单高效的萃取技术

自 2003 年问世以来，QuEChERS 技术的应用已经越来越广泛，尤其是在水果和蔬菜中多类别、多残留农药分析的样品净化方面。如今，这项技术的应用已超越了这些传统样品，扩展到了肉制品、鱼类、血液甚至土壤样品。这一简单的两步萃取技术基于盐析萃取和之后的分散固相萃取 (dSPE) 纯化。最初的 QuEChERS 方法采用 NaCl 进行盐析⁸，但人们发现一些对碱敏感的化合物（例如杀真菌剂百菌清和克菌丹）回收率较差，因此对方法进行了优化。该发现推动了初始萃取步骤中两种缓冲方法的发展。其中一种新的方法使用 1% 醋酸/醋酸钠缓冲盐，而不是 NaCl¹⁰，该方法构成了美国分析化学家协会 (AOAC) QuEChERS 2007.01 方法的基础¹¹。另一种新方法 — EN-15662 EU 方法 — 使用由 1 g 柠檬酸钠和 0.5 g 柠檬酸二钠盐 (pH 5.5) 组成的较弱的缓冲系统，在大多数情况下，该方法与 AOAC 方法等效¹²。这两种萃取方法略有不同，例如其使用的样品重量、溶剂体积等存在细微差别。

在乙腈萃取步骤之后引入 dSPE 步骤，所得的萃取物离心之后的上清液就能直接注入 GC/MS、LC/MS 或 MS/MS 系统进行分析，在 dSPE 步骤中，通过将一部分粗提物与散装 SPE 吸附剂（如 C18、N-丙基乙二胺 (PSA) 吸附剂和石墨化炭黑）混合，实现了萃取物的进一步纯化。在 dSPE 中，吸附剂的作用是吸附基质和不需要的组分，而将目标分析物留在液相中。这与固相萃取的“结合-洗脱”常规操作模式相反（请参阅第 9 章），在这种模式中，吸附剂的作用是保留目标分析物而不是基质。

QuEChERS 净化现在已经广泛用于各种水果和蔬菜中数百种农药残留的常规分离。虽然从一般的实验室用品目录中就能很容易地找到组装 QuEChERS 萃取装置所需的各种材料，但许多用户还是倾向于购买预包装的试剂盒。大多数公司销售的 QuEChERS 萃取产品都提供三种试剂盒，分别用于原始的无缓冲方法、AOAC 方法和 EU 方法。这些试剂盒都提供尺寸合适的离心管，其中装有预称重的盐和分散 SPE 吸附剂。有些供应商（如安捷伦科技公司）还提供根据水果和/或蔬菜样品的性质（如高脂肪含量的基质或高色素的基质）而设计的专用 dSPE 试剂盒。针对需要客户化 QuEChERS 实验的用户，还有散装出售的单独 dSPE 吸附剂。

图 8.1 展示了如何执行这一简单的萃取流程。

图 8.1

QuEChERS

步骤 1：盐析萃取



称取样品



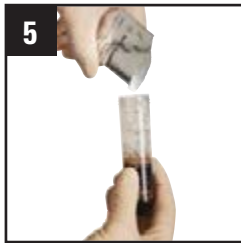
根据需要加入水和
QC 加标物，并加入内标



加入乙腈



涡旋或振摇



加入盐包



振摇 1 分钟

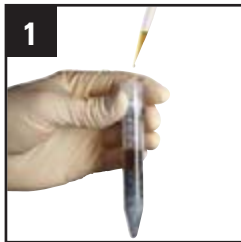


以 4000 rpm 的
转速离心 5 分钟



乙腈和水层的相分离

步骤 2：分散固相萃取 (dSPE)



选择分散净化试剂盒
并加入乙腈萃取物



涡旋振荡 1 分钟



以 4000 rpm 的
转速离心 5 分钟



吸取一份上清液并根据
需要进行干燥或稀释



放入自动进样器样品瓶中
进行气相色谱或液相色谱分析

初始样品前处理（图 8.1.1）

称取 10 g (AOAC) 或 15 g (EN) 等份的均质样品至 50 mL 离心管中。由于该方法采用的样品质量低于传统萃取方法的样品质量，所以确保初始样品（重量可达千克级）达到完全均质极为重要。因此我们建议使用强大的切碎装置来均质样品，使其表面积最大化以确保更好的萃取效率。这样的均质过程有助于确保 10 或 15 g 的子样品能代表初始样品。为了防止均质步骤中挥发性农药的损失，我们建议添加两个额外的操作步骤：预冷冻切碎的样品和添加干冰。由于水是初始萃取步骤中要用到的两种溶剂之一，实验的这个阶段必须有水的存在。许多水果和蔬菜样品都含有 80-95% 的水，这些水分是分配作用起效的必要条件。对于像豆类或谷物这样的干燥样品，应添加合适比例的水。

萃取 — 分配溶剂（图 8.1.2）

接下来，取 10 mL (EN 方法) 或 15 mL (AOAC 方法) 乙腈至含有固体样品的离心管中。虽然也可使用丙酮和乙酸乙酯等其他非卤代的溶剂，但我们还是建议使用乙腈作为 QuEChERS 萃取溶剂，因为加入盐之后，乙腈比丙酮更易与水分离。乙腈的极性比丙酮和乙酸乙酯的极性更强。根据“相似相溶”的原理，中等极性到高极性的农药在乙腈中的溶解性比其他两种溶剂中的溶解性更好。因此，使用乙腈能够显著改善极性农药的萃取回收率。

乙酸乙酯的缺点是：1) 仅能与水部分混溶（但它能萃取脂质和蜡质）；2) 对酸性/碱性农药的回收率较低；3) 用于 dSPE 时纯化效果不佳。但是，乙腈萃取亲脂性物质的能力较差。与使用丙酮时相比，使用乙腈时，硫酸镁能够更好地去除残留的水分。虽然乙腈在 GC 进样口的气化过程产生的溶剂膨胀体积相对较大、会干扰氮选择性 GC 检测器，而且比其他常用的 GC 溶剂挥发性更弱，但是它可兼容 HPLC 流动相和 GC 应用。因此，如果为了使用 HPLC 溶剂复溶分析物或为了提高浓度（针对非挥发性物质）而需要进行蒸发浓缩步骤，该过程将更加耗时。在加入盐之前（图 8.1.4），振摇样品-乙腈混合物以浸润全部样品（图 8.1.3）。这个步骤还能防止因为（在下一个步骤中）加入盐而短时产生的热量导致不稳定农药的损失。

盐的添加 (图 8.1.4)

添加盐的目的是诱导相与相分离。盐析效还会影响基于所用萃取溶剂的分析物分配。盐的浓度能影响有机相中水的百分比,并能调整它的“极性”。在 QuEChERS 萃取中,通常仅使用乙腈就足以获得优异的萃取效率,无需添加会稀释萃取物并使其变得极性极弱的非极性共溶剂。在某些情况下,必须控制萃取过程的 pH。

大多数农药(但不是全部)在低 pH 条件下更稳定。对于某些较为棘手的农药(例如在低 pH 下会强烈质子化的农药),要实现成功萃取,萃取系统的 pH 必须在 2-7 范围内调整¹³。当然,萃取时的 pH 也会影响基质化合物的共萃取和农药的稳定性。对于该步骤,非常重要的一点是将盐加入振摇后的乙腈-样品混合物中。如果反过来将样品添加到盐混合物中,可能会发生放热反应,造成挥发性农药的损失或引起不稳定农药的降解。现在已经有了用于盐添加步骤的商品化预称重盐混合物(无水,在氮气环境下包装),其操作方便,具有可直接倾倒的包装。由于会产生局部放热效应,建议不要使用预填充盐的离心管。

添加内标 (图 8.1.2 和 图 8.1.5)

为了最大程度减小 QuEChERS 方法的多个步骤产生的误差,我们会通常在处理过程的某个阶段添加内标,有时是在盐析萃取步骤等较早阶段。在最初的开发研究中,作者⁸采用了磷酸三苯酯(TPP),它所具备的属性能够实现低脂肪基质中的定量萃取。但是,后来作者发现,使用一种以上的内标作为质量控制的手段,会由于分配或净化过程中的移液错误或歧视而产生误差¹⁴。振摇样品-内标-乙腈-盐混合物 1 min 后,将离心管置于离心机(图 8.1.6)并以 4000 rpm 的速度离心 5 min,以确保相与相分离,并使多余的盐和基质与上清液分离(图 8.1.7)。

为了彻底混合固相和液相并减少振摇时间,我们建议在初始萃取步骤所用的 50 mL 离心管中使用安捷伦陶瓷均质子。这些惰性、无孔的固体棒状均质子具有带一定角度的切削表面,有助于确保样品与萃取化学物质之间紧密接触和打破盐结块(如果存在的话)。它们已经被证明能够显著减少振摇时间¹⁵和减少人员之间的操作差异,因为手动振摇也是 QuEChERS 过程的变量之一。RSD 也有所改善。

dSPE (图 8.1.8)

一般来说, SPE 纯化使用含有不同量的吸附材料的塑料小柱。执行 dSPE 时, 将一份样品萃取物 (例如 1、6 或 8 mL) 加入含有少量 SPE 吸附剂的样品瓶中 (图 8.1.8), 手动振摇 (1 min) 或使用涡旋混合器混合, 使松散的 SPE 材料均匀分布, 以完成纯化过程。接下来通过离心分离吸附剂 (图 8.1.9), 然后取一份上清液 (图 8.1.10) 进行分析 (图 8.1.11)。吸附剂的作用是保留基质组分, 而不是目标分析物。在某些情况下, 可以使用混合吸附剂。对于具有高脂肪基质的样品, 我们推荐使用 N-丙基乙二胺 (PSA) 与 C18 的混合吸附剂。对于含高浓度叶绿素和类胡萝卜素的样品 (例如菠菜和胡萝卜), 采用 PSA 与石墨化炭黑的混合吸附剂可以减少此类有色化合物。虽然添加石墨化炭黑有助于去除色素, 但这会导致某些平面结构农药 (例如多菌灵和啉菌环胺) 的回收率较低。在萃取步骤中添加甲苯可以提高平面结构农药的回收率¹⁶。现在已经有了既能去除叶绿素, 又不会吸附平面结构农药的新型吸附剂。

表 8.1 提供了如何根据样品基质的性质 (例如脂肪含量、蜡质以及色素的存在和色素的水平) 来匹配 dSPE 吸附剂与水果和蔬菜样品基质的一些指导。为方便起见, 该表还提供了各种 QuEChERS dSPE 试剂盒的安捷伦部件号。

表 8.1

根据食品基质选择 dSPE 吸附剂

QuEChERS 分散固相萃取试剂盒，水果和蔬菜

试剂盒	规格	单位	AOAC 2007.01 方法	欧盟方法	
			工具包组成 部件号	工具包组成 部件号	
 <p>常规水果和蔬菜： 去除极性有机酸、部分糖和脂类</p>	2 mL	100/包	50 mg PSA	25 mg PSA	
			150 mg MgSO ₄	150 mg MgSO ₄	
			5982-5022	5982-5021	
			5982-5022CH	5982-5021CH	
	15 mL	100/包	400 mg PSA	150 mg PSA	
			1200 mg MgSO ₄	900 mg MgSO ₄	
5982-5058			5982-5056		
5982-5058CH			5982-5056CH		
 <p>含脂和蜡的水果和蔬菜： 去除极性有机酸、某些糖类，多数脂类和固醇类</p>	2 mL	100/包	50 mg PSA	25 mg PSA	
			50 mg C18EC	25 mg C18EC	
			150 mg MgSO ₄	150 mg MgSO ₄	
			5982-5122	5982-5121	
	15 mL	50/包	5982-5122CH	5982-5121CH	
			400 mg PSA	150 mg PSA	
			400 mg C18EC	150 mg C18EC	
			1,200 mg MgSO ₄	900 mg MgSO ₄	
5982-5158	5982-5156	5982-5158CH	5982-5156CH		
				5982-5158	5982-5156
				5982-5158CH	5982-5156CH
				5982-5158	5982-5156
 <p>含色素的水果和蔬菜： 去除极性有机酸、某些糖类和脂类、以及类胡萝卜素和叶绿素；不能用于平面结构的农药残留测定</p>	2 mL	50/包	50 mg PSA	25 mg PSA	
			50 mg GCB	2.5 mg GCB	
			150 mg MgSO ₄	150 mg MgSO ₄	
			5982-5222	5982-5221	
	15 mL	50/包	5982-5222CH	5982-5221CH	
			400 mg PSA	150 mg PSA	
			400 mg GCB	15 mg GCB	
			1,200 mg MgSO ₄	885 mg MgSO ₄	
5982-5258	5982-5256	5982-5258CH	5982-5256CH		
				5982-5258	5982-5256
5982-5258CH	5982-5256CH				

部件号后标有 "CH" 表明萃取管配有陶瓷均质子。

(接转下页)

QuEChERS 分散固相萃取试剂盒，水果和蔬菜

试剂盒	规格	单位	AOAC 2007.01 方法		欧盟方法 EN 15662
			工具包组成 部件号	工具包组成 部件号	
 <p>高色素含量的水果和蔬菜： 去除极性有机酸、某些糖类和脂类、以及高含量水平的类胡萝卜素和叶绿素；不能用于平面结构的农药残留测定</p>	2 mL	100/包			25 mg PSA 7.5 mg GCB 150 mg MgSO ₄ 5982-5321 5982-5321CH
	15 mL	50/包			150 mg PSA 45 mg GCB 855 mg MgSO ₄ 5982-5356 5982-5356CH
	2 mL	100/包	50 mg PSA 50 mg GCB 150 mg MgSO ₄ 50 mg C18EC 5982-5421 5982-5421CH		
	15 mL	50/包	400 mg PSA 400 mg GCB 1200 mg MgSO ₄ 400 mg C18EC 5982-5456 5982-5456CH		

部件号后标有“CH”表明萃取管配有陶瓷均质子。

(接转下页)

QuEChERS 分散固相萃取试剂盒：其它食品分析方法

其他食品方法	2 mL	100/包	25 mg C18
去除生物基质干扰， 包括疏水物质（脂肪、 脂类）和蛋白质			150 mg MgSO ₄ 5982-4921 5982-4921CH
	15 mL	50/包	150 mg C18 900 mg MgSO ₄ 5982-4956 5982-4956CH
所有食品类型	2 mL	100/包	50 mg PSA 50 mg C18 7.5 mg GCB 150 mg MgSO ₄ 5982-0028 5982-0028CH
去除所有基质干扰物， 包括极性有机酸、脂类、 糖类、蛋白质、类胡萝卜 素和叶绿素	15 mL	50/包	400mg PSA 400 mg C18 45 mg GCB 1200 mg MgSO ₄ 5982-0029 5982-0029CH
动物源性食品	15 mL	50/包	50 mg PSA 150 mg C18EC 900 mg Na ₂ SO ₄ 5982-4950
去除极性有机盐类、糖类、 脂类和蛋白质等基质干扰			

部件号后标有 "CH" 表明萃取管配有陶瓷均质子。

“分析物保护剂”（可选）：

这是主要用于 GC 分析的一个可选的步骤，对于在中等 pH 条件下不稳定的农药以及在 GC 系统中分析效果较差（例如由进样口衬管、GC 毛细管色谱柱和其他内表面的活性位点造成的 GC 流路表面活性导致的响应损失、峰拖尾等）的敏感分析物非常有用。在这种情况下，在样品注入 GC 系统前向萃取物中加入分析物保护剂。保护剂化合物不会干扰目标农药的分析，但会减弱这些敏感农药与 GC 流路活性位点之间的相互作用，从而保护这些农药，避免出现不良的色谱性能。已有许多深入的研究致力于筛选出适当的分析物保护剂¹⁷⁻¹⁸。结果表明，由基质效应引起的 GC 分析误差在分析物保护剂的帮助下也得以明显减少。当然，我们不建议将保护剂用于 LC 和 LC/MS。

分析

离心后（**图 8.1.9**），确保上清液中无任何吸附剂或多余的盐，就能将 dSPE 步骤得到的样品直接注入 GC 或 HPLC 系统进行分析，无需进一步的检查。对于 LC/MS 分析，可能需要使用酸性的水进行稀释以保证 MS 的色谱完整性。对于 GC/MS 分析，如果仪器未配备程序升温气化进样口，可能需要蒸发上清液后采用与 GC 兼容的溶剂复溶萃取物。通过简单的 QuEChERS 流程获得的萃取物通常不如采用其他较为繁琐的样品前处理流程（如 SPE）获得的萃取物纯净。因此，我们强烈建议您使用选择性的检测方法。

QuEChERS 的应用

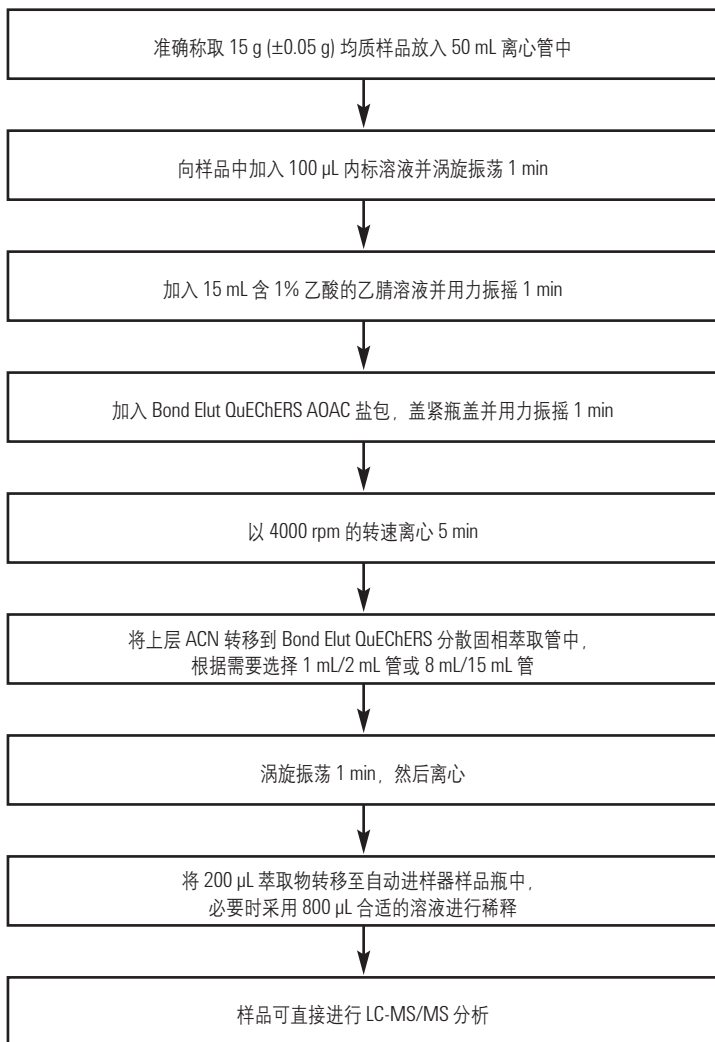
虽然 QuEChERS 方法主要用于食品和其他农产品中农药的分析，但它的应用范围正在不断扩展。**表 8.2** 列出了该方法涉及不同分析物和不同基质的典型已发表应用，展示了这一日益发展的样品前处理技术的多功能性。

表 8.2

选出的 QuEChERS 应用简报		
分析物	基质	安捷伦参考应用简报
丙烯酰胺	食用油	5990-8988EN
	炸薯条	5990-5940CHCN
氨基酸	菠菜、苹果	J.W.Henderson, T. Faye, U. Wittek, and J. Stevens, poster paper presented at RAFA 2009, Prague, Czech Republic
激素	虾	5990-6589CHCN
PAH	鱼类	5990-5441CHCN、5990-4248EN、5990-6668CHCN、5990-7908EN、5990-7714CHCN
	土壤	5990-5452EN (AOAC)、5990-6324CHCN 5990-6324CHCN、5990-5452EN
PCB	鱼类	5990-6263EN、5990-7908EN、5990-7714CHCN
农药	苹果	5990-4468EN、5990-6558EN、5990-3937EN
	大米	5990-8034EN
	绿茶	5990-6400CHCN
	柠檬油	5990-6432EN
	菠菜	5990-4305EN (AOAC)、5990-4395EN、5990-4247EN、5990-4248EN、5990-9317CHCN
	生菜	5990-6558EN
	婴儿食品	5990-5028EN
	面粉	5990-9317CHCN
	胡椒	
	橙子	
	胡萝卜	5990-Si-02213
	青椒	5990-8067CHCN、5989-8614EN
	黄瓜	5990-8067CHCN、5990-6323EN
	番茄	5990-8067CHCN、5990-6323EN、5989-8614EN
	茶叶 (绿茶和红茶)	5990-9865CHCN
	大豆	Si-02213
	鳄梨	Avocado_poster_EPRw2006.pdf
	鱼类	5990-7908EN、5990-7714CHCN、5990-6595CHCN
	橄榄油	5990-5553CHCN、5990-7722CHCN
	草莓	5990-7706CHCN、5990-9317EN
梨		
香蕉		
药物	全血	5990-8789EN
喹诺酮抗生素	牛肝	5990-5085EN
磺胺类抗生素	牛肝	5990-5086EN
	鸡肉	5990-5395CHCN
兽药	动物源性食品	5991-0013CHCN

为说明该技术的应用，我们将展示使用 AOAC 方法萃取和分析苹果中的 16 种“代表性”农药得到的一些结果¹⁹。这些代表性农药由 Lehotay et al²⁰ 等人选定，分别属于 9 个不同的农药类别，包括适用于 LC-MS/MS 分析的酸性、碱性、中性、对碱敏感和酸不稳定性农药。图 8.2 说明了本研究中使用的 QuEChERS 工作流程。

图 8.2
使用 QuEChERS 萃取苹果中农药的工作流程



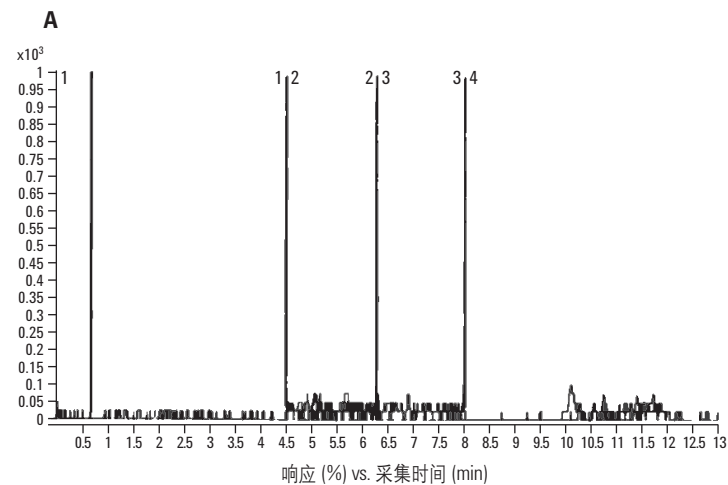
为获得最可靠的统计结果，初始的样品前处理是 QuEChERS 处理过程中极其重要的一部分。必须使用数量足够多的样品以确保最终得到的部分具有代表性。由于 QuEChERS 萃取只使用 15 g 样品，初始的大量样品必须充分粉碎。将 15 g 粉碎的苹果样品（来自 3 磅有机种植的苹果）置于 50 mL 离心管中，加入内标，然后涡旋振荡。接下来，加入 15 mL 1% 醋酸的乙腈溶液，然后加入含有 6 g 无水 $MgSO_4$ 和 1.5 g 无水醋酸钠的安捷伦 AOAC 缓冲萃取试剂包。正如之前所述，加入乙腈之后添加缓冲盐非常重要，因为盐的添加会引起放热反应，可能导致样品局部受热，从而引起热降解。接下来，将整个混合物紧密密封并用手剧烈振荡离心管，然后进行离心。该操作就是盐析萃取步骤。乙腈将在苹果基质形成的水相层上方形成分离的一层。

下一个步骤是采用 dSPE 进行进一步的纯化。将 1 mL 的上层乙腈溶液转移至 2 mL 的分散 SPE 管中，管内含有已预称重的 50 mg N-丙基乙二胺 (PSA) 吸附剂和 150 mg 无水 $MgSO_4$ 。将 SPE 管盖紧，涡旋振荡，然后离心。将 200 μ L 等分样品转移至自动进样器样品瓶中，并使用 800 μ L 水进行稀释。接下来用 LC-MS/MS 分析样品。

在苯基-己基色谱柱上通过梯度反相色谱法进行 HPLC 分离。操作条件请参阅参考文献 19。图 8.3A 展示了采用完整的 QuEChERS 流程进行处理所得的苹果空白样品的 LC-MS/MS 色谱图。采用 QuEChERS 制备所得的最终样品中会含有食品基质杂质，因为它仅仅是一个简单的样品萃取和纯化流程。由于在多反应监测 (MRM) 模式（请参阅参考文献 19 中的仪器数据采集设置）下操作的 LC-MS/MS 具有强大的选择性，苹果空白样品的萃取物没有对目标化合物造成任何干扰。图 8.3B 展示了 10 ng/g (10 ppb) 的加标苹果萃取物在定量限 (LOQ) 浓度水平的色谱图。此处的苹果中农药的 LOQ 远低于最大残留水平 (MRL)。虽然一些农药峰的色谱分离度较差，利用电喷雾离子化串联质谱的选择性仍然能够实现准确定量。平均回收率介于 76-117% (平均为 95.4%) 之间，RSD 值小于 15% (平均为 4.3%)。这些值在食品基质的痕量农药分析中是可接受的。

图 8.3

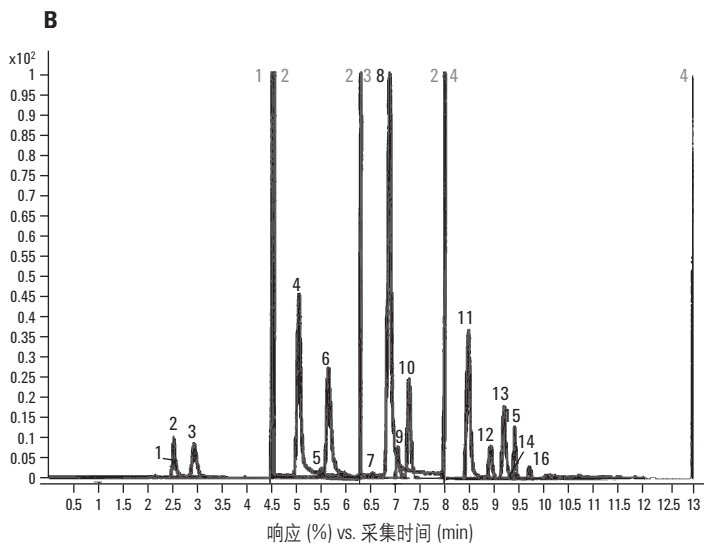
空白苹果萃取物与加标农药萃取物的 LC-MS/MS 色谱图



10 ng/g 加标苹果萃取物的
色谱图。

1. 甲胺磷
2. 高灭磷
3. 吡蚜酮
4. 多菌灵
5. 吡虫啉
6. 噻苯咪唑
7. 敌敌畏
8. 残杀威
9. 甲基托布津
10. 甲萘威
11. 灭线磷
12. 戊菌唑
13. 啉菌环胺
14. 抑菌灵
15. 醚菌酯
16. 对甲抑菌灵

苹果空白萃取物的色谱图
空白样品中未检出干扰物



参考文献

1. Frankforter, G.B.; Cohen, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1914**, *36*, 1103-1134
2. Wang, B.; Ezejii, T.; Feng, H.; Blaschek, H. *Chemical Engineering Journal* **2008**, *63*, 2595-2600
3. Leggett, D.C.; Jenkins, T.F.; Miyares, P.H. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1355-1356
4. *Method 8330A Nitroaromatics and Nitramines by High Performance Liquid Chromatography*, Rev. 1, U.S. Environmental Protection Agency, **January 1998**
5. Luke, A.; Doose, G.M. *Bull. Environ. Contam.* **1983**, *30*, 110
6. Mills, P.A.; Onley, J.H.; Gaither, R. A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1963**, *46*, 186
7. Schenck, F.J.; Wong, J.W.; J.L.Tadeo (Ed.) *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, CRC Press, Boca Raton, FL, **2008**, 154
8. Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stainbaier, D.; Schenk, F. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431
9. Majors, R.E. *LCGC No. America* **2007**, *25* (5), 436-446
10. Lehotay, S.J.; Mastovska, K.; Lightfield, A.R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 630-638
11. *AOAC Official 2007.01 Method: Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate*, **2007**
12. *EN 15662. Foods of Plant Origin – Determination of Pesticide Residues Using GC/MS and/or LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Cleanup by Dispersive SPE – QuEChERS Method*, **2008**
13. Lehotay, S.J.; Mastovska, K.; Lightfield, A.R. *Use of buffering to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables*, *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629
14. <http://www.quechers.com/> (follow link to QuEChERS – A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products)
15. Stevens, J.; Bertin, L.; Rothermich, M. *Increasing Efficiency and Pesticide Recovery from the QuEChERS Approach for Fruit and Vegetable Products Using Ceramic Homogenizers*, European Pesticides Residue Workshop, Strasbourg, Poster 24, **June 20-24, 2010**
16. Zhao, L.; Stevens, J., *用甲苯和含有石墨化碳黑的 Agilent Bond Elut AOAC QuEChERS 试剂盒优化菠菜中平面结构农药的回收率, 安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5990-4247CHCN, **2012 年**
17. Anastassiades, M.; Masrovskaa, K.; Lehotay, S.J. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1015* (1-2), 163-184
18. Masrovskaa, K.; Lehotay, S.J.; Anastassiades, M. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (24), 8129-8137
19. Zhao, L.; Schulz, D.; Stevens, J., *使用安捷伦 Bond Elut QuEChERS AOAC 试剂盒测定苹果中农药残留物的 LC/MS/MS 分析, 应用简报*, 出版号 5990-3937CHCN, 安捷伦科技公司, 美国特拉华州威尔明顿, **2009 年**

固相萃取 (SPE)

固相萃取是一种使用更广泛的样品前处理技术，通常用于液体样品或已经通过溶解或萃取的方式变为液体形式的固体样品。通过将气体样品捕集到吸附剂上或使用反应性化学物质进行原位衍生化的方式，SPE 还可以用于某些气体样品。

SPE 与 LLE

固相萃取是色谱分析中一项很重要的样品预处理技术。SPE 的操作方式与液-液萃取 (LLE) 类似。与仅包含一个分离阶段的 LLE 不同，SPE 是类似于 HPLC 的色谱分离过程，与 LLE 相比，它具有很多潜在的优势：

- 更彻底地萃取分析物
- 更高效地分离干扰物与分析物
- 提高分离选择性
- 有机溶剂消耗量减少
- 总分析物馏分收集更简便
- 痕量富集过程可额外提供浓缩功能
- 手动操作程序更方便
- 可去除颗粒
- 更容易自动化

由于 SPE 通常是一个比 LLE 更有效的分离过程,其更容易获得更高的分析物回收率。采用 LLE 需要好几个连续步骤才能回收 99% 以上的分析物,而通常 SPE 方法只需一步就能实现。SPE 还能更彻底地去除分析物馏分中的干扰物。由于有机溶剂使用量更少,能够维持较高的分析物浓度,反相 SPE 技术(一般称为非极性 SPE 或 RP-SPE)是使用最为广泛的技术。在 SPE 中,因为不需要进行相分离(如 LLE),我们能够很容易地收集分析物总馏分,从而消除了由变化的萃取体积或萃取体积测量不准确造成的误差。在 SPE 中不会形成乳浊液。最终,较大的颗粒被 SPE 小柱或其它装置(请参阅第 5 章)捕集,并且不会流入分析物馏分中。因此,SPE 具有纯化和去除颗粒的双重作用,在进样之前无需再对样品进行过滤。在多数情况下,非极性 SPE 还具备另一个优点——浓缩样品。

但是相比于 LLE, SPE 有一些缺点,包括:

- SPE 中可能发生混合机制
- 一些分析物会不可逆地吸附在 SPE 小柱上
- 需要进行更复杂的方法开发(涉及 3 个步骤或更多)

LLE 中使用的溶剂通常纯度很高而且是明确定义的,因此 LLE 分离的重现性很高。SPE 固定相有时会导致多种机制(例如反相和离子交换),让操作人员感到困惑。与 SPE 小柱相比,LLE 装置(例如分液漏斗)的表面积相当小,特别是它的填料。由于该原因及其他原因,LLE 发生不可逆的分析物键合(较低的回收率)的可能性低于 SPE。典型的非极性 SPE 包括四个步骤:活化、上样、淋洗和洗脱,每一个步骤都需要一定程度的优化,而 LLE 的溶剂选择则更加直接。

SPE 与 HPLC

这种最简单的 SPE 构造采用的是小型一次性塑料柱或小柱，通常是填充了 0.1-10.0 g 吸附剂的医用注射器筒。采用的吸附剂一般是反相材料（例如 C18-硅胶），反相 SPE (RP-SPE) 同时具有类似 LLE 和反相 HPLC 的分离特性。有时，选用选择性更强的 SPE 固定相（例如离子交换固定相或亲和固定相），能够获得比 RP-SPE 更好的结果，RP-SPE 主要依据分析物和基质的相对疏水性进行分离。

为简明起见，下文中均假定使用 RP-SPE，除非另有说明。虽然硅胶基键合相填料使用最为广泛，但是近年来出现的聚合物吸附剂也已经获得了越来越多的青睐。与硅胶基 SPE 填料相比，聚合物填料的优点包括更高的比表面积（因而具有更高的容量）、亲水性-疏水性的化学平衡（润湿性更好，且活化步骤完成一段时间之后即使变干燥，也不会影响回收率和重现性）、不含硅醇基（不可逆吸附高度碱性化合物的可能性降低）和宽泛的 pH 范围（可以更灵活地调整化学填料）。

在最常用的配置中，滤芯将 SPE 填料固定在注射器筒中，就像一根 HPLC 色谱柱。其粒径（平均为 40 μm ）一般比 HPLC 的粒径（1.5-10 μm ）大得多。由于柱床长度更短、颗粒更大以及柱床填充密度更低，SPE 小柱的柱效比 HPLC 色谱柱的柱效低很多 (N100)。出于成本的原因，SPE 通常使用不规则形状的填料（而不是球状的颗粒）。最近，市面上出现了用于 SPE 的球状硅胶，但尚未对最常用产品的销售产生影响。聚合物吸附剂一般是球状的，但通常比硅胶基填料更贵。但是某些 SPE 萃取盘也会使用比较昂贵的球状 SPE 填料，其颗粒直径在 7 μm 的范围内。

总的来说，SPE 的分离原理、相选择和方法开发过程与 HPLC 非常相似。SPE 与 HPLC 的一个主要区别是 SPE 小柱通常是一次性使用的，因为小柱上可能有残留的干扰物。当然，HPLC 色谱柱是循环使用的。

SPE 的用途

在样品前处理中，SPE 有 6 个主要作用：

- 去除干扰物
- 分析物浓缩或痕量富集
- 脱盐
- 相交换
- 原位衍生化
- 样品储存和运输

干扰物的去除

在 HPLC 或 GC 分离中，基质干扰物或多余的化合物可能会与分析物发生谱带重叠，增加了方法开发的难度，并且可能会对分析结果产生不利影响。在某些情况下，特别是对于复杂的样品（例如天然产物、食品、蛋白质裂解物），由于原始样品中含有大量的干扰物，使得我们几乎不可能仅通过一次 HPLC 或 GC 分离就将这些物质与一种或多种分析物的谱带分开。SPE 可用于减少或去除这些干扰物。一些样品所含的组分，如疏水性物质（例如脂肪、油、油脂）、蛋白质、高分子材料、颗粒等会阻塞 HPLC 色谱柱或使其失去活性。这些不利化合物通常可以通过 RP-SPE 去除。在 GC 中，高沸点物质会停留在色谱柱柱头并缓慢逸出，从而产生额外的色谱峰和导致基线漂移。SPE 同样有助于在进样之前去除这类干扰物。

痕量富集/分析物浓缩

SPE 常用于提高痕量组分的浓度。如果所选的 SPE 小柱可使分析物的 $k \gg 1$ ，那么在分析物饱和（过载）固定且开始从小柱中洗脱出来之前，可应用的样品体积就相对较大。最终的结果是当使用高强度溶剂 ($k < 1$) 洗脱分析物时，所得的分析物浓度将显著提高，这意味着检测灵敏度将增加（称为痕量富集）。痕量富集的一个实例是使用 RP-SPE 小柱通过 SPE 方法从环境水样中浓缩亚 ppb 级浓度的多核芳香烃或农药。高强度溶剂（例如乙腈或甲醇）能够以较小的浓缩体积从小柱中洗脱这些分析物，这也节省了蒸发时间。蒸发至干之后，可以使用与后续 HPLC 或 GC 分离兼容的溶剂复溶（重新构建）样品残留物。或者，也可以向 SPE 洗脱液中添加可混溶的弱溶剂以稀释较强的溶剂，这样所得的样品或许能够直接注入 HPLC 色谱柱。

脱盐

RP-SPE 通常用于生物样品和其他高盐样品的脱盐，尤其是在进行离子交换 HPLC 分析之前。选择可在一开始就保留分析物的 pH 和有机溶剂比例，而用水将无机盐从小柱上淋洗下来。接下来就能使用有机溶剂洗脱分析物（不含盐）³。

相交换

相比前面所述的其他作用，相交换不那么常用，使用 SPE 小柱分离目标分析物，然后将流动的空气或干燥的氮气通过小柱以去除初始液体即可实现相交换。接下来，可以使用第二种不混溶的溶剂将分析物洗脱至收集装置用于进一步的样品前处理或进样至色谱。

原位衍生化

在一种原位衍生化流程中，一种活性衍生化试剂吸附在 SPE 小柱上，含有活性分析物的样品通过小柱。根据反应动力学，分析物可以同时被衍生化和浓缩。接下来可使用高强度溶剂洗脱衍生化的化合物，然后对该化合物进行色谱处理。这种流程一个实例是使用 2,4-二硝基苯肼对含有羰基的化合物进行原位衍生化。另一种原位衍生化方法需要在含有 SPE 吸附剂的溶液中进行，SPE 吸附剂可以分离溶液中衍生化的分析物。然后，洗脱衍生化的化合物进行分析。这种方法的一个实例是使用四甲基氢氧化铵热水解细菌脂质样品中的细菌脂肪酸并直接将其甲基化。接下来，对衍生化所得的脂肪酸甲酯进行 GC-离子淌度质谱分析。这种方法的另一个实例是通过酸性农药与丁基氯甲酯在水相环境下反应实现的原位衍生化，接着使用 PDMS 纤维进行在线 SPME 纯化，分析物经热脱附后进入 GC/MS⁶ 进行分析。

样品储存和运输

样品储存和/或运输是 SPE 小柱一项有趣的应用。通常，吸附在固体支撑物上的分析物的稳定性要优于它们在溶液中的稳定性。该发现让我们能够使样品吸附在小柱上进行储存和运输（例如通过邮寄方式）。在这种方法使用之前，将分析物吸附到固体支撑物之前需要测试每组分析物的长期稳定性。

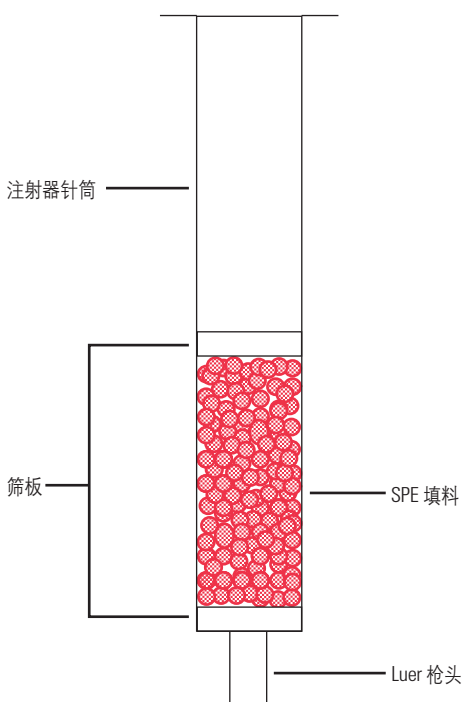
SPE 装置及其形式

以下是 SPE 采用的几种不同设计：

- 小柱 (图 9.1)
- 萃取盘 (图 9.2)
- 移液枪头 (图 9.3)
- 96 孔板 (图 9.4)
- 涂层纤维 (固相微萃取 (SPME), 图 9.5)
或涂层搅拌棒 (搅拌棒吸附萃取 (SBSE), 图 9.6)

图 9.1

典型的针筒式小柱设计



SPE 小柱

使用最为广泛的 SPE 装置类型是萃取小柱。典型的一次性 SPE 小柱（注射器筒式）如图 9.1 所示。注射器筒通常由医用级聚丙烯制成，选择这种材料是因为其纯度高。如果小柱的塑料材料中含有痕量水平的杂质（例如增塑剂、稳定剂或脱模剂），它们可能会在 SPE 过程中被萃取出来并污染样品，还有可能因此导致错误的分析结果或在质谱分析时引起离子抑制效应。注射器筒的出口处一般都配有一个可以固定针头的 Luer 尖头，便于直接将流出物导入小型容器或样品瓶中。

小柱中支撑颗粒柱床的滤芯由 PTFE、聚乙烯、不锈钢或钛（很少使用）制成，具有 10-20 μm 的孔隙，可提供微弱的流动阻力。为了适应自动化的仪器或机器人系统，SPE 小柱的设计各有不同。当标准注射器筒的塑料材料可能产生不可接受浓度的可萃取干扰物或可能发生塑料壁上的吸附时，可选用价格更贵但惰性更强的玻璃小柱或原生 PTFE 小柱进行超痕量分析（亚 ppb 级）。

除了上面提及的特殊小柱，一般来说，填充键合硅胶或吸附剂填料的 SPE 小柱相对比较便宜。因为存在样品交叉污染的潜在风险，它们通常都是一次性使用的。

为了适应广泛的 SPE 应用，现在已经有了容器体积（小柱中填料上方的体积）为 0.5-10 mL 的标准小柱，其填料质量为 35 mg-2 g。对于体积非常大的样品，还可选择填料质量多达 75 g，容器体积高达 150 mL 的“巨型”小柱。还可以考虑将这些小柱用于快速色谱应用（请参阅第 12 章），虽然快速色谱无论是在理论方面还是在实际操作方面与“真正的”SPE 均有所不同。填料量较高的小柱适用于可能会导致低容量小柱过载的“脏”样品。但是，对于小柱容量不会造成问题的相对干净的液体样品、痕量分析以及小体积样品来说，应首选填料量为 100 mg 或更低的小柱。由于聚合物 SPE 填料的表面积更大，单位面积的保留容量也可能更大，其填充柱床质量通常在 5-60 mg 范围内，因而可处理的样品和溶剂体积较小。在大多数情况下，我们都需要以尽可能最小的体积收集分析物，这意味着 SPE 小柱也必须尽可能最小。更小的体积也有利于减少使用与分析方法更兼容的溶剂复溶分析物时蒸发洗脱溶剂所需的时间。

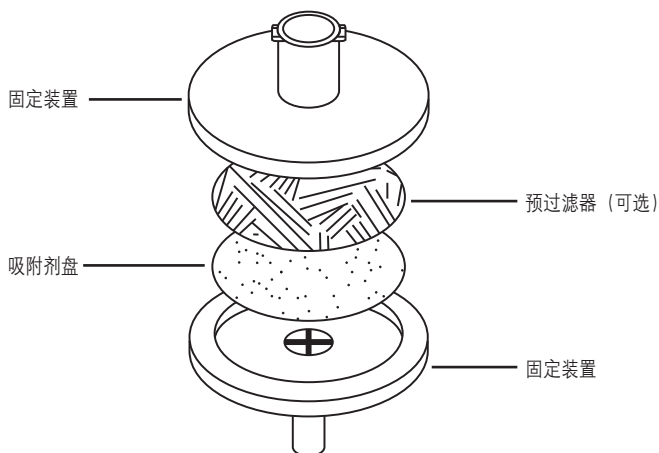
SPE 萃取盘

另一种常用的配置是 SPE 萃取盘 (图 9.2)。SPE 萃取盘结合了薄膜 (请参阅第 18 章) 和固相萃取的优点。萃取盘的外观与膜过滤器非常相似: 它们是扁平状的, 厚度通常为 1 mm 或更薄, 直径 4 - 96 mm。萃取盘中的 SPE 填料通常占膜总重量的 60-90%。有些萃取盘是单独出售的, 必须安装在可重复使用的过滤器支架中。然而, 最受欢迎的是预装在一次性支架中出售的萃取盘或带有可方便连接注射器的 Luer 接头的小柱。SPE 萃取盘的物理结构不同于膜过滤器 (请参阅第 18 章)。SPE 萃取盘的组成:

- 填满硅胶基填料或树脂填料的可塑或扩展 PTFE 网
- 带有嵌入式填充材料的刚性玻璃纤维盘
- 浸渍填料的聚氯乙烯
- 衍生膜

图 9.2

典型的 SPE 盘结构



SPE 萃取盘和 SPE 小柱的主要区别在于它们的长度/直径比 (L/d): 萃取盘的 $L/d < 1$ 而小柱的 $L/d > 1$ 。与 SPE 小柱相比, 萃取盘的这个特征使其能够应用更高的流速, 并且萃取速度更快。例如, 1 L 相对干净的水可在约 15-20 min 内通过直径为 45 mm 的萃取盘, 但使用 15 mm x 8 mm 的小柱柱床可能需要 2 h。和使用小柱时一样, “脏”水或含有颗粒的水(例如废水)可能会堵塞多孔萃取盘。无论采用哪种装置, 如果样品含有大量的颗粒, 在进行 SPE 处理之前都应该使用预过滤器过滤。某些萃取盘产品附带内置的预过滤器。由于填料内嵌在萃取盘基质中, 因此不会像填充欠佳的小柱那样, 由于产生沟流而导致不均匀的流动特性, 从而使分析物回收率降低。但是, 由于萃取盘的厚度较薄(一般为 0.5-2 mm), 低 k' 值化合物的穿透体积通常比在 SPE 小柱中的穿透体积更小。

SPE 萃取盘非常适用于环境应用, 例如地表水中痕量有机物的分析, 采用其他方法时, 该分析通常需要使用大量的样品以确保获得必要的灵敏度。美国环境保护局已经批准将 SPE 萃取盘技术(方法 3535A)作为 LLE 的替代技术, 用于水样品 HPLC 分析的样品前处理。相比传统的 LLE, SPE 的一个主要优点是减少了有机溶剂的用量。SPE 萃取盘和 SPE 小柱每次分析仅需使用几毫升溶剂, 而与它们效果相当的多步 LLE 分离则需要使用数百毫升溶剂。

含有 1.5-30 mg 嵌入式填充材料的低柱床体积刚性玻璃纤维萃取盘对于小体积临床样品(例如血浆和尿液)的预处理效果很好。这种萃取盘降低了吸附剂质量、减小了截面面积, 从而减少了溶剂消耗量。它的优点包括: 由于洗脱溶剂用量减少, 萃取物更加纯净; 来自弱保留化合物的干扰更少; 不使用筛板, 避免了来自这一途径的污染。这种萃取盘的实例是大容量 SPEC 固定相(安捷伦科技公司), 有小柱或 96 孔板形式可选(见图 9.4)。SPE 萃取盘有反相(C2、C8、C18、C18AR 和苯基)、正相(NH₂、CN、Si)、离子交换(SAX、SCX)和混合模式(非极性和 SCX)可选。

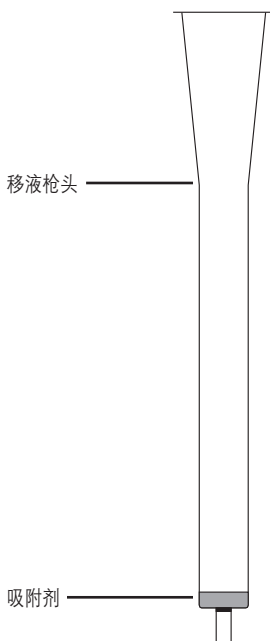
虽然生物样品的分离中也会用到萃取盘或小柱形式的浸渍填料的聚氯乙烯 (PVC) 和衍生膜, 但它们几乎不会用于 SPE 应用, 因此我们在这里不再进一步讨论。

SPE 移液枪头

分析化学朝着小型化方向的发展推动了新型 SPE 的开发。微量移液枪头 (MPT) 形式 (图 9.3) 可实现亚微升级样品 (例如生物体液) 的处理。固相萃取 (SPE) 可通过填充、嵌入或涂覆在移液枪头内壁上的各种固定相实现。由于具有开放式的流路结构, 用户无需撤销降压或堵塞, 即可移动和转移液体样品。我们已经介绍了多种常用的 SPE 技术, 包括反相、离子交换、疏水相互作用、亲水相互作用、固定化金属亲和以及亲和色谱法。基于微量移液枪头的 SPE (MPT-SPE) 现在主要用于蛋白质和多肽的纯化、浓缩和选择性分离 (亲和、金属螯合)。独一无二的移液枪头设计基于整体吸附技术。OMIX 枪头 (安捷伦科技公司) 是主要设计用于蛋白质组学的小体积 (10 μL 和 100 μL) 和小质量 (0.25-2 mg) 枪头。提供反相固定相 (C4、C18) 和强阳离子交换固定相 (SCX)。还提供用于特定的自动化机器人的 MPT 枪头, 例如适用于 Hamilton Microlab Star 系列的 300 μL 枪头和适用于 Tomtec Quadra 的 450 μL 枪头。

图 9.3

固相萃取移液枪头



近年来, 小体积 MPT-SPE 装置与 MS 或 LC/MS 联用已经成为了蛋白质组学领域常用的一种分离/纯化和鉴定技术。蛋白质的两种质谱 (MS) 分析技术包括电喷雾离子化 (ESI) 技术和基质辅助激光脱附/电离 (MALDI) 技术^{8,9,10}。ESI 用于溶液中生物分子的离子化, 而 MALDI 则通过激光脉冲使结晶的干基质中的样品升华和离子化^{11,12}。微量移液枪头的主要优势之一是它们可以与微量移液器一起使用或用于液体处理自动装置。这就使得生物分析实验室可以常规地使用 MPT-SPE, 并且能够轻松地将其与商业化的 x-y-z 液体处理系统一起用于高通量筛查应用。

SPE 96 孔板

96 孔板的配置 (图 9.4) 包括 8x12 排流通的 SPE 小孔, 小孔顶部和底部的滤芯中间含有填料。这些板非常适合自动化操作, 大多数现代的液体处理设备都能进行 SPE 操作的各个步骤。有三种类型的 96 孔 SPE 板, 其分类主要基于标准的外形尺寸: 1) 固定的圆孔, 2) 固定的方孔, 3) 可拆卸的方孔。圆孔配置具有固定的体积 (通常为 0.5-1.0 mL), 可装填不同量的 SPE 填料 (硅胶: 25-100 mg; 聚合物: 2-25 mg)。每个孔中的填料通常都是相同材料的。方孔配置能容纳更大体积的样品 (最多 2.0 mL) 且每个孔中通常包含固定的填料。可拆卸的方孔板 (例如安捷伦科技公司的 VersaPlate) 适合需要自己组装自定义配置的 96 孔板的用户。使用一个通用的底盘, 用户可以以任何顺序放置具有相同或不同固定相和具有不同质量填料的小柱。这种类型的板让用户能够将小柱数量与样品数量进行匹配, 避免为了少于 96 份的样品而牺牲一整块板。还可以使用随附的塞子堵住未使用的“孔”以便应用真空。在方法开发过程中, 此类板尤其适用于筛选最佳固定相和/或吸附剂质量。

96 孔 SPE 板也能用于方法开发。这些固定的孔装满了各种吸附剂或者带有不同固定相的萃取盘。用户可以使用一系列的固定相设置不同的上样、淋洗和洗脱条件, 从而获得最佳的组合用于分离基质化合物中的分析物。例如, 安捷伦的 SPEC 方法开发板包含以下硅胶基固定相: C2、C8、C18、C18AR (耐酸)、氰基、苯基、MP1 (混合模式 C8 + SCX) 和 MP3 (与 MP1 类似, 但具有极性保留性能)。

图 9.4

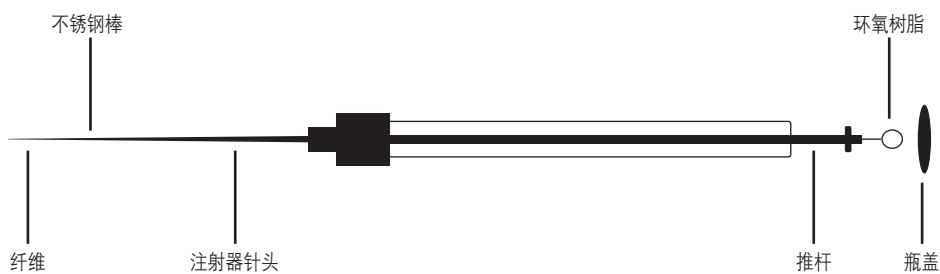
96 孔 SPE 板



固相微萃取 (SPME)

SPME 采用了带涂层的纤维。在这种设计中 (图 9.5), 一根细小的固体熔融石英纤维上涂覆了聚合物固定相涂层, 如聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 或聚丙烯酸酯。将纤维浸入待分析的溶液, 由于具有分配系数, 分析物将发生扩散并分配进入涂层。一旦达到平衡 (可能需要几十分钟), 将纤维从溶液中取出并置于 GC 进样口中, 在这里分析物将通过热脱附被转移。SPME-GC 技术的通用性很强, 已被用于环境和食品领域分析挥发性分析物的许多应用。对于非挥发性化合物, 可以采用 HPLC SPME 方法, 使用溶剂从纤维上脱附 (洗脱) 分析物, 但是这种方法的效果不如 GC SPME 方法。如需更加全面地了解 SPME, 请参考本书的第 10 章或参考该技术的创立者编写的通用教材¹⁴。

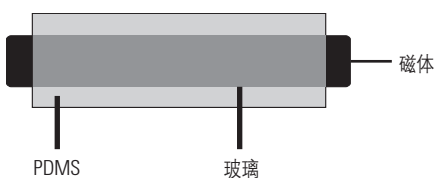
图 9.5
SPME 注射器组件



搅拌棒吸附萃取 (SBSE)

涂层搅拌棒的概念^{15,16}与涂层 SPME 纤维类似，但其表面积更大，可实现更高的质量灵敏度（见图 9.6）。带有聚合物吸附涂层的搅拌棒被置于水相液体中，溶液搅动时就会发生分析物/基质的分配。达到平衡后（同样需要几十分钟），取出搅拌棒并干燥，以去除痕量的水分，然后将搅拌棒转移至热脱附设备中，在这里，搅拌棒上的分析物将被转移到 GC 色谱柱中。对于 HPLC，最好采用离线溶剂脱附的方法从搅拌棒上释放分析物。

图 9.6
涂层搅拌棒



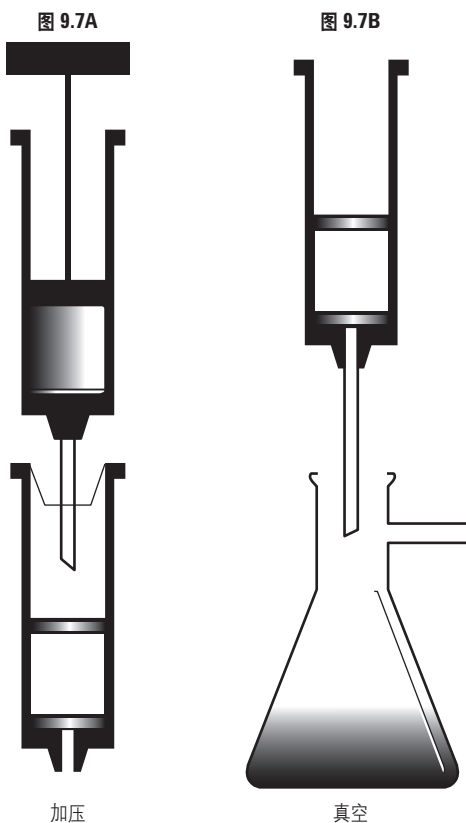
涂层纤维和搅拌棒装置在气相色谱分析中更常用，因为通过热脱附将吸附的分析物挥发至气相中比液相中的溶剂脱附更高效。使用这两种装置时，都有可能由于转移过程中的蒸发而损失挥发性非常强的分析物。

为了简便起见，SPE 章节之后的内容提及的 SPE 分离装置都是指典型的“SPE 小柱”。在大多数情况下，其他 SPE 装置也能以类似的方式工作。

SPE 装置

用于实施 SPE 实验的设备可以非常简单 (图 9.7)。重力可以驱动样品通过小柱, 但有时“真实的”样品流过小柱时非常缓慢, 而且该方不适合作为通用方法。因此, 最有效的基本系统 (图 9.7A) 包括能够手动推送溶剂或样品通过小柱的注射器。但如果样品比较粘稠或含有颗粒, 这种方法可能不好操作。在这种情况下, 可使用一次处理一根小柱的真空三角瓶 (图 9.7B)。但是, 如果需要同时处理多个样品, 建议使用能同时处理多根小柱的真空歧管或正压系统 (图 9.7C)。现在已经有了可容纳多达 24 个 SPE 装置的系统。这些歧管系统由耐化学腐蚀的、真空安全的透明玻璃制造, 透明玻璃材质让使用者可以监控整个样品收集过程。真空歧管内部配备了一个可拆卸、高度可调且耐溶剂腐蚀的支架, 可固定各种不同尺寸的试管或样品瓶, 这些试管和样品瓶的作用是收集洗脱液或用作活化、上样和溶剂淋洗过程的废液容器。用于连接小柱和收集管/样品瓶的传输针头由惰性的聚丙烯、PTFE 或不锈钢制造, 并且位置经过了校准, 以便将溶剂导入合适的收集装置。这种方式可以避免分析物洗脱步骤中的交叉污染。

图 9.7
SPE 装置



为了更好地控制溶剂流速, 某些设备配备了真空排气阀、真空控制阀和真空规。在更高级的设备中, 每个小柱都是单独控制的, 以确保所有小柱的流速分布相当。最后, 在真空歧管和真空泵之间设置一个带侧管的真空瓶, 用于收集溢出的冲洗和淋洗溶剂, 并防止液体污染真空泵。也有商业化的正压歧管和恒流系统, 通过它们可以单独控制每根小柱的流量。随着设备精密程度的提高, 它们的价格也随之上升。离心一般不常用于驱动液体通过小柱 (图 9.7D)。

使用 96 孔 SPE 板时需要使用专用的真空歧管。**图 9.7E** 展示了一个此类歧管系统，如底部的图中所示，歧管上方安装了一块常用的 96 孔 SPE 板，而另一块 96 孔收集板则用于收集最终的洗脱液。还有上样和冲洗步骤专用的废液容器。

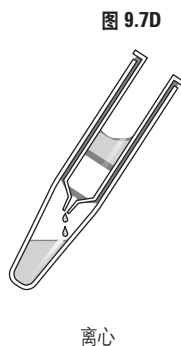
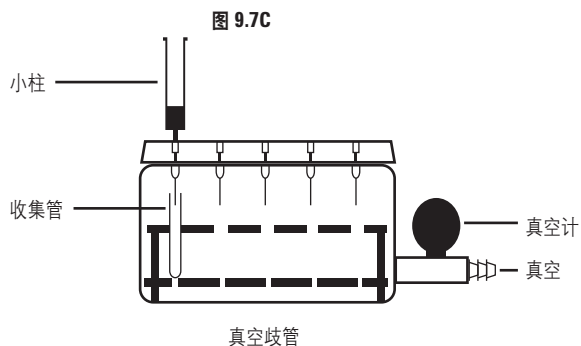


图 9.7E



用于 96 孔板的 CaptiVac 真空歧管



安装于 CaptiVac 真空歧管上的 96 孔 SPE 板

无论采用何种方法推动样品溶液穿过 SPE 小柱或其他 SPE 装置，流速都不应太快。否则，样品与固定相相互作用的时间可能不够，SPE 中的传质动力学与 HPLC 中的一样。对于典型的 SPE 应用，6 mL 小柱的建议流速为 10 mL/min 或更低，90 mm 萃取盘的建议流速为 50 mL/min。否则，由于吸附动力学过程过于缓慢，可能会发生样品的损失。

SPE 自动化

当样品数量增加，导致 SPE 样品前处理到达“瓶颈”时，可将整个过程自动化。有三种基本的方法可实现 SPE 自动化：

1. 专用 SPE 设备
2. 改进的 x-y-z 液体处理系统
3. 机器人工作站

能执行活化、上样、淋洗和洗脱的专用 SPE 装置是最简单且最便宜的设备。此类系统会用到标准的注射器筒小柱、专门配合仪器设计的特殊小柱或 SPE 萃取盘。Gilson 的 ASPEC、赛默飞世尔科技的 AutoTrace 280 和 Horizon 科技公司的 SPE-DEX 都属于这个专用类别。

改进的 x-y-z 液体处理系统主要用于执行液体处理功能，例如稀释、混合和内标的添加。安捷伦科技公司的 Bravo、Agilent PAL 进样器、Hamilton Microlab Star、Tomtec Quadra 和 Gerstel 多功能采样器 (MPS) 等系统已被广泛用于执行和协助各种样品前处理功能。此类装置不仅能执行多达几个的样品前处理步骤，而且还能将最终的纯化样品注入色谱。固相萃取的实施方式包括 SPE 微量移液枪头（用于小体积样品）、96 孔 SPE 板，某些情况下，还可以采用 SPE 小柱和萃取盘。目前来看，这种改进的液体处理方法似乎很受欢迎。

虽然完整的实验室机器人系统能够连接到可执行所有 SPE 实验步骤的设备上，但是将机器人连接到专用的 SPE 工作站更加节省时间且经济高效。机器人用于 SPE 工作站以及位于实验室工作台上的其他样品前处理设备（例如天平、混合器、稀释器、自动进样器，等等）的样品容器输送。多家系统集成公司可以组装完整的机器人系统，让这一自动化实验室系统更加完善。这种方法曾经被广泛应用，但现在完整的机器人实验室已经比较少见了。

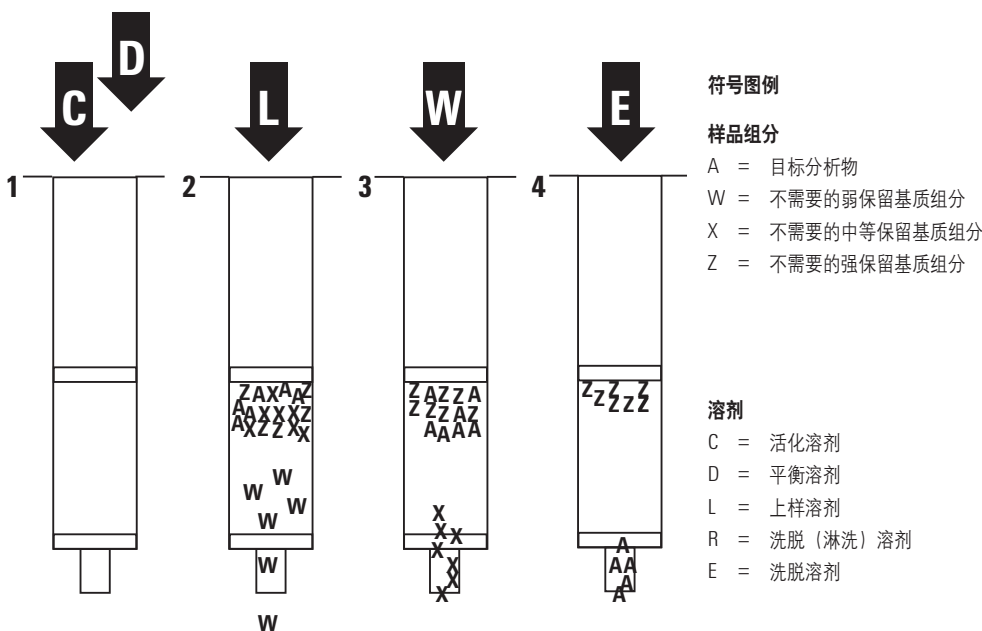
SPE 操作

SPE 分离概述：最常见的 SPE 实验通常包括 4 个步骤 (图 9.8)：

1. 活化填料 (图 9.8.1)
2. 样品应用 (上样) (图 9.8.2)
3. 淋洗填料 (去除干扰物) (图 9.8.3)
4. 分析物的洗脱和回收率 (图 9.8.4)

在方法开发过程中，上述每个步骤都必须进行优化。首先，我们将在这里提供这一四步过程的概览，然后会在“方法开发实践指南”部分提供更多的详细信息。

图 9.8
SPE 分步操作



我们有时将这种 SPE 操作模式称为“结合-洗脱”模式，因为所选的 SPE 条件均以结合分析物为目的，要么降低固定相结合基质和干扰物的程度 (使其经过小柱而不被保留)，要么提高固定相对这两类物质的结合程度 (使其保留在小柱上用于余下的 SPE 实验)。接下来，选择适合的溶剂系统，尽可能以最小体积的溶剂洗脱分析物，而留下保留性更强的干扰物/基质化合物，理想的情况是洗脱溶剂与分析的下一个步骤兼容。在上述的初步解释中，我们假设使用了 RP-SPE，分析物将在初始萃取步骤中被保留。第 10 章将讨论其他 SPE 模式，例如离子交换和络合作用。

步骤 1 — 活化

在这一添加样品之前的步骤中（**图 9.8.1**），使几个柱床体积的溶剂“C”（一般是甲醇 (MeOH) 或乙腈 (ACN)）通过小柱，对填料进行“活化”。活化步骤具有双重作用：(a) 去除小柱暴露于实验室环境时意外收集到的一些杂质，或制造商提供小柱时其中就已经存在的一些杂质，以及 (b) 使吸附剂溶剂化。溶剂化非常重要，因为已干透的反相硅胶基填料（尤其是 C8、C18 或苯基填料）对样品中疏水性分析物的保留性能通常会显著下降。此外，不同的固定相干燥状态也会导致不可重现的分析物回收率。在这方面，具有平衡的疏水-亲水表面特性的聚合物填料（例如安捷伦科技公司的 Bond Elut Plexa），可以保持稍微干燥的状态，并仍然维持其性能。Plexa 是一种球形 SPE 吸附剂，具有能够实现高重现性流速的单分散颗粒以及可减少分析物与基质干扰物键合的羟基化表面。

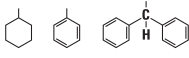
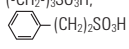
完成活化后，最好使用平衡溶剂“D”将多余的活化溶剂冲洗出来。在 RP-SPE 中，这种溶剂通常是水或水相缓冲溶液，能够在上样之前平衡 SPE 装置。但是对于体积非常小的 SPE 装置（例如 SPEC 萃取盘小柱），由于其空隙体积远小于样品体积，该平衡步骤就不那么重要了，可以省略。

步骤 2 — 上样

SPE 实验的这个步骤（**图 9.8.2**）涉及样品应用（上样），在该步骤中，溶解在弱溶剂“L”中的样品被添加到小柱上。这种弱溶剂能够增强分析物的保留。RP-SPE 操作所采用的弱溶剂是水或缓冲液，其中添加了最多 10% 的有机溶剂。离子交换萃取也可采用类似的溶剂，但应尽可能降低样品溶液的离子强度。有关上样溶剂的更多信息，请查看**表 9.1**。

可以使用移液管或注射器（手动地或通过自动进样器或液体处理机器人自动地）将样品应用到 SPE，或者将样品泵入小柱。后一种方法对于大体积样品 (50 mL) 更方便，比如从环境水样中分离痕量有机物时。样品和小柱的尺寸必须匹配，确保小柱容量不会过载。请记住，小柱的容量必须足以处理在上样步骤中可能被全部保留的样品的总质量（例如分析物、基质和干扰物）。应保证样品溶液在穿过小柱的过程中不会干燥。在大多数 SPE 设置中，并不会像在 HPLC 中那样精确控制流速，但是可以通过改变真空度进行调节，以达到从注射器或从泵中输送样品所需的流速。一般可接受的流速为 2-4 mL/min。由于横截面积更大，萃取盘可采用更高的流速，但是我们必须先研究流速与目标分析物回收率之间的关系。

表 9.1

典型的 SPE 固定相和使用条件					
分离机理	典型的固定相	结构	分析物类型	上样溶剂	洗脱溶剂
正相 (吸附)	硅胶、氧化铝、Florisil	$-\text{SiOH}$, Al_2O_3 , Mg_2SiO_3	弱极性到中等极性	ϵ^0 较小, 例如己烷	ϵ^0 较大, 例如甲醇、乙醇
正相 (极性键合相)	氰基、氨基、二醇基	$-\text{CN}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-$	中等极性到强极性	ϵ^0 较小, 例如己烷	ϵ^0 较大, 例如甲醇、乙醇
反相 (非极性键合相—强疏水性)	十八烷基硅氧烷、辛基硅氧烷、PS-DVB、DVB (聚合物型)	$(-\text{CH}_2-)_{17}\text{CH}_3$, $(-\text{CH}_2-)_7\text{CH}_3$ PS-DVB, DVB	疏水性 (强非极性)	高 P' , 例如 H_2O 、 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$	中等 P' , 例如 MeOH 、 ACN
反相 (非极性键合相—中等疏水性)	环己基、苯基、二苯基		中等非极性	高 P' , 例如 H_2O 、 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$	中等 P' , 例如 MeOH 、 ACN
反相 (非极性键合相—弱疏水性)	丁基、乙基、甲基	$(-\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_3$	弱极性到中等非极性	高 P' , 例如 H_2O	中等 P' , 例如 MeOH 、 ACN
聚合物型反相 (疏水—亲水平衡)	聚酰胺、聚[N-乙烯基吡咯烷酮-二乙烯基苯 (DVB)]、丙烯酸甲酯-DVB	多种聚合物	酸性、碱性、中性	水或缓冲液	中等 P' , 例如 MeOH 、 ACN
阴离子交换 (弱)	氨基、1 ⁰ , 2 ⁰ -氨基	$(-\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $(-\text{CH}_2)_3-$ $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	离子型 (可离子化)、酸性	水或缓冲液 ($\text{pH} = \text{pK}_a + 2$)	A. 缓冲液 ($\text{pH} = \text{pK}_a - 2$) B. 吸附剂或分析物为中性时的 pH 值 C. 高离子强度缓冲液
阴离子交换 (强)	季胺	$(-\text{CH}_2)_3\text{N}+(\text{CH}_3)_3$	离子型 (可离子化)、酸性	水或缓冲液 ($\text{pH} = \text{pK}_a + 2$)	A. 缓冲液 ($\text{pH} = \text{pK}_a - 2$) B. 吸附剂或分析物为中性时的 pH 值 C. 高离子强度缓冲液
阳离子交换 (弱)	羧酸	$(-\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	离子型 (可离子化)、碱性	水或缓冲液 ($\text{pH} = \text{pK}_a - 2$)	A. 缓冲液 ($\text{pH} = \text{pK}_a + 2$) B. 吸附剂或分析物为中性时的 pH 值 C. 高离子强度缓冲液
阳离子交换 (强)	烷基磺酸、芳香族磺酸	$(-\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}$, 	离子型 (可离子化)、碱性	水或缓冲液 ($\text{pH} = \text{pK}_a - 2$)	A. 缓冲液 ($\text{pH} = \text{pK}_a + 2$) B. 吸附剂或分析物为中性时的 pH 值 C. 高离子强度缓冲液

对于离子交换, 可采用 3 种洗脱条件:

A: 高于 (酸) 或低于 (碱) 分析物的 pK_a 2 个单位的缓冲液;

B: 分析物或吸附剂 (弱交换剂) 为中性时的 pH;

C: 高离子强度。 P' 是指极性 (辛醇-水分配系数), ϵ^0 是指溶剂强度^{18,19}。

步骤 3—淋洗（冲洗）

这个步骤（图 9.8.3）通过使用中等强度的溶剂“W”淋洗（冲洗）小柱来去除干扰物。理想情况下，应该限制淋洗溶剂的强度和体积，因为淋洗溶剂体积或强度太大会导致分析物部分洗脱，从而降低总体回收率。淋洗步骤（步骤 3）最好在分析物刚开始离开小柱时停止。这样就能使保留性弱于分析物的干扰物从小柱上淋洗下来，而不会损失分析物。RP-SPE 常用的淋洗溶剂是水或缓冲液，但它们无法完全去除步骤 4 收集的分析物馏分中的干扰物（图 9.8.4）。向淋洗溶液中限制性地添加少量有机溶剂有助于去除疏水性更强的物质，但必须谨慎操作以避免同时去除目标分析物。穿透体积必须通过实验确定（见图 9.11）。由于不同小柱的 SPE 分离性能可能存在微小差别，我们必须通过选择强度最佳的淋洗溶剂去除小柱上的干扰物，以保证方法的稳定性。我们的最终目标是在步骤 4（图 9.8.4）中收集到不含基质化合物或其他干扰化合物的 100% 分析物；否则将导致不良的和/或变化的回收率。

请注意，对于像饮用水这样非常纯净的样品，省略淋洗步骤不会损失萃取性能（很多美国 EPA 方法省略了淋洗步骤，直接进行洗脱前的干燥步骤）。如果样品比较复杂且含有许多不需要的基质组分，那么必须进行淋洗步骤，而且需要对其进行优化。

步骤 4—洗脱

该步骤（图 9.8.4D）的目的是洗脱和收集分析物馏分。如果检测灵敏度是一个主要关注点，那么该步骤的目标应该是尽可能以最小的溶剂体积收集全部的分析物。这可以通过使用强度非常大的洗脱溶剂“E”来实现，使得洗脱过程中分析物谱带的 $k << 1$ 。或者，使用较弱的溶剂“E”（例如 $k \approx 1$ ）仍然能够洗脱分析物，而且它能将本来会保留在小柱上的强保留性干扰物的洗脱降至最低。当 HPLC 分析存在大量晚洗脱物时，这是一个重要的考虑因素，因为这些化合物可能会增加后续 HPLC 分离所需的运行时间。在 GC 中，纯化的程度也应通过实验确定。如果使用中等强度的洗脱溶剂“E”获得的分析物馏分体积较大，一般都可以将洗脱液蒸发至干，然后将残留物复溶于 HPLC 流动相或者与 GC 相兼容的溶剂中，以降低最终分析物馏分的体积。无论如何，我们一般都需要将洗脱液蒸发至干，因为 SPE 的洗脱溶剂“E”的强度太大，不适合用作 HPLC 分离的样品溶剂，它还可能会损坏 GC 色谱柱的固定相（尤其是涂层固定相）。因此，最好选择挥发性相对较强的溶剂“E”，否则蒸发体积较大的洗脱液将花费很长时间，甚至还有可能需要采用繁琐的真空旋转蒸发方法。有时，我们可以利用相关的化学知识，通过使用添加剂降低目标分析物的挥发性，例如向胺类分析物中添加 HCl，将其转换成盐。

对于 HPLC，用于收集分析物馏分的洗脱溶剂最好是对于后续的分离来说较弱的流动相。这样我们就能够更加方便地进样大体积的分析物馏分，并获得更高的检测灵敏度。有两种方式可以达到这个目的。首先，如果分析物是酸或碱，可以调节样品的 pH 以抑制分析物离子化并最大化 RP-SPE 保留。改变 pH 能够影响步骤 4 中分析物的洗脱，使样品离子化并减少它的保留。收集分析物馏分后，可以再次调节馏分的 pH 以使后续的 HPLC 分离达到最佳保留效果。第二种方法是使用“弱”SPE 柱填料（氰基或短链烷基），这样就无需使用太强的洗脱溶剂。在这种情况下，需要使用“强”HPLC 色谱柱（例如 C18）来分析 SPE 馏分。

在 GC 中，最好使用与 GC 固定相兼容的挥发性溶剂收集洗脱的分析物。许多气相毛细管色谱柱都不能耐受含大量水分或极性有机溶剂的进样样品，以及含有酸性或碱性溶剂的液体样品。如果必须使用强的非挥发性溶剂，就必须通过蒸发或使用另一个 SPE 小柱进行溶剂置换（请参阅“SPE 的用途”）。

请注意，如果所使用的洗脱溶剂体积较小，或者如果洗脱溶剂与淋洗溶剂不混溶，那么就有必要（或最好）在洗脱之前从小柱中去除淋洗溶剂。在真空（或加压的空气或惰性气体）条件下使用空气吹扫小柱，直至小柱干燥，就能去除淋洗溶剂。对于小体积的 SPE 装置，该过程耗时约几秒钟，较大的 SPE 管或萃取盘则需要几分钟。

基质吸附 SPE 模式

在另一种方法中，SPE 还可用于保留杂质，而使目标分析物通过小柱，不被保留。这种技术有时被称为化学过滤，因为它能够“滤出”强保留的样品组分。这种模式也被称为基质吸附模式或 SPE 干扰物去除模式。该方法对于 SPE 收集馏分没有任何的浓缩作用，也无法将分析物与保留较弱的干扰物分离。因此，通过这种 SPE 模式获得的分析物馏分通常“更脏”，在分析之前需要进一步纯化（其他推荐的纯化方法请参阅参考文献 20）。图 9.8 所示的“键合-洗脱”过程让我们能够从弱保留和强保留的样品基质组分中分离分析物。因此，基质吸附模式在样品预处理中的应用较少，我们在此不再详述。

SPE 固定相和化学键合相

由于 SPE 实际上相当于经调整后效率较低的 HPLC, 因此 HPLC 中使用的多种固定相也适用于 SPE。**表 9.1** 列出了使用较为广泛的 SPE 固定相和它们能够保留的分析物类型。使用最为广泛的仍然是键合的硅胶, 但也有由其他无机材料和聚合物材料制成的商业化产品。除了**表 9.1** 展示的通用固定相之外, 还有针对具体分析物的专用固定相, 这些固定相将在第 10 章中详细介绍。

硅胶基 SPE 小柱填料与相应的 HPLC 填料相比, 其质量略为逊色, 但成本也相对较低。反相 HPLC 分析通常首选硅醇基相互作用最低的“碱性”柱填料, 而 RP-SPE 填料通常更“酸”(A 型), 硅醇基相互作用更为显著, 批次间的差异也更大。但是, 由于 SPE 通常只作为一项“开-关”技术或“数字化”分离技术使用, 它在保留方面造成的细小差异并不像在 HPLC 中那么重要, 在 HPLC 中, 要实现基线分离, 必须充分利用各种极为微小的选择性差异。

选择能够在上样过程中强烈保留分析物 (**图 9.8.2**) 的 SPE 填料 (**表 9.1**)。针对离子或可离子化的样品, 建议使用离子交换填料, 尤其是对于那些改变 pH 或增加离子强度时通常会被水相流动相洗脱的分析物。对于离子交换 SPE 应用, 调节 pH 使分析物离子化降至最低并优化其反相保留性之后, 可将分析物馏分直接注入反相 HPLC 色谱柱。中性分析物能在反相或者正相 SPE 填料上进行分离。推荐使用正相填料或某些新型亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 类型的填料分析极性较强的分析物; RP-SPE 填料是弱极性、强疏水性分析物的最佳选择。正相溶剂系统对气相色谱柱的兼容性更好。

一些具有适合的表面化学特性的聚合物填料能够将亲水性和疏水性可控且平衡地结合在一起, 让我们能够通过调节 pH、离子强度和溶剂条件实现中性、碱性和酸性分析物的分离。此外, 聚合物固定相的可用 pH 范围比硅胶基吸附剂更广泛, 赋予了方法开发过程更大的灵活性。事实上, 一般通用的方法开发方案即可用于聚合物填料, 无需进行严格的方法开发调查就有较高的成功可能性。

方法开发实践指南

为了得到稳定耐用的 SPE 方法，应采用系统性的方法以确保实现最高的分析物纯度、回收率和重现性。在方法开发的过程中，SPE 的四个步骤中的每一步都必须进行优化。图 9.9 展示了一个通用的系统性方法，解释了成功的方法开发需要执行的每个步骤。在 SPE 中，我们必须考虑表 9.2 和图 9.10 中列出的所有可能的分子间相互作用。通过选择适当的模式（例如吸附，反相，离子交换，等等）、样品容量和吸附剂的保留特征，对各步骤中的溶剂、缓冲液、pH 等，以及流速、温度和其他实验参数进行选择，我们能够实现 SPE 的目标。

表 9.2

SPE 固定相的常规分类
非极性固定相（反相） 疏水性/非极性相互作用
极性固定相（正相） 极性（氢键或偶极）相互作用
离子交换固定相 静电相互作用
共价键 PBA（请参见第 10 章）

在开始 SPE 方法开发之前，非常重要的一点是要探讨一些关于样品和最终分析目标的问题。本书第 1 章的结尾处有两张工作表，其中列出的一系列问题能够帮助您建立可满足分析需求的样品前处理方法。这些问题的答案能够促进 SPE 方法的开发。

图 9.9

系统化 SPE 方法开发

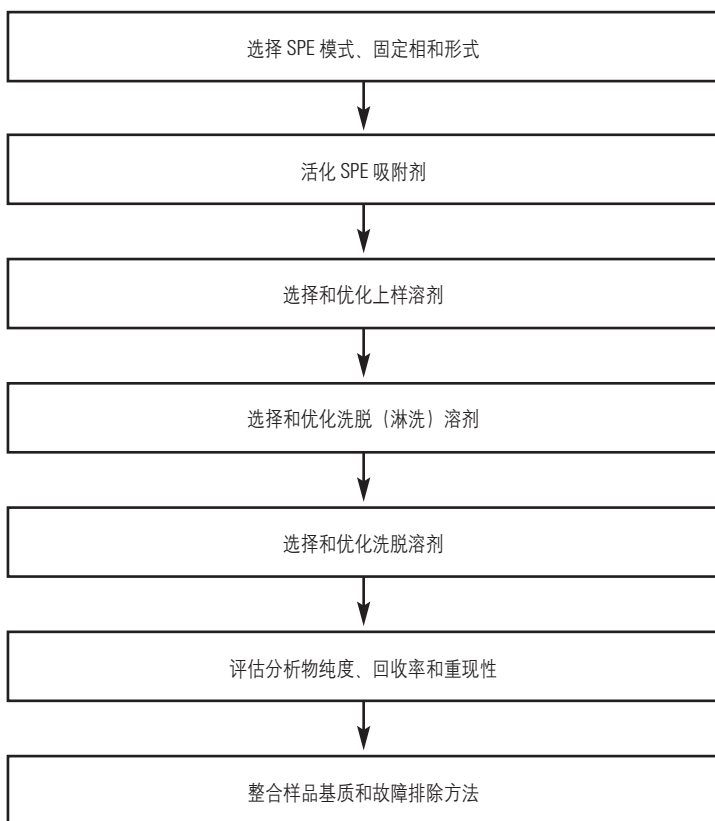
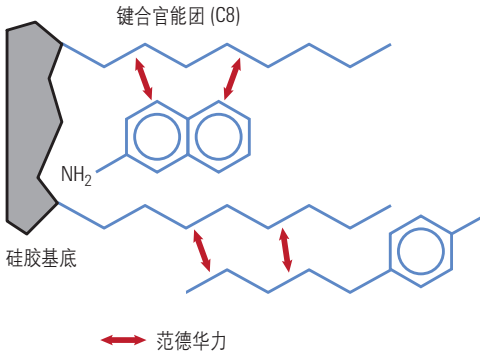


图 9.10

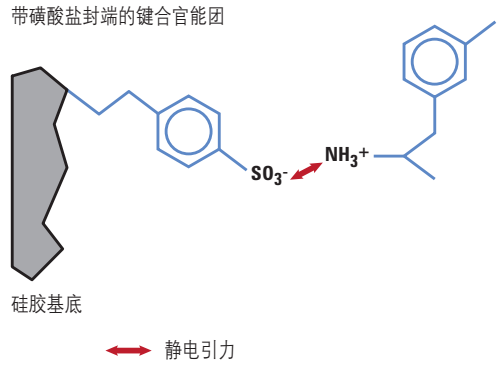
非极性相互作用

图 9.10A



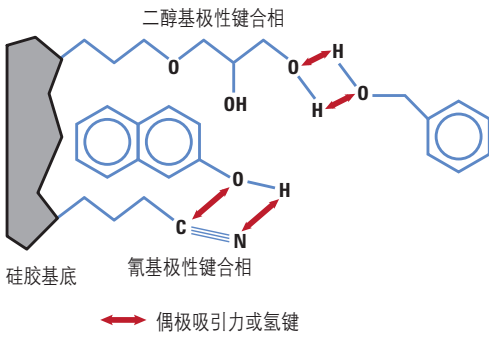
离子交换作用

图 9.10C



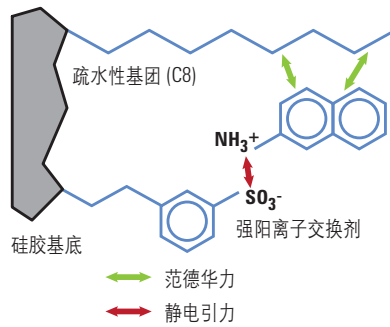
极性相互作用

图 9.10B



混合模式 SPE

图 9.10D



研究问题： SPE 已有相当长的历史，在各种文献、教材、互联网、应用参考书目和制造商网站中能找到成千上万的相关出版物。很有可能已经有人对您的目标分析物（或分析物类型）和基质进行了研究。以前人研究所得的 SPE 条件为起点，能够帮助您节省大量时间。针对相似分析物-基质对的 SPE 方法进行文献检索，也是一种非常有用的方法。SPE 小柱制造商也出版了广泛的参考书目（其中某些参考书目是可在电子数据库中进行搜索的格式，例如安捷伦科技公司的 ScanView），它们可以帮助您定位目标分析物或为您提供初始条件。此外，一些制造商还提供同种化合物或类似化合物的应用简报，还有一些制造商则提供 SPE 方法开发的咨询服务。本章末尾有一个该主题相关书籍的列表——这是您进行方法开发和寻找应用信息的一个良好开端。

了解分析物的特征： 在大多数情况下，您都知道分析物的结构并且可能了解它们的一些化学和物理性质。分析物的官能团和其他化学性质将决定可实现最大保留的 SPE 模式。分析物在各种溶剂中的溶解性、稳定性、pKa、log P（辛醇/水分配系数）等参数有助于最大化（或最小化）它们在所选固定相上的保留。分析物的浓度会对分离分析物所用的实验方法产生深刻的影响。ppb 级或更低浓度级别的分析物对于回收率、纯度和重现性来说是一个巨大的挑战，而较高的分析物浓度能够简化方法开发并使分析任务变得更简单。

了解样品基质的特性： 了解样品基质的特性对于选择合适的上样、淋洗和洗脱条件非常重要。如果基质的特性与目标分析物差异较大，方法开发将变得更轻松。如果基质中存在具有与目标分析物类似的官能团或 pKa 的化合物，方法开发将变得更加困难。了解基质的溶解性特征、稳定性、pH、离子强度等有助于萃取模式的选择。

开发或应用高效的 HPLC 或 GC 方法： 显然，我们需要能够测定纯度、回收率和重现性的分析方法来监测方法开发的进程。有时，由于 SPE 与 HPLC 类似，我们可以借鉴成功开发的 HPLC 分析方法来选择 SPE 可采用的模式、固定相和保留特性。根据 SPE 的这一性质，气相色谱方法对于选择可用的 SPE 固定相的帮助不大。

活化 SPE 填料： 请参阅本章前部分的内容回顾活化 SPE 填料的重要性（请参阅 *SPE 操作*，步骤 1），因为固定相必须进行适当的溶剂化之后才能接受样品。

通常使用甲醇作为 RP-SPE 填料或极性键合相填料（例如氰基、氨基和二醇基键合相）的活化溶剂。但是，MeOH 不能用于硅胶填料，因为它会造成这种填料高度脱活，对于未修饰的硅胶填料，我们建议使用中等极性的溶剂（如二氯甲烷）或非极性溶剂（例如己烷）作为活化溶剂。

活化填料后，应使空气气流通过小柱以去除多余的甲醇（或其他活化溶剂），直至小柱底部不再有液滴滴下（步骤 1A，图 9.8.1 中未示出）。但是，空气气流干燥操作仅限于该步骤，不应持续进行，因为这会影响分析的重现性（尤其是使用 SPE 萃取盘时）。最好在柱床上保留少量的活化溶剂，而不要冒险延长干燥时间，以致柱床完全干燥。如果在引入样品之前硅胶基 SPE 填料已完全干燥，应在继续实验前重复活化步骤。在这方面，聚合物填料（例如安捷伦的 Plexa 产品）的要求不如硅胶基 SPE 填料这样苛刻。在 RP-SPE 分离中，也可以使用可与活化溶剂和样品混溶的溶剂（例如水或缓冲液）吹扫小柱来去除多余的甲醇。进行预活化水洗（步骤 1，图 9.8.1，溶剂“D”）有利于 SPE 小柱为水样的引入（步骤 2，图 9.8.2）做好准备，但这一水活化步骤与上样步骤之间时间不宜间隔太长（不应超过几分钟），因为如果填料处于水中的时间过长，溶剂化的溶剂可能会慢慢分配至水中，从而使疏水键合相“去溶剂化”。

选择/测试吸附剂和加载溶剂：一旦选好了萃取模式，就需要确定能够最大程度保留样品溶剂中的分析物的吸附剂。针对所有的萃取模式，有多种不同的吸附剂。为了使步骤 2 中的分析物保留最大化（图 9.8.2），“样品-溶剂”相对于“分析物-填料”的结合来说应该是一种“弱”溶剂。在某些情况下，样品呈溶液状态，这时我们需要决定是让样品“保持原样”，还是使用新的溶剂替换原来的溶剂。便利性通常是一个重要的考虑因素，在条件允许的情况下，我们建议使用原始样品溶剂。

对于反相 SPE 填料（图 9.10A），水（pH 经过调节）是首选的上样溶剂，应尽可能减少其中添加的有机溶剂（请记住考虑其中添加的内标）。因此，如果您的样品是水溶液且主要含非离子组分，RP-SPE 通常是最优的选择。对于硅胶、氧化铝或极性键合相（例如氰基、二醇基，氨基）上的正相填料（图 9.10B），首选的溶剂是己烷或其他饱和烃；样品溶剂的极性越弱越好。因此，如果您的样品溶解在烃类溶剂或其他非极性有机溶剂中，可以使用正相 SPE。对于离子交换填料，首选的样品溶剂是离子强度尽可能低的水（但填料可耐受的少量有机溶剂不会造成问题）。如果样品含有能溶解在水中或缓冲液中的离子分析物或可离子化的分析物，那么 RP-SPE 固定相（图 9.10）、离子交换固定相（图 9.10C）或混合模式固定相（图 9.10D）均适用。后两种固定相有助于“调谐”SPE 纯化，近年来越来越受到人们的青睐。例如，采用同时具有离子交换和反相（RP）特性的固定相，利用两种不同的机制，能够为带疏水性官能团的可离子化分析物的纯化带来很大优势。并且，与 HPLC 分析柱“正交”（即具有不同的选择性或吸附特性）的 SPE 纯化降低了导致分析物峰被干扰峰重叠的可能性。

对于 RP-SPE 小柱来说，当样品含有可离子化的分析物（如有机酸或胺类）时，可以通过调整 pH（而不是改变溶剂）来保留（步骤 2 和 3）和去除（步骤 4）化合物。例如，通过在初始淋洗溶剂“W”（步骤 3）中使用低 pH 的水-有机缓冲液（例如 30% 乙腈/低 pH 缓冲液），可使有机酸分析物以其非离子化（中性）形式 ($k > 1$) 被保留。极性的离子杂质和质子化的碱将从小柱中洗脱出来并被弃去。接下来可增加 30% ACN/缓冲液淋洗溶剂的 pH，使 $pH > pK_a$ ，分析物全部离子化，且 $k \ll 1$ （步骤 4），从而使用小体积的溶剂即可洗脱分析物。

对于具有静电相互作用性质的离子化合物和可离子化化合物来说，离子交换技术非常适用，并且能为它们提供足够的选择性。阳离子交换填料适用于质子化的碱和其他阳离子，而阴离子交换填料则适用于离子化的酸和其他阴离子。离子交换填料有两种形式：“强”离子交换填料和“弱”离子交换填料；如果主要目的是强烈保留分析物，那么通常首选强离子交换剂。弱离子交换剂的保留性能是 pH 的函数。pH 的选择是在保留固定相的离子特征和确保离子分析物保持离子状态之间进行权衡。例如，使用羧酸弱阳离子交换剂分离质子化的胺时，所选的 pH 值必须能够确保胺保持质子化的形式（阳离子），并且羧基带负电荷（阴离子）。因此，pH 成为了可优化保留性能或将保留的分析物从弱离子交换剂上释放的一个有用变量。弱阴离子或弱阳离子交换 SPE 固定相相对于在各种 pH 条件下都呈离子化状态的分析物尤其有效（例如，二者分别对于带有季铵官能团的分析物和带有磺酸官能团的分析物尤其有效）。

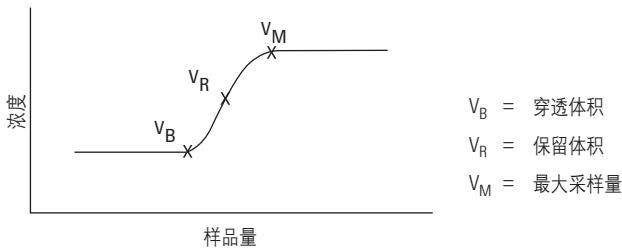
在某些情况下，选择合适的吸附剂时通常遵循一个经验方法。例如，基于已知的分析物特性能选出一些可能适合的 SPE 固定相。接下来可以测试这些固定相对分析物和干扰物的保留性，从而选出最佳的 SPE 吸附剂。现在已经有了 SPE 方法开发试剂盒，它能提供多种固定相用于筛选。这些试剂盒提供多种固定相，并且涵盖各种 SPE 形式：小柱、萃取盘、移液枪头或 96 孔板。96 孔板具有很强的灵活性，用户可建立自定义的板配置，在板上每一行的孔中填装不同的吸附剂。通过筛选不同的吸附剂，可以选择出最佳的吸附相。选出最佳固定相之后，用户就可以整盒地购买这种最佳固定相用于最终的方法。为了使最佳固定相和溶剂的选择更加简单，可采用自动化的仪器 SPE 系统，该系统经编程后可考察多种 SPE 固定相，不仅能自动分析各种上样溶剂，还能自动分析这些固定相适用的淋洗和洗脱溶剂条件。

下一个考虑因素是选择合适的小柱尺寸和固定相吸附剂的质量。SPE 小柱的上样体积取决于：(a) 小柱的尺寸和类型（填料重量）；(b) 分析物在样品-溶剂系统中的保留，以及 (c) 样品中分析物和干扰物的浓度。一般来说，为了在后续的色谱分离中获得最佳检测灵敏度，需要应用尽可能大的样品体积以最大限度提高其 SPE 馏分中分析物的浓度。虽然采用尺寸更大的小柱能够增加上样体积，但这并不会提高检测的灵敏度，因为 SPE 馏分中的最高分析物浓度是由样品体积与填料重量的比值决定的。因此，当可用样品量较少时，应尽可能选择最小的 SPE 小柱。小柱对分析物和干扰物的容量大概是 10-20 mg/g 填料。制造商通常以微当量/克为单位提供离子交换 SPE 吸附剂的总离子交换容量，以使用户确保上样量不会超过交换剂容量。

选好小柱尺寸之后，必须确定可以应用的最大样品体积。样品穿透是一个非常重要但经常被忽视的参数。SPE 中使用的吸附剂的样品容量是有限的。在 SPE 装置上加载质量或体积过大的样品会导致分析物损失，从而使回收率下降。这里所说的“样品”是指分析物、干扰物以及基质的全部贡献，因为样品的所有组分都会占用吸附剂活性位点。测定穿透的方法是以缓慢的流速 (1-2 mL/min) 泵入样品溶液并使其通过 SPE 装置，同时使用紫外检测器或其他可以测量所有样本组分的检测器监测基线。另一种方法是上样（或泵入）体积较大的样品并收集小体积馏分。然后使用 HPLC 或 GC 分析馏分中的分析物，以确定可避免发生分析物穿透的最大样品体积。执行该实验时，选择的分析物浓度应该是样品中预计的最大浓度。（如果样品基质的构成可能发生变化，那么可使用的样品体积也会随之变化）。

如图 9.11 所示，样品最终将饱和固定相并从小柱出口洗脱出来。穿透体积 (V_B) 代表穿透的起点。 V_M 代表单次上样 SPE 装置可容纳的最大样品体积。如果已知样品的浓度和流速，我们就能计算特定重量的吸附剂能处理的样品质量。上样量不得超过该质量，否则可能损失分析物，导致回收率降低。请注意，最终选用的样品体积应该略小于通过该方法确定的值，以确保在步骤 3 中去除杂质时不会损失分析物。

图 9.11
SPE 装置的穿透曲线



确定淋洗（冲洗）溶剂：该步骤（图 9.8.3）的目的是尽可能多地去除早洗脱干扰物。这个目标可以通过选用对分析物具有中等保留性能的淋洗溶剂“W”来实现；例如在分离条件下（样品基质存在时）， $3 < k < 10$ 。分析人员应尽可能使用大的淋洗溶剂体积来去除早洗脱杂质，同时让分析物保留在小柱上。可采用与确定最大样品体积相同的方法来确定最佳淋洗溶剂体积（请参阅上文），即收集馏分并分析其中的分析物。

有两种方法可以确定淋洗溶剂的最佳组成：

首先，使用 HPLC 时，SPE 方法开发通常需要以分析物标准品的方法为基础。如果一种填料同时适用于 SPE 和 HPLC，那么 HPLC 的保留数据能够为淋洗溶剂的组成提供初步的估计。如果 HPLC 的流动相是 30% ACN/缓冲液 (ACN 即乙腈)，那么分析人员应该以 30% 的乙腈作为初始淋洗溶剂。如果收集和分析的淋洗溶剂体积低于 5-10 倍小柱体积 (1 个小柱的体积 (μL) 也可换算为填料的质量 (mg)) 时就发现分析物开始离开小柱，说明淋洗溶剂强度过大。降低 ACN 的百分比并重复实验。

第二种方法是上样之后使用 5-10 倍柱床体积的强度连续递增的溶剂淋洗小柱 (例如 25%、50%、75%、100% 的有机溶剂；或者在正相 SPE 中使用溶剂强度和 P' 值递增的一系列纯溶剂)。通过监测各个浓度下的萃取洗脱液可确定样品的洗脱特征。

请记住，最有效的淋洗溶剂应该是既能去除干扰物，又不会洗脱吸附分析物的溶剂。对于可离子化的干扰物/基质化合物，调节淋洗溶剂的 pH 值能够有效调整干扰物的保留/释放 (例如酸性化合物在低 pH 条件下保留性较强，在高 pH 条件下保留性较弱，碱性化合物则正好相反)。

确定洗脱溶剂：该步骤的目的是尽可能以最小的洗脱溶剂体积收集所有分析物，同时尽可能去除最多的晚流出干扰物。更进一步的目标是所得分析物馏分的存在形式使其能够直接注入 HPLC 或 GC 色谱柱。对于 HPLC 分析，这些目标是相互矛盾的。采用非常强的 SPE 洗脱溶剂“E” (以致分析物的 $k \ll 1$) 能够最小化样品体积，但不一定能够获得可进样到 HPLC 色谱柱上的大量分析物馏分。采用溶剂强度恰好足以洗脱具有特定保留性 (例如 $k \approx 2$) 的分析物的洗脱溶剂，可以最大限度地减少晚洗脱物对分析物馏分的污染，但增加了洗脱溶剂的体积，而且最后不一定能够直接进样全部的分析物馏分。使用疏水性较弱的 RP-SPE 填料 (如氰基填料) 可以将这个问题最小化。当晚洗脱干扰物会造成问题时，最好的方法是在 $1 < k < 5$ 的条件下进行分析物的洗脱。如果需要进样所有分析物用于 HPLC 分析以保证检测的灵敏度，可能需要将分析物馏分蒸发至干并进行复溶。水样不易蒸发，可以采用冻干法作为替代方法。如果采用正相 SPE，那么分析物馏分存在于有机溶剂中，通过蒸发即可轻松去除。正相 SPE 分离也不一定保留在反相 HPLC 中倾向于晚洗脱的弱极性化合物。

如果分析物是酸或碱，可以通过改变 pH 来调节 RP-SPE 淋洗步骤和洗脱步骤中溶剂的强度（如前文所述）。这种方法让我们能够更加容易地选择最后可直接进样全部分析物馏分的萃取条件，而不会使分析物馏分受到会增加 HPLC（或可能是 GC）分离时间的晚洗脱物的污染。采用离子交换填料的 SPE 更有可能为后续的 HPLC 分析提供理想的分析物馏分。由于可能发生填料溶解和降解，建议用户不要在约 $2 < \text{pH} < 8$ 的范围以外使用硅胶基质 HPLC 色谱柱。但一次性 SPE 小柱可用于更宽的 pH 范围。少量溶解的硅胶或水解的键合相一般不会干扰后续的 HPLC 或 GC 分析。如果分析物馏分中溶解的硅胶会造成问题，可选用在 $1 < \text{pH} < 14$ 条件下性质稳定的聚合物 SPE 小柱。

测试空白和添加基质：针对分析物回收率、纯度和重现性完成方法优化之后，应使用优化的淋洗和洗脱溶剂运行添加基质样品和空白样品。

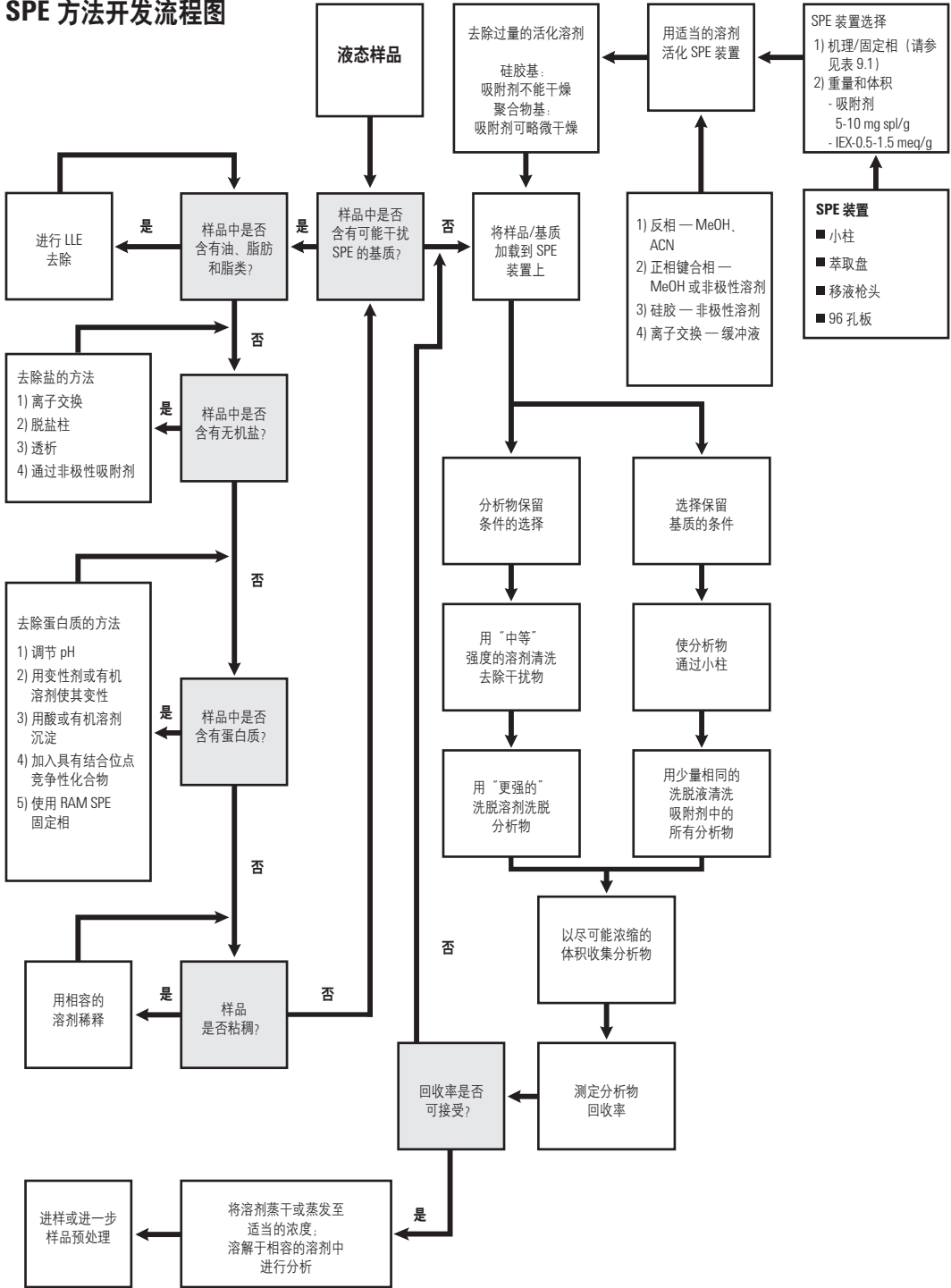
使用 SPE 时，运行空白以排除由柱体、滤芯和填充材料中的可萃取物引起的潜在污染非常重要。如果可能存在由这些材料引起的污染，在使用小柱之前应使用有机溶剂（如甲醇、乙腈）或稀酸（如 0.1% 甲酸）淋洗小柱。

测试真实样品和添加样品：现在需要使用真实样品和加标样品对方法进行测试，以检查分析物纯度、回收率和重现性是否会受到影响。如果这些指标受到了影响，就需要进一步改进方法。

为了协助方法开发，**图 9.12** 提供了方法开发的流程图，解释了执行 SPE 实验的基本步骤。该流程图能够指导我们执行开发 SPE 方法的主要步骤。在该流程图以及**表 9.1、9.2**，**图 9.8、9.9** 的帮助下，我们就能开始执行方法开发过程：选择适合的 SPE 固定相、活化溶剂、上样溶剂、淋洗溶剂和最终的洗脱溶剂。对于非常复杂的样品，在 SPE 纯化之前或之后可能还需要额外的样品前处理方案。流程图左侧所展示的其他样品前处理技术可用于去除难以处理的棘手干扰物。但是，通常最佳的 SPE 方法都应该具备获得足够纯净的样品用于直接进样分析的能力。串联质谱的高选择性和高灵敏度让我们能够使用更加简单的样品前处理方案。

图 9.12

SPE 方法开发流程图



方法验证

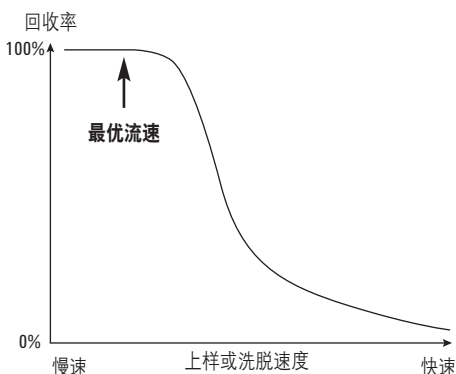
完成 SPE 方法之后，可能还需要进行方法验证（或者在不需要完整的方法验证时，评价方法的稳定性）。表 9.3 列出了验证方法时需要考虑的一些变量。图 9.13 展示了需要进行的一项更重要的研究 — SPE 中流速和回收率的影响，特别是对于上样、淋洗和洗脱步骤。吸附过程涉及动力学因素。分析物扩散到多孔的 SPE 支撑相中并与活性官能团发生相互作用需要一定的时间。如果流速太快，就没有足够的时间使其达到平衡，而流速太慢又会浪费时间。离子交换 SPE 的流速甚至更加重要，因为离子交换的动力学过程可能相当缓慢。通常，对于典型的小柱（例如 200 mg/3 mL），吸附和正相小柱使用 5 mL/min 或更低的流速，离子交换固定相使用 1-2 mL/min 的流速就足够了。

表 9.3

SPE 方法验证中需考虑的变量	
所需测试	待考察的实验参数
吸附剂	重量、小柱样式，不同批次
活化溶剂	溶剂强度（弱或强溶剂）、接触时间、体积
上样溶剂	类型、体积、有机物 %、pH、离子强度、流速、穿透体积、分析物回收率/损失、干扰物/基质去除
清洗溶剂	类型、体积、有机物 %、pH、离子强度、流速、分析物回收率/损失、干扰物/基质去除
洗脱溶剂	类型、挥发性、溶剂强度、体积、流速、pH、离子强度、干扰物/基质保留、分析物回收率/损失
分析物和基质稳定性	测试方法的每个步骤
样品/基质载荷能力	不同的分析物浓度
检测能力	检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)
方法线性和范围	在分析物预期浓度范围内进行测试，以基质载入量的函数进行测试

图 9.13

SPE 过程中样品回收率与流速之间的关系



SPE 应用实例

在这里我们将介绍使用 SPE 解决“现实世界”问题的一些实例。作为糖类的替代品，合成甜味剂越来越多地被用于对抗肥胖和龋齿。研究表明，某些合成甜味剂可能会导致某些动物体内产生肿瘤。污水处理厂不能完全去除废水中的人造甜味剂，因此这些污染物会污染下游水域并可能在饮用水中出现。采用中性聚合物吸附剂的固相萃取在分离和浓缩大体积水样中的有机污染物方面非常有用。此类吸附剂对有机物具有非常高的亲和力，而且对于水相环境中的有机物具有良好的回收率。在 Junginger 和 Korte 的研究中，他们使用含有 SPE 吸附剂 Bond Elut Plexa (安捷伦科技公司) 的 200 mg/6 mL 小柱分离水中的 4 种合成甜味剂 (安赛蜜、甜蜜素、糖精和三氯蔗糖)，每种合成甜味剂在水中的浓度均为 1 ppb。首先，使用 3 mL 甲醇，然后使用 3 mL 酸化的 HPLC 级纯水活化 SPE 小柱。使用 pH 为 2 的硫酸酸化水样品 (100 mL)，然后以 5 mL/min 的流速上样。这一痕量富集实验不需要冲洗步骤。采用 5 mL 甲醇以 2 mL/min 的流速从小柱上洗脱分析物。在氮气气流下将溶剂蒸发至近干，然后使用 1 mL 乙腈:水 (5:95) 复溶样品。采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 HPLC 色谱柱 (4.6 x 50 mm, 1.8 μ m) 和水-甲醇梯度，使用串联质谱检测，在仅 5 分钟左右的时间内就实现了 4 种甜味剂的基线分离。进样量为 20 μ L 时，4 种甜味剂的回收率范围为 74-91%，RSD 的平均值在 7% 左右，这样的结果在如此低的浓度水平下是完全可以接受的。

链格孢属真菌是水果和蔬菜等种植物的致病菌。链格孢属是人们特别关注的植物致病菌之一，它经常引发植物疾病，因为它会产生大量的有害真菌毒素，包括交链孢酚 (AOH)、交链孢酚单甲醚 (AME)、交链孢烯 (ALT)、展青霉素 (TEN) 和细交链孢菌酮酸 (TEA)。这些毒素在谷物、种子、辣椒和各种水果中均能发现。它们的测定对食品安全很重要。首先，必须从食物中萃取出这些毒素，然后通过 SPE 进行纯化和浓缩。Reinhold 和 Bartels 开发了如图 9.14 和 9.15 所示的样品前处理流程。在萃取蔬菜和葡萄汁样品中的毒素时，Bond Elut Plexa 聚合物又一次展现出了它出色的纯化性能。如图 9.16 所示，采用三元梯度洗脱以及反相 HPLC 与质谱联用检测，在 15 min 内就实现了基线分离。SPE 纯化减弱了质谱仪的离子抑制效应。该方法的检出限为 5 µg/L，定量限为 10 µg/L。葡萄汁中链格孢菌毒素的典型回收率范围为 97-105%。RSD 范围为 1-3.6%。

图 9.14
萃取链格孢菌毒素的初始工作流程

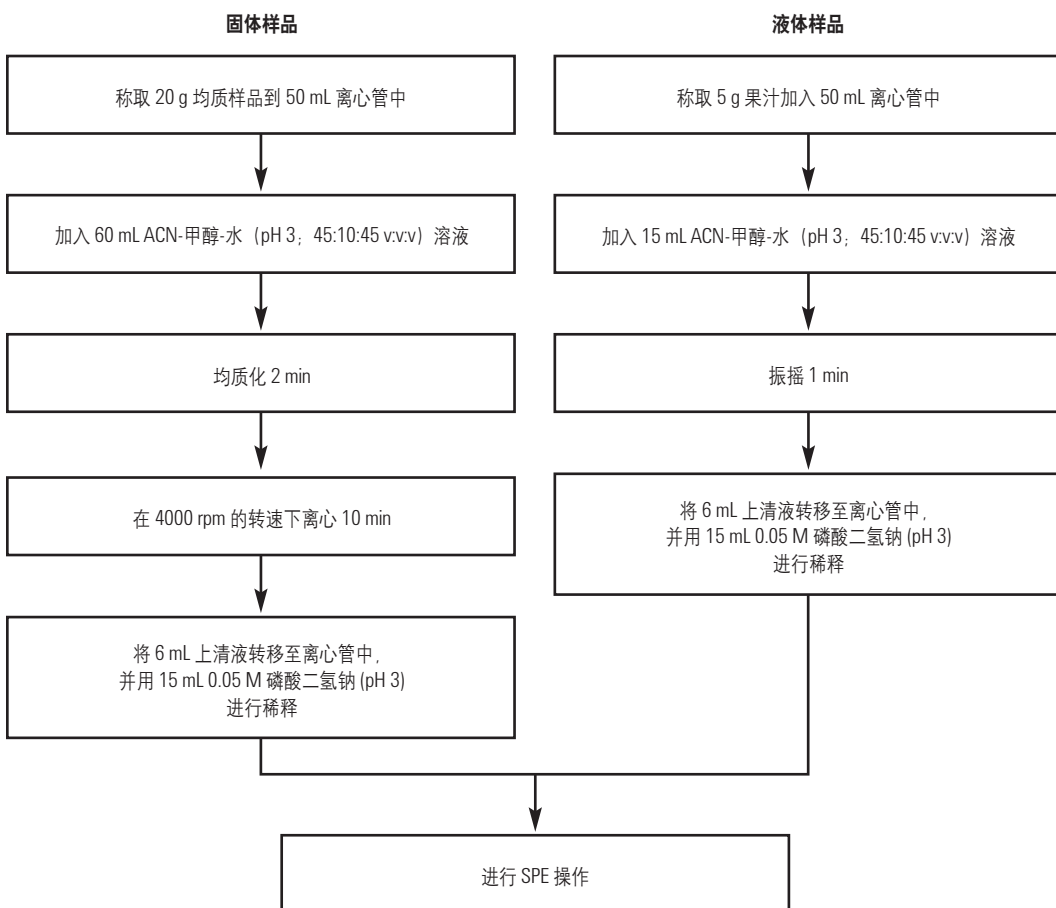


图 9.15

SPE 纯化链格孢菌毒素萃取物的工作流程

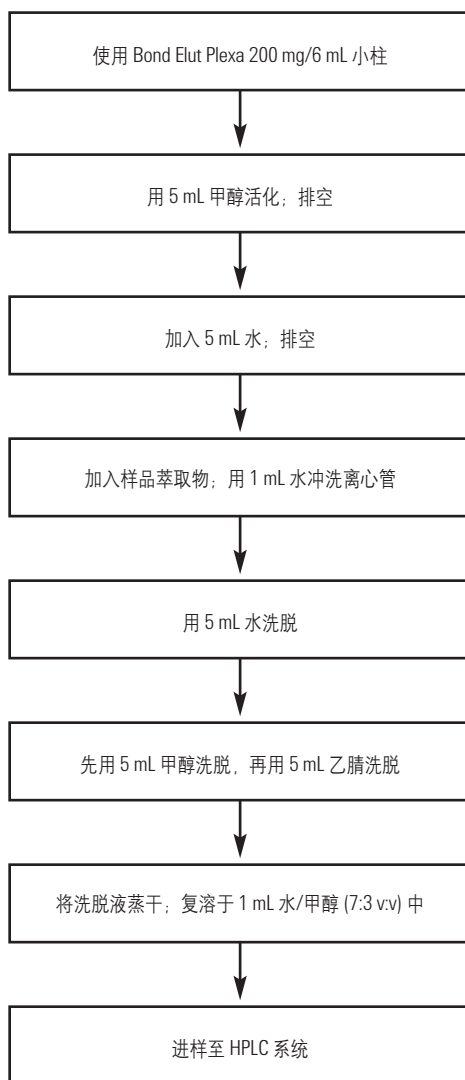
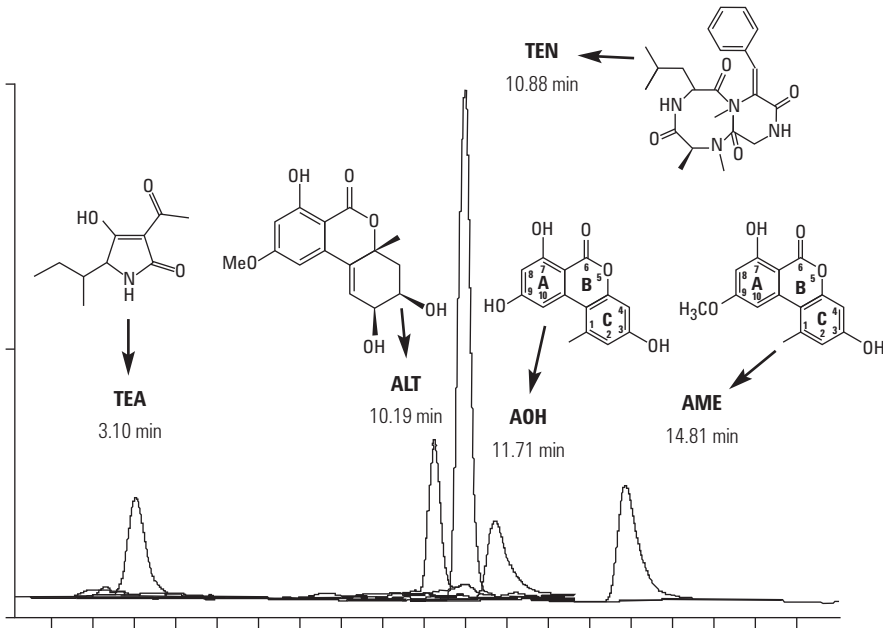


图 9.16

葡萄汁萃取物中链格孢菌毒素的 LC/MS 色谱图*



* 加标浓度 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的葡萄汁

Bond Elut Plexa 等聚合物吸附剂的出现促进了通用 SPE 方法的开发。将 SPE 纯化应用于棘手样品时，采用通用方法通常能够节省时间。通用方法发挥巨大作用的领域之一是生物体液中酸性、碱性和中性化合物的纯化。制药行业中大量的生物分析化合物都是碱性的，可以使用疏水性吸附剂或阳离子交换吸附剂轻易萃取。然而，降脂他汀类药物和抗炎药物往往是酸性的，使用传统的疏水性吸附剂进行萃取存在一定的困难。一种简单的通用方法被开发用于分析加标血浆样品中的酸性他汀类化合物，该方法采用了强阴离子交换剂 Plexa PAX，由于这种离子交换剂具有聚合物性质，在高 pH 条件下也能正常使用²⁴。在 96 孔板配置中使用 Plexa PAX 树脂。每个孔含有 30 mg 离子交换树脂。SPE 方法非常简单：首先使用 2% 氢氧化铵溶液按照 1:3 的比例稀释 100 μL 人血浆。使用 500 μL 甲醇之后接着使用 500 μL 水活化每个孔。将含有加标他汀类药物的稀释血浆样品添加到孔中的树脂上。上样后，首先使用 500 μL 水淋洗 Bond Elut Plexa PAX，接着使用 500 μL 甲醇淋洗。向 96 孔板添加 500 μL 5% 甲酸的甲醇溶液进行洗脱。收集洗脱液，将其蒸发至干，然后用 1 mL 5 mM 甲酸铵:甲醇 (80:20) 溶液进行复溶。采用反相 HPLC-LC-MS/MS 和梯度洗脱分析以下 5 种加标浓度为 50 ng/mL 的他汀类药物：阿托伐他汀、双氯芬酸、咪塞米、酮基布洛芬和普伐他汀，在仅仅 3 分钟左右的时间里就完成了分离。所有 5 种他汀类药物在 0.5-200 ng/mL 的范围内都能获得线性的校准曲线。通过测量分析物响应并将其与加标流动相标准的响应进行比较来计算分析物回收率。回收率范围为 62% (阿托伐他汀) 到 96% (咪塞米)，50 ng/mL 浓度水平的 RSD (n=6) 范围为 2.3-6.1%。

推荐的 SPE 相关教材

由于篇幅有限，本章只对 SPE 进行了基本的介绍。第 10 章将提供有关更具体的 SPE 相的信息。本书适合一般性阅读，内容全部与 SPE²⁵⁻³² 及其自动化相关³³。如需了解关于此主题的更详细的信息，请查看文中提及的参考文献。

参考文献

1. Díaz-Ramos, M.C.; Suarez, A.; Rubies, A.; Company, R.; Korte-McIlrick, E. *Determination of 24 PAHs in Drinking Water* (饮用水中 24 种多环芳烃的测定), 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5990-7686EN, **2012 年**
2. Gledhill, S. *High Sensitivity Detection of Pesticides in Water Using On-line SPE Enrichment* (使用在线 SPE 富集方法对水中农药进行高灵敏度检测), 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5991-08871EN, **2012 年**
3. Hudson, W.C.; Massi, J. M. *Protein Desalting and Concentration for MS Analysis Using Agilent Bond Elut OMIX C4 Pipette Tips* (使用 Agilent Bond Elut OMIX C4 移液枪头进行 MS 分析中的蛋白质脱盐和浓缩), 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5990-8885EN, **2011 年**
4. Baños, C.-E.; Silva, M. *Talanta* **2009**, *77* (5), 1597-1602
5. Ochoa, M.L.; Harrington, P.B. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (3), 854-863
6. Henriksen, T.; Svensmark, B.; Lindhardt, B.; Juhler, R.K. *Chemosphere* **2001**, *44*, 1531-1539
7. Alfred-Stevens, A.; Eichelberger, J.W. *Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water* (Supplement I), Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of R&D, U.S. EPA, Cincinnati, OH, **1990**, 33-63
8. Fenn, J.B. et.al. *Science* **1989**, (246), 64-71
9. Karas, M. *Anal. Chem.* **1988**, (60), 2299-2301
10. Thomas, R. *Spectroscopy* **2001**, *16* (1), 28-37
11. Majors, R.E. *LC.GC* **2005**, *23* (4), 358-369
12. Majors, R.E.; Shukla, A. *LC.GC No. America* **2005**, *23* (7), 646-660
13. Kataoka, H.; Lord, H.L.; Pawliszyn, J. *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 35-62
14. Pawliszyn, J. *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, **1997**, 264 pp ISBN-10: 0471190349 and ISBN-13: 978-0471190349
15. David, F.; Tienport, B.; Sandra, P. *LCGC No. America* **2003**, *21* (2), 108-118
16. Baltrussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.A. *J. Microcol. Sep.* **1999**, *11*, 737
17. Popp, P.; Bauer, C.; Wennrich, L. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *436* (1), 1-9

(续)

参考文献 (续)

18. Snyder, L.R. *J. Chromatogr. Sci.* **1978**, *16*, 223
19. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd Ed., Chapter 2 and Appendix I.2, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, **2010**
20. http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/online/3_series.htm
21. Takayama et al. *Long-Term Toxicity and Carcinogenicity Study of Cyclamate in Nonhuman Primates*, *Toxicol. Sci.* **2000**, *53*, 33-39.
22. Junginger, S.; Korte, E. 一种耐用的样品制备方法用于分析废水中的人工甜味剂, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-8248CHCN, **2011** 年
23. Reinhold, L.; Bartels, I. *LC-MS/MS Determination of Alternaria Toxins in Vegetables and Fruit Beverages*, (蔬菜和水果饮料中链格孢菌毒素的 LC-MS/MS 测定), 安捷伦科技有限公司应用简报, 出版号 SI-01322, **2010** 年
24. Hudson, W. 采用 *Plexa PAX* 吸附剂萃取人体血浆中的酸性化合物, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-9027CHCN, **2011** 年
25. Simpson, N.; van Horne, K.C. *Sorbent Extraction Technology Handbook*, Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA, **1993**
26. Thurman, E.M.; Mills, M.S. *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*, John Wiley and Sons, New York, **1998**, ISBN-10: 047161422X and ISBN-13: 978-0471614227
27. Fritz, J.S. *Analytical Solid-Phase Extraction*, Wiley-VCH, New York, **1999**, ISBN-10: 0471246670 and ISBN-13: 978-04712466
28. Simpson, N.J.K. (Ed.) *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*, Marcel Dekker, New York, **2000**, ISBN-10: 082470021X and ISBN-13: 978-0824700218
29. Telepchak, M.J. *Forensic and Clinical Applications of Solid-Phase Extraction*, Humana Press, Totowa, NJ, **2004**, ISBN-10: 0896036480 and ISBN-13: 978-0896036482
30. Sadek, P. *Practical Solid-Phase Extraction: Fundamentals and Method Development*, Wiley-Interscience, New York, **2005**, ISBN-10: 0471329894 and ISBN-13: 978-0471329893
31. Macwana, C.; Parmar, V. *Solid-Phase Extraction: Principle, Trends, Applications and New Developments*, LAP LAMBERT Academic Publishing, **2012**, ISBN-10: 3659206768 and ISBN-13: 978-3659206764
32. Olariu, R-I.; Arsene, C.; Vione, D.; Grinberg, N. *Solid-Phase Extraction: Principles and Applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, **2013**, ISBN-10: 1439868328 and ISBN-13: 978-1439868324
33. Wells, D.A. *High-Throughput Bioanalytical Sample Preparation: Methods and Automation*, Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, **2003**

SPE 中的特殊技术

有一些技术与 SPE 的操作原理极为相似。这些技术近年来越来越受到重视，因为人们在不断地寻求更少溶剂用量、更高选择性，以及可实现自动化以简化工作流程和获得更高重现性的样品前处理方法。本章将会介绍其中的一些技术。

固相微萃取 (SPME)

固相微萃取是一种相对比较新的样品萃取技术，最初由 Pawliszyn 及其同事于九十年代¹早期提出。其最常用的形式 SPME 包括两个独立的步骤：采用涂覆于固体熔融石英上的硅胶（或相关吸附性材料）薄层从样品基质中吸附溶质（图 9.5 和 10.1A）；然后通过热脱附 (GC) 或液体脱附 (LC) 将被吸附的分析物转移至色谱进样口。

SPME 已被应用于气相色谱 (GC) 和液相色谱 (LC) 分离，但其最成功的应用还是 GC。它可将分析物浓缩在纤维涂层中，而留下分析不需要的大量溶剂和非挥发性残留物，因此我们在进行 GC 分析时，无需再将大体积的样品转移至 GC 色谱柱中。在 GC 分析中，SPME 是一种更节省溶剂的样品前处理技术。在 LC 分析中，该技术的溶剂用量比液液萃取技术少好几个数量级，与 SPE 相比所使用的溶剂也更少。

另一项相关的技术——由 Sandra 及其同事首先提出的搅拌棒吸附萃取 (SBSE)，²采用涂覆有吸附性聚合物薄层的磁力搅拌棒（请参阅第 9 章，SPE 装置）。将搅拌棒置于样品溶液中一段时间，其中的溶质将被吸附在聚合物涂层中。接下来，取出搅拌棒，干燥，然后进行热脱附以用于 GC 进样，或者采用可兼容 LC 或 GC 的另一种溶剂反萃取吸附的分析物。SBSE 所用的固定相体积大于 SPME，因此，其萃取分析物的效率更高，吸附剂溶解度更低。因此，SBSE 的灵敏度通常高于 SPME。

表 10.1 列出了已成功应用 SPME 采样的多种应用。

表 10.1

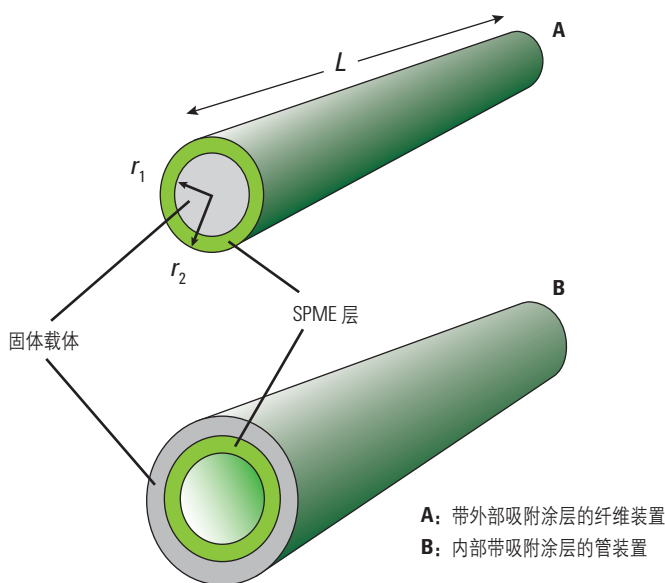
SPME 的典型应用		
分析物	基质	参考文献
香料	鲜花	3
化学毒剂	服装面料	4
处理杂质	药物	5
有机氯农药	中国茶	6
挥发性化合物	酸性介质	7
	奶酪	8
挥发酚	葡萄酒	9
环境污染物	水	10
氯代苯甲醚	软木塞	11
挥发性脂肪胺	空气	12
苯脲类除草剂	水溶液样品	13
亚 ppb 级邻苯二甲酸酯	水	14
甲基汞	金枪鱼	15
挥发性有机化合物	土壤	16
异丁基吡嗪 (MIBP 或 IBMP)	葡萄酒	17
BTEX	水	18
2-甲基异茨醇 (2-MIB) 和土臭素	饮用水	19
三氯苯甲醚	葡萄酒	20

SPME 原理

SPME 采用涂覆于固体熔融石英纤维上的吸附性聚合物涂层从样品中（通常为水性样品）萃取溶质（图 10.1A）。表 10.2 列出了一些已商品化的纤维填料。经过耗时较长（30 min 或更长）且需要搅拌辅助的采样阶段之后，萃取将达到平衡。然后将 SPME 纤维以及捕获的溶质转移至进样口系统，使溶质脱附进入气态（用于 GC）或液态（用于 LC）流动相中。实验的成功取决于选择的实验条件是否能使 SPME 吸附层在暴露于大量样品中时尽可能地吸附目标溶质。另一方面，吸附的溶质在脱附步骤中应尽可能快速且完全地释放。如果脱附过程比较缓慢，造成溶质峰展宽，则可能需要进行二级捕集以重新聚焦分析物。接下来，如果使用 GC 快速加热，重新聚焦的分析物将被快速吹扫入色谱柱进行分离和分析。吸附层填料和膜厚度的选择会显著影响吸附程度以及随后脱附的效率。现在已经有了与注射器整合的 SPME 纤维，无论是对于手动操作还是对于机器人自动进样系统来说都很方便。使用过的纤维通常可通过溶剂冲洗或烘烤纯化后进行再利用。图 10.2 展示了整个提取转移和脱附过程。虽然通过阀配置进行脱附可将溶质转移至 HPLC 柱中，但更方便的方法通常还是进行离线实验，然后将所提取的物质转移至样品瓶或者手动转移至定量环进样器中。

图 10.1

SPME 萃取装置的截面图



摘自²¹

图 10.2

气相色谱和液相色谱中 SPME 分步过程

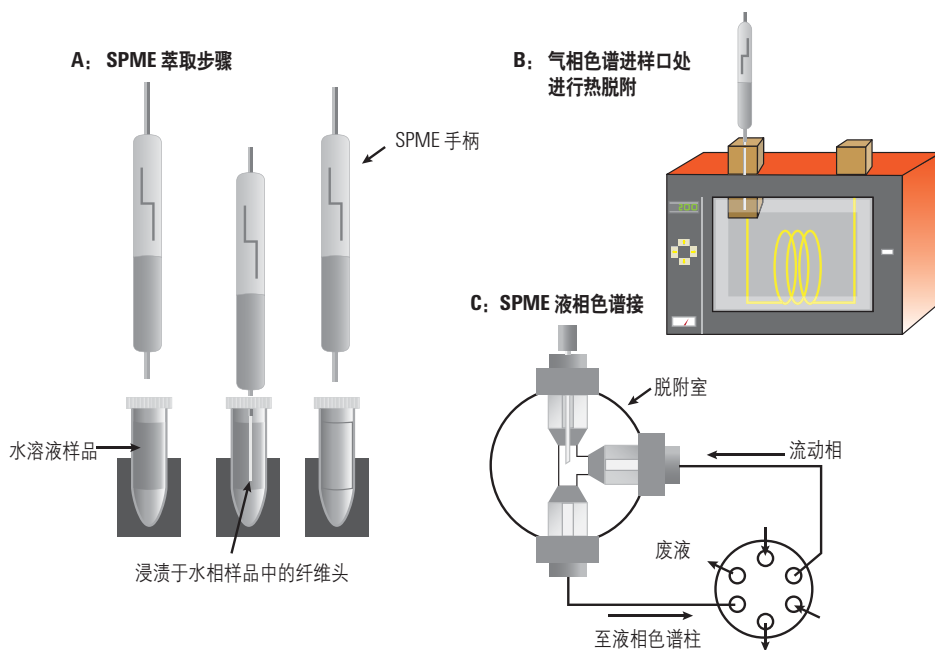


表 10.2

SPME 的样品类型及纤维头化学成分推荐

样品	纤维头化学成分推荐
低分子量或挥发性化合物	100 μm 聚二甲基硅氧烷 (PDMS)
较大的分子量或半挥发性化合物	30 μm PDMS 纤维头或 7 μm PDMS 纤维头
极性样品中的强极性物质	85 μm 聚丙烯酸酯
易挥发的极性物质, 例如醇和胺	65 μm 聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯 (PDMS/DVB)
痕量挥发性物分析	75 μm PDMS/Carboxen
扩增的分析物范围 (C3-C20)	PDMS 上的 50/30 二乙烯基苯/carboxen
常规 HPLC	60 μm PDMS/DVB

在另一种 SPME 方法中, 固定相被涂覆在开口熔融石英柱的内部 (图 10.1B)。这种方法被称为萃管式 SPME²², 通常用于液相色谱, 将含有目标分析物的溶液泵入带涂层的盘绕熔融石英管内部数次, 直至达到平衡。接下来, 清除毛细管中的样品, 然后使用强溶剂将涂层固定相捕集的分析物转移到 HPLC 的定量环进样器中。

接下来我们将详细介绍 SPME 的萃取、转移及脱附过程。接下来的讨论摘自 J. Hinshaw 的一篇文章²¹。

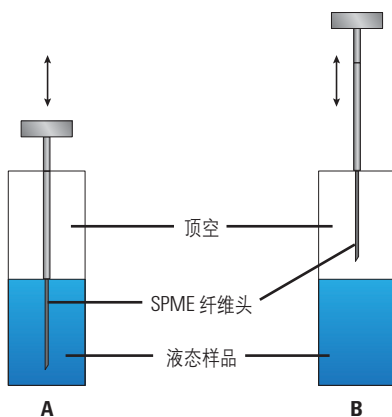
第 1 步：萃取

对于涂覆在外部的 SPME 吸附层上进行的萃取步骤，吸附层暴露于液相（图 10.3A）或气相（顶空）（图 10.3B）的样品中。随着时间的推移，SPME 萃取层中的溶质量与周围环境达到平衡，这代表在一组给定的采样条件下吸附层可以吸附和摄取的最大溶质量。达到平衡时 SPME 萃取层中的溶质量 (M) 可通过下面的公式进行估算：

$$M_{i,SPME} \sim K_{i,SPME} V_{SPME} C_i \quad \text{公式 1}$$

其中， $K_{i,SPME}$ 是 SPME 吸附层和样品之间的总溶质分配常数， V_{SPME} 是 SPME 萃取层的体积， C_i 是执行 SPME 采样前样品中的溶质浓度。

图 10.3
密闭样品瓶中的 SPME 萃取



A: 从液相中取样

B: 从顶空（气相）中取样

公式 1 假设样品体积远大于 SPME 萃取层的体积。SPME 涂层的典型厚度大约为 10-100 μm ，大约为常规使用的毛细管气相色谱柱涂层厚度的 10 倍。体积更小的标准 SPME 萃取层可相应地用于更小的微量样品体积。

步骤 2: 将混合物转移至柱中

采样之后的下一个步骤是转移与样品接触的 SPME 萃取层及其吸附的分析物, 使它们进入可将目标分析物脱附到色谱液体流动相的环境中。使用连接到 SPME 管的多位阀进行 LC-SPME 萃管式采样时, 无需物理移动 SPME 萃取层, 但必须在原来进行溶质脱附的地方建立新的溶剂化条件。另一方面, SPME 纤维装置要经历一段距离的转移, 从样品容器被转移到脱附溶质的地方 — GC 进样口或 (在某些情况下) 溶剂淋洗位置。一旦 SPME 纤维装置离开了接触样品的环境, 吸附的溶质浓度就会开始下降, 使其低于装置位于样品中时的溶质浓度值, 因为溶质会自然脱附到周围环境中。许多溶质的自然脱附速度都相当慢, 但挥发性分子在转移步骤中的损失比较明显。在实验室环境中, 从样品瓶到仪器的转移时间可以足够短, 因此溶质损失很小。在较长的转移过程和储存过程中, 通过将 SPME 萃取层密封在小型密封件中, 并确保脱附时将剩余样品中的含量也包括在内, 能够将损失降至最低。除了会损失挥发性样品, SPME 萃取层还很容易吸附环境空气中的非样品组分, 尤其是从较远地方的运输过程中。密封萃取层可防止此类污染物的涌入。许多商业化的 SPME 装置都带有这样的密封系统。

步骤 3: 脱附室

一旦将 SPME 萃取层置于色谱仪中,就必须为其提供能够将吸附的溶质尽可能以接近 100% 的效率进行脱附的条件,而且所用色谱模式的脱附时间还必须足够短。对于涂覆于管内部的 SPME 萃取层,在 LC 分析中,只需使用一个简单的多位阀就能将样品液体流切换为流动相。暂停 SPME 管中的流动相流速能够在脱附的物质被引入色谱柱之前为 SPME 萃取层在流动相中的溶质脱附达到平衡提供一定的时间。这一略显繁琐的停流操作可能会导致过度的谱带展宽,因此一些分析人员会转而采用离线脱附步骤。

在 GC 分析中,分析物从基于纤维的外部 SPME 萃取层上的脱附过程更加方便,只需将 SPME 插入标准的 GC 毛细管进样口系统即可(与进样针的操作一样)。在为了 GC 分析对 SPME 萃取层进行热脱时,需要进行一些权衡。首先,脱附温度必须足够高,以便溶质快速离开 SPME 纤维。脱附速度过慢可能会引起峰展宽和峰拖尾,除非气相色谱柱的起始位置处配备了额外的装置,用于在程序升温洗脱之前捕集溶质。相反地,进样口温度过高可能会引起热降解,还会引入一些来自隔垫流失和 SPME 萃取层本身的污染物进入到色谱柱中。

样品从 SPME 纤维脱附至分流/不分流进样口的过程中,应关闭分流流量,以便所有溶质都能进入色谱柱而不被分流,就像不分流进样一样。SPME 萃取层上吸附的样品质量一般不会达到需要样品分流的水平。窄径进样口衬管(通常被称为“不分流”衬管)能够将溶质体积限制在可能发生谱带展宽的体积以下,也有助于产生更好的峰形。将 SPME 装置从进样口分流器上移开之后,就能重新打开分流流量,以吹扫进样口中的残留物质,防止某种程度的峰拖尾。

由于内部体积较小,程序升温气化(PTV)进样口系统(请参阅第 6 章)非常适合用于 SPME 脱附。在 SPME 脱附应用中,操作温度应采用与传统的分流/不分流进样口相同的恒定高温,因为如果没有进行某种形式的附加固定相捕集,PTV 的加热速率(每分钟升高几百度的级别)可能不够快速,无法产生足够窄的峰。

SPME 的优点和缺点

SPME 的主要优势包括它能在采样过程中避免基质效应组分（从而防止基质效应导致原本清晰的样品组成失真或扰乱色谱分离）、具有简便性和易用性，以及它能降低溶剂消耗或根本不使用溶剂。因此，集上述特性于一身的 SPME 成为了一项极具吸引力的技术，可替代经典的顶空采样或热脱附采样、固相萃取以及经典的液-液萃取法。

正如许多相关的样品前处理和进样技术（例如顶空 GC 或热脱附），SPME 可处理棘手的样品基质，而且具有成本低、操作简单的优点。SPME 无需复杂昂贵的仪器配置，对于偶尔使用该方法的用户来说非常方便，而有经验的用户也可通过该方法得到良好的手动操作结果。这一点是手动顶空或热脱附采样不一定能做到的。现在已经有了可无人值守地进行 SPME 重复采样的自动采样器或机器人系统；自动化也是 SPME 的一个重要优势。

但另一方面，采用 SPME 进行定量分析较为困难。标准品与样品的前处理条件必须完全相同，但这通常很难实现。纤维本身较为昂贵，而您需要较为频繁地定期更换。随着纤维老化，它的性能会发生改变，致使重现性降低。此外，纤维较为脆弱，有时会带来方法稳定性的问题。与其他样品前处理技术相比，其达到平衡条件的速度较慢，因此，为了达到实际应用的要求，有必要缩短采样的时间。正如之前所提到的，如果脱附过程缓慢，则可能需要对非挥发性的分析物进行捕集以重新聚焦分析物用于色谱分析。

要获得成功的 SPME 方法，需要进行细致的优化步骤并保持一致的操作条件，但其他相关技术也是如此。任何未经仔细表征的采样技术都无法在实验室中有效应用，而且开发 SPME 方法所要付出的精力并不比开发其他技术更多。SPME 在分析人员的样品前处理技术储备库中占有重要的地位。

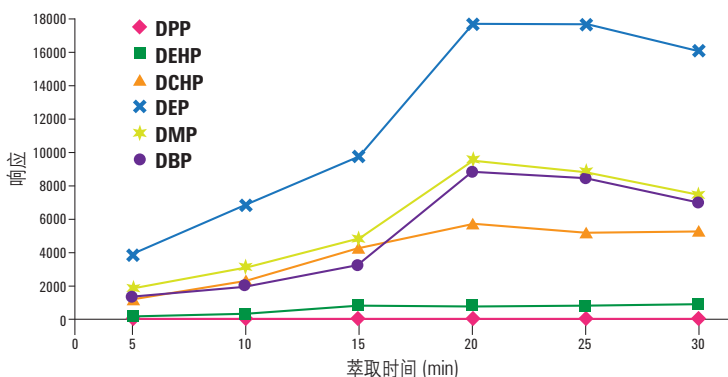
SPME 样品前处理实例

为了说明 SPME 的应用，我们开发了一种使用自动-SPE 和 GC/MS 测定水中亚 ppb 级邻苯二甲酸酯的方法²³。邻苯二甲酸酯是许多塑料中的关键添加剂，用于在室温下使塑料保持柔软。由于使用广泛，这类化合物在环境中的释放量也相对较大。近年来，人类与邻苯二甲酸酯的接触受到了极大关注，因为这类物质疑似具有致癌性和雌激素活性。液-液萃取已经广泛用于从水样中分离邻苯二甲酸酯。SPME 是分析水溶液中邻苯二甲酸酯的一种替代的方法。水样中分析物的萃取可通过直接在液相样品中浸入纤维头或使用顶空采样技术实现。这里展示的是使用 CombiPAL (安捷伦科技公司) 进行的完全自动化的 SPME 样品前处理过程。有关 SPME 纤维的所有操作都由软件控制，以达到最佳精度并减少人工操作。由于邻苯二甲酸酯是半挥发性化合物，因此需要选择适当的进入萃取模式。首先，我们研究了 40 °C 下萃取时间对最终萃取物量的影响。图 10.4 所示的信息展示了不同的萃取时间对应的六种邻苯二甲酸酯的萃取物量 (信号响应)。如图所示，萃取时间超过 20 min 时，响应值仅发生轻微变化，这意味着大多数化合物的萃取都在该时间点达到了平衡。因此，该实验选择了 20 min 作为萃取时间。

我们都知道，在水溶液中加入盐可提高 SPME 的萃取效率。因此，我们研究了在含邻苯二甲酸酯类物质的水溶液中加入 NaCl 之后的盐析效应。虽然结果未示出，但实验结果证实了盐析过程的确可提高萃取效率。在最终实验中，我们选用了 20% (W/V) 的盐浓度。图 10.5 展示了采用最佳条件得到的邻苯二甲酸酯类物质的 LC/MS SIM 色谱图。采用 SPME 方法进行样品前处理，并采用 GC/MS 进行分析，结果表明，该方法在 1-1000 ng/mL 范围内具有良好的线性和较高的相关系数。分析物在 1 ppb 浓度水平的 RSD 小于 10%，除了 DPP 之外。我们分析了自来水、饮用水、及饮水机中的纯净水等实际样品中邻苯二甲酸酯类物质的含量。结果表明，全部三个样品中均检出了邻苯二甲酸酯类物质，浓度范围为 24-79 ng/mL²³。

图 10.4

SPME 萃取时间 vs. 质谱响应



化合物名称	缩写	保留时间 (min)
邻苯二甲酸二戊酯	DPP	10.179
邻苯二甲酸二异壬酯	DEHP	11.862
邻苯二甲酸二环己酯	DCHP	16.749
邻苯二甲酸二乙酯	DEP	17.517
邻苯二甲酸二甲酯	DMP	20.666
邻苯二甲酸二丁酯	DBP	20.836

CombiPAL

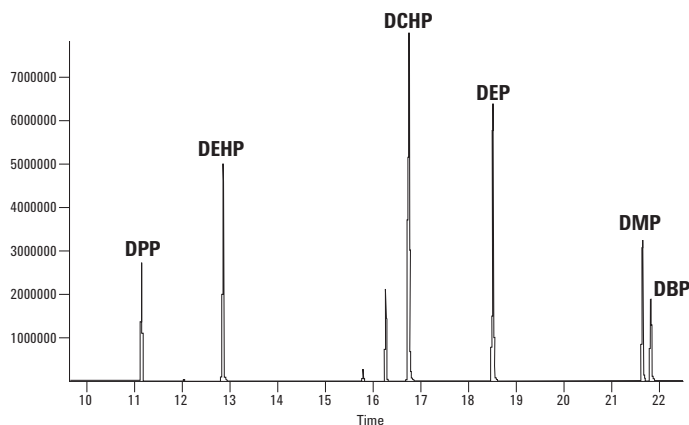
预孵育时间: 60 s
 孵育温度: 40 °C
 预孵育时的振荡速度: 500 rpm
 振荡运行时间: 5 s
 振荡停止时间: 2 s
 样品瓶穿刺深度: 25 mm
 萃取时间: 1200 s
 脱附到: 气相色谱进样口 1
 进样穿刺深度: 54 mm
 脱附时间: 120 s
 纤维头后处理时间: 300 s

SPME

纤维头类型: PDMS/DVB
 涂层: 65 μm

图 10.5

在优化萃取条件下得到的邻苯二甲酸酯的 SIM 色谱图



6890 GC

进样口温度: 270 °C
 载气类型: 氦气
 柱温箱条件: 50 °C, 以 10.00 °C/min 速度升温至 260 °C (3.00 min)
 色谱柱: DB-5ms 30 m × 250 μm, 0.25 μm
 模式: 恒流
 流速: 1.3 mL/min

5975 MS

采集模式: 同步 SIM/scan
 质量范围: 40-300
 样品: 3
 驻留时间: 30 ms
 质谱离子源: 230 °C
 质谱四极杆: 150 °C

基质固相分散 (MSPD)

基质固相分散 (MSPD) 是一种用于固体 (例如动物或植物组织、牛奶、蔬菜)、半固体和粘稠样品的样品前处理技术²⁴。它采用键合相固体载体 (通常是硅胶基键合相) 作为破坏样品结构的磨料, 在混合过程中, 这种固定相也能作为结合“溶剂”, 有助于样品的彻底分解。**图 10.6** 简要描述了整个萃取过程。在上述混合过程中, 样品会自动分散到键合相/载体材料的表面, 这样就形成了新的混合固定相, 能够从多种样品基质中分离分析物。混合过程不需要使用研钵和研杵进行仔细研磨, 大多数基质只需温和的搅拌就足够了。分散的样品能够更充分地接触分离分析物所用的溶剂和试剂。完成破坏样品的步骤之后, 将混合的样品基质及其分配到键合相/载体上的部分转移到装有滤芯的注射器筒中。在填充柱床顶部放置第二个滤芯。依次使相对于待洗脱分析物极性逐渐增强的各种溶剂通过填充柱床。通常都需要进行第二个纯化步骤。在某些情况下, MSPD 柱的洗脱液可直接导入常规 SPE 小柱以进行进一步纯化。

图 10.6

基质固相分散过程

步骤 1



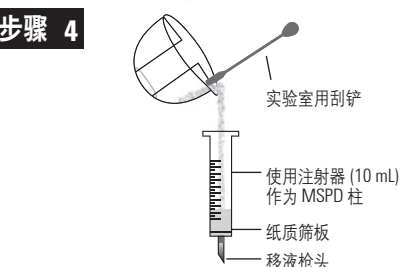
步骤 2



步骤 3

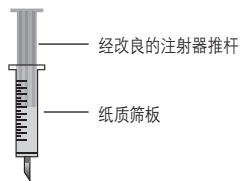


步骤 4

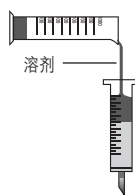


步骤 5

压实样品

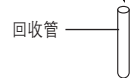


加入溶剂



步骤 6

洗脱样品；
重力或真空



步骤 7

收集样品组分



步骤 8

- 浓缩体积或完全蒸发
- 选择溶剂复溶残留物
- 过滤或离心 (可选)
- 共用色谱柱或使用额外的 SPE 纯化柱
- 上机分析

MSPD 技术应用十分广泛，特别是在食品工业中，它被应用于多种分析的样品前处理，例如水果²⁵、婴儿食品²⁶、果汁²⁷中农药的分析，组织中兽药的分析²⁸，食品中抗菌药物残留的分析²⁹，苜蓿叶中异黄酮的分析³⁰，双壳贝类中多环芳烃的分析³¹，以及牛奶中抗生素的分析³²。该方法的优点是操作简单，萃取效率高，回收率高，相比传统萃取方法更节省溶剂，应用范围广；但是，该技术的自动化较为繁琐。

SPE 专用固定相

SPE 专用固定相是专门针对标准 SPE 装置难以执行的特殊应用而开发的固定相。但有时制造商也会特别针对某个特定类别的化合物对标准固定相进行测试，并依此给出使用标准固定相分离此类化合物的最佳 SPE 条件。在某些情况下，专用 SPE 小柱是“整体解决方案”的一部分，与试剂、标准品和分析方法一起组成试剂盒产品。但大多数专用 SPE 固定相都合成了化学官能团，这些官能团能够特异性地与目标溶质发生相互作用。表 10.3 列出了几种目前市场上可获得的专用固定相及其适用的特殊纯化任务。更多固定相见下页。

表 10.3

SPE 的专用固定相		
Bond Elut 名称	所含官能团	主要应用
阿特拉津	C18	低负载、高流速 C18 相，为萃取阿特拉津而设计。填料粒径大，允许大体积样品通过；通过控制碳载量提高对阿特拉津的选择性；高质量柱床为阿特拉津提供更高容量
碳	石墨化碳	非多孔吸附剂在反相条件下使用时，对非极性和极性基质中的极性有机物和非极性化合物具有高度亲和性；推荐用于去除叶绿素及其他色素（特别是在 QuEChERS 应用中，请参考
碳/PSA	石墨化碳以及乙二胺-N-丙基硅烷分层	Bond Elut PSA 是一款烷基化胺类吸附剂，含有两种不同的氨基官能团：伯胺和仲胺。与 Bond Elut NH2 相比，它的 pKa 值更高，离子交换能力更强。PSA 吸附剂的碳载量比其他大部分氨基吸附剂的碳载量更高，因此更适用于会在 Bond Elut NH2 上强保留的极性化合物。Bond Elut PSA 是进行食品中农残分析时，去除脂肪酸和有机酸，以及色素和糖类的理想吸附剂
碳/NH ₂	石墨化碳和氨基（分层）	专为纯化日本肯定列表中农残样品而设计；Bond Elut NH2，一种伯胺类化合物，是比 SAX 类（始终带电荷的季胺类吸附剂）吸附剂更弱的阴离子交换剂。因此，它更适合用于保留非常强的阴离子，例如碘酸（不可逆地保留于 SAX 吸附剂上）。Bond Elut NH2 是进行食品中农残分析，去除脂肪酸和有机酸，以及色素和糖类的理想吸附剂

(续)

SPE 的专用固定相

Bond Elut 名称	所含官能团	主要应用
纤维素	纤维素粉末	纤维素相在很宽的 pH 范围内很稳定, 金属吸附量极低 (Fe 和 Cu 吸附量低于 5 ppm)。该吸附剂的大比表面积和独特聚合物结构使其具有很高的样品容量。纤维素介质中包含大量的羟基; 由于其极性大, 所以可以从水相和有机相中吸附很多的极性物质
EnvirElut	聚合物	EnvirElut 吸附剂专为萃取水相基质中的各种化合物而设计, 尤其是除草剂、多环芳烃 (PAH) 和农药
毒枝菌素	硅胶基离子交换	新型吸附剂, 能够纯化食品萃取物, 改善单端孢和玉米赤霉烯酮的分析。与免疫亲合柱 (IAC) 和活性炭/氧化铝柱等方法相比, 分析结果一致或更优; 具有选择性非保留机理 — 毒素分析物能从小柱中通过, 而食品基质成分得到保留 (将在本章后面部分的“特定类或离子特异性 SPE 小柱, 毒枝菌素 SPE 吸附剂”中进行详细说明)
PBA	苯硼酸	通过可逆共价键实现对分析物的强保留功能; 硼酸盐基团对含有顺式二醇基团的化合物 (如儿茶酚类、核酸类、一些蛋白质、碳水化合物和 PEG 化合物) 有很强的亲合作用。氨基醇、 α -羟基酰胺类、酮类化合物以及其他化合物也能得到保留; 极强的共价保留机理实现了高特异性和高纯化效率 (在“固定化苯硼酸 (PBA) 相”下将进行详细说明)
PCB	专利化的双相	一种专门设计的吸附剂, 柱床质量经过优化, 能够从各种基质中方便地提取多氯联苯 (PCB) 化合物; 可以使用简单的单溶剂方法对目标分析物上样和洗脱, 然后进行 GC/ECD

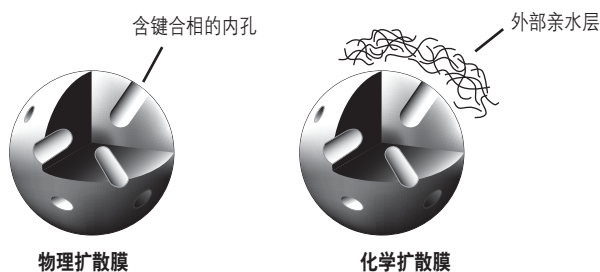
限进介质 (RAM)

RAM 是一种特殊类型的 SPE 吸附剂，可直接进样血浆、血清或全血等生物体液样品。这种吸附剂常用于分析小分子药物、它们的杂质以及代谢物。近几年来，出现了该吸附剂的多重变化形式，包括内表面反相固定相，隔离疏水固定相，半渗透固定相，双区固定相，以及混合官能团固定相。有关各种类 RAM 的更多信息，请查阅参考文献^{33,34}。

最常用的 RAM 固定相为双模式多孔填料，其特征为外层是亲水层，内层表面则是由疏水键合相构成的多孔内表面（图 10.7）。外层亲水层与蛋白质的相互作用极小，当蛋白质与可阻挡它们的填料小孔结合时，蛋白质将无保留地被洗脱，而小分子药物及药物代谢物则会进入填料孔隙，通过与烷基键合相的疏水相互作用被保留下来。尽管 RAM 以“不受污染”的固定相著称，但也有研究表明，如果重复地直接进样生物体液样品，RAM 色谱柱最终也会受到污染。如果流动相的 pH 和有机溶剂组成未经优化，RAM 中可能会发生蛋白沉淀，进而导致污染，所以在使用时必须十分小心。

图 10.7

限进介质 (RAM) 图示



RAM 固定相既可用于单色谱柱模式，也可用于多维 LC-LC。在单色谱柱模式下，所选的条件将首先去除血浆蛋白质，然后通过梯度洗脱对药物化合物进行洗脱和分离。虽然该方法的效果令人满意，但由于梯度洗脱后缺少重新平衡的步骤，或者由于孔隙中的疏水性固定相的选择性不足，RAM 受到污染的可能性较大，因此相比之下多维 LC-LC 是比它更好的方法。在多维 LC-LC 方法中，在 RAM 色谱柱之后通过一个 6 通或者 10 通切换阀将另一根色谱柱（通常是反相色谱柱）接入系统（请参阅第 13 章获取更多有关色谱柱配置的信息）。采用等度条件将血浆进样至 RAM 中，然后使用另一个梯度泵系统进行反相色谱分析。在该方法中，RAM 色谱柱捕获的药物及其代谢物可被冲至（或反冲至）反相柱中，然后进行梯度洗脱以分离杂质和/或代谢物。采用多维方法时，通常需在每次分析后对 RAM 柱进行反冲和再生。已有报道指出，重复使用 RAM 色谱柱进行的大鼠血清中大豆异黄酮的分析具有长期稳定性³⁶。此外，由于血浆蛋白质不会进入第二维的反相色谱柱，而是直接排入废液，延长了第二维色谱柱的使用寿命。

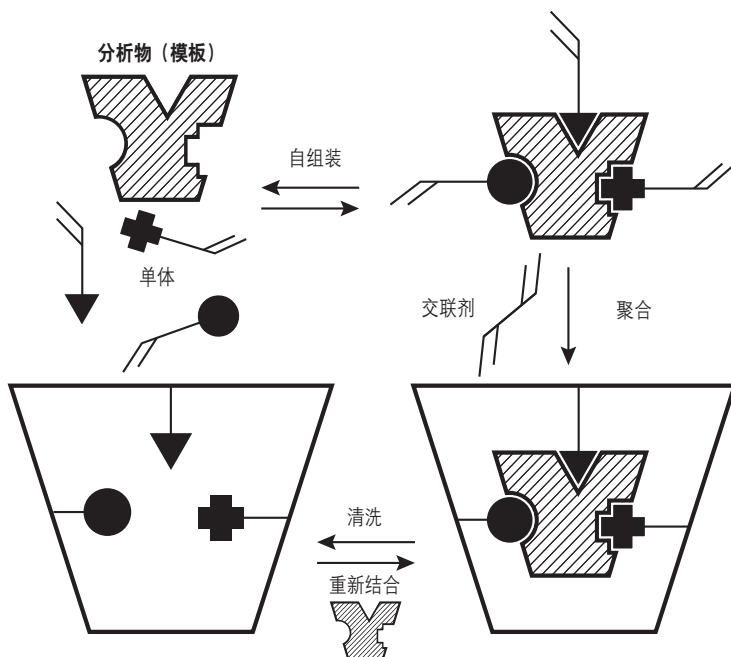
分子印迹聚合物 (MIP)

MIP 是选择性最高的 SPE 固定相之一。该技术有时也称为分子印迹固相萃取 (MIP-SPE)。分子印迹技术已被用于需要选择性识别以进行复杂分离或样品纯化的领域。一篇介绍性的文章³⁷概述了 MIP 技术的基本原理, 文献综述³⁸⁻⁴¹以及一本相关书籍⁴²详细介绍了 MIP 在 SPE 中的使用和发展前景。

MIP 是一种高度稳定的聚合物, 具有与目标分析物的三维结构和官能团相匹配的识别位点。非共价印记最常用的方法是使用可与聚合物的一个组成单元化学结合的印记分子 (模板)。聚合之后形成的键必须能够断裂, 以产生游离的选择性结合位点 (受体)。合成示意图如图 10.8。

模板和单体间的选择性相互作用基于氢键, 离子和/或疏水相互作用。最常用的单体基于甲基丙烯酸和/或甲基丙烯酸酯。MIP 的基本构想是“锁钥”概念, 即聚合物表面的选择性受体或腔体可与用于制备 MIP 的模板分析物完美匹配。受体位点与模板在大小、形状和官能团方面均可互补。这一概念与免疫亲和 (IA) SPE 固定相 (请参阅下一节, 小分子的免疫亲和萃取) 类似, 但是获取适合的抗体并将其连接到 IA 吸附剂上非常费时。

图 10.8



从聚合物 MIP 中去除模板非常重要，该步骤不仅能空出相互作用位点以增加样品容量，而且可确保待分离的分析物能够进行定量分析。模板分子去除不完全（即使采用极限提取条件）是 MIP 尚未被广泛接受的主要原因。模板分子常常会流出，有时会导致基线漂移，而且它们会干扰目标分析物的定量，尤其是分析物浓度较低时。解决该问题的一个方法是使用与目标分析物类似的模板。其中的一个例子就是对于含氯分子的目标分析物，使用溴代类似物模板而不是氯代类似物模板。如果该类似物可与目标分析物分离，那么使用 MIP 即可获得预期结果。

使用水性流动相时，由于选择性极性相互作用受到抑制，MIP 将表现出反相和离子交换相互作用。如果所选的实验条件能使 MIP 固定相产生通常它在合成 MIP 的有机溶剂中才会产生的选择性相互作用，那么实验中 MIP 的选择性将达到最高。采用该方法可使用 MIP 捕集水性溶液中的分析物：首先使样品与 MIP 发生疏水或离子相互作用，然后使用可破坏基质组分的选择性键合的溶剂进行淋洗，最后采用可破坏分析物与 MIP 聚合物基质间的强键合的有机溶剂进行淋洗。

由于 SPE 填料是聚合物，根据交联度的不同，溶剂中的变化可能会导致其发生某种程度的膨胀或收缩。这种物理变化可能会导致受体大小改变并影响 MIP 对目标分析物的选择性。在这方面，分子印迹有机-无机杂化聚合物的合成⁴³能够生成相对比较坚固的分子结构，不会发生膨胀和收缩。

SPE MIP 方法的一个缺点是每种吸附剂都必须定制。通过选择适当的模板分子可确定 MIP 的特异性。可以根据已经发表的方法在实验室中合成 MIP，或者将模板分子交由专业实验室进行 MIP 的定制。由于制作 SPE 专用的 MIP 是一个相对较长的过程，只有在该应用使用频率很高，或者没有其他方法能够达到所需的样品纯化效果时我们才会使用该方法。

最近，成品 MIP 被引入市场。这些标准的 MIP 固定相专门为复杂基质中常见的特定分析物而设计。目前已商业化的吸附剂产品包括专门针对以下用途进行了优化的品种：

- 生物体液中的克伦特罗
- 受体激动剂，尿液和组织样品中的多残留提取
- NNAL (4-甲基亚硝胺-1-(3-吡啶基)-1-丁醇) 生物基质中的烟草特异性亚硝胺
- 水样中的核黄素 (维生素 B2)
- 三嗪类物质，水、土壤以及食品中的多残留提取
- 氯霉素，生物基质中的抗生素
- 受体阻滞剂，水以及生物样品中的多残留提取

小分子的免疫亲和萃取

与 MIP 类似, 免疫亲和固定相也基于分子识别, 但它采用的是化学连接的单克隆抗体或多克隆抗体, 而不是表面腔体。毋庸置疑, 免疫亲和固定相是选择性最高的固定相, 因为它们主要基于选择性和亲和力极高的生物抗原-抗体相互作用而设计。借助这些吸附剂, 我们通常仅通过一个步骤就能对基质中的某种化合物或某个类别的化合物进行选择性和浓缩。

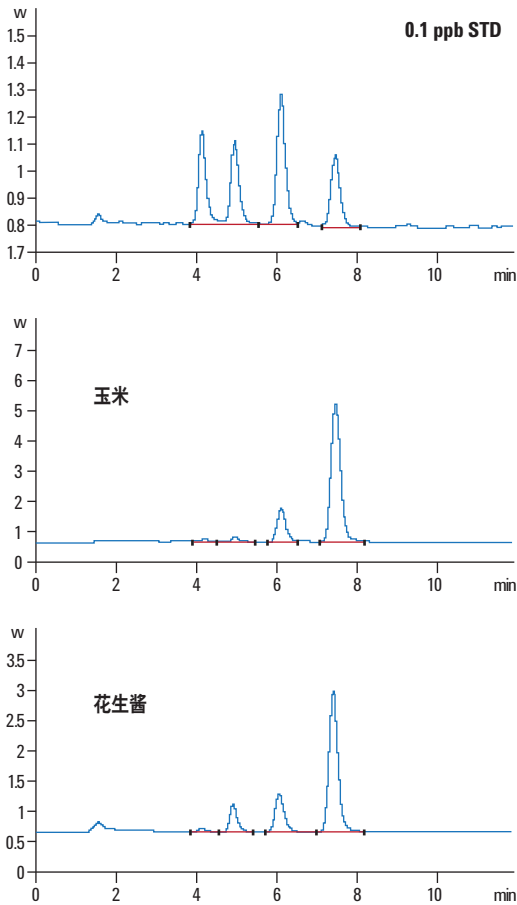
生物大分子的抗体随处可得, 且已经在免疫学和医学研究领域以及酶、激素和其他生物性物质的免疫萃取领域应用了多年 (请参阅第 15 章中蛋白质免疫萃取的实例)。但是, 获取小分子抗体比较困难, 因此小分子免疫亲和萃取技术近年来才出现且不够成熟。读者还可通过一些优秀的文献综述更详细地了解免疫亲和萃取⁴⁴⁻⁴⁸。

为展示免疫亲和样品前处理的应用, 我们采用 AflaPrep 免疫亲和 SPE 小柱 (R-Biopharm, 德国达姆斯塔特) 进行了玉米和花生酱样品的样品纯化, 用于黄曲霉毒素分析。所用的小柱含有固定在大孔径硅胶上的抗-黄曲霉毒素抗体, 具有针对该类化合物的选择性。黄曲霉毒素是一种剧毒天然物质和可疑致癌物, 可产生这种物质的霉菌存在于多种农产品上, 例如谷物、玉米、花生和种子。经常分析的荧光黄曲霉毒素有四种: B1、B2、G1 和 G2, 每种都具有不同的结构。常见的分析流程是首先进行液-液萃取、SPE 或柱色谱分离, 然后使用带荧光检测的 HPLC 进行分析。

近年来, 出现了一种选择性更高且更简单的纯化方法, 该方法采用了离线免疫亲和色谱⁵⁰。图 10.9 展示了免疫亲和纯化之后进行反相色谱分析和荧光检测的结果, 分析时采用溴作为衍生化试剂进行柱后电化学衍生化。四种黄曲霉毒素中, 每一种的线性范围都是 0.1-10 $\mu\text{g/L}$, 且 R 平方值均大于 0.99998。检出限范围为 0.004-0.007 $\mu\text{g/L}$ (相当于样品中的含量 0.008-0.014 $\mu\text{g/kg}$)。所有四种黄曲霉毒素的保留时间和峰面积的相对标准偏差均小于 0.3%。

图 10.9

测定玉米和花生酱中的黄曲霉毒素



高效液相色谱条件

色谱柱: Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm × 5 μm
柱温: 40 °C
流动相 A: 1 L 水中含有 238 mg KBr 和 700 μL 4M HNO₃
流动相 B: MeOH
等度洗脱: A:B = 50:50, 12 min
流速: 1.0 mL/min
检测: 激发波长: 362 nm, 发射波长: 455 nm, 增益 = 15
进样: 20 μL
电化学电流: 100 μA 设置
反应线圈: 内径 0.5 mm, 长 34 cm, PEEK 管 (从 KOBRA 池出口到 FLD 入口)

黄曲霉毒素测定的样品前处理过程为: 称量 25 g 样品, 放入高速混料罐中, 然后加入 2 g NaCl 和 125 ml HPLC 级的甲醇-蒸馏水 (60:40 v/v)。混合 1 min 后, 加入 125 mL 蒸馏水稀释提取物。过滤, 然后取 10 mL 滤液, 使其过免疫亲和柱, 流速为 2-3 mL/min。用 10 mL 水淋洗免疫亲和柱。最后, 用 1 mL HPLC 级的甲醇将黄曲霉毒素从柱中洗脱下来。在 HPLC 进样前, 用 1 mL 水稀释甲醇提取物。

化合物类别或离子特异性 SPE 小柱

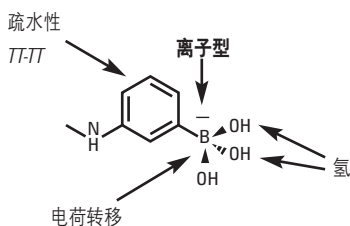
近几年来出现了多种具有化合物，化合物种类或元素特异性的专用固定相。显而易见，免疫亲和固定相及 MIP-SPE 固定相的选择性是最高的。专用固定相具有能够与特定化合物相互作用的特殊官能团，现在已被用于利基应用。

固定化苯硼酸 (PBA) 固定相

使用碱性缓冲液处理 PBA-SPE 固定相后，它们对特定官能团的特异性提高，例如糖和儿茶酚类中的邻二醇官能团。其他双官能团也具有反应活性。例如， α -羟基酸、芳香族 o -羟基酸以及酰胺、含氨基醇的化合物可被保留。它们可与这些官能团形成共价键（详细信息见图 10.10）。键合之后，可使用多种不同的溶剂淋洗吸附剂以去除干扰物。淋洗之后，使用酸性缓冲液/溶剂进行淋洗，可通过水解破坏共价键。PBA 固定相的一种常见应用是分离生物体液样品中的儿茶酚胺⁵²。

图 10.10

固定化 PBA 展现的预期次级相互作用

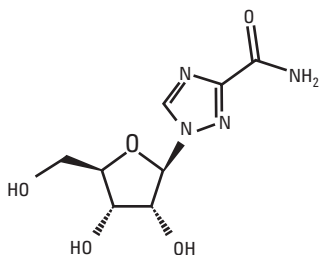


测定人类血浆中利巴韦林的应用展示了 PBA 固定相的独特选择性⁵³。利巴韦林是一种属于核苷类似物的抗病毒药物。它能阻止丙型肝炎病毒在体内的传播。其化学结构中（图 10.11）有一个独特的二醇官能，恰好能与 PBA 形成如图 10.10 所示的共价键。

样品前处理流程很简单。将加热去活的血浆与乙酸铵缓冲液 (250 mM, pH 8.5) 混合, 然后加载到先经甲醇活化, 然后使用 2 mL 乙酸铵缓冲液活化的 Bond Elut PBA 小柱 (100 mg/1 mL) 上。上样完成后, 首先使用相同的缓冲液, 接着使用甲醇淋洗小柱。最后, 采用 1 mL 2.5% 甲酸的甲醇溶液连续洗脱分析物。将洗脱液蒸发至干, 使用 200 μ L 流动相复溶蒸干的萃取物之后离心, 取一部分样品进样至配备 UV 检测的反相色谱柱中。相比不同溶剂组合的 LLE 方法, PBA 方法能够实现更好的回收率和重现性。校正曲线在 0.05-10 μ g/mL 的范围内呈线性, 且测定的定量限 (LOQ) 为 0.050 μ g/mL。该萃取方法经过改进之后还可用于萃取食品 (例如鸡肉) 中的利巴韦林⁵⁴。

图 10.11

利巴韦林的化学结构式



滥用药物分析

筛查生物体液样品中的滥用药物是 SPE 的重要应用之一。在这种特定分析中, 我们必须采用高纯度、高回收率且耐用的方法进行高效筛查以避免出现假阳性结果。Certify (安捷伦科技公司) 混合模式 SPE 吸附剂利用非极性、极性 & 离子交换特性进行纯化。由于该吸附剂可以进行多种吸附剂-分析物相互作用, 它们可用于多个药物种类的常规筛查, 或是药物及其代谢物 GC 和 GC/MS 确认分析的特异性样品提取。由于采用了含有中等长度碳链 (C8) 的键合相, 可暴露出一部分的极性硅胶表面。因此, 药物和基质干扰与吸附剂的极性和非极性相互作用得到了优化。第二种键合相, 强阳离子交换剂, 也经过了优化以提高容量。

首先使用甲醇活化 Certify 小柱, 以打开吸附剂中呈盘绕形态的疏水部分, 将其激活, 使其能够与极性基质发生相互作用。然后使用缓冲液进一步活化, 以去除多余的甲醇并使吸附剂柱床处于尽可能与基质最为相似的环境中。这样能够使吸附剂-基质相互作用最大化, 并最大限度提高回收率的重现性。萃取复杂生物基质 (例如血浆或尿液) 中的药物时需要控制 pH、离子强度和粘度。使用缓冲液稀释样品可以达到上述的控制目的。

Certify 推荐用于碱性药物的纯化，例如安非他明、苯环利定、丙氧芬、哌替啶、LSD、可待因、氧可酮、以及鸦片类药物。虽然这些药物的药理学性质和结构差异很大，但是所有的碱性药物都具有胺官能团 (NR_3 、 NR_2H 或 NRH_2)。该官能团去除 H^+ 之后呈碱性，带正电荷。但初萃取是利用药物通过非极性机制转移到吸附剂的疏水部分实现的。药物保留到吸附剂上之后，用水淋洗小柱以去除极性干扰物。然后，用酸淋洗小柱，以彻底洗脱极性干扰物，并确保碱性药物形成带正电荷的铵盐。非极性、非碱性的药物和干扰物可通过有机溶剂淋洗去除。最终，碱性药物可使用碱性有机溶剂进行洗脱（例如含 2% NH_4OH 的甲醇，乙酸乙酯 (EtOAc)，或 CH_2Cl_2 /异丙醇 (IPA)）。碱的作用是破坏药物与吸附剂之间的离子相互作用，因为药物所带的正电荷已经被中和了。有机溶剂可破坏最初用于保留样品中的药物的疏水相互作用。

与碱性药物类似，诸如巴比妥类、苯妥英、甲喹酮、苯二氮卓类和 Δ^9 -羧基 THC 等酸性和中性药物也具有差异巨大的药物性质和结构性质。把它们归为一类是因为它们都无法利用阳离子交换机制进行保留，虽然 Certify 的阳离子交换部分能改善含有这些药物的样品的纯化效果。这些药物的特点是缺少碱性的氨基官能团。（请注意，巴比妥类等药物具有一个弱酸性而非碱性的含氮亚胺官能团）。这些药物的保留机制是非极性机制。使用稀酸淋洗小柱能够去除极性杂质并确保所有碱性干扰物都带电荷。这样一来，通过破坏酸性和中性药物与吸附剂之间的非极性相互作用来洗脱这类物质时，碱性干扰物就能牢牢吸附在吸附剂的强阳离子交换部分上。为处理这些酸性和中性药物，我们开发了 Certify II。它是一种带有短链烷基 (C8) 和阴离子交换官能团的混合模式吸附剂。首先利用酸性药物与 Certify II 吸附剂疏水部分的非极性相互作用实现初步保留。接着，使用碱性缓冲液可淋洗去除极性干扰物。该淋洗步骤还能确保 COOH 官能团实现去质子化，形成能够保留在 Certify II 吸附剂阴离子交换部分上的 COO^- 同时，该步骤还可中和所有胺官能团上的电荷，为随后用于去除所有碱性药物的淋洗步骤作好准备。短暂干燥小柱之后，采用非极性溶剂可去除非极性的碱性药物和干扰物。最后，使用非极性酸性溶剂（例如含 1% 乙酸的己烷/乙酸乙酯溶液）即可洗脱和回收酸性药物（例如 Δ^9 -羧基 THC）。

为了说明 Certify 滥用药物固定相的实际应用，我们将会考察全血中 THC 及其代谢物的纯化⁵⁵。传统的滥用药物筛查方法是采用 GC 分析之后进行 GC/MS 确证。高效的萃取方法对于实现可靠的血液 THC 分析非常关键。在该例中，我们采用 Certify II，通过 SPE 方法进行样品纯化，然后进行 GC-MS/MS 分析。分析只需要 2 mL 血液样品。将四氢大麻酚 (THC) 的氘代内标及其已知的代谢物 11-羟基- Δ -四氢大麻酚 (11-OH-THC) 和四氢大麻酚酸 (THCA) 加标入血液样品中，浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。接下来，加入 4 mL 乙腈沉淀血浆蛋白质。离心后，转移上清液并将其蒸干至约 3 mL，然后加入 7 mL 0.1 M 的乙酸钠 (pH 6.0)。

向高流速 Bond Elut Certify II 小柱中加入 2 mL 甲醇，然后加入 2 mL 含有 5% 甲醇的 0.1 M 乙酸钠缓冲液 (pH 6.0) 进行活化。将样品缓慢加入小柱中。然后使用 2 mL 乙酸钠缓冲液淋洗小柱，在真空下干燥 5 分钟后使用 1 mL 己烷进行淋洗。在中性条件下使用 2 mL 95:5 己烷:乙酸乙酯洗脱 THC。然后使用 5 mL 1:1 甲醇:去离子水进行淋洗。再在真空下干燥小柱 5 分钟，并使用 1 mL 己烷进行淋洗，然后使用 2 mL 含有 1% 乙酸的 75:25 己烷:乙酸乙酯溶液洗脱代谢物。混合 THC 及代谢物馏分，蒸发至干，在衍生化之前用甲苯复溶。采用 40 μ L N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (BSTFA) 以及 1% 三甲基氯硅烷 (TMCS) 对 3 种分析物进行衍生化。

使用配备了低热容 (LTM) 色谱柱模块的安捷伦三重四极杆 GC/MS 进行气相色谱分析，该模块能够实现非常快速的升温 and 冷却。此外，利用气相色谱的反吹功能防止可能与目标分析物共萃取的杂质引起交叉污染。色谱和质谱条件的详细信息可在原始的应用简报中找到⁵⁵。使用 SPE 纯化、气相色谱柱的反吹功能以及三重四极杆质谱仪的 MRM，各种分析物的信号都非常干净，而且实现了极低水平的 THC 及其代谢物的检测。所得的 THC 和 11-OH-THC 定量线性动态范围为 0.1-50 ng/mL，THCA 的范围为 1-100 ng/mL。通过 LTM 模块和反吹功能加快了分析速度，运行时间仅为 6 min，循环时间仅为 8 min。可替代 THC 分析的另一项分析技术是使用 LC-MS/MS，它避免了进行 GC 分析所必需的衍生化步骤⁵⁶。

SPE 离子去除

在很多应用中，特别是在离子色谱中，样品基质中的高浓度离子型组分属于不良干扰物。使用具有特定功能的离子交换树脂可去除这些离子。例如，钡盐形式的强阳离子交换可选择性去除水性溶液中的高浓度硫酸盐。同样的，银离子形式的阳离子交换剂可去除氯离子。螯合型离子交换剂可去除过渡金属。

真菌毒素 SPE 吸附剂

镰刀菌可能是北部温带地区最普遍的产毒素真菌，在美洲、欧洲和亚洲温带地区种植的谷物中十分常见。多种不同的镰刀菌可产生多种单端孢霉烯类的毒素。这些毒素对人类健康危害极大。采用专为这类重要化合物设计的 SPE 专用固定相 Bond Elut Mycotoxin，可从谷物和谷物食品中分离出 12 种 A- 和 B- 单端孢霉烯以及玉米烯酮 (ZEA)⁵⁷。首先，使用乙腈/水 (80:20 v/v) 萃取磨细的谷物样品中的毒素，该方法可将基质共萃取物的含量降至最低。过滤之后，取 4 mL 滤液，使其通过 Bond Elut Mycotoxin SPE 柱，收集流出物并在温和的氮气流下吹干。使用 0.5 mL 乙腈:水 (20/80 v/v) 复溶样品，取 10 μ L 进样至 LC-MS/MS 进行分析。在多种谷物 (玉米、小麦、燕麦、面包等) 中加标 12 种单端孢霉烯族毒素和 ZEA，获得了可接受的 ppb 级回收率，回收率范围为 70% 至 95%，RSD 平均为 5% 左右。与传统的活性炭-氧化铝柱纯化法以及免疫亲和柱方法相比，该方法的回收率有明显提高，而且与需要使用多根色谱柱的免疫亲和柱纯化方法相比，它的成本更低。Bond Elut Mycotoxin SPE 小柱的优势之一是它能分离多种真菌毒素，例如黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马菌素等等⁵⁸。

多模式萃取和混合相萃取

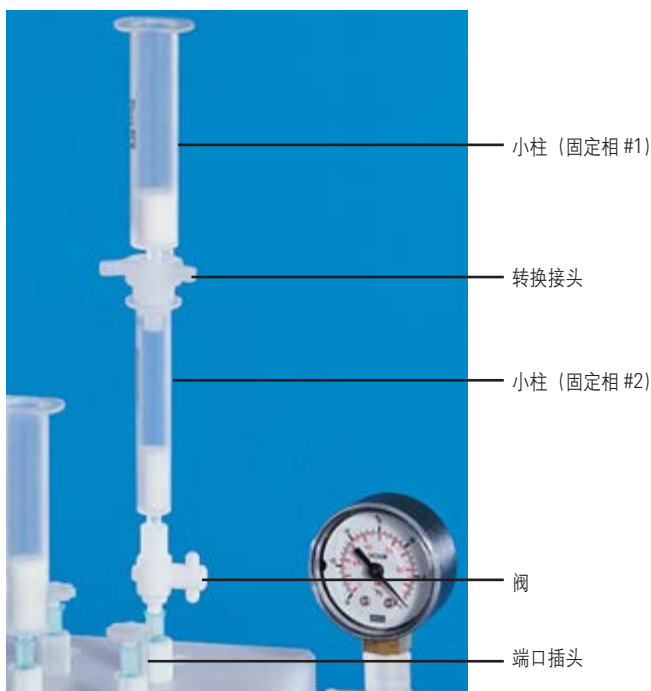
多数 SPE 过程都会采用单分离模式 (例如反相) 和单个 SPE 装置 (例如小柱)。但是，如果目标分析物的类型多于一种，或者需要额外的选择性以去除干扰物，多模式 SPE 就会非常有用。多模式 SPE 是指专门使用两种 (或更多种) 连续的分 离模式或小柱 (如反相和离子交换)。在实验操作中，有两种可实现多模式 SPE 的方法。在串联方法中，两个 (或多个) SPE 小柱以串联方式连接 (见图 10.12)。因此，分离酸、强碱和中性物质时，可以串联一根阴离子交换小柱和一根阳离子交换小柱。将样品和淋洗溶剂的 pH 调节至 7，酸和碱都将完全离子化。最终，酸将保留在阴离子交换小柱上，碱将保留在阳离子交换小柱上，而中性物质将通过两根小柱 (与酸和碱分离)。接下来就可以从两根小柱上分别收集酸和碱。

多模式 SPE 的第二种方法采用了混合固定相。在该方法中，一个小柱的固定相可能具有两种（或更多种）官能团，用以保留多个种类的化合物或提供独特的选择性。通常，单一固定相可能会发生多种相互作用。例如，聚合物离子交换固定相可能发生离子相互作用（例如阳离子或阴离子相互作用），还有可能与聚合物骨架（例如 PS-DVB）发生疏水性相互作用。多模式 SPE 的一个常见应用是从生物体液中分离滥用药物和药物（上文已提及）。

多模式 SPE 的另一个实例是分层填料的应用⁵⁹，在同一小柱中采用两种或多种填料用于分离不同种类的分子。多种分析蔬菜中农药的方法依赖分层固定相为其提供达到足够的样品纯化程度所必需的选择性。应用最为广泛的一种采用多层 SPE 固定相的方法是《日本肯定列表》中食品中的农用化学品的分析⁶⁰。许多向日本出口农产品的国家都必须依据这一包括 799 种化合物的列表进行测试。该列表不仅包括农药，还包括兽药中的饲料添加剂。这些方法中的大多数都需要通过使用反相 HPLC 色谱柱的 LC/MS（或 MS/MS）或 GC/MS 进行分析。现在已有两种详细的多残留筛查方法采用了石墨化碳/氨基多层 SPE 固定相和硅胶固定相进行样品纯化，这两种方法适用于番茄和柠檬基质中的农药分析⁶¹。

图 10.12

用于纯化复杂样品的多模式 SPE 实验设置



参考文献

1. Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1990**, *66*, 2145-2148
2. Baltrussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.A. *J. Microcol. Sep.* **11**, **1999**, 737
3. Battik, P.; Vednar, P.; Cip, L.; Ondrakova, L.; Stransky, Z. *JSS* **2003**, *26* (8), 715-721
4. Hook, G.L.; Kimm, G.; Betsinger, G.; Savage, P.B.; Swift, A.; Logan, I.; Smith, P.A. *JSS* **2003**, *26* (12-13), 1091-1096
5. Frost, R.P.; Hussain, M.S.; Raghani, A.R.; *JSS* **2003**, *26* (12-13), 1097-1103
6. Cai, L.; Xing, J.; Dong, L.; Wu, C. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1015* (1-2), 11-21
7. Araujo, W.A.; Lacerda, C.A.; Cappelaro, E.A.; Lancas, F.M. *JSS* **2003**, *26* (6/7), 624-628
8. Pinho, O.; Peres, C.; Ferreira, I.M.P.L.V.O. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1015* (1-2), 23-30
9. Castro Mejias, R.; Natera Marn, R.; de Valme Garca Moreno, M.A.; Garca Barroso, C. *J. Chromatogr. A* **2003**, 995 (1-2), 11-20
10. Bagheri, H.; Mohammadi, A. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1011* (1-2), 1-9
11. Bianchi, F.; Caren, M.; Mangia, A.; Musci, M. *JSS* **2003**, *26* (5), 369-375
12. Namiesnik, J.; Jastrzebska, A.; Zygmunt, B. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1016* (1), 1-9
13. Lin, H.-H.; Sung, Y.-H.; Huang, S.-D. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1012* (1), 57-66
14. Liu, W., 采用自动 SPME 和 GC-MS 测定水中的亚 ppb 级邻苯二甲酸盐, 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5989-7726CHCN, **2008 年 1 月**
15. Centineo, G.; Ignacio Alonso, J., 同位素稀释 GC-MS 法测定金枪鱼中的甲基汞, 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5989-9725CHCN, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市, **2008 年 9 月**
16. Zhao, S.; Zhai, A., 利用手动 SPME 和 Agilent 5975T LTM GC/MSD 测定土壤中的挥发性芳香化合物, 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5990-6398CHCN, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市, **2010 年 10 月**
17. Baumann, S., 采用三重串联四极杆 GC/MS PCI 模式高灵敏度检测葡萄酒中的 2-甲氧基-3-异丁基吡嗪 (MIBP 或 IBMP), 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5990-4935CHCN, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市, **2009 年 11 月**
18. Shutao, W.; Yan, W.; Hong, Y.; Zie, Y. *Chromatographia* **2006**, *63*, 365-371
19. You, Y.-W., 饮水中 2-甲基异茨醇 (2-MIB) 和土臭素的高灵敏度检测, 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5991-1031CHCN, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市, **2010 年 8 月**
20. Baumann, S.; Tandon, K., 使用三重串联四极杆 GC/MS 实现葡萄酒中三氯苯甲醚 TCA 的高灵敏度检测, 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5990-4968CHCN, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市, **2009 年 11 月**
21. Hinshaw, J. Solid-Phase Microextraction, *LCGC No. Amer.* **2012**, *30* (10), 904-910
22. Eisert, R.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3140-3147
23. Liu, W., 采用自动 SPME 和 GC-MS 测定水中的亚 ppb 级邻苯二甲酸盐, 安捷伦科技公司应用简报, 版本号 5989-7726CHCN, **2008 年**
24. Barker, S.A.; Long, A.R.; Short, C.R. *J. Chromatogr.* **1989**, *475*, 353-361
25. Ramos, J.J.; Gonzalez, M.J.; Ramos, L. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (43), 7307-7313
26. Georgakopoulos, P.; Mylona, A.; Athanasopoulos, P.; Drosinos, E.H.; Skandamis, P.N. *Food Chem.* **2009**, *115* (3), 1164-1169
27. Radisic, M.; Grujic, S.; Vasiljevic, T.; Lausevic, M. *Food Chem.* **2009**, *113* (5), 712-719
28. Wang, S.; Mu, H.; Bai, Y.; Zhang, Y.; Liu, H. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877* (27), 2961-2966
29. Marazuela, M.D.; Bogialli, S. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *645* (1-2), 5-17
30. Visnevschi-Necrasov, T.; Cunha, S.C.; Nunes, E.; Oliveira, M.B.P.P. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (18), 3720-3724

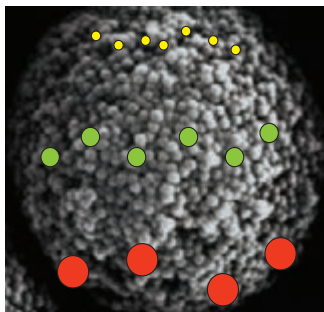
参考文献 (续)

31. Campins-Falco, P.; Verdu-Andres, J.; Sevillano-Cabeza, A.; Molins-Legua, C.; Herraiz-Hernandez, R. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1211* (1-2), 13-21
32. Mamani, M.C.V.; Reyes, F.G.R.; Rath, S. *Food Chem.* **2009**, *117* (3), 545-552
33. Boos, K.-S.; Rudolphi, A. *LCGC* **1997**, *15* (7), 602-611
34. Boos, K.-S.; Rudolphi, A. *LCGC* **1997**, *15* (9), 814-823
35. Cassiano, N.M.; Lima, V.V.; Oliveira, R.V.; de Pietra, A.C.; Cass, Q.B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384* (7-8), 1462-1469
36. Doerge, D.R.; Churchwell, M.L.; Berry Delclos, K. *Rapid Commun. in Mass Spectrometry*, **2000**, *14*, 673-678
37. Ensing, K.; Berggren, C.; Majors, R.E. *LCGC* **2001**, *19* (9), 942-954
38. Dmitrienko, S.G.; Irkha, V.V.; Kuznetsova, A. Yu.; Zolotov, Yu. A. *J. Anal. Chem.* **2005**, *59* (9), 808-817
39. Baggiani, C.; Anfossi, L.; Giovannoli, C. *Current Pharma. Anal.* **2006**, *2* (3), 219-247
40. Mahony, J.O.; Nolan, K.; Smyth, M.R.; Mizaikoff, B. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *534*, 31-39
41. Cormack, P.A.G.; Elorza, A.Z. *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 173-182
42. Piletsky, S.; Turner, A. *Molecular Imprinting of Polymers*, Landes Bioscience, Austin, TX, **2006**
43. Lin, C.I.; Joseph, A.K.; Chang, C.K.; Wang, Y.C.; Lee, Y.D. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 175-180
44. Hennion, M.-C.; Pichon, V. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 29-52
45. Pichon, V.; Delaunay-Bertoncini, N.; Hennion, M.-C. *Chapter 33 – Immunosorbents in Sample Preparation, in J. Pawliszyn, Comprehensive Analytical Chemistry* **2002**, *37*, 1081-1100
46. Delaunay, N.; Pichon, V.; Hennion, M.-C. *J. Chromatogr. B* **2000**, *745*, 15
47. Stevenson, D. *J. Chromatogr. B* **2000**, *745*, 39
48. Delaunay-Bertoncini, N.; Pichon, V.; Hennion, M.-C.; *Chromatographia* **2001**, *53*, S224
49. Majors, R.E. *LCGC No. Amer.* **2007**, *25* (1), 16-32
50. Yang, X.; Rong, A., 免疫亲和柱净化-柱后电化学衍生-HPLC 法测定谷物及花生酱中的 4 种黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-9125CHCN, 中国上海, **2011 年**
51. Li, X.; Pennington, J.; Stobaugh, J.F.; Schöneich, C. *Analytical Biochemistry* **2008**, *372* (2), 227-236
52. *Phenylboronic Acid (PBA) Solid-Phase Extraction Mechanisms and Applications (苯硼酸(PBA)固相萃取机理和应用)*, 安捷伦科技公司技术概览, 出版号 Si-02442, 2010 年
53. Loregian, A.; Scarpa, M.C.; Pagni, S.; Giuseppe-Parisi, S.; Palu, G. *J. Chromatogr. B* **2007**, *856* (1-2), 358-364
54. Berendsen, B.J.A.; Wegh, R.S.; Essers, M.L.; Stolker, A.A.M.; Weigel, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402* (4), 1611-1623
55. Baumann, S., 快速耐用的检测血中 THC 及其代谢物的方法, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-8456CHCN, **2011 年**
56. Hudson, J.; Hutchings, J.; Wagner, R.; Harper, C.; Friel, P., Cannabinoid Quantitation Using an Agilent 6430 LC/MS/MS (采用 Agilent 6430 LC/MS/MS 定量测定大麻素), 安捷伦科技公司, 出版号 5991-2521EN, **2013 年**
57. Rudrabhatla, M.; Wood, J.S. *Amer. Lab. April* **1**, **2007**, 40
58. Raisglid, M.; Burke, M.F. *Abstract #653*, 48th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Atlanta, GA, **1997**.
59. *Introduction of the Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods*, Japanese Department of Food Safety, Ministry of Health, Labour and Welfare, **June 2006**
60. Chang, E.; Yamashita, K.; Simpson, N.; Arora, R. *Multiresidue Screening of Agricultural Chemicals (I) and (II) in Food According to the Japan Positive List using Agilent Cartridge-Based SPE and LC-MS/MS (使用安捷伦 SPE 小柱和 LC-MS/MS 依据《日本肯定列表》对食品中的农用化学品 (I) 和 (II) 进行多残留筛查)*, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-9895EN, **2012 年**

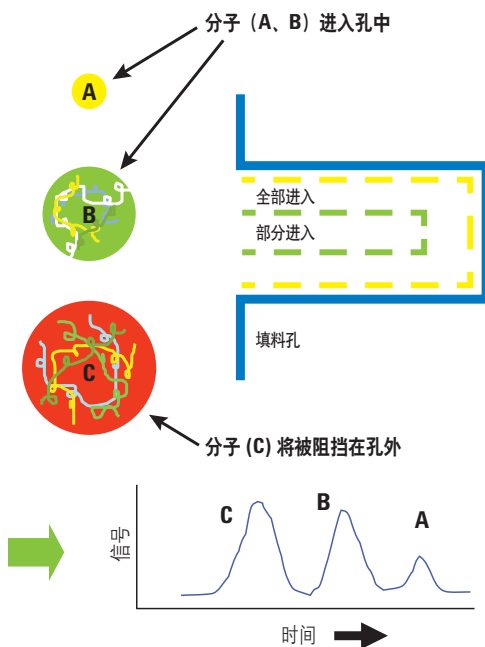
作为样品前处理技术的体积排阻色谱

体积排阻色谱 (SEC) 是 HPLC 的主要模式之一。与其他的 HPLC 模式不同, 在 SEC 中, 分析物与固定相之间不会发生相互作用。分子基于它们在溶液中的尺寸大小被 SEC 分离。使用不同孔径的填料进行分离。如图 11.1 所示, 大分子从这些充满溶剂的孔隙中排出, 而小分子则渗入孔中并较晚洗脱。因此, 如果需要将低分子量的目标分析物同高分子量的杂质物分离, SEC 是可选择的理想样品前处理技术。如果高分子量的分子不是目标分析物, 我们可以通过柱切换阀将它们导入废液 (请参阅第 13 章), 同时还能将小分子导入第二根 HPLC 色谱柱进行进一步分离和表征。该技术也可离线执行, 即收集目标馏分, 然后再将它们进样到另一根色谱柱中进行分析。非水相和水相体积排阻色谱均可采用这种分析方法。SEC 柱的校准曲线 (分子量大小相对洗脱体积) 能够为我们选择最佳的样品纯化柱提供有用指导 (请参阅后面部分的讨论)。

图 11.1
SEC 机理



分子必须自由出入孔才可得到分离。最大的分子首先被洗脱, 然后依次是中等大小的分子和最小的分子。



SEC 的优点就是它能够去除可能导致分析结果不佳的干扰物。它还能降低分析色谱柱受损的风险，因为它能去除可能会不可逆地吸附到固定相上的高分子量化合物。采用柱切换阀，整个过程都可以实现自动化。在非水相 SEC 模式（有时称为凝胶渗透色谱，GPC）下操作时，可以分离并去除高分子量化合物，例如脂质、烃类、油类以及其他干扰物。在水相 SEC 模式下，生物分子（例如蛋白质、聚合物材料以及其他更高分子量的水溶性物质）可以从水样中被去除。水相 SEC 是实现生物样品脱盐的一项有用技术，因为盐类是低分子量化合物，将在色谱图上以总渗透体积最晚洗脱（请参阅“用于生物分子样品前处理的 SEC”）。

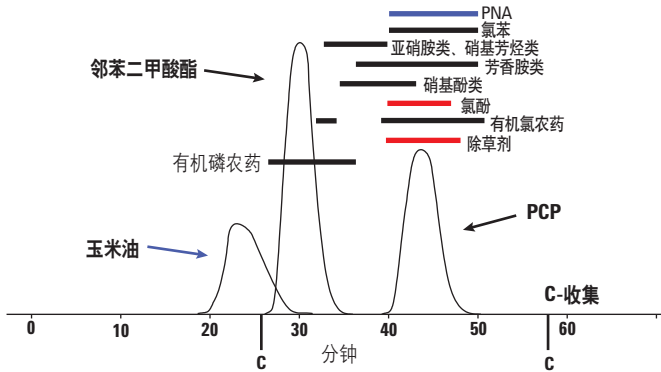
测定复杂的环境和食品样品中痕量的重点污染物是使用 SEC 进行样品纯化的一个重要应用领域。对于此类样品，在进行 GC 或 HPLC（以及与它们联用的质谱系统）分析之前，必须去除其中的高分子量干扰物，例如脂质、聚合物和色素等。事实上，美国国家环境保护局推荐了一个官方的 SEC 纯化方法——EPA 3640A。该方法允许在非水相 SEC 模式中采用自装填或预装填的体积排阻色谱柱。通常采用该方法分析的重点有毒化合物包括 PCB、PAH 和农药。图 11.2 为经典的 EPA 方法与典型污染物的洗脱曲线。该分析过程采用了人们不喜使用的氯代溶剂二氯甲烷作为流动相。EPA GPC 校准混标中含有玉米油 (25000 mg/L)、双(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯 (1000 mg/L)、甲氧氯 (200 mg/L)、二萘嵌苯 (20 mg/L) 以及硫 (80 mg/L)。EPA 推荐用于表征 SEC 柱的分离测试校准混标的色谱图见图 11.3。色谱分析采用了一根经典 SEC (GPC) 色谱柱进行分离，耗时 1 小时。

加速 EPA 方法的途径之一是在小内径玻璃柱装填更小粒径 SEC 填料。安捷伦的 EcoSpheres 是一种低交联度的球形微孔树脂。这些颗粒以干燥粉末的形式提供，是松散的多微孔介质，溶胀后可直接重力装填到玻璃柱中。这些微孔材料并没有固定的孔隙结构。孔隙是材料在溶剂中溶胀时形成的。如果不需要高分辨率，使用微孔填料可以实现更高的上样量。它们可以自装填到柱床长度可调的玻璃柱中。使用 EPA 测试方法获得了如图 11.4 所示的结果，该图说明 EPA 测试方法仅使用经典 EPA 流程三分之一的时间即可完成 EPA 测试混合物的分离¹。

图 11.2

样品纯化的典型凝胶渗透色谱洗脱曲线

EPA 3640 方法

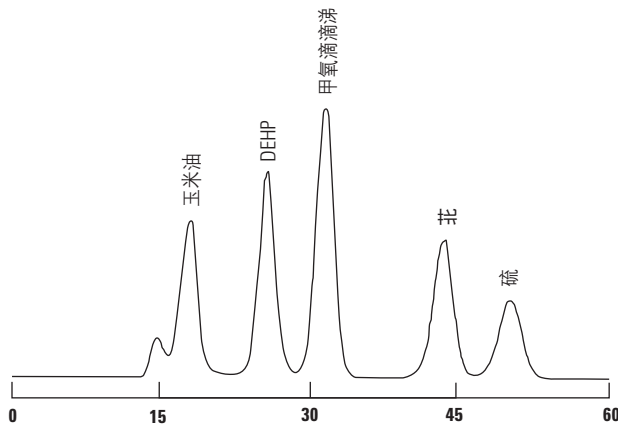


流动相: CH_2Cl_2 - 固定相: BioBeads SX-3 (700 mm × 25 mm)

总溶剂消耗量: 300 mL

图 11.3

按 EPA 3640A 方法分析 EPA 校准混合物所得的 SEC 色谱图



色谱条件:

色谱柱:

BioBeads SX-3 柱.

规格:

内径 25 mm, 长度 700 mm;

珠长:

490 mm

流动相:

二氯甲烷

流速:

5 mL/min (总溶剂消耗量: 300 mL)

图 11.4

EPA 分离混合物，用于 3640A 方法中使用 EcoSphere 色谱柱分离

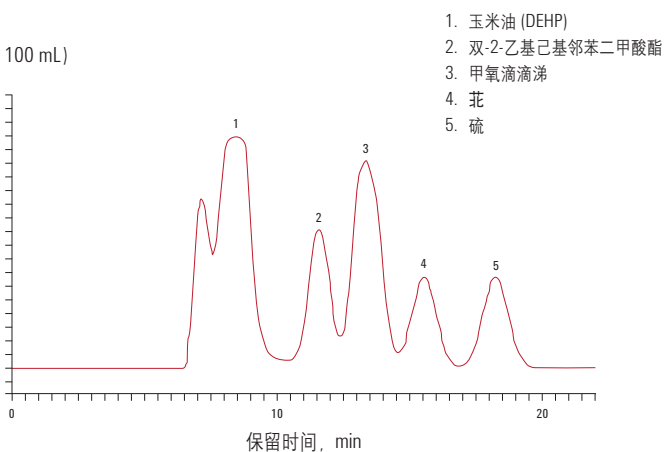
色谱柱: 填充了 Swollen EcoSpheres (100 g) 的玻璃柱
EPA 分离混合物，用于 3640A 方法中使用 EcoSphere 色谱柱分离
内径 25 mm，长 45 mm

流动相: THF

流速: 5 mL/min (总溶剂消耗量: 约 100 mL)

进样: 5 mL

检测器: UV, 254 nm



另一种方法采用粒径更小的 Agilent PLgel 聚合物填料 (5-7 μm)，其孔径为 100 \AA 。虽然更小的粒径可以提高分辨率，但会造成柱压上升，上样容量下降。但是，颗粒自身更坚硬，可以耐受更高的压力 (高达 150 bar)。将 EPA 分离混合物进样到这种小粒径色谱柱中，可获得更尖锐的峰形，并且分离速度更快，如图 11.5 所示。这里采用了 THF 作为流动相，它是一种比氯代溶剂二氯甲烷更安全的溶剂。

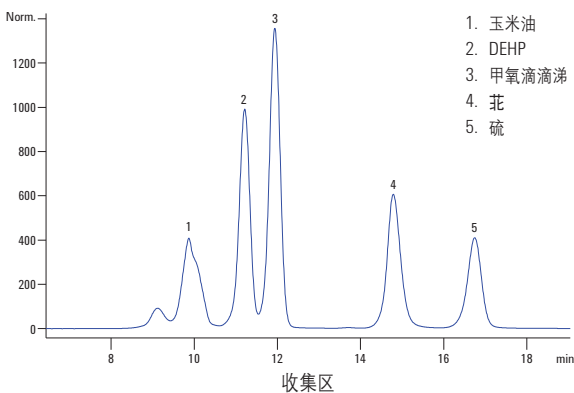
图 11.5

EPA 分离混合物，使用 5 μm SEC 柱分离

色谱柱: PLgel, 5 μm
7.5 \times 300 mm

流动相: THF

流速: 0.67 mL/min (总溶剂消耗量: 12 mL)



为了阐述离线 SEC 如何作为样品前处理方法使用，我们在土壤样品中添加了重点污染物多环芳烃 (PAH) 标准品，通过该法进行了分析。首先使用 THF 对该土壤样品进行萃取。采用两根 PLgel 色谱柱（硅胶孔径 100 埃，色谱柱规格为 7.5 x 300 mm）对萃取液进行纯化。如图 11.6A 所示，通过该法处理，PAH 可以从土壤萃取物中分离出来。两个红色星号所指之处为采集点。图中明显向上漂移的蓝色基线实际上是土壤萃取物的紫外曲线。红色部分代表色谱图中 PAH 洗脱的部分。将该馏分浓缩后，用 HPLC 兼容的溶剂复溶，然后重新进样到反相 HPLC 色谱柱上。使用水-乙腈进行梯度洗脱，结果表明该样品中存在大量的重点污染物（图 11.6B）。采用二极管阵列检测可以测定 ppm 浓度水平的此类污染物。如果需维持稍较低的压力，可以使用安捷伦的 EnviroPrep 色谱柱，它采用 10 μm 大孔树脂，是一款具有更高容量的制备型色谱柱 (25 x 300 mm)。

图 11.6A

土壤萃取物与 EPA 分离混合物 (A) 的 SEC 色谱图

色谱柱: 2× PLgel (7.5 × 300 mm)
 流动相: THF
 检测器: DAD

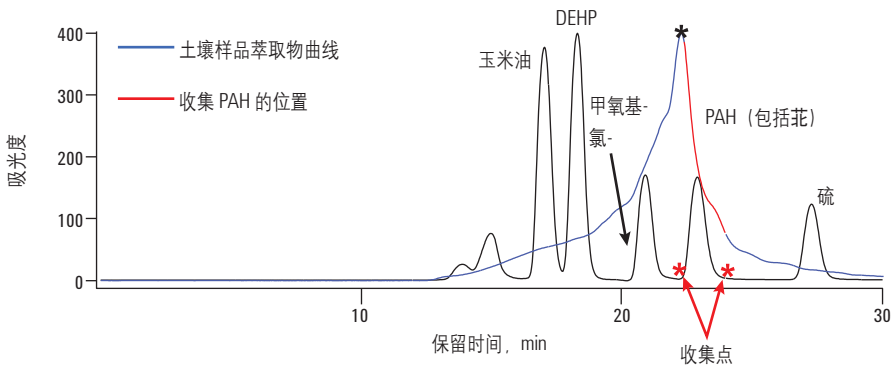
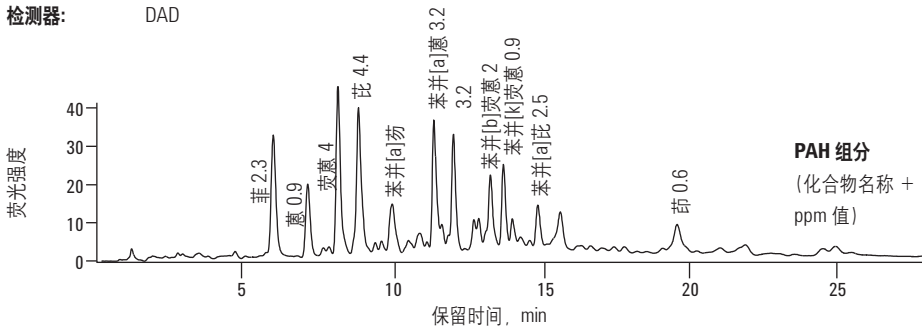


图 11.6B

土壤萃取物与 EPA 分离混合物 (B) 的 SEC 色谱图

色谱柱: 反相
 流动相: 水-ACN 梯度
 检测器: DAD



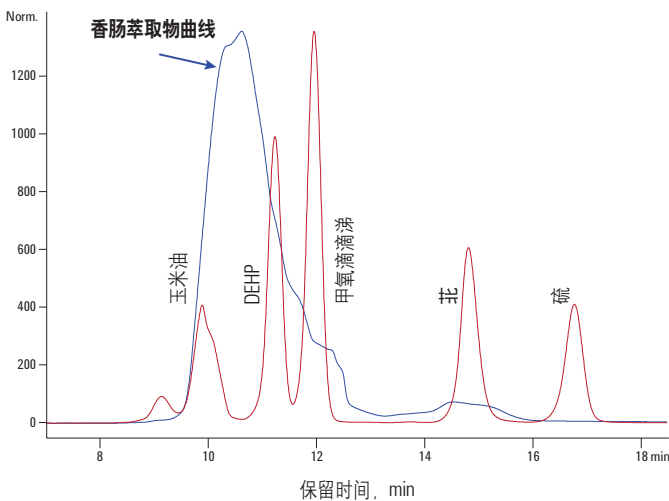
肉类样品通常含有大量脂质，如果不采用某种方法纯化样品，可能很难对它进行分析。SEC 是进行此类样品萃取的理想技术，因为与小分子（如农药或者人们可能感兴趣的某些毒素）相比，脂类物质具有更高的分子量。为了测试使用 SEC 纯化新鲜猪肉香肠样品的可行性，我们在肉类样品中添加 EPA 分离测试混合物，然后对其进行了萃取。肉类样品萃取物的质量与所估计的 25-30% 的脂质固体含量一致。

在处理高脂萃取物样品时，SEC 的柱容量将发挥作用，此时必须确保色谱柱规格能满足上样量的需求。例如，本例中使用的色谱柱 (PLgel 100Å, 7.5 x 300 mm) 在分辨率可接受的前提下的质量容量大约是 40 mg。因此，该质量就是整个样品（包括其中的脂质可萃取物）的进样质量上限。如果需要采用更大的进样量以提高分析物的检测灵敏度，就需要使用更大口径或更长的色谱柱。

在图 11.7 中，我们可以看到 SEC 色谱图中脂质背景的紫外吸收曲线（蓝色曲线）²。大量脂质通过 SEC 途径得以去除，证明了该技术的纯化能力。但是，根据收集体积和保留时间窗口，我们可能需要先对少量的脂质萃取物进行收集，然后将其进样到另一根色谱柱中，或对其进行进一步的纯化。

图 11.7

使用 PLgel 5 μm 100Å 柱对 EPA 分离混合物加标的猪肉香肠萃取物进行纯化



净化复杂混合物时，为了选择最佳的有机 SEC 柱，通常使用校准曲线来评价其分子量的分辨能力。在这里，我们使用一系列已知分子量的标准品绘制了分子量（分子大小）对应其洗脱体积（或保留时间）的关系曲线（有关水相 SEC 色谱柱的详细信息请参阅下一部分）。该校准曲线有助于用户选择最佳孔径的 SEC 进行样品纯化。因为由流体动力学半径定义的不同分子的大小各不相同，所以在处理复杂混合物时，校准曲线只能作为近似的参考。

用于生物分子样品前处理的体积排阻色谱

体积排阻色谱 (SEC) 还可用于从污染物等低分子量物质中分离生物分子 (例如蛋白质), 这些污染物中可包括聚集体 (单体、二聚体、三聚体、四聚体等)、赋形剂、细胞碎片及其他降解产生的杂质。SEC 还常被用于去除盐类, 即被称为脱盐的过程。水溶液中生物分子的尺寸分离 (有时称为凝胶过滤色谱, GFC) 的机制与使用 SEC 填料和有机流动相进行分离时完全相同, 如前文所述。较大的生物分子在孔隙中停留的时间更短, 较早洗脱。较小的生物分子在孔隙中停留的时间更长, 较迟洗脱。

为了实现生物样品兼容性, 水相 SEC 中使用的填料通常都含有水可润湿性官能团 (例如二醇或乙二醇官能团), 以减少与蛋白质上的各种官能团的特殊相互作用。聚合物和硅胶基填料均可用于 SEC 纯化。对于分子量分布范围较宽的聚合物分子, 如肝素、淀粉或纤维素, 常使用装填聚合物吸附剂的色谱柱。硅胶基固定相则最适于分析蛋白质和分子量不均一的分子。需要牢记的是, 蛋白质所含的众多氨基酸带有各不相同的侧链基团, 如酸性、碱性、疏水性、中性/亲水性基团。为了防止它们与硅胶色谱柱的固定相发生相互作用, 有时我们需要在流动相中加入缓冲液。如果下游检测涉及质谱分析, 我们推荐使用挥发性缓冲液。

分子量 (或者更确切地讲, 分子大小) 相对于洗脱体积的校准曲线, 对于我们确定适合蛋白质混合物纯化的 SEC 柱非常有用。**图 11.8** 为一条假定的校准曲线。将已知分子量 (大小) 的标准品进样到 SEC 色谱柱上, 并测定其洗脱体积。接下来, 当我们在相同的色谱条件下使用 SEC 分离未知样品时, 就能够很好地估计样品中分子的大小, 并且可根据这些信息来选择最合适的孔径, 以实现当前样品的最佳纯化效果。**图 11.8** 中校准曲线最为平坦的绿色区域可提供最佳的整体色谱分辨率。**图 11.9** 展示了一些不同孔径 SEC 填料的实际校准曲线。

图 11.8

水相 SEC 色谱柱的假定校准曲线

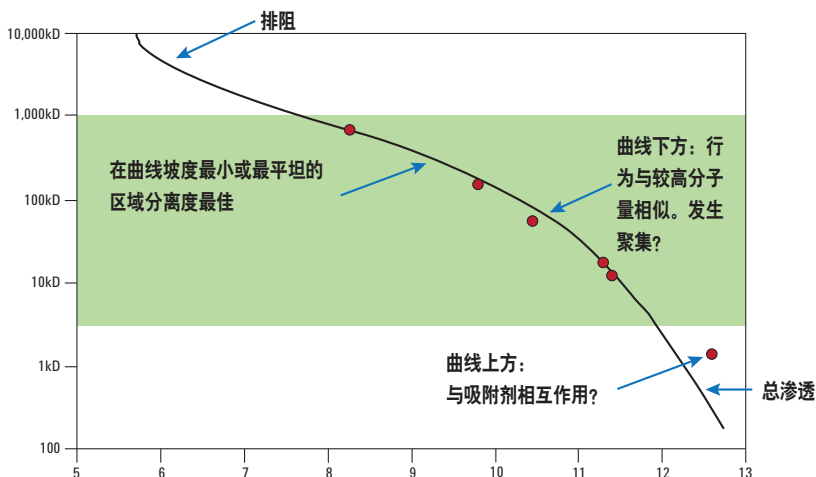
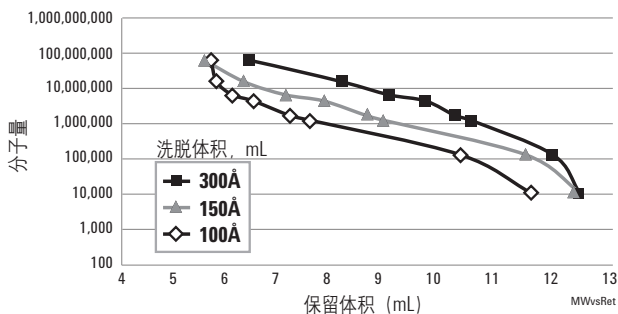


图 11.9

三种不同孔径 SEC 色谱柱的校准曲线

色谱柱: Bio SEC-3
7.8 x 300 mm, 3 μ m
流动相: 磷酸钠 150 mM, pH 7.0
流速: 1.0 mL/min
检测器: UV



蛋白质	分子量	孔径*		
		300Å	150Å	100Å
甲状腺球蛋白	670000	6.34	5.50	5.63
γ 球蛋白	150000	8.03	6.24	5.74
BSA	67000	8.90	7.00	6.03
卵清蛋白	45000	9.57	7.70	6.41
肌红蛋白	17000	10.12	8.50	7.10
核糖核酸酶 A	12700	10.40	8.80	7.46
维生素 B12	1350	11.90	11.40	10.20

*数值代表校准曲线上的“保留体积”

蛋白质聚集体的测定以及潜在蛋白质聚集体的去除是一项重要的样品纯化操作。蛋白质类生物药物中聚集体的尺寸、类型和含量会对药效和配方产生影响，有时甚至会引起免疫反应等严重后果。聚集体的形成有多种机制，包括形成二硫键和发生非共价相互作用。由于蛋白质聚集体（包括二聚体）的尺寸与蛋白质单体有很大区别，因此可以使用 SEC 分离这些不同形式的蛋白质。事实上，SEC 结合 UV 或光散射检测是定量检测蛋白质聚集体和测定分子量的标准技术。**图 11.10** 为 CHO-人源化单克隆抗体的色谱图，其中二聚体与单体实现了良好分离。请注意，使用 300 埃孔径的填料，通过 SEC 可对 MAb 单体与其二聚体，以及一些未知的低分子量杂质进行有效的分离。

进行生物样品的脱盐时，SEC 是一种被广泛使用的方法。在分析中，水相 SEC 可分离分子量差异小于两倍的分子（例如蛋白质）。在脱盐操作中，目标分离物质的体积差异非常大（即，蛋白质与盐相比）。选择适当孔径的凝胶作为过滤介质，该介质能够将较大的蛋白质完全排除在外，但能允许较小分子（例如盐和其他杂质）自由扩散进入其孔隙中。

色谱柱使用缓冲液进行平衡，它与样品的缓冲液可能相同，也可能不同。较大的蛋白质分子不能进入介质的孔隙中，最先从色谱柱中洗脱出来，随后是较小的分子（包括扩散进入孔隙中的盐类）。如果较小的分子和盐类不是分析目标，我们可以将它们导入废液，或者，如果需要分析这些物质，可以将它们导入馏分收集器以待进一步处理。

有时，我们需要使用与原始样品缓冲液不同的其他缓冲液来收集纯化的样品。如果流动相缓冲液与原始样品缓冲液不同，较大的分子将被新的缓冲液洗脱，这样就发生了缓冲液更换。当需要将挥发性缓冲液替换为非挥发性缓冲液以实现质谱兼容性时，该方法尤其有用。

图 11.10

完整 MAb 抗体和二聚体的 SEC 分离

色谱柱: Bio SEC-3, 300Å
5190-2511
7.8 x 300 mm, 3 μm

缓冲液: 磷酸钠 150 mM, pH 7.0

等度: 0-100% 缓冲液, 从 0-30 min

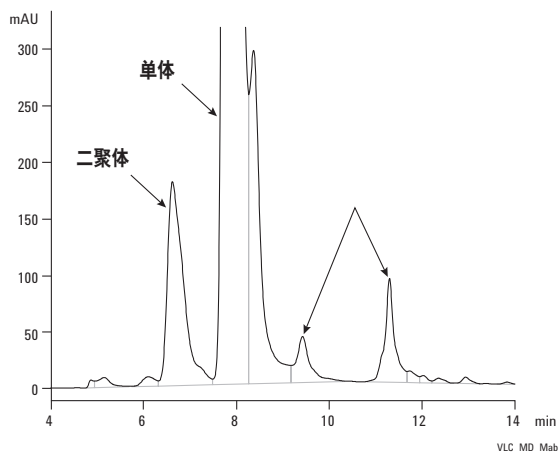
流速: 1.0 mL/min

样品: CHO-人源化 mAb, 5 mg/mL — 完整

进样: 5 μL

检测器: UV, 220 nm

柱温: 室温



参考文献

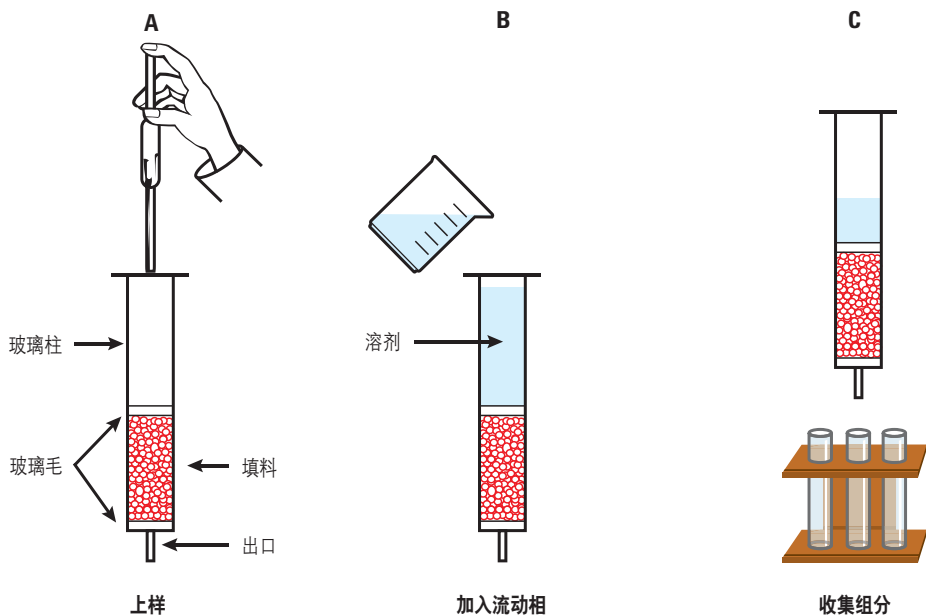
1. Saunders, G.; MacCreath, B., *基于安捷伦 EcoSpheres 凝胶渗透色谱的样品净化技术*, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-7583CHCN, **2011 年**
2. Woodman, M.; Stone, P., *Optimizing Sample Loading in Automated Size Exclusion Chromatography Sample Preparation for Small Molecules Analysis from Complex Matrices (在自动化体积排阻色谱样品前处理中针对复杂基质中小分子化合物的分析优化进样量)*, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5989-0181EN, **2003 年**

作为样品前处理技术的色谱柱/ 快速色谱

在开发用于样品预处理的 SPE 方法之前，可以先采用低压或开管柱液相色谱 (LC) 进行类似的纯化。**图 12.1** 为开管柱 LC 的步骤。在该纯化方法中，大颗粒的硅胶或氧化铝等吸附剂被装填在大内径 (1-5 cm) 的玻璃柱中。用移液枪将样品注入填充床顶部，溶剂将在重力作用下渗透过色谱柱。既可手动收集馏分，也可使用馏分收集器收集。采用分光光度计或比色计离线检测分析物。如果所收集的馏分中分析物的浓度过低，以致于二级分析技术无法进行测定，我们可以采用其他的样品前处理技术（例如蒸发）浓缩样品。相对于 HPLC，该技术的柱效很低，但简单易执行。

图 12.1

快速色谱过程图示



近年来，一种称为快速色谱的现代色谱柱技术应用日益广泛。快速色谱最先出现于上世纪 60 年代和 70 年代，主要通过开管柱应用中施加压力来实现，但随着 10 μm 和亚 10 μm LC 色谱柱的出现，它逐渐淡出了人们的视线。上世纪 90 年代中期，随着组合化学成为新药开发的必要内容，快速色谱作为一项用于快速纯化 mg 到 g 级合成混合物的技术被“重新发现”。与快速色谱相比，采用传统层析柱色谱速度太慢，使用 SPE 需要进行多组分收集或者存在损失目标分析物的风险，而 HPLC 又没有足够大的上样量，并且合成化学家觉得 HPLC 仪器过于复杂。

该技术采用了方便的预装填柱和预纯化的吸附剂，并应用低压力（数 bar）以辅助流动。有多种预装填的快速色谱柱可供选择，内径范围 75-150 mm，填料质量 200-9000 g。除了经典的吸附剂外，也可选用 C8 或 C18 键合硅胶等新型键合固定相，因此，除了可在硅胶和氧化铝（中性、碱性、酸性）上实现正相分离外，也可以进行反相色谱分离。HPLC 常用的键合相现在也可用于快速色谱分析。有的仪器还可在中等压力下泵送流动相通过色谱柱。现代仪器可以运行梯度洗脱，并且有不同的流通式检测器可供选择。它们实际上属于 HPLC 分离仪器，但工作压力更低，因为与 HPLC/UHPLC 色谱柱相比，它们所采用的填料颗粒相当大（超过 20 μm ）。

那么就产生了一个问题：固相萃取和快速色谱的分界线在哪里？从容器大小、填料质量和粒径来看，大尺寸的 SPE 柱与小尺寸的快速色谱柱非常类似，反之亦然。它们的主要区别可能在于快速色谱柱主要用于制备型任务和大规模的纯化，而大尺寸的 SPE 柱由于容量有限，主要用于放大较小规模的纯化工作。实际上，由于两者均可完成某种程度的样品纯化，它们并不存在本质上的区别。

离线 LC（包括快速色谱）作为样品纯化技术应用于 GC 和 HPLC 分析已有详细的报道。在快速液相色谱中，可采用两种不同模式的 HPLC（这两种模式正交）构成的分离系统进行样品净化，从而实现样品的高度纯化。这种多维的快速 LC-HPLC 实验方法还可以使进入 HPLC 色谱柱的样品更加纯净，有助于延长 HPLC 色谱柱的使用寿命。通常样品还可通过梯度洗脱实现分馏。该技术已成功应用于多种环境样品中的农药以及生物体液中的药物的样品纯化。在 GC 分析中，使用弗罗里硅土和氧化铝等吸附剂进行农药分析之前的样品纯化已有相当长的历史。在某些情况下，使用薄层色谱 (TLC) 有助于选择用于快速色谱的最佳 LC 条件。例如，TLC 可帮助我们确定在梯度洗脱中可使用的溶剂，或者帮助我们选择可从色谱柱上洗脱分析物而非基质化合物的溶剂。

作为样品前处理技术的柱切换 (在线 SPE)

柱切换(有时也称为二维液相色谱、多维色谱柱色谱、串联色谱柱色谱,或 Boxcar 色谱)是一种可分离和纯化复杂多组分样品的重要技术。在该方法中,初始色谱柱(色谱柱 1)的全部或部分色谱峰选择性地转移至第二根色谱柱(色谱柱 2)中进行进一步分离(见图 13.1)。就样品前处理而言,色谱柱 1 可以是 SPE 柱、小柱或萃取盘,而这种技术可称为在线 SPE。

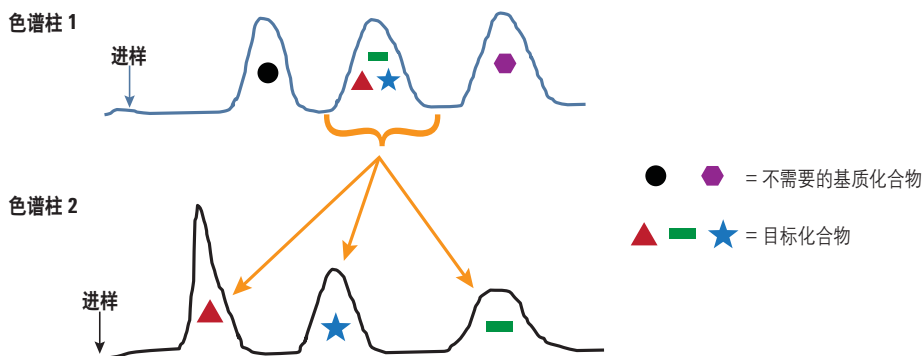
柱切换(C-S)可用于:

- 去除不利于色谱柱 2 的样品组分
- 在进样至色谱柱 2 之前去除洗脱较晚的化合物
- 选择性去除色谱柱 2 中会与分析物峰重叠的干扰物
- 梯度洗脱的替代方法
- 痕量富集,同时也是一种样品前处理技术

与使用单柱模式相比,实现以上的一点或几点,能够大大提高样品通量。C-S 的基本目标是尽可能多地将分析物转移至色谱柱 2 中,同时将干扰化合物的转移降至最低,也就是说,它与采用离线 SPE 进行样品前处理的目标相同。

图 13.1

色谱作为样品前处理技术的原理（中心切割）



在 HPLC 中，通过一个耐高压切换阀将色谱柱 1 连接到色谱柱 2，以实现 C-S。在该方法中，样品在色谱柱 1 中部分分离，含有目标分析物的馏分被导入色谱柱 2 进行最终的分离和检测。C-S 可配合 LC、GC、TLC、SFC 以及 CE 使用。本章只介绍 LC-LC 方法。虽然 C-S 与采用 HPLC 分析 SPE 的离线馏分（请参阅第 9 章）类似，但它们的常规应用存在着一些主要的区别：

- SPE 小柱通常只使用一次即丢弃；C-S 中的色谱柱 1 可重复使用，但其使用次数（例如 50-100 次）通常少于常规的 HPLC 色谱柱。因此，在 C-S 中，需要额外的清洗/反冲步骤以确保色谱柱 1 上的干扰物能够完全被去除。否则，这些杂质可能会损坏色谱柱 1 的性能，或是在之后的分析中从色谱柱 2 中洗脱，形成多余的色谱峰
- 与 SPE 小柱相比（ d_p 为 40 μm 左右），色谱柱 1 的效率更高（粒径更小， d_p 为 3 或 5 μm ）。因此，色谱柱 1 中洗脱的分析物的带宽更窄，与 SPE 小柱相比，其分离度更高，并且能够为色谱柱 2 提供纯度更高的样品，简化了最终的 HPLC 分离
- 因为 C-S 是在一个闭合系统中进行的，相较于在开放环境中进行的 SPE，其损失样品（例如发生氧化）和导致浓度变化（例如蒸发）的几率更低
- 多个阀的配置可实现中心切割、反冲、将污染物直接排入废液等

当然，柱切换也存在一些缺陷。首先，其系统要求比离线 SPE 更为复杂——需要使用阀、管路、精确的计时装置以及电子接口。样品不能含有颗粒物，因为它们可能会保留在色谱柱 1 的滤芯上，轻则造成柱压增加，重则最终堵塞色谱柱。强保留的样品组分及基质干扰物会保留在初始色谱柱中，因此初始色谱柱需要更换或定期进行清洗。

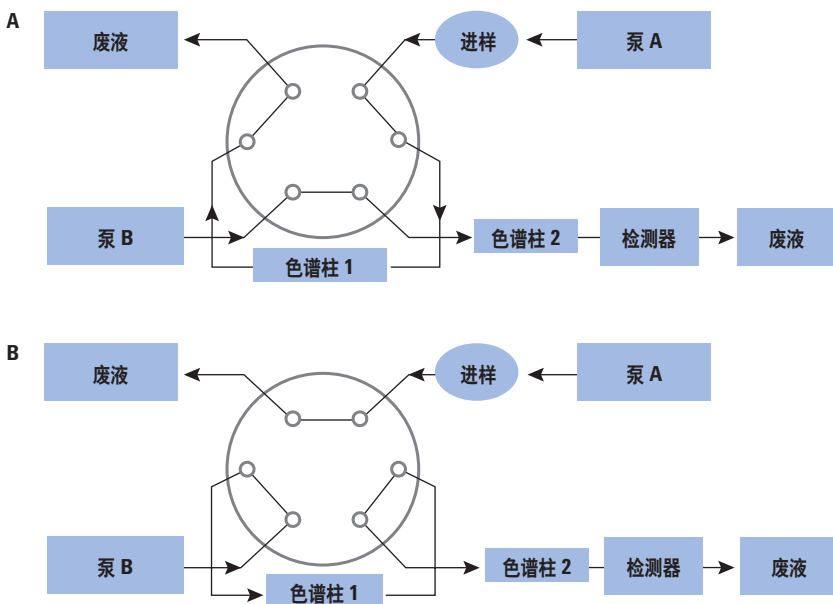
操作原理

柱切换可手动进行也可自动进行，但大多数 C-S 应用均采用全自动化的方式。使用低死体积的切换阀，并通过计时器或 HPLC 系统控制器中的时间编程事件实现自动化运行。C-S 实验中需要实现的非常重要的一点是将分析物从色谱柱 1 完全转移至色谱柱 2 中。这需要严格控制切换时间。现在已有 2 到 10（或更多）通的高压切换阀，其中 6 通或 10 通阀最常用。C-S 也可通过精细配置的单泵系统操作，但我们通常都会使用多个泵（至少两个）。

一种常用的 C-S 系统（如图 13.2）采用了双泵配置，其中色谱柱 1 连接六通阀的两个端口，并位于色谱柱 2 之前。采用图 13.2A 所示的阀位置可使来自色谱柱 1 的泵 A 流动相绕过色谱柱 2，直接进入废液。因此，进入色谱柱 1 且保留较弱的非目标样品组分可被去除并进入废液。接下来，如图 13.2B 所示，阀位置切换，使得流动相可由泵 B 经色谱柱 1 流入色谱柱 2。因此，任何保留在色谱柱 1 中的组分都可被“反冲”进入色谱柱 2 进行分离和检测，洗脱方向与样品上样方向相反。如果色谱柱 1 的上样端同时捕集了颗粒物等污染物，此时采用反冲会干扰色谱柱 2 的分析，因此此时可使用正冲方式。完成初始上样之后，通过选用适合的流动相强度和洗脱时间，能够对色谱柱 1 上保留的样品组分进行选择性的洗脱。

图 13.2

利用反吹进行样品纯化实验设置



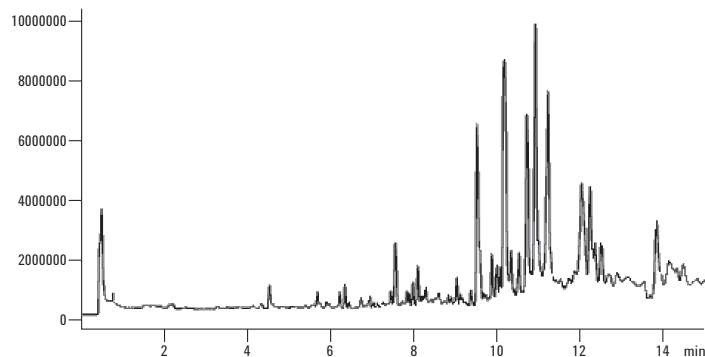
采用 LC 色谱柱切换进行样品纯化的实例

香料中的苏丹染料¹：苏丹染料为偶氮染料，根据 IARC（国际癌症研究署）发现归类为第 3 组潜在致癌化合物。自 2004 年起，欧洲、日本和美国禁止在食品中添加该类化合物。如果香料或含香料的产品（例如复合香料）中检测出该类化合物，则产品必须召回并销毁。我们研究了以下三种主要的苏丹染料：苏丹橙 G，苏丹 1（苏丹 I），以及苏丹 2（苏丹 II）。

在该例中，采用了如图 13.2 所示的阀配置进行样品纯化。为了分析香料产品（例如辣椒或红辣椒粉）中的苏丹染料而进行的初步样品前处理相对来说比较简单直接。采用超声水浴在乙腈中对粉末进行提取。待液体冷却后，进行过滤，然后进样至 HPLC 柱。该提取物含有大量的有色和无色化合物，所得的 LC-MSD 色谱图十分复杂，如图 13.3 所示。在线样品纯化在预柱（色谱柱 1，即参考文献 1 中的纯化色谱柱）中进行，通过分析柱（图 13.2 中的色谱柱 2）和纯化柱之间的阀切换实现。该过程可去除分析柱中的主要污染物，它们来源于香料中存在的油类和其他残留物，还能使质谱仪的离子抑制效应最小化。

图 13.3

MSD 全扫描模式分析红辣椒粉末萃取物



条件

色谱柱：

纯化柱（色谱柱 1）：Agilent ZORBAX RRHT Eclipse Plus C18 柱，
2.1 × 30 mm，1.8 μm

分析柱（色谱柱 2）：Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 柱，
2.1 × 100 mm，1.8 μm

流动相： A = 水，
B = 乙腈（当为分析泵时，水中需加入 400 μL TFA 进行改性）

分析泵流速： 0.5 mL/min；停止 15 min；后运行 3 min

清洗泵流速： 0.3 mL/min；停止时间不限

分析泵的梯度条件： 0 min 时为 5% B；5 min 时为 95% B

清洗泵等度条件： 5% B

柱温箱： 两侧均为 40 °C，阀切换 = 下一次运行

阀切换： 2.0 min 时处于位置 B

进样器： 进样量 1 μL，洗针时间 6 s

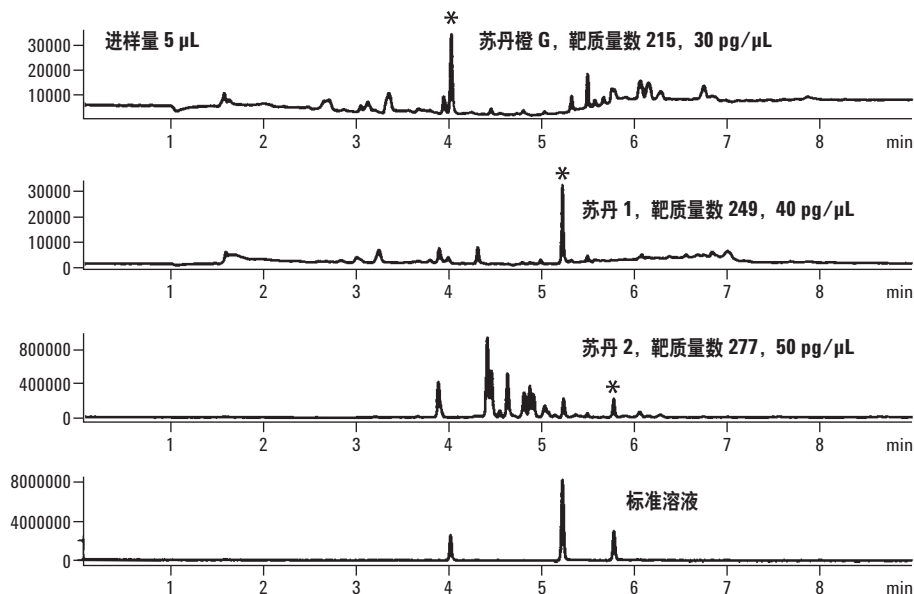
采用如图 13.2 所示的阀组件配置在线纯化红辣椒粉提取物的工作流程如下：

- 1) 将样品引入较短的清洗柱中（阀位置如图 13.2A）。泵 A 泵入流动相。前 1 min 内洗脱的所有化合物均排入废液
- 2) 1 min 后进行阀切换，使清洗柱和分析柱串联（阀位置如图 13.2B）。然后由泵 B 泵入流动相。分析梯度开始，目标峰从分析柱中洗脱（色谱柱 2）
- 3) 阀位置再次切换至初始位置，弃去所有剩余的化合物（阀位置如图 13.2A）。将清洗柱中的乙腈强度提高至 95% 以冲走所有剩余化合物。然后重新平衡清洗柱（色谱柱 1）至初始条件

采用配备 SIM 操作模式 Agilent 6140 四极杆质谱仪的 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统，可高灵敏度地检测苏丹红化合物。目标质量是 215、249 和 277。图 13.4 展示了标准品和样品提取物的叠加色谱图。与图 13.3 相比，进行在线纯化和 SIM 检测后的色谱图杂乱程度降低，这是因为在苏丹染料之前和之后洗脱的化合物被排到了废液中。虽然在此未展示，所采集的数据表明基质组分的离子抑制效应降低了。这三种主要苏丹染料中每种染料的最小检测量 (MDQ) 约为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^1$ 。

图 13.4

标样和样品萃取物的 LC-MSD SIM 谱图叠加



条件

色谱柱:

分析柱: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 柱,
2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm

清洗柱: Agilent ZORBAX RRHT Eclipse Plus C8 柱,
2.1 mm × 30 mm, 1.8 μm

流动相: A = 水, B = 乙腈
分析泵 水 + 400 μL TFA

分析泵流速: 0.5 mL/min; 停止 9 min; 后运行 3 min

清洗泵流速: 0.5 mL/min; 停止时间不限

分析泵的

梯度条件: 0 min 时为 20% B; 1 min 时为 20% B; 5 min 时
为 95% B

梯度清洗泵: 0 min 时 20% B;
6.5 min 时 20% B;
6.6 min 时 95% B;
8.1 min 时 20% B

柱温箱: 两侧均为 40 °C, 阀切换 = 下一次运行

阀切换: 0 min 时处于位置 A, 1 min 时处于位置 B,
6.5 min 时处于位置 A

DAD: 220/20 nm, 参比 = 关闭, 450/20,
PW > 0.0012 min, 20 Hz, 狭缝宽度 4 nm

进样器: 进样量 1 μL (标样) 或 5 μL (加标萃取物),
洗针时间 6 s

MSD: 峰宽 0.03 min;
质量数为 215、249 和 277 的正离子 SIM 参数,
碎裂电压 = 100;
实际驻留时间 45;
载气温度 = 350,
干燥气 = 12 L/min;
雾化压力 = 35 psig;
V_{cap} 正离子电压 = 3000 V

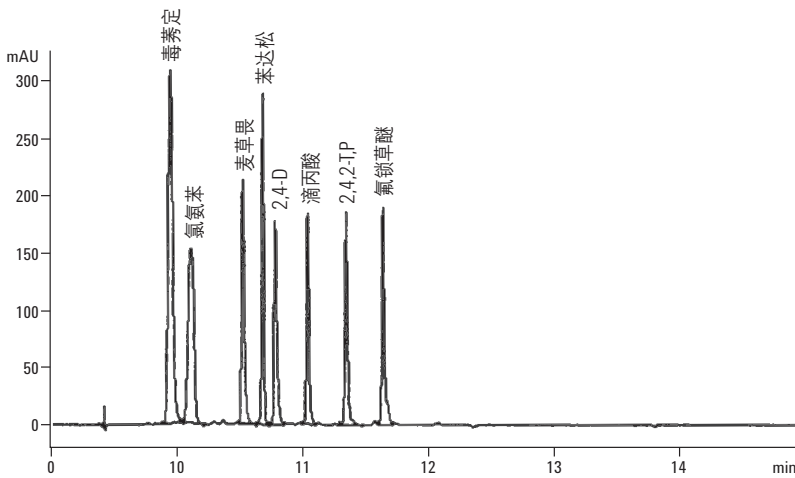
* : 显示了苏丹染料母体的峰位

痕量富集水中的除草剂：痕量富集是指使大体积的样品（通常为饮用水或水源含水层）通过捕集柱以浓缩其中的低浓度有机物，然后将浓缩的分析物转移至另一根 HPLC 柱中进行进一步分离。我们需要对水体中的除草剂污染进行监控，以减少它们对人类健康的不良影响。要满足法规要求，就需要可对这类化合物进行检测和定量的高灵敏度方法。

采用与图 13.2 中类似的仪器配置，从富集柱 (Agilent ZORBAX SB-AQ, 2.1 x 30 mm, 1.8 μ m) 中分离出了 8 种含氯除草剂，并将其转移至分析柱 (Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m) 中进行分离，然后由高灵敏度的二极管阵列 (DAD) 检测器进行检测²。样品为少于 2 mL 的含有除草剂的水，整个捕集过程不到 3 min，整个分析时间只需 15 min (见图 13.5)。该方法的灵敏度达到了美国国家环境保护局 (EPA) 规定的方法 555 所描述的检测限 (毒莠定 0.5 ng/mL, 2,4-滴丙酸 1.7 ng/mL)。峰面积，峰高及保留时间的 RSD 均小于 1%。

图 13.5

8 种分析物（每种分析物 50 ppb）的样品的色谱图



色谱柱切换的其他应用如表 13.1 所示。该系统的优势是可以实现过程自动化，因此可提高定量性能和重现性，并降低整个分析过程的人力成本。

表 13.1

柱切换作为样品前处理技术举例			
分析物	基质	方法	参考文献
免疫抑制剂	血浆和全血	先进行蛋白质沉淀，然后将 IS 捕集到柱 1 上；反吹去除基质化合物并将其余化合物洗脱到柱 2 上，并通过 LC-MS/MS 进行分析	5
新霉素和筛查氨基糖苷类	牛奶	在较短的熔融石英毛细管反相色谱柱上提取离子对；直接洗脱到 MS-MS 中	6
吡哌美辛	血浆	使用 ISRP（内表面反相）柱 1；蛋白质被排阻，但小分子药物得到保留，并被切换至分析柱通过 LC-DAD 进行分析	7
去甲替林		使用 Biotrap 排阻柱 1 去除蛋白质；药物被洗脱到反相柱 2 中并通过 DAD 进行检测	8
25-羟基维生素 D2 和 D3		先进行蛋白质沉淀，然后将其余物质捕集到 Poroshell 120 柱上；去除基质干扰物并将其余化合物洗脱到柱 2 上，并通过 LC-MS/MS 进行分离和分析	9
β 受体阻滞剂	地下水	大体积进样，进行预浓缩，然后进行液相色谱-荧光和 LC-TOF MS 分析	10
17 β -雌二醇	血浆	未衍生的雌二醇捕集柱（反相）和分析柱（反相）	11
氧化物和芳香族化合物	烃加工流	使用 Deans Switch 进行中心切割实现分析物的 GC-GC 分析	12
地高辛	人血清	柱 1 中的限进介质排阻蛋白质但保留小分子；蛋白质被冲洗到废液中，而小分子则被洗脱到柱 2（短链反相柱）上	13

当我们需要分析从色谱柱 1 洗脱得到的每一种化合物时，通常都会采用涉及色谱柱切换的复杂多维色谱法（使用两根色谱柱时也可称为二维色谱法，或 LC x LC 或 GC x GC）。在复杂的 LC x LC 中，每个泵的液流都不会停止，两根色谱柱将同时进行分离。色谱柱 1 的流速相对较低，这是因为其洗脱物会通过位于 10 通阀上的两个定量环之一进行持续收集。这两个定量环的大小足够容纳色谱柱 1 的所有流出物，而色谱柱 2 中的分析非常迅速，通常只需 1 或 2 分钟。一旦色谱柱 2 中的分离结束，该色谱柱会迅速进行再生，然后初始定量环中的化合物将切换至色谱柱 2，进行另一轮的快速分析。这一次，第二个定量环开始收集色谱柱 1 的流出物，整个过程不断重复进行。色谱柱切换实验的不同之处在于，我们可能只关注色谱柱 1 中流出的一个，两个或几个峰，而不是整个样品。在 GC x GC 中，我们采用热调制器对 GC 色谱柱 1 的流出气体进行低温捕集，以收集和浓缩分析物，同时 GC 色谱柱 2 中的分离也极其迅速，通常不到 1 分钟。所捕集的样品将被快速加热，并直接进入色谱柱 2 进行进一步分离，与此同时在冷调制器中捕集新的馏分。更多有关二维色谱的信息，请参阅参考文献 3 和 4。

更多有关 SPE 的安捷伦应用简报，请访问 www.agilent.com/chem/online-spe

参考文献

1. Gratzfeld-Huesgen, A. *On-line Sample Cleanup on the Agilent 1290 Infinity LC Using a Built-in 2-position/6-port Valve* (采用内置 2 位/6 通阀的 Agilent 1290 Infinity LC 进行在线样品纯化)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-5255EN，**2010 年 2 月**
2. Kailasam, S. *Trace Analysis of Chlorinated Herbicides in Water with On-line Enrichment* (采用在线富集进行水中含氯除草剂的痕量分析)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-6922EN，**2010 年 12 月**
3. Mondello, L. (Ed.) *Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry*, Wiley, New York, 2011, ISBN-10:0470434074 and ISBN-13:978-0470434079
4. Cohen S.A.; Schure, M.R.(Eds.) *Multidimensional Liquid Chromatography: Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences*, Wiley-Interscience, New York, **2008**, ISBN:0471738476
5. McCann, K. ASMS 2011, Paper ThP166, *A Rapid Quantitative Analysis of Five Immunosuppressant (IS) Drugs in Blood by LC-MS/MS for Clinical Research*, **June, 2011**
6. Lu, C.-Y.; Feng, C.-H. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 2143-2148
7. Koizumi, K. *Automatic HPLC Analysis of Indometacin in Plasma Using Column Switching* (采用柱切换对血浆中的吲哚美辛进行自动化 HPLC 分析)，安捷伦科技公司出版物，出版号 5968-7205，**1999 年 8 月**
8. Ricker, R. *Analysis of Nortriptyline in Plasma* (血浆中去甲替林的分析)，安捷伦科技公司出版物，出版号 5988-6398EN，**2002 年 4 月**
9. Chun, M.R.; Jung, H.-J.; Yang, J.S.; Kim, H.-Y.; Lee, S.-Y. *Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Lab* (MSACL 2012) Poster 55, **January, 2012**
10. Galera, M.M.; Vazquez, P.P.; del Mar, M.; Vazquez, P.; Garcia, G.; Amate, C.F. *J. Sep. Sci.* **2011**, 34, 1796-1804
11. Szczesniowski, A. *Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Lab* (MSACL) Tuesday Lunch Workshop, **January, 2012**
12. McCurry, J.; Quimby, B., *二维气相色谱采用中心切割技术分析汽油中的氧化物和芳烃*，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5988-6696CHCN，**2002 年 5 月**
13. Sudergat, H.; Unger, K.K.; Emmert, J.; Wendt, J.; Mandel, F., *在线样品制备-液相色谱/质谱联用分析人血清中的地高辛*，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5988-4364CHCN，**2001 年 10 月**

固体样品的样品前处理方法

通常，在 HPLC 或 GC 分析前，样品必须呈液态。一些不溶性的固体中含有可溶性的分析物，例如聚合物中的添加剂、食品中的脂肪，以及土壤中的多环芳烃 (PAH)。让溶剂与样品接触可使分析物被萃取到溶剂中，然后通过倾倒、过滤或离心将溶剂与固体残留物分离。如有必要，在 HPLC 或 GC 分析之前还需对溶液进行进一步处理。第 2 章中的表 2.2 和 2.3 总结可用于从不溶性固体基质中萃取（“浸出”）可溶性分析物的技术。我们将在本章中回顾先前的列表内容。

传统萃取方法

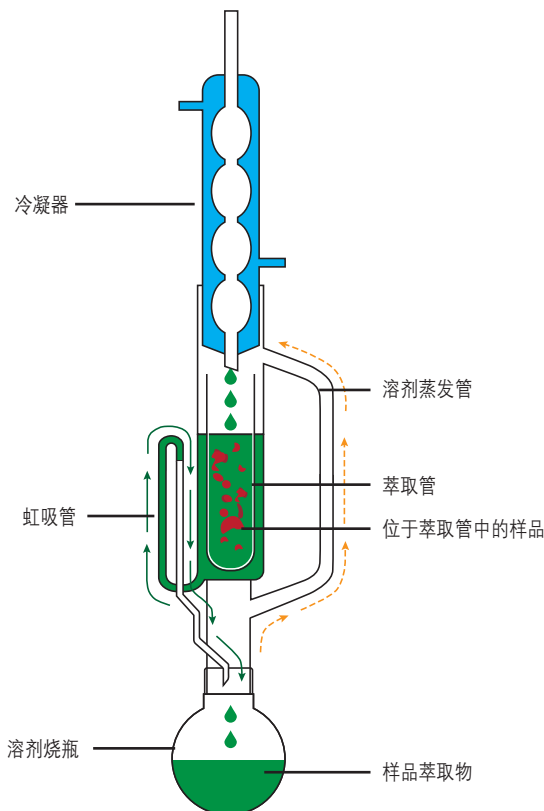
任何一种溶剂萃取技术都不可能同时适用所有样品。表 2.2 列出了几种传统的固体样品预处理方法。其中的大部分方法（例如，索氏提取法和浸提法）都拥有上百年的使用历史，它们经过了时间检验，已被多数科学家所接受。美国国家环境保护局 (U.S. EPA)、食品药品监督管理局 (FDA) 等法规机构以及其它国家的类似机构都已批准将这些经典方法用于固体样品的萃取。但是，这些方法通常需要使用大量有机溶剂，这引发了近年来萃取方法朝着小规模化发展的趋势。此外，某些传统萃取技术还需要使用大量的玻璃器皿并且耗费大量的人工操作。

溶剂萃取可通过多种方法实现。当分析物在萃取溶剂中的溶解度较高且样品为多孔物质时，液液分配的萃取效果最好，该方法的主要步骤是向样品中添加溶剂之后进行搅拌。进行快速萃取时，首先需将样品磨碎（请参阅第 4 章，减小粒度）。对溶剂中的样品进行加热或回流可以加快萃取速度。如果还需要进一步加快萃取速度并使样品得到完全萃取，我们通常使用超声搅拌的方法，超声可以使固-液相间有效的接触从而提高萃取效率，同时其微弱的加热效应也有助于萃取。超声法在许多固体环境样品的推荐预处理步骤，例如 U.S. EPA 方法 3550（土壤、污泥和废料等固体样品中非挥发性和半挥发性有机化合物的萃取方法）中就采用了该法。该方法根据固体基质中污染物的类型及浓度推荐了不同的萃取溶剂和超声条件。

在强制流动浸出中，固体样品被装填入一根短的不锈钢柱（例如 20 x 0.4 cm）中，然后在加压条件下（40 psi）将甲苯泵入通过加热至 100-110 °C 的不锈钢柱。萃取结果与索氏提取法（见下方）相当，但萃取时间显著缩短（例如从 24 h 降至 0.5 h）。已证明采用该技术从煤灰样品中萃取多环芳烃可得到良好的回收率¹。强制流动浸出的优势在于，样品由新的热溶剂进行连续萃取，并且柱中的流出物非常易于收集用于进一步处理。

索氏提取法是萃取固体样品时应用最广泛的方法。在该过程中，固体样品被置于索氏提取套筒（由强化滤纸制成的一次性多孔容器）中，然后将提取管置于索氏提取器中。回流的萃取溶剂冷凝进入提取套筒中并萃取出可溶性分析物（图 14.1）。提取器经专门设计，每当盛装提取管的腔室充满溶剂时，提取液将发生虹吸。虹吸的溶液携带着其中溶解的分析物返回长颈烧瓶，然后该过程反复进行，直至分析物完全从固体样品中被萃取出来并进入隔离的烧瓶中。索氏提取通常很慢（耗时 12 - 24 h 或更长），但该过程可实现无人值守。最常用的索氏提取器需要使用数百毫升非常纯（且非常昂贵）的溶剂，但现在已经有了用于毫克级样品的小体积提取器和提取套筒。

图 14.1
传统索氏提取装置图示



索提时，我们通常采用加热的新配制萃取溶剂来处理样品，目的是为了最大程度提高分析物的溶解度。由于萃取出的分析物将在长颈烧瓶中富集，因此分析物必须在萃取溶剂的沸点温度下保持稳定。开发索提方法需要寻找适合的挥发性溶剂（例如，沸点为 < 100 °C），满足分析物在其中具有高溶解度，并且固体样品基质在其中溶解度较低的要求。索氏提取法作为最古老的有效萃取方法，是衡量新型萃取技术（如 SFE、加压流体萃取（PFE）/加速溶剂萃取（ASE）以及微波辅助萃取（MAE）等）萃取效果的公认标准。

用于固体材料的新型萃取方法

多年以来，表 2.2 所列的溶剂萃取法满足了绝大多数实验室的分析需求。表 2.3 中所列的新方法是为了满足人们对更高效、更快速，以及自动化程度更高的分析日益增长的需求而开发的。其中的某些方法实际上是表 2.2 中某些方法更加便捷的自动化版本。其他技术则是基于新原理开发的。在大多数情况下，由于需要购买新的设备，这些新方法的成本会比较昂贵，但它们能够降低单个样品的分析成本，并且分析速度更快。这些新方法中的大多数都在高温和高压下进行的固相萃取。表 14.1 提供了关于这些参数如何加快萃取的背景信息。表中涉及的缩略语将在后面部分进行解释。

表 14.1

大多数现代固相萃取技术使用高温和高压

温度的影响

- 提高分析物溶解度
- 加快扩散速度并提高扩散传质
- 降低粘度与室温的比值
- 更容易克服脱附的活化能
- 更有利于脱附和溶解动力学

压力的影响

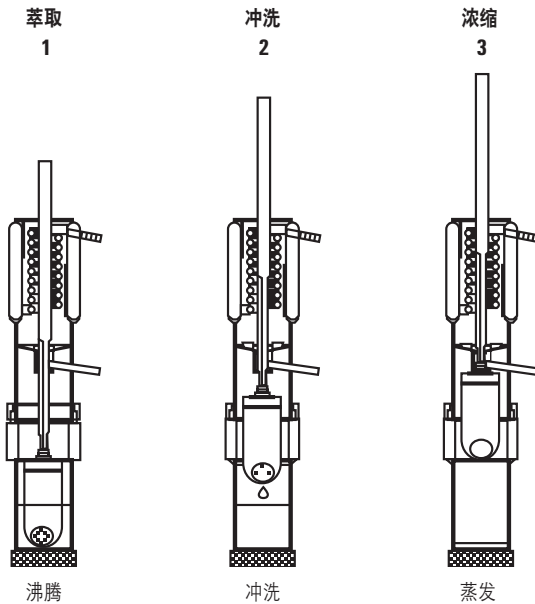
- 推动液体进入多孔材料的孔内
- 加速萃取池充满 (PFE/ASE, SFE)
- 加速萃取池排空

将温度和压力结合

- 在 SFE 中，压力和温度变化将改变超临界二氧化碳的密度，从而改变其溶解性能
- 在 ASE/MAE 中，温度和压力相结合可加快萃取速度和提高萃取程度

1974年, Edward Randall 对索氏提取技术进行了重大改进, 显著缩短了萃取时间²。在他的改进方法里, 样品完全浸入沸腾的溶剂中。在经典的索氏提取法中, 冷凝萃取溶剂的温度略低于其沸点, 与该方法相比, Randall 的方法萃取速度更快, 因为分析物在热溶剂中的溶解性比其在温热溶剂中的溶解性更高。Randall 方法的操作见图 14.2。首先, 将萃取管浸入沸腾的溶剂中, 直至样品充分萃取。接下来进行冲洗步骤, 以冲洗出样品中的残留萃取物。在第二阶段中, 将萃取管提升到沸腾溶剂的上方并保持一段时间, 直至冷凝的溶剂完全去除固体材料上的残留萃取物, 该操作与传统的索氏提取实验相同。最后, 通过干燥步骤从溶剂瓶中去溶剂并浓缩分析物, 用于进一步处理。在该步骤中, 关闭溶剂回流阀可将冷凝的溶剂导入一个远离样品和沸腾溶剂的收集容器中, 以待重复利用或废物处理。某些系统还有第四个步骤, 在该步骤中, 样品杯被提起, 使其离开热源以进行进一步的蒸发, 避免了样品过热、蒸干或可能发生的氧化。与传统的索氏提取法相比, Randall 方法最多可减少 10 倍的萃取时间。

图 14.2
现代索氏提取系统的操作原理



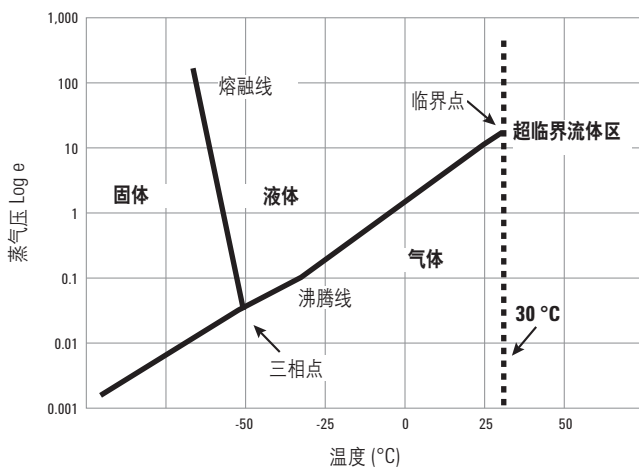
现代索氏提取系统可以实现完全无人值守的运行, 还能提供程序升温、溶剂回收和多种安全特性。大多数溶剂均可使用, 但不推荐使用乙醚, 因为乙醚存在明显的安全隐患。自动化的索氏提取法已被 U.S. EPA 批准用于土壤、底泥、污泥和固体废弃物中有机分析物的萃取 (方法 3541)。

随着全自动系统的发展, 经典的索氏提取法已不再像过去那样繁琐复杂。尽管如此, 人们还是针对索氏提出了一些改进建议。通过聚焦式微波辅助索氏提取法萃取环境固体样品时, 使用可吸收微波的特定溶剂能够进一步加快的萃取速度³⁻⁴。进一步改进方法, 使用过热水作为萃取溶剂, 方法将变得更为环境友好⁵。与实验室配置的加标污染土壤相比, 使用索氏提取法萃取老化土壤中的污染物更加困难。有研究表明, 采用原位衍生化技术更容易萃取得到沙化土壤中的五氯酚 (PCP)⁶。研究人员发现, 对于相同的土壤样品, 使用乙酰化试剂 TEA-醋酸酐和吡啶-醋酸酐萃取原位衍生化 PCP 的收率比通过传统的索氏提取法萃取未经衍生化 PCP 的收率提高了四倍, 并且萃取时间更短。

超临界流体萃取 (SFE)

一种物质的物理状态可以通过相图来描述，该图根据物质的固态、液态和气态状态定义了相应的区域。在相图中，曲线上的点代表两相间达到平衡时物质的状态。在二氧化碳的相图 (CO_2 , 图 14.3) 中，与固态和液态间的曲线不同，液态和气态间的曲线有一个终点 (临界点)。该临界点由临界温度 T_c 和临界压力 P_c 定义；在临界点以外 (超临界区域)，无论压力如何，气态 CO_2 都不会转变为液态。SF 具有类似气体的传质性，以及类似液体的溶解性，这使得它能够比液态溶剂更加快速有效地进行溶剂萃取。如今，超临界流体萃取 (SFE) 已用于从固体基质中萃取非极性和中等极性分析物。一些参考文献⁷⁻¹¹介绍了 SFE 的仪器、方法开发和应用。

图 14.3
 CO_2 的相态图



可用于 SFE 的流体包括 CO_2 、 NH_3 、 N_2O 和戊烷。 N_2O 和戊烷易燃，而 NH_3 具有化学反应性和腐蚀性。 CO_2 最常用于 SFE，因为它安全、化学惰性、无毒、无腐蚀性，并且能以合理的成本使其达到较高的纯度。 CO_2 易于从所收集的分析物中去除，并且不会产生任何废弃物处理的问题。低密度超临界 CO_2 的极性与己烷相同，即它是非极性的。但是，SF 的极性会随着密度的增加而增加，尤其是接近临界点的时候；因此，当 SF- CO_2 达到最高密度时，其极性类似于甲苯、苯和乙醚等溶剂。

虽然纯 CO_2 可用于萃取多种非极性和中等极性的分析物，但它对极性更强的化合物的萃取效果不佳。在其他一些情况下，它还可能无法置换强烈吸附在固体基质上的分析物。向 CO_2 中加入少量的（最多 10% 体积分数）极性有机溶剂（甲醇、二氯甲烷、乙腈、甲苯等），可以提高其溶解更强极性分析物的能力，或者当这些化合物吸附于样品基质上时，提高 CO_2 对它们的置换能力。在 CO_2 中加入有机溶剂对临界温度和临界压力值略有影响，因此在这种情况下，可能需要改变用于纯 CO_2 的温度和压力。

U.S EPA 已经批准了多个用于环境分析的 SFE 方法，例如土壤和污泥中总石油烃类、多环芳烃 (PAH) 和有机氯农药的分析方法。SF- CO_2 还是萃取脂肪的极佳溶剂，适用于食品工业领域的萃取应用。高脂肪含量的溶剂萃取物接触到反相 HPLC 流动相时，脂肪会发生沉淀，或者强烈吸附到疏水性固定相上，很快导致色谱柱失效。因此，SFE 可作为一项选择性的样品前处理技术，用于去除部分“会对色谱柱造成损害的样品组分”。

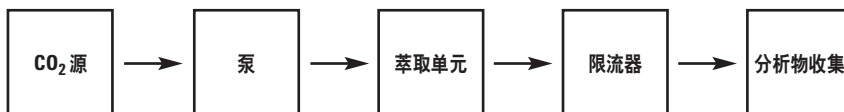
SFE 还可利用不连续的溶剂强度变化（即密度梯度或密度程序）来分离不同类别的分析物。它的一个应用实例就是通过密度梯度 SPE 对啤酒花进行连续分馏¹²⁻¹³。在聚合物领域，SF- CO_2 的渗透能力使其在 1 小时内就能够完成抗氧化剂和增塑剂等聚合物添加剂的萃取。而采用传统的索氏提取法或超声萃取方法进行此类萃取通常需要好几个小时。药物化学家发现 SFE 非常适用于从片剂和组织样品中萃取药物。

SFE 仪器

图 14.4 是超临界流体萃取器的示意图。主要部件包括二氧化碳源、泵（注射泵或冷头往复泵）、放置样品的萃取室（或萃取池、萃取管）、限流器，以及分析物收集装置（通常为某种容器）。泵头、萃取室、限流器和收集装置的温度是分别控制的。 CO_2 以液态形式泵出，并保持这种状态直至其到达萃取室，在这里， CO_2 在适当的温度和压力条件下变成 SF。在萃取管内，SF 持续地流经样品，当萃取时间足够长时，分析物可以从固体基质中提取出来。通过萃取管后，SF 将到达限流器，在这里 SF 通过减压处理恢复到非 SF 状态。

图 14.4

超临界流体萃取器的框图



限流器的选择至关重要。常用的限流器有两种：由一段毛细管组成的固定限流器，或由用户控制的可变限流器。限流器的作用是控制萃取管中的超临界条件，以及当 SF 暴露于大气压下或 CO₂ 变为气体逸散时，控制分析物的析出。此时，SF 的快速膨胀会导致 Joule-Thomson 冷却，因此我们必须加热限流器来补偿下降的温度。否则，如果萃取的分析物和/或基质的量较大，限流器可能会堵塞。

分析物在限流器出口端外（冲击表面）以气溶胶的形式被收集起来。可采用三种方式收集（捕集）：(a) 采用空容器收集；(b) 采用填充了惰性材料（如玻璃微珠或不锈钢微珠、SPE 型填料 (20-40 μm)、GC 固相填料）的捕集阱收集；(c) 溶解到溶剂中。收集温度和最佳收集方法取决于分析物的挥发性。例如，空容器不适合用于收集某些气溶胶或高挥发性化合物，因为这类化合物可能会随 CO₂ 气体一起被吹扫带走。溶剂收集同样受到气溶胶影响（高速流动的 CO₂ 气体通过液体时可能会产生气溶胶）。因此，为了更有效地进行捕集，应选择最不易形成气溶胶且分析物溶解度最高的溶剂。冷却溶剂也有助于收集过程。使用填充捕集阱收集样品时，仪器通常需要一个小型分液泵，用于将分析物冲洗进入样品瓶中捕集分析物的能力是 SFE 最为重要的一项指标，通常也是 SFE 中最困难的一步。

SFE 方法开发

在 SFE 中，根据基质不同，分析物的萃取方法也各不相同。例如，从土壤、飞灰、污泥和沙中萃取相同 PAH 组分所需 SFE 萃取条件就各不相同。萃取老化土壤样品中的已知分析物比萃取新加标的样品更加困难¹⁴。固体基质的 SFE 萃取由以下三点控制：

- 分析物对基质的相对引力
- 分析物从基质向萃取溶剂中转移的速度
- 分析物在 SF 中的溶解度

温度会影响上述三个因素，并且是 SFE 方法开发中的一个重要变量。当高密度 SF-CO₂ 无法从基质中有效萃取目标分析物时，向其中添加有机溶剂作为改性剂（最多 10% 体积分数），可通过溶解分析物、让有机改性剂与分析物竞争基质表面，和/或修饰基质以释放分析物来促进萃取。在最后一种情况下，改性剂会“溶胀”或溶解全部或部分基质，以辅助 SF-CO₂ 的渗透。在极端情况下，可向 SF 中加入化学试剂，使其与分析物反应（例如分析土壤中的酚类时加入醋酸酐），将分析物转化为更容易萃取的形式。

极性和非极性溶剂均可用作 SF-CO₂ 的改性剂（“共溶剂”）。适用于指导非 SF 溶剂萃取（第 7 章）的混合溶剂选择的一般性规则也可应用于 SFE。也就是说，溶剂的极性 (P) 和选择性会对分析物的回收率及其与干扰物的分离产生较大的影响。选择 SFE 的初始条件时，了解分析物的性质非常重要，例如其分子量、官能团、极性、溶解性、挥发性、pKa、热稳定性和浓度等。此外，了解样品基质的特性也同样重要，例如粒度、均匀性、多孔性、组成、溶解性和密度等。基质本身还可能含有改性剂，如水、脂质和/或油。如果待分离的分析物是极性的，基质中的水会促进萃取过程；而样品中的脂质和油类则会起到相反的作用。

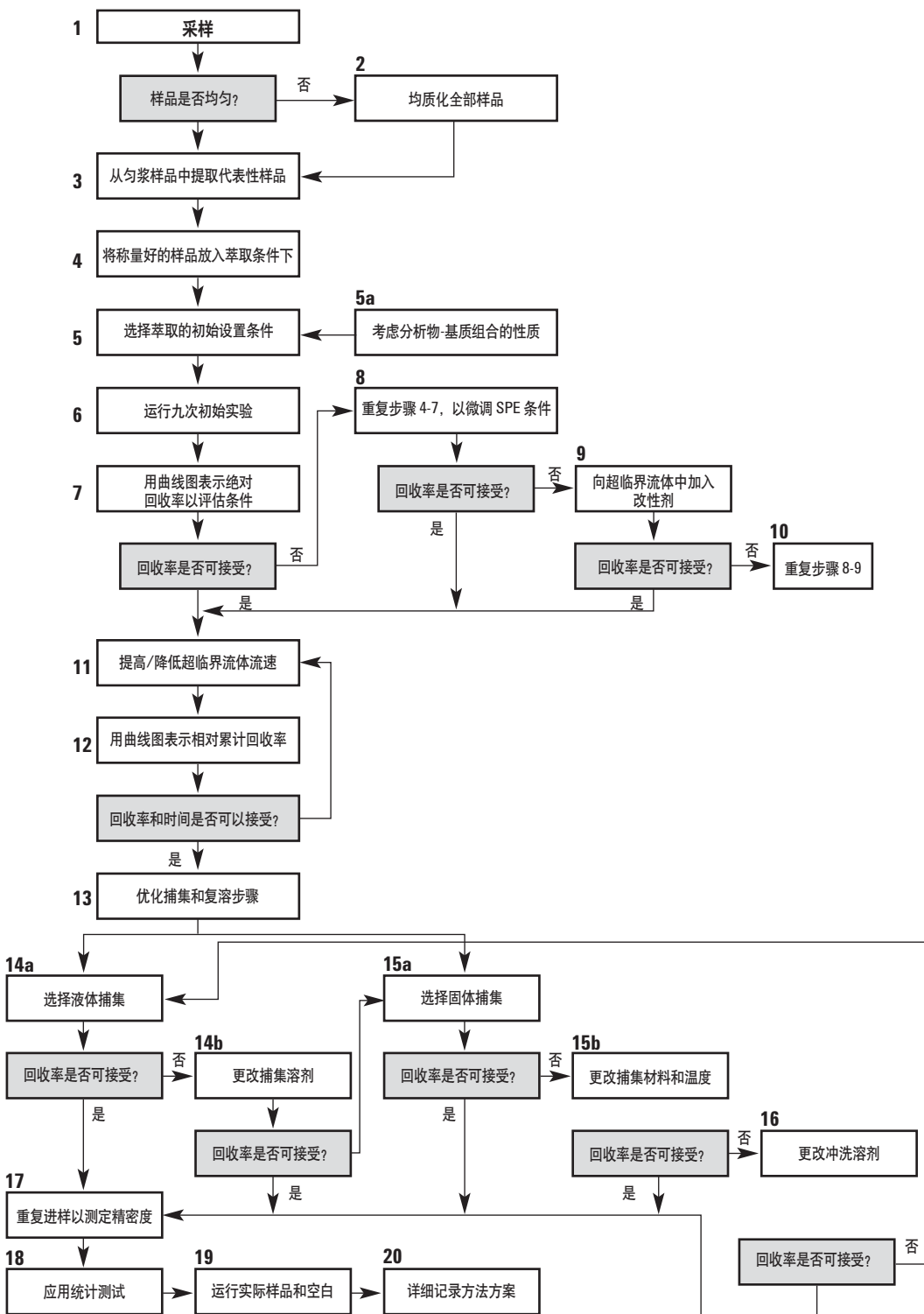
在 SFE 中，基质的物理状态非常重要。对于散装样品（例如固体颗粒、硬土、植物性物质等），通常需要对其进行一定的预处理：研磨、过筛、干燥、混合或浸湿。与其他萃取技术类似，对于非多孔或半多孔的样品，通过减小样品的粒度可以加快萃取速度。在某些情况下，调节 pH 或向萃取池中添加溶剂也有助于 SFE 过程。湿基质（如泥浆）可能需要预先除水才能得到较好的回收率和重现性。在基质中加入无水硫酸钠或硅藻土使其成为可自由流动粉末，也能达到同样的效果¹⁵。

影响 CO₂-SFE 的主要变量为压力、温度、流速、共溶剂和萃取时间。压力和温度共同控制 SF 的密度。SF 对分析物的溶解度随着压力和密度增加而增大。同一萃取剂 SF-CO₂ 的密度 (g/mL) 可通过无限种温度和压力的组合实现。对于热敏物质，应使用低温萃取，而对于较为稳定的分析物则可使用较高的温度。为了收集到萃取管中的所有分析物，我们可能需要使用较高流速或较长时间对样品进行萃取，但当萃取过程的动力学系数较小时，则应采用较低的流速进行萃取。

针对不同基质/分析物的萃取，现在已经有了许多已发表方法。分析人员通常使用“反复试验法”来优化萃取-收集条件。为了辅助方法开发，图 14.5 提供了一个通用指南¹⁶；但并不是每个样品都需要关注所有这些步骤。方法开发指南假设分析人员以标准样品开始，按照下列顺序进行考察：

- 惰性基质（例如，硅藻土、Celite 或滤纸）中的分析物；这使得测定分析物在 SF 中的溶解度成为可能
- 空白基质（某些空白基质已作为标准物质商品化）中的考核样品；或者制备典型的“纯净”基质（尽可能接近实际样品的基质）
- 真实基质中的考核样品；开发 SFE 方法时，通常需要将新建方法的前处理结果与“成熟”方法（如索氏提取法或液液萃取法）的结果进行比较

图 14.5 SFE 方法开发流程图



读者如需了解 SFE 方法开发的详细信息，请参阅参考文献 14、15 和 17。

微波辅助溶剂萃取 (MAE)

与利用热传导对萃取容器进行加热的传统方法不同，采用微波可直接加热样品和萃取溶剂。采用热溶剂进行萃取，本身就具有效率优势。MAE 有两种极限形式：(a) 微波吸收（高介电常数）萃取溶剂，或者 (b) 非微波吸收（低介电常数）溶剂。在微波吸收溶剂方法中，样品和溶剂被置于一个封闭的非微波吸收容器中。微波辐射将溶剂加热到其沸点以上，从而使热溶剂在中等压力下[通常为数百 psi，当然也有可承受更高的温度（高达 300 °C）和压力（高达 1500 psi）的专用容器]快速萃取分析物。在这种高压下进行萃取时所使用的容器由 PTFE、石英或先进的复合材料制成，它们结合了最佳的化学耐受性和温度耐受性，并且具有良好的力学性能。该方法已被用于萃取聚合物中的添加剂、食品中的维生素，以及土壤和底泥中的重点污染物（PAH、农药、PCB）¹⁸⁻²⁰。

在非微波吸收溶剂萃取方法中²¹，样品和溶剂被置于开放或密闭的容器中。由于溶剂几乎不吸收微波辐射，所以其温度不会升高。通常情况下，含水或其他高介电常数组分的样品则会吸收微波辐射，从而加热样品中的分析物，并将其释放到周围经筛选对分析物具有良好溶解性的液体中。后一种方法较为“温和”，因为该方法在大气压或低压条件下进行，还可用于热不稳定分析物。非微波吸收溶剂萃取法的应用实例包括从²²鱼类中萃取脂质，以及从底泥样品中萃取有机氯农药¹⁸。在一种改良型的非微波吸收溶剂萃取方法中，一根可吸收微波的惰性固体棒与样品（已被处理为微小颗粒）以及萃取溶剂一起被置于萃取容器中。微波吸收棒快速升温，将热能传递给溶剂，然后，与其他液固萃取方法一样，溶剂将分析物从样品中萃取出来。微波炉还可用于酸消解，尤其适用于从土壤和其他复杂基质中萃取的痕量金属物质，以及氨基酸分析前的蛋白质水解。

MAE 比传统索氏提取法或液液萃取法使用的溶剂更少。我们可通过多个变量控制萃取过程：例如萃取溶剂的种类、加热时间、采用脉冲式加热或连续式渐热、搅拌或不搅拌、使用密闭容器或开放式容器（压力），以及进行容器的外部冷却或不冷却等。仅用一个普通的微波炉就能够同时萃取多达 40 个样品，该方法实现了样品的高通量检测。而且，使用 MAE 方法进行萃取时用户不会与萃取溶剂（通常有毒）接触。而针对该方法中微波辐射和加压容器的造成的安全隐患，我们需要制定相应的预防措施。您可以通过文献综述²³⁻²⁴和专业书籍获取更多信息^{17, 26-27}。

加压流体萃取/加速溶剂萃取

萃取容器也可以在常规柱温箱中加热，不需要使用微波辐射。加压流体萃取 (PFE)，也称为增强溶剂萃取、加压液体萃取，或者加速溶剂萃取 (ASE，赛默飞世尔科技公司，美国加利福尼亚州森尼韦尔)，是在一个封闭的萃取容器中，使用普通的有机溶剂在高温 (50-200 °C) 和高压 (150-2000 psi) 下从固体样品中萃取可溶性分析物²⁸⁻²⁹。高温可提高分析物回收率，并加快萃取速度，而且由于加热的溶剂具有更高的溶质容量，溶剂用量减少。PFE 的实验装置与 SFE 装置类似：一个用于输送溶剂进出萃取容器的泵、具备自动密封功能、可耐受高压的萃取容器、一个用于加热样品室的柱温箱，以及用于盛装所采集萃取物的收集样品瓶。PFE 包括以下步骤：1) 样品室上样 (典型上样量为 5-20 g)；2) 溶剂引入和加压；3) 样品室加热 (在恒定压力下)；4) 静态萃取；5) 将萃取物转移到密封瓶中，然后用新鲜的溶剂清洗固体样品；6) 氮气吹扫样品室；以及 7) 进行下一个样品的上样。样品上样到萃取室之后的整个过程通常都是自动化且可编程控时的。现在已经有了能够无人值守地连续制备多达 24 个样品的仪器，以及一次可萃取单个或多个样品的仪器。

PFE 在环境领域的典型应用包括 EPA 方法 3545A，即从固体废弃物样品中萃取 BNA (碱性、中性和酸性物质)、多环芳烃 (PAH)、有机磷和有机氯农药，以及多氯联苯 (PCB)。其他的应用还包括从食品中萃取游离脂肪和从动物组织中提取 PCB。

固体萃取方法的比较

表 14.2 比较了固体样品萃取的常用方法。除了在开放容器中进行的微波辅助萃取和使用超临界 CO₂ 的 SFE 之外，这些技术所使用的萃取溶剂均相同。这些方法的开发时间、回收率和重现性大致相当。它们之间的主要区别在于萃取速度、有机溶剂的使用、自动化程度以及成本。SFE 方法开发所需的时间较长，这是因为可能存在基质效应以及我们对分析物萃取过程中所用共溶剂的效果了解得还不够透彻。但是，优化后的 SFE 方法仍能提供与那些更传统的萃取技术相当的回收率和重现性。与 MAE 相比，加压流体萃取、现代索氏提取和 SFE 的自动化程度更高。MAE、超声方法、PFE，以及一些 SFE 仪器可同时萃取多个样品。PFE 和 MAE 均不能浓缩萃取的分析物，因为这两种方法萃取结束时的样品体积与原始萃取溶剂的体积相同。SFE 配合带溶剂洗脱功能的固体捕集阱使用时，可实现一定程度的浓缩。在 PFE 中，我们有时需要将萃取室中的提取物与另一种溶剂一起泵出，因此与 MAE 相比，萃取溶剂的总体积更大，样品的稀释程度更高。但无论如何，与过去的萃取方法相比，所有这些新方法均可节省时间、劳动力和溶剂。

表 14.2

固体样品前处理萃取方法的比较

参数	超声处理	索氏提取 (传统)	索氏提取 (现代)	SFE	PSE/ASE	微波 (CV)	微波 (OV)
样品量, g (典型)	20-50	10-20	10-20	5-10	1-30	2-30	2-10
溶剂体积, mL	100-300	200-500	50-100	10-20****	10-45	20-30	20-30
温度, °C	环境温度-40	40-100	40-100	50-150	50-200	50-200	40-100
压力	大气压	大气压	大气压	2000-4000 psi	1500-2000 psi	1500-2000 psi	大气压
时间, 小时	0.5-1.0	12-24	1-4	0.5-1.0	0.2-0.3	0.1-0.2	0.1-0.2
自动化程度*	0	0	++	+++	+++	++	++
样品数量**	1 (连续) 高 (批量)	1 (连续 或批量)	6 (批量)	44 (连续)	24 (连续) 6 (批)	24 (批量)	6 (连续)
仪器成本***	低	极低	中等	高	高	中等	中等

CV = 密闭容器

OV = 敞口容器

* 对于最完备的市售仪器而言, 0 = 无自动化, +++ = 全自动化

** 市售仪器能够处理的最大数量

*** 极低 < \$1000; 低 < \$10000; 中等 \$10000-20000; 高 > \$20000

**** 当使用有机改性剂改变“极性”时

参考文献

1. Mangani, F.; Cappiello, A.; Crescentini, G.; Bruner, F.; Bonfanti, L. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2066-2069
2. Randall, E.L. *J.A.O.A.C.* **1974**, *57* (5), 1165-1198
3. Luque-García, J.L.; de Castro, L.J. *Chromatogr. A* **2003**, *998* (1-2), 21-29
4. Luque-García, J.L.; Ramos, M.J.; Martínez-Bueno, M. J.; Luque de Castro, M.D. *Chromatographia* **2005**, *62* (1-2), 69-74
5. Luque-García, J.L.; Luque de Castro, M.D. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (24), 5903-5908
6. Soto-Cordoba, S.M.; Baeza, J.; Freer, J. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2001**, *46* (2), 179-185
7. Levy, J.M. *LCGC* **1999**, *17* (6S), S14-S21
8. Smith, R.M. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000* (1-2), 3-27
9. Taylor, L.T. *Techniques in Analytical Chemistry: Supercritical Fluid Extraction*, Wiley, NY, **1996**
10. Luque De Castro, M.D.; Valcarcel, M.; Tena, M.T. *Analytical Supercritical Fluid Extraction*, Springer, New York, NY, **1994**
11. Ramsey, E.D. (Ed.). *Analytical Supercritical Fluid Extraction Techniques*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **1998**
12. Caudell, T. *Practical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1999**
13. Verschucere, M.; Sandra, P.; David, F. *J. Chromatogr. Sci.* **1992**, *30*, 388-391
14. Gere, D.R.; Derrico, E.M. *LC/GC Mag.* **1994**, *12*, 432-445
15. Gere, D.R.; Derrico, E.M. *LC/GC Mag.* **1994**, *12*, 352-366
16. Majors, R.E. *Sample Preparation Wall Chart, LCGC No. America* **2012**
17. McHugh, M.; Krukoni, V. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, Butterworths, Boston, MA, **1987**
18. Onuska, F. I.; Terry, K.A. *Chromatographia* **1993**, *36*, 191-194
19. LeBlanc, G. *Current Trends and Developments in Sample Preparation: Microwave-Accelerated Techniques for Solid Sample Extraction LCGC* **1999**, *17* (6S), S30-S37
20. LeBlanc, G. *LCGC No. America* **2013**, *31* (11S)
21. Pare, J.R.J.; Belanger, J.M.R.; Stafford, S. *Trends in Anal. Chem.* **1994**, *13* (4), 176-184
22. Mandal, V.; Mohan, Y.; Hemalatha, S. *Pharmacognosy Reviews Jan-May* **2007**, *1* (1), <http://www.phcogrev.com>
23. Sparr Eskiksson, C.; Bjorklund, E. *J. Chromatogr. A* **2000**, *902* (1-2), 227-250
24. Tatke, P.; Jaiswal, Y. *Res. J. Med. Plant* **2011**, *5* (1), 21-31
25. Chemat, F.; Cravotto, G. (Eds.) *Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Springer, New York, **2013**, ISBN-10: 1461448298 and ISBN-13: 978-1461448297
26. Sin, K. *Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds*, LAP LAMBERT Academic Publishing, Germany, **2012**, ISBN-10: 3847331752 and ISBN-13: 978-3847331759
27. Dean, J.R. *Chapter 8, Microwave-Assisted Extraction in Extraction Methods for Environmental Analysis*, Wiley, New York, **1998**, ISBN-10: 0471982873 and ISBN-13: 978-0471982876
28. Richter, B.E.; Ezzell, J.L.; Felix, D.; Roberts, K.A.; Later, D.W. *Amer. Lab.* **1995**, *27* (4), 24-28
29. Ezzell, J.L.; Richter, B.E.; Felix, W. D.; Black, S.R.; Meikle, J.E. *LC/GC Mag.* **1995**, *13* (5), 390-398

生物样品的样品前处理

在生物分子的分离中，样品前处理通常都会涉及一种或多种预处理技术。没有一种样品前处理技术能够同时适用所有的生物样品。现代生物色谱法的样品前处理也常常使用经典的生物化学技术，例如透析、化学沉淀、柱色谱和离心。现在，在分子生物学、生物技术和各种组学（例如蛋白质组学、基因组学、代谢组学等）领域，人们不仅关注经典方法的应用，对新型样品前处理技术也越来越感兴趣。这些领域所涉及的样品通常都非常复杂，而且样品量较少，需要极其小心地进行处理。要保证生物大分子的回收率以及在回收时保持其结构和功能完整性，我们通常需要采用快速且温和的样品前处理方法。

由于大部分生物样品都需要使用 HPLC、毛细管或凝胶电泳进行分离，但这类样品的复杂性使分析人员必须提前进行样品预处理，才能获得更好的分离结果；在使用 HPLC 时，可延长色谱柱寿命。推荐用于实际样品前处理的技术取决于下面几种因素：

- 样品和干扰物的分子量
- 样品体积和分析物浓度
- 缓冲盐的存在（阴离子和阳离子）
- 金属的浓度和类型
- 表面活性剂的加入
- 颗粒物质的存在
- 抗体、质粒、内毒素等的存在
- 放射性标记的化合物的存在
- 样品前处理后选择的分析类型（例如色谱、电泳、质谱）
- 有机物的存在

除了用于过滤去除颗粒以外，色谱（包括亲和色谱）还可用于纯化许多生物样品。**表 15.1** 列出了许多可在流通模式中以小柱、过滤盘或柱子形式使用的样品前处理技术。一些技术可以进行批量处理，在该模式中，可将介质倒入样品（溶液形式）中，并进行搅拌以保持样品与介质的接触，然后过滤或倾倒入液相以去除介质，使目标化合物吸附在固定相上或保留在液相中。虽然批量吸附比过柱方法慢，但操作起来更容易。

表 15.1

典型的生物色谱样品前处理技术					
目的	最常用的方法	保留物质的种类	典型应用*	填充基质-官能团	其他方法
抗体纯化	亲和色谱 羟基磷灰石色谱	IgG 及其亚类	血清、腹水和组织培养物中 IgG 的浓缩；带未反应荧光标签的荧光标记抗体	亲和凝胶（基于琼脂糖、硅胶）和羟磷灰石（磷酸钙）	
缓冲液和试剂的超提纯	离子交换	微量阳离子和阴离子	去除电泳和 HPLC 检测中会导致谱带展宽或高背景背景的离子	阳离子和阴离子交换剂（弱和强），螯合树脂	
	吸附	微量有机物	中性 PS-DVB、氧化铝和二氧化硅可去除缓冲液中的极性有机物；可从有机溶剂中去除水	中性 PS-DVB、氧化铝、硅胶	
	混合柱床离子交换	离子	在 HPLC 分析之前使糖类去离子化；蛋白质中离子污染物的分离；试剂的制备	具有季铵官能团和磺酸官能团的 PS-DVB	透析
脱盐和缓冲液交换	离子交换		糖类、葡聚糖和多元醇中阴离子的分离	具有季铵官能团的 PS-DVB	
		蛋白质	使含疏水性分子的蛋白质去离子化	带透析管的混合树脂	
	凝胶过滤/体积排阻	大分子在盐类和小分子之前洗脱	分子量 >6000 Da 的蛋白质和核酸的脱盐	水相溶性体积排阻凝胶	透析、超滤
	离子阻滞	阳离子、阴离子	蛋白质和氨基酸样品中盐类和离子型表面活性剂的去除	具有季铵官能团和磺酸官能团的 PS-DVB-丙烯酸酯	
反相	疏水性分析物	多肽溶液的脱盐	C4 或 C8 键合硅胶		

(接转下页)

典型的生物色谱样品前处理技术

目的	最常用的方法	保留物质的种类	典型应用*	填充基质-官能团	其他方法
去除表面活性剂	离子交换	阳离子和阴离子表面活性剂	从蛋白质、酶再活化反应物中去除表面活性剂	分别基于 PS-DVB- 和聚丙烯酸酯的强阳离子交换剂和强阴离子交换剂	溶剂萃取、离子对萃取
	吸附	非离子型表面活性剂	从蛋白质溶液中去除了 Triton X-100	允许非离子型表面活性剂通过的硅胶、羟磷灰石、反相、PS-DVB 或混合离子交换树脂	透析
	离子阻滞	阴离子表面活性剂	去除样品中多余的 SDS	具有季铵官能团和磺酸官能团的 PS-DVB-丙烯酸酯	溶剂萃取；离子对萃取（使用三正丁胺或三乙胺）
金属浓缩或去除	离子交换	阳离子	水性介质中金属和盐的去除	基于 PS-DVB 或硅胶的阳离子交换剂	离子交换膜
	螯合树脂	多价阳离子	铜、铁、重金属、钙和镁的去除	螯合树脂	
	吸附	金属-有机物络合物	与极性或疏水性络合剂络合的金属	硅胶，反相	
去除颗粒物	过滤	颗粒物	保护 HPLC 滤芯和阀的前处理；培养基的过滤	疏水性和亲水性膜（有机-无机）	离心
质粒纯化，探针清洗	凝胶过滤/体积排阻	低分子量污染物	在标记反应混合物时去除未结合的放射性核苷酸	琼脂糖、葡聚糖以及其他水溶性聚合物介质	
	吸附	高分子量 DNA	RNA、蛋白质和其他细胞化合物的去除	琼脂糖、葡聚糖以及其他水溶性聚合物介质	
	离子交换	溴化乙锭或碘化丙啶	通过质粒可视化实验进行去除	具有磺酸官能团的 PS-DVB	

(接转下页)

典型的生物色谱样品前处理技术

目的	最常用的方法	保留物质的种类	典型应用*	填充基质-官能团	其他方法
蛋白质浓缩	离子交换	水	提高电泳和 HPLC 分析的灵敏度	带透析管的聚丙烯酰胺树脂	冻干法
		蛋白质	蛋白质和低分子量物质的分离	羟磷灰石	超滤, 化学沉淀
	吸附	疏水性蛋白质	通过 C18 固相萃取去除亲水性蛋白质中的疏水性蛋白质	C18-改性硅胶	透析
去除或浓缩阴离子和阳离子	离子交换	阳离子、阴离子	水溶液中离子的去除; 大分子蛋白质的浓缩; 矿物质的去除	具有磺酸官能团的 PS-DVB (阳离子); 具有季铵官能团的 PS-DVB (阴离子); 弱碱性树脂 (叔铵) (阴离子)	离子交换膜
有机物的去除或浓缩	吸附	极性有机物	非离子型表面活性剂和脂质的去除; 核酸制备中溴化乙锭的分离	具有键合固定相的氧化铝、硅胶和 SPE 小柱	
	凝胶过滤 (有机) / 体积排阻/GPC	高分子量化合物在小分子之前洗脱	从复杂样品基质中分离分子量 < 150000 Da 的水溶性有机化合物	各种孔径的 PS-DVB	

流通模式的使用更加广泛。虽然可能使样品得到稀释，但流通柱方法更适用于去除最后的痕量目标分析物或杂质。许多生产商都可提供便利的预填充小柱和膜过滤盘，后者具有较大的横截面积，因此可提供较小的流动阻力。有时，试剂盒由多种物品组成，包括所有介质、化学品和附件，这些物品是纯化操作，尤其是获得纯 DNA、RNA 和 mRNA 样品所必需的。液体可在施压、真空或离心的情况下通过流通装置。**表 15.1** 中的许多样品前处理技术基于离子交换或离子阻滞原理对离子物质进行阻滞。其他方法则是利用疏水相互作用和吸附原理保留大分子，而让离子型和更小的分子通过。

除了**表 15.1** 中所列的色谱原理外，还可使用其他方法纯化生物样品并保留样品的生物活性。例如，透析就是一项成熟的方法，可使用膜对生物样品进行纯化和脱盐。在透析的经典应用（请参见第 18 章）中，相较于其他样品前处理技术，透析被认为是一项缓慢的技术。更新颖的方法如使用一次性微透析试剂盒可以对小量的样品体积进行高效透析。在这类装置中，可将透析膜轻松结合在试管盖上，再将试管盖拧在锥形试管上，锥形试管的底部可最大程度提高样品回收率。

使用电渗析是更快速的脱盐或缓冲液置换方法。电渗析的原理是在带固定正电荷或负电荷的离子交换膜的整个支架上施加电压。溶液中的阳离子和阴离子向高浓度区迁移，并远离稀释区。电渗析是一项温和的技术，可提供出色的脱盐效果，并且不会影响蛋白质的生物活性。此外，受施加电流大小的影响，电渗析过程中水的迁移可引起轻微的样品浓缩。

超滤 (UF) (请参见第 18 章) 是使用离心作为驱动力的膜过滤技术。将分子量截留为数万道尔顿的膜过滤器置于离心机上。通过离心，溶剂、盐和小分子通过膜，而分子量大于截留值的大分子则被保留和富集在膜上。由于所选膜具有较低的非特异性吸附能力，超滤可以获得良好的回收率，并且几乎不影响生物活性。要使一个样品完全脱盐，需要进行两次或更多次循环。

本文中已描述的许多样品前处理技术，如液液萃取（第 7 章）和膜萃取（第 18 章），可直接用于生物样品的分离。

有时，将两种样品前处理方法结合使用可提高纯化效率。例如，将色谱与透析结合使用可提供出色的蛋白质溶液浓缩。不溶性的聚丙烯酰胺微球对水和低分子量物质具有高亲和性（1 g 树脂可吸附 5 mL 水），可用作富集树脂。将含有蛋白质稀溶液的透析管或透析袋置于装有树脂的烧杯中，树脂形成了高渗透梯度，可将水从样品中吸出并通过透析膜，使蛋白质得到浓缩。水的扩散速率为每管 1 - 2 mL/h/cm²。由于树脂微球本身不会通过透析膜扩散，因此其不会与蛋白质发生相互作用。

核酸组分和基因组学的样品前处理

现代药物研发过程强调快速的数据生成和分析，以便在开发周期的早期阶段发现有前景的新型化学物质。遗传学、基因组学、生物化学和药学领域的高速发展加速了药物研发的改革。这些进展包括人类基因组测序、实验室自动化的提升以及组合化学、高通量筛选、质谱和生物信息学领域的高速发展。所有这些发展使化合物合成更为快速，并能对大量化合物的药理活性和代谢活性作出更有效的评价。现代高通量方法的最终目标是在更短的时间内将药物推向市场，该方法已为许多科学和医疗团体提供了巨大帮助。

从一般意义上来说，“样品前处理”是指在分析之前进行的分析物浓缩、溶剂置换，和/或干扰物去除。但在高通量实验室中，自动化过程还有更多的支持功能，例如输送溶剂、溶解样品、吸取和分配样品、从试管到微孔板的样品重组、板复制、均质、处理微孔板、施加真空、清洗微孔板、封盖/启盖、密封、酶解，以及向检测器输送样品。

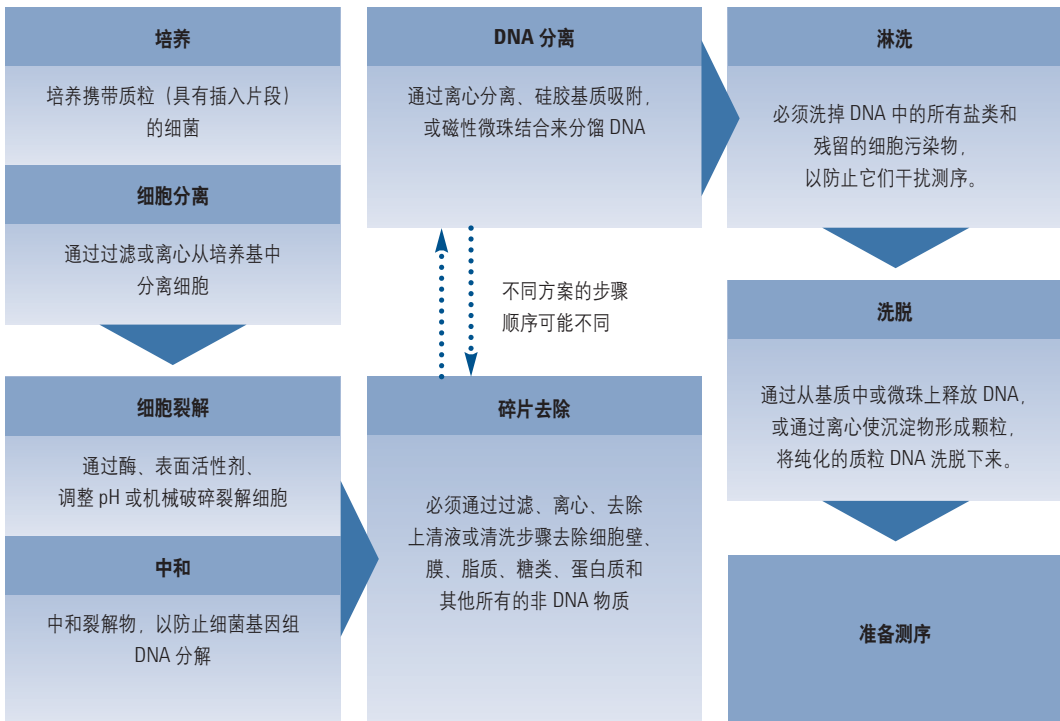
基因组学研究的一个目的是通过鉴定 DNA 序列以及后续的基因、所得的 RNA 分子和/或蛋白质的分析，为药物开发提供新的生物学靶标。首先，这项工作需要从样品中分离高质量 DNA 并进行处理。基本上，任何有机体中的任何细胞类型或病毒都可以作为核酸的来源，但分离 DNA 的过程却因来源细胞的物理性质而各不相同。一旦分离后，DNA 必须制成含各个片段的‘数据库’，全部片段代表了该样品基因组中的每个核苷酸。数据库常常通过将样品基因组 DNA 片段插入到细菌或酵母的较大段 DNA（易于实验室处理）中制成。然后将处理后 DNA 携带样品插入片段置于可控系统中生长以增加产量。为成功进行基因组测序，对 DNA 结构的后续分离和纯化非常重要，并且可能非常耗时。96 孔 DNA 测序仪的高通量性能使分析人员需要快速的样品前处理方法，以使前处理速度能跟上测序速度。我们将简单了解基因组核酸常用的样品前处理方法（传统方法和高通量方法）。

传统的核酸提取技术

多种技术都可分离和纯化核酸，而它们都必须能够实现某些特定的目标。我们一般从细胞裂解物中提取 DNA，先将它们与蛋白质、脂质和碳水化合物等非核酸的细胞组分分离，最后通过一系列的沉淀和离心步骤分离留下的 DNA（图 15.1）。大多数方案还包括使用 RNA 酶的酶解步骤以降解 RNA。

图 15.1

携带质粒（具有插入片段）的细菌细胞 DNA 纯化的典型样品前处理步骤



细胞裂解物的苯酚提取法是最古老的 DNA 提取技术之一。用表面活性剂裂解悬浮的单细胞，然后使用蛋白酶裂解蛋白质分子。然后用有机溶剂（苯酚/氯仿）提取非核酸组分，将核酸留在水层中。分离水相，然后向其中加入异丙醇，使高分子量的核酸沉淀。沉淀后，通过螺旋化或离心从异丙醇中分离出 DNA，然后用乙醇清洗两次。大多数有机溶剂提取流程都包括使用不含 DNA 酶的核糖核酸酶（RNA 酶）进行的孵育步骤，该步骤的作用是去除 RNA，通常在有机溶剂提取之前或之后。在某些应用中，我们可能需要进行第二次有机溶剂提取，以达到所需的 DNA 纯度。有机溶剂提取法并不是分离质粒的最佳选择，它更适用于分离全基因组 DNA。

使用一种称为“迷你制备”的技术将含有样品插入序列的少量（每 mL 培养液中约 1 μ g）细菌质粒 DNA 从细胞培养液中分离出来。单个少量制备方法可为现代毛细管和凝胶测序仪提供足够的 DNA，该方法比使用氯化铯密度梯度分离毫克级质粒 DNA 的标准“大型制备”减少了更多劳力。用于少量制备质粒分离的两种常用的细胞裂解方法是碱水解法和快速煮沸法。然后使用对质粒 DNA 具有高结合效率和大容量的磁性颗粒，将质粒 DNA 与细胞裂解液或其他反应物（例如未掺入的核苷酸或连接器）分离。这些磁性颗粒系统首先捕获测序延伸产物，然后进行一系列的连续冲洗，最后进行释放步骤。接下来，分离得到的质粒 DNA 可用于自动化 DNA 测序和其他分子生物学方法，例如 PCR 扩增。

体积排阻色谱（第 11 章）是常用的另一种高效和快速核酸纯化的技术。该技术可提供不同孔径的凝胶，用以排阻分子量范围为 10000 - 200000 Da 的分子。将核酸从核苷酸或缓冲液中纯化的工作可通过 25000 Da 的排阻尺寸出色完成，因为蛋白质的平均尺寸为 30000 Da。低成本的一次性可离心凝胶过滤柱是体积小（< 100 μ L）核酸溶液纯化的理想之选，也是从标记反应混合物中分离未结合的放射性核苷酸的首选方法。预包装柱消除了手动制备柱所需的繁琐而费时的步骤，确保以最少的劳力获得更高的 DNA 回收率和对未结合核苷酸的更高的保留能力。

虽然已证实这些技术可成功用于分离 DNA 以进行特定基因、操纵子或质粒的测序，但全基因组测序时代的到来使单个样品前处理技术有些过时。即使是具有 250 万个碱基的中等大小的细菌基因组，也需要进行超过 20,000 次的单个样品前处理，使用随机数据库获得 8 倍的覆盖率。而且，测序仪器本身以 96 孔的模式运行，这就迫使分析人员使用更快速的质粒制备方法，以维持测序仪连续不断地运行。因此，质粒纯化过程需通过自动化加快速度。

高通量 DNA 纯化系统

能快速而有效地纯化 DNA 的吸附剂是使这一方法实现自动化的关键。不过，虽然各生产商各自方法性质不同，但基本方法是一致的：当使用前述技术进行细胞裂解后，或将 DNA 吸附到流通型 96 孔板中所含的化学改性硅胶基质上（请参见图 9.4），或使用磁珠或瞬间顺磁性技术将 DNA 磁性分离。RNA、蛋白质和其他细胞组分先被滤出，或在后续步骤中被洗出。然后将纯化 DNA 的多个样品以纯化形式同时洗脱，以便进行批量测序。吸附剂可以是由多个生产商提供的预包装的 96 微孔板试剂盒和离心管。例如，安捷伦科技公司提供多种纯基因组 DNA 试剂盒和无内毒素质粒 DNA 转染试剂盒。还提供多种 RNA 提取试剂盒，例如不含 DNA 的总 RNA 提取试剂盒、高纯度 mRNA 提取试剂盒以及 miRNA 提取试剂盒。硅胶基质和磁性微板试剂盒可提供比传统的苯酚或凝胶电泳方法更方便的操作和更高的通量。这些试剂盒可同时进行多个纯化步骤，改善单个的微量样品制备方法。

自动化高通量系统

自动化液体处理工作站包括在放置着实验室器具的台面上以笛卡尔坐标 (X、Y、Z) 可移动多个探针，这些器具包括多孔板、试管架、溶剂瓶、清洗瓶、一次性移液枪头等。已证实这些仪器非常方便将溶剂从试剂瓶移取和分配到目标瓶，并且通过改进（例如对使用 96 孔板的真空歧管、加热块和振荡器的控制）彻底革新了核酸的纯化过程。多探针液体处理器可调节移液头间距，扩大移液头之间的宽度，以便从多种尺寸的试管中吸取液体，当需要将液体分配到间距为 9.0 mm 的微孔板孔内时，可缩短移液头之间的间距。根据在台面上移动微孔板的需要，可扩展工作站模块的排列，使集成化钳爪的功能和效用更明显。实验室器具在台面和外部设备（如微孔板栈、荧光读取器）间的移动均按标准化操作进行。

作为现代自动化工作站配置的一个实例，Agilent BenchCel 工作站可使用 Dellaporta 核酸提取方法快速分离和纯化 DNA，为多种基因组样品的前处理提供全面的自动化方法。Bravo 液体处理平台是该工作站的核心，可执行以下操作：加入试剂（使用 Tris-HCl、EDTA、NaCl 和 2-巯基乙醇）进行裂解，然后加入异丙醇进行沉淀，并去除污染物（使用苯酚、氯仿和异戊醇）。然后使用异丙醇生成 DNA 沉淀，随后使用核糖核酸酶处理，再次去除污染物，最后再用异丙醇沉淀。

虽然对于高通量基因组实验室来说，上述自动化系统既实用又经济，但它们无法满足每天要处理 5000 个以上样品的超高通量实验室，此类实验室需要的是超越这些工作站解决方案的高度定制化配置。磁珠的使用免除了缓冲液更换，从而加速了纯化过程。

蛋白质和蛋白质组学的样品前处理

在发展迅速的药物发现方法领域，人们的重要关注点在于深入了解生物体内的基本生物过程，尤其是基因组与其蛋白质组之间的相互作用“蛋白质组”是指由某基因组表达的全部蛋白质。我们已经解析了人类以及许多其他生物体的基因组序列。活生物体每个细胞中的基因、RNA 分子和蛋白质之间的相互作用都极为错综复杂。与人类基因组计划中的静态基因组不同，细胞或组织的蛋白质组是高度动态的，并且会随周围环境、生理状态、压力、药物摄入、健康状况或疾病而不断发生变化。人类蛋白质组计划面临的挑战是不仅要解析出基因组表达的所有蛋白质，还要弄清楚在各种环境条件下（正常状态、压力状态和疾病状态）这些蛋白质在人体各组织中的水平。科学家们估计，人类基因组中有 20000-30000 个基因，而蛋白质的种类可能多达 50000-500000 种。可能存在更多种类蛋白质的原因在于蛋白质可能会发生翻译后修饰（例如磷酸化、乙酰化、硫酸化和糖基化），这些修饰会导致各种不同的蛋白质反应。但是，仅仅简单地根据蛋白质编制目录是远远不够的，因为这并不能确定蛋白质之间的相互作用，以及/或者不同类型细胞的结构-功能关系。

蛋白质组学比基因组学面临更多的技术挑战。DNA 可使用聚合酶链反应 (PCR) 技术，但没有类似方法可用于扩增蛋白质。因此，有许多分析问题亟待解决，例如样品前处理、分离复杂生物基质中皮摩尔至飞摩尔级蛋白质，以及分离超低含量的具有生物活性的蛋白质。虽然质谱仪的高灵敏度实现了对超低含量蛋白质的检测，但样品前处理对去除高丰度蛋白（例如 IgG、人血清白蛋白）仍然非常重要。蛋白质组学所需的其他工具包括用于蛋白质分离的凝胶和/或多维液相色谱（带质谱检测器），以及蛋白质数据库和生物信息学的应用。蛋白质组学的产业化需要将各种市售系统和技术（包括液体输送、消耗品、酶解、机器人、检测和数据分析）配合使用，这可以通过一个常用的软件平台实现，使这些过程自动化。

如今，蛋白质组学的全部过程一般包括手动和不连贯的步骤，用以进行样品前处理、蛋白质分离和表征。分析人员需要开发和实施更好的策略来进行高通量的蛋白质的表达和功能分析，以便通过成功使用蛋白质组学研究所获得的信息，尽快实现医学领域的巨大进步。本文提供了目前有关蛋白质样品前处理的方法、蛋白质分离、鉴定和分析的后续步骤以及使用和/或需要自动化方法作为整个方法一部分等方面的信息。我们首先介绍经典的蛋白质样品前处理方法，然后介绍蛋白质组学中的样品前处理。

传统的蛋白质样品前处理技术

进行样品前处理的目的是在分析之前从生物细胞或生物体中分离出目标蛋白质，该步骤对于获得准确、可重现且有价值的分析结果非常重要。从这些样品来源中分离所得的蛋白质含有各种污染物，例如天然存在的角蛋白、白蛋白、血清蛋白、核酸、脂质、碳水化合物和多糖。此外，为了保持酶活性或生物活性，可能还需要添加各种无机盐、缓冲液、还原剂、表面活性剂、去污剂和防腐剂。这些外源性物质可能会给电泳分离带来问题，例如弥散、掩蔽和重现性差等。采用液相色谱技术并在随后应用其他检测和/或质谱定量分析时，这些物质也会对分析性能造成影响。

不存在可分离混合物中所有蛋白质的通用的样品前处理步骤，因为蛋白质以多种形式存在，并位于细胞的不同位置（如细胞膜或细胞质），而且还具有不同的溶解度。常用的蛋白质样品前处理方法简单总结于**表 15.1** 中，包括脱盐、富集、离心、透析、过滤和超滤、沉淀和冷冻干燥。可根据蛋白质的不同特性（例如等电点、分子量、形状、溶解度和疏水性）进行纯化流程设计。因为蛋白质是易损物质，所以样品前处理过程中必须谨慎操作，以避免引入可能改变蛋白构象和生物活性的负面修饰。

为开发纯化策略，可将几种样品前处理方式结合使用（**图 15.2**）。通常，细胞裂解过程初始使用超声、酶处理或机械方法来释放蛋白质。最近有一种技术称为压力循环技术 (PCT)，可通过快速将容器内的压力在大气压至最高 45000 psi 之间进行反复升降来破坏分子间相互作用。该方法为组织和细胞裂解提供了更好的方法，并且有助于疏水性分子（包括内在膜蛋白）的定量回收。

随后,使用溶解度方案获得有代表性的蛋白质样品。核酸通常可使用沉淀技术或使用超声将其破坏成更小的片段去除。脂类可使用过量表面活性剂或沉淀法去除。每种类型的细胞或组织都需要专门的方法。现已有分离小鼠、人体组织、体液和微生物蛋白质的方案集¹。首先将样品纯化成可溶性粗品,然后使用称作预分离的方法在分离和分析前对特定蛋白质组分进行富集和纯化。这项技术使用了多种色谱和电泳方法²。

样品前处理过程中的一个重要内容就是去除高丰度的外源性蛋白,例如白蛋白、IgG。白蛋白是血浆中主要的酸性蛋白成分,去除白蛋白以及人体和其他哺乳动物血浆中的IgG和其他主要蛋白可提高分析技术的灵敏度,并改善亲和纯化介质的效率和结合容量。去除高丰度蛋白的经典技术,通常只能去除其中的一个或几个蛋白(请参见表15.2)。新型亲和类产品可去除6到20种高至中丰度蛋白,将数千种低丰度蛋白留在溶液中,进行进一步预处理³。这类固定相中含有针对高丰度蛋白的特异性抗体。有离心管和流通柱两种形式可供选择。图15.3展示了安捷伦科技公司流通柱的操作模式。使用该方法可去除多达14种高丰度蛋白。将血浆样品注入多重亲和去除系统。如图15.4所示,高丰度蛋白保留在柱上,而低丰度蛋白则通过柱。可将低丰度蛋白捕集/收集到离心柱上,再用痕量富集技术进行浓缩。然后,更换缓冲液释放高丰度蛋白,可直接丢弃或保存(如果需要)。最后,对柱进行再生,该柱可重复使用数百次。将亲和去除和多维LC-MS/MS配合使用可研究生物体液中痕量的上调和下调蛋白。

我们提供多种试剂盒,可用于去除DNA、盐和缓冲液,以及分离和溶解特定类型蛋白质(例如膜蛋白、酸性和碱性蛋白以及核蛋白)。在去除血清中高丰度蛋白时,必须小心不要去去除低丰度蛋白,新型选择性去除试剂盒可帮助您实现这一目标。蛋白质纯化后,一些常用的分离方法有一维和二维电泳(2DE)、液相色谱(LC)、体积排阻色谱、凝胶过滤以及亲和色谱。

本文中还提供了去除蛋白质的其他经典实验室方法⁴⁻⁷。与只研究单一组分的蛋白质化学相比,蛋白质组学的研究重点在于多个不同蛋白之间的相互作用,以及它们在更大的生物系统中的作用。

图 15.2

传统的蛋白质样品前处理方法

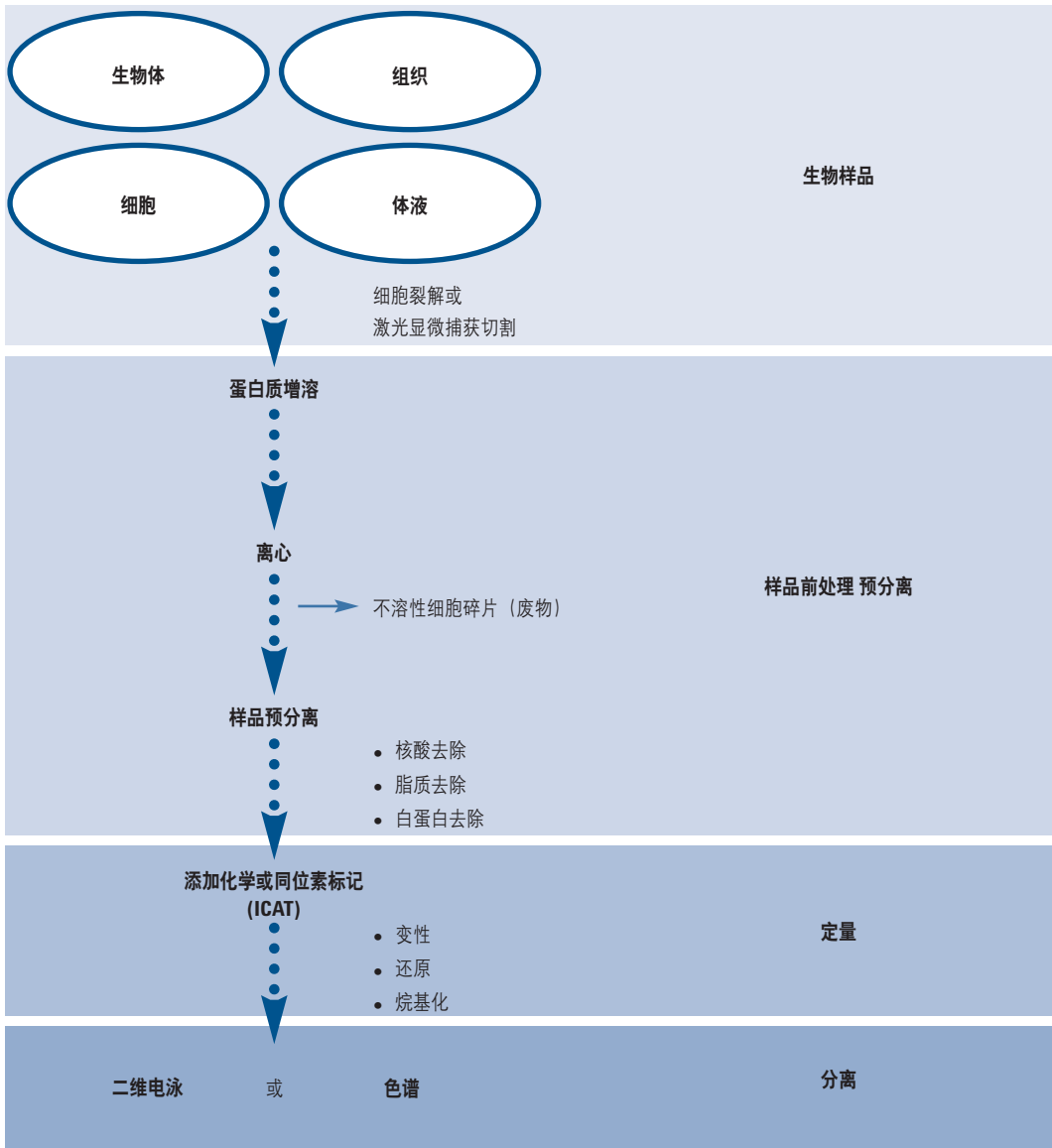


表 15.2

去除生物体液中高丰度蛋白质的经典方法				
技术	系统类型	目标去除物	原理	参考文献
亲和色谱	汽巴蓝或相关的氯三嗪类染料与色谱介质结合；某些固定相已获专利	白蛋白	白蛋白与汽巴蓝染料强烈结合，该染料具有离子型、疏水性、芳香族或空间活性结合位点。可与凝胶相互作用的蛋白质能实现高度特异性的结合及释放，从而控制洗脱缓冲液的组分。结合容量：10-15 mg/mL	15-19, 47-51
单抗体色谱柱	a) Anti-HSA 抗体附着至多孔聚合物 b) Anti-IgG 抗体附着至多孔聚合物	a) 白蛋白 b) IgG	a) HSA 的特异性抗体 b) IgG 的特异性抗体	16, 19, 52-53
蛋白质 A-、-G 或 -L	蛋白质附着至树脂	免疫球蛋白	这些蛋白质对免疫球蛋白有很强的亲和性和选择性	16, 54
结合亲和相	多种固定相附着至树脂	白蛋白和 IgG	结合上面的方法去除血浆中的两种高丰度蛋白质（白蛋白和 IgG）	16, 20, 55-57
等电位捕集	多腔室电解槽或自由流电泳	白蛋白、酸性和碱性蛋白质	在膜电泳系统中，蛋白质首先根据其 pI 值分离，最终分离至各腔室以便于检索。分子量接近 HSA 分子量范围内的蛋白质将被去除。需要注意的是，这些仪器是专为蛋白质分馏而设计的，但也可用于分离高丰度蛋白质	58-59

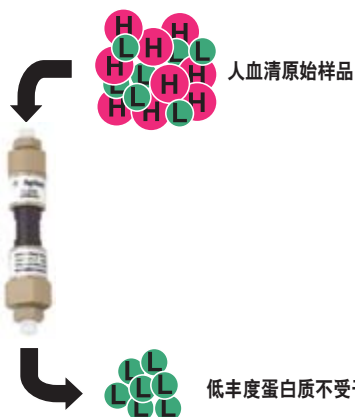
(接转下页)

去除生物体液中高丰度蛋白质的经典方法

技术	系统类型	目标去除物	原理	参考文献
Gradiflow	制备电泳	白蛋白	蛋白质首先根据其 pI 值分离，再进一步根据大小（分子量）分离	60-61
多肽亲和色谱	噬菌体分离物涂布于 96 孔板上		从库中选择的合成多肽与多种哺乳动物的血清白蛋白结合良好，且与 HSA 有较强的亲和性	62-63
离子交换和体积排阻色谱	色谱柱切换或串联	白蛋白, IgG 和其他蛋白质	离子交换色谱柱根据电荷进行分离，体积排阻色谱柱根据分子量（大小）进行分离；有时也会将反相色谱柱与离子交换色谱柱结合使用	64-65
多凝集素亲和色谱	凝集素吸附至琼脂糖微珠	糖蛋白	多种混合的凝集素具有针对不同糖蛋白的亲性，可用于人体血浆中糖蛋白的富集；可与多种亲和性蛋白质清除柱结合使用	66
有机溶剂沉淀	有机溶剂与血清混合	大于 20 KDa 的蛋白质	向血清中加入可与水混溶的有机溶剂（例如乙腈）时，大分子蛋白质将会沉淀；可通过离心或过滤去除沉淀的蛋白质；上清液中则含有低分子量的蛋白质，可供进一步研究。	67-68

图 15.3

血浆中高丰度蛋白质的去除



- 使用色谱柱和优化的缓冲液去除人血清和血浆样品中丰度最高的 14 种蛋白质
- 连接到 HPLC 仪器并泵入样品 — 即可收集和分析目标蛋白质

- H** 高丰度蛋白质
(白蛋白、IgG、IgA、转铁蛋白、触珠蛋白、抗胰蛋白酶)
- L** 低丰度蛋白质
(疾病和药物靶标的生物标志物)

图 15.4

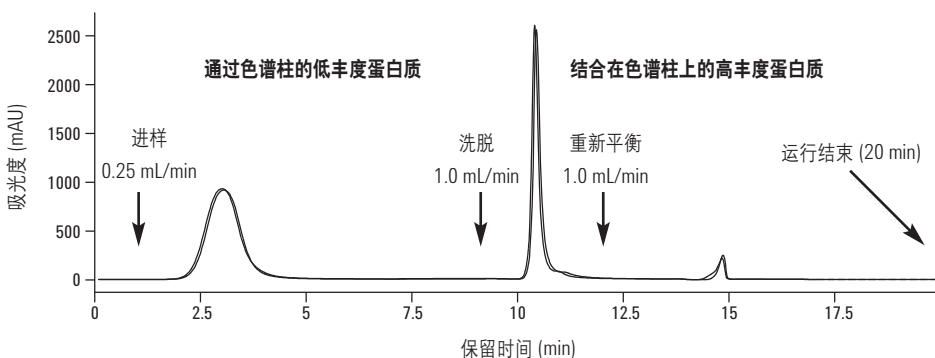
MARS 免疫亲和色谱柱洗脱曲线 — 4.6 x 50 mm 色谱柱



- 色谱柱总运行周期 = 20 min (包括进样、洗脱和再生)
(4.6 x 50 mm 色谱柱)
- 容量 = 每次进样 15-20 μ L 血清
1.2-1.6 mg 总血清蛋白

时间 (min)	%B	流速	最大压力 (bar)
1 0.00	0.00	0.250	120
2 9.00	0.00	0.250	120
3 9.01	100.00	1.000	120
4 12.50	100.00	1.000	120
5 12.60	0.00	1.000	120
6 20.00	0.00	1.000	120

第 20 次运行和第 200 次运行的结果对比



蛋白质组学研究的现代样品前处理方法

经典蛋白质化学和蛋白质组学之间的主要区别在于，经典蛋白质化学关注单个蛋白质的分离，并鉴定其总序列，而在蛋白质组学中，其目标是表征多种表达水平中存在的蛋白质复杂混合物，并使用部分序列分析（酶解后）对其进行鉴定。这类鉴定在没有诸如表达序列标签 (EST)、蛋白质和多肽序列以及强大的数据挖掘算法等数据库的情况下不可能完成。Agilent Spectrum Mill MS 蛋白质组学软件可用于蛋白质数据库 MS/MS 数据检索。

蛋白质组学研究实际上分为三个领域：功能、结构和表达蛋白质组学，每个领域拥有自己的一组样品前处理方案。表达蛋白质组学是药物研发中蛋白质组学的发现领域。其定义为对健康和疾病组织中存在的蛋白质进行鉴定和定量。功能蛋白质组学是在保持蛋白质复合物的情况下对未变性的蛋白质进行分析，而结构蛋白质组学则是解析每个人体蛋白质功能性“活性”位点的结构。最终目标是开发对这些活性位点具有高度特异性的药物。蛋白质组学的巨大分析挑战源自以下事实，即蛋白质组是 30 - 80% 的基因表达产物的集合，这些基因产物来源于低水平（每个细胞 10 - 100 拷贝）表达和高水平（每个细胞 10000 - 100000 拷贝）表达。这表示其动态范围为至少 6 个数量级。作为参考，大多数真核细胞含有约 20000 种不同的蛋白质，平均分子量为 50 kDa。酶解可产生约 30 个多肽（每个蛋白质），或约 6000000 个不同的多肽。当然，这些大量的蛋白质为样品通量、检测和数据分析带来了巨大的技术挑战。

表达蛋白质组学最关注的样品前处理技术是在使用制备电泳或色谱分离前对蛋白质进行预分离和富集。可使用基质辅助激光脱附电离 (MALDI) 或大气压电离 (API) 质谱进行检测。**图 15.5** 为测定不同蛋白表达水平整个过程的典型工作流程图。蛋白质化学中用来提取和分离蛋白的经典方法也可用于蛋白质组学研究。此外，更新的方法如激光显微捕获切割⁸⁻⁹还可显著化疾病组织和健康组织之间的差异。稳定同位素标记（如，¹³C、²H 和 ¹⁵N）或同位素编码亲和标签 (ICAT) 常加入分析步骤中，以便亲和捕获低丰度的差异表达蛋白质。

二维电泳 (2DE)

虽然人们认为二维电泳是一种分离技术，而不是样品前处理技术，但它的确是使用多维分离原理将蛋白质和其他生物分子从复杂混合物中分离出来的一种技术，如第 13 章中进行的讨论。多年以来，二维电泳是分离蛋白质的标准方法，在第一维中基于等电点进行等电聚焦 (IEF) 分离，在第二维中使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按分子量进行分离。即便是现在，许多实验室仍在使用这个久经考验的方法分离蛋白质。无机和有机染料可用来对凝胶板上已分离的蛋白质进行显色。高分辨率二维成像和分析软件可对结果进行总结，并帮助鉴定目标蛋白以进行切割和进一步研究。使用二维凝胶时需要注意几点。其中一个重要点是，大多数具有生物重要性的蛋白质的浓度都较低，因此通常检测不到。高效的样品前处理技术可去除大多数高丰度的干扰蛋白（请参见前文），并提高二维电泳分离的重现性。可根据理化参数（如等电点）进行预分离，以提高凝胶板的载样量并最大限度减少蛋白质之间的相互作用。在凝胶分离前去除样品中的不溶性物质也很重要，因为已知疏水膜蛋白或组织蛋白与其他蛋白的行为不同。非常重要的是在二维电泳分离前要溶解蛋白质。必须加入多种无机和有机缓冲液，以破坏二硫键和非共价相互作用。多家公司可生产二维凝胶、样品纯化试剂盒、试剂、缓冲液以及有机/无机染料，以帮助优化目标蛋白的分离。

从凝胶上提取和酶解

在二维电泳中，大多数蛋白质都可被凝胶捕获，难点是如何将其提取出来用于分析。对已切割的蛋白斑点进行酶解（如胰蛋白酶），如将该小块凝胶置于离心管中，并依次进行还原、烷基化、清洗和脱水步骤。然后加入缓冲液和酶，将蛋白质在 25 °C 或 37 °C 条件下孵育过夜以进行酶解。已开发出对少量样品进行在线酶解以显著缩短酶解时间的方法。酶解完成后，必须进行几个小时的手动操作以去除酶、缓冲液和盐，然后样品才能被引入质谱进行分析。可使用胶上酶解试剂盒，在 96 孔过滤板上处理多达 96 个蛋白质样品。此类试剂盒含有酶、试剂和样品纯化产品，可进行脱盐和浓缩以进行质谱分析。

从胶上切割蛋白斑点然后进行酶解的方法，可减少低丰度蛋白损失并提高分析通量。我们还提供自动化机器人系统和液体处理工作站，可进行以下操作：从二维凝胶开始，切割目标蛋白斑点，对其进行酶解和浓缩，在某些情况下，还可将最终样品点在板上以进行质谱分析。下节将介绍如何使用自动化、在线酶解和微流体技术显著缩短分析时间。

质谱检测

蛋白质组学中可选的检测方法有：使用 MALDI 的质谱、纳米电喷雾电离 (ESI) 串联质谱 (MS/MS) 或反相微毛细管液相色谱电喷雾电离。许多文献都详细讨论了质谱在蛋白质组学领域的应用¹⁰⁻¹³。MALDI 和 ESI 在蛋白质检测上的最初使用纯化的单一蛋白质和多肽实现多肽质量指纹谱分析和多肽从头测序分析。然而，从二维凝胶和细胞中提取物具有生物学意义的样品实验暴露了该方法的弱点，即对表面活性剂、染料和有机/无机缓冲液没有耐受性。这些技术的超高灵敏度还使它们对高浓度的蛋白质污染物（如，角蛋白、蛋白 A 和白蛋白）更加敏感。

除定量以外，蛋白质和多肽的检测灵敏度和准确度同样受到这类污染物的影响。质谱工作者面临的挑战是，高重现性地去除盐、表面活性剂、脂类和高丰度蛋白，但不去除有生物学意义的低拷贝数蛋白质。

已有填充了固定相吸附剂填料的微量柱和微量移液枪头等产品问世，如 Agilent OMIX 整体式萃取头（请参见第 9 章），这些产品成本低廉，便于使用，可在 MALDI 分析前进行蛋白质和多肽样品的浓缩和脱盐。这些产品死体积非常小，可用于极少量样品的处理，且含有 C18、C4、强阳离子交换的小柱床，可固定在 10 μL 移液枪头的顶端；浓缩、纯化的样品可使用 1 - 4 μL 体积洗脱。OMIX 萃取头还有 96 孔板的形式；该形式把胶上酶解与将纯化和浓缩的多肽在靶板上点样相结合。

多维液相色谱

分析人员正在寻找能替代电泳和凝胶技术的方法，因为所进行分离和分析的蛋白质数量非常庞大，所以需要具有更高制备容量和重现性的高通量系统。毛细管液相色谱是理想之选，因为它是成熟的分离技术，可实现完全自动化，还可与质谱串联进行在线检测。这种组合也很有吸引力，因为质谱通过质荷比提供了优于色谱柱分离的更高的分辨率。有关蛋白质分离以及液相色谱与质谱联用技术的进一步说明不在本文讨论范围内。

多维蛋白质鉴定技术 (MudPIT) 采用了两个连续的色谱分离步骤，并且有多种配置可供选择：(1) 在第一根色谱柱上进行分离并收集馏分，然后将收集到的馏分进样到第二维的色谱柱上；(2) 直接连接两根 LC 色谱柱；(3) 通过色谱柱切换实现多维液相色谱分离（请参阅第 13 章）。

二维液相色谱分离一般将离子交换柱、亲和柱、体积排阻柱或色谱聚焦柱以第一维或第二维的方式与反相柱联用。也可使用混合柱床的微毛细管柱，该色谱柱的树脂柱床上含有离子交换填料和反相填料。这类色谱方法可用于取代二维凝胶方法，并且具有多种分析方案，例如：使用“鸟枪法”分析所有蛋白质（250 - 5000 种蛋白质）、某一类蛋白质（10 - 250 种蛋白质）和特定蛋白质（1 - 10 种蛋白质）。

通过数据依赖型仪器控制和色谱控制实现的串联质谱数据进行“快速”采集，可大大提高质谱仪的分析通量。智能算法为蛋白质鉴定提供了多肽质谱图的自动化分析。此外，还可实现复杂多肽混合物和完整蛋白的完全分离。

这种液相色谱方法可以使用纳米 LC-MS/MS 检测低拷贝数蛋白，并且能够检测某些使用二维凝胶不易检测的蛋白质类型（如大分子蛋白质、疏水性膜蛋白以及强酸性或强碱性蛋白质）；但要完全分离蛋白质组中的所有蛋白则需要使用两维以上的分离技术和预分离步骤。

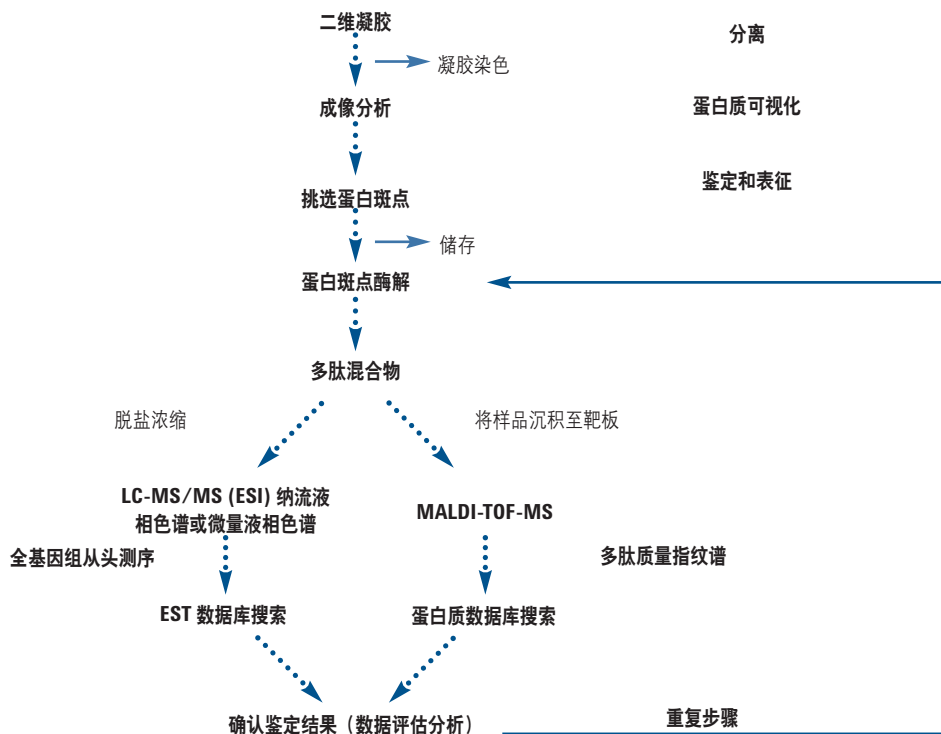
自动化样品前处理

蛋白质纯化包括手动和不连贯的步骤，这些是多步骤过程中的一部分。实现这些独立步骤的自动化是蛋白质组学实验室的重要目标，可帮助他们满足高通量的分析要求。自动化装置及其尺寸的选择根据任务要求不同而具有不同程度的复杂性。整个过程中常用的自动化选项列于图 15.5 中：使用激光显微捕获切割系统可将健康细胞从疾病细胞中分离出来；从二维凝胶板上切割目标蛋白；酶解这些切割下来的凝胶斑点或栓；酶解后进行脱盐和富集处理；以及将这些多肽样品点在 MALDI 靶板上进行分析。

各步骤的自动化以特定的任务模块形式存在。使用带有机载高分辨率摄像头的特殊仪器可将目标染色斑点从凝胶上提取出来，具体方式为：使用摄像头获取凝胶图片，再通过软件进行分析，最后生成蛋白质目标切割图谱；选定的蛋白质可通过多个平行的切割头单元进行切割。将提取到的蛋白栓置于 96 孔板（有时使用 384 孔板）并登记分类。将蛋白水解酶（如胰蛋白酶）加入到取出的凝胶片中并加热酶解。这类自动化模块可进行所有必要的清洗步骤，并将蛋白质酶解成肽段。一些系统通常使用胶内酶解试剂盒。

图 15.5

表征蛋白质的典型工作流程



多肽片段可在自动化 MALDI 前处理工作站上进行脱盐和浓缩，该工作站本质上是改良的液体处理器（1、4 或 8 通道移液），通常配备有机机械臂，可在台面周围运送微孔板，或将微孔板运出或运进台面；液体处理工作站的基本原理在 Wells 的文章中有所叙述¹⁴。通常使用含有固相萃取介质的一次性枪头（例如安捷伦公司的 OMIX 移液枪头）进行该样品的前处理，且这类移液枪头可与大多数液体处理工作站兼容。“点样”是将多肽样品置于称为“MALDI 靶板”的特殊介质上，并将多肽样品固定在适当基质中进行分析。工作站也可在靶板上进行简单的高精度定位点样。我们还提供两种不同功能的模块，如蛋白质酶解与 MS 样品点样。

带质谱检测器的多维液相色谱也可通过增加柱切换功能实现自动化，该柱切换功能可平行容纳多根色谱柱（请参见第 13 章）。人们对自动化蛋白质处理方法的要求不断提高，促使生产商应对众多挑战：更高的样品通量、更高的重现性、对低丰度蛋白质的更高灵敏度、更高的小体积液体处理能力以及在靶板上进行高密度样品点样。

肽谱分析

一旦蛋白质得到分离后,就必须进行进一步表征。MS/MS 是基于质谱特征对完整蛋白进行鉴定的技术。肽谱分析也是一种非常强大、具有一定选择性的方法,并且是蛋白质鉴定中使用最广泛的方法之一。分析中常需通过酶解(常使用胰蛋白酶)蛋白质生成肽段碎片,然后进行碎片分离和鉴定,从而检测并监测单一氨基酸变化、氧化、脱氨基及其他的降解产物。肽谱分析还可以直接检测常见的单克隆抗体变体,例如 N 端环化、C 端赖氨酸处理和 N 端糖基化,以及其他的翻译后修饰。肽谱是一个蛋白及其多次处理后所得最终产物的指纹图谱,可为所分析的蛋白提供全面深入的认识。它包括 4 个主要步骤:

- 蛋白质分离和纯化
- 肽键的选择性裂解
- 肽段的色谱分离
- 肽段的验证分析

前两个步骤可认为是样品前处理过程的一部分,随后的两个步骤是分离和分析。反相液相色谱是肽谱研究首选的测定技术。肽谱被认为是一个对比流程,它可以确定蛋白的一级结构,并检测结构的改变。肽谱中应包含蛋白质的阳性鉴定、完整肽段序列的最大覆盖率,并提供除酶解蛋白水平所得信息之外的其他信息和序列鉴定。可获得便捷的肽谱分析指南⁶⁹。

蛋白质酶解

表 15.3 显示了蛋白质酶解的 5 个步骤，可对完整蛋白进行选择性裂解。我们对每个步骤分别进行了检测，以掌握影响酶解最终产物的参数。

表 15.3

蛋白质酶解的五个步骤		
步骤	预期效果	常规实验
1. 样品前处理	对样品进行前处理，用于酶解	去除、富集、透析、脱盐
2. 选择裂解试剂	特定的裂解要求	无
3. 还原和烷基化	还原反应可还原二硫键 烷基化可引入 SH 基团	还原：DTT，45 min，60 °C 烷基化：IAM，1 h，避光进行
4. 酶解过程	蛋白质裂解	酶解：pH 8，37 °C，过夜 淬灭：加入 TFA
5. 富集/纯化	制备样品用于 LC 或 LC/MS 分析	C18 枪头、浓缩、透析、亲和色谱柱

步骤 1：样品前处理

根据蛋白质的大小或结构，样品的预处理方法不尽相同。在特定的条件下，可能需要进行样品富集，或从样品前处理过程中添加的物质和稳定剂中分离蛋白质，尤其是在当这些添加剂会干扰肽谱分析过程时。针对这些流程，现已开发出许多方法，每种蛋白质均具有一套对应的纯化措施或处理方法。酶解前通常会使用一些更常用的方法进行样品纯化，包括去除/富集、透析（请参见第 18 章）和凝胶过滤脱盐（请参见第 11 章）。前文已介绍了一些去除策略（请参见表 15.2）。这些去除策略利用了免疫亲和技术（例如免疫沉淀、免疫共沉淀及免疫亲和色谱法）。另一方面，富集技术会根据独特的生化活性、翻译后修饰 (PTM) 或胞内的空间定位分离细胞蛋白的亚类。翻译后修饰（例如磷酸化和糖基化）可使用亲和配体（例如，金属离子亲和色谱 (IMAC) 或固定化凝集素）分别进行富集。

不论是简单的样品还是复杂的样品，常需要通过透析或脱盐对样品进行优化处理，以确保它们酶解过程的兼容性。例如，由于质谱法 (MS) 将测定带电离子，因此必须在 MS 前进行除盐（特别是钠盐和磷酸盐），最大程度减少它们对检测的干扰（请参见第 17 章）。透析和脱盐方法可进行缓冲液交换、脱盐或小分子去除处理，以防止对后续过程的干扰。

透析是降低样品盐浓度的常规流程。具体步骤是先将样品装入透析袋（袋膜具有特定的孔隙）中，袋口打结，然后将其置入水浴或缓冲液中，通过扩散使盐浓度达到平衡。大分子无法扩散出透析袋，会留在袋内。如果使用水浴，袋内小分子的浓度会缓慢降低直到透析袋内外浓度相同。达到平衡后，即可撕破透析袋，将其中的溶液倒入收集容器中。虽然透析体积可以从微升到高至数升，但这对大量样品并不实用，因为需要很长时间（如，数小时，甚至数天）才能将盐完全去除。

为在酶解前进行样品脱盐，最常用的实验室方法是体积排阻色谱 (SEC) (第 11 章)，也称为凝胶过滤色谱 (GFC)。该方法是一种非吸附的色谱技术，可根据分子大小进行分离。凝胶过滤使用等度洗脱处理样品。在分析中，GFC 可分离分子量差异小于两倍的分子（例如蛋白质）。在这些应用中，目标分离物质的体积差异非常大（即蛋白质与盐相比）。我们需要选择适当孔径的凝胶过滤介质，使其能够在完全排除较大的蛋白质的同时允许较小分子自由扩散进入所有孔隙中。色谱柱使用缓冲液进行平衡，它与样品的缓冲液可能相同，也可能不同。较大的分子不能进入介质的孔隙中，最先从色谱柱中洗脱出来，随后是扩散进入孔隙中的较小分子。如果较小的分子和盐类不是分析目标，我们可以将它们导入废液，或者，如果需要分析这些物质，可以将它们导入馏分收集器以待进一步处理。如果流动相缓冲液与原始样品缓冲液不同，较大的分子将被新的缓冲液洗脱，这样就发生了缓冲液置换。

步骤 2：裂解试剂的选择

裂解肽键的方法有两种 — 化学裂解和酶解。化学裂解涉及到使用亲核的非酶促试剂（例如，溴化氰 (CNBr)）在特定区域以化学形式裂解肽键，而胰蛋白酶等蛋白水解酶则被证实对于多个位点特异性裂解区域非常有效。裂解方法和试剂的选择取决于所要分析的蛋白质以及分析人员所期望的特定结果。此外，进行选择时还需要仔细考察整个肽图分析过程，并考虑相关的表征。肽图分析最常用的裂解试剂是胰蛋白酶，因为它具有定义明确的特异性。胰蛋白酶仅水解由精氨酸 (Arg) 或赖氨酸 (Lys) 的羧基形成的肽键。**表 15.4** 中列出了一些常见的裂解试剂及它们的特异性。

表 15.4

裂解方法

裂解类型	裂解试剂	特异性
酶促型	胰蛋白酶	Arg 和 Lys 的羧基端
	胃蛋白酶	非特异性
	糜蛋白酶	疏水性残基的羧基端
	谷酰胺肽链内切酶	Glu 及 Asp 的羧基端
化学	溴化氰	Met 的羧基端
	稀酸	Asp 与 Pro
	BNPS 粪臭素	Trp

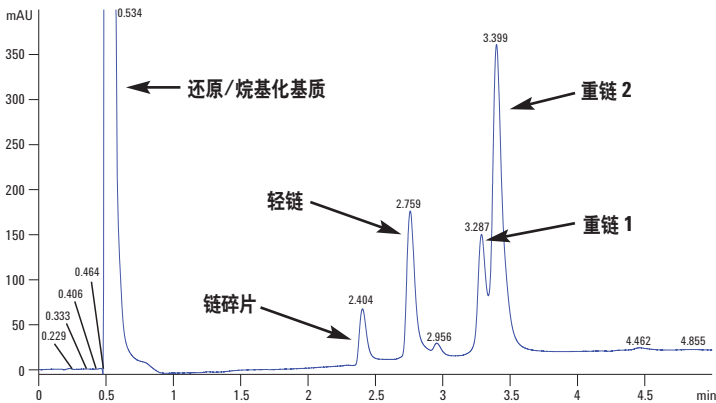
步骤 3：变性、还原和烷基化

为使蛋白水解酶有效地裂解肽链，需要利用各种广泛使用的试剂对样品进行变性、还原和烷基化。变性和还原常可同时进行，即在使用试剂（例如，1,4-二硫苏糖醇 (DTT)、巯基乙醇、或三羧甲基磷酸）的同时进行加热。常用的化学试剂为 DTT，这是一种强还原剂，可还原二硫键，从而保护蛋白质中半胱氨酸之间的分子间和分子内二硫键。通过同时进行变性和还原，可避免因二硫键被还原而导致的蛋白复性，这是使用单独加热作为变性剂时常存在的问题。蛋白变性及还原后，还需要对半胱氨酸进行烷基化，以进一步减少潜在的复性。酶解前对蛋白质样品进行烷基化最常用试剂为碘乙酰胺 (IAM) 和碘乙酸 (IAA)。

图 15.6 为使用反相色谱分离方法评估一个单克隆抗体酶解前的发生完整化还原和烷基反应的实例。

图 15.6

某还原和烷基化的单克隆抗体酶解前的反相液相色谱分离



条件：本次分离采用安捷伦超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8, 2.1 x 50 mm 色谱柱和 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪，运行条件为流速 0.5 mL/min，柱温 75 °C，流动相为水 (0.1% TFA)/ACN (0.08%)，采用多阶梯度条件⁶⁹。

步骤 4：酶解

如前所述，因为胰蛋白酶具有良好的特异性，所以是最常用的消化蛋白酶。由于胰蛋白酶也是一种蛋白质，它自身也可能发生水解（即自溶）。但是，在大部分样品中天然存在的 Ca^{++} 可与胰蛋白酶中的 Ca^{++} 键合环结合，从而阻止胰蛋白酶的自溶。现今，大多数实验室中均使用修饰型胰蛋白酶，因此自溶大大减少，不需要特别考虑。

蛋白质在不同环境下的酶解表现可能不同，在酶解混合物中的示范蛋白质时，其酶解效率会低于单独酶解的效率。其中一个原因可能是当多种蛋白质共同进行酶解时，它们对胰蛋白酶裂解位点的竞争性增加。此外，还有许多因素和条件参数可能会影响蛋白质酶解的完全性和有效性，从而导致各种各样的预期结果。

如果我们能够充分了解或控制这些因素，将显著改善酶解结果。反应的 pH 值、酶解时间和温度，以及使用的裂解试剂量均是酶解效率的关键影响因素。

胰蛋白酶的最佳酶解 pH 值范围为 7.5 至 8.5，通常在 37 °C 条件下进行。为使酶解能在最佳 pH 下进行，需要在添加胰蛋白酶之前加入缓冲液（通常为 50 mM 三乙基碳酸氢铵 (tABC)，或 12.5 mM 碳酸氢铵 (ABC)）。2-氨基-2-羟甲基丙烷-1,3-二醇 (Tris) 缓冲液也有相同的作用，但需要仔细考虑，因为 Tris 缓冲液与质谱分析（例如 MALDI 及 ESI-MS）并不兼容，需通过固相萃取法 (SPE) 或使用反相移液枪头（例如安捷伦的 OMIX）将其去除。为确保有足够量的酶用于酶解，正确的酶/蛋白质比值非常关键。针对酶解中关键步骤的详细讨论如下：

- **酶解 pH。** 一般情况下，对于给定的裂解试剂，为确保获得最佳效果，可按经验确定酶解混合物的 pH 值。例如，如果使用溴化氰作为裂解试剂，则必须保持强酸环境（例如，pH 2，甲酸）；但如果使用胰蛋白酶作为裂解试剂，那么最佳条件则为弱碱 (pH 8) 环境。一般情况下，反应的 pH 值不能改变酶解过程或碎裂反应过程中蛋白质的化学完整性
- **酶解时间及温度。** 时间和温度是酶解优化过程中的重要因素。为最大程度减少对实验不利的化学反应，建议将大多数蛋白质酶解的温度控制在 25 °C 至 37 °C 之间，例如，胰蛋白酶的酶解温度通常为 37 °C。但是，蛋白质的类型和大小将最终决定反应的温度，因为随着反应温度的提高，蛋白质可能会发生变性。反应时间也是优化酶解方案时的一个考虑因素。如果样品量充足，需考虑通过实验性研究来确定最佳反应时间，以确保获得可重现的肽谱和避免酶解不完全。酶解时间从 2 h 到 30 h 不等，具体取决于样品大小和类型，停止反应时可选择添加不会对肽谱产生干扰的酸，也可通过冷冻停止反应

- **裂解酶的浓度。**裂解试剂的浓度应尽可能低，以避免干扰肽谱分析。实验中通常会使用过量的裂解试剂以获得合理的快速酶解时间（即 6 至 20 h）；但应充分的考虑需要增加多少试剂量。常用的蛋白质/蛋白酶比值为 10:1 至 200:1 之间，建议裂解试剂分两步或多步添加，以实现裂解的最优化。在许多胰蛋白酶的标准酶解流程中，胰蛋白酶都是以上述方式加入。尽管如此，最终的反应体积仍保持小到足以实现分离的水平（肽谱分析中的下一步）。为确定可能影响后续分析的酶解因素，将使用一个含有所有溶剂（无测试蛋白质）的酶解对照执行一次空白检测

如需进一步了解常用胰蛋白酶裂解方法的更多信息，读者可以参阅参考文献 69，其中介绍了各操作步骤、预期的酶解时间，并汇总了还原、烷基化和酶解方案。

步骤 5：酶解产物的纯化和富集

进行实际的谱图分离之前，通常需要进行纯化和/或富集以便成功进行肽谱分析。根据样品类型和靶向目标，有多种方法可完成纯化和富集。例如，特定 PTM（例如磷酸化、泛素化和糖基化）的富集可采用 PTM 特异性抗体或配体进行亲和纯化，而磷酸化肽可使用抗磷酸化特异性抗体通过免疫沉淀 (IP) 进行富集，或通过 Pull-down 实验使用 TiO₂（可特异性结合磷酸化的丝氨酸、酪氨酸或苏氨酸）进行富集。

多肽富集后，可使用石墨或 C-18 枪头或小柱去除盐类和缓冲液，而去垢剂则可通过亲和柱或去垢剂沉淀剂进行去除。稀释的样品可采用各种截留分子量 (MWCO) 范围的浓缩仪进行浓缩。纯化后，多肽样品可进行用于后续质谱分析的最终制备，根据分子类型的不同，制备方式各不相同。对于 LC/MS（或 LC-MS/MS）分析，为获得良好的 LC 分离度和分析结果，需正确选择流动相和离子对试剂。MALDI-MS 需要将多肽样品与特定的基质（结晶的能量吸收染料分子）结合，然后在 MALDI 板上干燥后再进行分析。

肽谱的色谱分离

使用最广泛的肽谱色谱方法是采用低 UV (210-220 nm)-、UV (280-nm)- 或质谱检测的反相液相色谱。采用 C18 键合固定相的现代亚 2 微米和表面多孔颗粒色谱柱能够提供卓越的分离能力，还能使用与质谱兼容的挥发性流动相添加剂，因此可实现快速分离。适用于各种大小的多肽片段的最佳色谱柱孔径是 100-120 埃。柱温通常高于 40 °C。最常用的流动相的 pH 一般小于 3，由 0.1% 三氟醋酸 (TFA) 的水溶液 (溶剂 A) 和 0.08% TFA 的乙腈溶液 (溶剂 B) 组成，采用线性梯度洗脱。

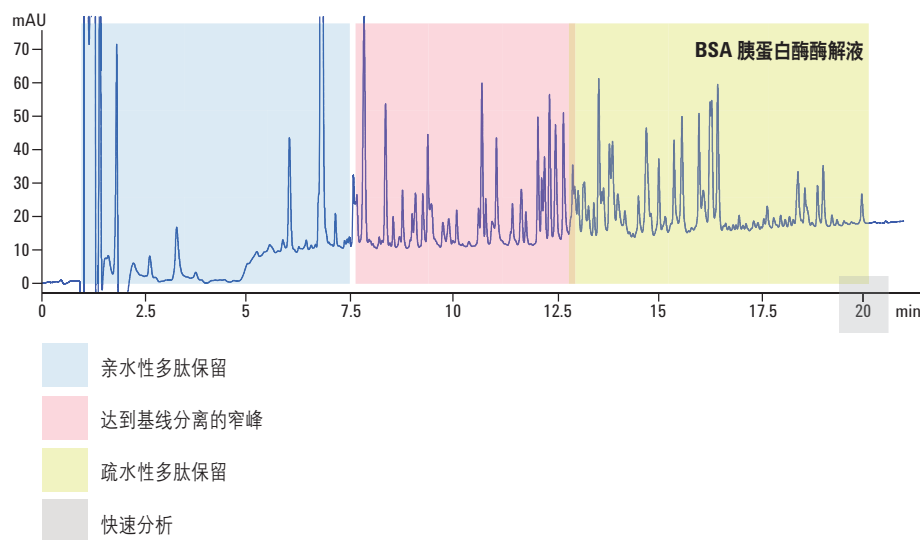
由于 TFA 是一种离子对试剂，并且有时可在质谱仪上引起离子抑制 (请参见第 17 章)，因此还使用了甲酸和乙酸，但色谱分离效果可能不及 TFA 效果好。因为质谱检测需要的流速比 4.6 mm 内径的色谱柱常用的流速稍低，所以通常使用柱内径为 2.1 mm、柱长最多为 150 mm 的色谱柱，并且流速一般低于 0.5 mL/min。作为目前 HPLC 柱容量的实例，图 15.7 提供了仅用 20 分钟即完成分析的牛血清白蛋白裂解物的详细肽谱。如需了解色谱分离条件、条件优化和质谱检测等更多信息，请见参考文献 69。

图 15.7

使用现代肽谱分析色谱柱分析 BSA 胰蛋白酶酶解液所得的肽谱

2.1 x 150 mm AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (安捷伦科技公司)

流动相: A: 水 (0.1% TFA), B: ACN (0.08% TFA), 40 °C, 流速: 0.52 mL/min



自动化肽谱分析

由于手动进行多肽的样品前处理非常耗时，而且所有步骤都有可能导导致样品损失以及向分析中引入误差，因此如果需要进行 LC-MS/MS 分析的样品数量较多，最好能够实现整体工作流程的自动化。重现性更好、通量更高、方法开发过程更快、试剂和样品需要量更少，以及能够解放科学家们的时间，这些都是微型工作流程自动化的优势。AssayMAP 多肽样品前处理解决方案（安捷伦科技公司，美国加利福尼亚州圣克拉拉市）是一款专为执行标准化的样品前处理工作流程而设计的微型液体处理系统。该解决方案采用现代化的液体处理平台 (Bravo)，使用基于 96 孔板的平行处理方法完成酶解、纯化和分馏（使用反相和/或阳离子交换 SPE 小柱）等步骤。分馏步骤离线进行，通过缩短液相色谱梯度洗脱时间提高了 LC-MS 的分析通量。

参考文献

1. Mitra, S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, **2003**, ISBN #0-471-32845-6
2. Righetti, P.G.; Castagna, A.; Herbert, B. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 320A-326A
3. Zolotarjova, N.; Mrozinski, P.; Majors, R.E. *LCGC No. America* **2007**, *25* (2), 118-140
4. Rehm, H. *Protein Biochemistry and Proteomics* 4th Ed., Academic Press (Elsevier), Burlington, MA, **2006**, ISBN 13: 978-0-12-088546-9 and ISBN 10: 0-12-088545-X
5. Lovric, J. *Introducing Proteomics: From Concepts to Sample Separation, Mass Spectrometry and Data Analysis*, Wiley, Hoboken, NJ, **2011**, ISBN-10: 0470035242 and ISBN-13: 978-0470035245
6. Mishra, N.C. *Introduction to Proteomics: Principles and Applications*, Wiley, Hoboken, NJ, **2010**, ISBN-10: 471754021 and ISBN-13: 978-0471754022
7. Coligan, J.E.; Dunn, B.M.; Ploegh, H.L. et al. *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, New York, **2002**
8. Emmert-Buck, M.R.; Bonner, R.F.; Smith, P.D.; Chauqui, R.F.; Zhuang, Z.; Goldstein, S.R.; Weiss, R.A.; Liotta, L.A. *Science* **1996**, *274*, 998-1001
9. Banks, R.E.; Dunn, M.J.; Forbes, M.A. et al. *Electrophoresis* **2000**, *20*, 689-700
10. Aebersold, R.; Goodlett, D.R. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 269-295

(接转下页)

参考文献 (接转下页)

11. Aebersold, R.; Mann, M. *Nature* **2003**, *422*, 198-207
12. Han, X.; Aslanian, A.; Yates III, J.R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (5), 483-490
13. Bensman, A.; Heck, A.J.; Aebersold, R. *Annual Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 379-405
14. Wells, D.A. *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation: Methods and Automation Strategies*, Elsevier Science, San Diego, CA, **2003**, ISBN-10:044451029X and ISBN-13:978-0444510297
15. Lee, W.-C.; Lee, K.H. *Anal. Biochem.* **2004**, *324*, 1-10
16. Bjorhall, K.; Miliotis, T.; Davidsson, P. *Proteomics* **2005**, *5*, 307-317
17. Jacobs, J.M.; Adkins, J.N.; Qian, W.-J.; Shen, Y.; Camp III, D.G.; Smith, R.D. J. *Proteome Res.* **2005**, *4* (4), 1073-1085
18. Ogata, Y.; Charlesworth, M.C.; Muddiman, D.C. J. *Proteome Res.* **2005**, *4* (3), 837-845
19. Chromy, B.A.; Gonzales, A.D.; Perkins, J.; Choi, M.W.; Corzett, M.H.; Chang, B.C.; Corzett, C.H.; McCutchen-Maloney, S.L. *J. Proteom. Res.* **2004**, *3*, 1120-1127
20. Govednik, L.; Brne, P.; Gabor, B.; Barut, M.; Štrancar, A.; Strlič, M. *Chromatographic Characterization of Affinity and Pseudoaffinity Columns for the Depletion of IgG and HSA from Plasma Samples*, 12th International Symposium on Separation Sciences, Poster Paper P1, Lipica, Slovenia, **September 27-29, 2006**
21. Martosella, J.; Zolotarjova, N.; Liu, H.; Nicol, G.; Boyes, B.E. J. *Proteome Res.* **2005**, *4* (5), 1522-1537
22. Zhang, K.; Zolotarjova, N.; Nicol, G.; Martosella, J.; Yang, L.-S.; Czafranski, C.; Bailey, J.; Boyes, B. *敏捷伦多重亲和和去除系统用于人血清中高丰度蛋白的去除—新型敏捷伦技术 (Agilent Multiple Affinity Removal System for the Depletion of High-Abundant Proteins in Human Serum – A New Technology from Agilent)*, Agilent Application Note #5988-9813EN, **2003**
23. Brand, J.; Haslberger, T.; Zolg, W.; Pestlin, G.; Palme, S. *Proteomics* **2006**, *6*, 3236-3242
24. Shen, Z.; Want, E.J.; Chen, W.; Keating, W.; Nussbaumer, W.; Moore, R.; Gentle, T.M.; Siuzdak, G. J. *Proteome Res.* **2006**, *5*, 3154-3160
25. Fang, X.; Huang, L.; Feitelson, J.S.; Zhang, W.-W. *Drug Discovery Today Technol.* **2004**, *1*, 141-148
26. *Seppro Protein Fractionation Services Brochure*, Genway, San Diego, CA
27. Lynch, M. *Amer. Biotech. Lab.* **2005**, *37* (5), 24-26
28. Schuchard, M.; Melm, C.; Crawford, A.; Chapman, H.; Cockrill, S.; Ray, K.; Mehig, R.; Chen, D.; Scott, G. *Specific Depletion of Twenty High Abundance Proteins from Human Plasma*, NCI Proteomic Technologies Reagents Resource Workshop, Chicago, IL, **December 11-12, 2005**
29. Maccarrone, G.; Milfay, D.; Birg, I.; Rosenhagen, M.; Holsboer, F.; Grimm, R.; Bailey, J.; Zolotarjova, N.; Turck, C.W. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2402-2412
30. Cho, S.Y.; Lee, E.Y.; Lee, J.S.; Kim, H.Y.; Park, J.M.; Kwon, M.S.; Park, Y.K.; Lee, H.J.; Kang, M.J.; Kim, J.Y.; Yoo, J.S.; Park, S.J.; Cho, J.W.; Kim, H.S.; Paik, Y.K. *Proteomics* **2005**, *5*, 3386-3396

(接转下页)

参考文献 (接转下页)

31. Zolotarjova, N.; Martosella, J.; Nicol, G.; Bailey, J.; Boyes, B.E.; Barrett, W.C. *Proteomics* **2005**, *5*, 3304-3313
32. Moritz, R.L.; Chippingdale, A.B.; Kapp, E.A.; Eddes, J.S.; Ji, H.; Gilbert, S.; Connolly, L.M.; Simpson, R.J. *Proteomics* **2005**, *5*, 3402-3413
33. Yocum, A.K.; Yu, K.; Oe, T.; Blair, I.A. *J. Proteome Res.* **2005**, *4* (5), 1722-1731
34. Wu, J.; Kobayashi, M.; Sousa, E.A.; Liu, W.; Cai, J.; Goldman, S.J.; Dorner, A.J.; Projan, S.J.; Kavuru, M.S.; Qiu, Y.; Thomassen, M.J. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4.9*, 1251-1264
35. Wang, H.; Clouthier, S.G.; Galchev, V.; Misek, D.E.; Duffner, U.; Min, C.-K.; Zhao, R.; Tra, J.; Omenn, G.S.; M. Ferrara, J.L.; Hanash, S.M.; *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 618-625
36. Molina, H.; Bukenborg, J.; Reddy, G.H.; Muthusamy, B.; Scheel, P.J.; Pandey, A. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 637-650
37. Echan, L.A.; Tang, H.-Y.; Ali-Khan, N.; Lee, K.; Speicher, D.W. *Proteomics* **2005**, *5*, 3292-3303
38. Tang, H.-Y. *Proteomics* **2005**, *5*, 3329-3342
39. Zolotarjova, N.; Boyes, B.; Martosella, J.; Yang, L.-S.; Nicol, G.; Zhang, K.; Czafranski, C.; Bailey, J.; Smejkal, G.B., Ed.; Lazarev, A., Ed. *Separation Methods in Proteomics*, CRC Press, Boca Raton, FL, **2005**. ISBN-10: 0824726995 and ISBN-13: 978-0824726997
40. Anderson, L.; Hunter, C.L. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5.4*, 573-588
41. Sitnikov, D.; Chan, D.; Thibaudeau, E.; Pinard, M.; Hunter, J.M. *J. Chromatogr. B* **2006**, *832*, 41-46
42. Misek, D.E.; Kuick, R.; Wang, H.; Galchev, V.; Deng, B.; Zhao, R.; Tra, J.; Pisano, M.; Amunugama, R.; Allen, D.; Walker, A.K.; Strahler, J.R.; Andrews, P.; Omenn, G.S.; Hanash, S.M. *Proteomics* **2005**, *5*, 3343-3352
43. He, P. et al. *Proteomics* **2005**, *5*, 3442-3452.
44. Huang, L.; Harvie, G.; Fietelson, J.S.; Gramatikoff, K.; Herold, D.A.; Allen, D.L.; Amunngama, R.; Hagler, R.A.; Pisano, M.R.; Zhang, W.W.; Fang, X. *Proteomics* **2005**, *5*, 3314-3328
45. Liu, T.; Qian, W.-J.; Mottaz, H.M.; Gritsenko, M.A.; Norbeck, A.D.; Moore, R.J.; Purvine, S.O.; Camp, D.G.; Smith, R.D. *Mol. Cell. Proteomics* **2006** EPUB
46. Schuchard, M.D.; Melm, C.D.; Crawford, A.S.; Chapman, H.A.; Cockrill, S.L.; Ray, K.B.; Mehig, R.J.; Kappel, W.K.; Scot, G.B. *Origins* **2005**, *21*, 17-23
47. Wang, Y.Y.; Cheng, P.; Chan, D.W. *Proteomics* **2003**, *3*, 243-248
48. Ahmed, N.; Barker, G.; Oliva, K.; Garfin, D.; Talmadge, K.; Georgiou, H.; Quinn, M.; Rice, G. *Proteomics* **2003**, *3*, 1980-1987
49. Colantonio, D.A.; Dunkinson, C.; Bovenkamp, D.E.; van Eyk, J.E. *Proteomics* **2005**, *5*, 3831-3835
50. Ramstrom, M.; Hagman, C.; Mitchell, J.K.; Derrick, P.J.; Hakansson, P.; Bergquist, J. J. *Proteome Res.* **2005**, *4*, 410-416

(接转下页)

参考文献 (接转下页)

51. Hinerfeld, D.; Innamorati, D.; Pirro, J.; Tam, S.W. *J. Biomolec. Techniques* **2004**, *15* (3), 184-190
52. Affibody Application Note, *Depletion of Abundant HSA from Serum*, Bromma, Sweden
53. Greenough, C.; Jenkins, R.E.; Kitteringham, N.R.; Pirmohamed, M.; Park, B.K.; Pennington, S.R. *Proteomics* **2004**, *4*, 3107-3111
54. Fahnestock, S. Trends in *Biochem. Sci.* **1987**, *5*, 1567
55. Fountoulakis, M.; Juranville, J.-F.; Jiang, L.; Avila, D.; Roder, D.; Jakob, P.; Berndt, P.; Evers, S.; Langen, H. *Amino Acids* **2004**, *27*, 249-259
56. Shen, Y.; Kim, J.; Strittmatter, E.F.; Jacobs, J.M.; Camp III, D.G.; Fang, R.; Tolie, N.; Moore, R.J.; Smith, R.D. *Proteomics* **2005**, *5*, 4034-4045
57. Govorukhina, N.I.; Keizer-Gunnink, A.; van der Zee, A.G.J.; de Jong, S.; de Bruijn, H.W.A.; Bischoff, R. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1009*, 171-178
58. Herbert, B.; Righetti, P.G. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3639-3648
59. Mikios, G.L.; Maleszka, R. *Proteomics* **2001**, *1*, 30-41
60. Rothmund, D.L.; Locke, V.L.; Liew, A.; Thomas, T.M.; Wasinger, V.; Rylatt, D.B. *Proteomics* **2003**, *3*, 279-287
61. Lee, H.-J.; Lee, E.-Y.; Kwon, M.-S.; Paik, Y.-K. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *10*, 1-8
62. Sato, A.K.; Sexton, D.J.; Morganelli, L.A.; Cohen, E.H.; Wu, Q.-L.; Conley, G.P.; Streltsova, Z.; Lee, S.W.; Devlin, M.; DeOliveira, D.B.; Enright, J.; Kent, R.B.; Wescott, C.R.; Ransohoff, T.C.; Ley, A.C.; Ladner, R.C. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 182-192
63. Baussant, T.; Bougueleret, L.; Johnson, A.; Rogers, J.; Menin, L.; Hall, M.; Aberg, P.-M.; Rose, K. *Proteomics* **2005**, *5*, 973-977
64. Petric, T.C.; Brne, P.; Gabor, B.; Govednik, L.; Barut, M.; Strancar, A.; Kralj, L.Z. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (in press)
65. Jin, W.-H.; Dai, J.; Li, S.-J.; Xia, Q.-C.; Zou, H.-F.; Zeng, R.J. *Proteome Res.* **2005**, *4*, 613-619
66. Yang, Z.; Hancock, W.S. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1053* (1-2), 79-88
67. Alpert, A.J.; Shukla, A.K. ABRF 2003, poster #P111-W
68. Zhang, J.; Goodlet, D.R.; Peskind, E.R.; Quinn, J.F.; Zhou, Y.; Wang, Q.; Pan, C.; Yi, E.; Eng, J.; Aebersold, R.H.; Montine, T.J.; J. *Neurobiol. Aging* **2005**, *26*, 207-227
69. 最优化肽段表征的要点: 肽谱分析指南. Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Publication Number 5991-2348CHCN, **2013**

生物分析中的样品前处理

生物基质中（例如血浆、血清、尿液、唾液、组织等）药物及其代谢物，以及低分子量生物标志物的分析，统称为“生物分析”。在这里，我们也将组织样品分析归为生物分析的一部分，因为组织样品前处理是药物和生物研究中非常重要的一部分。我们将针对生物样品中高分子组分（例如蛋白质、核酸等）的样品前处理称为生物样品前处理（请参阅第 15 章）。在药物开发的整个过程中，从体外/体内测试、临床前研究到临床试验，生物分析都是极为重要的一部分。近十年来，人们在分析方法和仪器方面取得了许多技术突破。除了具有更高的选择性和灵敏度，现代分析仪器还为快速且经济高效的生物分析方法开发和验证提供了极大的优势。在这些现代分析技术中，兼具特异性、灵敏度和高分析速度的液相色谱-质谱联用方法被认为是定量/定性生物分析方法的标杆。然而，这种选择性最和灵敏度最高的分析技术也有局限性，例如存在基质效应，在经过处理的生物基质中，目标分析物的选择性和灵敏度都会降低。

样品前处理，也称样品预处理/样品纯化/样品萃取，是大多数生物分析方法不可分割的一部分。在临床领域，目标药物/代谢物/生物标志物都存在于生化性质非常复杂，并且含有多种组分（例如盐类、酸、碱、蛋白质、细胞、脂质和脂蛋白等外源性/内源性有机小分子）的生物基质中。但是，这些基质的生化复杂性各不相同（例如组织、全血、血浆/血清、尿液、唾液、脑脊液等）。简而言之，样品前处理过程的目的就是要从基质中选择性地分离目标分析物，并尽可能去除或减少处理过的样品中基质组分的含量，此外，如有必要，还要对目标分析物进行浓缩。有效的样品前处理是一种技能，最多可占生物分析总时间的 80%。如第 1 章所述，样品前处理是整个生物分析方法中最费力且容易出错的部分。

本书中涉及的许多样品前处理方案都可直接用于生物分析基质。液液萃取 (LLE, 第 7 章)、过滤 (第 5 章)、固相萃取 (SPE, 第 9 章和第 10 章), 以及“稀释-上样”法都是常用的传统样品前处理技术。由于本书其他部分已经详细介绍了这些技术, 此处不再重复它们的相关信息。但新的以及改进的样品前处理技术层出不穷, 有越来越多的方法能够有效地从生物基质中提取出目标分析物。许多这类新开发的样品前处理技术已经过了测试、验证并已经商品化。本章将概要地介绍其中一些新的或使用较广泛的方法。

生物分析实验室中的血液分析

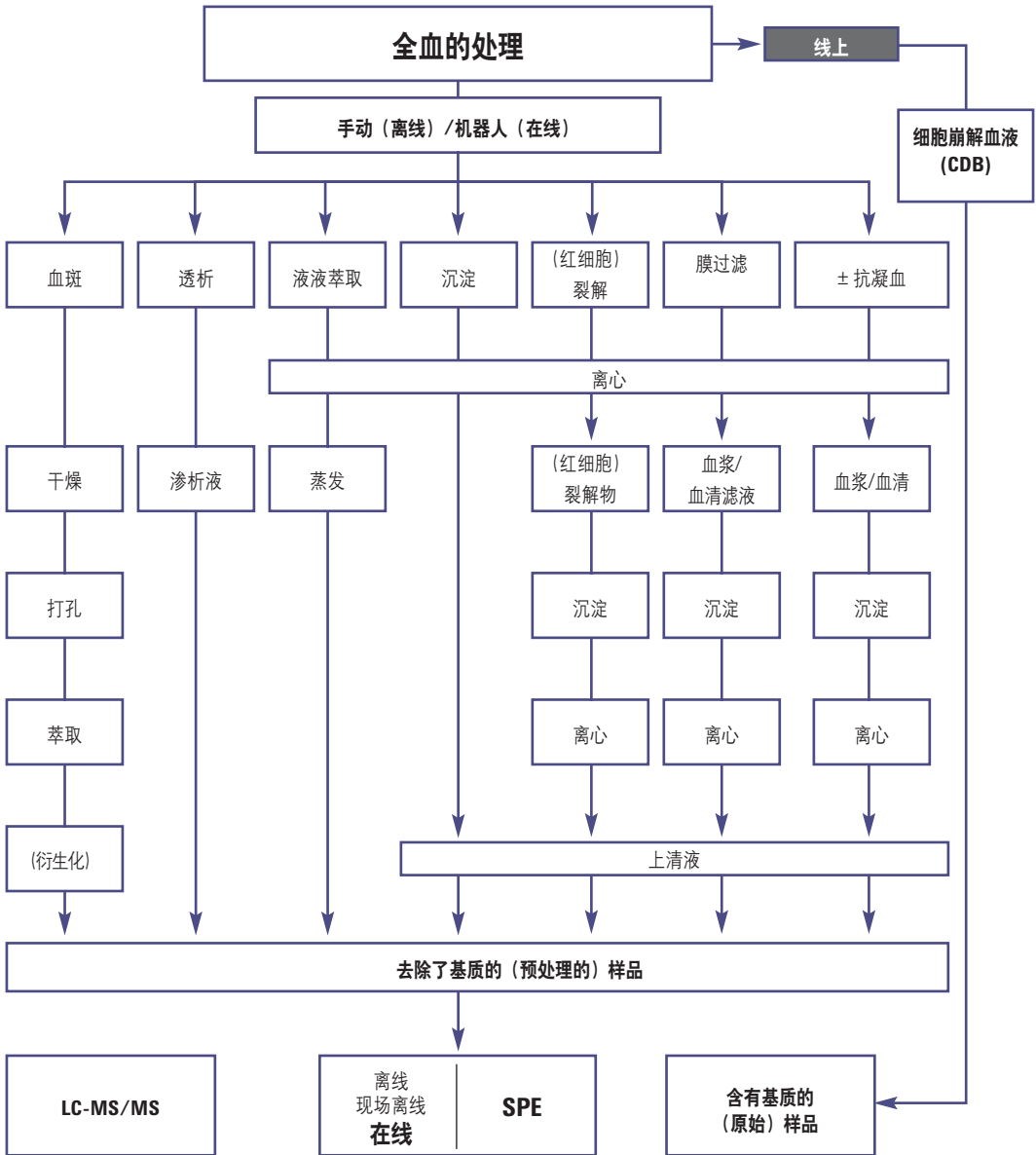
血液无疑是分析生物体液中的药物和药物代谢物时最常见的基质。人们通常都更倾向于使用血浆或血清作为分析基质, 但这需要采集大量的血液。在药代动力学 (PK) 和毒代动力学 (TK) 研究中, 啮齿类动物是临床前试验最常用的动物。小型啮齿类动物 (例如小鼠) 可提供的血液样品是有限的。通常, 每次 TK 试验需要 200-250 μL (总体积可多达 1500 μL) 的样品。为了得到足够的血液样品, 采样前必须将动物保暖 10 min。为了得到足够用于试验的血液, 我们经常都需要混合数只大鼠或小鼠的血液。显然, 如果检测用血减少, 就可以减少动物使用。在新生儿临床试验中, 我们不可能获得大量血液。因此, 降低血液样品的使用体积有助于实现更多的儿科研究及其他试验。

我们常常面临一个问题: 应该使用血浆还是全血来进行分析测定? 一些研究显示, 许多药物都趋向于在血浆和血细胞之间平均分布, 而另一些研究则显示, 某些药物会选择性地结合血浆蛋白。还有报告显示, 免疫抑制剂等药物主要与血细胞结合。药物代谢 (DM) 和 PK/TK 研究通常使用血浆, 因为与全血相比, 血浆更易于处理、运输和储存。但国际协调会议和美国食品药品监督管理局的监管机构均指出, 血液是药物暴露检测中可接受的生物基质。因此, 在某些情况下, 最好使用全血进行 DMPK 和 TK 研究中的分析。

传统的全血分析

图 16.1 展示了分析和处理全血的各种方法。传统方法见图中部，包括透析、液液萃取、蛋白质沉淀、(血液)溶解、膜过滤和抗凝血。这些方法通常需要较大体积的血液样品，涉及多个耗时的步骤，在这些步骤中可能损失分析物。许多传统方法都是手动操作的，但很显然，在面对大量样品时，通过机器人或其他方式实现自动化可以为分析提供保障。所有这些方法都能得到去除了基质的(预处理的)样品。根据最终测定药物和代谢物所用的分析技术，我们还有可能需要采用其他的样品前处理方法(例如固相萃取，SPE)进行最终纯化和预浓缩。近年来，LC-MS/MS 已被用于进一步的分离和检测。这一联用方法的高灵敏度和高选择性非常有利于痕量分析。实际上，在许多领域中，这一组合方法已经成了为痕量分析的常用方法。借助 LC-MS/MS，我们甚至无需进行过多的样品纯化步骤就能测定生物样品中的 ppb 级的化合物。对于定量分析来说，LC-MS/MS 是必不可少的。

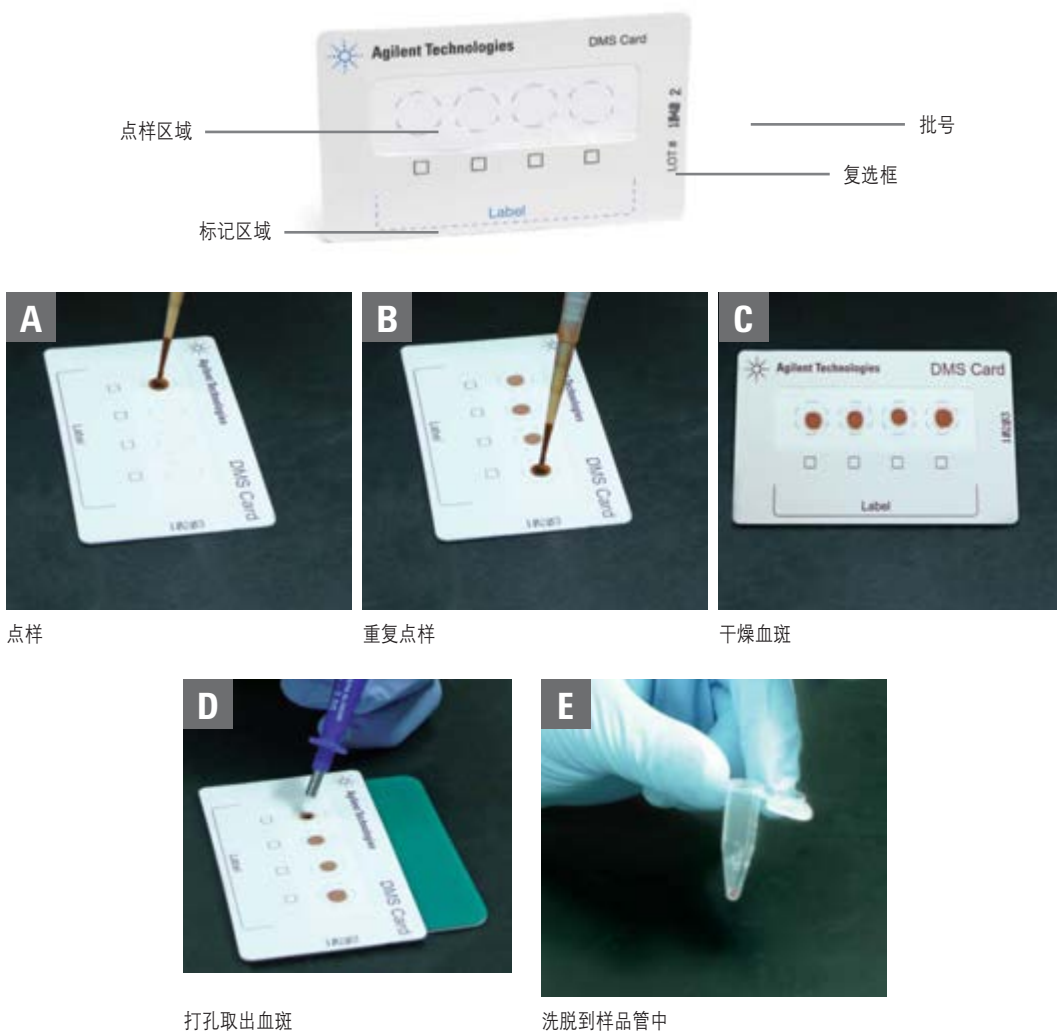
图 16.1



摘自参考文献 1。

但是，这些分析全血的传统技术仍无法达到分析小体积全血样品的要求。近来，一种比以前预期的血液样品用量更少，名为干血斑 (DBS) 分析 (图 16.2A-D) 的技术引起了人们的极大关注。该技术已经扩展到其他生物体液 (例如血浆、唾液、脑脊液 (CSF))，因而人们提出了干介质斑点 (DMS) 分析的概念。全血样品前处理还有一个有趣的新方法 — 制备细胞崩解血液 (CDB，图 16.2E)。在该方法中，使均质的血液样品通过一根加热的 (75 ° C) 不锈钢毛细管。产生的热冲击将导致细胞崩解，进而生成一种称为 CDB 的新基质以用于进一步分析。如需了解该技术的更多信息，请参阅参考文献 1-3。

图 16.2
干血斑分析步骤



干血斑分析/干介质斑点分析

早在 1913 年，Bang⁴ 就发表了 DBS 分析在血糖浓度评估中的应用。但最著名的干血斑应用是 Robert Guthrie 博士在 20 世纪 60 年代初期开发的苯丙酮尿检测方法⁵。他开创的滤纸采血法被广泛应用于新生儿遗传性代谢疾病的群体筛查。近年来，滤纸采血法已成为了一种重要工具，广泛应用于临床研究中的个体筛查、临床前动物试验、治疗和违禁药物监测，在常规药物开发中也有潜在用途。

今天，制药行业面临着需要在尽可能短的时间内提供高质量 PK 数据的压力，因此该领域的工作者们必须能够准确、精密地收集、分享、储存和分析成千上万的生物样品。此外，号召在药物开发过程中减少、改良和替代动物使用的运动，又形成了另一个挑战，要求该领域的工作者们适度采集样品，在保证收集到足够的血液样品总量用于分析的同时，还要避免过度使用动物。因此，干血斑分析成为了制药行业应对这些挑战的一种方法。此外，干血斑分析中涉及的其他技术也将这一方法扩展到了其他领域。

如图 16.2 中的工作流程所示，DBS 操作和分析相当简单，只有几个步骤。针刺手指或脚踵，将血液吸入玻璃毛细管中，是常用的采集方法（虽然有时也使用移液枪头）。在动物实验中，通常针刺其尾部采样。这样就不需要使用注射器吸取静脉血。根据毛细管的大小，吸取足够制备多个血斑的血液样品。通常只需要几十微升的血液。有时也会从受试者的微血管中采集血液。

具有一定尺寸的 DBS 卡片由滤纸或其他非纤维素材料制成（例如安捷伦的 DMS 卡）。这种卡片是点样装置。如图 16.2A 所示，采血后，将血液点在 DBS 卡片上。一张典型的卡片上最多可点四个血斑（图 16.2B）。每个血斑一般点样 10-30 μL 血液（平均 15 μL ）。采用毛细管进行血液点样（有时也采用微量移液器）。极为重要的一点是切勿让毛细管接触到滤纸，以避免污染。典型的血斑直径在 5-9 mm 之间。接下来，让血斑在室温下干燥 2 小时（图 16.2C）。该步骤可采用干燥架。经这种方式处理的血液可以在室温下长时间储存而不会降解。如需运送和保存已经点样的卡片，应将其放在含有干燥剂的可密封塑料袋中。

进行分析时，对每个干血斑进行打孔操作（图 16.2D），将所得的圆形（盘状）血斑置于样品瓶、离心管或 96 孔板的孔中。典型的打孔尺寸为 3-6 mm 的盘状区域，具体尺寸可根据需要达到的检测限以及可用的点样血液体积进行优化。对于训练有素的技术人员来说，手动打孔 96 个样品所需的时间一般为 10-15 min。使用有机溶剂（一般为含有内标的甲醇或甲醇-水混合物）洗脱目标分析物。对于碱性分析物，建议使用含 0.1% 甲酸的 80:20 (v/v) 甲醇:水溶液；对于酸性分析物，建议使用含 1% 氢氧化铵的 60:40 (v/v) 甲醇:水溶液。提取溶剂的体积在几百微升范围内，一般为 300 μL 。研究表明，使用 DBS 技术时，点样尺寸的重现性通常在 \pm 5-10% 范围内⁶。在一些例子中，可能还需要通过蛋白质沉淀、液液萃取或固相萃取等方法对样品进行进一步纯化。

表 16.1 展示了 DBS 技术与传统血浆分析技术相比的许多优势。DBS 分析技术的缺陷在于它无法预浓缩分析物，因此通常都需要采用高灵敏度的分析技术（例如 LC-MS/MS），而某些实验室可能不具备这种能力。但是，LC-MS/MS 正在逐渐成为各种类型的痕量分析的标准分析技术。采用微量 SPE 也许可以对去除了基质的 DBS 萃取物进行进一步纯化。其他的考虑还包括这项技术不能用于分析挥发性化合物、对空气敏感的化合物，以及某些不稳定的代谢物。光敏化合物需要进行专门处理。

表 16.1

传统血浆分析与干血斑分析的对比			
参数	传统血浆分析	干血斑分析	对 DBS 的评价
血液体积	>500 μL	10-30 μL	需要更少的实验动物；可从单只实验动物上进行更连续的采样，获得一致性更好的数据，对组合数据的依赖性更低；可用于新生儿和青少年患者研究
血液采集技术	使用注射器从静脉血管抽取血液	使用毛细管从手指或脚踵处采样	采样的损害性及患者的不适感降低，更易获取多个样品；采样总体过程更加简单
样品处理	对血浆进行离心、分离和纯化处理	简单的三步流程：直接在底物上进行纯化，可保持更高的分析物稳定性（尤其是对酶敏感的化合物）	DBS 步骤更少，因此产生误差的可能性更低；所需的人力更少；目前还不能轻松实现自动化；通常需要手动进行打孔和提取
储存和运输	血浆必须在冷冻条件下储存和运输	干燥状态下可在室温下保持稳定；运输时无需生物危害物标识	DBS 样品可在室温下储存，运输时无需使用干冰，因此可用于更远程的取样，这一点对于人体临床试验样品尤为重要
成本	运输时需要使用冰箱、干冰，需要使用更多的实验动物，必须作为危害性物质处理	降低了运输成本、储存成本，使用的实验动物更少，可作为非危害性物质运输	可降低药物开发的总成本

DBS 样品采集技术已经通过多种药物化合物的分析得到了验证,并且大量研究表明, DBS 结果与传统的血浆分析方法所得的结果之间具有良好的相关性。例如,有研究直接比较了使用传统血液分析技术与干血斑技术定量测定大鼠体内 12 种药物化合物的结果⁷。总的来说, DBS 样品和血液:水样品得到的分析结果具有良好的相关性。另一个例子是在大鼠体内进行的奥美拉唑毒代动力学研究,该研究比较了全血和血浆样品的分析结果与 DBS 的分析结果⁸。传统的血浆分析需要使用 240 μL 血液,而经典的 DBS 卡片只需要 60 μL 血液样品(可点样 4 个血斑)。采用 LC-MS/MS 分析从 DBS 卡片上洗脱的药物。通过 DBS 血样浓度比血浆浓度的平均值我们可以得到血液与血浆浓度之比,将该比值应用于血浆浓度即可预测出血液浓度。

由于 DMPK/TK 研究的样品量较大,手动上样和干血斑打孔成了一项繁琐的工作。因此,我们需要实现某种形式的半自动或全自动化。人们已经应用了多种自动化方法。其中的一种机器人自动化装置在 15-20 分钟内就能完成 96 个血样滤纸片的打孔。其他方法直接将分析物从卡片上洗脱下来,还有一种方法是将卡片上的分析物离子化,使其变为气相,然后再将它们转移到质谱仪中。这是一个相当新的领域,相关实验方法的细节不在本章的范围之内。读者可以参考详细描述了这些方法的文献综述⁹⁻¹²。

蛋白质的去除

人体和各种动物的尿液和血浆是我们最常分析的生物体液。采用 LC-MS/MS 分析生物基质中的化合物时,去除蛋白质是样品前处理过程中非常关键的一个步骤。许多生物体液不能直接使用 LC-MS/MS 进行分析的主要原因之一,就是其高含量的蛋白质将迅速损坏 HPLC 色谱柱的性能以及污染质谱离子源。有多种技术可以去除血浆中的蛋白质或降低其含量。

表 16.2 列出了许多较为常用的蛋白质去除技术。在串联质谱技术被广泛接受之前, LLE 和 SPE 作为主要的蛋白质去除技术被应用了多年。但是,这两种样品前处理技术都需要进行方法开发且步骤繁多。例如, LLE 需要通过直接萃取和反萃取才能去除蛋白质,而 SPE 则需要研究人员考察各种吸附剂、萃取、冲洗和洗脱溶剂,以及 pH 条件,以使药物和代谢物达到最佳纯化效果和回收率。蛋白质沉淀法现在已经较为常用,而且只要污染物不会导致 MS 检测器中出现过度的离子抑制或离子增强效应,该方法的效果相当不错。

蛋白质沉淀

蛋白质沉淀（有时称为蛋白质“破碎”）是一种常用的样品前处理方法，因为有时某些样品经沉淀之后可以直接进样到 HPLC 色谱柱中。该方法几乎不需要进行方法开发，使用的设备和试剂也很简单。但该技术不能浓缩分析物，实际上，反而发生了稀释。此外，样品的纯化程度也是有限的。取决于所用的沉淀试剂、实验条件和需要从血浆中提取的物质种类，该方法最多可从样品中去除 98% 的蛋白质。但是，其他赋形剂（例如盐类、脂质和磷脂）仍会留在上清液中。

蛋白质沉淀法的原理非常简单（见**图 16.3**）。向血浆样品中加入化学试剂的目的是使蛋白质在样品中的溶解度显著降低，进而沉淀。通过过滤或离心可去除沉淀，留下的透明上清液或滤液通常可以直接进样到 HPLC 或 LC-MS/MS 系统中。**表 16.3** 列出了沉淀血浆蛋白质常用的 4 种主要试剂。

图 16.3

干血斑分析步骤

样品

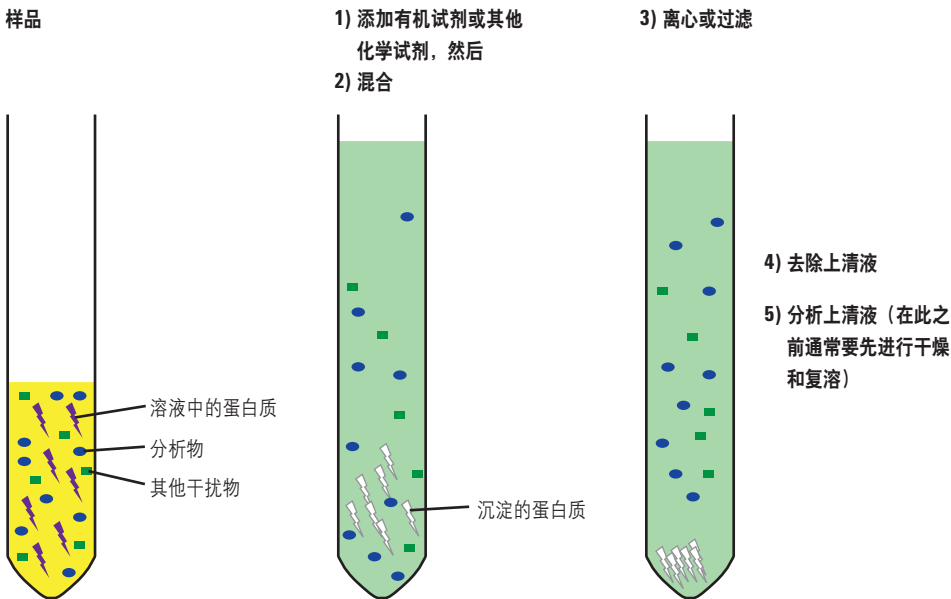


表 16.2

用于从生物体液中去除蛋白质的技术		
蛋白质去除技术	原理	参考文献
沉淀	在搅拌的同时，向血浆溶液中加入有机溶剂（例如乙腈、甲醇）、酸性溶液（例如高氯酸、甲酸、三氯乙酸）或盐溶液（例如硫酸钠、硫酸铵）。蛋白质沉淀并形成小球，可通过离心或过滤去除。上清液可通过 HPLC 进行分析	13-16
限进介质 (RAM) (请参阅第 10 章)	将含蛋白质的溶液注入 RAM 柱，该柱具有短链亲水性键合相（例如烷基二醇），该键合相经专门设计可阻挡蛋白质，还允许小分子扩散进入其孔隙中并与键合的反相发生相互作用；溶液的蛋白质部分可通过切换阀排入废液中；一种类似材料具有亲水性聚合物，能通过覆盖 C18 固定相表层执行相同的功能。	17-21
湍流流动色谱	具有大粒径（约 50 μm）键合硅胶的小直径反相色谱柱（内径 1 mm）可在非常高的线速度下（高达 8 mL/min）运行；虽然雷诺数不在湍流范围内，但由于线速度非常高，低扩散的蛋白质和其他血浆组分将无法穿过填料孔隙，进而被冲入废液中；小分子物质（通常为药物及其代谢物）则能够穿过孔隙并保留在反相填料中。接下来使用水性-有机流动相将小分子洗脱进入质谱仪中	22-25
离子交换 (请参阅第 9 章)	通过调节流动相的 pH 使生物体液的蛋白质部分带净正电荷或净负电荷，使离子交换柱选择性地保留生物大分子；小分子则会通过柱，不会被保留，并且可通过第二维色谱柱富集，进行后续的 HPLC 分析。可采用离线或在线方法	26-28
体积排阻色谱 (请参阅第 11 章)	选用与水兼容的适当小孔径填料，可阻挡蛋白质并使其首先从柱中洗脱下来，而小分子量化合物则在接近总渗透体积时洗脱出来	29-34
反相 (请参阅第 9 章)	采用键合到大孔径硅胶上的弱疏水性短烷基链固定相（例如 C3 或 C4），可保留蛋白质，且与极性药物的相互作用更少，因此它们可用于保留蛋白质并使小分子通过	35-36
高丰度蛋白质的去除 (请参阅第 15 章)	键合至固相填料的抗体亲和相可去除人和其他血浆/血清样品中的高丰度蛋白质（多达 20 种）；由于低丰度蛋白质不与柱介质发生相互作用，因此它们可作为未保留峰收集。然后它们可通过痕量富集技术进行浓缩，并进行进一步的研究。该技术更常用于低丰度蛋白质的研究，而较少用于生物体液中药物和代谢物的分析	37-41

最常用的方法是加入有机溶剂。有机溶剂能够降低血浆蛋白溶液的介电常数，从而增强蛋白质分子之间的静电相互作用。有机溶剂还能够置换与蛋白质疏水部分相连的水分子。由于最大限度减弱了疏水相互作用并增强了静电相互作用，蛋白质开始聚集，然后沉淀。在低于蛋白质等电点的任何 pH 条件下，酸性试剂都会与蛋白分子中带正电荷的氨基形成不溶性盐。金属离子与蛋白质上的氨基结合，从而置换质子。这也会降低蛋白质的等电点，同时置换的质子也会降低溶液的 pH，导致蛋白质沉淀。高盐浓度会减少可用的水分子，使蛋白质脱水，进而增强疏水相互作用，导致蛋白质聚集。

表 16.3

沉淀血浆蛋白质的化学试剂		
试剂类型	典型试剂	注释
有机溶剂	乙腈、甲醇、乙醇	最常用的是乙腈；它可以不可逆地破坏蛋白质的三维结构
酸类	三氯乙酸、高氯酸、钨酸	不可逆地破坏蛋白质的三维结构
金属离子	氢氧化铋、硫酸铜-钨酸钠	
盐类	硫酸铵	盐析效应；蛋白质变性可能是可逆的，透析出多余的盐之后蛋白质有可能复性

沉淀之后，通过离心或过滤去除变性的蛋白质，留下透明的上清液，并取其中一部分转移到另一个试管或样品瓶中。如果采用离心方法，需要使用相对较高的离心力 (10000-15000 g) 才能分离沉淀的蛋白质。由于离心包括多步手动操作，所以不太适用于高通量分析。对于这类实验室，使用更为普遍的是“流通”式 96 孔过滤板，而且它能实现全过程自动化。在这种过滤板中，每个孔的底部都有一个小型滤膜，该滤膜可将沉淀的蛋白质滤出，使得上清液能够在出口处被收集到 96 孔收集板中。采用这种过滤板时，“溶剂优先”法是沉淀血浆中的蛋白质最为有效的方法。但是，在常规的 96 孔过滤板上，低粘度溶剂（例如乙腈）总是会在添加血浆之前就在重力作用下过早地从板上开始滴落。现在已经有了专门设计的新型专用无滴落过滤板（例如安捷伦科技公司的 Captiva ND 过滤板），它们所用的材料能够无滴落地有效留住沉淀所用的有机溶剂。只有施加真空时样品才能通过滤膜。这样可避免损失样品，还实现了无障碍的自动化方法。先加入有机溶剂，然后加入生物样品，充分混合，接下来施加真空，滤出沉淀的蛋白质。只需几分钟，即可得到无颗粒、无蛋白质的样品。对于样品数量不多，不需要使用 96 孔过滤板的操作人员，还有 SPE 小柱形式和一次性滤膜过滤器形式的单滤膜 Captiva 过滤器可供选择。

此处展示了使用无滴落 96 孔过滤板和离心方法对加标了 b-受体阻滞剂类药物的血浆进行样品前处理的一个实例⁴²。表 16.4 列出了样品前处理过程中的各个步骤以及每一步所用的时间。离心操作涉及几个手动步骤，而使用 96 孔过滤板的方法可以实现完全的自动化，从而显著节省了时间，并免除了很多手动操作。我们进行了几个检测实验来说明使用膜过滤的蛋白质沉淀法的有效性。采用微粒 1.8 μm ZORBAX Eclipse Plus HPLC 色谱柱 (2.1 x 50 mm) 以及梯度洗脱，将过滤样品的上清液进行 5000 次进样分析，结果柱压仍可保持相对恒定，这表明蛋白质去除得非常彻底。经同样次数的进样分析 b-受体阻滞剂（美托洛尔、纳多洛尔、呋洛洛尔和普萘洛尔）所得的保留时间和 MS 峰面积也保持恒定。

表 16.4

使用 Agilent Captiva ND 96 孔过滤装置和离心方法进行蛋白质沉淀的样品前处理时间比较 ⁴²			
离心	时间 (min)	96 孔过滤装置	时间 (min)
将 0.2 mL 加标血浆样品和 0.6 mL 乙腈 + 0.1% 甲酸加入到离心管或空的 96 孔板内	5	将 0.2 mL 加标血浆样品和 0.6 mL 乙腈 + 0.1% 甲酸加入到无滴落 96 孔板内	5
以 10000 RPM 的转速离心 10 min	11	用移液枪将每个孔中的样品混合五次并施加真空	
将上清液转移到 2 mL 进样用样品瓶中（如果使用的是离心管）或新的空 96 孔板上（如果使用的是多孔板）进行分析	10	将进样板直接用于分析	0
样品前处理所需的总时间	26	样品前处理所需的总时间	5

亲脂性物质的去除

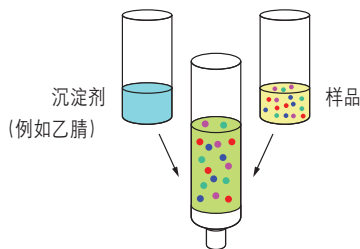
如前所述，蛋白质沉淀法在很大程度上只能去除血浆样品中的蛋白质。而盐类、低含量的蛋白质、脂质、磷脂、溶血磷脂酰胆碱，以及其他赋形剂仍然留在上清液中。由于测定药物和生物体液主要采用的技术是反相 HPLC，因此留在上清液中的盐类影响不大，因为大部分盐类都会随着溶剂前沿或其附近部分从反相色谱柱中被洗脱出去。但亲脂性化合物是个问题，因为它们会出现在反相色谱图疏水性部分的后方，对分离造成干扰，还会滞留在色谱柱上，滞后流出，并且/或者造成 MS 信号的离子抑制。采用固相萃取法可以去除部分这类化合物，但却增加了样品前处理过程的复杂性。

一种能够更加快速且更加经济有效地去除这些亲脂性化合物的方法是使用 Captiva ND^{Lipids} 96 孔过滤板或者与其等效的单管产品。图 16.4 展示了如何使用这种过滤板去除血浆样品中的沉淀蛋白质和脂质。该装置采用了双层过滤器设计：第一级的无滴落过滤器可去除沉淀的蛋白质，第二级的过滤器（专利）可去除亲脂性化合物。通常使用 50-200 μL 的血浆样品。以有机溶剂:血浆 3:1 的比例加入沉淀试剂（有时称为破碎溶剂）甲醇或乙腈。调节 pH 使目标分析物离子化。对于碱性化合物，我们建议在甲醇中加入 0.1%-1% 的甲酸。对于酸性化合物，我们建议使用 pH 为 9，浓度为 5-10 mM 的甲酸铵缓冲液。为了使沉淀更加彻底，我们建议使用移液枪进行抽吸混合，而不是采用轨道式振荡或涡旋混合。过滤/除脂步骤耗时应为 5 分钟或更短。

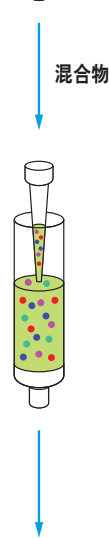
图 16.4

Captiva ND^{Lipids} 脂质/ 蛋白质去除过滤板

1 加入沉淀试剂



2 沉淀



3 过滤

图示说明

- 盐类
- 蛋白质
- 脂质
- 分析物



图 16.5 比较了使用 Captiva ND 和 Captiva ND^{Lipids} 去除血浆中亲脂性物质的结果。采用 184 → 184 (源内裂解) MRM 离子对, 可将磷脂酰胆碱作为监测离子抑制的指示。从 **图 16.5** 中可以看出, 大部分含脂质物质的含量均有所下降。进一步比较的结果如 **图 16.6** 所示, 通过柱后注射实验对脂质进行了研究, 并比较了处理血浆样品的各种方法。通过对比可以明显看出, 如果分析人员想要消除 LC-MS/MS 分析中的亲脂性离子抑制, 仅采用蛋白质沉淀法远远不能满足需要。SPE 和液液萃取纯化血浆样品的效果相当。而脂剥离与蛋白质沉淀结合的方法表现出最佳的总体基线。去除含磷化合物的另一种方法是使用对磷具有高度亲和性的氧化钛或氧化锆类吸附剂。

图 16.5

Captiva ND 的使用 Lipids 纯化装置的作用

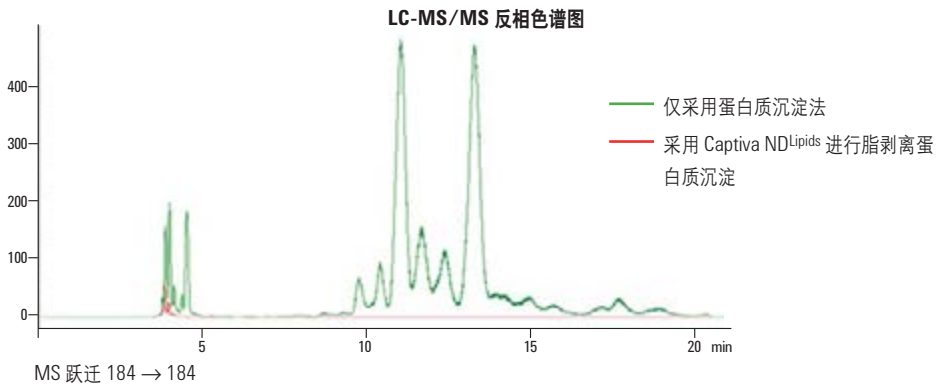
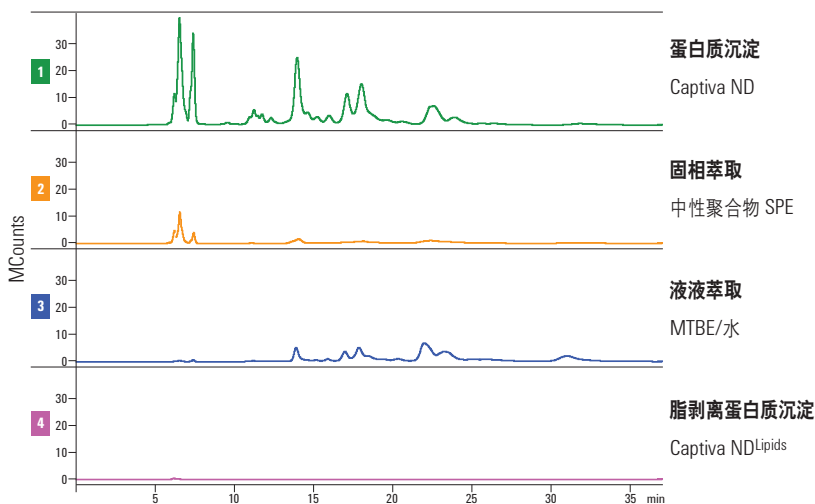


图 16.6

柱后灌注研究：脂质



生物组织样品的样品前处理*

生物组织样品的样品前处理一直以来都是一项极为繁琐和费时的实验室工作。从组织被切割下来的那一刻起，我们就必须高度重视样品的储存、处理（无论是通过机械方法还是化学方法）、提取和最终分析。即使顺利完成了这些处理过程，组织分析数据的可用性以及分析的质量（准确度、精密度和重现性）仍然是不确定的。尽管组织分析从某种程度上来说非常棘手，但是近十年来，在探索组织样品前处理的新方法方面，以及更好地理解传统方法的风险和优势方面，我们仍然取得了重大的进展。在这里我们将简要介绍定量生物分析应用中人体和动物组织的样品前处理。但不包括显微技分析、成像分析和元素分析的组织样品前处理。我们将介绍和比较传统的提取技术和新的方法。

* 部分摘自参考文献 43

为什么要进行组织分析?

涉及组织前处理的几个应用领域包括制药、分子生物学、食品科学、法医学和毒理学。在药物研究中,组织的定量分析可用于评估药物作用位点上的组织摄取、关联药物浓度与药代动力学和药效动力学响应,以及预测毒性和剂量。组织样品经处理后可获取其中的蛋白质、多肽、纯化的 DNA 或 RNA 用于分子生物学研究。在食品科学研究中,测定饲养动物组织中的防腐剂、农药残留、生长激素和药物残留非常重要。例如,在食用动物中使用抗生素的问题越来越受到关注,因为即使人类食用的肉类中仅有痕量的氟喹诺酮抗生素残留,也有可能提高人体内的细菌抗药性。组织分析的另一个重要应用领域是法医或毒理学分析,无论是根据犯罪现场的证据确证嫌疑犯身份,还是确定是否发生了中毒或药物过量,都能应用该方法。因为几乎从任何人类组织中都能提取到 DNA,因此我们可以将从犯罪现场的证据中提取到的 DNA 与从已知个体中提取到的 DNA 进行比对。在毒理学或 DNA 检测中,组织通常与血液、尿液和毛发样品一起使用。

组织前处理技术的类型

组织前处理技术可以分为机械、酶解或萃取仪器。某些已成功地应用于其他类型固体样品(例如土壤或植物体等)的技术(第 14 章)也可以用于组织。组织样品虽然是固体,但我们应该认识到其本质上含水性极高,我们可以利用这一点来碎裂组织基质中的细胞。通常,采样后我们会立即将组织块放入液氮中急速冷冻,并在处理之前将其保存在非常低的温度下(-20 或 -70 °C)。与任何其他生物基质一样,我们应针对生物危害采取一定的安全预防措施。组织样品从冰箱中取出之后最好立即处理,因为解冻过程将产生不便切片或切块的弹性块状物。如果需要大量组织进行前处理,应将样品分成几小批顺序处理,而不要一次性解冻所有样品。

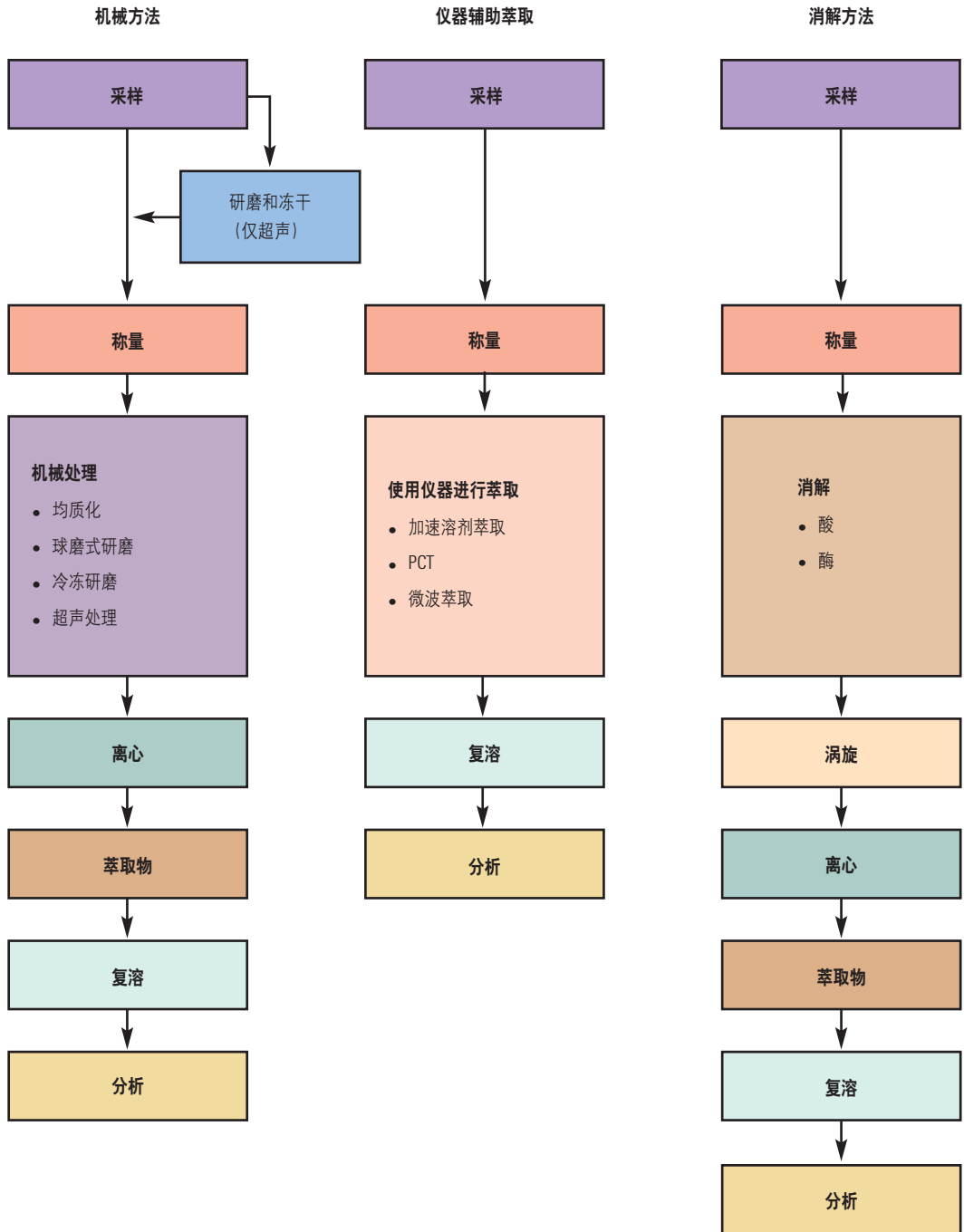
表 16.5 对各种技术进行了简单的比较。所述组织前处理方法的工作流程如图 16.7 所示。每种技术都有其各自的优缺点,有时我们还可以结合使用某些技术以实现最佳提取效果。

表 16.5

组织样品前处理技术						
技术	主要应用	处理整个组织样品块	分析物稳定性问题	自动化	价格低	高样品通量
均质机	小分子、蛋白质、多肽、DNA、RNA	是	否	否	是	否
超声仪		否	否	否	否	否
球磨式研磨器	DNA、核酸	是	否	是	是	是
冷冻/研磨		是	否	是	否	是
自动均质器	小分子、蛋白质、多肽、DNA、RNA	是	否	是	否	是
酸或碱	DNA、核酸	是	是	否	是	是
酶解	小分子、DNA、核酸	是	可能	可能	是	是
加速溶剂萃取 (ASE) 或加压流体萃取	环境样品 (土壤、食品)	是	是	是	否	是
微波加速提取		否	是	是	否	是
压力循环技术 (PCT)	DNA、核酸	是	否	是	否	是

图 16.7

组织样的前处理方法工作流程对比



机械技术

在一系列定性或定量应用中，均质或“研磨”仍是制备组织样品最常用且最实用的方法。一开始，由发动机和一组刀片组成的小型不锈钢探头型搅拌器会进行剧烈混合和搅拌，并将样品物理切割成小块。然后，称取一定量的样品（10 mg 到 1 g），加至含有已知体积缓冲液的样品瓶中。缓冲液的 pH 可调节为符合提取所需的条件。所得的样品或均质物为半固体性质，可以按照与处理血浆基本相同的方式进行处理。延长均质步骤，或对均质物进行离心后倾出上清，将最大限度地减少均质物中的大颗粒。

均质机是一种紧凑且相对廉价的小型仪器，仅需极少的培训即可进行操作。但操作人员会过度暴露在高速混合的噪音中，需要对耳进行保护。在处理每个样品之间的间隙，应充分地重复冲洗探头，以避免交叉污染。使用并联均质机，采用多探头的平行处理方法可加快均质速度。这种类型的均质机配备了 4 或 6 个探头的均质机探头组件，或具有各种尺寸切割刀片的超声处理仪。通过三个可编程的清洗工作站可对探头进行自动清洗。在 248 页的边栏处，“大鼠脑组织中地昔帕明分析的均质方法”介绍了在脑组织的地昔帕明分析中采用均质方法的典型样品前处理流程。

超声处理是另一种均质方法。在超声处理中，首先对组织样品进行急速冷冻，然后立即在液氮浴中用研钵和研杵将其研磨成细小粉末。称量粉末并妥善保存，在分析之前，将其与已知体积的缓冲液混合，然后将专门设计的声学工具（变幅杆或探头）直接放置在粉末和缓冲液的混合物中进行超声处理。该方法比均质更直接，但要使组织粉末化，需要大量的手动操作，这可能会造成操作者的职业健康问题（例如腕管综合症）。与使用均质机时相同，在样品与样品之间应彻底清洁超声探头。

珠磨式研磨器代表了一种自动化程度更高的组织样品前处理方法。25年前由 BioSpec Products (美国俄克拉何马州巴特勒斯维尔) 推出的珠磨式研磨器是一种独特但设计简单的仪器, 它利用小型研磨珠和高速马达粉碎细胞。坚硬的聚四氟乙烯叶轮高速旋转, 使得数千个小型研磨珠在特殊形状的容器中碰撞, 从而快速、高效且安全地破碎细胞。每个样品分别放置于装有规定量的研磨珠和缓冲液的独立试管中, 然后搅拌 15-20 分钟。由于是在一次性微量离心管中进行均质, 可确保最大限度地减少样品的交叉污染。

另一种形式的珠磨式研磨器是 SPEX Certi-Prep (美国新泽西州梅塔钦) 的冷冻研磨机, 它使用小型磁棒而非研磨珠来粉碎样品。通过将样品室浸入液氮浴中进行冷却。冷冻研磨机适用于较大的样品 (>500 mg), 但也可以针对小型样品进行定制。无论是采用冷冻研磨机还是珠磨式研磨器, 都需要将样品放入第二容器中, 该容器可以是一次性的, 也可以不是。清洁非一次性样品容器是一项费力的工作, 因此应尽可能使用一次性容器。

由路易斯安那州立大学的 Steven Barker 首创的新技术基质固相分散 (MSPD, 请参阅第 10 章) 在食品科学领域广为人知, 但药物研究人员却对该技术了解甚少⁴⁴⁻⁴⁵。与机械技术 (如珠磨式研磨器) 类似, MSPD 利用了混合组织样品与大型硅胶颗粒 (>50 μm) 以及使用研钵与研杵进行研磨时产生的剪切力。使用各种固相化学填料可将农药或药物等分析物从组织中提取出来。分析物留在硅胶或键合硅胶颗粒上, 随后使用适当的溶剂即可将其洗脱下来。目前这一多步骤方法需要反复且仔细的手动操作, 但我们可以想象, 未来它必将实现自动化或与前文所述的某些装置结合使用。

一篇已发表的出版物报道了基于 MSPD 在线 SPE 纯化方法，随后采用 LC-MS/MS 分析鱼类组织中（不是人组织）真菌毒素的应用⁴⁶。在这篇出版物中，作者测定了虹鳟鱼中 ppb 级的玉米烯酮 (ZON) —— 一种非甾体类雌激素大环内酯类真菌毒素。首先将鱼切成小块，冷冻，然后置于玻璃研钵中。向研钵中加入 2 g C18 SPE 填料，用研杵剧烈混合均匀。将得到的粉末在 40 ° C 烘箱中干燥，然后将混合物填充到配备了聚乙烯过滤盘滤芯的 6 mL 聚丙烯柱中。接着将该聚丙烯柱与另一个填充了石墨化炭黑 (GCB) 的 SPE 柱串联。用甲醇-水 (70-30 v/v) 将 ZON 从上面的柱（来自 MSPD 实验）中洗脱到下面的 SPE 柱中。ZON 和干扰物都会被捕集在 GCB 柱上。通过一系列的溶剂冲洗去除干扰物后，再用二氯甲烷-甲醇混合物 (80-20 v/v) 洗脱 ZON。收集洗脱液，在氮气流下将其蒸干，用兼容 LC 的溶剂复溶，然后采用 LC-MS/MS 进行分析。在方法开发过程中，作者还曾使用氧化铝作为基质分散试剂，但最后发现采用 C18 可获得更出色的回收率和更低的 %RSD。

大鼠脑组织中地昔帕明分析的均质方法

1. 制备样品时，将称量过的一小块脑组织放入样品瓶中。加入适量的去离子水，使每毫升水中含 0.1 g 组织
2. 制备标准溶液和质量控制样品时，将称量过的一小块脑组织放入样品瓶中。加入适当体积的地昔帕明储备液 (10 mg/mL) 和去离子水，使每 mL 水中含 0.1 g 组织
3. 至少应均质处理 300 mg 空白组织 + 3 mL 去离子水，以获得足够的空白基质用于标准曲线、质量控制样品和空白的制备
4. 对样品、初始工作标准溶液和质量控制样品进行 3-5 min 的均质处理，每次处理后清洗探头
5. 用空白均质基质稀释标准工作溶液和质量控制样品，制备线性动态范围内的标准溶液和质控样品。充分涡旋混合
6. 取等量的 100 μ L 样品、标准品、质量控制样品和空白，并分别与 200 μ L 200 ng/mL 的氟哌啶醇（内标）乙腈（蛋白质沉淀和样品萃取）溶液混合
7. 涡旋混合 5 min，以 4000 RPM 的转速在 4 °C 下离心 5-10 min
8. 转移上清液并进样至 LC-MS/MS 系统

酶解技术

机械技术对于破坏细胞结构以及从非血管化或低含水量的组织（例如骨骼、软骨或毛发）中提取分析物帮助不大。对于 DNA 或核酸等可耐受苛刻条件的物质，我们经常采用强酸（例如 12 N 盐酸）分解等极端方法。而特定的酶则可以用于分解组织样品。

现在已有商品化的装置可供选择，它们包括由抗腐蚀性介质的材料制成的裂解罐。这种裂解罐也可以作为微波萃取系统（将在后面介绍）的容器。

酶解，一种常用于组织分解以及从细胞中获取蛋白质和 DNA 的技术，具有样品前处理可实现无人值守运行、可自动化和低成本等优势。酶解性质和效率各不相同的多种酶为我们提供了广泛的选择。酶的选择取决于需要进行酶解的目标组织或组分（例如软骨）。虽然酶解技术已经应用了几十年，但是很少有出版物涉及组织样品前处理中为获得小分子而进行的酶解⁴⁷。

人们对酶解作为药物生物分析中组织前处理技术的一种替代技术的可行性进行了研究⁴⁸。选择了胶原酶和蛋白酶 K 两种酶进行评价，这两种酶均能酶解结缔组织以使组织分解，且分别代表了较为温和的消化酶（胶原酶）和较为强烈的消化酶（蛋白酶 K）。结果表明，酶解的提取效率与均质方法相当，使用胶原酶或蛋白酶 K 的酶解方法可以作为分析组织中的小分子时的替代样品前处理方法。

用酶解法制备受损伤大鼠脑组织样品并检测其中的化合物浓度，所得结果与使用传统组织均质法制备样品检测所得的数值具有很好的一致性，这表明酶解法也是一种适用于组织样品前处理的方法⁴⁸。根据所需的酶解强度，还可以使用各种不同的酶，例如胰蛋白酶、木瓜蛋白酶或弹性蛋白酶等。

萃取仪器

人们也曾经评估过（或至少考虑过）一些用于其他类型固体样品的提取仪器用于组织样品前处理的可行性。但是，预期用途与仪器设计在样品尺寸方面相冲突。使用这些仪器时，必须考虑样品室或样品瓶的数量和尺寸，以及最终的提取体积。加压流体萃取（PFE）仪器（第 14 章）使用高温高压的液体溶剂，在极短时间内用少量溶剂从固体或半固体样品中萃取分析物。使用 PFE 时，样品密封在经过加压和加热且充满了提取溶剂的不锈钢容器中。静态提取样品 5-10 分钟，溢出的溶剂排入收集样品瓶中。

接下来，压缩氮气将剩余溶剂吹扫进同一样品瓶中。由于该技术使用液体溶剂，所以可用于目前使用液体溶剂的任何应用。整个过程通常只需不到 15 分钟，10 g 的样品大约需要 15 mL 溶剂⁴⁹。该技术已被应用于从动物、植物、鱼类组织、食品、聚合物中提取小分子化合物，以及土壤中多种类型的环境污染物的提取。

微波加速提取（第 14 章）已作为一种加速提取过程的技术广泛应用于固体样品。微波加热可以驱动多种化学过程，包括酸消解。但是，大多数组织以及组织内分析物的热不稳定性限制了这项技术在组织中的应用。

还有一种新型萃取仪器，它基于压力循环技术（PCT）。该仪器利用超高压和常压的重复循环从组织中提取蛋白质和核酸⁵⁰。这项新技术已被应用于从多种生物体中（包括病毒、细菌、动植物细胞和组织）定量提取核酸、蛋白质和小分子化合物。

选择组织前处理技术时的考虑因素

如何针对应用选择最适合的组织前处理技术，是一个难以解决的问题。样品通量、分析物回收率、分析物的热稳定性、可用的样品量、可用的样品前处理技术、精密度、准确度、所需的人力，以及操作者安全只是选择最佳样品前处理技术时必须考虑的因素的其中几点。图 16.8 比较了使用各种技术处理 50 份组织样品所需的典型处理时间⁴³。

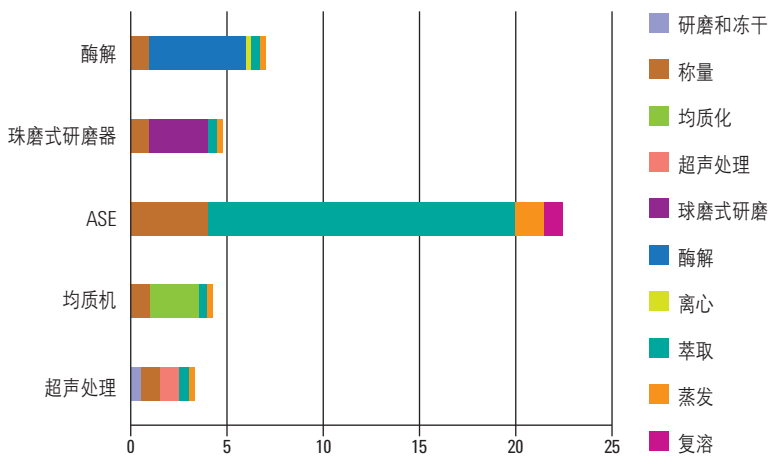
一般来说，最简单的方法——均质是最安全，也是最经济的。但如果您的实验室每个月要分析的组织样品很多，那么投资新技术也是一种合理而经济的途径。对许多用于其他类型固体样品的装置经调整也可用于处理组织样品。但是，科学家应该审慎地判断所用方法的风险（交叉污染、人工干预、分析物不稳定性）是否大于其优势。应尽可能最大程度地降低单个样品之间的交叉污染，且前处理技术必须与接下来将使用的分析方法（即 GC、LC/MS 等）兼容。组织本身的性质也是必须考虑的因素之一，因为纤维结缔组织（例如肌肉）与高含水量的组织（例如眼角膜）相比需要强度更大的处理操作。

组织分析具有其特有的挑战性。无论何种应用，都普遍缺乏适合基质或相应基质中各种分析物的参比物质。我们很难回答有关分析物在组织基质中的空间分布异质性的问题，除非使用放射自显影等成像技术。组织定量需要繁琐的样品称量（切片和切块）步骤，以获得良好的准确度和精密度。因此，可准确获取一定量的组织的技术（如 ASE）都需要在组织称量方面花费大量时间。虽然我们通常都会使用内标 (IS)，但它通常都是以溶液形式加入制备所得的均质物、酶解物或萃取物中。很可惜，目前还没有能够将内标分散到组织基质中的物理方法，所以我们无法测定基质中 IS 的萃取效率。

用于其他固体样品的提取装置通常都难以在各种装置之间进行放大或缩小，而且还需要购买专门针对某一样品重量范围的样品容器。通常我们都难以获得（也通常不可能获得）分析标准品与样品之间完整的分析物提取效率相关性。然而，尽管存在这些挑战，科学家们仍然能够在成熟方法和新方法之间进行选择，例如在均质法和酶解法、96 孔珠磨式研磨器等更新且更经济有效的方法之间作出选择。

图 16.8

各种样品前处理方法耗费总时间对比



从含 50 个样品的样品组所得的数据进行计算。所示的时间为典型时间，且与组织类型无关。

结论

虽然传统的生物样品前处理方法已使用了多年，但人们对更高效、更快速和高通量分析的追求仍推动着新技术的开发。我们希望新技术比传统方法更快速，并且能够提供与传统方法相当的（即使不能更加出色）重复性和分析物提取效率。通过使用 96 孔板实现自动化，有助于提高总体工作效率，并且越来越多的样品前处理技术（例如液液萃取、支持液相萃取、过滤、蛋白质沉淀等）都开始采用这种模式。对于液体样品（例如全血、血浆和尿液），从手动方法到自动化方法的转换相当简单。在组织样品前处理领域，用户可选择的技术多种多样，包括传统的均质或超声处理，到酶解和压力循环技术等新型技术。用户需要从速度、成本和自动化程度等方面比较这些技术。

参考文献

1. Morello, R.; Milokovic, J.; Boos, K.-S. *Therapeutic Drug Monitor* **2007**, *29*, 505
2. Berger, I.; Morello, R.; Boos, K.-S. *LC-MS/MS Analysis of Drugs in Whole Blood: A Unique Solution for Total Automation and Undisturbed Detection*, Poster P-527-W, presented at HPLC 2010, Boston, MA, **June 19-24, 2010**
3. Berger, I.; Morello, R.; Kinzig, M.; Boos, K.-S. *LC-MS/MS Analysis of Immunosuppressants in Whole Blood: Comparison of Dried Blood Spots, Heat Shock or Cryogenically Treated Blood and Denatured Blood*, Poster P-528-M, presented at HPLC 2010, Boston, MA, **June 19-24, 2010**
4. Bang, I. *Ein Verfahren zur Mikrobestimmung von Blutbestandteilen*, *Biochem. Ztschr.* **1913**, *49*, 19-39
5. Guthrie, R.; Susi, A. *Pediatrics* **1963**, *32*, 338-343
6. Bowen, C. *American Laboratory* **2010**, *42 (10)*, 11-14
7. Evans, C.A. *The Application of Dried Blood Spots for Quantitation of Xenobiotics – A Paradigm Shift within Pre-Clinical DMPK*, The Delaware Valley Drug Metabolism Discussion Group, **February 11, 2010**
8. Patrone, L.M. *Direct Comparison of DBS Analysis to Plasma and Whole Blood Analysis in Toxicokinetic Studies of Rats, EBF Workshop Connecting Strategies on Dried Blood Spots*, Brussels, Belgium, **June 17-18, 2010**
9. Spooner, N.; Lad, R.; Barfield, M. *Anal. Chem.* **2009**, *81 (4)*, 1557-1563
10. Abu-Rabie, P.; Spooner, N. *Anal. Chem.* **2009**, *81 (24)*, 10275-10284
11. Saussereau, E.; Lacroix, C.; Gaulier, J.M.; Gouille, J.P. *J. Chromatogr. B* **2012**, *885-886*, 1-7
12. Majors, R.E. *LCGC No. America* **2011**, *29 (1)*, 14-27
13. Biddlecombe, R.A.; Pleasance, S. *J. Chromatogr. B*, **1999**, *734 (2)*, 257-265
14. Li, J.; Wang, L.; Chen, Z.; Xie, R.; Li, Y.; Hang, T.; Fan, G. *J. Chromatogr. B* **2012**, *895-896*, 83-88
15. Dawes, M.L.; Gu, H.; Wang, J.; Schuster, A.E.; Haulenbeek, J. *J. Chromatogr. B* **2013**, *934*, 1-7
16. Makkar, H.P.S. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37 (4)*, 1197-1202
17. Oliveira, R. V.; Cass, O.B. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54 (4)*, 1180-1187
18. Wa, C.; Maltik, R.; Hage, D.S. *Anal. Chem.* **2008**, *80 (22)*, 8751-8762
19. Santos-Neto, A.J.; Markides, K.E.; Sjoberg, P.J.R.; Bergquist, J.; Lancas, F.M. *Anal. Chem.* **2007**, *79 (16)*, 6359-6367
20. Willemssen, O.; Machtejevas, E.; Unger, K.K. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1025 (2)*, 209-216
21. Rbeida, O.; Christiaens, B.; Hubert, Ph.; Lubda, D.; Boos, K.-S.; Crommen, J.; Chiap, P. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1030 (1-2)*, 95-102
22. Herman, J.L.; Edge, T. *LCGC No. America* **2012**, *30 (3)*, 200-214
23. Xin, G.-Z.; Zhou, J.-L.; Qi, L.-W.; Li, C.-Y.; Liu, P.; Wen, X.; Li, P. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878 (3-4)*, 435-441
24. Bunch, D.R.; Heideloff, C.; Ritchie, J.C.; Wang, S. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878 (31)*, 3255-3258
25. Mottier, P.; Hammel, Y.-A.; Gremaud, E.; Guy, P.A.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *56 (1)*, 35-43

(接转下页)

参考文献 (接转下页)

26. Mansson, M.; Phipps, R.K.; Gram, L.; Munro, M.H.G.; Larsen, T.O.; Nielson, K.F. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (6), 1126-1132
27. Wang, L.-Q.; Zeng, Z.-L.; Su, Y.-J.; Zhang, G.-K.; Zhong, X.-L.; Liang, Z.-P.; He, L.-M. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (25), 6359-6363
28. Reedy, C.R.; Hagan, K.A.; Strachan, B.C.; Higgonson, J.J.; Bienvenue, J.M.; Greenspoon, S.A.; Ferrance, J.P.; Landers, J.L. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5669-5678
29. Bertini, S.; Bislo, A.; Torri, G.; Bensi, D.; Terbojevich, M. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 168-173
30. Hu, L.; Li, X.; Jiang, X.; Zhou, H.; Jiang, X.; Kong, L.; Ye, M.; Zou, H. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (2), 801-808
31. Lindemann, T.; Hintelmann, H. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (18), 4602-4610
32. Mandal, B.K.; Suzuki, K.T.; Anzai, K.; Yamaguchi K.; Sei, Y. *J. Chromatogr. B* **2006**, *874* (102), 64-76
33. Bowsher, R.R.; Santa, P.G. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877* (8-9), 689-696
34. Zhou, W.; Bi, J.; Janson, J.-C.; Li, U.; Huang, Y.; Zhang, U.; Su, Z. *J. Chromatogr. B* **2006**, *838* (2), 71-77
35. Svensson, J.-O.; Barkholt, L.; Sawe, J.; *J. Chromatogr. B* **1997**, *690* (1-2), 363-366
36. Pagel, P.; Schubert, R.; Wolf, H.W. *J. Chromatogr. B* **2000**, *746*, 283-295
37. Zolotarjova, N.; Mrozinski, P.; Majors, R.E. *LCGC No. America* **2007**, *25* (2), 118-140
38. Martosella, J.; Zolotarjova, N.; Liu, H.; Nicol, G.; Boyes, B.E.; *J. Proteome Res* **2005**, *4* (5), 1522-1537
39. Zhang, K.; Zolotarjova, N.; Nicol, G.; Martosella, J.; Yang, L.-S.; Czafranski, C.; Bailey, J.; Boyes, B. 安捷伦多重亲和去除系统用于人血清中高丰度蛋白的去除—新型安捷伦技术 (Agilent Multiple Affinity Removal System for the Depletion of High-Abundant Proteins in Human Serum—A New Technology from Agilent), Agilent Application Note #5988-9813EN, **2003**
40. Brand, J.; Haslberger, T.; Zolg, W.; Pestlin, G.; Palme, S. *Proteomics* **2006**, *6*, 3236-3242
41. Shen, Z.; Want, E.J.; Chen, W.; Keating, W.; Nussbaumer, W.; Moore, R.; Gentle, T.M.; Siuzdak, G. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 3154-3160
42. Chang, M. 自动化蛋白质沉淀样品制备实现高通量生物分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-9030CHCN, **2011年9月**
43. Yu C.; Cohen, L.H. *LCGC No. America* **2003**, *21* (11), 1038-1048
44. Barker, S.A.; Long, A.R.; Short, C.R. *J. Chromatogr.* **1989**, *475*, 353-361
45. Barker, S.A. LCGC, *Current Trends and Developments in Sample Preparation* **May, 1998**, S37-S40
46. Lagana, A.; Bacaloni, A.; Castellano, M.; Curini, R.; De Leva, I.; Faberi, A.; Materazzi, S. *J.A.O.A.C.* **2003**, *86* (4), 729-736
47. Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Semeniuk, S. *J. Chromatogr. A* **2001**, *914*, 89-94
48. Yu, C.; Penn, L.D.; Hollembaek, J.; Li, W.; Cohen, L.H. *Proc. 51st Annual Conference American Society of Mass Spectrometry and Allied Topics, ThPM 257*, **2003**
49. Draisci, R.; Marchiafava, C.; Palleschi, L.; Cammarata, P.; Cavalli, S. *J. Chromatogr. B* **2001**, *753*, 217-223
50. Schumacher, R.T.; Manak, M.; Gerret, P.; Miller, W.; Lawrence, N.; Feng, T. *American Laboratory* **2002**, *34* (16), 38-44

LC/MS 样品预处理

由于质谱具有高特异性和低检测限,被认为是一项高分辨率的灵敏检测技术。适当的样品前处理及 HPLC 操作可确保其获得最佳的化合物测定定性和定量结果。随着质谱仪的灵敏度不断提高,我们能够更好地解决其应用领域中的一些棘手问题,但这也带来了另外一个问题——质谱对进入其离子源的流出物的质量要求也随之提高。虽然样品预处理步骤是在 HPLC 检测之前进行的,但使进入液相色谱的样品达到一定的质量要求仍然有助于质谱实现最佳性能。样品前处理是成功的质谱实验中不可或缺的一部分,但它往往会被忽略。LC-MS/MS 作为一项关键技术,广泛应用于生物分析、蛋白质组学、食品安全及其他要求高灵敏度、高通量分析的市场,而这也是导致人们开始忽略样品前处理重要性的最初原因。曾经,甚至一度有人认为样品前处理/色谱分离步骤是不必要的!如果认为单独使用质谱即可解决所有的分离问题,那就大错特错了,实际上这整个系统需要共同协作,我们应该认识到,良好的样品前处理有助于获得更好的质谱结果。因此,在 LC/MS 和 LC-MS/MS 分析中观察到以前未发生过的“基质”效应之后,研究人员终于开始重新思考样品前处理对于成功运用质谱这一强大技术的重要性。

LC/MS 方法最大的不确定性来自于样品基质,因为基质中可能含有各种已知类型的干扰物。样品及其基质(以及流动相)可能影响的因素为:

- 质谱干扰
- 系统受损
- 加合物形成
- 离子抑制效应

在 LC/MS 方法中，我们必须识别、去除、减少样品干扰物，或将它们可能造成的影响降至最低。

质谱干扰：与目标组分 m/z 值相同或相近的离子可能会造成质谱干扰。相似 m/z 值的离子通常可以在进入 MS 前通过色谱方法进行分离。如果不能预先分离这些离子（例如由于 MS 系统分辨率较低，或样品和基质非常复杂），分析人员可以利用 MS-MS 系统的多反应监测 (MRM) 功能更加清晰地分辨这些离子。使用飞行时间分析仪的 MS 系统通常能获得比单位质量分辨更好的效果，它可以拉开在低分辨率系统中重叠的峰。因此，与能够分辨 m/z 值非常接近的化合物的高分辨率质谱系统相比，低分辨率质谱系统通常都需要纯化程度更高的样品纯化步骤。

系统受损：通常，可在 LC/MS 接口上沉积，造成 LC/MS 系统性能下降的流动相组分或样品组分会使系统受损。最容易在大气压离子源或电喷雾离子源中沉积的组分是缓冲盐和离子对试剂。改用挥发性缓冲液，或仅仅使用挥发性酸（例如甲酸）或碱（例如氢氧化铵）调节 pH，可以解决这一问题。三氟醋酸 (TFA) 是蛋白质和多肽分离时最常用的 HPLC 流动相添加剂，因为它可以提供良好的峰形。但是，它的问题在于会引起离子对相互作用，因此许多分析人员更倾向于使用甲酸，以稍差一些的色谱峰形为代价，换来更好的 MS 信号强度。蛋白质等样品基质组分也可能在离子源中沉积。可去除蛋白质的方法包括沉淀、透析、SPE、体积排阻色谱、免疫亲和色谱以及其他许多方法（请参阅第 16 章，蛋白质的去除）。脂质（尤其是磷脂）可对质谱仪造成极大损坏，采用新型二氧化钛吸附剂以及其他 SPE 吸附剂可去除这类隐患极大的干扰物（请参阅第 9、10 和 16 章）。在使用 MRM 的 MS-MS 分析中， m/e 184 处的信号通常代表存在磷脂污染物，当样品前处理技术无法去除此类干扰物时，您可利用这一点将它们与您的分析物峰进行色谱分离。

因此，使用表 15.1 中所列的各种技术去除盐类、离子对试剂和蛋白质等基质干扰物，有助于保持离子源洁净且无污染。某些新型的正交离子源可耐受一定程度的污染物积聚，但尽管如此，最明智的方法还是在多余组分进入 MS 离子源之前就将其去除。

加合物形成：目标组分加合了另一个离子，使图谱中目标组分出现的 m/z 值发生偏移。加合离子（例如钠、钾和铵）可能来自样品本身、试剂，甚至盛装样品的容器。硼硅酸钠玻璃器皿中的钠离子就是来自样品容器的加合物离子的一个实例。加合物形成可以作为改善大分子信号的一种方法。但是，我们通常都不希望发生不受控制的加合物形成，一般都会采用特定的样品前处理方法减少或去除这些加合物。前面的**表 15.1**列出了可去除离子的各种技术。

离子抑制/离子增强：未提取的基质化合物可能与目标分析物共洗脱，最后进入质谱仪的离子化室。这些组分会抑制目标组分的离子化，或在目标组分子化的过程中与目标组分竞争，从而造成离子抑制效应。这是由于存在挥发性较弱的化合物，它们可改变液滴形成或液滴蒸发的效率，进而影响最终抵达检测器的气相中带电离子的量。离子抑制是这些干扰物造成的最关键的问题，因为它通常是最难测定的。甚至某些不会显示在质谱图中的组分也可能引起离子抑制。某些共洗脱化合物会对电喷雾检测器产生强烈的影响。在测定复杂基质（例如生物体液）中的痕量分析物时，离子抑制效应是我们最应注意的问题。除了生物样品中常用的复杂缓冲液和表面活性剂系统之外，其他可引起离子抑制的物质还包括盐类、离子对试剂、内源性化合物（例如脂质、糖类和核酸，以及药物、代谢物和蛋白质）。在生物样品中，样品之间内源性化合物浓度的天然差异，可导致其离子抑制的水平各不相同。而这种差异会造成样品中目标化合物的信号响应产生不可接受的变化。最常发生情况的就是响应消失；因此我们通常使用“离子抑制”这一术语。离子抑制效应会影响分析的重现性和信号强度。在某些情况下，目标分析物的响应可能会增强，产生离子增强效应或获得比预期更强的信号。大气压化学电离检测器也受离子抑制的影响，但其受影响的程度低于电喷雾检测器。但是，无论使用 API 接口进行 LC/MS 定性分析还是定量分析，了解和消除离子抑制和离子增强效应都非常重要。

可以通过注射实验确定是否存在离子抑制。注射实验的具体操作是使用连接到色谱柱上的注射泵，连续地将含有目标组分及其内标的标准溶液引入色谱柱中。将空白样品萃取物注入 LC 系统后，如果原本恒定的基线向下偏移，则说明干扰物的存在对分析物产生了离子抑制。

虽然这不在本章的讨论范围内,但是已有多种方法可减弱离子抑制效应。其中包括改变离子化模式(例如从正离子化模式切换为负离子化模式)、样品稀释或减小体积、降低流速、提高色谱选择性,以及优化样品前处理效果。其中最后一种方法(优化样品前处理效果)可能会用到本书中介绍的多种样品前处理技术(例如 SPE 或液液萃取)甚至其他的技术,以获得最佳的谱图数据。用甲酸代替 HPLC 流动相中的三氟乙酸也有一定的效果。更多信息请参阅我们此前发表的有关离子抑制效应及其清除的讨论¹。更多有关 LC/MS 和 LC-MS/MS 样品前处理的信息,可参阅相关的文献综述²、教材³,以及 LC/MS 教材³⁻¹⁰。

API/MS 中最易形成的离子是质子化分子,用 $[M+H]^+$ 表示。类似地,去质子化分子 $[M-H]^-$ 会出现在负离子操作中。这些分子通过电喷雾中的离子蒸发和 APCI 中的气相化学电离形成。了解这些反应是了解产生离子抑制效应的原因的基础。在正离子操作中,气相离子-分子反应将形成最弱的酸(即最弱的质子供体)。例如,在氨 ($R-NH_2$) 的 APCI 分析中,水是比较更强的质子供体,因而更容易给出 H_3O^+ 中的质子,形成 $R-NH_3^+$ 离子。但是,如果我们现在大量引入另一种可形成比分析物形成的酸更弱的化合物(例如 R_3N),那么接下来气相反应将转而形成更弱的酸—— R_3NH^+ 。 $R-NH_2$ 分析物将不再电离,或电离不充分,因而在质谱图中能观察到的水平不显著。同样类型的质子转移反应也会发生在电喷雾接口中。负离子操作中也有类似的模式,该过程形成的是最弱的质子受体(最弱的碱)。

当形成了非常强的离子对,且 API 接口的条件无法使其断裂时,可能产生另一种类型的离子抑制效应。已有多种类型的离子对试剂被证明对离子抑制效应有促进作用,因此在 LC/MS 分析中我们应尽可能避免使用它们。

尽管该检测技术可提高分析的分辨率,但我们仍然应该适当地进行样品前处理,以改善 LC/MS 的性能。现代质谱技术(尤其是串联质谱技术)的灵敏度和选择性水平不断提高,对气相和液相样品的分析均产生了重大的影响。欲了解更多信息,读者可参阅第 21 章,这一章重点介绍了如何在分析过程中(分离和检测)实现选择性与其他性能指标的平衡,并介绍了“Just Enough”的样品前处理概念。

质谱中使用的溶剂及挥发性缓冲液

虽然样品前处理是色谱分析之前的步骤，但了解该步骤会用到哪些溶剂和缓冲液非常重要，因为除非进行交换或将其去除，这些添加物可能会进入 LC/MS 系统并影响目标分析物的离子化。表 17.1 和 17.2 分别列出了与质谱兼容的溶剂和挥发性缓冲液。应避免使用非挥发性缓冲液，因为它们可能污染进样系统并导致一些质谱离子源问题。缓冲液的一般浓度范围应为 1-10 mM。

虽然采用 TFA 作为 HPLC 流动相添加剂时碱性化合物能够获得良好的峰形，但它会在电喷雾 LC/MS 中抑制离子化，导致灵敏度降低，因此应避免使用。甲酸是更好的选择。

表 17.1

典型 LC/MS 溶剂				
溶剂	分子式	MW (Da)	沸点 (°C)	UV 截止波长 (nm)
乙腈	CH ₃ CN	41.05	81.6	190
氯仿	CHCl ₃	119.38	61.7	245
二氯甲烷	CH ₂ Cl ₂	84.93	40.0	235
乙醇	CH ₃ CH ₂ OH	46.08	78.5	210
乙酸乙酯	CH ₃ CO ₂ CH ₂ CH ₃	88.12	77.1	260
乙醚	(CH ₃ CH ₂) ₂ O	74.12	34.5	220
庚烷	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH ₃	100.21	98.4	200
己烷	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	86.18	69	200
异丙醇	CH ₃ CH(OH)CH ₃	60.11	82.4	210
甲醇	CH ₃ OH	32.04	65	205
正丙醇	CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH	60.11	97.4	210
四氢呋喃	C ₄ H ₈ O	72.12	66	215
甲苯	C ₆ H ₅ (CH ₃)	92.15	110.6	285
水	H ₂ O	18.02	100	无

表 17.2

典型 LC/MS 挥发性缓冲液			
挥发性缓冲液	结构	pKa	缓冲液范围
三氟乙酸	$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$	0.5	3.8-5.8
甲酸	HCO_2H	3.8	—
甲酸铵	HCO_2NH_4	3.8	2.8-4.8
乙酸	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	4.8	—
乙酸铵	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$	4.8	3.8-5.8
丙酸	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	4.9	3.9-5.9
4-甲基吗啉	$\text{OC}_4\text{H}_8\text{N}(\text{CH}_3)$	8.4	7.4-9.4
碳酸氢铵	$\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$	6.3/9.2/10.3	6.8-11.3
乙酸铵	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$	9.2	8.2-10.2
甲酸铵	HCO_2NH_4	9.2	8.2-10.2
1-甲基哌啶	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}(\text{CH}_3)$	10.1	10.0-12.0
二乙胺	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	10.5	9.5-11.5
三乙基乙酸铵	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_3$	11.0	10.0-12.0
吡咯烷	$\text{C}_4\text{H}_8\text{NH}$	11.3	10.3-12.3

生物基质中的小分子

LC/MS 和 LC-MS/MS 应用极为普遍的一个领域是新药研发，在该领域中我们需要对生物体液中的药物及其代谢物等小分子进行分离和鉴定。如前所述，该领域的分析所面临的挑战是需要存在内源性化合物的情况下获得良好的定性和定量分析结果，而这些内源性化合物可产生的离子抑制效应会影响 MS 信号。本书中讨论的许多方法都可用于去除或减少血浆、尿液、CSF 等样品中的不良干扰物。

从生物体液中提取药物的传统方法是液液萃取 (LLE, 第 7 章)。经过适当的方法设计, LLE 可以提供非常好的选择性, 得到非常纯净的萃取物。该方法可实现一定程度的自动化, 如近年来出现的采用 96 孔板的支持液相萃取, 但一般来说 LLE 是一种手动或半手动方法。近年来, 固相萃取 (SPE) 的应用逐渐赶上了 LLE。对于血浆和其他生物样品, 所采用的实验设计通常是将药物/代谢物保留在 SPE 固定相上, 而洗去蛋白质和其他内源性组分。药物/代谢物 (以及保留在吸附剂上的杂质) 在第二步中由另一种溶剂洗脱。与 LLE 相比, SPE 的优势体现在: 所需要的样品量, 溶剂使用量, 还有最重要的一点 — 它可用于全自动化的在线系统。许多这类系统都使用相同规格的 96 孔板。与 LLE 相比, SPE 的方法开发和优化需要更多步骤。对于生物体液来说, 如果方法开发和优化得当, SPE 萃取物的纯净程度通常可媲美 LLE 萃取物, 但其选择性有一定的限制, 除非能够找到选择性的固定相, 另外, 萃取柱上的细粉/颗粒可能会堵塞液相色谱柱或质谱接口, 虽然与十年或二十年之前相比, 这已经不再是严重的问题了。由于方法开发比 LLE 或 SPE 更简单, 蛋白质沉淀法的应用日益广泛, 但该方法所得的萃取物的纯净程度比不上这些久经考验的技术。但只要采用好的色谱方法使目标分析物的离子抑制最小化, 蛋白沉淀法萃取物的 LC-MS/MS 分析同样能够得到相当出色的定性和定量结果。

SPE 固定相的最新技术进展是混合模式吸附剂的问世, 它同时含有硅胶基吸附剂和聚合物吸附剂。人们对于“通用型”SPE 固定相的需求推动了混合模式吸附剂的发展, 这种固定相同时具有疏水和亲水两种特性, 可用于多种化合物的一种或几种提取方法。聚合物吸附剂可耐受 1-14 的 pH 范围, 再结合它们的双模式特性, 为使用常规方法提取血浆、血清和尿液中的酸性、碱性及中性药物提供了一个灵活的平台。

反相 SPE 对一些碱性药物的回收率通常较低，因为这类药物可能会与硅胶上的残留硅醇键合。因此，人们开发出了混合疏水/SCX（强阳离子交换）固定相来解决此问题。聚合物及硅胶吸附剂都具有多种不同的烷基链长以及磺酸 SCX 官能团。根据预期设定，药物化合物及其他疏水性赋形剂将首先结合至固定相的烷基部分，而高度水溶性的化合物则会被淋洗出去。接下来采用水/有机溶液去除疏水性干扰物，然后将药物及其代谢物转移到强阳离子交换剂上。最后，使用甲醇/氢氧化铵进行洗脱，即可得到非常纯净的碱性药物提取物。

为了追求更高的分析通量，研究人员自然是希望能够在分析中直接进样生物体液。为了达该目的，人们开发出了两种方法：限进介质（RAM，请参阅第 10 章）和湍流流动色谱¹⁰。许多限进介质填料都是双模态的，例如前文所述的那些吸附剂。限进机制依赖于 SPE 填料的保留性表面对大分子的排阻，该过程可以采用物理方式、化学方式，或者二者的结合。实质上，限进介质让小分子穿过填料的孔隙，使其接触吸附剂的反相部分，然后被保留在吸附剂的这一部分。大分子（例如血清蛋白）则被排阻在孔隙外，留在具有生物兼容性或亲水化学性的固定相的外部。吸附剂的这部分不会使蛋白质变性或保留，因此高水性溶剂的溶剂前沿即可将其洗出。为防止蛋白质被导入 HPLC 色谱柱，我们可通过柱切换（请参阅第 13 章）将其导入废液。然后，增加强溶剂的量，将目标小分子从 RAM 上洗脱下来。

湍流流动色谱是一种需要采用特殊色谱柱的技术，样品将以高达 4-8 mL/min（以水计）的流速加载到色谱柱上。¹¹ 小分子将被保留在色谱柱上，而血浆组分则会在这种高线性流速下被冲洗流入废液。接下来，将流动相切换为水/有机洗脱溶剂，将目标化合物洗脱进入 MS 接口。高流速可实现非常快速的分析。

限进色谱柱及湍流流动色谱柱均可用于将分析物直接洗脱至质谱接口或用于 LC/LC 模式，在 LC/LC 模式中，分析物在进入质谱之前会在 HPLC 分析柱中重新聚焦。研究表明，后面这种操作模式更适用于复杂、多组分的样品，因为样品制备柱通常效率较低，很难充分分离复杂混合物。

用于解决上述问题的 SPE 应用主要是填充柱应用。当然，SPE 萃取盘和固相微萃取 (SPME) 也可用于生物体液中药物的分析。玻璃纤维、PTFE 和聚氯乙烯萃取盘都被应用于 SPE。小粒径 (约 10 μm) 的吸附剂键合相填料被装填到萃取盘中，或由萃取盘材料本身衍生化产生。小粒径填料还被用于填充柱床以改善传质效率。萃取盘的优势是吸附剂的表面积大大增加，而且非特异性吸附比典型的填充柱少得多。所以，萃取盘所需的样品量和使用的溶剂量更少，纯化不需要的化合物所需的步骤也更少。萃取盘极高效的流速还能节省时间。它的小体积设计可兼容微量液相色谱，而且小直径萃取盘非常适用于目前许多自动化系统所采用的 96 孔板。

SPME (请参阅第 10 章) 在 GC 和 GC/MS 分析领域已应用多年，并且也已经开始应用于 HPLC。SPME 主要依赖涂覆于纤维外部的固相吸附剂，该纤维将直接被导入样品用于萃取分析物。接着，采用与标准 SPE 相同的方法洗脱目标化合物。SPME 纤维只能吸附样品中约 20% 的分析物，但能将其全部注入色谱仪中。相比之下，标准的 SPE 可吸附 90% 的分析物，但如果没有预浓缩步骤，只能进样其中百分之几的分析物。

用于 LC/MS 的“萃管式”SPME 已被应用于尿液和血清样品中药物的分析 (请参阅第 10 章)。该方法采用一根开管 GC 毛细管柱取代纤维。取少量 (约 30 μL) 过滤后的血清样品，使其反复通过毛细管，将药物萃取到固定相中。然后将毛细管切换至 LC 流动相的流路，对脱附的药物进行 LC/MS 分析。这种 LC-SPME 萃管式方法成本较低且很容易实现自动化。使用该方法分析体内的低浓度的 β -受体阻滞剂类药物及其代谢物，获得了良好的回收率和 LOQ。

免疫亲和吸附剂（请参阅第 10 章）在 LC/MS 领域也相当受关注。这些基于固定化抗体的吸附剂通过分子识别来保留目标化合物。随后的抗体变性可使分析物被释放出来。“经典的”亲和色谱柱基于琼脂糖，无法兼容 LC/MS 在线自动化必须达到的高压或流速。但是，我们可以采用更能耐受 HPLC 条件的 HEMA（聚甲基丙烯酸羟乙酯）固定相。近年来，亲和技术已逐渐被用于需要从中等到小体积样品中特异性地分离低含量分析物（例如农药）的环境分析中。类似地，该技术还被用于测定生物体液中的低浓度药物。

MS/MS 是一种应用广泛的检测技术，常用于测定生物体液样品中低浓度的药物及药物代谢物。MS/MS 的优势是具有高定量灵敏度（尤其是三重四极杆仪器）、高通量，以及高特异性。在选择性反应监测 (SRM) 和多反应监测 (MRM) 过程中，MS 的第二阶段能够选出可表征分析物的特征离子。

第二级 MS 是分离的另一个阶段，因此可允许导入比较“脏”的初始样品。如果分析物与另一种化合物共洗脱，且该化合物产生的离子与分析物产生的离子具有相同的 m/z 值，选择该离子用于后续的 MS/MS 分析通常能够产生分析物（而不是共洗脱干扰物）的特征碎片离子。然后可将该碎片离子用于定量和定性确证鉴定结果。

然而，MS/MS 并不是一种离子化技术。其优势体现在离子形成之后。因此，MS/MS 用户仍然需要关注离子抑制效应和盐类等组分，因为它们可能会影响系统性能。此外，使用 MS/MS 并不能阻止加合物的形成。但如果所有的加合物离子都生成普通的碎片离子，将降低解析加合物离子图谱的难度。一级 MS 的全扫描谱图将捕获所有加合物离子，用于二级 MS 分析仪器中的碎裂和分析。接下来，可将二级 MS 设置为只允许特征碎片离子通过。

生物大分子

可将大分子进样到 MS 中的电喷雾 LC/MS 接口对蛋白和核酸的研究产生了重大影响。电喷雾质谱图可直接提供分子量、序列及结构信息。这些应用不在本章的讨论范围内，但读者可参考一些相关的参考文献³⁻⁹。

在完整生物大分子的方法开发中，仍然需要考虑与小分子应用相同的干扰物问题。但此时，由于实验室主要关注新药开发，是否能达到在一天内分析上千个样品的分析通量并不是主要的考虑因素。取而代之的是，研究人员更关注分子的完整表征，而且通常可用的起始材料量非常少。因此，样品前处理方法必须具有良好的回收率并能提供高纯度的提取物。很多情况下都需要将微量样品前处理方法与 Micro-LC 或 CE 联用。LC/MS 和 LC-MS/MS 的其他应用领域还包括研究癌症及其他疾病的生物标志物，以及评价蛋白质酶解所得的多肽片段。第 15 章介绍了这类应用的实例。

分析蛋白质时（请参阅第 15 章），我们通常需要在 LC/MS 分析之前进行传统的纯化步骤。疏水相互作用色谱、体积排阻色谱、超滤和 HPLC 都已被应用于分析之前的蛋白质分离。采用反相和离子交换吸附剂的 SPE 方法应用广泛，并能提供良好的纯化效果，特别是用于去除可促进离子抑制效应和加合物形成的盐类和缓冲液时。当然，许多 SPE 和色谱方法都具有实现在线、自动化操作的潜力。

在开发生物分子的 LC/MS 方法时，某些流动相组分也应纳入考虑范围，虽然严格来说它们并不属于“样品前处理”问题。前面已经讨论过的非挥发性缓冲液盐和离子对试剂问题就是需要考虑的问题之一。另一个问题就是采用电喷雾分析多肽/蛋白质时，使用三氟醋酸 (TFA) 会造成离子抑制效应的问题。我们一般认为 TFA 可以改善反相色谱中多肽的峰形，因为它能与多肽分子上的碱性位点形成离子对，从而消除混合保留机制。但是，接口的条件无法使 TFA-多肽离子对断裂，因此阻止了蛋白质的离子化。这个问题的解决办法是将 TFA 的浓度限制在 0.1% 以下，或使用“TFA light”（即少量的 TFA，可能为 0.05%）以及与之浓度相等的醋酸。这样我们就能根据电喷雾的要求控制 pH 值和促进蛋白质离子化，同时避免形成过多的离子对。虽然这会影响到多肽的液相色谱峰形，但不会对质谱分析造成负面影响。但在某些情况下，我们必须保持液相色谱峰形和必要的分离，因此不能降低流动相中 TFA 的含量。在这种情况下，我们需要进行流动相柱后修饰。在 HPLC 色谱柱后安装一个混合三通，使得我们能够在流动相进入 MS 接口之前，使用一个小型泵向流动相中添加溶剂。“TFA 修饰”是指以色谱柱流速一半的速度，向流动相中泵入含 20% 丙酸的异丙醇。我们通常认为，在 API 接口的气相环境中，丙酸能够取代离子对中的 TFA，所形成的新离子对随后将断裂，释放出分析物离子。

蛋白质和核酸中加合物的形成会导致 $[M + nX]n^+$ 造成大量色谱峰的总离子流展宽，严重影响了质谱图的使用。“X”通常为 Na^+ 和 K^+ 离子，它们存在于玻璃器皿、高纯度溶剂，甚至固相吸附剂介质的化学环境中，很容易形成加合物。在将样品引入 MS 之前，采用反相 SPE 或 HPLC 通常能够很好地去除其中的高水溶性盐类。阳离子交换和沉淀法也可用于脱盐。对于寡核苷酸，加入强碱（例如哌啶）可以减弱钠加合物的信号。

这些类型的纯化方法都需要数量相对较多样品。这在生物技术研究中可能是一个问题，尤其是对于阳离子加合效应随分子量增大而显著增强的多聚核苷酸，纯化方法对样品量的要求大大限制了分析的灵敏度以及可分析的分子大小。解决该问题的一个方法是采用可有效减少阳离子形成的在线微透析系统¹⁰。水相透析缓冲液有一个额外的优势，即它能使生物聚合物保持其天然构象。

使用最广泛的蛋白质分离技术之一是二维凝胶电泳（请参阅第 15 章）。复杂的蛋白质混合物首先在聚丙烯酰胺凝胶上基于其等电点进行分离，然后转向与初始分离方向呈 90° 的方向，在变性剂（通常为十二烷基硫酸钠，SDS）中基于分子大小进行分离。最后，通过胶上染色步骤对蛋白质进行染色。在一块标准凝胶上，最多可以分离出 1000 个蛋白质“点”。

SDS-PAGE 可以将蛋白质分子量测定的准确度限制在 5-10% 范围内。现代电喷雾-TOF 质谱测定蛋白质分子量的准确度在 100 ppm 以内（通常换算为 $< 1 \text{ Da}$ 的准确度）。而且，通过质谱我们还可以获得蛋白质的序列、胱氨酸交联键、翻译后修饰的位置和类型，以及三级结构的相关信息。因此，获取凝胶上的蛋白质用于 LC/MS 分析已成为了蛋白质研究人员的关注点之一。

在质谱分析前必须去除蛋白质中的 SDS 表面活性剂以及染色剂，否则将会发生严重的离子抑制和干扰问题。凝胶中的蛋白质可通过电印迹转移到膜上，也可直接从凝胶中对其进行提取。凝胶中分离得到的蛋白质需要采用酶（例如胰蛋白酶）进行酶裂解。随后即可将后续 LC/MS 分析所得的质谱图上传至数据库以鉴定初始蛋白质。质谱还可用于确定未知多肽片段的一级结构。

分析蛋白质的 MS 工具之一是纳流电喷雾，它相当于具有极小体积、极低流量电喷雾，样品可以长时间停留在 MS 内，因而可获得极高的 S/N 值，进而降低检测限，提高 m/z 准确度和分辨率。另一个更能说明色谱和样品前处理之间并不存在明确界限的实例是直接纳流 LC 色谱柱接入纳流电喷雾系统的毛细管入口管线中。这样一来，强溶剂就能一次性洗脱所有蛋白质，并且梯度洗脱还能实现某种程度的初始分离。使用与纳流电喷雾连接的固定化胰蛋白酶“微酶解”色谱柱，无需进行离线酶解步骤即可获得胰蛋白酶 MS 肽图。这两种方法都是高度自动化的，并可达到飞摩尔级的检测限。

结论

LC/MS 和 LC-MS/MS 作为强大的分析工具，在分析化学各个领域中的应用越来越广泛。其影响力在生物基质样品的分析中尤为突出。为了优化这些分析所得的数据，分析人员必须了解和处理来自样品本身、流动相或环境的质谱干扰。幸运的是，现在已有多种样品前处理策略可供化学家们选择，用于处理这些问题。现在，我们在设计样品前处理-液相色谱-质谱系统时，必须全面考虑整个工作流程，所采用的方法应能够在分析方案的早期消除潜在污染物，例如基于聚乙二醇 (PEG) 的表面活性剂或非挥发性盐类。

近年来，开发更高效、自动化程度更高的新型 LC/MS 及 LC-MS/MS 分析样品前处理方法成为了一个重要的研究课题。随着这些新型的自动化方法逐渐商品化，分析过程中“色谱分离”和“样品前处理”这两个部分之间的界限将越来越模糊，取而代之的将是“完整 LC/MS 集成系统”的概念。固相萃取方法将作为一项重点技术继续发展，因为它与 HPLC 具有相似性，并且具有实现高度自动化的可能性。与此同时，整体化的分析系统（包括样品前处理系统）将继续向小型化的方向发展，可能会转变成芯片或微流体的形式。诸如 SPME、微透析，以及纳流液相色谱等技术都很好地应用了“芯片仪器”的概念，这一概念是指将微型自动进样器、样品前处理技术、色谱柱以及 MS 毛细管接口整合到一个单独的微型仪器上，并将该仪器直接连接到针对亚微升级流速及样品量进行了优化的 API-MS 仪器上。

参考文献

1. Klink, F. *LCGC* **1999**, *17* (12), 1084-1093
2. Hess, S. *Current Trends in Mass Spectrometry, Supplement to LCGC No. America* **July, 2013**, 12-17
3. Ivanov, A.R.; Lazarev, A.V. *Sample Preparation in Biological Mass Spectrometry*, Springer, New York, **2011**, ISBN 978-94-007-0758-0 and e-ISBN 978-94-007-0828-0
4. Urban, J.; Vanek, J.; Stys, D. *Systems Theory: in Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbruecken, Germany, **2012**, ISBN-10: 3659298166 and ISBN-13: 978-3659298165
5. Lipton, M.S.; Pasa-Tolic, L. *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides: Methods and Protocols*, 2nd Ed., Humana Press, New York, **2009**, ISBN-10: 1934115487 and ISBN-13: 978-1934115480
6. Ferrer, I.; Thurman, E.M. *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, MS/MS and Time of Flight MS: Analysis of Emerging Contaminants*, American Chemical Society, Washington, D.C., **2003**, ISBN-10: 0841238251 and ISBN-13: 978-0841238251
7. Brown, M.A. *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Applications in Agricultural, Pharmaceutical, and Environmental Chemistry*, American Chemical Society, Washington, D.C., **1989**, ISBN-10: 0841217408 and ISBN-13: 978-0841217409
8. Niessen, W. M.A. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3rd Ed., CRC Press, New York, **2006**, ISBN-10: 0824740823 and ISBN-13: 978-0824740825
9. Ardrey, R.E. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley, Chichester, W. Essex, U.K., **2003**, ISBN-10: 0471498017 and ISBN-13: 978-0471498018
10. Sparkman, O.D.; Klink, F.E. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry Fundamentals and Applications – An ACS Short Course*, American Chemical Society, Washington, D.C., **1999**
11. Herman, J.L.; Edge, T. *LCGC No. America* **2012**, *30* (3), 200-214

样品前处理中的膜技术

膜通常由合成聚合物（如 PTFE、尼龙或聚氯乙烯）、纤维素或玻璃纤维制成。过滤（第 5 章）和使用萃取盘的固相萃取 (SPE)（第 9 章）代表了膜在样品前处理中的主要应用。一般来说，膜分离技术并未广泛应用于其他的色谱样品前处理任务。但超滤、反渗透、透析、微透析和电渗析都是使用膜对分析物进行浓缩、纯化和分离的技术实例，这些应用在生物领域尤为常见。

透析和膜样品前处理

微多孔半渗透膜可以让某些特定的化合物通过，同时阻止其他化合物通过。由于其微孔孔径不同，这些膜可以进行选择性过滤。例如，要从小分子（如药物或药物代谢物）中分离大分子（如蛋白质），应选择使用微多孔分子量截留膜的透析方法¹ 因为蛋白质无法通过这些小孔，而小分子则很容易通过。膜工作示意图见**图 18.1**，样品溶液（供体）置于膜的一侧，另一侧是第二种液体（受体）。在某些情况下，干扰物会通过膜扩散，留下纯化的供体溶液。更常见的情况是，分析物通过膜进入受体溶液，而将干扰物留在供体溶液中。中性小分子通过半透膜的迁移，是膜的水性供体一侧与膜的水性受体一侧存在分析物浓度差异造成的，一旦浓度达到平衡，迁移就会停止。

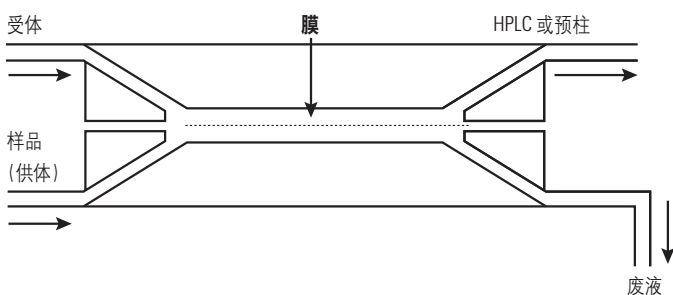
透析并不具备选择性富集小分子分析物的特性。由于不具备甄别与分析物具有相同分子量的小分子物质的机制，透析只能完成部分纯化^{2,3}。鉴于此，我们通常不会将单独的透析步骤作为一种萃取技术，而常常将它作为萃取过程中的一个附加的样品纯化步骤。但是，由于大分子在样品通过膜孔隙时被排除，该方法被广泛用于食品和生物样品。此外，该方法在生物溶液脱盐方面也有着广泛的应用。

所以，如图 18.1 所示，要将膜技术成功应用于样品净化或者纯化，就必须捕集（痕量富集）从受体侧移除的分析物。如果我们可以更改分析物的化学状态（例如将它们从不带电荷变为带电荷），就能继续对该分析物进行富集。膜分离技术在 RP-HPLC 分析中的优势在于供体和受体溶液通常都是水或缓冲液。膜分离既可以在静态系统中进行，也可以在流动系统中进行，后者更易于控制，可实现在线自动化。

与 SPE 或 LLE 相比，膜分离较慢，也不太可能通过富集使样品中的分析物浓度增加几个数量级。如果没有分析物的富集，分析物则会保留在溶液中，没有进一步浓缩。这种情况下，检测限可能会受影响，并且需要花费额外的样品处理时间进行后续的纯化步骤。使用膜纯化脏样品（如废水）还存在另一个风险，即膜孔隙可能被碎屑（如微粒、胶质、固体等）污染。此外，根据膜化学性质的不同，目标分析物还可能与膜本身发生化学相互作用，从而影响回收率和方法的精密度。

大部分膜技术都不能完全满足高通量样品前处理的要求。但是，现在膜技术已经有所进步，能够应用于 96 孔板系统。如果以单孔（样品）为基础进行评估，由于可以同时处理全部 96 个样品，膜技术与其他样品前处理技术相比，将更具有“通量竞争性”。

图 18.1
流动系统中的膜工作示意图



膜可以制成许多形式：片状、筒状、盘状、胶囊、小柱、螺旋缠绕状以及中空纤维形式。除浓度差异外，化学或电化学梯度也能驱动分析物发生跨膜扩散。带电荷的多孔膜或离子交换膜都具有带固定正电荷（或负电荷）的多孔壁。离子型分子的分离由膜的孔径和壁上的电荷控制。应用电化学驱动力能够为膜分离过程增加另一个维度（请参阅下文）。

微透析取样是微透析技术的一种特殊应用，采用了一端带膜的熔融石英管微探针⁴。这种探针可以植入生物体中（如小白鼠大脑），无需干扰动植物即可使用 HPLC 在线监测小型有机分子通过膜的扩散情况。

超滤

超滤 (UF) 制样与透析和微透析类似，不同的是施加到膜两边的压力差 (10-100 psi) 形成的驱动力会使分子穿过膜（截留分子量为 300-300,000）。而在透析中，小分子是收集在受体一侧的。UF 膜是可用于手动处理水性生物样品的一体化一次性装置。进行 UF 分离时，先将样品倒入滤杯中并盖好杯盖，然后通过顶盖施加空气或其他气体的气压。

浓缩的蛋白质和其他分子量大于截留值的分子保留在滤杯中，而水、盐类和其他小分子可溶性组分则被收集到滤液收集杯中。通过超滤方法浓缩样品，无需使用可能影响热不稳定化合物（如治疗活性蛋白质）生物活性的严苛化学条件。还可以避免使用有机溶剂和极端 pH 条件。

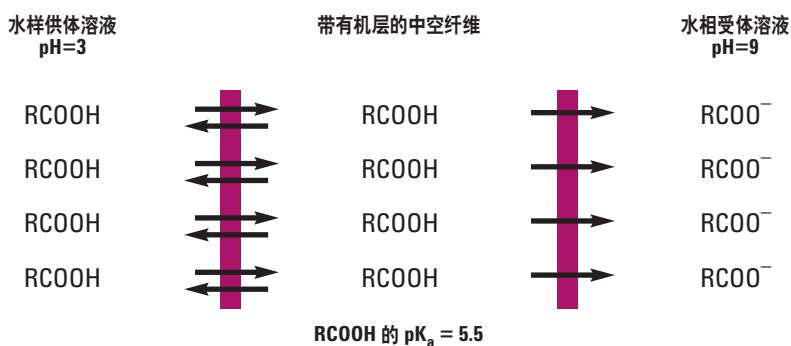
支持液膜 (SLM) 富集

SLM 技术⁵⁻⁷与流动透析类似，不同之处在于分离两种水相溶液的是充满了溶剂的多孔 PTFE 膜。这项技术实际上是透析和液液萃取的结合。首先，采用术语称之为支持液的非水溶性有机溶剂（例如正十一烷）对膜进行浸泡，然后将膜置于固定架上。毛细作用力使有机溶剂保留在膜的孔隙中。由于化合物在支持液中的溶解度更高，化合物将从供体一侧被萃取到膜上，然后从膜中被再次萃取到受体一侧。

一个可说明 SLM 技术的简单实例如图 18.2 所示，样品首先分配到被有机溶剂浸入的膜上，从供体一侧萃取未离子化的羧酸 (RCOOH)。然后在受体一侧使用碱性溶液对膜进行后续萃取，在该过程中，酸被离子化，因而不会重新被萃取到膜中，也不会被转移回供体一侧。采用 SLM 萃取可以获得数百倍的浓缩因子。

图 18.2

从水样中萃取有机酸



中空纤维液相微萃取 (HF-LPME)

中空纤维应用广泛，主要用途之一是废水处理，而在实验室中，通常将它们用于微过滤和反渗透。中空纤维 (HF) 由有机聚合物（如聚丙烯、聚醚砜、聚酯及其他材料）制成，也可以由无机材料（如二氧化钛和氧化锆）制备。HF 价格相对较低，可考虑一次性使用，而且材料可回收利用。在用于分析应用之前，应将 HF 在丙酮或其他兼容溶剂中浸泡多次，然后在室温下干燥。

静态中空纤维液相微萃取 (HF-LPME) 的原理如图 18.3 所示。HF-LPME 与液相微萃取 (LPME) 有一些相似之处。但在 LPME 中，对针尖上“裸露”液滴的处理存在一些问题。虽然操作过程本身很简单，但操作人员必须非常小心，因为液滴可能不稳定，而且样品需要保持相对纯净。在 HF-LPME 中，萃取“液滴”被转移到 HF 腔内的过程增加了保护机制，能够避免出现 LPME 中悬挂液滴会遭遇到的某些物理问题。与 LPME 中的球形悬挂液滴不同，HF-LPME 为萃取溶剂提供的是杆状液滴。杆状液滴的溶剂表面积更大，因为对于相同体积的液体，球形的表面积更小。因此，与球形液滴相比，杆状样品液滴与萃取溶液之间的接触面积更大，接触也更充分。改变溶剂形状最直接的优势就是萃取效率提高。另一个显著优势是，在萃取过程中可以应用更高的搅拌速度，因为溶剂受中空纤维的保护，稳定性更高。此外，中空纤维可一次性使用的特性消除了样品交叉污染的可能性，确保了高重现性；而且，中空纤维壁上的孔隙能够阻止大分子物质（如样品基质中的蛋白质、颗粒等）的萃取，使其具备了一定的选择性。因此，HF-LPME 不仅仅是一种预浓缩技术，它还能进行样品纯化，因而也可用于复杂的样品基质。

图 18.3

HF-LPME 仪器示意图

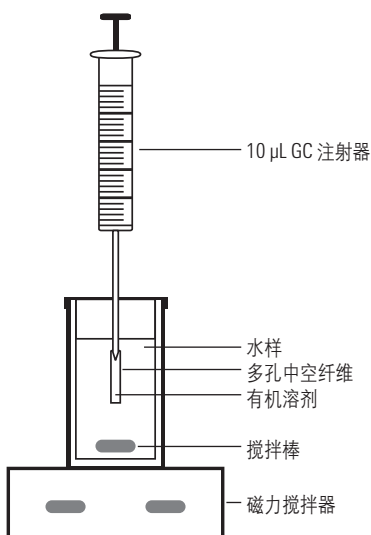
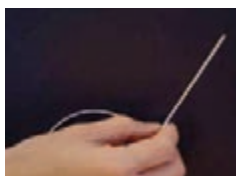


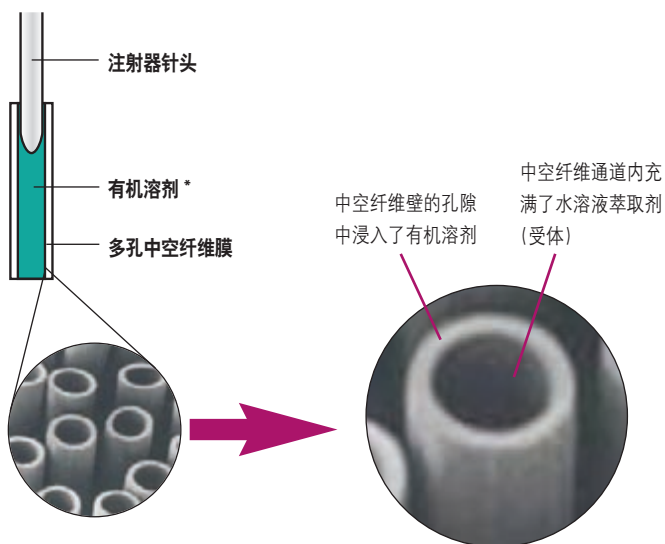
图 18.4

中空纤维液相微萃取的特性



HF 膜的典型特性:

600 μm 外径 x 200 μm 壁厚,
0.2 μm 壁孔径



(由新加坡国立大学的 H.K.Lee 提供)

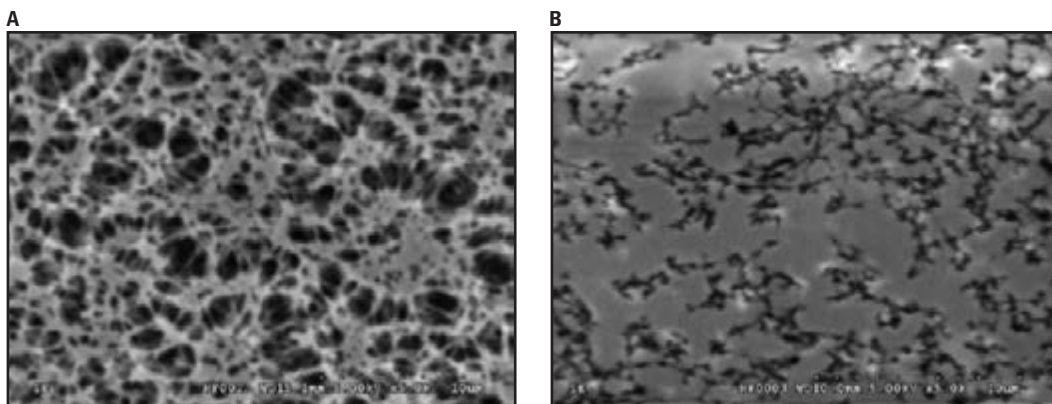
*两相 LPME 中采用有机溶剂作为受体相。三相 HF-LPME 中, 采用第二种水相溶剂作为受体相 (有时这项技术被称为中空纤维液-液-液相微萃取, 或 HF-LLME)。

图 18.4 展示了用于 HF-LPME 的 HF 所需的所有元素。选择合适的有机溶剂来填充中空纤维的孔隙，是方法成功的关键因素。与支持液膜技术类似，对有机溶剂有几个要求。首先，溶剂必须易于固定在中空纤维孔内，而且应为非挥发性物质。一般来说，大多数 HF-LPME 实验所用的中空纤维都是由疏水性聚丙烯制成的。选择的溶剂应对中空纤维具有良好的亲和性，以防止萃取过程中发生溶剂损失，并实现稳定的溶剂浸入效果。第二，溶剂应与水不混溶，因为它将作为水样的屏障。最后，目标分析物在该溶剂中的溶解度应高于其在水样基质中的溶解度。通常，相对非极性、粘度较高的溶剂符合上述要求，常用的溶剂包括 1-辛醇、正己醚、十一烷、甲苯等。但这些相对非极性的溶剂对极性化合物的溶解度通常较低，因此会影响极性化合物的萃取效率。

离子液已被用作 HF-LPME 应用的溶剂⁸⁻¹²。虽然离子液是极性和非挥发性的，但它已被证明能获得稳定的溶剂浸入效果。

图 18.5 展示了离子液浸入前后中空纤维内表面的扫描电子显微镜图。通过比较两张扫描电子显微镜图，我们能够很明显地看出，离子液已经有效地浸入到了中空纤维的孔隙中，形成了可用于萃取的离子液膜。使用离子液作为萃取溶剂的优势包括它能够提供针对极性化合物的高度亲和性以及取决于不同化合物的选择性。离子液的这些特殊性质将 HF-LPME 的应用拓展到了极性化合物的分析。

图 18.5



离子液浸入前 (A) 和浸入后 (B) 中空纤维内表面放大 5000 倍的扫描电子显微镜图¹³。

HF-LPME 方法简便, 只包含几个步骤。萃取前, 通过火焰熔封中空纤维 (通常为 1.5-10 cm 长, 200 μm 厚, 内径 600 μm, 孔径 0.2 μm) 的一端。接下来, 将其浸入不混溶的溶剂中, 让溶剂浸入中空纤维的孔隙。溶剂将在中空纤维壁上形成薄层。通常用微注射器支撑中空纤维, 并将受体相导入中空纤维管腔中。然后, 将中空纤维置于充满水样的样品瓶中, 样品体积通常为几毫升。为了加快萃取速度, 可对样品进行充分搅拌。分析物首先通过中空纤维孔隙中的溶剂层从水样中被萃取出来, 然后进入管腔内的受体相中。等待一段时间待萃取达到平衡 (通常在 10-30 min 之间) 后, 将受体相吸入微注射器, 然后直接注入仪器进行分析。

根据不同模式, 中空纤维管腔内可以填充几微升相同的溶剂 (两相模式), 也可填充一种水性受体相 (三相模式)。在两相 HF-LPME 中, 浸入中空纤维管腔部分的有机溶剂作为杆状溶剂暴露在经过搅拌的水样中。水样中的非极性分析物即可由于扩散作用通过中空纤维被大量萃取到受体溶剂中。由于所选择的溶剂可兼容 GC, 萃取所得的样品可以直接注入气相色谱仪进行分析。因此, 使用非极性溶剂作为受体相的两相 HF-LPME 系统更适合相对疏水的分析物的萃取¹⁷⁻¹⁹。但如果使用离子液 (IL) 作为受体相, 两相 HF-LPME 则更适用于亲水分析物的萃取。因为 IL 存在污染色谱柱的风险, 且需要经常清洗进样口, 因此不适用于 GC, 但它可注入 HPLC 系统进行分析, 离子液在该系统中能够快速洗脱, 因此几乎不会对 HPLC 反相色谱分析造成干扰或干扰极低。

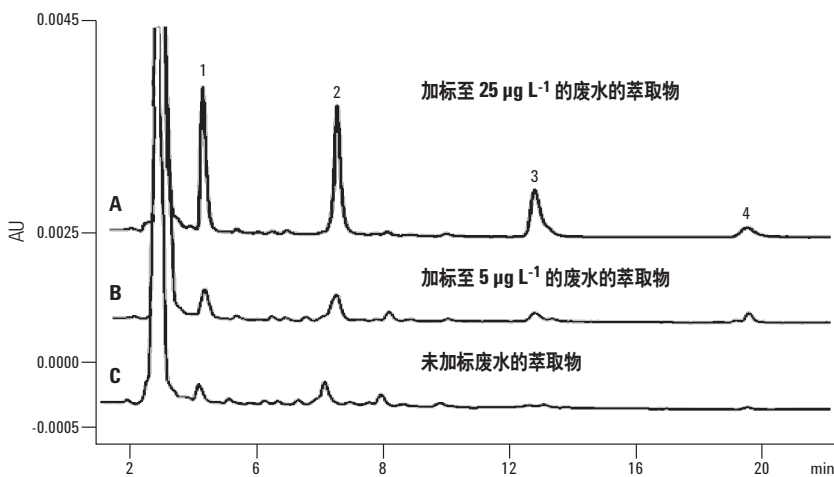
中空纤维液-液-液微萃取 (HF-LLLME) 的三相模式有时称为带反萃取的 LPME (LPME-BE)。这一模式与图 18.2 中的例子相似, 供体和受体相均为水相, 第三种溶剂是固定在中空纤维孔隙中的有机相, 充当分隔两种水相的屏障。在萃取过程中, 目标分析物通过中空纤维壁内的有机溶剂薄层从供体水相中被萃取出来, 然后进入受体水相。由于受体相为水溶液, 萃取物可以使用 HPLC 或 CE 进行分析。该方法常用于离子型化合物或可离子化的化合物, 传质扩散的驱动力来自供体和受体水相之间的差异, 如 pH 调整、供体相的盐析效应, 或加入适当的受体试剂 (如分析物的离子对复合试剂等)。

由于供体相 (水样品) 和受体相 (溶剂或第二种水相) 所占比例的差别非常大 (100:1), 分析物在受体相中会发生明显的浓缩, 富集因子可高达几百倍。而由于富集效率极高, 分析方法的检测限得到了极大改善。因此, 我们可以轻松实现更低的检测限 (低 ppb 级或亚 ppb 级), 甚至使用灵敏度相对较低的检测器时 (如紫外检测器) 也不例外。

为了说明三相 HF-LLLME 技术的应用，我们研究了原始废水样品以及加了极性酚类的废水样品¹⁴。由于酚类的极性较强，且在水中的溶解度很大，所以使用有机溶剂无法从水中直接萃取这类物质。因此，在本例中，我们在 HF 中注入了离子液。离子液含壬烷和甲基咪唑六氟磷酸盐混合物、BMIM[PF6]/乙腈 (1:1)，是酚类的良好萃取介质。受体相为水相。采用如图 18.3 所示的实验设置。

使用带紫外检测的反相 HPLC 分析萃取物，图 18.6 为采用 HF-LLLME 方法萃取原始废水样品及两个水平的 (5 和 25 $\mu\text{g/L}$) 加标废水样品后分析其中的四种酚类的结果对比。很明显，这些低含量水平的酚类化合物可以成功地从废水样品中被萃取出来。色谱图最前端的大峰是从反相色谱柱洗脱出来的接近孔隙体积的离子液峰。

图 18.6
测定酚类的离子液 HF-LLLME-HPLC-UV 谱图



HF-LLLME，含壬烷和 [BMIM][PF6]/乙腈 (1:1)。废水萃取物的 PLC-UV 谱图。(A) 加标 $25 \mu\text{g L}^{-1}$ 各种酚类的废水的萃取物；(B) 加标 $5 \mu\text{g L}^{-1}$ 各种酚类的废水的萃取物；(C) 未加标实际废水样品的萃取物。色谱峰：1) 4-叔丁基苯酚；2) 4-叔辛基苯酚；3) 4-正辛基苯酚；4) 4-正壬基苯酚。

电膜萃取 (EME)

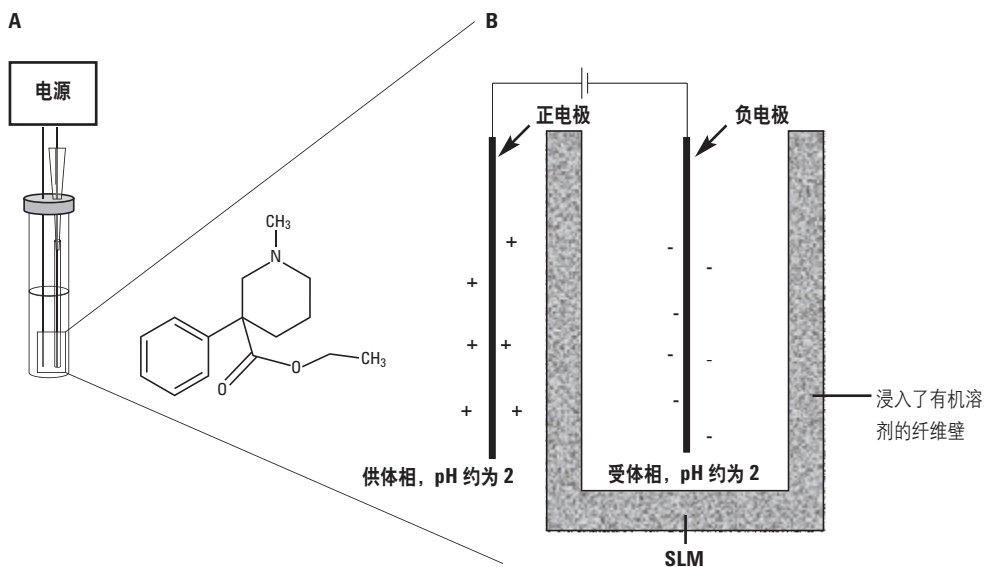
EME¹⁵ 的概念结合了中空纤维液相微萃取 (HF-LPME)^{16,17} 的技术设置与著名的电解萃取原理¹⁸⁻²⁴。通过这一结合, 我们得到了一种高选择性的样品前处理方法, 仅使用简单的设备即可在短时间内实现高度的富集。

EME 方法通过固定在中空纤维壁上的有机溶剂薄膜萃取小体积样品中的带电物质, 然后将其转移到中空纤维内腔中的受体溶液中。这一萃取过程由跨膜施加的电势差驱动。LLE 与电动学迁移的结合为离子型物质提供了一种快速、高选择性的样品前处理方法。EME 可兼容多种生物基质 (如血浆、全血、尿液和母乳), 采用简单便宜的装置, 在短时间内即可制备出纯净的萃取物。

EME 所采用的仪器技术设置基于先前的 HF-LPME 经验, 如图 18.7 所示。所用的中空纤维由多孔聚丙烯制成, 可兼容多种有机溶剂。制作支持液膜 (SLM) 时, 先将纤维浸入有机溶剂 5 s, 使溶剂充满壁上的孔隙, 然后用医用擦拭布轻轻擦去多余的有机溶剂。将连接在移液器枪头上的纤维穿过样品室盖上的孔, 如图 18.7A 所示。以移液器枪头为机械支撑, 通过它将 0.5 mm 厚的铂丝插入中空纤维腔内。另一根铂丝则穿过样品室盖直接插入供体相中。接入电源时, 这些惰性铂丝即成为电极, 在 SLM 上形成电场。通过这种方式, 仪器形成了闭合电路, 而 SLM 则充当了电阻器。

图 18.7

EME 设置 (A) 和原理 (B)，以杜冷丁作为模型物质



样品体积在 150-500 μL 之间，具体取决于样品室的大小。在萃取过程中，使用平板摇床振荡样品，以增加分析物在大体积供体相中的物理运动，并减少供体相和 SLM 之间的界面上滞留层的厚度。受体相的体积设定为 25 μL ，用微注射器将其注入中空纤维管腔中。预设的萃取时间（通常只有几分钟）结束时，用微注射器收集 20 μL 的受体相溶液等分试样，将其转移到样品瓶中，用毛细管泳仪 (CE)²⁵⁻²⁹ 或 HPLC 进行分析³⁰。

图 18.7B 还展示了 EME 的机制。测试物质为杜冷丁，是一种具有含氮基团的合成阿片类药物，该含氮基团在低 pH 下将质子化。供体相和受体相的 pH 均为 2。向 HF 施加电场时，带正电荷的分析物被吸引到 EME 中设置的负极，这种强大的吸引力能够克服分配到 SLM 中的物质所受到的任何其他引力，从而将离子转移到受体溶液中。酸性和碱性化合物均具有良好的萃取效率和可重复性。影响萃取效率和回收率的因素包括：施加的电压、膜的化学性质、SLM 中有机溶剂的类型（加入或不加离子对试剂等添加剂）、供体和受体溶液的 pH 值、供体溶液的体积、样品基质类型、搅拌程度和萃取时间。

参考文献

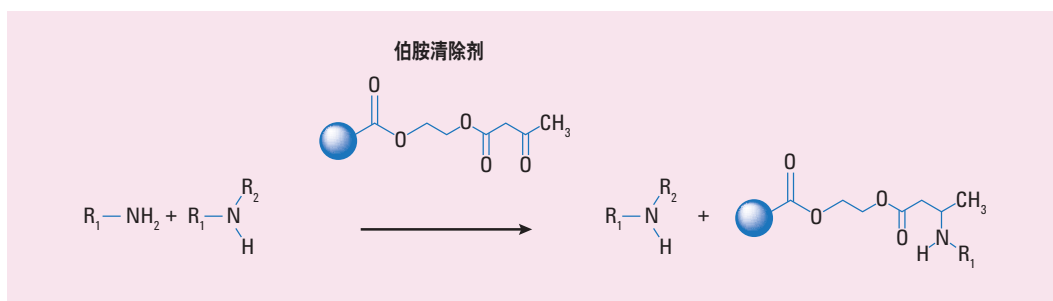
1. Greenway, G.M.; Kometa, N.; Macrae, R. *Food Chemistry* **1992**, *43*, 137-140
2. Pingoud, A.; Urbanke, C.; Jeltsch, A.; Jeltsch, J. *Biochemical Methods: A Concise Guide for Students and Researchers*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2002**, ISBN-10: 3527302999 and ISBN-13: 978-3527302994
3. Hassan Y. Aboul-Enein, (Ed.) *Separation Techniques in Clinical Chemistry*, CRC Press, New York, **2003**, ISBN-10: 0824740130 and ISBN-13: 978-0824740139
4. Nandi, P.; Lunte, S.M. *Handbook of Sample Preparation*, Pawliszyn, J.; Lord, H.L. (Eds.) John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, **2010**, 103-123, ISBN: 978-0-470-09934-6
5. Audunsson, G.A. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2714-2723
6. Jonsson, J.A.; Mathiasson, L. *Trends in Anal. Chem.* **1992**, *11* (3), 106-114
7. Jonsson, J.A.; Mathiasson, L. *LCGC No. Amer.* **2003**, *21* (5), 424-438
8. Tao, U.; Liu, J.-F.; Hu, X.-Li.; Li, H.-C.; Wang, T.; Jiang, G.-B. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6259-6266
9. Peng, J.-F.; Liu, J.-F.; Hu, X.-L.; Jiang, G.-B. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1139*, 165-170
10. Liu, J.-F.; Jiang, G.-B.; Cai, Y.Q.; Zhou, Q.-X.; Hu., J.-T. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5870-5876
11. Liu, J.-F.; Chi, Y.-G.; Jiang, G.-B.; Tai, C.; Peng, J.-F.; Hu., J.-T. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1026* (1-2), 143-147
12. Ho, T.S.; Halvorsen, T.G.; Pedersen-Bjergaard, S.; et al. *J. Chromatogr. A* **2002**, *963*, 3-17
13. Zhao, L.; Lee, H.K.; Majors, R.E. *LCGC* **2010**, *28* (5), 580-591
14. Lee, H.K. Paper presented at Separation Science Singapore 2009, Biopolis Science Park, Singapore, **August 26-28, 2009**
15. Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1109*, 183-190
16. Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2650-2656
17. Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 132-142
18. Arrigan, D.W.M. *Anal. Lett.* **2008**, *41*, 3233-3252
19. Berduque, A.; Arrigan, D.W.M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2717-2725
20. Berduque, A.; O'Brien, J.; Alderman, J.; Arrigan, D.W.M. *Electrochem Commun* **2008**, *10*, 20-24
21. Berduque, A.; Sherburn, A.; Ghita, M.; Dryfe, R.A.W.; Arrigan, D.W.M. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7310-7318
22. Vandervlis, E.; Mazereeuw, M.; Tjaden, U.R.; Irth, H.; Vandergreef, J. *J. Chromatogr. A* **1996**, *741*, 13-21
23. Vandervlis, E.; Mazereeuw, M.; Tjaden, U.R.; Irth, H.; Vandergreef, J. *J. Chromatogr. A* **1995**, *712*, 227-234
24. Vandervlis, E.; Mazereeuw, M.; Tjaden, U.R.; Irth, H.; Vandergreef, J. *J. Chromatogr. A* **1994**, *687*, 333-341
25. Gjelstad, A.; Andersen, T.M.; Rasmussen, K.E.; Pedersen-Bjergaard, S. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157*, 38-45
26. Gjelstad, A.; Andersen, T.M.; Rasmussen, K.E.; Pedersen-Bjergaard, S. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1124*, 29-34
27. Gjelstad, A.; Rasmussen, K.E.; Pedersen-Bjergaard, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 921-928
28. Kjelsen, I.J.O.; Gjelstad, A.; Rasmussen, K.E.; Pedersen-Bjergaard, S. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1180*, 1-9
29. Middelthun-Bruer, T.M.; Gjelstad, A.; Rasmussen, K.E.; Pedersen-Bjergaard, S. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 753-759
30. Gjelstad, A.; Andersen, T.M.; Rasmussen, K.E.; Pedersen-Bjergaard, S. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1157*, 38-45

清除剂在样品前处理中的应用

清除剂是一种特殊形式的固相填料，其作用与 SPE 类似。但它并不是利用疏水作用力或吸附等分子相互作用，而是利用化学反应来去除非目标化合物。有机化学家常将它们用于去除有机合成中的非目标反应产物或多余的起始材料。大多数清除剂都采用共价键合原理。在大多数清除剂的应用中，产物和起始材料间必须有非常明显的区别。例如，虽然去除亲核剂十分简单——例如去除酰胺中存在的胺类，但从存在其他胺官能团的环境中去除伯胺类化合物就可能有一定的困难。因此，清除剂都具有很高的选择性。**图 19.1** 展示了一个实例，聚合物支持的酮酯树脂 (PL-AAEM) 能够从存在多种取代胺类化合物的环境中选择性地去除伯胺类化合物。因此，该清除剂非常适用于还原胺化反应以及一些多组分反应应用。如果需要同时去除伯胺类和仲胺类化合物，可使用选择性稍弱的聚合物支持的异氰酸酯树脂 (PL-NCO)。

图 19.1

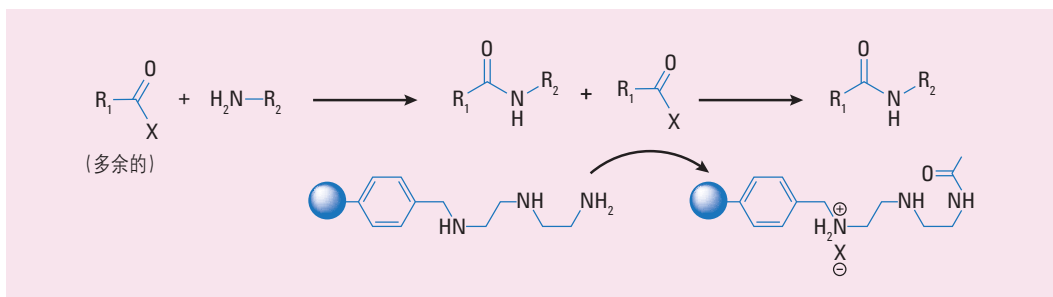
伯胺清除剂的化学反应



采用带有氨基的清除剂树脂可高效简便地去除溶液中的亲电试剂。聚合物支持的三胺树脂 (PL-DETA) 可去除酰基氯、磺酰氯、异氰酸盐和异硫氰酸盐，反应流程如图 19.2 所示。

图 19.2

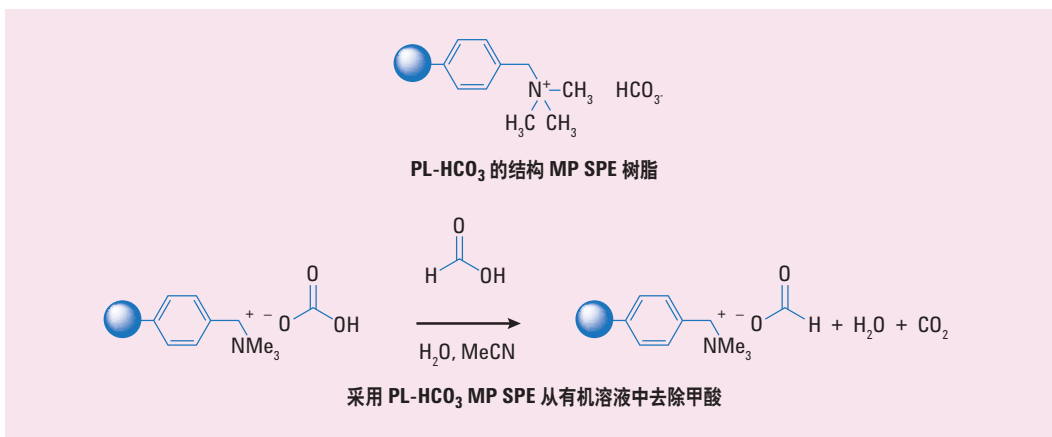
使用 PL-DETA 树脂去除亲电试剂



固相清除剂的一项特别有用的应用是从 HPLC 馏分中去除酸性流动相添加剂。在 HPLC 流动相中加入有机酸以增加极性化合物（特别是生物分子）的溶解性是一项很常用的技术。一般来说，最常用的流动相是含 0.1% TFA 的水-乙腈混合物。如果采用制备型 HPLC 进行样品纯化，所得的溶剂馏分中将含有痕量的 TFA。如果采用蒸发或冷冻干燥方法处理样品，所得的有机物可能会形成 TFA 盐。盐类（尤其是 TFA 盐）的长期稳定性较差。使样品穿过一个装填了聚合物支持的碳酸氢盐树脂 (PL-HCO₃ MP SPE, 图 19.3) 的小柱，即可去除 TFA 及其他有机和无机酸（例如甲酸，乙酸和盐酸）。

图 19.3

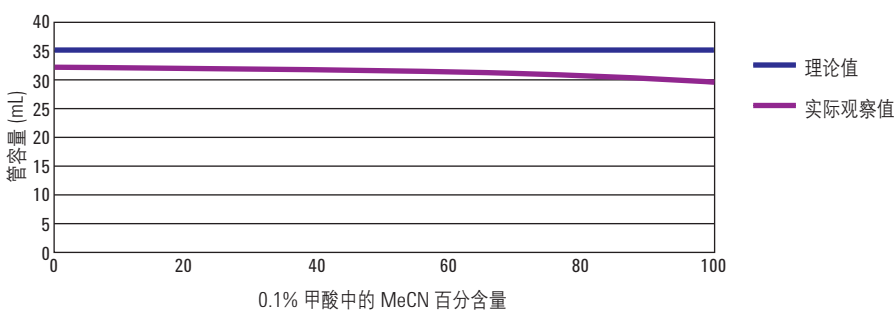
使用 Stratospheres 去除有机溶液中的甲酸



为了证实 PL-HCO₃ MP SPE 树脂从水-乙腈混合物中去除甲酸的效果,我们制备了一系列含 0.1% (v/v) 甲酸的水-乙腈混合物 HPLC 溶液,并使其通过 200 mg PL-HCO₃ MP SPE 装置¹。每得到 2 mL 馏分即通过测定其 pH 来确定介质的甲酸去除容量;当 pH 变化至约 2.5 时,停止实验并记录溶剂的体积。如图 19.4 所示,随着乙腈浓度增加,所观察到的终止测定时的容量只略微减少。这很可能是由于样品粘度降低导致溶剂混合物的停留时间发生了变化。但是,100% 乙腈时的介质的甲酸去除容量 (30 mL) 对大多数应用而言也已足够。

图 19.4

乙腈浓度对 200 mg/mL SPE 清除 0.1% 甲酸溶液体积的影响



从有机溶液中去除甲酸的实验过程十分简单。首先，使用 1 mL MeOH 预处理 SPE 小柱。然后将含甲酸的溶液加入 SPE 小柱，使该溶液在重力作用下穿过小柱。待溶液全部流过小柱后，使用 1 至 2 mL 的适当溶剂（如 MeOH 或 H₂O）冲洗 SPE 小柱。收集有机溶液，在真空下将溶剂去除，即可得到所需的不含残留甲酸的化合物。

针对多种不同的有机化合物，有各种聚合物支持的树脂清除剂可供选择。与 SPE 吸附剂相比，清除剂是具有化学活性的树脂，所以我们需要采取一定的预防措施，将这些材料保存在惰性、低温的环境中。

要获得纯度高、易筛查的化合物，去除残留的金属元素（例如有机反应中的催化剂）非常重要。一系列 SPE 装置被设计用于去除有机反应中的多种不同金属试剂，它们主要采用简单的重力流通方法。吸附剂会将多余的残留物质保留在 SPE 管中，而目标化合物可顺利通过。

用于去除金属元素的 StratoSpheres SPE 采用了专门设计的大孔填料，其容量很高，适用于多种溶剂。聚合物基上引入了一系列设计用于结合金属试剂及催化剂的配体官能团。表 19.1 列出了多种 SPE 清除剂产品以及它们可从溶液中清除的金属元素。

表 19.1

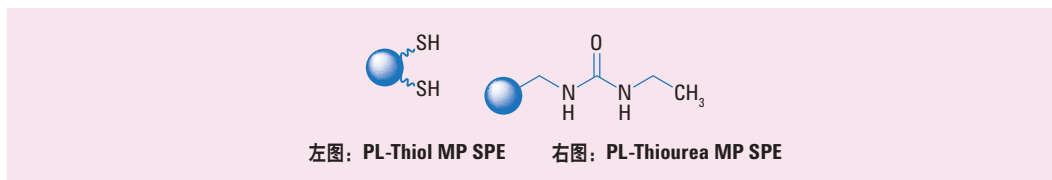
Stratospheres 金属去除大孔径 SPE 树脂	
产品	可去除的金属元素
PL-Guanidine MP SPE	Au, Bi, Cd, Hg, Pd, Pt, Re, Rh, Sn, Zn
PL-Thiol MP SPE	Ag, Au, Cu, Fe, Pd, Ru, Rh, Sn, Pb, Cu
PL-Thiourea MP SPW	Ag, Cd, Cu, Pt, Pd, Ru, Rh, Hg, Cu, Ni
PL-Urea MP SPE	Ag, Au, Hg, Ni, Pd, Pt, Re, Sc

为了说明金属清除剂的使用，文中展示了采用 Stratosphere SPE 快速简便地去除铑元素的实验。含铑催化剂在合成化学的许多方面均得到广泛应用，包括从小规模应用（例如药物化学中小分子的合成）到大规模的生产。尽管铑试剂的利用价值高，但也给反应后金属残留物的去除造成一大麻烦。最著名的铑催化剂之一是威尔金森催化剂，它是用于烯烃加氢作用中的均相催化剂。另一种极为有用的铑基试剂是醋酸铑，它可用于催化重氮类化合物中碳烯的形成。

PL-Thiol MP SPE 和 PL-Thiourea MP SPE 是两种金属清除剂，在重力作用下，它们在一次处理中即可去除有机溶液中的所有铑类残留物。图 19.5 展示了这两种清除剂的结构。该吸附剂由高度交联的大孔聚合物构成，不会发生膨胀，可用于多种质子型、非质子型，极性和非极性溶剂。纯化过程的条件与之前用于去除甲酸的条件相同。起始溶液中威尔金森催化剂和乙酸铑催化剂的铑浓度均为 1000 ppm，两种清除剂均可将铑浓度降至低于 1/10 ppm²。

图 19.5

用于去除铑的 Stratosphere SPE 固定相的结构



参考文献

1. Boguszewski, P. *StratoSpheres SPE for Efficient, Flow Through Removal of Formic Acid (StratoSpheres SPE 用于高效的流通式甲酸去除)*, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 SI-01043, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市, **2007 年**
2. Boguszewski, P. *Fast and Simple Removal of Rhodium Using StratoSpheres SPE (使用 StratoSpheres SPE 快速简便地去除铑)*, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 SI-01042, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市, **2007 年**

HPLC 和 GC 分析的衍生化

衍生化包括分析物与衍生化试剂之间发生的化学反应，其目的是改变该分析物的理化性质。在 HPLC 和 GC 分析中进行衍生化的五个主要目的是：

- 提高检测性能
- 改变分析物的分子结构或极性以获得更出色的色谱分离
- 增加挥发性
- 改变基质性质以实现更好的分离
- 稳定分析物

理想情况下，衍生化反应应该是一个反应快速、定量进行且产生副产物极少的化学反应。过量的衍生化试剂应对分析没有影响，或应非常易于从反应基质中去除。关于色谱分离中的衍生化步骤，有许多优秀的书籍可供我们参考¹⁻⁵。

随着 MS 技术（如 LC/MS、LC-MS/MS、GC/MS 和 GC-MS/MS）越来越普及，许多实验室更倾向于通过仪器方法达到高灵敏度和进行所需类型的检测，而不会选择相对费时费力的化合物衍生化方法。由于衍生化方法会延长分析时间、增加复杂程度、可能带来误差，还可能在色谱分离中引入多余的成分（分析物或基质的反应副产物），该方法通常是方法开发过程中的最后一个手段。虽然衍生化步骤可以实现自动化，但分析人员必须确保衍生化步骤能够定量进行（如有必要），并且不会将多余的杂质引入分析中。虽然衍生化方法有各种缺点，但它仍然是分离和检测复杂基质中痕量物质的重要技术。实际上，在某些情况下，MS 检测衍生化还可以改善正离子（或负离子）电离。

本章内容涵盖 HPLC 分析中的衍生化，随后将介绍 GC 分析中的衍生化。

用于提高检测性能的 HPLC 衍生化

在 GC 分析中，衍生化通常用于提高分析物的挥发性或改变其极性，而在 HPLC 分析中（除手性分析外），衍生化的目的则是改善分析物（尤其是不具有发色团的分析物）的检测性能。HPLC 有多种分离机制（正相、反相、手性和离子色谱），可采用多种类型的固定相，还能通过直接向流动相中添加流动相改性剂克服与固定相之间的相互作用——例如化学吸附、吸附作用和拖尾等。

要选择可提高检测性能的 HPLC 衍生方法，首先需要考虑的就是目标分析物中是否存在可发生化学反应的一个或多个合适的活性官能团。同时，还必须确定最适合这类衍生化合物的检测机制。当然，前提是实验室可供相应的检测仪器。衍生化合物最常用的检测器包括紫外-可见光检测器、荧光检测器和电化学检测器。此外，还需要考虑选用柱前衍生还是柱后衍生（请参阅本章后面的部分）。带有羟基、酚羟基、氨基、羧基、烯羟基等活性官能团的样品组分都是衍生化反应的候选组分。因此多个种类的化合物都可进行衍生（表 20.1），其中包括酸、碱、胺类、抗生素、巴比妥类药物及其相关化合物、羟基化合物和类固醇化合物。

最常见的两种衍生化类型是在分析物中引入发色团或荧光官能团，然后分别采用紫外或荧光检测方法进行测定，这两种方法让我们能够检测到原本不可检测的分析物，或提高了检测的灵敏度。选择衍生化试剂一般需要考虑以下几点：

- 必须使用性质稳定的衍生化试剂
- 衍生化试剂以及衍生过程中产生的副产物应为不可检测的，或者应能够与分析物分离的
- 分析物与衍生化试剂的反应条件应易于实现
- 尽可能采用无毒的试剂
- 该过程应能实现自动化

许多有机反应都可用于分析物的衍生化。但对于常规应用，最好的办法是选用适当的衍生化试剂，并使用声誉良好的供应商提供的预处理衍生化试剂盒，根据其详细的分步指导进行操作。

表 20.1

用于 UV 和荧光检测的官能团与衍生化试剂 *

官能团	UV 衍生物	荧光衍生物
羧酸 脂肪酸 磷酸	PNBDI DNBDI PBPB	BrMaC BrMmC
醇类	DNBC Dabsyl-Cl NIC-1	
醛类 酮类	PNBA DNBA	丹磺酰肼
胺, 1°		荧光胺 OPA
胺, 1° & 2°	DNBC SNPA SDNPA Dabsyl-Cl NIC-1	NBD-Cl NBD-F Dansyl-Cl
氨基酸 (多肽)	SBOA SDOBA Dabsyl-Cl	荧光胺 OPA NBD-Cl NBD-F Dansyl-Cl
异氰酸酯	PNBPA DNBPA	
酚类	DNBC Dabsyl-Cl NIC-1	NBD-Cl NBD-F Dansyl-Cl
硫醇	Dabsyl-Cl	NBD-Cl NBD-F OPA

发色基团缩写		荧光标记缩写	
Dabsyl-Cl	4-二甲氨基偶氮苯-4-磺酰基	NBD-Cl	7-氯代-4-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑
DNBA	3,5-二硝基苄氧基胺盐酸盐	NBD-F	7-氟代-4-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑
NIC-1	1-萘异氰酸酯	荧光胺	4-苯基螺(咪喃-2(3H)),1'-二氢异苯并咪喃-3,3-二酮
PBPB	对溴苯乙酰基溴	OPA	邻苯二甲醛
PNBA	对硝基苄基羟胺盐酸盐	Dansyl-Cl	5-二甲氨基萘-1-磺酰氯
PNBDI	对硝基苄基-N,N'-二异丙基脒	BrMmC	4-溴甲基-7-甲氧基香豆素
DNBDI	3,5-二硝基苄基-N,N'-二异丙基脒	BrMaC	4-溴甲基-7-乙酰氧基香豆素
PNBPA	对硝基苄基-N-正丙胺盐酸盐		
DNBPA	3,5-二硝基苄基-N-正丙胺盐酸盐		
SNPA	N-琥珀酰亚胺基-对硝基苯乙酸酯		
SDNPA	N-琥珀酰亚胺基-3,5-二硝基苯乙酸酯		
DNBC	3,5-二硝基苄氯		

* 由 Regis Technologies 提供

紫外检测

通常，用于紫外-可见光检测的试剂都应具有两个重要的官能团。其中一个官能团控制该试剂与目标分析物的反应，另一个则用于 UV 检测。发色团应具有较高的摩尔吸收值，并且其吸收带应具有最大化检测范围以及最小化背景噪音。**表 20.2** 列出了紫外检测中常用的几种发色团，同时列出了它们的最大吸收波长以及在 254 nm 处的摩尔吸收系数。摩尔吸收系数为 10000 或以上的试剂可实现 ng 级别的检测。**表 20.1** 列出了一些市售紫外检测用衍生化试剂。它们将要进行衍生的目标官能团也列于表中。

表 20.2

可改善 UV 检测效果的目标发色基团		
发色基团	最大吸收波长	254 nm 下的摩尔吸收系数
苄基	254	200
4-硝基苄	265	620
3,5-二硝基苄	-----	> 10000
苯甲酸酯	230	低
4-氯苯甲酸酯	236	6300
4-硝基苯甲酸酯	254	> 10000
2,4-二硝基苯基	-----	> 10000
甲苯酰基	236	5400
甲氧苯基	262	16000
苯甲酰甲基	250	10000
4-溴苯乙酰基	260	18000
2-乙酰基萘	248	12000

请注意，许多用于在分子中引入硝基苄发色团（**表 20.2**）以进行紫外检测的常用试剂同样适用于电化学检测。此外，胺类以及氨基酸的 OPA 衍生物可以在极其微量的浓度下通过电化学检测方法进行测定。有关在 HPLC 电化学检测中应用衍生化的更多信息，请参阅参考文献 4。

荧光检测

选择衍生生化试剂时，除了需要考虑上述因素之外，如果选用的是荧光衍生生化试剂，该试剂还必须具备有宽吸收带和高量子产率的荧光发色团。由于强荧光响应要求物质具有一些特殊结构，荧光衍生生化试剂的种类比 UV 检测衍生生化试剂的种类少（表 20.1）。荧光衍生化的应用请参见图 20.1。

柱前衍生

柱前衍生与柱后衍生相比有几个优势。由于分析人员可以先进行衍生化，然后再将样品转移到适当样品瓶中进行分析，因此柱前衍生的设备和化学试剂限制更小。柱前衍生既可以手动操作，也可以自动进行。多家分析仪器或机器人厂商都提供自动化柱前衍生装置。只要所有试剂、分析物及衍生化产物性质稳定，该方法对衍生化反应的动力学特性就没有任何时间限制。最后，本书所述的样品前处理方法还可用于去除不需要的副产物、样品干扰物，如有必要，还可以更改样品溶剂以兼容 HPLC 流动相和 GC 固定相。

柱前衍生化可能会在检测中引入污染物或损失分析物，吸附、不良副反应、可能发生的样品降解、样品转移和反应不完全都可能造成这些问题发生。而且，衍生化需要额外的时间，还会增加方法的复杂性，同时也可能降低方法的精密度。

柱后衍生

柱后衍生通常需要在反应检测器中完成，分析物在分离之后，将要进行检测之前在此处完成衍生。反应检测器的设计考虑了样品在反应系统内的扩散。反应器的三种最常见设计为：毛细管、填充床和空气分段反应器它们的反应速度分别为快速 (< 1 min)、慢速 (1-5 min) 和更慢速 (5-20 min)。柱后衍生的主要优势为：假阳性化合物生成量极少；只要反应的重现性良好，就不必保证反应完全；分析物的色谱分离不受影响。

柱后衍生的缺点是除了快速反应之外的所有反应都会发生谱带变宽，同时衍生化步骤也大大增加了方法开发和常规应用的复杂性。该方法需考虑的重要因素包括对衍生化反应的动力学要求（需在 30 min 内完成反应），以及流动相可能与衍生化试剂不兼容的问题。确保试剂和流动相的兼容性也增加了 HPLC 方法研发的复杂性，因为在达到衍生化要求的同时还必须考虑该条件是否会影响分离的实现。最佳的分离流动相可能与衍生化反应不兼容。

以分析饮用水中的农药甲萘威和克百威的为例，对柱后衍生进行阐述⁶。N-甲基氨基甲酸酯农药（结构见图 20A 左侧）属于广谱杀虫剂，常用于水稻和玉米作物。过量的农药可能污染地下水、地表水和饮用水。现已发现饮用水中含低浓度的 N-甲基氨基甲酸酯可造成神经系统和生殖系统的健康问题。

在该应用中，自动化 SPE 最初用于从水中分离痕量农药⁶。SPE 小柱活化后，将 1L 水样通过小柱以富集其中的有机物质。二氯甲烷是 SPE 小柱的最佳洗脱溶剂。色谱分析采用了反相 HPLC 和柱后衍生。进行衍生前，首先通过高温下的初始柱后反应在碱性条件下将甲萘威和克百威水解为甲基胺接下来，甲基胺依次与邻苯二甲醛 (OPA) 和 2-巯基乙醇 (RSH) 反应，生成具有强荧光性的异吲哚衍生物（图 20.1A 右侧）。初始化合物是没有荧光性的。图 20.1B（见下页）显示了来自加标到自来水中的氨基甲酸酯的强荧光信号。请注意，为了防止水中的残留氯影响痕量农药的分析，我们在样品中加入了少量硫代硫酸钠。该柱后反应方法显示出了优异的线性、出色的重现性 (%RSD 小于 2%) 以及良好的回收率 (80-110%)，检测限可达到 ppt 级。

图 20
氨基甲酸酯的结构和柱后衍生化反应

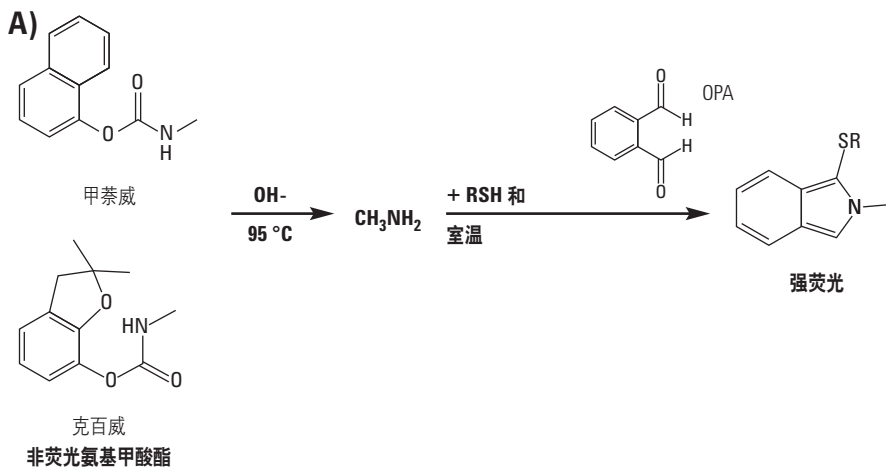
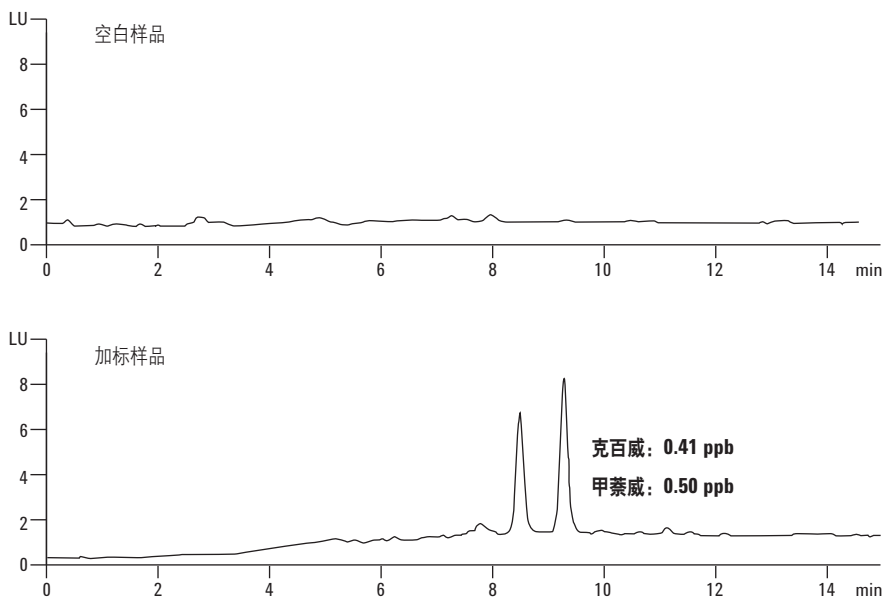


图 20 (接转下页)

B) 加标 ppb 级氨基甲酸酯农药的自来水样品柱后荧光色谱图



实验

仪器: 配备荧光检测器 (FLD) 的 Agilent 1100 或 1200 系统; 如果所需进样量达到 400 μL , 可安装多次抽取升级工具包。

色谱柱: **Agilent TC-C18(2) 4.6 x 150 mm, 5 μm**

流动相: A: 水, B: 甲醇;
0 min 42% B, 5 min 55% B,
12 min 60% B,
13 min 42% B, 停止时间 15 min,
后运行 2 min

流速: 1.0 mL/min

柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$

检测器: 荧光: Ex 339 nm; Em 445 nm

进样体积: 10 μL

柱后反应条件

试剂流速: 0.1 mL/min

反应器温度: 95 $^{\circ}\text{C}$

衍生化温度: 室温

SPE 小柱 安捷伦科技公司 Sampliq C18, 6 mL/500 mg

衍生化的其他用途

虽然衍生化主要涉及气相色谱,而在 HPLC 分析中,对于适用于分析高挥发性分析物的蒸发光散射检测器或电晕放电检测器来说,可提高分析物挥发性的衍生化反应也是非常重要的样品前处理方法。通过极性基团(如氨基)的衍生化处理可以去除硅胶基反相色谱柱上由于硅醇基或离子相互作用而产生的峰拖尾。

与非手性分离中的衍生化处理不同,手性衍生化的目的在于增强分离效果,而不是改善检测结果。而且,历史最为悠久的手性分离方法就是衍生化。因此,我们拥有大量的可用信息,并能够从经验证可衍生的多个官能团中进行选择。现在,手性衍生化已被用于反相和正相液相色谱。手性分析的关键在于使具有光学活性的目标分子与同样具有光学活性的试剂发生反应。

衍生化手性分析具有如下的优势和局限性:

优势

- 这项技术已被广泛研究,大量的可用资料使得该技术简单易用
- 该方法使用标准的 HPLC 固定相和流动相
- 仅需一个步骤就能同时完成检测和分离的衍生化反应,产物的检测不再是让分析人员为难的问题

局限性

- 对于对映异构化合物,必须先进行手性拆分,分离出目标化合物,再进行衍生化,该过程难以实现自动化分析
- 衍生化试剂的纯度极为重要,轻微的对映体污染就有可能导致错误的测定结果
- 对于反应和/或平衡速率不同的对映体,使用常数计算出的结果可能无法反映真实的对映体比例
- 样品前处理过程中,产物可能发生外消旋。

除手性化合物的衍生化外,使用手性试剂也可以增加手性固定相(CSP)对手性分析物的选择性。某些化合物不具备足够独特的结合位点,无法在 CSP 上获得足够的分离度,而通过与手性试剂进行衍生化反应能够使其实现分离。

气相色谱中的衍生化

在 GC 分析中，衍生化的主要目的是增加分析物的挥发性。大分子化合物，尤其是那些生物或环境分析中的高分子物质和/或含有极性官能团的化合物，在对其进行 GC 分离的温度下通常都是热不稳定的，这些物质就是 GC 衍生化的候选化合物。衍生化反应的主要类型是将质子官能团反应变为对热稳定、挥发性更强的非极性官能团。除改善热稳定性外，衍生化还能最大限度地减少管壁相互作用以及可能导致拖尾和/或不可逆吸附的其他相互作用，从而改善峰形。有多种 GC 衍生化试剂可供选择，表 20.3 列出了其中使用更为广泛的一部分试剂。许多出版物都为适用于 GC 分析的化合物总结了各种衍生化方法^{1,3,5}。

表 20.3
典型的 GC 衍生化试剂

试剂类别	典型的试剂化合物	衍生化合物	注释
三烷基硅烷	TMCS、HMDS、MSTA、MSTFA、BSTFA	醇类、酚类、羧酸、硫醇、胺类、酰胺	最常用，在无水条件下反应，反应速率取决于位阻因素，需要使用催化剂，需选择适当的溶剂和温度；除几种糖类产物以外，副产物很少；可采用 ECD 检测卤代硅烷。
卤代烷基丙烯酰基	全氟化碳酰基 (例如三氟乙酰基、五氟丙酰基、七氟丁酰基)	胺类，酚类	通常在碱 (例如吡啶、三乙胺) 存在的条件下由酰酐或酰基氯制得；引入电子捕获基团用于 ECD 检测。
卤代烷基丙烯酰基	醇类	羧酸	在酸催化剂 (例如 HCl、乙酰氯、三氟化硼) 存在的条件下与过量的醇发生反应；去除水的副产物，有助于衍生化过程；最常用甲酯。
烷基化	卤代烷、重氮烷、缩醛类、N,N'-二甲基甲酰胺二烷基缩醛	含活性氢的化合物 (例如-COOH、-SO ₂ OH、-OH、-SH、-NH ₂ 、=NH)	必须使用催化剂以保证充分反应；常用的催化剂包括氧化银、氧化钡、氢氧化钠。
五氟 (PF) 苯基	PF-苯甲酸酐、PF-溴化苄、PF-苯甲酰氯等	醇类、胺类、酚类、羧酸、酮类	适用于各种有机化合物；衍生物稳定、挥发性强，可使用 ECD 检测。
脲类	羟胺或衍生物 (甲基、乙基或苄基)	酮类、醛类	主要用于在形成其他衍生物时保护酮基

代码:

TMCMS: 三甲基氯代硅烷

HMDS: 六甲基二硅氮烷

MSTFA: N-甲基-N-(三甲基硅烷基)乙酰胺

MTBSTFA: N-叔丁基二甲基硅烷-N-甲基三氟乙酰胺

对 GC 来说, 硅烷化试剂是最常见且最通用的衍生化试剂。其反应活性强, 可与大多数官能团发生衍生化反应, 并且与大多数化合物的反应都不会产生副产物或伪峰。三甲基硅醚衍生物本身在无水条件下稳定。现在人们又开发出了水解稳定性和检测性能更出色的新型硅烷同系物和类似试剂。有机酸三甲基硅烷化衍生的典型反应如下。



硅烷化反应一般在玻璃样品瓶中进行, 并且通常需要升高温度。需要注意的是, 在升高温度时 PTFE 螺口盖可能出现渗漏。有时需要使用碱性催化剂 (如吡啶、二乙胺) 来去除 HCl 副产物。在某些情况下, 使用三甲基硅烷试剂混合物比单独使用其中任何一种试剂更有效。

改善色谱检测性能是 GC 衍生化的另一个重要目的。现在人们已经开发出了含氯、溴或碘 (用于电子捕获检测器) 和氰基 (用于热离子检测器) 等电子捕获基团的硅烷化试剂来改善色谱的检测性能。几乎所有的 GC 衍生化反应都是柱前衍生化反应。

近年来, 随着串联 LC-MS/MS 技术越来越受关注, 气相色谱工作者已经把某些分析转换为使用液相色谱, 从而避免了衍生化反应步骤。串联质谱技术的灵敏度和选择性完全可媲美 GC 检测器的选择性和灵敏度 (更多信息请参阅第 17 章)。

参考文献

1. Poole, C.F.; Poole, S.K. *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, **1993**
2. Lunn, G.; Hellwig, L.C. *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, **1998**, ISBN-10: 0471238880 and ISBN-13: 978-0471238881
3. Blau, K.; Halket, J. (Eds.) *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2nd Ed., John Wiley and Sons, Chichester, U.K., **1993**
4. Lingeman, H. *Detection-Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography*, CRC Press, New York, **1990**, ISBN-10: 0824782879 and ISBN-13: 978-0824782870
5. Drozd, J. *Chemical Derivatization in Gas Chromatography*, Elsevier Science, **1986**, ISBN-10: 0444553223 and ISBN-13: 978-0444553225
6. Fu, R. Agilent Technologies Publication #5989-9802EN, Shanghai, China, **2008**

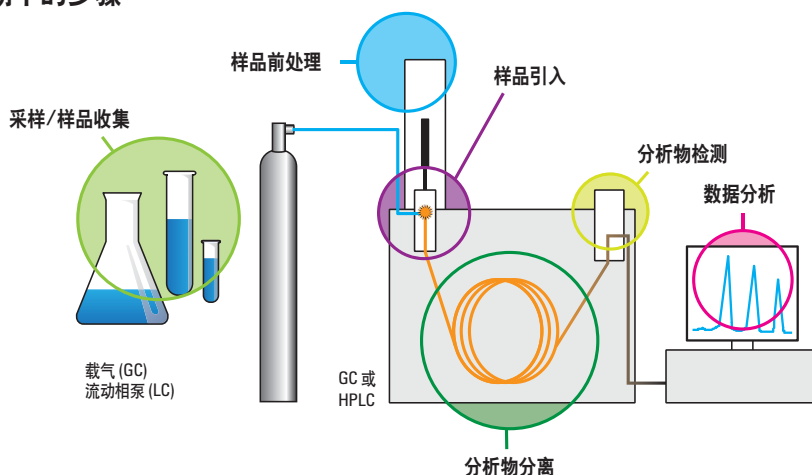
“恰到好处”的样品前处理方法： 已经验证的样品分析发展趋势

样品前处理（以及小范围内的数据分析）通常被认为是方法的速度决定步骤和容易出错的环节。如果能够在分析过程的其他部分获得符合分析人员要求的选择性，将大大减轻样品前处理步骤面临的提高分析选择性的压力。本章阐述了“恰到好处”（Just Enough）的样品前处理概念，¹内容基于 LCGC No. America 中的一篇介绍该理念的文章。“恰到好处”的样品前处理方法高度依赖于串联质谱检测技术的最新研究进展，以此为样品分析提供过去无法实现的高灵敏度和高选择性。即便如此，我们有时仍然需要使用更加复杂的样品前处理方案，特别是当共洗脱干扰引发离子抑制/增强效应时。

在前面的内容中，我们已经讨论过如何将选择性方面的考虑贯穿整个样品分析周期²。**图 21.1**列出了典型样品分析的工作流程。在大多数分析中，化学家的目的都是要在通常非常复杂的基质中寻找一种或几种目标分析物。方法开发的目的，就是开发出一种具有足够的选择性的分析方法，在目标分析物的浓度水平以分析人员所需的精密度和准确度分析这些化合物。分析人员可以选择在分析周期（**图 21.1**）的任一环节获得所需的选择性，包括采样过程、样品前处理、样品进样、色谱分离、检测，甚至是在数据分析过程。在目标分析物能够以良好的灵敏度得到检测的前提下，只要样品基质中的干扰物不会对分析仪器或色谱柱造成损坏（短期或长期），或被确认为有害干扰物，却能够轻松去除，就允许这些化合物存在。去除干扰物的一个例子是在每次分析后进行反吹，以去除 GC 色谱柱头捕集的高分子量污染物。参考文献中列举了如何在气相色谱分析过程的每个步骤中获得所需选择性的各种实例²。

图 21.1

分析周期中的步骤¹



分析方法某一部分选择性较低，可通过提高该方法另一部分的选择性来弥补。例如，如果分析人员的 HPLC 仪器仅配备了固定波长紫外检测器，或 GC 仅配备了热导或火焰离子化检测器，检测器的选择性就可能无法达到排除多余样品组分的干扰检测目标分析物所必需的选择性要求。因此，为了弥补检测器的缺陷，我们就需要采取额外的样品前处理步骤，或寻找在分离过程中选择性更高的色谱柱。在这种情况下，分析人员可能需要花费大量时间和精力来进行一个或多个样前处理步骤，或优化色谱柱/流动相系统 (HPLC) 的选择性，以排除潜在的干扰。另一方面，如果分析人员拥灵敏度和选择性极高的检测器，就没有必要花费大量时间优化样品前处理方法和/或分析分离方法了。

由于分离色谱柱的选择性往往不容易预测，所以从目标样品中去除干扰物就成为了样品前处理步骤的主要目标。虽然有时这项工作会增加分析人员的负担，但幸运的是现在已有许多久经考验的样品前处理技术可供分析人员选择。然而，随着具有高度选择性和灵敏度的 HPLC 和 GC 串联质谱技术的发展和普及，当样品基质含有的干扰物不会干扰分离和检测时，样品前处理步骤以及色谱分离过程就能够极大地被简化。我们将这一简化的样品前处理过程称为“恰到好处” (Just Enough) 的样品前处理方法。

虽然使用“恰到好处”的样品前处理方法获得的样品纯度并非一定能够媲美多模式固相萃取 (SPE) 或液液反萃取等更为严格的方法，但只要杂质不会对分离或检测（当然，还有色谱柱或仪器）造成负面影响，就没有问题。实际上，在保证最终结果符合分析人员要求的前提下，样品前处理的时间是可以大大缩短的。虽然目前质谱仪检测器的价格仍远远高于紫外或 FID 检测器，但许多实验室认为它的性价比高，能够改善分析并加快分析速度，从而提高总的分析效率并降低成本。当然，只要分析物无需进行衍生，价格较低的选择性检测器（如 HPLC 荧光检测器、GC 电子捕获检测器）也适用于“恰到好处”的样品前处理方法。

“恰到好处”的样品前处理概念并不意味着我们需要投机取巧或不使用更复杂的方案。它实际上是指如图 21.2 所示的一系列样品前处理流程。该图只列出了广泛使用的众多样品前处理方法中的其中一部分。从该图最上方的过滤、离心以及“稀释-上样”法开始，越往下，样品前处理方案的选择性就越高，同时也更为复杂，分析人员需要付出更多的人力、实施更多的操作步骤才能获得“恰到好处”的纯化结果以满足分析需求。任何分析技术都需要最大限度地减少样品处理步骤，因为样品转移的次数越多，分析物损失（或发生变化）的可能性就越大，因此会导致分析精密度和准确度降低。如果仅通过一两个步骤即可满足分析方法的需求，这就足够了，但在某些情况下，我们可能还需要增加其他的样品前处理步骤以去除干扰物。去除或减少干扰物的需求不会多于 LC/MS 和 LC-MS/MS 的分析要求（见图 21.2）。

图 21.2

Just Enough 样品前处理方法是指一种连续的方法

方法

- 过滤
- 离心
- “稀释-上样”
- 超声
- 冻干
- 蛋白质沉淀
- 蒸馏
- 透析/超滤
- 液-固萃取/加压流体萃取
- 索氏提取
- 固相微萃取
- 支持液相萃取
- 液液萃取
- 固相萃取
- QuEChERS
- 湍流流动色谱
- 衍生化
- 色谱柱切换/中心切割
- 免疫亲和吸附剂
- 分子印迹聚合物

更简单的通用方法

选择性较低 样品纯化效果较差



更复杂的技术

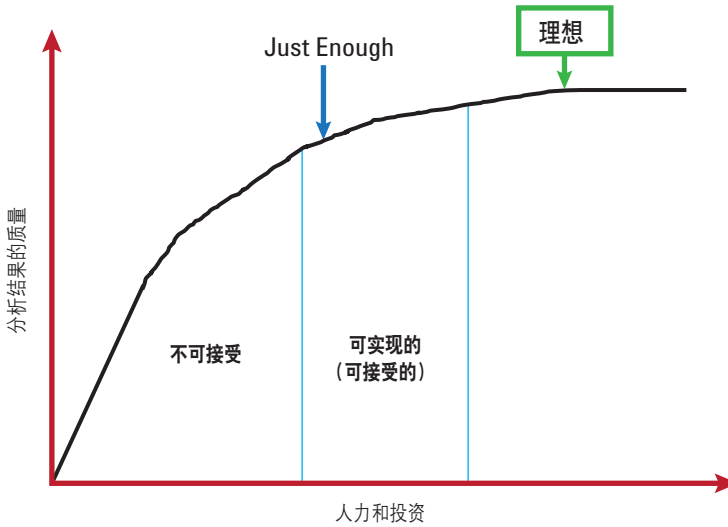


更高的选择性
最佳的样品纯化效果

图 21.3 以图示形式展示了“恰到好处”(Just Enough)的样品前处理概念，这一理念实际上可应用于整个分析过程，但我们往往只着重将其应用于样品前处理阶段，这是因为许多分析人员正是希望能在这一阶段实现最大幅度的灵敏度提升。理想情况下，在一种分析方法中，我们总是希望以最少的人力和投资得到最好的结果。而另一方面，实际的数据要求可能并不需要最佳结果，可接受的结果往往就足够了。例如，筛查几百个尿样中是否存在滥用药物，大多数样品都是阴性。因此，使用定性方法就足以筛查出含有非法药物的样品。但是，一旦在筛查实验中锁定了可能含有非法药物的样品，接下来就可能需要采用较为复杂的方法更加仔细地对阳性样品进行定量分析。

图 21.3

在样品前处理中趋于适当的均衡



还有许多其他因素可能影响“恰到好处”纯化方法中样品前处理技术的选择。分析人员的操作技术和知识储备非常重要。还有仪器的可用性、化学试剂、消耗品以及其他装置；进行方法开发和完成当前任务的可用时间；基质的性质和复杂性；分析物的浓度水平和稳定性；需要的样品量；每个样品的分析成本（预算）；以及样品前处理技术的安全性等等，这些都只是众多考虑因素中的一部分。分析人员需要考虑上述所有因素以及其他因素，从中找到平衡的方法。

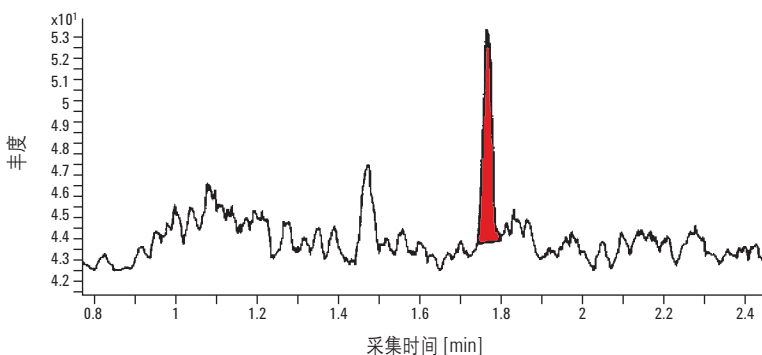
“恰到好处” 样品前处理方法实例

本书中已讨论了多种样品前处理方法。图 21.2 列出了满足“恰到好处”样品前处理方法标准的多种样品前处理方案。如前所述，分析方法的样品前处理步骤越少，出现误差的几率就越低，同时分析物的回收率越高，处理样品所要花费的时间越少。但是在图 21.2 中，越往下，“恰到好处”方法也可能需要使用更复杂的样品前处理手段。

现在让我们来看看几个可以之称为“恰到好处”的样品前处理实例能否提供可接受的结果。近年来，为了测定生物体液（如血浆）中的目标药物及其代谢产物，许多制药公司都改用更简单的蛋白沉淀法（请参阅第 16 章）并采用反相 HPLC 分析，但通过这种方法获得的样品在分析时需要使用选择性和灵敏度更高的 LC-三重四极杆 MS/MS 检测器，并对特定离子对进行多反应监测（MRM）。第一个例子是采用 LC-三重四极杆质谱系统直接分析人血浆中的丙酸氟替卡松（FP）³。FP 是一种糖皮质激素类的合成类固醇，用于治疗过敏性疾病。作为鼻吸入剂或喷雾剂使用时，该药物直接作用于鼻腔内的上皮组织，仅有极少量药物会被吸收进入身体其他部分。由于系统浓度很低，需要使用高灵敏度的 LC/MS 方法测定其在人血浆中的浓度。图 21.4 展示了采用蛋白沉淀法（请参阅第 16 章，蛋白沉淀）处理血浆后通过“稀释-上样”法获得的 LC/MS 分析结果，分析时监测的 MRM 转换离子对见图下方的说明。在这个例子中，“稀释-上样”法在低至 5 pg/mL 的最低校正水平展现出的灵敏度已经超过了用于定量的标准。因此，蛋白质沉淀与“稀释-上样”相结合的样品前处理方法完全在法规指南要求的分析性能范围内，并且能够“恰到好处”地满足分析需求。

图 21.4

使用“稀释-上样”样品前处理方法测定血浆中的丙酸氟替卡松³



仪器：Agilent 6490 型 LC-三重四极杆 LC/MS 系统 (MRM 离子对 501.2 → 293.1)，柱上进量 2.5 fg；
检测限 1 fg；5-50 mg/mL 浓度范围内的标准曲线呈线性

样品前处理：使用乙腈沉淀血浆样品，然后用水将其稀释 4 倍

“恰到好处”的样品前处理方法的第二个例子在第 16 章有详细描述，依然采用了蛋白沉淀法，但考虑了离子抑制效应的问题。这里不再重复展示图示，读者可以参阅第 16 章，亲脂性物质的去除。如果在色谱图中目标分析物与磷脂在同一区域被同时洗脱，那么血浆中（磷）脂的存在可能会引起离子抑制效应。在分析中考虑代表磷脂和溶血磷脂酰胆碱洗脱的 $m/e\ 184 \rightarrow m/e\ 184$ 离子对可获得磷脂的 MS-MS 选择性。图 16.6.1 展示了典型的浸提实验结果，血浆样品经蛋白沉淀后采用了 Captiva 过滤产品 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 进行过滤。如果药物和/或其代谢产物与这些化合物共洗脱，可能会发生离子抑制效应并严重影响分析结果。因此，在这个例子中，仅采用简单的蛋白沉淀样品前处理方法不足以提供可靠的数据。

经过更为复杂的 SPE 方法 (图 16.6.2) 或液液萃取法 (图 16.6.3) 处理，所得的萃取物更加纯净，磷脂类含量大大减少。要获得最好的整体效果，还需要采用选择性的 SPE 进行更为复杂的去磷脂步骤，才能去除萃取物中残留的痕量磷酸盐化合物 (图 16.6.4)。幸运的是，一种名为 Captiva ND^{Lipids} 的产品为我们提供了简便的“恰到好处”解决方案，它结合了膜过滤/磷脂去除 96 孔板，让我们仅通过单次操作就能达到通过上述两个步骤才能获得的纯化效果。

QuEChERS (请参阅第 8 章) 是一种最初用于水果和蔬菜中农药萃取的样品前处理技术⁴。这是一种相对来说较为简便的样品前处理方法，包括两个步骤：1) 使用含高浓度盐（如氯化钠、硫酸镁和缓冲试剂）的水和乙腈进行盐析分配萃取；2) 分散固相萃取步骤，使用各种吸附剂处理第 1 步获得的试样，去除基质中可能干扰后，使用 LC/MS、LC-MS/MS、GC/MS 或 GC-MS/MS 分析的化合物。该技术已被证明可广泛用于多种基质中数百种农药的痕量分析。方法的标准化也使其成为了通用的样品前处理方法。

近年来，QuEChERS 萃取的应用已扩展到农药实验室之外，被广泛用于多种基质，包括畜肉和禽肉中抗生素的萃取、动物饲料中兽药的萃取以及土壤中环境污染物的萃取。在“恰到好处”样品前处理方法的第三个实例中，我们采用了如图 21.5 所示的方案，使用 QuEChERS 萃取鱼类中的多环芳烃 (PAH)。PAH 是欧盟和美国国家环保局重点污染物列表中的一大类有机化合物，具有致突变和致癌性。在海洋环境中，PAH 作为一种水媒性化合物和富集性污染物，可经由食物链进入海洋生物体内。该应用表明，样品前处理技术满足检测需求时，无须使用串联质谱检测器。大多数 PAH 都具有强荧光性，因此，如图 21.6 所示，采用反相 HPLC 结合荧光检测即可测定 16 种加标水平在 10 ng/g 以下的该类化合物⁵。QuEChERS 萃取法提供了良好的回收率，% RSD 均低于 2%。

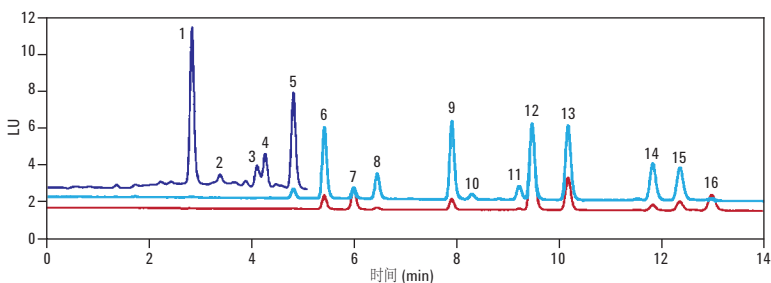
图 21.5

QuEChERS AOAC 样品前处理流程图⁵



图 21.6

加标鱼类萃取物的 HPLC-荧光色谱图



加标鱼类样品的 HPLC-FLD 叠加色谱图，加标 PAH 包括（括号中为加标浓度）：1. 萘 (20 ng/g)；
 2. 芴烯 (20 ng/g)；3. 芴 (10 ng/g)；4. 芘 (10 ng/g)；5. 菲 (10 ng/g)；6. 蒽 (10 ng/g)；7. 荧蒽 (10 ng/g)；
 8. 芘 (10 ng/g)；9. 1,2-苯并蒽 (5 ng/g)；10. 苯并菲 (10 ng/g)；11. 苯并(e)芴烯 (5 ng/g)；
 12. 苯并(e)芴烯 (5 ng/g)；13. 苯并(k)荧蒽 (5 ng/g)；14. 二苯并(a,h)蒽 (5 ng/g)；15. 苯并(g,h,i) (5 ng/g)；
 以及 16. 茚并(1,2,3-cd)芘 (5 ng/g)；色谱图黑色部分采用下列荧光激发/发射波长：260 nm/352 nm；
 红色部分 260 nm/420 nm；蓝色部分 260 nm/440 nm。对于芴烯，紫外检测采用 230 nm。

HPLC 条件

色谱柱： Agilent ZORBAX Eclipse PAH C18, 4.6 × 50 mm, 1.8 μm

流速： 0.8 mL/min

柱温： 18 °C

进样体积： 5 μL

流动相： A = 去离子水, B = 乙腈

梯度：

时间 (min)： **%B**

0 60

1.5 60

7 90

13 100

结论

测定复杂基质中的目标化合物时所需要的选择性，在分析过程中的任何环节都可以获得。针对样品前处理阶段，我们提出了“恰到好处”的样品前处理概念。这一理念高度依赖于通过串联质谱与色谱分离联用实现的灵敏度和选择性的提高。在离子抑制/增强效应维持最低水平的情况下，“恰到好处”的样品前处理方法能够提供符合分析需求的良好回收率、最低检测限 (MDL) 和最低定量限 (MDQ)。

不过，正如前文中分析鱼类中 PAH 的实例所述，我们也可以选择使用其他的选择性检测机制（如荧光检测）。有一点需要特别注意：在某些分析中，样品前处理步骤仍是决定分析速度的主要步骤，在这种情况下，“恰到好处”样品前处理法不一定能满足分析需求。这时，我们还是需要使用较为复杂的样品前处理方案，如 SPE、液液萃取等。

参考文献

1. Majors, R.E. *LCGC No. America* **2012**, *30* (12), 1024-1031
2. Turner, D. *LCGC No. America* **2012**, *30* (2), 100-110
3. *Bioanalysis Application Note Determination of Fluticasone Propionate in Human Plasma (生物分析应用简报—人血浆中丙酸氟替卡松的测定)*, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-6380EN, 美国加利福尼亚州圣克拉拉市, **2010年8月**
4. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. *Journal of AOAC International (JAOAC)* **2003**, *86*, 412-431
5. Pule, B.O.; Mmualefe, L.C.; Torto, N. *Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish*, Agilent Technologies Application Note #5990-5441EN, Santa Clara, CA, **January, 2012**

样品前处理的现状及未来

本书记述了色谱样品前处理领域中取得的诸多进展。与十年前相比，许多现代样品前处理技术具有以下特点：

- 更快速
- 更安全
- 更易于自动化
- 小型化
- 使用更少的有机溶剂
- 在样品回收率和重现性方面与旧方法相当或优于旧方法

但是，在许多领域中，样品前处理仍被认为是分析实验室的瓶颈。总体上，学术界未对样品前处理引起重视，他们认为该课题过于平凡，不如分析本身具有挑战性。尽管如此，该领域的工作者仍在不断开发新的样品前处理技术和改良现有技术，其中某些技术性能具有突破性，可成为主流的常规方法，如固相微萃取 (SPME)、QuEChERS 和加压流体萃取。

成熟的技术还扩展了新的应用领域，例如在水果和蔬菜的农残分析以外的领域使用 QuEChERS、将固相微萃取用于远程采样，或将干血斑分析用于其他生物体液。针对液固萃取的新型吸附剂不断得到开发，例如具有高选择性的分子印迹聚合物和免疫吸附固定相。全新的技术（例如分散液液微萃取、离子液体萃取和微量盐析液液萃取）将和固相萃取一样，成为新一代广泛使用的技术。近年来，许多耗时的样品前处理技术的自动化已取得诸多进展，帮助分析人员获得更多时间处理挑战性的工作。90 年代的完整实验室机器人系统已被 x-y-z 台式液体处理系统所取代，后者与分析仪器更加接近，并且通常可与分析仪器集成。除进样外，带有样品前处理功能的自动进样器已推出数年，并已证实其在进样前最后几个关键步骤中极为有用。有时，对液体和固体样品，这类自动进样器和台式样品前处理系统可提供全方位的自动化，甚至包括样品称量。

正如第 21 章详尽介绍的那样，高灵敏度/选择性质谱仪以及更高效和更高选择性的色谱分离在某些情况下提供的选择性都是过去在样品前处理化学家的帮助下得到的。这样，开发一种结合了采样、样品前处理、分析、检测以及数据分析的最优的分析方法，为复杂样品提供更全面更耐用的解决方案。应用越来越广泛的带正交分离模式的多维在线柱切换系统可为样品前处理/分析提供解决方案，此类解决方案比耗费几个小时开发所谓最适宜的样品前处理技术更快速且更具选择性。

受仪器灵敏度不断提高的驱动，进一步发展小型化可在不止一个方面为分析人员提供各种优势。现在只需要很少的样品量。使用 96 孔流通型 SPE 板，其中每个孔内仅含几毫克吸附剂，不仅缩短了萃取时间，而且只需要几微升的洗脱溶剂。因此，可显著加快溶剂蒸发和复溶的速度。96 孔蒸发系统和多孔板处理器使样品前处理不再受处理速度限制，并且使高通量样品处理正成为常见操作。更重要的是，溶剂使用量与小型化程度成比例递减，从而降低了溶剂购买和处理成本。虽然基于芯片的分析系统仍未投入常规使用，但有理由相信这类集成化系统将来会取代占据整个实验室台面的仪器。有些具备简单样品前处理技术的便携式现场分析仪器已经投入使用，这为将分析带入源头或者生产车间提供了一种趋势。

目前小型化是广受关注的话题，未来纳米材料在样品前处理中的应用前景将非常可观。由于具有“纳米级”效应，所以纳米材料独特的物理和化学性质使其成为良好的候选吸附剂。许多纳米颗粒（例如金属、金属氧化物、金属有机框架、硅质以及诸如石墨烯和碳纳米管的碳质）已成为研究课题，并且此类研究课题越来越多，纳米颗粒不仅作为 μ -SPE 吸附剂，而且还作为 SPME 棒和纤维的涂层。对后者而言，固定化纳米颗粒具有与现有聚合物固定相一样坚固耐用的性质，并具有更高的表面积，可提高灵敏度，还可以进行衍生化以引入新的化学性质。特别受关注的是磁性 SPE 颗粒，由于它们可通过使用磁铁进行回收，所以可直接将这些颗粒分散到样品溶液中进行快速分析物萃取。磁性操作克服了 SPE 传统的问题，例如无需填充小柱或 SPE 板，或无需大体积液体样品加载的耗时过程。

绿色化学的话题已持续多年，据悉这一概念已在一些大型公司和机构中得到采纳，它不仅用于生产环境中，还用于化学实验室中。在分析和分离实验室中，绿色化学不仅意味着使用更环保和更安全的溶剂，还意味着要降低溶剂的使用量、减少能量消耗，以及考虑使用无溶剂的样品前处理技术。对于后者而言，SPME、单滴微萃取、过热水萃取以及超临界流体萃取（和色谱）正是几乎不使用传统有机溶剂的技术。委员会仍大力提倡使用离子液和共熔溶剂，以实现更环保的萃取。



术语表

96 孔收集板	在固定尺寸的聚乙烯矩形板 (127.8 mm × 85.5 mm) 上以 8 × 12 (96 个) 阵列排列的小“试管”，也称为孔；这些孔的体积为 0.5- 2 mL；请参见第 9 章。
96 孔板	含有 96 个单孔的小型矩形塑料板，这些单孔为小体积试管，以 8 × 12 阵列排列；用于液体处理和其他类似需求；请参见第 5 章和第 9 章。
96 孔固相萃取板	在小型的矩形塑料板上以 8 × 12 矩阵排列的 96 个独立流通式 SPE 孔，每个孔具有上下筛板，以容纳吸附剂或树脂的固体颗粒并进行微量水平的 SPE；通常将 1 mg - 0.2 g 填料置于孔内，孔的容积可达 2 mL；可使用 x-y-z 液体处理系统或定制工作站进行自动化 SPE；请参见第 9 章。
96 孔过滤板	在固定尺寸的聚乙烯矩形板 (127.8 mm × 85.5 mm) 上以 8 × 12 (96 个) 阵列排列的小过滤试管 (体积范围为 0.5- 2 mL)；在孔底部放置膜过滤器过滤液体样品；有时将预过滤器放置在膜过滤器上面，避免颗粒堵塞过滤器；请参见第 5 章。
ACN	乙腈的缩写，乙腈是反相液相色谱以及样品前处理中常用的溶剂。
氨基相	正相键合相色谱中使用的一种固定相，即丙氨基相。对任何溶质分子（如醛类）或可以与胺类反应的流动相添加剂都有一定的反应性。在一些应用中，氨基相可作为弱离子交换剂使用，也可在水 - 乙腈流动相中用于分离碳水化合物。这是一种相对不稳定的固定相；请参见第 9 章。
螯合树脂	含有与阳离子类化合物（如，铜、铁、重金属离子等金属）发生相互作用的官能团；用于富集痕量成分或分离。
Boxcar 色谱	请参见 柱切换 ，别名。
被动采样	在被动气体采样中，在选定时间内（从 5 分钟到 24 小时），空气样品在流量控制器的驱动下进入排空的采样罐中。采样时间和流速决定了所需的采样罐体积。

标样	含有已知量的目标化合物的样品；通过将该样品的洗脱时间和在同样条件下通过样品进样而获得的保留时间进行比较，来帮助鉴定样品峰。在定量分析中，外标是以检测器输出（峰面积或峰高）对浓度的比值来建立校准曲线所用的化合物；可通过在校准曲线上匹配检测器输出值来测定未知浓度。内标是具有不同保留时间的已知浓度化合物，将其加入到样品中，并比较未知化合物与内标之间的响应值，以此定量测定未知化合物。
标准品加入	用于改善定量分析的方法；需要使用已知浓度的纯标准品。首先将未知浓度的样品进样获得峰面积；再向未知浓度样品中加入已知量的纯化合物。通过所获得的新色谱峰，分析人员可以测定原未知浓度样品中化合物的量；另一种方法是将恒量的未知浓度样品加入到该物质的一系列标准溶液中，并使用所得的峰面积对原标准溶液的已知浓度作图。从所得直线的斜率可获得未知样品的浓度。
表面积	在吸附剂中，指采用可行测量技术（如使用氮气吸附的 BET 方法）测定的固体表面总面积。典型多孔吸附剂（如硅胶）的表面积在 100-600 平方米/克范围内。
玻璃纤维萃取盘 (SPE)	SPE 颗粒嵌入玻璃纤维基质中的一种形式；萃取盘在处理大体积样品（如水）时极为有用，因为与经典小柱相比，萃取盘具有更大的横截面积，可以实现更高的流速；请参见第 9 章。
补偿离子	在离子交换过程中，溶液中用于置换离子化位点上目标离子的离子。在离子对中，是加入到流动相中以形成中性离子对的带相反电荷的离子。
捕集	用固体物质（如，硅胶、聚合物、无机吸附剂等）或液体溶液，以物理或化学方法保留稀释液流或气流中目标溶质的过程；常用于富集分析物以进行高灵敏度分析。
不分流进样	进入气相色谱柱的样品不分流，而是直接导入色谱柱；比分流进样具有更高的灵敏度，但可能出现回流，并且由于样品在高温进样口滞留时间较长，降解的可能性更高；请参见第 6 章。
不规则填料	指色谱柱填料的形状。这种不规则填料具有各种微粒粒径可供选择。填料来自于固体原料研磨成的小颗粒，然后用粒径分选机按细化的粒径范围筛分成多个组别。目前在分析型 HPLC 中，球形填料比不规则填料更为常用；但更便宜的不规则填料仍广泛用于制备液相色谱柱和 SPE 中；请参见第 9 章。
C4、C8、C18 等	指反相键合相的烷基链长度。
Certify	用于滥用药物分析的 SPE 产品；请参见第 10 章。

- 采样** 在源头采集代表性样品的过程；采样还指对样品进一步抽样，使其更符合实验室分析要求；重要的是，必须确保最终分析的样品可代表原始样品，不含偏差或歧视。
- 采样罐富集** 一种不锈钢容器，该容器中的真空保持在 10 mTorr 以下，或保持压力为 40 psig。采样罐有多种体积规格：400 mL、1.0 L、3.0 L、6.0 L 和 15 L。采样罐的尺寸选择通常取决于采样期间所需的样品分析物浓度、采样时间、流速和样品体积。一般情况下，越浓缩的样品（如土壤气体采集）使用的采样罐越小，3 L 和 6 L 采样罐可用于测定环境空气样品的时间加权（TWA）浓度，采样时间可达 24 小时，而 15 L 采样罐可用作标准气。采样时间受采样罐尺寸和样品采集流速的限制；请参见第 6 章。
- 采样误差** 当群体的统计特征来源于该群体的子集或样品估算值时出现的情况。因为样品不能包含群体中的全部，所以对样品的统计学分析（例如平均值和数量）通常与整个群体的参数不同。因为取样通常是用来测定整个群体的特性，因此样品和群体值之间的差异被称作取样误差。一般不能准确测量取样误差，因为真实的群体值是未知的；但取样误差可以通过样品的概率模型进行估算；请参见第 4 章。
- 残留硅醇基** 将固定相化学键合到填料后，残留在填料表面的硅醇基 (-Si-OH)。这些硅醇基可能存在于极小的孔隙内，不会接触到体积大的反应性有机硅烷（例如二甲基十八烷基氯化硅），但会接触极性小分子化合物。这些硅醇基通常可以使用小的有机硅烷（如三甲基氯硅烷）封端去除。请参见封端。
- 超临界流体萃取 (SFE)** 用超临界流体从固体原料中萃取分析物，较强极性的分析物最常使用二氧化碳和有机改性剂，或含少量有机改性剂的二氧化碳；超临界流体具有气体的扩散能力和液体的溶剂能力；需要特殊的 SFE 单元对压力和温度进行精密控制；分析物可以采集到冷阱中、吸附剂上或液体里；是一种“绿色”提取技术；请参见第 14 页。
- 超滤** 多膜过滤形式，该过程中液体静压力将液体紧压至半透膜。高分子量的固体悬浮物和溶质得到保留，而水和低分子量溶质则通过半透膜。这一分离过程可用于纯化和富集大分子 (103-106 Da) 溶液，特别是蛋白质溶液。超滤与微过滤、纳米过滤或气体分离没有本质上的不同，区别在于超滤所保留的分子大小不同。超滤可使用错流过滤或全流过滤模式，并且超滤分离会出现浓差极化现象；请参见第 2、15、17 和 18 章。
- 超声** 对液体样品使用超声 (> 20 kHz) 波处理并引发搅动。声波传入液体介质，产生交替的高压（压缩）和低压（稀疏）循环。稀疏过程中，高强度声波在液体中产生许多真空小气泡或空腔，然后在压缩过程中这些气泡或空腔剧烈崩塌（空蚀），造成非常高的局部温度；众多环境样品（如，土壤、固体废料）的法规方法中规定了超声方法；请参见第 2 章和第 14 章。

超声筛分	用于加速筛分过程，是经典低频振荡器的替代或补充方法；对于通常只能通过超声才能筛分的极细粉末极为有用。
称量	进行样品前处理时最基本的样品前处理过程。
程序升温汽化 (PTV)	样品导入技术即样品在略低于溶剂沸点的温度下被导入进样口衬管；溶剂不断蒸发，并通过进样口分流排出；一旦溶剂排完，进样口温度迅速升高，并将样品转移入色谱柱中；与热进样口进样相比，使用 PTV 进样口可减少样品歧视和敏感化合物的热降解；请参见第 6 章。
冲洗步骤 (SPE)	也称为 清洗步骤 ，是 SPE 中的第三步；样品加载后，设计冲洗步骤以去除包括基质化合物在内的干扰物；此时，选择溶剂或缓冲液去除干扰物，而不是目标分析物；请参见第 9 章。
冲洗步骤 (SPE)	请参见 冲洗步骤 ；请参见第 9 章。
初级采样	初次从群体中采集一个或多个增量或单位；初级样品是取自原始来源的样品；建议使用适当的统计学采样方案；请参见第 4 章。
穿透容量	请参见 穿透体积 。
穿透体积	将特定溶质连续泵过色谱柱，直至该溶质开始洗脱时所用的体积。与色谱柱体积和该溶质的保留因子相关。适用于测定色谱柱对特定溶质的总样品容量；请参见第 9 章。
吹扫捕集采样	动态顶空技术，液体或固体样品上方的蒸气被样品上方的气流持续吹走（吹扫）；挥发性组分通常被吸附剂或低温方法捕集浓缩。最常用于富集挥发性痕量组分；请参见第 2 章和第 6 章。
磁珠技术	微磁珠是均匀的聚合物颗粒，直径一般为 0.5-500 微米，微磁珠在聚合物基质中含有氧化铁微粒（或其他可受磁铁吸引的颗粒）。生物反应性分子可以吸附或联接到微磁珠表面，可用于分离细胞、蛋白质或核酸等生物物质；使用磁铁/磁场可以在试管或 96 孔板中轻松处理磁珠。这些微球可用于分离和处理特殊物质或分子和分析敏感分子或其他低丰度的物质，例如，在微型化和自动化设置中。
萃取	从基质中去除目标分析物的通用术语。
大孔树脂（大孔网状树脂）	交联离子交换树脂既有分子级的微孔又有几百埃的大孔。这些大孔树脂具有较大的内表面积，适用于大分子化合物。

大体积进样 (LVI)	大于普通进样体积的样品溶液导入毛细管气相色谱柱的技术；在该方法中，大量溶剂在样品转移至分析色谱柱前汽化；有两种常用的 LVI 技术：程序升温汽化和带溶剂汽化排空的冷柱头进样；两种方法都可以降低检测限；请参见第 6 章。
代表性样品	统计学抽样得到的样品；预计所得样品足以反映总群的目标属性。
单滴微萃取	悬挂在顶空的一滴溶剂（1 微升或 2 微升）会吸附挥发性分析物到溶剂中；可以用进样针吸取液滴注入气相色谱中；请参见第 7 章。
蛋白质沉淀	请参见 蛋白质碎裂 。
蛋白质破碎	用于去除/降低生物液体（如血浆）中蛋白质浓度的术语；稍加稀释后，可将有机溶剂（如乙腈）加入血浆，使不溶解的蛋白质沉淀。通过离心或过滤去除蛋白质，并将上清液注入 HPLC 或进行下一步工作；请参见第 16 章。
电渗析	在存在电势差的情况下，盐离子通过离子交换膜从一种溶液转移到另一种溶液中。这一过程在电渗析池中进行。电渗析池由流入室（稀释液）和浓缩室（浓盐水）组成，阴离子交换膜和阳离子交换膜置于两个电极之间；可以提供良好的富集因子；请参见第 15 章和第 18 章。
顶空采样	顶空 (HS) 是指液体和固体上方形成的蒸气；如果在密闭的恒温容器中样品与气相达到热力学平衡，则称为静态顶空方法；如果惰性气体流经样品或流过样品之上，将捕集到的挥发性组分聚集在吸附阱或低温阱中，则该方法称为动态顶空或吹扫与捕集采样；请参见第 2 章和第 6 章。
顶空单滴微萃取	悬浮在顶空的一滴溶剂（1 微升或 2 微升）可以使挥发性分析物分配到该溶剂中；然后用进样针吸取液滴，并注入气相色谱中；请参见第 6 章和第 7 章。
顶空固相微萃取	可以用聚合物涂层纤维代替溶剂液滴置于顶空；分析物一旦吸附到聚合物涂层上，纤维可以转移入气相色谱进样口，然后所吸附的分析物通过热脱附挥发；请参见第 6 章和第 7 章。
定点采样	在气体采样中，可以打开真空采样罐以非受控速度快速采集样品，通常为数秒钟，直到容器压力与大气压力达到平衡。通常，这种定性技术用于必须对未知物鉴定时、或在特定（短）时间内空气中含高浓度分析物时，或者有异味发生并需要迅速采样时。通常成对采集样品（前/后或有气味/无气味），以便对感觉到的问题进行定性判断；请参见第 2 章。
定量限 (LOQ)	分析物的最低浓度，该浓度下出峰可以准确定量。通常高于 LOD 3-5 倍。

动态顶空	请参见 吹扫与捕集 ；请参见第 6 章。
冻干法	样品脱水处理：通常使用真空升华处理含水生物样品；也称为冷冻干燥；请参见第 4 章。
堆锥四分法	一种样本量缩减技术，为了得到统计学上有代表性的样品，将散状固体样品（粉末）系统性四等分。分析化学家使用的方法，可减小样本量又不产生系统偏差。该技术首先将样品堆成锥形，再摊平成蛋糕状。将蛋糕状样品等分为四份；弃去对角的两份，将另两份合并组成缩减后的样品。重复此过程，直到达到适当的样品量。最后对留下的样品进行分析；请参见第 4 章。
多模式 SPE	使用两种不同的固定相或模式净化样品的一种 SPE 方式；具体过程包括将两个独立的小柱串联，然后分析物在这两个不同的小柱上得到分离；当两种不同的固定相存在于同一小柱，甚至同一填料上时，则可用第二种处理过程；有时称为混合模式 SPE；请参见第 10 章。
多维色谱	使用两种或更多色谱柱或色谱技术，以实现更好的分离。适用于样品纯化、提高分离度和分析通量。可以离线使用，先收集分离组分，再将其重新进样到第二根色谱柱上，也可通过切换阀实现在线使用。也称为组合柱色谱、柱切换、多柱色谱，或箱车式色谱；请参见第 13 章。
二醇固定相	适用于正相和反相的亲水相。由二醇结构组成（脂肪链的相邻碳原子上具有两个 -OH 基团）。在正相中，其极性弱于硅胶，在反相中，该亲水相已用于蛋白质和多肽的分离；请参见第 9、10 和 16 章。
二级采样	指获取原始样品有代表性的部分，以进一步缩小样品量，或制备实验室样品用于最终分析的过程；请参见第 4 章。
二维电泳	二维凝胶电泳，缩写为 2DE 或 2D 电泳，是分析蛋白质常用的一种凝胶电泳形式。蛋白质混合物在二维凝胶上通过两种性质在两个维度进行分离。二维电泳先从一维电泳开始，然后根据第二种性质将分子沿与一维电泳呈 90 度的方向进行分离。在一维电泳中，蛋白质（或其他分子）在一个维度进行分离，因此，所有蛋白质/分子将沿一个泳道展开，但在二维凝胶上，这些分子将散开分布。因为两种分子不可能具有两个类似的性质，所以分子在二维电泳中比一维电泳中更能得到有效分离；请参见第 15 章。
二氧化钛	TiO ₂ ，一种吸附色谱中不常用的吸附剂；也用作 SPE 吸附剂，主要用于去除含磷化合物（例如磷脂）。
二乙氨基乙基	一种通用的弱阴离子交换官能团（一般连接到纤维素或交联琼脂糖上），GE Healthcare 公司的产品，可用于生物分子分离；官能团也可以连接到其他聚合物材料和硅胶上。

反吹	一种柱切换技术，在液相色谱中，将四通阀置于进样器和色谱柱之间，使流动相可以向两个方向流动。在气相色谱中，用压力（或 Deans）切换控制气流方向。反冲/反吹可用于洗脱强吸附在柱头的化合物。它可用于分析这些化合物，或仅仅是从色谱柱中去除它们。分析完成后使液流/气流反吹，使聚集在柱头的分析物从色谱柱中流出，因为这些分析物距离色谱柱出口更短；有时需要使用强溶剂（液相色谱）或更高的温度和/或流速（气相色谱）以去除这些分析物；请参见第 6、9、10、13 和 21 章。
反萃取	用于液液萃取中，执行再次萃取以进一步纯化样品；开始时使用高 pH 值的水相溶剂和不混溶有机溶剂进行萃取，一旦初始萃取完成，并去除了干扰物以后，再使用另一种低 pH 值的水相溶液中和分析物，将分析物反萃取到有机层中。以含 -COOH 基团酸性物质的纯化为例，在高 pH 值的条件下，羧基被离子化，进入水相层，杂质则迁移到有机相中并被丢弃，接着，再将水相层的 pH 值调节到低值。此刻羧基以非离子化形式存在，易被纯化提取到有机层中；请参见第 7 章。
方法开发	对分离进行优化的过程（包括样品预处理），以获得可重现的和稳定的分离。通常着重于寻找能满足分离和样品富集的固定相、洗脱剂和柱温。
方法验证	测试一个方法是否满足保留时间精密度和准确度，以及是否满足对目标样品的分离度和定量限的过程。
方孔板	具有方形孔而非普通圆底孔的 96 孔板；请参见第 9 章。
非极性	非极性分子是电子分布较为对称的分子，因此，分子的各个对立面之间不含多余的电荷。所有电荷都已互相抵消。非极性化合物、溶剂或键合相易溶于有机溶剂（例如己烷），或更倾向于这类有机溶剂而不是水。非极性物质不易溶于水。
分离	从基质背景分离出来并进行后续分析的分析物；请参见分析物。
分流进样	一种气相色谱进样技术，只有一部分样品直接进入色谱柱中（称为分流比，100:1、50:1 等），避免色谱柱过载，并确保有代表性的样品进入色谱柱；该技术简便耐用，可以保护色谱柱。但可能存在样品歧视；通常自动执行不分流进样；请参见第 6 章。
分馏范围	在 SEC 中，是指凝胶或填料的使用范围。在该范围内，填料可以基于分子大小对分子进行分离。在该范围的一端，不能扩散浸入孔隙的过大分子被排阻。在该范围的另一端，分子可以扩散进入到所有孔隙中并完全渗透进填料（未分离）；请参见第 11 章。

分配常数 (系数) (K_c)

组分在固定相内或上的平衡浓度除以组分在流动相中的平衡浓度；也称为分布系数，在分配色谱中称为分配系数；在分配色谱中，当固定相中组分的浓度按每单位体积的固定相来计算时 ($V_R = V_M + K_c V_S$)，用 K_c ；在固定相为固体时，用 K_g ，并按每干燥固体相的质量（重量）计算浓度；在吸附色谱中，当吸附剂经过良好表征且表面积已知时，固定相中的组分浓度按每单位表面积计算。

分散 SPE

将松散的 SPE 填料直接加入溶液，而不是让溶液通过装于小柱或试管中的填料的方法；最常用于 QuEChERS 的第二步，其中的基质化合物已在第 1 步盐析萃取中从有机溶剂中去除；请参见第 8 章。

分散液液微萃取

基于三组分溶剂系统的技术。容器通常为离心试管，使用注射器将不混溶的有机萃取溶剂（通常为几微升，如 8 μL 四氯乙烯、TCE）与分散溶剂（如约 1 mL 丙酮）快速注入含目标分析物的水相溶液（约 5 mL）中。三种溶剂迅速混合后，形成含萃取溶剂液滴的浑浊溶液；将整个混合物离心并用微量注射器吸取含已提取分析物 (TCE) 的溶剂液滴，然后直接进样。萃取几乎是瞬时完成的，而且富集值非常高；请参见第 7 章。

分析物

将待分析的目标化合物注入到 HPLC 或气相色谱柱中进行洗脱。

分析物保护剂

在气相色谱中，在进样前加入到样品中的化合物，这类化合物可切断气相色谱流路中不稳定或分析效果差的分析物在活性位点上的相互作用；所选择的保护剂要不干扰目标化合物的分析，并且还能避免目标化合物与流路中的活性位点作用；液相色谱和液质联用一般无需这类保护剂；请参见第 8 章。

分析物萃取馏分

萃取分析物比例 (E) 的计算公式： $E = C_o V_o / (C_o V_o + C_{aq} V_{aq}) = K_D V / (1 + K_D V)$ ，其中 V_o 为有机相的体积， V_{aq} 为水相的体积，而 V 为相比率 V_o/V_{aq} ；请参见第 7 章。

分样器

用于将固体粉末样品再次分成更小单元的机械装置；可以手动或自动操作；分样器可一次性将原料样品分成两个更小的部分，或多次处理再进一步细分。分样器的重要性质是每次分样都保留了原始样品的特性；请参见第 4 章。

分子印迹聚合物 (MIP)

请参见 *印迹固定相*。

酚提取法

用于从生物样品中分离 DNA 的一种样品前处理技术；请参见第 15 章。

封端	用于去除硅胶上硅醇基的技术，硅醇基可能是与大分子硅烷化试剂（十八烷基三氯硅烷）反应后残留的。当用小分子硅烷化试剂（如三甲基氯硅烷和二氯二甲基硅烷）对硅胶型填料表面的残留硅醇基进行键合时，称为对色谱柱封端。最常用于反相填料中，以最大程度减少对碱性、可离子化和离子型化合物的非预期吸附。对于带末端硅醇基的聚合物固定相而言，封端反应也可用于去除这类硅醇基。
峰追踪	在方法开发过程中，对不同实验运行之间含相同化合物的色谱峰进行匹配的方法；取决于每个纯分析物的检测参数；二极管阵列检测器和质谱检测器因为具有特异性，所以是用于峰追踪的最佳检测器。
氟代固定相	一种脂肪族和芳香族的反相填料，其大部分的键合相已氟化。有时称为含氟固定相或全氟固定相。通常具有与烃固定相不同的选择性。
覆盖率	指键合相色谱中硅胶支持剂上键合相的量。覆盖率通常用微摩尔/平方米表示，或用 %C (W/W) 表示。
改性剂	改变流动相特性的添加剂。例如，在反相中，水是弱溶剂，而强溶剂甲醇有时被称为改性剂；有时其他添加剂，如竞争碱（三乙胺或离子对试剂）也称为改性剂，但其更正确的叫法应该是添加剂；请参见 添加剂 。
干介质斑点分析	除 DBS 外，在其他生物体液（如血浆、血清、CSF、唾液）以及其他非生物液体样品方面也有研究；请参见第 16 章。
干血斑分析	血液样品采集和运输新方法；将少量（约 15 μ L）全血样品置于纤维素或其他类似纸的材料上并干燥 2 小时；提取干血斑点上的目标分析物用于下一步分析；有望代替抽取大量血样的分析；可与 LC-MS/MS 配合使用以进行高灵敏度和高特异性的分析；请参见第 16 章。
干燥	干燥样品萃取物可以通过加热（蒸发）、真空干燥和其他方法来完成；可使用无水硫酸钠去除有机溶剂中的水（干燥）；请参见第 4 章。
高丰度蛋白质去除	使用对最高丰度蛋白质具有特异性的抗体柱，选择性地将这类蛋白质从血浆中去除，使生物化学家能够研究较低丰度的蛋白质，这类低丰度蛋白质可以是生物标记物或其他目标化合物；请参见第 15 章。

固定化液相萃取	与 SPE 相似，但聚合物固定相键合在玻璃瓶内；实验在玻璃瓶中进行；分析物分配进入聚合物相，通过添加多种不同溶剂完成上样、冲洗和洗脱步骤。
固定式多孔板	具有固定孔（不可移动）的 96 孔板，不是阵列 96 孔板；请参见 96 孔板 和 阵列 96 孔板 。
固相捕集	使用 SPE 小柱或填充柱捕集流经装置的特定分析物；可选择合适的填料以选择性地保留目标分析物，并让非目标化合物无保留地通过。
固相萃取 (SPE)	一种广泛应用的技术，该技术中使用塑料小柱、萃取盘或 96 孔流通板的装填固相填料（粒径为 20-40 μm ）对样品进行前处理。其所用的固定相与 HPLC 填料没有区别。尽管该技术与色谱相关，但原理不同，有时被称为数字化色谱。最常操作的过程分四个步骤：1) 活化吸附剂；2) 加样；3) 洗去杂质；4) 用最少体积强溶剂洗脱样品；可以多种形式进行：小柱、萃取盘、移液枪头、96 孔板等，且有多种模式，如反相、离子交换、正相等；请参见第 9 章和第 10 章。
固相微萃取 (SPME)	将细小的聚合物涂层固体纤维放入溶液，或置于固体或液体样品顶空的技术；分析物将扩散到涂层上，直至达到平衡；在气相色谱分析中，将含有所吸附样品的纤维转移入气相色谱中，捕集的组分可通过热脱附进入色谱柱；在 HPLC 中，用溶剂冲洗所吸附的组分，再将其注入液相色谱柱中；较少用于液相色谱，多用于气相色谱；请参见第 2、6、7、9 和 10 章。
硅醇基	硅胶表面的 Si-OH 基团。硅醇基具有不同强度，这取决于其所处的位置和彼此间的关系，并且与硅胶的金属含量相关。最强的硅醇基是酸性的，并且在色谱分离中经常与碱性化合物发生非预期的相互作用。
硅胶	最常用的 HPLC 和 SPE 填料。该填料是具有非晶体结构的多孔填料，由硅氧烷和硅醇基组成。该填料可在液相色谱的所有模式中作为吸附的裸填料使用，或作为 LLC 或化学键合相的支持剂使用，以及因其具有多种孔径，所以可作为 SEC 填料使用。HPLC 中使用的是平均粒径为 3、5 和 10 μm 的硅胶微粒。与不规则硅胶相比，现代分析型 HPLC 柱更倾向于使用球形硅胶，因为球形硅胶具有良好的填充重现性和较低的压力降；有时称为二氧化硅。
硅藻土	又名矽藻土，是一种天然存在的软性硅质沉积岩，很容易破碎形成白色到灰白色的细小粉末。硅藻土含石化的硅藻——一种有硬壳的藻类。硅藻土的粒径范围从不到 3 微米到 1 毫米以上，但一般为 10-200 微米。取决于其粒度，这种粉末有粗糙感，类似于浮石粉，并且由于它具有高孔隙率，所以非常轻。烘干的硅藻土的一般化学成分为 80-90% 二氧化硅、2-4% 氧化铝（大多归因于粘土矿物）和 0.5-2% 氧化铁；高纯度硅藻土可用作色谱支持剂，并可用于支持液液萃取；请参见第 7 章。

过滤	使液体通过滤纸、滤膜、玻璃或其他类型过滤器，以去除可能给下游色谱分析带来干扰的颗粒的过程；化学过滤器还可去除某些化学物质；请参见化学过滤；请参见第 5 章。
过滤漏斗	实验室过滤过程中，将固体从液体中分离所用的漏斗。为实现这一目的，通常是将一片圆形滤纸折成锥形贴在漏斗内壁中。然后将固体和液体悬浮液倒入漏斗。固体颗粒太大，不能通过，留在了滤纸上，而较小的液体分子则通过滤纸，进入漏斗下方的容器中，形成滤液。这种滤纸只能使用一次。如果目标是液体，则弃去滤纸。如果目标是悬浮物，则保留滤纸上的固体残留物和滤液，进行进一步分析；请参见第 5 章。
过滤瓶	膜过滤器单元，由两部分组成：过滤推杆，其含有适用过滤溶剂的膜过滤器；第二部分是瓶本身；一旦加载并过滤样品后，样品瓶可直接放置在自动进样器上，无需再将过滤后的样品转移；请参见第 5 章。
过滤器孔隙率	孔径大小关系到过滤器滤除某个粒径颗粒的能力。例如，0.05 微米滤膜可滤掉过滤流中直径为 0.05 μm 或更大的颗粒。过滤器的孔隙率一般与孔径无关，也不受孔径控制。这两个参数基本上是独立的。孔隙率也与厚度无关。更确切的说，孔隙率是由过滤器生产中所用的聚合物和铸造工艺决定的；请参见第 5 章。
过滤支架	膜过滤器或膜过滤盘有时安装不牢固，因此可以放在支架上（通常为不锈钢结构）进行样品处理；一旦滤膜用过以后，可打开支架，更换上新的滤膜；请参见第 5 章。
过热水萃取	在密闭加压系统中，将水在大于沸点的温度下充分加热；加热改变了水的介电常数，提高了水的溶解力，使水成为“类有机”溶剂，是一种从固体基质中提取有机分析物的“绿色”方法。
HILIC	亲水相互作用液相色谱；一种使用极性固定相（如硅胶、氨基、二醇等）和极性流动相（如水和乙腈，流动相中至少含有 2.5% 的水）的技术；据悉该技术的机制包括将分析物分配在吸收的水层；可使用高浓度的乙腈或其他与水混溶的溶剂；与反相液相色谱 (RPC) 相反，水是强溶剂，并随时间梯度增加水的浓度；该技术最适合分析反相色谱柱上弱保留的极性小分子；请参见第 9 章。
痕量富集	使用弱流动相或溶液将痕量化合物保留在 HPLC 柱或预柱填料中，然后加入更强的流动相将化合物浓缩洗脱。该技术可用于以反相填料富集水中的痕量疏水化合物（例如多环芳烃）。使用强溶剂（如乙腈）洗脱富集的化合物；请参见第 2、7、9、13、16 和 18 章。

化学过滤	液体样品经过填料（如吸附剂、离子交换剂等）时，填料选择性地与样品中的一种或多种化合物发生相互作用，以化学方式去除和纯化液体样品。常规过滤不包括任何化学作用，只是去除颗粒；请参见第 4 章。
化学吸附	因与填料的化学反应而发生的吸附。大多数这样的相互作用是不可逆的。通常发生在带反应性官能团（如硅醇基或键合氨固定相）的填料上。带强路易斯酸位点的金属氧化物固定相常发生化学吸附。
缓冲液	维持恒定 pH 值的溶液，能够抵消稀释或少量酸碱加入引起的 pH 值改变。
缓冲液强度	请参见 离子强度 。
磺酰基阳离子交换剂	树脂型填料中的强阳离子交换功能基；通常为丙基-SO ₃ H；可以其他阳离子形式存在，如，钠、铵、银和钙。
混合	指通过某种混合操作，将不均匀样品制成更均一样品的过程；最常用的混合器是机械搅拌器，可将半软材料分成更小块；请参见第 4 章和第 16 章。
混合模式分离	根据双保留机制的保留性和选择性，在一根色谱柱上进行分离。例如，在中到高 pH 条件下，带残留硅醇基的反相柱可以通过硅醇基的疏水作用以及离子化相互作用实现分离；有时混合模式的分离可能有助于提高选择性（谱峰间隔），但也可能造成峰不对称，并且在使用后续批次的填料时难以重现各作用间精密的平衡。也适用于 SPE。
混合柱床色谱柱	在同一色谱柱中结合两种或更多固定相，此类色谱柱最常用于离子交换分离（IEC）（阴离子和阳离子混合树脂）和 SEC（不同孔径填料的混合物）。该色谱柱在 IEC 中的优势是可以完全去除阳离子和阴离子化合物；在 SEC 中也非常有用，因为同一色谱柱可以容纳更宽范围的分子量。
活动式多孔板	请参见 阵列 96 孔板 。
活化 (SPE)	一般考虑作为 SPE 的第一个步骤；首先固定相必须进入化学/物理状态，使其能够接受 SPE 第二步加载的样品溶液；将活化溶剂通过 SPE 固定相，使固定相溶剂化，以便更容易吸附目标样品；在反相 SPE 小柱中使用甲醇或乙腈作为活化溶剂；有时必须除去多余的活化溶剂，但也不应让填料干燥，因为这可能对“已活化的”固定相造成影响；请参见第 9 章。

活性位点	位于色谱填料表面的反应性或强吸引位点，可结合分析物或引起峰拖尾；有时流动相添加剂（如竞争碱）可以消除活性位点的作用。
ICAT	同位素编码亲和标签；用于定量蛋白质组学的非凝胶方法，依赖于化学标记试剂。这些化学探针含有三个通用单元：能标记指定氨基酸侧链的反应基团（例如修饰半胱氨酸残基的碘乙酰胺）、同位素编码连接器以及用于标记蛋白质/多肽亲和分离的标签（例如生物素）。要对两个蛋白质组进行定量对比，需将一个样品用轻同位素（d0）探针标记，并将另一个用重同位素（d8）探针标记。为减少误差，将两个样品合并，并用蛋白酶（即胰蛋白酶）消化，然后导入亲和和亲和和色谱以分离标记了同位素编码的多肽。再用液相色谱-质谱（LC-MS）联用技术分析这些多肽。定量测定不同质量标签的多肽对的信号强度比，以确定两个样品中蛋白质的相对含量。最初是用氧标记的，但后来同一个团队重新设计了改用 ¹³ C标记，解决了在液相色谱分离过程中氧与色谱柱固定相发生相互作用而产生的峰分离问题；请参见第15章。
基质	在样品前处理中，基质通常是指某种物质，在该物质中存在分析人员尝试检测的一种或一系列溶质；通常基质不是目标分析物，并且为了分离和检测必须降低或消除其浓度；基质可以是有机、无机或生物基质。
基质固相萃取	请参见 基质固相分散 。
基质固相分散	一种技术，该技术采用键合相固体载体作为破坏样品结构的磨料，在混合过程中，这种固定相也能作为结合溶剂，有助于样品的彻底分解；使用研钵和研杵将微小颗粒轻轻混合并转移到色谱柱中，然后使用适当的溶剂洗脱分析物；请参见第10章。
基质吸附模式 (SPE)	较少使用的一种SPE模式，其中吸附剂经过选择可最大限度地保留基质和其他干扰物，而目标分析物则不被保留；与正常SPE过程（结合-洗脱）相反，不发生分析物的富集；请参见第9章。
极性	分子可能因为极性键或因为非极性键的不对称结构以及非成键电子对而具有极性；极性分子一般能溶于水（H ₂ O），因为水具有极性；极性分子不易溶于非极性有机溶剂，如己烷。极性分子具有略带正电荷和略带负电荷的末端；通常我们关注化合物的极性。
极性指数 (P')	溶剂相对极性的测量，可用于确定适当的流动相或萃取溶剂。极性指数随极性而增加；例如，己烷 P'=0.0；异丙醇 P'=3.9；THF P'=4.0；甲醇 P'=5.1；乙腈 P'=5.8；水 P'=9.0。

挤压	从半固体物质（如，植物、水果、肉类）中挤压液体的过程；请参见第 4 章。
加速溶剂萃取	由戴安公司推出，现由赛默飞世尔科技公司销售的加压流体萃取系统的商品名；请参见第 14 章加压流体萃取。
加压流体萃取	请参见 加速溶剂萃取 ；请参见第 14 章。
加压溶剂萃取	请参见 加速溶剂萃取 ；请参见第 14 章。
检测限 (LOD)	生成色谱峰能区分于基线噪音的分析物浓度。文献和法规描述了不同的 LOD 测定方法。
键合相	一种通过共价键键合到支持颗粒或管（毛细管）内壁上的固定相。
交换容量	请参见 离子交换容量 ；请参见第 9 章。
交联	对于树脂而言，在形成三维基质的共聚过程中，加入了双官能团单体以便在相邻聚合物链之间形成交联键。交联度由加入反应的此类单体的量决定。例如，二乙烯基苯是生产聚苯乙烯离子交换树脂的交联剂。树脂的膨胀和扩散特性由其交联程度决定。
搅拌棒吸附萃取	原理与固相微萃取 (SPME) 类似，但该系统使用聚合物涂层的搅拌棒而不是涂层纤维，可大大增加表面积，得到更高的容量和更大的质量灵敏度；与 SPME 相似，平衡需要数十分钟；在气相色谱中，需要特殊的热脱附装置来处理搅拌棒；在液相色谱中，通常可离线冲洗搅拌棒；请参见第 9 章。
结合 - 洗脱	SPE 中的标准操作模式，在该操作模式中，当样品加载到活化的吸附剂或树脂上后，目标分析物得到保留（结合），而干扰物（或许还有一些基质）则不会保留在填料上；经过清洗步骤去除不需要的样品组分后，在洗脱步骤中，用少量强溶剂洗脱目标分析物；请参见第 9 章。
浸软	用撕裂、截断、剪切等手段将软性物料分解成小碎片；请参见第 4 章。
净相色谱	请参见 正相色谱 ；请参见 正相 SPE 。
聚苯乙烯二乙烯基苯树脂	离子交换色谱最通用的基础聚合物。通过各种化学反应与离子基团结合。反相色谱中使用中性 PS-DVB 微球。DVB 含量的变化可以改变交联度，进而改变孔隙率和机械稳定性。

聚合物 SPE	使用聚合基质填料（如 PS-DVB、丙烯酸甲酯），而不是无机填料（如，硅胶、氧化铝）；聚合物一般比某些无机填料具有更宽的 pH 范围和更高的样品容量；请参见第 9 章。
聚合物填料	基于聚合物材料的填料，通常为微球形。液相色谱和 SPE 中所用的典型聚合物为聚苯乙烯 - 乙烯苯 (PS-DVB)、聚二乙烯苯、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸甲酯、聚环氧乙烷、葡聚糖凝胶或多糖。
均质化	通过缩减尺寸和混合使样品更均一的过程；可使用带高速刀片的均质器；请参见第 4 章。
颗粒物质	一般指流动相中出现的小颗粒，可阻塞筛板引起背压问题；也可指填充在 HPLC 柱中的小颗粒。
可拆卸的多孔板	请参见 阵列 96 孔板 ；请参见第 9 章。
空白	更准确地称为 方法空白 ：为尽可能代表基质而制备的空白样品。方法空白完全按照现场样品的方法进行配制/萃取/溶解和分析。目的：评估在样品前处理过程中引入的污染。
空间排阻色谱	液相色谱的主要模式，其中样品凭借其在溶液中的大小进行分离。也称为体积排阻色谱 (SEC)、凝胶渗透色谱、凝胶过滤色谱，或凝胶色谱。SEC 最常用于聚合物分离和表征，以及样品纯化；请参见第 11 章。
孔径	多孔填料的平均孔径。其数值用 A 或 nm 表示。孔径决定了分子是否可以扩散入或扩散出填料；请参见 平均孔径 。
快速色谱	经典液相色谱的极快速形式，有机合成化学家使用此方法进行快速纯化。主要以正相模式进行，有时用于反相色谱；请参见第 12 章。
朗缪尔吸附等温线	一种特殊形式的等温线 $C_s = N_0 \cdot C_M / (K_d + C_M)$ ，其中 C_s 和 C_M 是溶质平衡时的固定相浓度和流动相浓度， N_0 是可用于吸附的表面位点的总数， K_d 是吸附常数。
冷冻干燥	去除水的过程，主要使用真空升华去除生物样品中的水；请参见第 4 章。

冷柱头进样	将液体样品直接导入气相色谱柱的技术；不需要先将样品蒸发，因此具有如下优点：1) 消除样品歧视；2) 避免样品变化；以及 3) 提供更高分析精密度。但有一些特殊要求：1) 需要相对洁净的样品；2) 真实样品常常浓度过高而不能柱上进样，必须稀释；3) 由于溶剂、固定相和溶质的极性差异，可能出现峰分叉或峰变形；请参见第 6 章。
离线 SPE	SPE 的常规操作是手动（即多管真空装置、移液器转移等）处理 SPE 小柱、萃取盘、枪头等；与在线 SPE 相反。
离心	包括使用离心机通过离心力将混合物沉淀（请参见离心）。该过程可分离两种不混溶的液体。混合物中密度较高的组分向离心轴外迁移，而密度较低的组分向轴内迁移。化学家和生物学家可以增加试管上的有效重力，使沉淀物（“颗粒物”）更快速完全地沉积在试管底部。剩余溶液称为“上清液”或“上层清液”。然后，在不影响沉淀的情况下倒出上清液，或用巴斯德吸管吸取上清液；请参见第 1、2、4、5、7、8、9、10、14、15、16 和 21 章。
离心管	请参见 离心柱 。
离心过滤器	与离心柱相似，但填料部分由膜过滤器替代；过滤器的目的是去除颗粒物。
离心机	由电机驱动的一种装置（某些老式型号为手动旋转），可以使某一物体环绕固定轴转动，并在与轴垂直的方向施加作用力；请参见 离心 。
离心柱	用于样品净化或分离的小柱，通常含有填料；将样品加入装有选择性填料的小柱中；然后将小柱依次放入小收集管中并置于离心机中；离心管常用于处理生物样品，可分离 DNA、RNA 和其他目标生物化合物；请参见第 15 章。
离子对色谱	一种色谱形式，溶液中的离子可以“成对”或中性化，在反相柱上作为离子对分离。离子对试剂通常为离子化合物，含有的烃链可提供一定的疏水性，使离子对能够在反相柱上保留。保留性与烃链长度和离子对添加剂的浓度成比例。正相色谱也可使用离子对，当离子对的一方动态加载到吸附剂上时即可实现，但这项技术不如在反相色谱技术中常用。也称为离子相互作用 (IIR) 色谱或动态离子交换色谱，需强调的是，添加剂如何控制保留的具体机制尚不清楚。

离子交换容量

填料上可以发生交换的离子位点数。交换容量用毫克当量/克表示。典型的苯乙烯-二乙烯基苯强阴离子交换树脂可能具有 3-5 meq/gm 容量。IC 交换剂具有很低的容量。弱阴离子和弱阳离子交换剂的容量随 pH 剧烈变化。

离子交换色谱

离子型物质在填料的阳离子或阴离子位点上分离的色谱模式。样品离子（一般为补偿离子）将与填料可离子化基团上的离子发生交换。保留取决于不同离子对位点的亲和性以及其它溶液参数（pH、离子强度、补偿离子类型等），离子色谱本质上是一种离子交换技术。

离子强度

电解质溶液的特性。一般表述为电解质离子间的静电相互作用。与电解质浓度相关，但离子强度和电解质浓度之间的主要区别在于，如果一些离子所带电荷更高，则离子强度更高。流动相的离子强度越高，流动相与分析物竞争离子或吸附位点的能力越强。

粒度缩分

细化较大颗粒，使其更易于萃取的通过程；颗粒越小，溶解越快，或者如果颗粒不可溶，则越小的颗粒萃取越快，以便进一步进行样品纯化。细化颗粒的一般方法包括粉碎、研磨、均质化、截断、混合等；请参见第 4 章。

连续液液萃取

当 K_D 值非常低或需要的样品体积非常大而不能多次萃取时，该方法非常有用；也用于萃取缓慢而需要长时间才能建立平衡的情况；在连续 LLE 中，新鲜溶剂不断循环通过水性样品；连续萃取装置可用于比水重和比水轻的溶剂；请参见第 7 章。

联用色谱柱

一种柱切换形式，在该方法中，通过选择阀将第一维色谱柱与两个第二维色谱柱连接。来自柱 1 的组分可以选择性地转移到柱 2 和柱 3，以进一步分离。该术语也用于描述将两根或多根色谱柱串联，以提供更多塔板数；请参见第 13 章。

链长度

反相填料中烃的碳链长度。用碳原子数表示（如，C8，C18）。连接在硅烷上的短链（通常为甲基、异丙基和仲丁基等）除外。

两性离子交换树脂

具有正离子和负离子基团的离子交换树脂。这类树脂在离子阻滞中最为有用，因为阴离子和阳离子官能团同时存在于同一物质中，所以所有的离子型物质都可从溶液中去；请参见第 9 章。

两性离子填料	HPLC 填料表面既带正电荷又带负电荷；两性离子填料在 HILIC 模式中非常有用。
流动注射萃取	一种在线萃取技术，样品注射进水性液流中，该液流被有机相分割成多个小段；水性和有机液流在流向盘管过程中混合，并最终在末端通过一个特殊的管件使两相分离，最后可测定有机相中萃取到的化合物的量；请参见第 7 章。
滤纸过滤	使用多孔滤纸（主要为纤维素）去除液体样品中的颗粒；可使用不同孔隙率的滤纸。低孔隙率滤纸可去除非常细小的颗粒，但流速较慢，而高孔隙率滤纸则以较高流速滤除较大颗粒物质；滤纸过滤常用于湿法化学，可进行过滤、燃烧，然后称量不溶性物质；无灰滤纸也可用于此；请参见第 5 章。
脉冲不分流进样	推荐用于大体积样品（最多 5 μL ）的一种气相色谱进样形式，这种形式是在进样口上施加短期高压脉冲，以避免溶剂大量蒸发，使大多数或全部样品直接进入色谱柱中；样品一旦导入，即恢复正常压力；使用该技术，高挥发性化合物不会通过分流放空丢失，并且热不稳定样品在高温的进样口处停留时间更短，减少了样品的降解；请参见第 6 章。
消解	用反应性物质（如，对于无机化合物可以是强酸；对于生物化合物可以是酶）处理不溶性化合物，将其分解成更可溶解的形式以便进一步处理和分析的过程；请参见第 2、15 和 16 章。
免疫亲和和 SPE	基于分子识别的固定相，该分子识别采用的是化学连接的单克隆抗体或多克隆抗体；由于抗原-抗体相互作用，这类固定相成为了一类最具选择性的固定相；市售的免疫亲和固定相可用于小分子（如污染物、毒素等）；现有固定相用于生物大分子的例子；请参见 高丰度蛋白质去除 ；请参见第 10 章。
免疫吸附	请参见 免疫亲和 SPE 。
膜过滤	膜过滤器；膜过滤盘。

磨碎	用电机驱动棒或振荡器来减小固体样品颗粒；可在存在液氮的条件下用冷冻球磨机处理有韧性的聚合物或具有低玻璃化转变温度的聚合物；请参见第 4 章。
内标	在定量分析中，通过使用内标 (IS) 可大大提高精密度和准确度。包括将一定量的内标 (IS) 加入到浓度递增的标准系列和未知样品中。将标准系列的峰面积与 IS 的峰面积比值对标准浓度作图。内标应与需要进行定量检测的物质具有相似的化学性质，并且内标的保留时间应非常接近待检物质。
碾磨	用于减小固体原料粒径的装置。盘式研磨机通过将物料投入可调节的固定盘和旋转盘之间，可将直径 < 20 mm 的硬质样品粉碎；样品直径一般可减小到 < 100 μm；高速旋转粉碎机结合了冲击和剪切，可将软到中等硬度和含纤维的原料粉碎至 80 μm；球磨机使用玛瑙球、碳化钨球或带 PTFE 涂层的不锈钢球，并通过离心或行星式研磨作用来获得高研磨能量，将原料粉碎至亚微米大小；请参见第 4 章。
凝胶	凝胶色谱或 GPC 中使用的固体填料。目前的凝胶由两部分组成：被分散的介质（固体部分）和分散介质（溶剂）。也定义为固体和液体的胶体分散体系，其中固体为连续相。
凝胶过滤色谱	也称为水相体积排阻色谱，使用水溶性流动相。通常是指在葡聚糖等软性凝胶上进行的分子层面的分离，但高度交联的聚合物、硅胶和其他多孔介质也可以使用。大多数凝胶过滤分离会涉及生物聚合物和水溶性聚合物，例如聚丙烯酸；请参见第 11 章。
凝胶渗透色谱	采用有机流动相分离和表征聚合物的 SEC。使用水性流动相的 SEC 称为水性 GPC 或 GFC；请参见第 11 章。
浓缩	增加稀释样品的强度或密度的过程；浓度较高的样品较容易测定；可使用多种样品前处理技术实现浓缩，如蒸发、吸附、扩散等。

pK_a	酸电离常数, K _a , (也称为酸度常数, 或酸离子化常数) 是对溶液中酸强度的定量测定。酸电离常数是酸碱反应中化学反应的平衡常数。该平衡可以表示如下: HA <--> H ⁺ + A ⁻ , 其中 HA 为普通酸, 离解为 A ⁻ (酸的共轭碱), 以及氢离子或质子, H ⁺ , 其在水性溶液中以水合氢离子形式存在, 即溶剂阳离子; 电离常数通常写为平衡浓度(用 mol/L 表示)的商, 符号为 [HA]、[A ⁻] 和 [H ⁺]: K _a =([H ⁺] [A ⁻])/[HA]; 由于 K _a 值有多个数量级, 在实际工作中, 酸电离常数通常取对数表示。对数常数, pK _a , 等于 -log ₁₀ K _a , 有时也 (但不正确) 称为酸电离常数。
排阻色谱	请参见体积排阻色谱和离子排阻色谱; 请参见第 11、15 和 16 章。
排阻体积	分子在 SEC 填料上的最小保留体积, 而所有大于最大孔隙的分子都被完全排阻。这些分子不能渗透到孔隙内, 并以色谱柱空隙 (间隙) 体积洗脱; 请参见第 11 章。
排阻限	在 SEC 中, 分子量 (或分子大小) 的上限, 超出该限值的分子将以相同保留体积洗脱, 称为排阻体积。许多 SEC 填料都标示了它们的排阻限。例如, 10 ⁵ 多孔硅胶柱可排阻分子量超过 100000 的任何化合物 (基于聚苯乙烯校准标准); 请参见第 11 章。
盘式小柱 (SPE)	请参见 圆盘 。
配体	在配体交换色谱中, 是指与固定相进行配体交换的分析物; 在亲和色谱中, 是指连接在支持剂 (载体) 上形成亲和柱的生物特异性物质 (酶、抗原或激素); 在键合色谱中, 是指共价结合在表面上的基团。
破碎板	是指加入可混溶的有机溶剂 (如乙腈) 使蛋白质从血浆中沉淀出来; 当使用流通型 96 孔板或固定型 96 孔板时, 称为破碎沉淀, 96 孔板称为沉淀板; 请参见第 16 章。
QuEChERS	一种最初用于从水果和蔬菜中萃取农药的技术。包括两步: 1) 使用缓冲溶剂或非缓冲溶剂 (通常为乙腈) 进行盐析萃取, 2) 进行分散 SPE 处理, 即用固体吸附剂处理步骤 1 中的样品, 去除干扰物和基质化合物。QuEChERS 最常与气质和液质系统 (或 MS-MS) 配合使用, 以更高的选择性分析农药萃取物; 最近, QuEChERS 产品已扩展到了其他基质, 如食用油、肉类、鱼类、生物体液等, 还可用于其他分析物 (如药物、抗氧化剂、毒素等); 请参见第 8 章。

气相萃取	请参见 直接热采样 。
强溶剂	通常是指某化合物的良好溶剂；在色谱中，是指能提供更高溶剂强度的流动相组分，以便使分析物更快速地从色谱柱中洗脱；在反相液相色谱的水-乙腈二元溶剂系统中，乙腈可作为强溶剂。
强阳离子交换剂	带强酸性离子化基团（如，磺酸基）的阳离子交换填料。
强阴离子交换剂	带强碱性可离子化基团（如四烷基铵）的阴离子交换填料。
强制流动浸提	将固体填料填充入不锈钢柱，在加压和加热的条件下向柱中泵入甲苯（或其他萃取溶剂）；热溶剂萃取出可萃取化合物，并在柱出口收集；请参见第 14 章。
切断	将样品物理切割成小块的过程；请参见第 4 章。
切割	切割粉碎机可减小软到中等硬度物质（< 100 mm 直径）的尺寸；请参见第 4 章。
切碎	通过撕裂、截断、切割、切丁等方式将肉类或蔬菜产品分解小块的过程；请参见第 4 章。
亲和色谱	通过在固体支持剂（或载体）上偶联针对目标大分子的特异性配体（例如酶、抗原或激素）来制备生物特异性吸附剂的技术。该固定化配体只和选择性地与之结合的分子发生相互作用。未结合的分子将不被保留。保留的化合物稍后以纯化状态释放。亲和色谱通常是一种“结合-释放 (on-off)”分离技术；请参见第 10 章。
亲水性	“亲水”是指固定相完全兼容于水，或一般的水溶性分子。许多用于分离蛋白质的色谱柱（离子交换柱、SEC 柱、亲和柱）都具有天然的亲水性，并且在水性环境中不会不可逆地吸附蛋白质或使蛋白质变性。
清除剂	特殊类型的固定相颗粒，使用化学反应代替 SPE 中的分子相互作用去除不需要的物质，例如有机合成中不需要的反应副产物或过量的初始原料；多数基于共价键结合原理；含反应性基团的填料可用于有机或无机物质，如催化剂；请参见第 9 章。

氰基固定相	以 -CN 官能团为末端的化学键合相；可作为中等极性吸附剂用于正相，也可以作为短链键合相用于反相。
热萃取	通过高温（低于热裂解温度）从多孔固体基质中萃取稳定的分析物；样品置于热脱附管中，与热脱附中的方式一样；请参见第 6 章。
热裂解	将样品加热到足够高的温度使其化学键受热断裂，形成可以用气相色谱分析的较小分子的过程；请参见第 6 章。
热脱附	通过加热使分析物从热脱附管中的 SPME 纤维、SBSE 棒或固体基质上脱附下来；请参见第 6 章。
容量因子	测量保留程度的色谱参数。请参考 k' 计算方法。现在称为保留因子 k (IUPAC)。
溶剂交换	将与分析方法不兼容的溶剂置换成更兼容溶剂的过程；在某些情况下，通过蒸发去除挥发性溶剂，再使用另一种溶剂复溶样品。
溶剂强度	是指溶剂将特殊溶质或化合物从色谱柱上洗脱的能力。溶剂强度由 Lloyd Snyder 为高效液相色谱而定义，可用于使用氧化铝的 LEAC (LSC) 吸附色谱；溶剂在洗脱序中定量分级。硅胶和碳吸附剂的数据较少。
溶解	将样品溶解在适当溶剂中的过程。
乳浊液	含有两种或更多不混溶（不可混合）液体的混合物。乳浊液通常指分散相和连续相都是液体的情况。在乳浊液中，一种液体（分散相）在另一种液体（连续相）中分散。乳浊液在 LLE 中较难处理，因为它们有时很难破坏，不能分层或进一步处理（如有必要）。有多种方法可用于破坏乳浊液；请参见第 8 章。
弱阳离子交换剂	带弱酸性可离子化基团（如，羧基）的阳离子交换填料。
弱阴离子交换剂	带弱碱性可离子化基团（如，氨基、二乙氨基乙基）的阴离子交换填料。

Silanophile

对硅胶表面活性（酸性）硅醇基具有高亲和性的化合物。通常为强碱性胺。

筛板

置于色谱柱两端的多孔单元，用于保留色谱柱或 SPE 填料。它置于色谱柱的末端，通常更多在末端接头处。筛板可为不锈钢或其他惰性金属或塑料材质，例如多孔 PTFE 或聚丙烯。筛板的孔隙必须小于 HPLC 色谱柱中的最小填料颗粒，否则填料颗粒将通过筛板流失。

筛分

将固体颗粒样品通过横截面积相同（3 μm 至 123 μm 的正方形孔）的金属或塑料筛网，以便将颗粒分离成统一大小的过程；可在干燥或潮湿条件下进行；请参见第 4 章。

上样步骤 (SPE)

SPE 的第二步（活化后），此时样品加载到 SPE 相（小柱）上；请参见第 9 章。

深孔板

96 孔板的每个孔可处理多达 2 mL 液体；请参见第 9 章。

声波

在已处理成微小颗粒的固体材料表面使用超声进行强力搅动；直接方法：用特别设计的惰性声学工具（喇叭或探针 = 超声波发生器）置于样品 - 溶剂混合物中；间接方法：将带有溶剂的样品容器浸入超声水浴中，进行超声辐射；超声有助于溶解；可加热提高萃取速率；安全、快速，是粗颗粒物质的最佳方法；在间接方法中，多个样品可以同时处理；促使有效接触溶剂；请参见第 2 章和第 14 章。

十八烷基硅烷 (ODS)

HPLC 和 SPE 中最常用的反相键合相。十八烷基硅烷键合相可键合到硅胶或聚合物填料上。具有单分子键合和聚合物键合形式。

石墨化碳

非石墨碳经石墨化热处理后形成完美三维六角晶体结构的石墨碳；这种填料对水溶液样品和水溶性有机提取物中的极性化合物有强亲和性。通常用于农药分析的样品前处理，以去除食品样品中的色素；也称为石墨化炭黑 (GCB)；请参见第 8 章和第 9 章。

时间积分采样

在气体采样中，为获得更具代表性的样品，需要进行时间加权采样。使用限流器在特定时间内采集样品流，以确保获得“平均”混合的样品或时间加权平均 (TWA) 样品。TWA 样品将准确反映环境空气的平均情况，尤其适用于为了监管和健康影响评价进行的暴露浓度监测，而环境具有很高不确定性的条件下（如职业暴露）。

疏水性	“憎水”是指固定相与水不兼容，以及分子在一般情况下对水没有亲和性。疏水分子几乎不含极性官能团；大多数都含有高含量的烃（脂肪族和芳香族）官能团。
树脂	离子交换分离中使用的固体聚合物填料。最常用的树脂是小粒度 (< 10 μm) 的聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物。离子型官能团结合在树脂上。
数字化色谱	固相萃取 (SPE) 过程有时也称为数字化色谱——一种物质在其保留/洗脱过程中，存在于 SPE 固定相上，也可不在固定相上；在色谱分离中，我们常常试图利用两个密切相关的物质在模拟分离保留上的细微差异对其进行分离；理想情况下，SPE 中溶质的 k 值最好为无限大，而洗脱进溶液时在吸附剂上则为零；请参见第 9 章。
四甲基铵	树脂型填料中常用的强阴离子交换官能团；一般以氯化物形式提供。
缩分器	用于将固体粉末再分割成更小单元的手动或自动机械装置；单次操作将原料样品切割成两个更小的部分；通过多次操作可进一步再分割样品；请参见第 4 章。
索氏提取	从固体样品中萃取化合物的成熟技术；样品放置在一次性多孔容器（提取管）中；回流过程中，新鲜冷凝的溶剂流过提取管并溶解分析物，使分析物持续收集到长颈烧瓶中；可使用特殊设计的玻璃器皿（索氏提取器）进行无人值守式萃取；请参见第 2 章和第 14 章。
Tedlar® 采样袋	用于空气或其他气体的简单取样；取样袋是一种全空气采样装置，用于高浓度 VOC 和永久性气体。在多个 EPA、NIOSH 和 OSHA 方法中介绍了使用袋取样法的多种应用：固定源排放、工作场所环境、大气环境、室内空气质量和呼吸气成分分析等。Tedlar® 采样袋的独特设计该采样袋将采样隔膜直接装在阀（聚丙烯或不锈钢结构）上，比其他类型的采样袋更轻、使用更简便。
碳载量	在键合相硅胶中，该术语通常用于描述表面覆盖率，或柱填料表面的硅醇基与键合相发生反应或置换的程度；碳载量越高，残留硅醇基越少。碳载量一般用 % 碳表示（如，12% 碳）。在反相液相色谱或 SPE 中，碳载量越高，对分析物的保留能力越强。

替代样品	几乎不存在于任何样品中的纯物质，在萃取前将该物质按已知量加入到样品中，并使用与测定其他样品相同的步骤进行测定。替代物的行为与目标分析物类似，最常用于有机分析中。替代分析物的目的是检测方法测定每个样品时的性能。
添加剂	添加到流动相中改善分离或检测特性的物质；例如，消除硅醇基效应的竞争碱、阻断金属位点的螯合剂或加入紫外吸收化合物以进行间接光度检测。
填料	HPLC 或 SPE 柱中所用的吸附剂、凝胶或固体支持剂。大多数现代分析型 HPLC 填料的平均直径都不到 10 μm ，目前最优选的是 5 μm 。SPE 颗粒则更大 (> 20 微米)。
条形码	条形码是一种光学机器可读的数据形式，含有与粘贴了该条形码的物体相关的信息。有时在色谱自动化中使用条形码全程追踪样品的分析过程；条形码条可以贴在样品瓶、烧杯或其他容器上；有时样品瓶上也带有永久性的条形码；自动进样器可带有条形码读取器，帮助追踪样品；这些读取器一般直接与数据系统连接。
透析	根据半透膜上的溶质扩散和流体超滤为原理进行工作。扩散是物质在水中的一种性质，即从高浓度区域向低浓度区域移动的趋势。半透膜是含有不同尺寸的孔或孔隙的薄层材料。较小的溶质和流体可以通过该膜，但较大物质（如，红细胞、大蛋白质）不能通过。生物样品前处理中使用的一种体液脱盐技术；请参见第 15 章和第 18 章。
湍流流动色谱	在非常高的线速度下进行的色谱分离，其中大颗粒处于具有高雷诺数的条件下；在该条件下，H-v 曲线显示 H 随 v 的增大而减小，湍流流动色谱法可用于分离或进行样品前处理；请参见第 16 章和第 17 章。
脱附	在色谱或 SPE 过程中，残留在填料表面或其他固体（如色谱柱壁、筛板等）及固定相表面的分子从表面脱附，进入到流动相中。
脱盐	从非离子型和高分子量化合物中去除低分子量盐和其他化合物的技术。例如，用反相填料通过疏水作用保留样品化合物，但不保留通过的盐，即为脱盐的一个例子。用 SEC 柱排阻大分子，保留较小分子量的盐，这是另一个例子；透析脱盐常用于蛋白质纯化；请参见第 9、11 和 15 章。

微波辅助萃取 (MAE)	用微波加热溶剂中的样品可以进行快速萃取；MAE 可以在敞口容器中进行，该过程中使用非微波吸收溶剂，含有高介电常数（例如水）物质的样品可被快速加热，使萃取出的分析物进入萃取溶剂。也可以加入惰性微波吸收固体物质，它可将热能转移到周围溶剂中。MAE 还可在非微波吸收材质的密闭容器中进行；在该情况下，利用微波吸收使容器内的温度和压力升高，以帮助分析物快速萃取；请参见第 14 章。
微萃取	使用少量有机溶剂进行液相萃取的通过程，其中相比率 V_o/V_{aq} 非常低；其他使用中空微纤维作为屏障的技术也称为微萃取；请参见第 7 章和第 18 章。
微孔径树脂	交联成离子交换树脂，该树脂含有与分子大小相对应的孔隙。尤其对于大分子而言，扩散进入窄孔的几率将降低，并且可能出现较低交换速率和较差的柱效。
微孔树脂	请参见 微孔径树脂 。
微量移液枪头	请参见 移液枪头 。
微量移液枪头 (SPE)	一种 SPE 形式，在该形式中，填料嵌入或吸附在移液枪头的内壁；适用于极少量液体样品的 SPE 处理；通常与 x-y-z 液体处理系统一起使用，以实现自动化；请参见第 9 章。
微透析	侵害性最小的取样技术，用于连续测量几乎任何组织细胞外液中游离分析物的浓度。分析物可包括内源性分子（如神经递质、激素、葡萄糖等），用于评价它们在体内的生化功能，或外源性化合物（如药物），用于测定它们在体内的分布。微透析技术需要将一个微透析小导管（也称微透析探针）插入到目标组织。一旦插入到目标组织或体液中，小分子溶质可以通过被动扩散透过半透膜。微透析探针模拟毛细血管而设计，由针尖上带半渗透中空纤维膜的杆状物构成，该杆状物进口和出口有管线连接；请参见第 15 章和第 18 章。
吸附	一种保留过程，其中溶质与吸附剂表面之间的相互作用占主导地位。作用力可以是强作用力（如氢键）或弱作用力（范德华力）。对于硅胶而言，硅醇基是吸附的驱动力，任何能够与该基团发生相互作用的溶质官能团都可以保留在硅胶上。吸附主要发生在涂层或键合固定相表面上，而不是渗透或嵌入固定相；请参见第 9 章和第 10 章。

吸附等温线	在吸附过程中，以流动相中每单位体积的样品平衡浓度对固定相中每单位重量的浓度作图。吸附等温线的形状可以决定溶质的色谱行为，例如拖尾、前伸、过载等。
吸附剂	吸附色谱中使用的填料。硅胶和氧化铝是 HPLC 和样品前处理中最常用的吸附剂。
吸附色谱	液相色谱和 SPE 基本模式中的一种，依赖于吸附过程来影响分离。硅胶和氧化铝是最常用的正相吸附剂，分子通过其极性官能团与吸附剂表面的官能团（如，硅胶的硅醇基）相互作用而得到保留。碳也可用作反相模式的吸附剂；请参见第 9 章和第 10 章。
矽藻土	既可用于柱色谱，又可以作为样品净化介质的硅藻土。由于只具有弱吸附性，所以该物质也可用作液相色谱以及支持液相萃取的载体；请参见支持液相萃取。很少用于 HPLC；请参见硅藻土和第 2、7 和 14 章。
稀释	通过加入惰性物质来降低化学物质的浓度；该物质可以是液体、固体或气体。
稀释和上样	一种简单的样品前处理步骤，分析人员只需使用溶剂、流动相或可兼容的液体稀释样品，然后将稀释的样品进到色谱，不需进行任何样品处理；请参见第 2、16 和 21 章。
洗脱步骤 (SPE)	通常为 SPE 的第四步，在清洗（冲洗）步骤后进行；在洗脱步骤中，强溶剂将分析物从 SPE 固定相上洗脱下来，此时分析物呈浓缩状态；将强溶剂蒸发去除，然后再用与色谱系统更兼容的溶剂复溶分析物；请参见第 9 章。
洗脱序	LSC 或吸附色谱中常用的强度递增的一系列溶剂（洗脱剂）。在正相色谱和 SPE 中，非极性溶剂（如戊烷）位于该系列末端，过渡溶剂（如二氯甲烷）位于该系列中间，而强极性溶剂（如甲醇）位于该系列另一端靠上的位置。在 NPC 中，强度顺序相反；水为弱强度溶剂，而已烷为高强度溶剂。因此，在开发方法或运行梯度时，可依据洗脱序选择溶剂。
限进介质 (RAM)	用于将生物体液（如，血浆或血清）直接进样到 HPLC 液流中的吸附剂；这类吸附剂含有亲水外表面，可与蛋白质发生最低程度的作用，并且当蛋白质与吸附剂上的小孔结合时可将其排斥；内表面为疏水性，当小分子扩散入孔内时，以反相机制发生作用并得到保留；小分子（如药物及其代谢产物）可使用有机溶剂洗脱；RAM 可成功用于柱切换设置，该过程使用第二维色谱柱分离小分子，并将蛋白质直接引入废液，避免其污染第二维色谱柱；请参见第 10 章。

小柱	一般指 SPE 或过滤中使用的容器；小柱可以像医用注射器针筒那样简单，在针筒中填充填料，并在针筒两端用筛板封堵；也可以是含有相似填料的模塑装置甚至不锈钢装置。在 SPE 中，该装置也称为 SPE 管；请参见第 4 章和第 9 章。
协同离子	与组成固定相的离子型基团带相同符号电荷的离子。
辛基硅烷	反相色谱中常用的一种固定相；与更常用的 C18 相比，保留略弱；具有单分子键合和聚合物键合形式。
压碎	碳化钨可变速颚式破碎机，可用于粉碎大块且硬度高的易碎样品；请参见第 4 章。
研磨	可以使用手动和自动研钵和研杵；研磨可以在潮湿或干燥条件下进行；通过这一过程可以获得 10 μm 左右的颗粒；请参见第 4 章。
盐析萃取	请参见 QuEChERS 或盐析效应；在该提取方法中，水相中的高浓度盐使某些化合物进入到有机相，反之亦然；高浓度盐也会使通常混溶的溶剂（如水和乙腈）变为不混溶，可进一步分配极性更强的分析物，达到非极性有机溶剂不能获得的萃取效果；请参见第 8 章。
盐析效应	在流动相中加入高浓度盐缓冲液减小低极性分析物在水中的溶解度，从而使其沉淀或析出；常用于蛋白质疏水相互作用色谱，首先使蛋白质在高盐浓度下沉淀，然后使用反相梯度洗脱进行逐渐稀释以洗脱蛋白质；也可以用于液液萃取；请参见盐析萃取；请参见第 8 章。
衍生化	一种化学技术，可将化合物转化成具有类似化学结构的产物（反应衍生物），称为衍生物。通常，化合物的特定官能团参与该衍生化反应，并将化合物转化成具有不同反应性、溶解度、沸点（挥发性）、熔点、聚集状态或化学组成的化合物。产生的新化学性质可用于定量（如紫外或荧光检测）或实现更好的分离；请参见第 20 章。
阳离子交换色谱	离子交换色谱使用的树脂或填料具有能够分离阳离子的官能团。例如磺酸带强阳离子官能团；羧酸带弱阳离子交换官能团；请参见第 9 章和第 10 章。
氧化锆	多孔氧化锆；用作色谱吸附剂，通常使用聚合物有机相对其进行涂层或键合。

氧化铝	吸附色谱中使用的正相吸附剂。氧化铝 (Al_2O_3) 是一种多孔吸附剂, 可制成弱碱性表面; 也可以进行中性和酸性修饰。碱性氧化铝相较于公认为具有酸性表面的硅胶具有诸多优势; 实际应用中, 氧化铝很少用作 HPLC 柱填料; 请参见第 9 章。
样品尺寸缩减	将样品分成更小块, 但仍保留样品初始代表性特征的样品缩减过程; 请参见第 4 章。
样品缩分	将样品分成更小块, 但仍保留样品初始代表性特征的样品缩减过程; 请参见第 4 章。
样品预处理	常与样品前处理同义; 使后续分析更容易的样品处理过程。
样品追踪	通过分析周期追踪初级样品、二级样品、实验室样品以及其他样品的过程; 对于分析链和监管要求而言, 很重要的一点是要确保最终用于仪器分析的样品来自源头原始采集的样品; 样品追踪极为简单, 只需在容器上写下样品号, 使用含条形码的样品瓶或 RFI 标签, 以自动追踪样品流。
液固萃取	使用有机溶剂从固体原料中萃取分析物的萃取技术的通用表达。其最简单的形式是, 在室温下进行“振摇烧瓶”萃取, 当基质具有多孔性且分析物易于萃取时效果较好; 请参见第 2 章和第 14 章。
液相微萃取	一种液体萃取技术, 在该技术中, 受体相与供体相之间的比率大幅降低; 在中空纤维中浸满有机溶剂, 用于容纳或保护微量受体溶液。该新方法已证实为简便、低成本和基本无溶剂的样品前处理技术, 通过额外消除运行间的交叉污染, 提供高度的选择性和富集能力; 请参见第 6、7 和 18 章。
液液萃取 (LLE)	通过将分析物在两种不混溶液体 (或相) 之间进行分配, 将干扰物与分析物分离的萃取技术; 其中一相通常为水相, 另一相为有机溶剂; 亲水性较强的化合物倾向于水相, 而疏水性较强的化合物则进入有机相; 使用添加剂 (如缓冲液、离子对试剂等) 可以改变平衡, “强迫”分析物或基质化合物进入两相中一个或另一个; 请参见第 7 章。

一次性过滤器	请参见 注射式过滤器 ；请参见第 5 章。
胰蛋白酶裂解	选择性并可重现地打断蛋白质的肽链，以获得更小单元的特征片段的方法，该方法可用梯度洗脱的反相液相色谱分析母蛋白质；请参见第 15 章。
移液枪头	自动化液体处理过程中使用的可更换的移液枪头；此枪头均为一次性，避免污染。
阴离子交换	分离阴离子所用的离子交换过程。该模式可使用合成树脂、键合相硅胶以及其他金属氧化物。典型的阴离子交换官能团是四烷基铵，是强阴离子交换剂。键合固定相上的氨基是弱阴离子交换剂的一个实例；请参见第 9 章。
银染法 SPE	将银盐结合在 SPE 固定相上，将有助于保留带烯键的化合物。通常用于有机溶剂中，以便最大程度促进电荷转移相互作用；请参见第 10 章。
印迹固定相	在存在“模板”或“印迹”分子的情况下生成的聚合物和硅胶固定相。这些固定相提高了模板分子的选择性；也称为分子印迹固定相（MIP）；请参见第 10 章。
有沟槽的滤纸	用有规律的方式折叠滤纸，让通道中有更多空气；使液体更快地通过滤纸；请参见第 4 章。
预过滤器 (SPE)	在样品中含有大量颗粒的情况下，常规 SPE 小柱和萃取盘会被堵塞，使流速降低；预过滤器是更高孔隙的过滤装置，可滤除大颗粒并帮助 SPE 柱床更有效地工作；一些 SPE 装置具有内置的预过滤器，另一些 SPE 装置则可以自行添加预过滤器；在某些情况下，使用惰性填料（例如玻璃微球）可发挥与过滤器相同的作用；请参见第 9 章。
原位衍生化 (SPE)	在其原始状态下衍生目标化合物；例如，对牢固深度保留在土壤中的分析物，进行原位衍生改变其化学性质，使该化合物更容易得到释放和分离，以便进行下一步分离检测；衍生化还可以在溶液中进行，并用 LLE 提取衍生化合物；请参见第 9 章和第 20 章。

圆孔板	96 孔板上的圆形小孔可放置 96 个小试管；请参见 96 孔板 。
圆盘	许多 SP 和分离介质采用圆盘；圆盘最常用于过滤，且可由任意多种多孔聚合物构成；SPE 萃取盘最常用的是将填料嵌入由 PTFE、其他惰性聚合物或带内分散吸附颗粒的玻璃纤维基质制成的圆盘中；某些生物纯化介质也采用圆盘形式。固定相含有离子交换基团或其他可吸引目标溶质或要弃除的杂质官能团；请参见第 9 章。
在线 SPE	指使用填充了 SPE 填料的小柱，该小柱置于 6 通或 10 通进样阀或柱切换阀上两个端口之间；SPE 捕集柱通过外加泵或注射器加载样品，然后切换阀，使 SPE 捕集柱成为 HPLC 流路的一部分，然后分析物与置换溶剂一起被导入色谱柱；在线 SPE 柱通常可以多次使用，而离线 SPE 小柱一般只使用一次；请参见第 13 章。
在线预浓缩	将预柱置于分离柱前，分离前富集分析物；可以采用不同机制（如，疏水相互作用、吸附、酶反应）随时间变化而保留分析物，然后通过置换（如，溶剂洗脱，pH 改变等）将浓缩的分析物转移入分离柱。
在线柱切换	请参见在线 SPE 操作指南；在柱切换中，第二根色谱柱通常为另一种高效液相色谱柱或气相色谱柱，而不是短 SPE 柱；柱切换的主要目的是分离一根色谱柱不能处理的更复杂混合物；在气相色谱中，当使用压力差控制经过两根色谱柱的气体相对流量时，需使用 Deans Switch；在液相色谱中，切换阀最为常用；请参见第 13 章。
针头式过滤器	含有膜过滤器的小型塑料支架，上下都具有 Luer lock 接口，可以接注射器（注射器也具有 Luer lock 接口）以便使样品通过过滤介质；注射式过滤器的直径范围可达 90 mm；请参见第 5 章。
真空过滤	使用真空辅助液体通过过滤器；尤其适用于高粘度液体或具有低孔隙率的精密过滤器；请参见第 5 章。
真空歧管	为 SPE 小柱和 SPE 萃取盘而设计的多管装置，该装置利用真空驱动液体通过填充床；还具有加压多管装置。真空多管装置可以一次处理 8 到 24 个样品；请参见第 9 章。

真空蒸馏	一种蒸馏方法，在该方法中，将待蒸馏的液体混合物的压力降至其蒸气压以下（通常低于大气压），使大多数挥发性液体汽化（具有最低沸点的物质）。这种蒸馏方法的原理是，当液体的蒸气压超过环境压力时发生沸腾。真空蒸馏过程可以加热也可以不加热。经常用于大气压蒸馏时可能降解的高沸点物质；请参见第 2 章和第 7 章。
阵列 96 孔板	96 孔 SPE 板，96 个单孔都可以从底盘上取下；这种设置可以让用户根据自己的配置，在每个 96 孔板中放置不同类型和数量的 SPE 吸附剂。这种类型的 96 孔板还称为灵活的 96 孔板配置；请参见第 9 章。
蒸发	为分离目标化合物而去除挥发性化合物的过程；溶剂蒸发是最常用的样品前处理技术。
蒸馏	基于组分的挥发性差异，在沸腾的液体混合物中分离这些混合物的方法。蒸馏是一种单元操作或物理分离过程，而不是化学反应；可用来纯化有机混合物或去除溶剂；馏分蒸馏可用于分离沸点相近的化合物；共沸蒸馏是用共沸混合物去除溶剂，该溶剂的沸点与另一种化合物的沸点过于相近或相同而不能与之分离。
支持液相萃取 (SLE)	基于液液萃取原理的技术，其中水相由高纯度、高表面积 of 的硅藻土填充床支持（试管、小柱或 96 孔板的形式）；该水相可以是缓冲液，可含有需要分配的样品；然后有机相渗透通过填充床与水相充分接触。在柱出口处收集到的洗脱液含有萃取物；与 LLE 相比，SLE 技术实现了微型化，易于自动化操作，并提供了卓越的萃取效率；请参见第 7 章。
直接采样	从源头直接取样的方法。例如，可以用采样罐在源头直接采集气体样品。将收集容器直接浸入水中采集河水样品。让气流通过含吸附剂的热脱附管，以浓缩挥发性和半挥发性分析物。
直接热采样	用温度作为变量进行挥发性和半挥发性物质采样的过程；在一定温度下的静态顶空方法即为热采样的一个实例；选择一定温度，可以去除某些样品组分，因为其在选定温度下具有极低的挥发性；热采样可以在高温分解的各阶段进行，在这个过程中，有目的地破坏样品中的化学键，以获得该物质的结构；请参见第 6 章。

中空纤维液相微萃取 (HF-LPME)	中空纤维 (HF) 膜技术, 其中 HF 膜将两个提取相分隔; 膜充当了屏障并且可浸入溶剂中, 实现液液萃取或液液液萃取; 可以对膜进行选择以让特定分析物通过, 而阻止其他物质通过; 请参见第 7 章和第 18 章。
中心切割	在制备液相色谱中, 是指收集色谱峰中纯度最高的中心部分。该术语也用于 柱切换 ; 请参见第 13 章。
逐步洗脱	在色谱分离中使用不同组成的洗脱液。这些洗脱液可通过泵或选择阀分步加入。梯度洗脱就是连续改变溶剂组成进行洗脱。
主动采样	在活性气体采样中, 使用泵抽动样品通过质量流量计并进入采样罐中。相对于被动采样, 此方法通过对样品加压使其进入采样罐, 可以收集更多样品。通常将样品加压到 15 psig, 可有效获得两倍体积的样品。
柱后衍生化	请参见 柱后反应 ; 请参见第 20 章。
柱前衍生	请参见柱前反应; 请参见第 20 章。
柱切换	通过切换阀将多根色谱柱连接起来, 更好地进行色谱分离或样品纯化。来自第一维色谱柱的组分可以切换到两根或多根第二维色谱柱上, 再进一步转移到其他色谱柱或检测器上; 有时称为多维色谱; 请参见第 10、11 和 13 章。
柱上进样	在气相色谱中是指使用安装在毛细管内的细针将全部液体样品直接注入柱头的过程; 请参见第 6 章。
撞击式采集器	玻璃气泡管, 用于将空气中的有害物质收集到液体介质中。使用个体空气采样器时, 将已知体积的空气泵入含方法中特定液体的玻璃试管中。然后分析该液体, 测定空气中有害物质的浓度。可以将空气采样器固定在空气采样泵的一侧, 或放入皮套内并置于受测试人员呼吸带处; 请参见第 6 章。

索引

数字

- 96 孔板, 阵列/灵活性121
- 96 孔板33,261
- 96 孔板, SPE..... (请参见 SPE 产品类型)
- 96 孔板, 过滤33,238-239

A

- AOAC 2007.1 方法 QuEChERS 80
- ASTM, 美国材料与试验协会11

B

- 剥离, 气相48, (请参见动态顶空/吹扫捕集)
- 捕集, 固相9, 11, 48-49
- 捕集, 冷48, 51
- 捕集, 吸附剂48, 51-52
- 捕集, 液体9

C

- Captiva ND Lipids33, 238-242, 303
- Captiva 过滤33
- CaptiVac 真空歧管108
- 采样17-20
- 采样, 初级1, 17-18

- 采样, 顶空10
- 采样, 定点9
- 采样, 二级25-27
- 采样, 误差27
- 采样方案17
- 超临界流体萃取 (SFE)13, 185-190
- 超滤199, 271
- 超声 (超声搅拌)12, 181, 246
- 沉积16
- 穿透容量, SPE122
- 穿透容量, 捕集48
- 吹扫捕集 (请参见动态顶空)

D

- DNA 纯化, 高通量203
- dSPE80-85, 31
- 单滴微萃取 (SDME)46, 73-75
- 单滴微萃取 (SDME), 溶剂74
- 蛋白浓缩198-199
- 蛋白质沉淀235-239, 303
- 蛋白质沉淀, 去除亲脂性化合物240-242
- 蛋白质聚集体纯化 (使用 SEC)168-169
- 蛋白质去除技术235-239
- 蛋白质样品前处理, 传统205-209

蛋白质样品前处理, 从凝胶上取出	212
蛋白质样品前处理, 现代	211-215
蛋白质样品前处理, 自动化	214-215
蛋白质组学样品前处理	204-215
低温聚焦	51-52
电膜萃取 (EME)	278-279
电渗析	199
顶空, 动态 (吹扫捕集)	10, 36, 43, 48-50
顶空, 静态	10, 42-43
顶空单滴微萃取 (HS-SDME)	46-47, 75
顶空固相微萃取 (HS-SPME)	46
冻干法	3, 16, 28, 55, 198, 205, 246, 282, 300
堆锥四分法	25-26
多次顶空萃取 (MHE)	43
多反应监测 (MRM) (质谱)	68, 79, 91, 155, 241, 256, 264, 302
多维液相色谱	204-213

E

Ecospheres	161, 163
二维电泳	212-215, 266

F

反灌, 气相色谱进样	36
分流比	37
分配系数 (KD)	60-62

分散 SPE (请参见 dSPE)	71
分散 SPE, 吸附剂	80, 85-87
分散 SPE, 吸附剂选择	85-87
分散液液微萃取 (DLLME)	35
分散液液微萃取 (DLLME), 工作流程	70-72
分析物保护	88
分析周期	1-2, 17, 298
分样器, 实验室	26
分子印迹聚合物 (MIP)	148-149

G

干介质斑点分析	232-235
干血斑分析	232-235
干燥	28
工作表, 问题	6-7
固相萃取	(请参见 SPE)
固相微萃取	(请参见 SPME)
硅胶	9, 49, 119, 170
硅藻土	266, 271
过滤	16, 29-34, 197
过滤, 真空	30
过滤板, 96 孔 (Captive)	33
过滤瓶	34
过滤器, 离心	31
过滤器, 膜	29-32
过滤器, 膜, 耐化学腐蚀	32

过滤器, 膜, 滞留体积	31	搅拌棒吸附萃取 (SBSE)	16, 106
过滤器, 针头式	30	进样, 不分流/脉冲	39
过滤器, 纸	29-30	进样, 程序升温汽化 (PTV)	37-38
H		进样, 大体积 (LVI)	39-40
HF-LPME, 两相	276	进样, 带溶剂汽化出口 (SVE) 的 冷柱头进样	40
HF-LPME, 三相	276	进样, 分流/不分流	37
Hydromatrix	67	进样, 进样针	35
核酸组分样品前处理, 传统	200-202	进样, 冷柱头 (COC)	36-37
核酸组分样品前处理, 高通量	203	进样口, 多模式 (气相色谱)	38
化学过滤	114	进样口, 样品 (气相色谱)	36-41
环境样品, 专有污染物 SEC 纯化 (EPA 3640A 方法)	161-164	浸渍	22
缓冲液	61, 65, 196	聚合物, 合成	52
缓冲液置换 (使用 SEC)	188	均质化	12, 22, 246, 251
挥发性有机化合物 (VOC)	35-54	K	
混合	22	抗体纯化	196
J		快速色谱纯化	170-171
Just Enough 样品前处理方法	297-306	L	
基因组学样品前处理	200-203	LC-MS 加合物的形成	257, 264, 266
基质固相分散 (MSPD)	14, 143-144, 247	LC-MS 样品预处理	255-268
极性指数 (P')	60	LC-MS, 大分子样品前处理	265-266
挤压	22	LC-MS, 挥发性缓冲液和溶剂	259-260
加速溶剂萃取 (ASE)	13, (请参见 PFE)	LC-MS, 离子抑制/离子增强	255, 257, 264-266
加压流体萃取 (PFE)	11, 13, 192	LC-MS, 小分子样品前处理	261-264

Luke 方法	79
滥用药物 (使用 SPE)	153-155
冷冻干燥	请参见冻干法
冷冻研磨机	22, 24, 244, 247
离心	16
离子对	59, 65
粒度缩分	21-24
流动注射萃取	76
漏斗, 分液	56
滤纸, 有沟槽	30

M

美国分析化学家协会 (请参见 AOAC)	80
美国国家环保局	(请参见 USEPA)
美国农业部 (USDA)	79
美国药典	(请参见 USP)
膜技术	269-280
磨粉机	24
磨碎	22, 24, 247

N

N-丙基乙二胺 (PSA)	80, 84-87, 91, 145
内标	5-6, 47, 70, 81, 83, 91, 109, 120, 233, 251, 257
逆流分配	62
碾磨	22, 24
农药	39-41, 79, 162

O

欧盟 QuEChERS 方法 (EN15662)	80
--------------------------	----

P

PLgel, SEC 样品纯化	163-164
-----------------	---------

Q

QuEChERS	76, 80-92
QuEChERS, 操作步骤	81-84
QuEChERS, 工作流程	81, 90
QuEChERS, 应用	88-89
气相萃取	14
强制流动浸提	182
切断	22
切碎	22
清除剂	281-285
球磨机	24
去除表面活性剂	197, 266
去除蛋白质, 高丰度	206, 210
去除甲酸	282-283
去除金属, 生物样品	197
去除铯	284-285
去除亲电试剂	282
全血处理	230
确证, 滥用药物	153-155

R

热萃取	10, 50
热裂解	10, 51-52

热脱附	10, 48-49, 51
溶剂萃取	(请参见液液萃取)
溶解	12
溶解度, 液液萃取中的相溶解度	10, 64

S

SEC 校准曲线	166-167
SFE (超临界流体萃取)	11, 13
SFE, 方法开发	188-190
SPE 产品类型, 小柱	29, 99-100
SPE 产品类型	
SPE 产品类型, 96 孔板	104-105
SPE 产品类型, 涂层搅拌棒 (用于 SBSE)	106
SPE 产品类型, 涂层纤维 (用于 SPME)	105-106
SPE 产品类型, 移液枪头	103
SPE 产品类型, 圆盘式	29, 101-103
SPE 与 HPLC	96
SPE 与 LLE	95-96
SPE 装置	107-108
SPE 装置, 真空歧管 (96 孔板)	108
SPE 装置, 真空歧管 (小柱)	107-108
SPE 自动化	104, 109
SPE (固相萃取)	
SPE, 步骤	110-114
SPE, 毒枝菌素固定相	156
SPE, 多模式萃取	156-157
SPE, 方法开发	112, 116-125
SPE, 方法开发工作流程	125
SPE, 方法验证	126
SPE, 分散 (dSPE)	80-82, 84-87, 91
SPE, 固定化相	152-153
SPE, 混合模式	156-157, 261-262
SPE, 基质吸附模式	114
SPE, 结合-洗脱模式	110
SPE, 聚合物吸附剂	261
SPE, 滥用药物	153-155
SPE, 离子特异性	152
SPE, 流速的影响	127
SPE, 免疫亲和萃取	150-151, 264
SPE, 去除离子	155
SPE, 推荐教材	131-132
SPE, 相	112, 115
SPE, 用途	97-98
SPE, 优点/缺点	95
SPE, 在线 (柱切换)	172-180
SPE, 专用固定相	145-146
SPME	10, 70, 105-106, 133-141, 263
SPME, 步骤	136-139
SPME, 萃管式	263
SPME, 顶空	45
SPME, 纤维化学	136
SPME, 优点/缺点	140

SPME, 原理	135-136
StratoSpheres	283-285
筛分	22, 26
生物分析, 样品前处理	227-254
生物色谱样品纯化	196-198
生物体液, 有机挥发物	49
生物组织样品前处理	242-252
生物组织样品前处理, 工作流程	245
时间, 典型样品前处理	4
食品重点污染物 SEC 纯化 (EPA 3640A 方法)	161
使用 SPE	97-98
使用 SPE 脱盐	98
缩分	26
索氏提取, 传统	11-12, 181-182
索氏提取, 现代	184

T

USEPA 3535A 方法, 盘式 SPE	102
USEPA 3550 方法, 声波	181
USEPA 3640A 方法, SEC 纯化	161
USEPA 8330A 方法, 硝基芳烃类	79
USEPA SEC 校准混标	162-164

USP, 467 方法, 残留溶剂	45
肽谱分析, 样品前处理	216-222, 266
肽谱分析, 自动化	223
体积排阻色谱 (SEC)	160-169
透析	198, 269
透析, 微量	266, 271
湍流流动色谱	262
脱盐, 生物样品	186, 196

W

微波辅助萃取 (MAE)	11, 13, 191
微波加速提取	(请参见 MAE)
微萃取	70
微萃取, 固相	(请参见 SPME)
微萃取, 固相, 顶空 (HS-SPME)	45
无水硫酸镁 (用于 QuEChERS)	79, 82, 85-87
误差, 来源	4, 17

X

吸附剂, 分散	SPE 80
吸附剂接口膜萃取 (MESI)	49-50
稀释	65, 67
限进介质 (RAM)	147, 262

小柱, SPE	29, 99-100
小柱, 过滤器	30
血液分析, 样品前处理	228-235

Y

压碎	22, 24
研磨	22, 24, 246
研磨, 干法和湿法	23
盐析萃取	78-79
盐析效应	59, 70, 78
衍生化	9, 288-296
衍生化, 气相色谱	295-296
衍生化, 气相色谱, 试剂	295
衍生化, 液相色谱	287-293
衍生化, 液相色谱, 试剂	288
衍生化, 荧光检测	290, 292-293, 305
衍生化, 柱后	291-293
衍生化, 柱前	290
衍生化, 紫外检测	289
氧化铝, 阱	51
样品, 采集	3
样品, 储存	3, 18
样品, 传输	3, 18

样品, 干燥	28
样品, 固体	181-193
样品, 气体	9
样品, 生物	195-223
样品尺寸缩减	25-27
样品追踪	17
摇瓶	181
液固萃取	11-12
液相微萃取 (LPME)	70, 273
液液萃取 (LLE)	15, 55-64
液液萃取 (LLE), 反萃取	61
液液萃取 (LLE), 理论	58-59
液液萃取 (LLE), 连续	61
液液萃取 (LLE), 生物分析	261
液液萃取, 工作流程	57
液液萃取, 理论	58-59
液液萃取, 溶剂	60
液液萃取中的分析物吸附	63
液液萃取中的溶质结合	64
液液萃取中的乳浊液	63, 65

Z

蒸馏	15, 55, 300
----------	-------------

支持液膜 (SLM)	272
支持液相萃取 (SLE)	65-69
支持液相萃取 (SLE), 96 孔形式	67
支持液相萃取 (SLE), 步骤	66-67
支持液相萃取 (SLE), 溶剂	68
直接进样	3-4, 7, 9, 14-15, 153
植物纤维	52
质粒纯化	197
中空纤维液相微萃取 (HF-LPME)	273-277
中空纤维液液微萃取 (HF-LLLME)	276
中心切割	173, 179, 300
珠磨式研磨器, 组织前处理	247
柱切换纯化	172-180, 262
自动化	5, 33, 67, 109, 200, 203, 214, 223
综合多维色谱	180
组织, 酶解	249
组织样品前处理, 仪器	246-247, 250

基质/分析物索引

B

菠菜, 农药 (QuEChERS).....89

C

草莓, 农药 (QuEChERS).....89

茶, 红茶和绿茶, 农药 (QuEChERS).....89

茶, 有机氯农药 (SPME).....134

沉积物, 有机氯农药.....191

沉积物, 有机氯农药.....191

橙子, 农药 (QuEChERS).....89

D

大豆, 农药 (QuEChERS).....89

大鼠脑组织, 地昔帕明.....246-248

地下水, β 受体阻滞剂.....179

动物纤维.....52

动物源性食品, 农药 (QuEChERS).....89

动物组织, PCB.....192

动物组织, 农药.....243

E

鳄梨, 农药 (QuEChERS).....89

F

番茄, 农药.....89, 157

蜂蜜, 农药.....68-69

G

橄榄油, 农药 (QuEChERS).....89

固体废弃物, 农药, PCB, 烃类化合物.....192

果汁, 风味成分.....45, 144

H

胡椒, 农药 (QuEChERS).....89

胡萝卜, 农药 (QuEChERS).....89

花生酱, 黄曲霉毒素.....151

黄瓜, 农药 (QuEChERS).....89

J

鸡肉, 磺胺类抗生素.....89

聚合物, 添加剂.....49-50, 191

K

咖啡, 风味成分.....45

空气, 挥发性有机化合物.....51

空气中的酮和醛类 (EPA TO-11).....11

空气中的酮和醛类, ASTM
(D5197-03 方法).....11

L

梨, 农药 (QuEChERS).....89

绿茶, 农药 (QuEChERS).....89

M

面粉, 农药 (QuEChERS).....89

苜蓿叶, 异黄酮.....144

N

柠檬, 农药.....157

柠檬油, 农药 (QuEChERS).....89

牛肝, 磺胺类抗生素 (QuEChERS).....89

牛肝, 喹诺酮类抗生素 (QuEChERS).....89

牛奶, 抗生素.....144, 179

P

苹果, 农药 (QuEChERS).....90-92
葡萄酒, 异丁基吡嗪.....134

Q

青椒, 农药 (QuEChERS).....89
全血, 药物 (QuEChERS).....89

R

人血浆, 利巴韦林.....152-153
人血清, 地高辛.....179
肉, 兽药 (QuEChERS).....89
软木塞, 氯苯甲醚.....134

S

生菜, 农药 (QuEChERS).....89
食品, 抗菌素残留.....144
食品, 维生素.....191
食用油, 丙烯酰胺 (QuEChERS).....89
蔬菜, 非离子型农药.....79
双壳贝类, 多环芳烃.....144
水, 氨基酸酯农药.....292-293
水, 苯脲类除草剂.....134
水, 除草剂 (痕量富集).....178
水, 杜冷丁.....279
水, 多环芳烃.....70
水, 酚类.....277
水, 风味成分.....45
水, 合成甜味剂.....127

水, 痕量爆炸物.....79
水, 痕量有机物.....75
水, 痕量有机物 (EPA 3535A 方法).....102
水, 邻苯二甲酸酯.....134, 141-142
水, 农药 (DLLME).....72
水, 农药 (SLE).....67
水, 农药 (痕量富集).....97
水, 酸性农药.....98
水, 硝基芳烃类爆炸物.....75, 79
水, 饮用水, 非卤代挥发物 (EPA 502.1).....49
水, 饮用水, 挥发性芳香族化合物
(EPA 503.1).....49
水, 雨水, 烃类.....49, 134
水稻, 农药 (QuEChERS).....89
水果, 农药 (MSPD).....144
水果和蔬菜, 链格孢菌毒素.....128-130
水果和蔬菜, 农药 (QuEChERS).....76, 79, 80-86, 89, 303

T

调味料, 苏丹染料 (柱切换).....175-177
烃加工流, 氧化物和芳香族化合物.....179
土壤, BTEX.....49
土壤, 多环芳烃 (QuEChERS).....89
土壤, 多环芳烃 SEC 纯化.....164
土壤, 非挥发性和半挥发性有机化合物.....134, 181
土壤, 沙化土壤, 五氯酚.....184
土壤, 石油烃.....50
土壤和淤泥, 有机氯农药.....186, 191

X

虾, 激素 (QuEChERS)	89
香蕉, 农药 (QuEChERS).....	89
血浆, 17- β -雌二醇.....	179
血浆, 丙酸氟替卡松.....	302
血浆, 免疫抑制剂.....	179
血浆, 去甲替林.....	179
血浆, 维生素	179
血浆, 吡喹酮.....	179
血液, 乙醇	42, 45

Y

药物, 残留溶剂.....	46-47
饮料, 香料	49
婴儿食品, 农药 (QuEChERS).....	89, 144
鱼, PCB (QuEChERS).....	89
鱼, 多环芳烃	89, 303-305
鱼, 甲基汞	134
鱼, 农药 (QuEChERS)	89
鱼, 真菌毒素	248
鱼, 脂类	191
玉米, 黄曲霉毒素.....	151

Z

炸薯条, 丙烯酰胺 (QuEChERS).....	89
植物油, 风味成分.....	45
猪肉香肠, SEC 纯化	165
组织, 兽药	144

备注

备注

备注



可靠地萃取并浓缩复杂基质中的样品

样品制备是成功实现色谱分析的一个重要步骤。它延长了色谱柱寿命，减少了重复进样次数，并且将可以危害分离、检测和定量的干扰降至最低。



安捷伦为所有分析仪器提供了最全系列的样品制备产品。包括：



- **预包装的 QuEChERS 试剂盒** — 让样品制备更快速、更容易、更可靠
- **过滤产品** — 同时改善系统性能和分析质量，防止可萃取物、蛋白质、脂质或其他污染物影响分析的准确性
- **Chem Elut 产品** — 适用于支持液相萃取 (SLE)，与传统液-液萃取相比，溶剂用量更少、分析时间更短
- **Bond Elut SPE 产品** — 从具有挑战性的基质中选择性地去除干扰物和/或目标分析物 提供当今市场上最全面的吸附剂类型供您选择

www.agilent.com/chem/sampleprep

如需了解更多信息

如需了解有关安捷伦样品前处理产品系列的更多信息，请访问

agilent.com/chem/sampleprep

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

安捷伦科技大学：

<http://www.lscA-china.com.cn/agilent>

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：

www.agilent.com/chem/accessagilent-cn

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013

2013年11月13日，中国印刷

5991-3326CHCN

