

固相萃取技术

固相萃取 (Solid Phase Extraction, 简称 SPE) 技术, 发展于上世纪 70 年代, 由于其具有高效、可靠、消耗试剂少等优点, 在许多领域取代了传统的液-液萃取而成为样品前处理的有效手段。

一些传统的介绍 SPE 的书籍将其归为一个液相色谱的原理, 这其实是引起使用不当的主要源由之一。把 SPE 小柱看作一根液相色谱柱, 不如把它看成单纯的萃取剂更合适, 因为: 液相色谱的重点在于分离, 而 SPE 的重点在于萃取。固相萃取技术在样品处理中的作用分两种: 一是净化, 二是富集, 这两种作用可能同时存在。

固体萃取和液-液萃取相比, 其长处在于方便和消耗试剂少, 短处在于批次间的重复性难以保证。出现这种情况的原因在于: 液体试剂的重复性好, 只要其纯度可靠, 不同年代的产品的物理化学性质都是可靠的。而固体萃取剂就算保证了纯度外, 还存在着颗粒度的差异, 外形的差异等液体试剂不存在的且难以衡量的因素, 不同年代不同批号的萃取性质可能会有较大的区别。

从理论上和厂家宣传来看, 固相萃取应该在色谱分析的前处理上得到很好的应用: 有机溶剂用得很少, 可批量处理样品, 既可富集, 又能除杂质, 给人印象是前处理的革命性进步。然而现实情况, 起码在国内, 虽然推广了多年, 实际应用还是相当有限。

SPE 应用得不广, 与我们的使用方式和期望有关, 也与它本身的局限有关。对于供应商来说, 从经济利益出发, 向来都是忽略固相萃取的局限与不足。固相萃取可以作为前处理手段的一个很好补充, 但是在使用时, 一定要清醒知道到它的优点和缺点, 注意因地制宜, 扬长避短。

固相萃取理论

反相固相萃取

反相分离包括一个极性或中极性样品基质 (流动相) 和一个非极性的固定相。分析物通常是中极性到非极性。几种 SPE 材料属于反相类, 如烷基, 或芳香基键合的硅胶 (LC-18, ENVI-18, LC-8, ENVI-8, LC-4, 和 LC-Ph)。在这里, 纯硅胶 (一般孔径为 60—40nm 大小的颗粒) 表面的亲水性硅醇基通过硅烷化学反应, 被含有疏水性的烷基或芳香基取代了。

由于分析物中的碳氢键同硅胶表面官能团的吸附作用, 使得极性溶液 (例如, 水) 中的有机分析物能保留在这些 SPE 物质上。这种非极性-非极性吸附力通常称为范德华力或色散力。为了从反相 SPE 管或片上洗脱被吸附的化合物, 一般采用非极性溶剂去破坏这种化合物被吸附到填充物质上的力。LC-18 和 LC-8 是标准的单键合硅胶, 而 ENVI-18 和 ENVI-8 则属于聚合键合类填料, 具有很高的硅表面覆盖率和较高的碳含量。这类聚合键合类填料具有更强的抗酸碱性, 因而更适于环境应用, 如从酸化的液体样品中富集有机化合物。所有使用过的键合硅胶相都有一定数量的未反应硅醇基, 它将成为二级相互作用之源。在萃取或保留强极性分析物或污染物时, 这种二级相互作用是非常有用的, 但是对分析物的吸附也可能是不可逆。

以下物质也用于反相条件: ENVI-Carb (碳), ENVI-Chrom P (聚合类) 和 Hisep (聚合涂层的键合硅胶)。含碳的吸附物质, 如 ENVI-Carb 材料, 是由石墨和无孔碳组成, 它对极性和非极性样品中的极性和非极性有机化合物有较高的吸附能力。该碳表面是正六圆环的原子结构, 每个碳原子在石墨层上相互联接。这种正六圆环结构对某些分子有很强的选择性, 比如平面型芳香化合物或类正六圆环分子和可形成许多表面触点的烃链分子。分析物的保留取决于其结构 (形状和大小), 而不是其上官能团与吸附剂表面的相互作用。洗脱时, 使用中等极性到非极性溶剂。与烷基键合硅胶相比, 尤其是在键合硅胶不灵时, ENVI-Carb 显示出特有的结构和选择性优势。聚合类吸附物质, 如 ENVI-Chrom P 是苯乙烯-二乙烯基苯物质, 用之保留一些含有亲水性官能团的疏水性化合物, 尤其是芳香型化合物。有时在反相条件下, 苯酚很难保留在 C18 键合硅胶

上,这主要是因为它在水中的溶解度大于有机相。而 ENVI-ChromP 在反相条件下可很好地保留苯酚。洗脱时,使用中等极性到非极性溶剂,这是因为,聚合类填料对所有的溶剂都是很稳定的。

Hisep 是一个疏水基(类似 C18)键合硅胶涂上一层亲水聚合物,常用于反相条件,这种有孔的聚合物能阻止不需要的大分子被吸附到硅胶表面。聚合物的孔径大小只允许所分析的疏水性有机小分子化合物(如药物)接近硅胶表面,而不需要的大分子(如蛋白质)则被聚合物层隔离在外,没有机会接近硅胶表面,并被冲洗出固相萃取管。Hisep 固相萃取过程类似于 LC-18 固相萃取过程。

正相固相萃取

正相固相萃取包括了一个极性分析物质、中等极性到非极性的物质(如丙酮,卤化溶剂和正己烷)和二极性固定相。极性官能团键合硅胶(如 LC-CN,LC-NH₂ 和 LC-Diol)和极性吸附物质(如 LC-Si,LC-Florisil,ENVL-Florisil 和 LC-Alumina)常用于正相条件。在正相条件下,分析物如何保留取决于分析物的极性官能团与吸附剂表面的极性官能团之间的相互作用,具体包括氢键、相互作用、偶极-偶极相互作用和偶极-诱导偶极相互作用及其它。因此,由以上几种机理所吸附的分析物,应用比样品本身更极性的溶剂去破坏其相互作用,这样分析物才随之而洗脱。

键合硅胶 LC-CN、LC-NH₂ 和 LC-Diol,有一个带有极性官能团的较短烷基链键合在硅胶表面上。因为极性官能团的存在,这种硅胶相对于反相硅胶更具有亲水性。常用的正相硅胶,它从非极性的样品中吸附极性化合物。这种固相萃取管已用于吸附和选择性洗脱结构很类似的化合物(如异构体)复杂的混合物或者象药物和脂类化合物。为了利用它这种疏水性,它也可用于反相条件(如水溶液样品)。

LC-Si 填料是一种没有衍生的硅胶,一般用来作所有键合硅胶的基体。这种硅胶极亲水,必须保持干燥,这就要求所分析的样品必需无水。硅胶用于从非极性物质中吸附化合物官能团的都是表面自由羟基。LC-Si 从非极性物质中吸附极性化合物,然后用一种极性更强的有机溶剂洗脱。多数情况下,LC-Si 是作为一种吸附剂,当硅胶基体用于有机萃取时,分析物不停留在硅胶上,而不要的化合物则被吸附在硅胶上,随之扔掉。这种过程称为样品前处理。

LC-Florisil 和 ENVI-Florisil 固相萃取是一个键合硅胶,通常用在样品的有机萃取,用其进行有机样品的前处理。它是一种强极性物质,可以有效地从非极性物质中吸附极性化合物。ENVI-Florisil 固相萃取是由聚四氟乙烯或者不锈钢滤片制作。这种对环境过程非常重要的结构详述在美国环境保护组织的方法中。ENVI-Florisil 已用气相色谱分析法测定其背景较小。

LC-Alumina 固相萃取用于吸附和样品前处理的过程,Al₂O₃ 材料可为酸性(Al₂O₃-A, pH 约为 5)碱性(Al₂O₃-B, pH 约为 8.5)或者中性(Al₂O₃-N pH, 约为 6.5)。Al₂O₃ 的活性水平随水加入的多少,从 1 级到 5 级而变化,装管时,Al₂O₃ 可在装管前预处理或者装管后再处理。

离子交换固相萃取

离子交换固相萃取适用于带有电荷的化合物(一般为水溶液,也有有机溶液)。阴离子(负电荷)化合物可用 LC-SAX 或 LC-NH₂ 键合硅胶管进行分离;阳离子(正电荷)化合物可用 LC-SCX 或 LC-WCX 键合硅胶管进行分离。基本原理是静电吸引,也就是化合物上的带电电荷基团与键合硅胶上的带电电荷基团之间的吸引。为了从水溶液中将化合物吸引到离子交换树脂上,样品的 pH 值一定要保证其分离物的官能团和键合硅胶上的官能团均带电荷。如果某种离子带有与分析物一样的电荷,它将会干扰分析物的吸附。当然这种情况也可能是罕见的。洗脱溶液一般是其 pH 值能中和分离物官能团上所带电荷,或者中和键合硅胶上官能团所带电荷。当官能团上的电荷被中和,静电吸引也就结束,分析物则随之洗脱。另外,洗脱溶液也可能是一种其离子强度很大或含有另一种离子能取代被吸附的化合物,这样被吸附的化合物也随之而洗脱。

阴离子交换

LC-SAX 是一种脂肪族季铵盐键合在硅胶上的物质，季铵盐是一种很强的碱，带有一个正电荷，能交换或吸附溶液中的阴离子，称之为阴离子交换(SAX)。季铵盐的 pH 值很高(>14)，在水溶液中，所有的 pH 条件下，都能带上电荷。这样 LC-SAX 可分离很强的阴离子化合物(很低的 pH 值, <1)或弱阴离子化合物(中等的 pH 值, >2)，只要样品在其 pH 条件下，分析物带有电荷即可。对于阴离子分析物(酸性)，为使之带上电荷，其 pH 值必需大 2 个单位。大多数情况下，被分析物是强酸性的或弱酸性的。

因为化合物被吸附地如此之紧，只有在不要求其阴离子回收率时(化合物被分离，然后扔掉)，才能用 LC-SAX 萃取强阴离子。弱阴离子则能用 LC-SAX 分离，因为它们能被另外一种阴离子所取代或者被一种酸性溶液所洗脱，该酸性溶液的 pH 值可中和被取代的阴离子(pH 小 2 个单位)。如果要求强阴离子其回收率时，可选用 LC-NH₂。

LC-NH₂ 固相萃取填料适用于正相分离，当用于水溶液时也做为一种弱阴离子交换树脂(WAX)。LC-NH₂ 填料含有一个脂肪族季氨基，并键合在硅胶表面上。这种伯胺基的 pH 值大约为 9.8。因为其用于阴离子交换，样品的 pH 值必需小于 9.8 至少 2 个单位，此 pH 还必需保证所分析的阴离子化合物带上电荷(比其 pH 值大 2 个单位)。LC-NH₂ 也可适用于强阴离子或弱阴离子分离回收，这是因为硅胶表面的氨基能被中和强阴离子或弱阴离子(比其 pH 大 2 个单位)，这样强阴离子或弱阴离子都能被洗脱。弱阴离子也能用一种溶液(pH 比该阴离子的 pH 小 2 个单位)而洗脱，或者加入另外一种阴离子取而代之。

阳离子交换

LC-SCX 填料含有一个脂肪族磺酸基，并键合在硅胶表面上。这种磺酸基有很强的酸性(pH 值 <1)，它能吸附或者交换溶液的阳离子，称之为强阳离子交换(SCX)。在所有的 pH 条件下，这种键合官能团都能带有电荷，只要该 pH 能保证所分析化合物带有电荷，因此其能用于强阳离子(pH 值 >14)或弱阳离子(pH 值 <12)化合物的分离。对于所分析的阳离子(碱性)化合物，样品的 pH 要比其 pH 值小 2 个单位，以保正其带电荷。多数情况下，所分析的化合物是强碱性的或弱碱性的。

当不要求强阳离子回收或者被洗脱时，LC-SCX 固相萃取管可用于强阳离子的分离。弱阳离子则可以用 LC-SCX 分离和洗脱。洗脱时，用一种 pH 比其 pH 大 2 个单位的溶液(中和分析物的电荷)，或者加入另外一种阳离子取而代之。如果要求强阳离子回收率，可选用 LC-WCX。LC-WCX 固相萃取填料含有一个脂肪族羧酸基团，并键合在硅胶表面上。这种羧基是一种弱酸性阴离子，所以它可作为一种弱性阳离子交换(WCX)。LC-WCX 上羧基的 pH 约为 4.8。当 pH 比其 pH 大 2 个单位时，它保持带负电荷，能分离此 pH 下带电荷的阳离子。LC-WCX 适用于强阳离子或弱阳离子分离和回收，因为硅胶表面的羧基能被中和(pH 比其 pH 小 2 个单位)，强阳离子或者弱阳离子则被洗脱。对于弱阳离子可用一种溶液(pH 比阳离子 pH 大 2 个单位)中和而洗脱，或者加入另外一种阳离子取而代之。

在很多情况下，由离子交换固相萃取所吸附的分析物被洗脱在水溶液中。如果必需使用酸性溶液或者碱性溶液去洗脱固相萃取管上的分析物，同时分析物又必需以有机溶剂来分析，而有机溶剂又不溶于水，这时可根据情况，试用含有酸的甲醇(98%甲醇、2%浓盐酸)或者含有碱的甲醇(98%甲醇、2%氢氧化氨)来洗脱。由于甲醇很容易挥发，样品可再溶解在另一种溶剂里。如果需要一个很强(非极性)的溶剂从固相萃取填料上去洗脱所分析物，可加一些二卤甲烷、正己烷、乙酸乙酯到酸或碱性的甲醇里。

二级相互作用

以上详述了化合物在固相萃取方法中是如何保留的基本原理。对键合硅胶可能有二级相互作用的存在。

对反相键合硅胶，基本原理是非极性的相互作用。然而，由于硅胶只是主体，有一少部分

硅甲醇存在，这就有一些极性二级相互作用（正如我们在正相固相萃取所谈）将要发生。如果非极性溶剂不能有效地从反相固相萃取填料上洗脱化合物，就有必要加些极性溶剂（如甲醇），以破坏极性相互作用而保留的化合物。在这种情况下，甲醇与硅胶上的羟基形成氢键，打断了分析物与硅胶上的羟基形成的氢键。

硅甲醇在硅胶表面， Si-OH ，也可为酸性，当 pH 大于 4 时，以 Si-O^- 型式存在。这时在硅胶基体上也可能发生阳离子交换的二级相互作用，能吸附阳离子或碱性分析物。在这些情况，调整洗脱溶液的 pH 非常重要，以破坏这些相互作用而洗脱分析物（酸中和硅甲醇或碱中和分析物）。可选用含有酸的甲醇（98% 甲醇、2% 浓盐酸）或者含有碱的甲醇（98% 甲醇、2% 浓氢氧化氨），或者用一种溶于甲醇的非极性有机溶剂来洗脱。

正相键合硅胶通过其键合基团展示了极性保留机理，但是也有一些二级相互作用发生在分析物与联接键合基团的烷基链之间。在这种情况下，更非极性的溶剂或极性—非极性混和溶剂可用来做洗脱溶剂。作为反相键合硅胶，硅胶基体与分析物之间的二级相互作用和阳离子交换作用也可能发生。

离子交换键合硅胶不仅能提供这种分析物与硅胶上部分非极性基团之间的非极性二级相互作用，而且还有分析物与硅胶基体之间的极性和阳离子交换作用。要从这些填料上洗脱分析物，一个准确的 pH 、离子强度和有机物的含量是必要的。

固相萃取中的 pH 影响

用在固相萃取中的溶液有很大 pH 范围的溶液有。硅胶作为基体原料，如高压液相色谱柱，通常稳定的 pH 范围是 2-7.5。当 pH 高于和低于这个范围，键合相就会水解和从硅胶上断链下来，或者硅胶本身溶解了。然而，在固相萃取中，常常溶液只与吸附剂接触较短的时间。实际上固相萃取管都是一次性使用，允许任何 pH 溶液以达到最佳保留和洗脱效果。如果固相萃取管对 pH 极限的稳定性非常重要时，聚合或碳键合固相萃取材料均可选用，如 ENVI-Chrom P 或 ENVI-Carb。这些材料在 1-14 pH 范围内都是稳定的。

对于键合硅胶上反相固相萃取过程，如果希望保留分析物，预处理的溶液和样品（基本上或全部为水溶液）的 pH 应调至最适宜分析物保留。如果，分析物是酸或碱性的，通常情况下，使用的 pH 应该阻止化合物带电荷。中性化合物（无酸性和碱性基团）的保留，一般不受 pH 影响。相反，也能调节 pH ，使样品中不需要的化合物保留在固相萃取的填料上，而分析物则不被保留而流出。在适当的 pH ，分析物的再次亲水性和阳离子交换作用则能被利用。

吸附剂（如 ENVI-Chrom P 和 ENVI-Carb）用于反相条件，则应选择 pH ，使分析物最大程度地保留在反相硅胶上。一般使用有机溶剂洗脱时，这一点上的 pH 无足轻重。令人吃惊的是，当溶液在中性 pH 条件下，苯酚可带电荷，它能更好的保留在 ENVI-Chrom P 上，而不是溶液在酸性 pH ，苯酚不带电荷的情况。这表明，相对键合硅胶吸附剂对某些化合物有不同的选择性。当使用这类填料时，应对样品和预处理溶液的 pH 范围有所研究。

对于键合硅胶或吸附剂上的正相固相萃取过程， pH 一般是无关重要的。因为在这些过程中所用的溶剂一般为非极性有机溶剂，而不是水。

离子交换固相萃取是如何保留化合物，很大程度上取决于样品和预处理溶液的 pH 。为了保留化合物，样品的 pH 应保证分析物和硅胶表面的官能团带上相反的电荷。

固相萃取的五个步骤

固相萃取过程要求样品以溶液形式存在，没有干扰，而且有足够的浓度以被检测。固相萃取的发展过程分为五步：

第一步 选择萃取管

1. 正相柱、反相柱、吸附柱：样品质量不超过填料质量的 5%。
2. LC-SAX 和 LC-SCX 柱：其吸附剂容量为 0.2 毫当量/克（1 毫当量=1 毫摩尔的 $[+1]$ 或 $[-1]$ 带电荷物质）。



3.LC-NH2 和 LC-WCX 柱：离子交换容量由应用决定。

样品基质是水溶液

弱阴离子和酸性：LC-SAX 或 LC-NH2

带电荷 强阴离子和酸性：要回收 LC-NH2，无回收 LC-SAX

弱阳离子和碱性：LC-SCX 或 LC-WCX

强阳离子和碱性：要回收 LC-WCX，无回收 LC-SCX

中性 用 LC-SAX、LC-SCX 除干扰物

样品基质是有机溶液

带电荷 试用反相或离子交换萃取

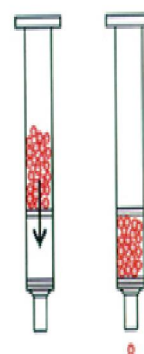
中 性 试用反相萃取

第二步 预处理萃取管

反相类型硅胶和非极性吸附剂介质，通常用水溶性有机溶剂，如甲醇，预处理。甲醇湿润吸附剂表面和渗透键合烷基相，以允许更有效地润湿硅胶表面。这些溶剂通常与洗脱剂一样是用于消除固相萃取管上的杂质对分析物的干扰，

正相类型固相萃取硅胶和极性吸附剂介质通常用样品所在的有机溶剂来预处理。

离子交换填料:对于非极性有机溶剂中的样品，用样品溶剂来预处理。对极性溶剂中的样品，用水溶性有机溶剂来预处理。为了使固相萃取填料从预处理到样品加入时都保持润湿，允许大约 1ml 的预处理溶剂在管过滤片上。

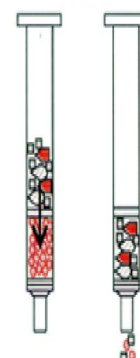


第三步 加入样品

当过量体积的水溶液被萃取时，反相硅胶填料渐渐减少预处理时所获得的溶剂化层。这就会降低萃取效率和样品的回收率。如果回收率较低或重现性不好，可能是分析物流失。

为使适当的化合物保留在填料上，洗脱或沉淀不要化合物，要调节 pH、盐的浓度和样品溶液在有机相中的含量。为了避免堵塞固相萃取管的过滤片，如果可能，在萃取之前预先过滤或离心样品。

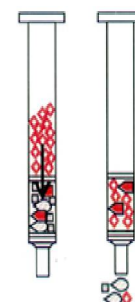
流速会影响某些化合物的保留。一般来说，对于离子交换固相萃取管，流速小应大于 2ml / min；对于其它上的固相萃取管，流速不应大于 5ml / min；如果时间不是一个确定因素的话，滴速最佳。



第四步 冲洗填料

若分析物被保留在填料上，用一种不能洗脱所要化合物的溶液，去冲洗掉不要的物质。冲洗液不超过一个管体积。

为消除不要的、可能保留很弱的物质，用比样品基质强，但其强度又不至于洗脱分析物的溶剂去冲洗填料。典型的溶液可含有比最后洗液少一点的有机或无机盐，也可以调节不同的 pH。与最后洗脱液完全不同极性的纯溶剂或溶剂混合物可为有用的洗脱液（见表 A）。



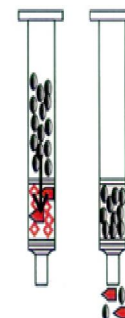
如果选用分析物不被保留在填料上的方案，则应用相当于一管体积的样品溶剂去洗脱管上的分析物。在这种情况下，冲洗是作为洗脱来完成萃取过程。

第五步 洗脱感兴趣的化合物

用少量能洗脱分析物的溶液去冲洗填料（一般 2ml-200 ml，取决于管的大小）用两次少量液体洗脱分析物比用一次大体积更有效，当洗脱液停留在料上为 20 秒到 1 分钟时，分析物的回收率最好。这一步滴速是最有利的。

- 对于反相、正相和离子交换过程，一般五步全都需要进行；
- 对于样品净化过程，只需要前三步，并且在第三步，分析物将随着样品从管内流出而收集，干扰杂质保留在吸附剂上。

表 A 常用溶剂的性质



正己烷	异辛烷	四氯化碳	三氯甲烷	二氯甲烷	四氢呋喃	乙醚	乙醚 乙脂	丙酮	乙氰	异丙醇	甲醇	水	醋酸
非极性性 → 极性													

样品的前处理

除了保证样品适当的 pH 值，您还应该考虑其它样品前处理的需要。以下部份描述了在使用固相萃取装置之前某些很难的样品应该怎样进行前处理。

土壤和沉积物:土壤和沉积物一般用中等极性到非极性溶剂通过索氏萃取或超声波处理萃取。萃取物使用正相萃取除去干扰物，再溶解在另一种溶剂之中。如果所分析化合物的萃取取决于 PH，土壤和沉积物样品在萃取和固相萃取净化之前，要将其均匀化。

植物组织、水果、蔬菜和谷类:植物组织、水果、蔬菜和农产品（如动物的食物及谷类），要用水、极性溶剂（如甲醇，乙氰）或水及这些溶剂的混合物来均匀化，用反相及离子交换使之净化。通过离心或过滤除去沉淀的蛋白质和固体后，样品的 pH 可能需要调节。样品也可能用中等极性到非极性溶剂均匀化，以用于正相固相萃取。同样，在用于固相萃取之前，样品可能需要离心或过滤。

食用肉类、鱼类和动物组织:食用肉类、鱼类和其它的动物组织要在水中均匀化，如用于反相和离子交换的样品，可能需要用酸（一般为盐酸或三氯乙酸）水解或降解食用肉类及组织、或者用碱（如氢氧化钠）皂化。样品接着可离心，取上层溶液用于正相固相萃取。

药片和其它药用固体样品:药片和其它药用固体样品应粉碎成细粉状，然后用水或适当的缓冲溶液萃取或均匀化，使用反相或离子交换固相萃取。中等极性到非极性溶剂用于正相净化过程。

血清、血浆、血液：血清和血浆样品不需要前处理即可用于固相萃取。然而，在很多情况下，分析物（如药物）可能结合在蛋白质上，它会降低固相萃取的回收率。为了破坏生物体内蛋白质的键合，在反相或离子交换萃取过程中，可选用以下方法之一：

- 用 0.1M 或更大浓度碱或酸调节 pH 至极限值（ $\text{pH} < 3$ 或 $\text{pH} > 9$ ）。用上层溶液做样品进行固相萃取。

- 用极性溶剂如乙腈、甲醇或丙酮沉淀蛋白质（通常用两份溶剂/一份生物体液），混合均匀和离心之后，移取上层溶液，用水或缓冲溶液稀释即可用于固相萃取。

- 为沉淀蛋白质，用酸或无机盐如甲酸、高卤酸、三卤乙酸、硫酸氨、硫酸钠或硫酸锌来处理生物体液。在用于固相萃取之前，上层溶液的 pH 可能需要调节。

- 生物体液超声波处理 15 分钟，加入水和缓冲溶液，离心，上层溶液用于固相萃取。

尿：对于反相或离子交换固相萃取，尿样品不需要前处理，但样品加入前，经常需用水或有适当 pH 的缓冲溶液稀释。但某些情况下，酸水解（对碱性化合物）或碱水解（对酸性化合物）用来保证所分析的化合物在尿样品中自由溶剂化。通常将一个强酸（如浓盐酸）或碱（如 10M 氢氧化钾）加入尿中。加热尿样 15-20 分钟，然后冷却，用缓冲液稀释，调至适当的 pH 即可用于固相萃取。也可用酶水解来释放被结合的化合物或药物。

细胞培养介质：细胞培养介质不用处理即刻使用。某些方法可能需要用水或有适当 pH 的缓冲溶液稀释其介质，以保证分析物在样品中自由溶剂化。如果细胞培养介质含有满载颗粒，是很难通过固相萃取装置。在用于固相萃取之前，它可能需要摇动和离心。大部分细胞培养介质的固相萃取使用反相和离子交换方法。

牛奶：一般牛奶使用反相和离子交换固相萃取条件。样品可能要用水和水/极性溶剂混合物（如甲醇，大约至 50%）稀释。某些过程需要用酸处理来沉淀蛋白质（典型的盐酸、硫酸、三卤乙酸）。沉淀以后，样品要离心，上层溶液即用于固相萃取。

水样品：饮用水、地下水及污水只要不含大量固体颗粒，可直接用于同相萃取。地下水及污水在使用固相萃取之前可能需要过滤，如果所分析的化合物被结合在被遗弃的颗粒上，过滤会降低其回收率。如有可能尽量不过滤样品，让未过滤样品直接通过固相萃取装置，在洗脱过程中，让溶剂通过在吸附剂之上的颗粒，这将提高回收率。因为用这种方法，被结合在颗粒上的要分析化合物将得到回收。在很多情况下，水样品使用反相或离子交换固相萃取。

酒、啤酒、液体饮料：在反相或离子交换条件下，液体和酒精饮料不用处理就可用于固相萃取。对反相萃取，如酒精含量很高，需要用水或缓冲溶液稀释到酒精含量小于 10%；如果有固体在样品之中，在用于固相萃取之前，有必要离心或过滤样品。

水果汁：水果汁一般不用前处理或离心既可用于固相萃取。如果离心，上层溶液用于固相萃取。粘性果汁可能需要用水或有适当 pH 的缓冲溶液来稀释。

药用液体样品：因为液体药品主要是水溶液，这类样品使用反相或离子交换固相萃取。如果样品具有粘性，必须用水或有适当的缓冲溶液来稀释。样品的有机萃取物可能要用正相固相萃取。

油类：碳氢或脂肪油通常是在正相萃取条件下分析的，因为它们不能用水稀释。

稀释溶剂常选用中等极性到非极性溶剂，如正己烷和卤化剂。稀释的样品通过正相键合硅胶或吸附剂，样品在通过时被收集。所分析的化合物通过而不被保留，杂质则被保留在吸附剂上。如果分析物被保留在填料之上，不断地用增加溶剂的极性或用极性稀释混合物冲洗固相萃取填料，直到分析物回收到某一流份之中。为收集水样品中的油，使用反相同相萃取。

固相萃取的应用优势

在什么项目的前处理适合使用固相萃取技术，即用固相萃取会比普通的溶剂萃取更理想，个人认为有以下几种情况：

（一）水中有机物的前处理。

此类常规处理基本上是用与水不相溶的有机溶剂振荡萃取，用固相萃取的优势在于

（1）可以定量地重复前处理过程。

溶剂振荡的操作一般只能要求到控制时间的程度，却无法控制振荡频率，强度，动作，我们知道，每个人的振荡动作是不同的，就是同一个人，也很难保证始终划一的动作。所以说，溶液萃取的动作是不定量，不能重复的。

而在应用固相萃取时，比较容易保持过柱和洗脱速度的均一和稳定，因此，固相萃取的萃取过程是可以重复，可定量的。

（2）现场处理。

水中有机物的分析有一个长期困扰我们的瓶颈。即有机物在池塘水库等环境中能保持相对稳定，但是一旦进入采样瓶这个小环境中，就会迅速发生变化，所以很多水的有机物分析方法要求即采即分析，最多不能超过 4 个小时，可一般的情况是，从取水回到实验室的时间就远远不止 4 小时了，样品发生了变化，分析结果的可靠性可想而知。

如果引入固相萃取技术，由于其设备简单，体积小，易于携带，完全可以做到在现场一边采样，一边进行前处理。采样者带回实验室的是固相萃取柱，而不是水样。这样就能保证我们处理的是真正成份稳定的水样。

从实际应用来说，在水的检测中用固相萃取技术取代传统液液萃取还有相当的工作需要摸索，目前尚不能完全取代，但是其发展的前景很值得看好。

（3）有机试剂消耗量的减少。

在处理水样时，如果用固相萃取，则只需要在洗脱时用到有机溶剂，用量比传统液液萃取要少数十倍以上。对于实验者的人身保护和环境保护有着积极的意义。

（二）批量生物材料的药物成分萃取

这是固相萃取在实际应用中比较成功的范例，主要是指在医院中检测血样和尿样时的前处理工作，由于对药物成份的吸附是固相萃取的优势，加上样品单一，组成固定，在确定方法后很适合大规模批量的净化操作。

（三）免疫亲和固相萃取。

萃取的理想状态就是特异性富集或特异性排斥，可是不论是溶液萃取还是固相萃取，基本上是相似相溶的，最多做到“某一类”层次上的萃取，而无法达到“某一种”层次的萃取。

在固相萃取柱的基础上加上免疫亲和技术，可以利用其生物特异性选择吸附，能够达到近于理论的完美萃取。

实际困难在于虽然其概念很好，但是由于技术难度相对较高，可供应用的更少。

三、固相萃取的应用局限性

(1) 样品局限性

固相萃取不适于处理固体样品。对于固体，必须将其先制备为液体形态才能进行固相萃取操作，这一点就远不如液体萃取了。

即使是液体样品，固相萃取也有其额外的苛刻要求，即液体必须洁净度高，不能有悬浮物或其它固体颗粒，否则会在柱前形成堵塞，无法继续过柱及洗脱操作。所以固体样品要制备成液体，液体样品最好还要过滤。相比来说，溶剂萃取就不存在这个麻烦，稍脏点也影响不大。

(2) 结构局限性

固相萃取柱的结构很简单，除了塑料管，只有筛板和填料了。就这简单的结构，带来了便利，也带来了与生俱来的矛盾，一些我们在用溶剂萃取时永远不会遇到的矛盾。

矛盾 1 液面的问题。

当我们进行活化、净化，洗脱等典型的固相萃取操作时，会使用不同溶剂，这时的操作要求在液面下降到筛板时换加不同溶剂，加得太晚，会使填料中干涸产生气泡，影响结果的稳定性（甚至会因为溶液的张力问题而使液面无法下降）。相反，如果加得太晚，会使加入溶液和在筛板上的原有溶液混合，产生一个其实是我们不希望存在的、无法预料极性的新洗脱液，使结果的可靠性大打折扣。

加液加到筛板，说得容易做起来难，如果单独做一个样品可以紧盯液面操作。但是在批量操作时只会顾此失彼，固相萃取技术实用的一个重要意义就在于，其可以方便可靠地批量处理样品，如果这个意义削弱的话，其实用性也就大大降低。

液面问题是制约固相萃取应用成功的主要瓶颈，虽隐蔽却无法回避。

解决的方法有两种。

第一种解决方法是干脆不用理会液面的困扰，每次都做到抽空溶液，这种做法倒是不会产生筛板上的溶液混合的问题，但是又会出现一个新的问题，即填料看起来是抽干了，但实际表面还是有数量不定的液体，每次干涸程度不一致，也无法重复。

另一种解决方法就是在使用固相萃取器时用电导探针测试，这个方法比较精确，但是也有一个新的问题，探针需要一个清洗过程，否则会有交叉污染的可能，而且这类装置的固相萃取器价格一般相当地昂贵。且一个探针在同一时间只能探测一个样品管，要同时监测一批小柱则很困难。

矛盾 2 填料的装填松紧问题。

用液体萃取时我们从来不用考虑整个溶剂的密度是否均匀，但是对于固体填料，我们却不能忽略这个问题。在同一批次甚至同一包里的几个小柱，加上相同溶液时，我们会发现液体过柱的速度是不均匀的，总是有快有慢。

由于生产工艺和成本的综合考虑，固相萃取小柱不可能采用类似填充液相色谱柱的匀浆高压法，所以填料的装填松紧不均匀是必然的。这就造成一个问题，由于液体流过的速度不一样，在每次加液的时间也会不一样，不利于同步批次处理样品。而且回收率也会不同。看过一些公司的所谓全自动固相萃取器，其原理都有一个假设，即每根小柱的流过速度应该一致，可惜，这真的是假设——“假”的“设”想。

矛盾 3 填料的质量稳定问题

在我们开启一瓶二氯甲烷或丙酮时，只要买的不是伪劣产品，就是不同公司的也可以放心使用，因为它们的萃取性能是稳定可靠的。而固相萃取则不同，就

是同一公司的正品填料,每次的产品性质还是有些许差异,不同公司的相差更大。而如果换一家公司的固相萃取柱或同一公司不同批次的小柱,都需要我们把所有的项目做一遍质量评估,那估计也没有太多人愿意使用。

矛盾 4 不能加热

一般的加热行为可以改善吸附作用,可是由于固相萃取柱的套管是由塑料制造的,一加热就会变形,所以只能做常温操作。

(3) 项目局限性

从各家供应商提供的资料来看,做得比较好的应用主要在处理药物方面,即分子量比较大,性质比较稳定的那些物质。液体萃取的相似相溶理论已经久经考验,而固相萃取靠的是吸附与洗脱,已经完全不是经典的萃取过程了,并不是所有的项目都适合用。很多经典的液体萃取实验到现在也不能转化到固相萃取,即使转化,效果也不理想。

四、应用固相萃取技术时的注意事项。

1. 尽量慢。

我们在用固相萃取时,面临的一个问题就是:液体应该以什么速率过柱流出,我的经验是,要想效果好,就要慢,尽量慢。

对于固相萃取柱中的填料,我们如果局部放大地看,能够看到其实它们是有很多的空隙,液体流通的渠道很多,如果流得快,相当比例的待测组分还来不及与填料充分作用就地从通道流失;所以要慢,给它们一个充分作用的机会。

如何慢呢?一个窍门就是不要用配合抽气机使用的所谓固相萃取器,而采用再普通不过的重力法。利用重力的作用使液体向下流出。在实验速度上,重力法远不如吸力法,但是在实验效果方面,重力法远比吸力法优胜,用吸力法只能得到谱带吸附,用重力法却能得到柱头吸附,在速度和效果两者的平衡中,我们还是倾向于优先保证好的效果。

举例来说,一个 3 ml 500mg 的 C18 小柱,如果加甲醇活化,其甲醇全部流至筛板时间约为 20 分钟,而在过样品液时,25ml 的液体最多 2 小时可以流完,而且用重力法如果得当,工作速率不一定比吸力法差很多。因为我们可以充分利用空闲时间,用吸力法必须有人在旁边守候,而重力法由于不需要用电,可以充分利用午休和晚上时间过柱,液体量大时接个堆叠接头和延长管即可,安排好实验步骤,工作效率一样很高。另外,重力法不需要抽气机和固相萃取器。

2. 尽量少。

在固相萃取条件选择上,有人为了提高提取效率,尽量多加液体,或选择填料量大的小柱,我觉得大可不必如此。尤其在用重力法时,由于效率高,很多情况下是柱头吸附,并不是所有的填料都在起作用,填料多了不仅液体流出速度会更慢,而且在洗脱时的扩散会很明显。

因此建议,够用就行,在能保证效率时,填料尽量少,加液也不宜多。

3. 实验条件不宜过分细化。

固相萃取从原理上是色谱分离,但是在操作时最好只把它作为吸附萃取剂使用,由于填料性质、松紧常有差异,因此在实际实验中不必因为追求效果的最佳化而设计出很复杂的洗脱程序。

在建立条件中,我们应该尽量多利用现成的资料,尽快地建立起体系,同时要对操作过于复杂的步骤保持警惕性,在实验效果,实验速率和易操作性三者中取得平衡点。

4. 只用一次

固相萃取柱最好只用一次。因为从严格的意义上来说,很多物质的吸附是不可逆的,一次吸附,无法洗脱,影响着下一次吸附,虽然有人做过重复利用的实验,但是总体来说为了节省一点经费而大大增加了结果的不可靠性和不确定性,是很不合算的行为。

因此建议,只用一次。如果想节省经费可以从减少填料量和使用小容积管入手,尽量用堆叠接头和延长管。

5.慎用固相萃取器

所有的供应商都会在推荐固相萃取柱的同时,推销固相萃取器,最简单的固相萃取器也要几千,如果贴个进口商标价格更要加几倍,这样的价格还不包括抽气机。但是这样的配置就是再加上调速开关,也很难得到好的结果,主要问题就是把小柱的不平行性放大了。

建议:实在不适合重力法的才用固相萃取器。

至于全自动固相萃取器,应该说,现在市面上还没有比较理想、适合食品检测的机器,主要问题就是无法解决一批小柱中液面下降不一致的问题,加上价格很昂贵,性价比也自然不高。带液面测量的也不能对多批量的小柱同时检测,且有交叉污染的危险。

目前的全自动固相萃取器基本上是走重力法路线,倒是回避了密封的难题。

6.不可忽视传统的液体萃取。

有些人在初次接触固相萃取时,总觉得它能取代液体萃取,实际上就象毛细管电泳无法取代液相色谱一样。固相萃取在某些场合比液体萃取合适,但是在更多情况下,还是传统的液体萃取更可靠更合适。这一点从目前实验技术的实际发展可以得到印证。

关于液固萃取,我们不要仅仅把它看作是一个提取过程,从另一个角度来看,它还 是一个净化过程,是把固形干扰物排除净化的过程。理解这一点,有助于我们优化选择实验方法。

7.实用性是实验设计成功与否的最终准绳

在设计一个实验时,开始要考虑到其技术上是否先进。而在实际运用中,最终决定这个方法是否可行,是否能够存在的关键是实用性。一个实验方法不仅要解决问题,而且能够在人力,物力,财力三方面达到平衡,且满足可持续、可重复操作的要求。

因此,再先进的技术,也要服从实用性,否则就没有生命力。

五.举例点评 2003 版新国标的固相萃取技术运用。

2003 版的“食品卫生检测方法 理化部分”的色谱实验部分,相对于 1996 年的版本,它引入了一些新的技术,主要是普遍采用了仪器法。进步虽然明显,可错误依然很多,有些甚至是一脉相承。尤其是某些新引入的国标,只能让人无比感慨标准批准机构的宽容与勇敢。

虽然在 2003 版国标中大范围地引入了固相萃取技术,但是如果直接套用书中的方法,其实用性相当低。下面以农药检测中(详见表 1)最常用的佛罗里硅土举例,讲解新国标应用固相萃取技术的主要问题和解决方法。

新国标中对于佛罗里硅土的处理从头到尾如出一辙:“在 650℃下活化 4 - 5 小时,临用前用 3%的水去活化。再取一支玻璃层析管,上下各装 1.5 厘米高的无水硫酸钠,中间加入 10 克处理后的佛罗里硅土”,最后都是淋洗和浓缩的步骤。以上的步骤看起来很清晰,但是可操作性却很差,具体分析成以下几个方面。

(1)“在 650℃下活化 4 - 5 小时”。高温活化的过程虽然是 5 个小时,但是

马弗炉从 650 降到室温就需要 10 小时以上，所以光活化就是一整天的时间。

(2) “临用前用 3% 的水去活化”。由于处理后的佛罗里硅土吸附性太强，所以要加入水来灭活，3% 的概念是指按照佛罗里硅土重量的 3% 加入水量，但是谁也无法保证加入的水是均匀的，这是一个结果平行的隐患。

(3) “装入玻璃层析管”，应该注意到这是一个在实验前才能做的工作，而不能将材料做好后储备起来。

(4) “淋洗和浓缩”，这是实用性最差的阶段。一般的淋洗后体积为 100ml，而浓缩后的体积要求一般在 2ml 左右。这样就需要用到旋转蒸发器，而我们知道，旋转蒸发器的工作效率是很低的。

从以上 4 点可以看到，这一系列操作的问题在于所有的材料均要在临实验前手工装备完成，而且还要经过耗时耗力的浓缩过程。如果这是在一个科研机构开发方法，或一天只处理一个样品则是勉强可行，但是对于我们这样的基层检验机构则是完全不现实的。

要解决以上的问题，方法就是首先要利用现成的、可长期保存的商品柱代替手工装填柱，其次要尽量避免大体积的浓缩过程。

商品的佛罗里硅土柱各家公司均有售，个人推荐使用的规格为 3ml, 500mg，至于品牌选择，一定要买大公司的独立包装柱。我曾经买过一小品牌的效果很差。佛罗里硅土的填料其实很普通，关键在于厂家在制造前是否经过严格的烧烤过程。

由于使用商品柱，所以加 3% 的水去活化变成一件不可能的事情，但是据我的实际操作经验，完全可以利用样品本身去活化，所以这一步骤是可以去除的。至于“淋洗和浓缩”步骤，我建议不一定要非全部洗脱出来再浓缩定容才能保证准确的值，在淋洗曲线的某一点，洗脱出的溶液浓度会正好与实际样品液浓度会一致，只要能控制在某一点的洗脱液接收，完全可以避免复杂的浓缩过程，这一点，对于那些本身就对热不稳定的项目是更加重要。

例如 GB/T 5009.146-2003“植物性仪器中有机氯和拟除虫菊酯类农药多种残留的测定”，要求在手工填装的佛罗里硅土柱加入 2 ml 石油醚试液，再用 100ml 石油醚+乙酸乙酯 (95+5) 后洗脱，最后将 100ml 浓缩至 1ml 后测定。而通过上述所提的淋洗曲线，会发现在首 2ml 淋洗液是无待测物洗脱，第 2 - 3ml 是比实际值高一倍的洗脱液，第 3 - 5ml 的洗脱液则与实际样液浓度一致，所以可以直接取第 3 - 5ml 的洗脱液测定，而不用经过一个全部洗脱后再浓缩的过程。

这样，我们就可以提出以下的“实用版”植物性食品中有机氯和拟除虫菊酯类的前处理步骤：

1. 取干燥样品 5.0 克于 250ml 碘量瓶中，加石油醚 50ml，放在振荡机上振荡 30 分钟。（如果是含水分样品，则先加入适量无水硫酸钠混合，等其脱水后再同上处理）。
2. 用三角漏斗过滤，收集滤液（滤液可轻度浓缩）。固定竖立净化柱，净化柱上接堆叠接头，上接 24ml 空管。
3. 加全部滤液进入空管内，过柱。
4. 等滤液全部从柱底端流完后，加入 3ml 石油醚+乙酸乙酯 (95+5)，洗脱液放弃，整个过程小柱加盖，防止挥发。
5. 第一次加入的洗脱液流完后，再加入 3ml 石油醚+乙酸乙酯 (95+5)，在小柱底端收集洗脱液）
6. 进样。

表 1 从“食品卫生检测方法 理化部分(二)”中农药项目部分摘录的表格

页数	项目名称	填料种类
47	氯氰菊酯	三氧化二铝
75	三环唑	三氧化二铝
364	丁草胺	三氧化二铝
341	有机磷多组份	凝胶渗透(GPC)
347	有机氯和拟除虫菊酯	凝胶渗透(GPC)
359	氨基甲酸酯	凝胶渗透(GPC)
23	百菌清	佛罗里硅土
29	二氯苯醚菊酯	佛罗里硅土
41	水胺硫磷	佛罗里硅土
59	喹硫磷	佛罗里硅土
127	三唑酮	佛罗里硅土
145	佛磺胺草醚	佛罗里硅土
155	莠去津	佛罗里硅土
161	绿麦隆	佛罗里硅土
166	禾草敌	佛罗里硅土
173	灭幼脲	佛罗里硅土
179	五氯硝基苯	佛罗里硅土
217	吡佛禾草灵	佛罗里硅土
230	甲基异柳磷	佛罗里硅土
239	有机氯和拟除虫菊酯	佛罗里硅土
247	除虫脲	佛罗里硅土
297	稻瘟灵	佛罗里硅土
369	2,4-滴丁酯	佛罗里硅土
420	佛乐灵	佛罗里硅土
427	噻螨酮	佛罗里硅土
431	异丙甲草胺	佛罗里硅土
437	2,4-滴	佛罗里硅土
447	敌稗	佛罗里硅土
465	恶草酮	佛罗里硅土

1.样品前处理的重要性

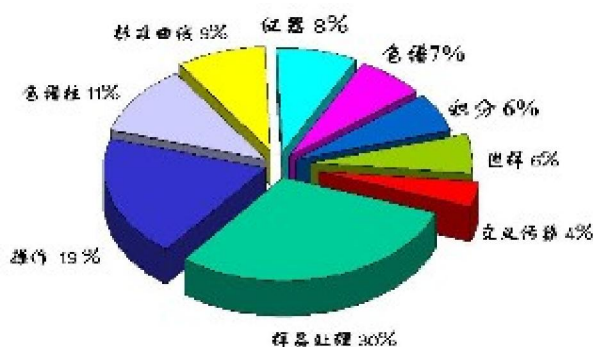
无论是对样品的化学分析还是在生物工程中，样品的分离、纯化都是必不可少的前处理步骤。样品前处理的好坏将直接影响最后的结果。

根据 LC-GC Int.杂志对世界 1000 多个实验室进行的统计，样品前处理所花费的时间占整个分析过程的 61%现代的自动化分析仪器使分析工作趋向简单、快速。然而，许多拥有现代化分析仪器的实验室却依然使用着古老、繁琐的样品前处理方法。样品前处理已经成为现代分析中的瓶颈，严重阻碍了分析工作的进行。因此，要提高效率，就必须解决样品前处理的问题。



(来源：LC-GC Intl. 1991, 4(2): 10)

根据同一份统计报告可以看到在整个色谱分析的过程中,样品前处理产生的误差最大,高达 30%,如果再加上操作误差,人为的因素占了误差来源的近 50% 换句话说,如果我们能够解决人为因素造成的误差,分析误差产生的几率就降低了一半。



(来源：LC-GC Intl. 1991, 4(2): 10)

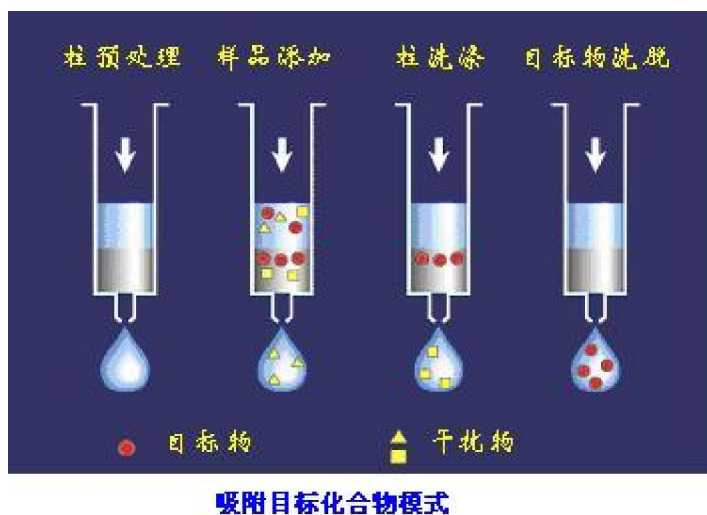
不同的检测手段对样品前处理的要求也不相同。其主要目的大都在于：

- 1.将目标化合物从基质中分离出来；
- 2.尽可能地除去对目标化合物的分析有干扰的组分；
- 3.尽可能地除去对分析仪器造成伤害的物质；
- 4.对目标化合物进行浓缩以达到分析仪器的检测下限；
- 5.调整样品的 pH 值、离子强度以满足分析仪器检测要求。

2.固相萃取基本原理

2.1 吸附目标化合物模式

在吸附目标化合物模式中，SPE 柱对目标化合物的吸附力大于样品基液。如下图所示，当样品通过 SPE 柱时，目标化合物被吸附在固体填料表面，其它大部分的样品组份则随基质通过柱子。目标化合物可用适当溶剂洗脱下来。为了方便起见，我们将这种萃取模式称为“吸附目标化合物模式”或“目标化合物吸附模式”在这种萃取模式中，SPE 柱在吸附目标化合物的同时，可能也会吸附一些对分析有影响的干扰物。因此，在对目标化合物进行洗脱之前，要对 SPE 柱进行洗涤，最大限度地清除这些干扰物。



如上图所示，吸附目标化合物模式可以分为以下几个步骤：

SPE 柱预处理（弃去过柱液体）

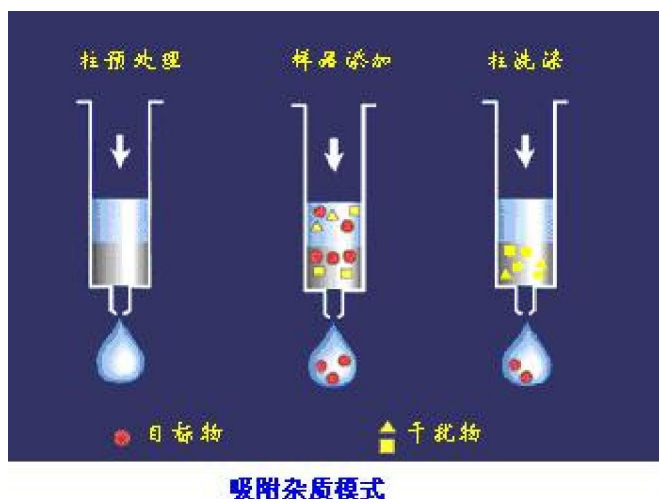
样品过 SPE 柱（弃去过柱液体）

SPE 柱洗涤及干燥（弃去过柱液体）

目标化合物洗脱（收集过柱液体）

2.2 吸附杂质模式

在固相萃取过程中，当样品通过 SPE 柱时，SPE 柱吸附样品中的杂质，而目标化合物随样品基质通过 SPE 柱。我们称之为“吸附杂质模式”或“杂质吸附模式”，这种模式多用于样品净化。在这种萃取模式中，样品过柱后的组分和柱洗涤的组分要一并收集。与目标化合物吸附模式不同，杂质吸附模式中的柱洗涤是要将残留在 SPE 柱上的目标化合物洗脱下来，而将杂质保留在 SPE 柱上。



如上图所示，在吸附杂质模式中可以分为以下几个步骤：

SPE 柱预处理（弃去过柱液体）

样品过 SPE 柱（收集过柱液体）

SPE 柱洗涤（收集过柱液体至上述收集液体的试管中）

3.固相萃取中的主要作用力

3.1 固相萃取中的非极性作用力

固相萃取中的非极性作用力产生于固相萃取材料功能团上的碳氢键与样品中化合物的碳氢键之间。这种作用力既为人们所熟悉的范德华引力或散射力。由于有机分子或多或少都存在这种非极性结构，非极性作用力常常被用于从样品基质中吸附分离具有非极性结构的化合物。

使用最多的非极性 SPE 柱是具由十八个碳组成的碳链官能团，俗称为 C18 柱。由于 C18 材料在液相色谱中广泛使用，所以人们对其性能也较为了解，在 SPE 中也大量使用。一般说来，非极性 SPE 柱通用性比较好。所以比较适合用于同时萃取多种不同化学性质的化合物。但其选择性则比极性或离子交换作用力差。

通常，非极性 SPE 柱较适用于从极性基质中萃取分离非极性及中极性的目标化合物。

对于通过非极性作用力吸附在非极性 SPE 柱上的目标化合物，可以用具有非极性性质的溶剂洗脱，如氯仿、环己烷等。即便是极性较强的甲醇对于许多化合物来说也具有足够的非极性作用力将其洗脱。

3.2 固相萃取中的极性作用力

固相萃取中的极性作用力在许多固相萃取材料官能团及样品中的化合物都可以发生。极性作用力包括：氢键、偶极力/偶极力、诱导偶极力、 π - π 等。如：羟基、氨基、巯基、羰基、芳香环及含氧、氮、硫、磷等杂原子的基团。其中氢键是最常见的极性作用力。

非极性的基质环境有利于吸附剂和目标化合物之间的极性作用力；极性环境有利于破坏吸附剂和目标化合物之间的极性作用力；环境离子强度大也不利于吸附剂和分析物之间的极性作用力。

值得指出的是所有以键合硅胶为材料的 SPE 柱，由于键合硅胶本身具有一定数量的没有键合的 $-OH$ 基团（没有封尾），所以都具有极性。这种极性功能在非极性溶剂中最明显。

在极性萃取中常用的洗脱溶剂有：甲醇、水、THF、异丙醇、乙酸、乙腈、丙酮、胺类、高离子强度缓冲液或上述溶液的混合液。

3.3 固相萃取中的离子作用力

离子作用力发生在带相反电荷的样品化合物与 SPE 填料官能团之间。对有机化合物而言，能够产生离子交换作用的化合物官能团有两类：

- 1.可生成阳离子的官能团（带正电荷）
- 2.可生成阴离子的官能团（带负电荷）

常见阳离子的官能团包括：伯，仲，叔，丁胺类。

常见阴离子的官能团包括：羧基，磺酸基，磷酸基等。

要正确使用离子交换柱进行固相萃取，必须注意控制萃取环境。为了有效地利用离子交换机理将目标化合物吸附在固相柱上，必须满足以下两个条件：

1. 环境的 pH 必需使分析物和吸附剂带相反电荷
2. 环境不能含有高浓度带有和分析物相同电荷的竞争化合物

在实际操作中为了确保目标化合物及 SPE 填料官能团能够 99%以上带电或呈中性（不带电），可以根据目标化合物及 SPE 填料官能团的 pK_a 来决定。

要用阴离子交换剂将可生成阴离子的弱酸性化合物 99% 吸附, 目标化合物所处环境体系的 pH 值要高于该目标化合物的 pKa 两个 pH 单位。要使 99% 目标化合物脱附, 则环境体系的 pH 值必须低于该化合物的 pKa 两个 pH 单位。

反之, 要用阳离子交换剂将可生成阳离子的弱碱性化合物 99% 吸附, 环境体系的 pH 值必须低于该化合物的 pKa 两个 pH 单位。要使 99% 该化合物脱附, 体系环境的 pH 值必须高于该化合物的 pKa 两个 pH 单位。

在应用离子交换作用力进行 SPE 萃取时还必须考虑离子强度和选择性。一般说来, 低离子强度有利于分析物的吸附, 高离子强度有利于分析物的脱附。离子交换剂选择性的强弱取决于其功能团的性质。如: 对柠檬酸阴离子而言, 季胺(强阴离子交换剂)就优于醋酸根阴离子的 250 倍。因此, 用醋酸根阴离子溶液处理的季胺吸附剂对分析物的吸附力远比用柠檬酸阴离子溶液处理的季胺吸附剂强。反之, 柠檬酸阴离子溶液是一个好的洗脱剂。

在应用离子交换 SPE 萃取时, 了解目标化合物的 pKa 对于调节样品的 pH 值十分重要。但是由于种种原因, 常常不知道其 pKa。这就给实验带来了一定的盲目性。在这种情况下, 我们可以参考官能团的 pKa 值来调节样品的 pH。由于同一官能团在不同分子中所处的位置不同, 化合物的立体结构也不同, 官能团的 pKa 值与含有该官能团的化合物的 pKa 值是有所差异的。

在阴离子交换萃取中, 目标化合物可以通过以下五种方式进行洗脱:

1. pH 高于填料官能团 pKa 两个 pH 单位的缓冲溶液。在该 pH 条件下, 阴离子交换剂的官能团呈中性。
2. pH 低于带有阴离子官能团的目标化合物两个 pH 单位的缓冲液。在该 pH 条件下, 目标化合物的阴离子官能团呈中性。
3. 高离子强度缓冲溶液 ($>0.1\text{ M}$)。缓冲溶液中的高强度阴离子高阴离子浓度会导致阴离子与目标化合物产生竞争, 将目标化合物释放出来。
4. 洗脱液为含有高选择性的阴离子。由于这些阴离子对吸附剂阴离子交换官能团具有很高的吸引力, 可以将目标化合物从阴离子交换柱上交换出来, 从而达到洗脱分离的目的。
5. 上述几种方法的结合使用也可以达到洗脱阴离子目标化合物的目的。

在阳离子交换萃取中, 洗脱溶剂的选择原则与阴离子交换柱相反:

1. 洗脱溶剂的 pH 低于吸附剂的阳离子交换官能团 pKa 两个 pH 单位。这样就可以使该官能团呈中性, 将目标化合物释放出来。
2. 洗脱溶剂的 pH 高于目标化合物 pKa 两个 pH 单位。在此条件下, 目标化合物呈中性状态, 与吸附剂阳离子官能团分离, 被洗脱溶剂洗脱出来。常常可以在甲醇中加入氢氧化钠、氢氧化钾或氨水来实现 pH 的调节及目标化合物的洗脱。如果需要降低洗脱馏分中水的含量, 则可以在有机溶剂中加入 1%~2% 的有机胺来实现这种洗脱。
3. 洗脱溶剂为高阳离子强度 ($>0.1\text{ mol/L}$) 的缓冲溶液。高阳离子浓度会导致阴阳离子与目标化合物产生竞争, 将目标化合物释放出来。
4. 洗脱液为含有高选择性的阳离子。由于这些阳离子具有对填料阳离子官能团具有很高的吸引力, 可以将目标化合物从阳离子交换柱上交换出来, 从而达到洗脱分离的目的。
5. 上述几种方法的结合使用也可以达到洗脱阳离子目标化合物的目的。

3.4 固相萃取中的多种作用力

在固相萃取中常见的多种作用力有两类。一类是固相萃取材料本身所具有

的，如以键合硅胶为基质的固相萃取材料；另一类是人为引入的，如混合型 SPE 柱。有关混合型 SPE 柱请参阅相关资料。

必需强调，几乎全部的键合硅胶都存在多于一种以上的作用力。因此，在考虑固相萃取方法时应该综合考虑各种作用力对萃取过程的影响。

键合硅胶柱存在的付作用力对于目标化合物的萃取有时是不利的，应该尽量避免。但这种副作用力有时是有利的，应该充分利用。

常见键合硅胶 SPE 柱多种作用力

功能团	非极性	极性	阴离子交换	阳离子交换
C18	●	○		⊗
C8	●	○		⊗
C2	●	●		⊗
CH	●	○		⊗
PH	●	○		⊗
CN	●	●		⊗
2OH	●	●		⊗
SI		●		⊗
NH2	○	●	●	⊗
PSA	○	●	●	⊗
DEA	○	●	●	⊗
SAX	○	○	●	⊗
CBA	○	○		●
PRS	○	○		●
SCX	●	○		●

- — 主作用力

○ — 第二作用力

⊗ — 活性硅醇基

C18 — 十八烷基 (Octadecyl)

C8 — 辛烷基 (Octyl)

C2 — 乙烷基 (Ethyl)

CH — 环己基 (Cyclohexyl H-form)

PH — 苯基 (Phenyl)

CN — 氰基 (CN)

基 (Propylbenzenesulfonyl, H- form)
- 2OH — 二醇基 (Diol)

SI — 未键合硅醇基

NH2 — 丙氨基 (Aminopropyl)

PSA — 一元 / 二元氨基 -

DEA — 二乙基丙氨 (Diethylaminopropyl)

SAX — 三甲基丙基

CBA — 甲羧酸基 (Carboxymethyl,

PRS — 丙磺酸基 (Sulfonylpropyl, Na-form)

CX — 苯丙磺酸

4.固相萃取材料

4.1 键合硅胶固相萃取材料

C18

主要官能团：十八烷基 (Octadecyl); C18 主要作用力是非极性，第二作用力是极性、阳离子交换。

C18 是十分常用的非极性材料。在所有反相硅胶填料中，C18 的非极性吸附能力最强。强非极性化合物被 C18 吸附后很难洗脱。C18 难吸附非常极性的分子，如碳水化合物（Carbohydrates）等。

通常 C18 被当作最没有选择性的填料，因为绝大多数有机分子或多或少含有非极性基团，C18 可以从水溶液中吸附这些有机化合物。因此，C18 对于同时分离不同结构的化合物时较为适用。由于 C18 的选择性较低，其最终萃取物往往没有其他选择性高的填料。C18 是优秀的除盐 SPE 柱，因为样品中的盐在 C18 柱上没有保留。C18 的极性副作用力比其他 SPE 填料低许多。主要是碳链较长的原因。

C8

主要官能团：辛基（Octyl）；主要作用力是非极性，第二作用力是极性、阳离子交换。

C8 的性质与 C18 十分相近，但对非极性化合物的吸附能力没有 C18 强，因为 C8 的碳链相对较短。正因为如此，对于一些在 C18 上吸附太强难以洗脱的化合物，可以用 C8 来取代。C8 的极性作用力比 C18 要强。因为 C8 的碳链较短不能覆盖硅胶的表面。尽管如此，极性作用力依然不是 C8 的主要作用力。

C2

主要官能团：乙基（Ethyl）；主要作用力是非极性、极性，第二作用力是阳离子交换。

因为 C2 的碳链十分短，使得硅胶上的硅烷醇（Si-OH）较为暴露在填料表面。这使得 C2 具有相当显著的极性特点。通常在实际应用中，如果目标物在 C18 或 C8 上吸附作用太强，可用 C2 来取代。C2 的极性作用力比 CN 要略为强些。

CH

主要官能团：环己基（Cyclohexyl）；主要作用力是非极性，第二作用力是极性、阳离子交换。

环己基是中等极性的 SPE 填料。对特定的化合物有相当的选择性。当作为非极性填料使用时，CH 基的极性与 C2 大致相同。在用 CH 柱从水溶液中分离苯酚这类极性化合物时，CH 填料表面的极性特性显得十分重要。由于 CH 基的这种选择性，当 C18、C8、C2 不能选择性地吸附目标化合物时，可以考虑使用 CH。

PH

主要官能团：苯基（Phenyl）；主要作用力是非极性，第二作用力是极性、阳离子交换。

苯基在非极性萃取是十分常用的填料。其极性与 C8 相当。由于苯环的电子云作用，PH 基与 CH 基相同，具有一定的选择性。

CN

主要功能团：氰丙基（Cyanopropyl）；主要作用力是非极性，极性，第二作用力是阳离子交换。

氰丙基是常用的中等极性填料。当目标化合物在 C18、C8 的吸附是不可逆时，改用 CN 基填料较为有效。另一方面，当使用极性填料（如 Si 或 2OH 时）发现目标化合物的吸附是不可逆时，也可以用 CN 基填料取代极性填料。

2OH

主要官能团：二醇基（Diol）；主要作用力是极性，非极性，第二作用力是阴离子交换。

二醇基是具有相当极性的填料，特别适用于从非极性溶剂中萃取极性化合物。二醇基十分相似于未键合的 Si-OH 能够与化合物形成较强的氢键。与硅胶类似，二醇基能够分离结构相似的化合物，如异构体。由于二醇基具有碳氢链结构，所以也有相当的非极性吸附功能。如从极性的尿液中萃取 THC。

NH₂

主要官能团：氨丙基 (Aminopropyl)；主要作用力是极性、阴离子交换，第二作用力是非极性、阳离子交换。

NH₂ 基填料具有所有官能团的特征。因此在使用 NH₂ 填料时要特别注意溶剂/样品基液环境。NH₂ 基是很强极性 & 强氢给予体的填料，具有阴离子交换剂的功能。NH₂ 的 pK_a 值为 9.8，当体系 pH 值低于 9.8 时，NH₂ 带正电。

与 SAX 基比较，NH₂ 属于弱阴离子交换剂。因此，要吸附强阴离子时，NH₂ 是十分理想的填料。如硫酸等在 SAX 上的吸附是不可逆的，最好就是选用 NH₂ 填料。

虽然 NH₂ 具有非极性特征，能够从极性溶液中萃取非极性化合物，但是其强极性特征使得非极性特征比其他特征要弱得多。与 2OH 及 SI 一样，NH₂ 特别适用于分离异构体。

PSA

主要官能团：乙二胺-N-丙基 (Ethylenediamine-N-propyl)；主要作用力是极性、阴离子交换，第二作用力是阳离子交换、非极性。

PSA 的特征与 NH₂ 相同是阴离子交换剂。PSA 有两个胺基，具有较高的离子交换容量 (1.4 meq/g，而 NH₂ 为 1.1 meq/g)。其 pK_a 较高，伯胺基为 10.1，仲胺基为 10.9。PSA 的阴离子交换能力比 NH₂ 要强。PSA 的功能团是一个很好的二元配位体，这使 PSA 成为很好的螯合填料。其多碳结构使得 PSA 的非极性作用力比 NH₂ 要强。因此，如果强极性化合物在 NH₂ 上吸附力太强，就可以用 PSA 代替。

DEA

主要官能团：二乙基胺丙基 (Diethylaminopropyl)；主要作用力是极性、阴离子交换，第二作用力是阳离子交换、非极性。

类似于 PSA，DEA 也与 NH₂ 具有相同的特征。作为阴离子交换剂，其吸附容量相对较小 (1.0 meq/g)，同时，由于其官能团的碳链使其具有较高的非极性特征。DEA 的 pK_a 值为 10.7。DEA 的碳链使得其即使在有胺官能团存在下也具有中等的极性特征。DEA 的极性比 C₈ 强，但是比 C₂ 或 CN 弱。

SAX

主要官能团：三甲基胺丙基 (Trimethylaminopropyl)；主要作用力是阴离子交换，第二作用力是非极性、极性、阳离子交换。

SAX 是最强的阴离子交换剂。由于其功能团是季胺，这种填料总是带正电。由于官能团上的碳原子被胺遮蔽，SAX 的非离子作用力十分小。在非极性溶剂中 SAX 具有一些极性特征，但是由于胺的空间阻碍及季胺的性质，SAX 的极性作用力不能很好地形成氢键。

由于 SAX 的强阴离子作用力，这种 SPE 柱一般不用于吸附很强的阴离子，如硫酸等。因为吸附后难以洗脱。由于 SAX 不能通过改变 pH 值来使其中性化，洗脱一般使用的是高选择性的反离子。SAX 对于弱阴离子是很好的 SPE 填料。如羧酸类化合物。这类化合物在弱阴离子交换剂上不能很好地被吸附。

CBA

主要官能团：羧甲基 (Carboxymethyl)；主要作用力是阳离子交换，第二作用力是非极性、极性。

CBA 基属于中等极性的填料。在实际应用中 CBA 基显极性还是非极性特征取决于环境的情况。

CBA 基一个十分有用的特征是其弱阳离子交换的性质。在有机化合物中，最常见的阳离子是胺类。胺类的 pK_a 一般都较高，在中性化时需要在较高的碱性条件下进行。正因为如此胺类化合物一般较难从类似于 SCX 基这种强阳离子交换剂上洗脱下来。另外，大多数阳离子并没向阴离子一样有很大范围的相反离子 (counter-ion) 选择性，这样就限制了利用高选择性的相反离子洗脱的可能性。

由于 CBA 基的 pK_a 值为 4.8，在出现上述问题时，采用 CBA 填料就能够很好地解决洗脱问题。在 pH4.8 以上，CBA 带负电，可以吸附带阳离子的目标化合物；当 pH 值在 4.8 以下时，CBA 变为中性，这样被吸附的目标化合物就可以被洗脱下来。正是这个原因，在处理强阳离子时，CBA 基填料是最好的阳离子交换剂。

PRS

主要官能团：丙磺酸基 (Sulphonylpropyl)；主要作用力是阳离子交换，第二作用力是极性、非极性。

PRS 基是个极性非常强的阳离子交换剂。其非极性作用力很弱，一般难以利用。在非极性溶剂中，PRS 基具有极性及氢键合作用力。PRS 基的 pK_a 值非常低，一般阳离子必须用高离子强度的溶液洗脱或将目标化合物中性化从而将其洗脱。一般来说，PRS 基只适用于弱阳离子的吸附，如吡啶类化合物。

SCX

主要官能团：丙苯磺酸基 (Propylbenzenesulphonyl)；主要作用力是非极性、阳离子交换，第二作用力是极性。

SCX 是强阳离子交换剂，具有很低的 pK_a 值。其离子性质与 PRS 基相近。SCX 与 PRS 主要的不同之处在于 SCX 填料表面的苯环具有较高的非离子作用能力。这种非离子特点在用离子交换机理从水相中萃取目标化合物时必须考虑。

CX 基的双重性对于目标化合物既离子又有非离子特征时特别有用。在吸附目标化合物后，可以用非极性溶剂及高离子强度的溶剂洗涤 SPE 柱而不会造成目标化合物流失。目标化合物可以用一种能够同时破坏非极性及离子作用力的溶剂洗脱。如甲醇/HCl。SCX 的这种双重特性比单一功能的填料在清除杂质是要好得多。

4.2 无机固相萃取材料

SI

主要官能团：非键合的活性硅土 (Unbonded, activated silica)；主要作用力是极性，第二作用力是阴离子交换。

SI 被人们认为是最强的极性填料。未键合的活性硅具有酸性。硅胶的这种特性使得其可以吸附空气中的水分，因此必须注意在使用前需确保其干燥。由于 SI 的高极性，在使用 SI 填料进行极性吸附时一定不能使用极性溶剂处理 SI 柱。如果需要在 SPE 柱预处理时使用极性溶剂，则应该改用 2OH 或 NH₂ 填料。

在分离结构相似的化合物时，SI 是理想的填料。将目标化合物溶在非极性溶剂中，然后通过增加 THF 或乙酸乙酯来逐渐增加溶剂的极性将机构相近的化合物分开。

弗罗里硅藻土

佛罗里硅藻土是极性吸附剂。适用于从非极性的基液中萃取极性化合物(如胺类、羟基类及含杂原子或杂环化合物)。

氧化铝

结构： Al_2O_3

酸性氧化铝(Al-A)的 pH 约为 5，具有很高的活性。酸性氧化铝可以通过铝金属的中心与化合物羟基的氢形成氢键将化合物吸附。或通过离子交换将带有负电荷的化合物吸附。可以通过控制氧化铝表面的 pH 来控制其吸附作用。用酸洗氧化铝可以使得其吸附碱性化合物的能力下降。酸性氧化铝主要用于吸附极性化合物或具有阴离子官能团的化合物。

中性氧化铝(Al-N)的 pH 约为 6.5，具有很高的活性。中性氧化铝可以通过铝金属的中心与化合物羟基的氢形成氢键将化合物吸附。或通过离子交换将带有负电荷的化合物吸附。可以通过控制氧化铝表面的 pH 来控制其吸附作用。中性氧化铝的表面能够通过其铝原子中心与带有高负电荷的杂原子(杂环化合物)作用。如：N、O、P、S。也可以与富电的芳香结果的化合物作用。这种填料可以将胺类或芳香族化合物从水相或非水相基液中吸附。

碱性氧化铝(Al-B)的 pH 约为 8.5，具有很高的活性。碱性氧化铝可以通过铝金属的中心与化合物羟基的氢形成氢键将化合物吸附。或通过离子交换将带有负电荷的化合物吸附。可以通过控制氧化铝表面的 pH 来控制其吸附作用。用碱性溶液淋洗这种填料使得填料表面带负电。具有阳离子官能团的化合物可以通过碱性氧化铝表面的负电荷吸附。碱性氧化铝主要用于吸附极性化合物或具有阳离子官能团的化合物。

活性碳

活性碳是最早使用的含碳固相萃取材料。主要用于萃取中等极性至极性的有机化合物。由于这种材料对部分目标化合物的吸附常常是不可逆的，而且对一些化合物的回收率较低。因此，目前很少使用这种材料。

石墨碳黑(Graphitized carbon black)

石墨碳黑(GCB)是通过对碳黑加热(2700-3000)而得到的。主要用于萃取非极性至中等极性有机化合物。早期的石墨碳黑是无孔的。表面积在 $100\text{m}^2/\text{g}$ 。近期的石墨碳黑表面积可达 $210\text{m}^2/\text{g}$ 。由于氧的化学吸附，碳黑表面结构上含有氧复合物。其结构类似于含氢醌、醌、等。这些功能团具有很强的极性，可以吸附一些酸性化合物。由于这些功能团的存在，石墨碳黑表面带有一些正电荷，具有阴离子交换的功能。

多孔石墨碳(Porous Graphitized carbon)

多孔石墨碳(PGC)具有平面晶体的表面，六个碳原子组成的平面六角形具有显著的疏水(非极性)特征。对石墨碳进行处理后得到的多孔石墨碳商品化的多孔石墨碳的颗粒大小与硅胶材料相近。其平均表面积在 $120\text{m}^2/\text{g}$ 。多孔的平均直径为 25 nm。多孔率为 75%。这种材料几何结构稳定，不会膨胀及收缩。可以在所有的 pH 范围使用。多孔石墨碳萃取机理与传统的 C18 及 PS-DVB 聚合材料有明显的不同。由于多孔石墨碳是通过范德华力将其多层水晶结构合为一体，多孔石墨碳可以通过疏水作用及电子作用吸附非极性以及极性化合物，包括水溶性的化合物。

4.3 高聚物固相萃取材料

为了解决硅胶材料的多种作用力的问题，人们开始采用高聚物作为色谱或 SPE 材料。为了满足固相萃取的要求，这些高聚物往往需要经过交联，使其性质

更加稳定。目前较为常见的是聚苯乙烯-二乙烯苯[(poly)styrene-divinyl- benzene , 简称 PS-DVB 或 SDB]为填料的聚合物 SPE 柱。由于聚合物填料没有以硅胶为基质常见的硅羟基,因而萃取机理单一,不会产生键合硅胶柱常见的副作用力。采聚合物 SPE 柱的另一个好处是这种材料可以在 pH1-14 广范围使用。

GDX 401

GDX401 是由二乙烯苯和含氮杂环化合物共聚而成的高分子聚合物。中等极性,略呈碱性。表面积为 370 m²/g。

GDX403

GDX403 是由二乙烯苯和 N-乙烯吡咯烷酮共聚而成的高分子聚合物。同时具有亲水及亲脂的特点。表面积为 280 m²/g。由于是共聚物所以可以在 pH0-14 范围使用。可以用于取代 C18 柱。

H2O-Philic DVB (J.T. Baker)

H2O-Philic DVB 填料是疏水二乙烯苯共聚物。可以在 pH0-14 范围使用。可以用于取代 C18 柱。其功能类似于 Waters 的 Oasis HLB。柱容量为 0.85 μ eq/mg。

H2O- Philic SC-DVB (J.T. Baker)

H2O-Philic SC-DVB 填料是疏水磺酸-二乙烯苯共聚物。属于非极性阳离子交换混合型 SPE 柱。可以在宽 pH 范围使用。其反相非极性柱容量为 0.85 μ eq/mg; 阳离子交换柱容量为 0.8 μ eq/mg。该填料类似于 Oasis MCX。

H2O- Philic SA-DVB 柱 (J.T. Baker)

H2O-Philic SC-DVB 填料是疏水季胺-二乙烯苯共聚物。属于非极性阴离子交换混合型 SPE 柱。可以在宽 pH 范围使用。其反相非极性柱容量为 0.8 μ eq/mg; 阳离子交换柱容量为 0.6 μ eq/mg。该填料类似于 Oasis MAX。

Oasis HLB 柱 (Waters)

HLB 填料是 N-乙烯吡咯烷酮-二乙烯苯共聚物。同时具有亲水及亲脂的特点。其表面积比普通的 C18 填料高 2-3 倍,因此其柱容量也比普通 C18 柱高。HLB 柱可以用于取代 C18 柱。

Oasis MCX 柱 (Waters)

MCX 填料是 N-乙烯吡咯烷酮-苯磺酸共聚物。属于阳离子交换及反相非极性混合填料。这种填料没有传统硅胶填料的羟基的影响。由于是共聚物所以可以在 pH0-14 范围使用。其阳离子容量为 1 meq/gram。

Oasis MAX 柱 (Waters)

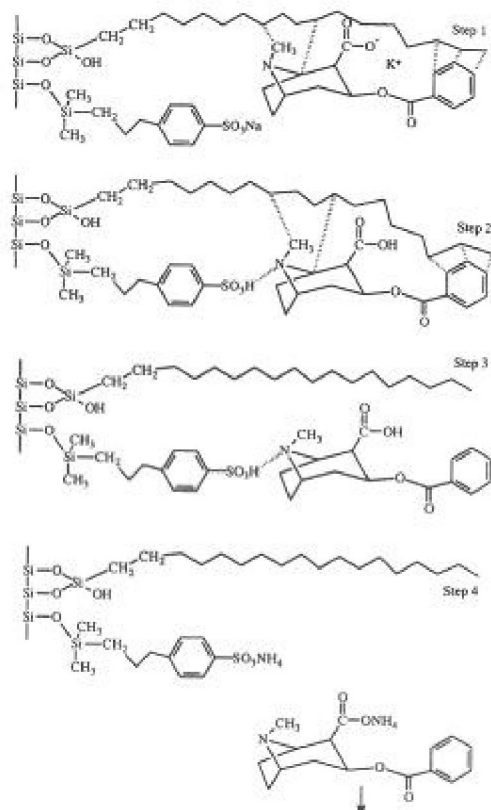
MAX 填料是乙烯吡咯烷酮-季胺基共聚物。属于阴离子交换及反相非极性混合填料。这种填料没有传统硅胶填料的羟基的影响。由于是共聚物所以可以在 pH0-14 范围使用。其阴离子容量为 0.3 meq/gram。

4.4 混合型固相萃取材料

早在 90 年代初,混合型 SPE 柱 (mixed-mode SPE columns) 就已经面世。混合型 SPE 柱的填料一般具有两个以上的萃取。有的是两种不同填料混合物,也有是在同一填料上键合不同的萃取官能团。最常见的是非极性官能团 (如 C8) 与离子交换官能团 (如强阳离子交换剂或强阴离子交换剂)。对于一些基质较为复杂 (干扰物多,特别是离子干扰物及非极性干扰物较多) 的样品,或样品中存在的待监测目标化合物性质不同,用单一萃取机理的 SPE 柱难以达到较好的萃取接过时,就可以使用混合型 SPE 柱。

如下图所示,应用混合型 SPE 柱 (C8-丙苯磺酸基) 对于 5 含有大量离子及非极性干扰物样品中的弱碱性或两性化合物的萃取分离,可以先将样品的 pH 值

调节到目标化合物呈中性，通过非极性作用力与填料上的 C8 官能团结合，此时可以用极性强的水等溶剂最大限度地除去离子干扰物。之后，调节环境 pH 使目标化合物呈阳离子状态，被丙苯磺酸基吸附。此时可以用包括甲醇在内的有机溶剂洗涤，以除去非极性干扰物。最后，通过调节环境 pH 至碱性，使目标化合物呈中性，通过有机溶剂洗脱。下图是应用多种作用力从复杂样品基质中分离目标化合物的示意图。



应用混合型 SPE 柱进行药物筛选分析样品前处理就是利用混合型 SPE 柱不同功能团对性质不同的酸性、中性、碱性药物进行一次性萃取的一个例子。

键合硅胶 C8—强阳离子交换混合柱

最典型的键合硅胶型混合柱是 Varina 公司生产的 Bond Elut Certify。这种混合型 SPE 柱具有 C8 及磺酸基。

键合硅胶 C8—强阴离子交换混合柱

最典型的键合硅胶型混合柱是 Varina 公司生产的 Bond Elut Certify II。这种混合型 SPE 柱具有 C8 及强阴离子交换剂。

聚合物混合型柱

以聚合物为材料的混合型柱的代表应该是 Waters 公司生产的 Oasis MCX 及 Oasis MAX。前者是具有非极性与强阳离子交换剂的功能；后者则具有非极性与强阴离子交换剂的功能。

4.5 免疫亲和固相萃取材料

免疫检测 (Immunoassay) 具有速度快、灵敏度高、花费低的特点。当是，这种技术较难区别交叉反应物，不能够定量分析。将免疫检测技术与色谱技术结合在一起就成为了具备两者特点的免疫色谱技术 (Immunochromatographic techniques)。免疫亲和萃取 (Immunoaffinity extraction) 技术是免疫色谱技术的

一个主要应用。免疫亲和固相萃取柱 (IASPE) 与经典的固相萃取柱的不同之处在于 IASPE 柱中的功能组分是抗体，而不是我们常说的功能团。这些抗体包括单克隆及多克隆抗体。通过共价结合、包埋或生物分子俘获等方式将这些抗体固定在固相萃取材料上就形成了免疫亲和固相萃取材料。

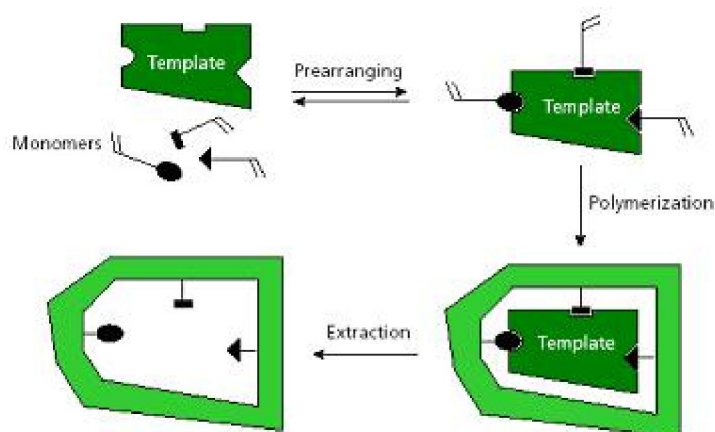
免疫亲和萃取的基本原理如下图所示，将样品载入免疫亲和固相萃取柱上，目标化合物及交叉反应物 (cross-reactants) 被键合保留在免疫亲和柱上。通过温和的洗涤步骤将弱键合干扰物除去。最后将小心地用混合溶剂或缓冲溶液将目标化合物洗脱。

目前已有许多商品化的免疫亲和固相萃取柱面世。免疫亲和固相萃取技术已经被应用于生物毒素 (如黄曲霉素、玉米烯酮、赭曲霉毒素等) 多环芳烃 (PAHs) 及除草剂的萃取净化。

4.6 分子印记固相萃取材料

分子印记固相萃取柱是以分子印记聚合物 (Molecularly Imprinted Polymers, MIP) 为填料的。这种材料对目标化合物的亲和力具有类似于抗体的高选择性。分子印记聚合材料具有高稳定性和高选择性。所吸附的目标化合物在三维立体结构及功能团必须满足分子印记聚合材料相对应的结构。因为只有符合上述条件的目标化合物才能够很好地“镶嵌”在分子印记材料上。

分子印记聚合材料的合成可通过共价及非共价方式进行。共价合成方式较少使用。较多使用的是非共价方式。如下图所示，非共价合成方式一般分为三步：第一步是将印记模板与带有指定功能团的单体组合为一体。第二步是在交联剂及聚合引发剂的作用下完成第一步得到的单体-模板与刚性多孔共聚物聚合；第三步是将印记模板除去得到具有特定结构的分子印记聚合材料



目前，市场上已有多种商品化的分子印记固相萃取柱面市。其应用有包括盐酸克仑特罗在内的 β -兴奋剂、苯塔松、三嗪类药物、茶碱、尼古丁及其同系物、三苯氧胺 (抗雌激素) 等。

4.7 限进介质固相萃取材料

在使用固相萃取柱萃取富集生物样品中的小分子分析物中，经常遇到样品中的大分子蛋白质、核酸等遇到疏水性反相 SPE 填料时发生变性。变性后的大分子吸附在填料的表面，造成 SPE 柱堵塞、柱效下降、吸附容量减少等问题。限

进介质 SPE 填料在一定程度上解决了上述问题。这种 SPE 填料同时具有对大分子的体积排阻功能及对小分子的萃取功能。

人们通过对填料孔径的控制及对填料表面进行适当的亲水性修饰,使得生物或环境样品中的大分子不能进入填料的孔径内。而表面亲水性的填料使得生物大分子在填料表面不会发生不可逆的变性及吸附。

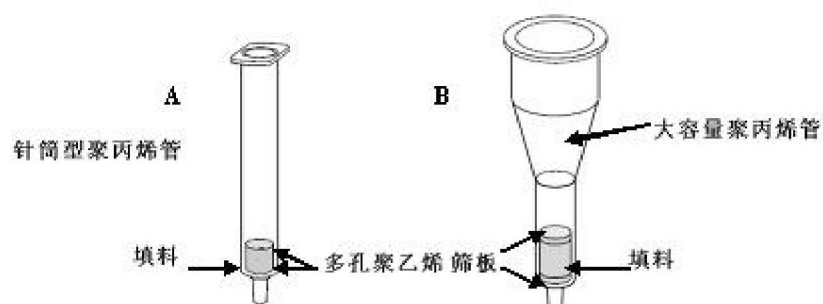
由于大分子不被吸附,所以在死体积或近于死体积的情况下被洗脱除去。而填料孔内的反相或离子交换官能团则吸附样品中的小分子。这样就实现了在大分子存在的条件下选择性地吸附小分子的目的。

目前 RAM 主要应用领域是生物体液的分析。包括细胞培养液、牛奶、尿液、血清、血浆等。主要测定的药物包括:安定类、 β 阻滞剂、阿托品、普鲁卡因等碱性药物、激素类。也有用于有机磷酸三酯农药的样品净化。在环境监测中的应用主要包括河水、湖水、地表水、废水中的除草剂残留、农药残留及激素残留的样品处理。

5.固相萃取装置

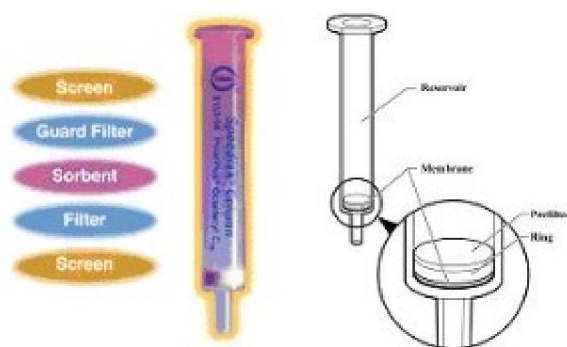
5.1 固相萃取柱

固相萃取柱是最为经典的固相萃取装置。市场上流行的 SPE 产品是以固相萃取柱为主。如下图中的左图所示,常见的固相萃取柱是以聚乙烯或玻璃为材料的注射针筒型装置,针筒内上下装有两片以聚丙烯或玻璃纤维为材料的滤片,中间装有一定量的吸附剂。这种 SPE 柱外形均为直筒型,上部敞开。这种 SPE 柱即可用于手工操作,也可用于自动化操作。为了方便手工操作,一次性加入体积较大的样品(15 mL~20 mL),一些厂商生产了大容量固相萃取柱(下图右),SPE 柱的吸附剂及滤片部分的尺寸与经典的 SPE 柱相同,属于直筒型的,但其承受液体的部分则是漏斗型的,以便一次性载入更多的液体样品。前者在手工及自动 SPE 中都能使用,后者由于外形不规范,多用于手工 SPE 操作。根据填料上部的空间体积的大小,商品化的 SPE 柱可分为 1 mL、3 mL、6 mL 的规格,也有 8 mL、12 mL 甚至更大尺寸的 SPE 柱。大量使用的为 1 mL、3 mL 及 6 mL SPE 柱。8 mL 以上的 SPE 柱主要用于一些比较特殊的应用。另外一种常见的手工 SPE 柱是其上下两端都是直径很小的管状开口。这种萃取柱也称为固相萃取筒(SPE cartridges)。这种萃取装置需要与针筒连接使用,一般用于简易的手工操作。



5.2 固相萃取膜片

与经典的硅胶基质固相萃取柱不同，薄片型萃取柱 (Extraction disk) 采用的是聚合树脂为基质。将相关的功能团键合在聚合树脂制成的薄片上，然后装填在与经典固相萃取柱相同的针筒型萃取管中，如下图所示。其中比较典型的的就是美国 J.T. Baker 公司生产的 Speedisk。与传统的硅胶基质的固相萃取柱比较，采用聚合树脂的 Speedisk 薄膜型萃取柱有很好的刚性及更大的表面积。适合在 pH 1-14 的范围使用。另外，这种新型的聚丙烯薄膜型固相萃取柱十分洁净，特别使用于对样品洁净度要求高的检测手段使用。Speedisk 薄膜柱使用的溶剂量要少很多，而且每克担体的容量则比传统的固相萃取柱要大很多。



薄膜型固相萃取柱的容量取决于担体的类型、重量、样品基液的性质、样品的体积以及担体对分析物的亲和力等因素。一般平均为担体重量的 5%。

使用薄膜型 SPE 柱有几个显著的优点

1. 提高检测灵敏度 在经典的 SPE 柱中，洗脱液的体积对于 1 mL SPE 柱 (100 mg) 来说一般是 0.5 – 1 mL ;对于 3 mL SPE 柱 (500 mg) 是 1 – 1.5 mL ;6 mL SPE 柱 (1 g) 为 2 – 3 mL。而对于典型的薄膜型 SPE 柱，1 mL 柱大约为 150 μ L ; 3 mL 柱为 300 μ L ; 6 mL 柱为 500 μ L。在载样量相同的情况下，使用薄膜型 SPE 柱由于最后的洗脱液体积减少使得实际浓度在没有浓缩的情况下比经典 SPE 柱增加了 5 倍。

2. 减少样品体积 在痕量分析中，为了得到足够的分析物浓度以满足检测灵敏度，往往需要萃取大体积的样品。如在水中农药残留物的分析中，经常需要使

用 250 mL – 1000 mL 的样品，有时甚至需要更大体积的样品量。大体积的样品往往会给 SPE 带来不利因素。首先，如此大体积的样品过 SPE 柱是十分费时的工作；其次，如此大体积的样品通过 SPE 柱往往会改变 SPE 柱的动力学键合环境，使得痕量的分析物不能完全被 SPE 柱吸附。解决这个问题最好的方法是采用薄膜型 SPE 柱。由于使用薄膜型 SPE 柱所需的洗脱液体积小，在保证相同的检测灵敏度时可以减少样品的体积。

3.用 HPLC 流动相进行洗脱避免浓缩步骤 当使用反相 SPE 柱时，一般做法是用溶剂洗脱分析物，然后再进行浓缩/再溶解进样分析。使用薄膜型 SPE 柱则可以直接用小体积的 HPLC 流动相进行洗脱直接在线进行 HPLC 分析。这样可以有效防止热不稳定分析物的损失。

固相萃取膜 (Extraction membrane, Extraction disk) 主要由美国 3M 公司生产。包括 J. T. Baker, Varina 等其他公司的萃取膜都是来源于 3M 公司。固相萃取膜是将微小的填料颗粒固定在由聚四氟乙烯 (PTFE) 纤维组成的基质中，其中重量的 90% 是填料，10% 是形状与我们常用的过滤膜相似，主要规格有直径为 47 mm、50 mm 及 90 mm 几种。

由于固相萃取膜表面积比市面上任何萃取柱的表面积都大很多、流速快，所以特别是用于处理大体积样品。如自来水，环境水等。

由于这种萃取膜比经典的固相萃取柱要薄许多，所以具有以下优点：

减少溶剂及样品体积

高通量

洗脱体积小

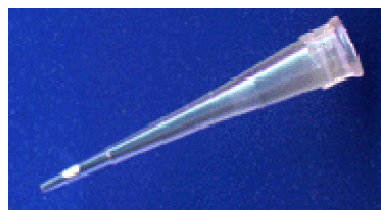
可以较少或省略浓缩步骤

样品可以以最大的流速通过萃取膜，而不会形成渠沟

稳定的回收率

5.3 固相萃取吸嘴

由于人们在蛋白质组学研究的不断深入，新的，更加灵敏的分析检测手段也不断被引入对蛋白质组学的研究，如 MALDI – TOF-MS。这些检测手段要求样品体积小，浓度高。这就要求人们采用与之相对应的微小规模 (microscale) 的样品前处理技术。固相萃取吸嘴就是其中一种。固相萃取吸嘴最早是由美国 Ansys Technologies 公司 (已被 Varian 公司收购) 在 1998 年引入市场。主要用于生物样品中微量多肽、蛋白质、寡核苷酸的分离纯化。



简单地说，固相萃取吸嘴就是在经典的移液器吸嘴内装填了少量的固相萃取填料。目前常见的填料是 C18、C4 等。填料的颗粒比经典固相萃取柱填料小，在 15 μm 左右。装填量在 2.0 – 5.0 μg 左右。目前使用最多的固相萃取吸嘴是 10 μL 。

可以使用多通道移液器或自动化液体处理仪进行萃取操作。一般程序与经典固相萃取程序基本相同，包括：

- 1、固相萃取吸嘴预处理
- 2、样品吸附

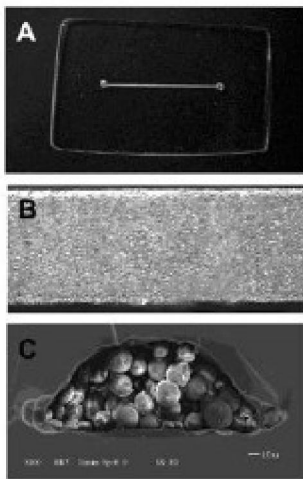
3、杂质洗涤

4、目标物洗脱

与经典的固相萃取柱比较，采用固相萃取吸嘴进行萃取时无论样品还是洗涤、洗脱溶液都可以反复吸、排，多次通过填料，以达到最佳的吸附或洗脱效果。

5.4 固相萃取芯片

固相萃取芯片是基于微全分析（Total analytical system, μ -TAS）的一种固相萃取样品前处理装置。目前主要用于 DNA 的纯化。从基本原理上说，固相萃取芯片与传统的固相萃取的机理是相同的，但是固相萃取芯片及其制作与传统的固相萃取柱是完全不同的。通常多是在细小的通道内加入固相萃取材料，然后以一定方式将其固定。这个细小的通道就是固相萃取的柱床。这种柱床可以是直线形，也可以是蛇形等。下图是一种简单直型的固相萃取芯片。



A-固相萃取芯片全景，B-放大 10 倍的填料，C-放大 500 倍的硅胶填料管路横截面。

6.如何建立固相萃取方法

6.1 固相萃取基本步骤

固相萃取的步骤视萃取机理及检测手段可多可少。对于反相固相萃取柱而言，其基本步骤有 five 步：

- 固相萃取柱预处理
- 样品添加
- 固相萃取柱洗涤
- 固相萃取柱干燥
- 目标物洗脱

固相萃取柱预处理

无论是自行装填的还是商品化的固相萃取柱在使用之前都是以干燥的状态存在的。如同新购置的 HPLC 柱一样，在使用时都必须先对柱子进行活化、平衡。对于反相固相萃取柱而言，进行柱子预处理的主要目的有两个：

对固相柱进行活化，展开碳氢链增加和分析物作用的表面积。

对固相柱进行清洗，除去柱上吸附的对分析有影响的杂质。

在具体操作上，一般程序是：先用甲醇或极性有机溶剂淋洗柱子，然后再用水或缓冲溶剂除去多余的有机溶剂。因为上述有机溶剂都是良好的洗脱剂，过多

的存在会使目标化合物在吸附过程中损失。当用离子交换 SPE 时, 必须注意系统的 pH。其 pH 值应该与样品保持一致。如果使用的是手工的操作方法, 必须注意在加样于固相柱前已处理好的固相萃取柱必需保持湿润。这点对于非高聚物的固相萃取柱尤为重要。否则会出现回收率低、重现性差的结果。

样品添加

将样品添加于固相柱中, 用正压或负压使样品通过柱子。样品的流速必须控制。慢流速有利于对目标化合物的吸附。但是, 流速过慢会增加整个萃取过程的时间, 降低样品处理的通量。另外, 过慢的流速会造成杂质被吸附的机会增加, 对目标化合物的检测分析不利。一般对于 100 毫克填料的 SPE 柱流速在 5-10 ml/min。对于以离子交换为作用机理的萃取, 样品通过 SPE 柱的速度应该适当的降低, 以保证分析物有足够的时间与 SPE 柱填料的离子交换功能团发生作用一般控制在 1.5-5 ml/min。

固相萃取柱洗涤

为了减少分析时杂质对目标化合物的干扰, 延长仪器的使用寿命, 应该尽可能地除去干扰物。因此, 在固相萃取中经常会通过对固相萃取柱的洗涤来达到这个目的。选用适当的洗涤剂选择性地洗脱吸附力弱杂质而保留分析物于柱上。洗涤剂的选择也取决于最后的分析手段。不同的检测手段对样品的“干净”程度也不同。

固相萃取柱干燥

如最后的洗脱剂为缓冲溶液或水溶性有机溶剂, 而分析手段为反相 HPLC, 固相柱上的残留水对分析影响不大。但是, 当水溶性差的有机溶剂为洗脱剂或分析手段为 GC 或 GC-MS 时, 固相萃取柱的干燥就特别重要。水溶性差的有机溶剂作为目标物的洗脱溶液时, 水的存在会直接影响洗脱效率。而样品中大量水分的存在将对 GC 分析柱造成致命性的损害。

目标物洗脱

目标化合物的洗脱在整个固相萃取过程中是至关重要的最后一步。为了最大限度地目标化合物洗脱下来, 必须选择适当的洗脱溶剂。选择洗脱溶剂时必须考虑以下几个因素:

洗脱剂必需有足够强度, 以最小用量将分析物洗脱下来。洗脱剂必需有足够的选择性只将分析物洗脱, 而将吸附力强的杂质保留在柱上。

在选择洗脱溶剂时, 可以通过改变溶剂的极性指数、溶剂强度、溶剂选择性来达到最好的分离效果。

洗脱溶剂通过柱子的流速也必须控制。流速慢有利于目标化合物的洗脱。但是, 会增加萃取时间, 降低效率; 同时, 过慢的流速可能会造成最后洗脱馏分中杂质的增加, 对检测分析不利。

6.2 相关信息的汇集

要建立一个好的固相萃取方法应该综合考虑许多因素。其中首先要做的就是汇集所有可能得到的信息。这些信息主要包括:

目标化合物

- 化学结构
- 可生成离子化合物的 pKa
- 浓度
- 估计样品体积
- 溶解度

- 稳定性

样品基质

- 基质的类型
- pH 值及离子强度
- 对目标化合物萃取的干扰

分析手段

- 最终的分析手段
- 分析方法可使用的溶剂
- 现有的 HPLC 方法

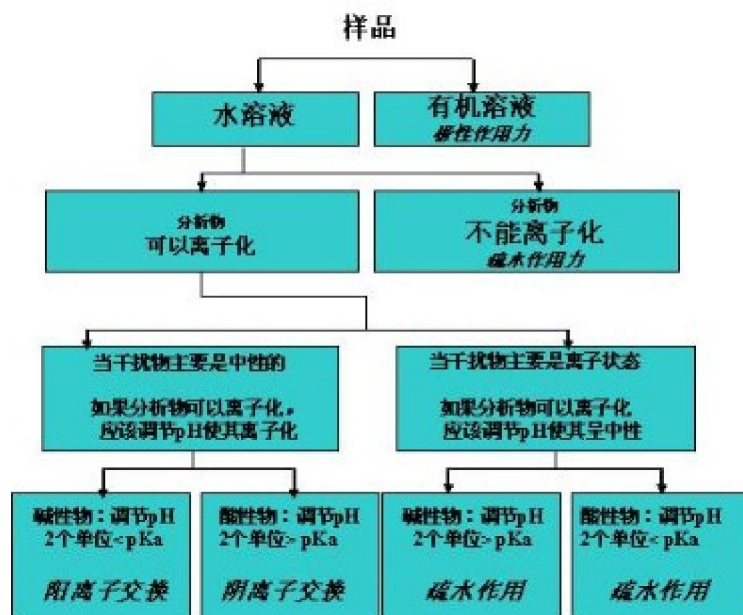
在具体实施中可以通过填写下列表格来确定初步的固相萃取参数：

建立初步SPE方法表格

样品名称	_____
分析物名称	_____
样品体积	_____
SPE 填料量	_____ g
SPE 柱容量	_____ mL
测试的SPE柱	1) _____ 2) _____ 3) _____ 4) _____
1. 样品预处理	_____
2. 柱预处理使用	_____ mL 的溶剂 _____ 流速 _____ mL/min
3. 平衡柱使用	_____ mL 的溶剂 _____ 流速 _____ mL/min.
4. 样品添加流速	_____ mL /min.
5. 洗涤溶剂使用	_____ mL 的溶剂 _____ 流速 _____ mL/min.
干燥时间	_____ 分钟
6. 洗脱使用	_____ mL 的溶剂 _____ 流速 _____ mL/min.

6.3 固相萃取材料的选择

在选择固相萃取柱时,首先要考虑的是选择哪种萃取机理对目标化合物进行萃取。以下是根据萃取机理选择萃取填料类型的示意图：



根据化合物的 lg Kow 选择固相萃取材料

辛醇-水分配系数 Kow 是有机化合物在辛醇和水两相平衡浓度比，Kow 反映了该有机化合物的亲脂性或亲水性的程度。在固相萃取中，可以根据 lg Kow 的大小来选择固相萃取柱。通常，lg Kow > 3 为非极性化合物；lg Kow 在 1-3 之间为中等极性化合物；lg Kow < 1 为极性化合物；lg Kow < 0 为水溶性化合物。

6.4 选择固相萃取溶剂

溶剂的选择一般包括两个方面：洗涤溶剂的选择和洗脱溶剂的选择。

对于洗涤溶剂而言，我们希望的洗涤溶剂能够最大限度地将对目标化合物分析及对检测仪器带来干扰及损害的物质除去。同时，又能最大限度地保证分析物在洗涤过程中不会有明显的损失。下表是选择洗涤溶液的一些基本原则。

干扰物的洗涤

分析物种类	SPE 填料种类	干扰物的洗涤
中性	疏水作用 如：C2、C8、C18	用柱平衡使用的缓冲液洗涤。如果分析物在 SPE 柱吸附强，可以在洗涤溶液中加入水溶性的有机溶剂以增强洗涤效果。如果发现回收率降低，收集此馏分检测是否有分析物在这一步被洗脱。 <i>注意：如果可离子化的分析物已经通过调节 pH 使之中性化并通过疏水作用力吸附，就必须注意洗涤步骤保持同样的 pH 值。</i>
阳离子或阴离子	阳离子交换剂 (CBA、SCX、C2、PRS) 或 阴离子交换剂 (SAX、NH2、PSA)	用柱平衡使用的缓冲液洗涤。 <i>注意：对于带单电荷的分析物，缓冲溶液的离子强度不要超过 50 mM。对于带双电荷的分析物，缓冲溶液的离子强度不要超过 10 mM。</i>

注意保持相同 pH!

洗脱溶液用于将目标化合物从固相萃取柱上洗脱下来。

选择洗脱溶剂

染料	分析物	可使用的溶剂*
CIB、CB、CH、PH	正极液	1.正己烷 2.二氯甲烷
	碱水，有一些极性的衍	1.丙酮/乙酸乙酯 3:1 2.1HF 3.甲醇、丙酮、乙腈
	中性的，极性的 ----- 中性的，碱性的	1.叔丁基醇 (参见以下注意事项) 2.叔丁基醇/乙酸乙酯 (参见以下注意事项) 1.甲醇/NEt ₃ 10% 2.甲醇/三氯乙酸, 1% 3.甲醇/四氢呋喃, 2%
SAX、HAX NH ₂ 水溶液样品	极性的	1.正己烷/乙酸乙酯 75:25+1%乙酸 (参见以下注意事项) 1.叔丁基醇 (参见以下注意事项)
SCX、HCX	碱性的	1、乙酸乙酯/水 98:2 2、二氯甲烷/甲醇/水 75:20:5
CBA	碱性的	乙酸乙酯
PBS	碱性的	缓冲溶液, 0.1 M (单电荷离子) ; 0.2 M (双电荷离子)
极性的染料 Si、CN、NH ₂ 水溶液样品	极性的	1.甲醇 2.甲醇/正己烷 1:1 3.甲醇/缓冲液

混合溶剂适用于以多种作用力吸附的化合物的洗脱

固相萃取中常见溶剂的性质

相对极性	溶剂	洗脱强度 (ϵ^b)	极性指数 (P)	水溶性 (%w/w)
非极性 ↓	石油醚	0.0		
	正己烷	0.0	0.06	0.001
	戊烷	0.0	0.2	0.0003
	异辛烷	0.01		
	环己烷	0.03	0.0	0.01
	甲苯	0.22	2.4	0.051
	苯	0.27	3.0	0.18
	四氯化碳	0.11	1.6	0.08
	氯仿	0.31	4.4	0.815
	二氯甲烷	0.32	3.4	1.6
	四氢呋喃	0.35	4.2	100
	二乙醚	0.38	2.9	6.89
	二氧杂环乙烷	0.49		100
	甲基乙酮	0.39	4.5	24
	丙酮	0.43	5.4	100
	乙酸乙酯	0.45	4.3	8.7
	乙醇	0.50	6.2	100
	吡啶	0.55	5.3	
	三乙胺	0.73		100
	异丙醇	0.63	4.3	100
乙醇	0.70		100	
甲醇	0.73	6.6	100	
二甲亚砜	0.73		100	
乙酸	>0.73	6.2	100	
水	>0.73	10.2	100	
极性 ↓				

6.5 选择固相萃取的流速

在固相萃取过程中，有三个步骤涉及到液体通过固相萃取柱的流速：样品过柱、洗涤及洗脱。其中，样品过柱的流速及洗脱液过柱的流速对结果的影响较大。样品过柱的流速的选择可以参考下表：

样品添加

分析物种类	填料种类	SPE 柱空间容量	载样流速 (mL/min)
中性	疏水作用 (如：C2、C8、C18)	1 mL	1-15
		3 mL	3-30
		6 mL	10-20
阳离子或阴离子	阳离子 或 阴离子	1 mL	0.5-2
		3 mL	1-15
		6 mL	3-35

洗脱溶剂的流速与洗脱溶剂的用量有关。溶剂用量大，溶剂过柱的流速可以加快。但是一般的洗脱原则是洗脱溶剂的体积越小越好。因为洗脱溶剂体积小，有利于洗脱物的后处理。如减少浓缩时间或无需浓缩。对于以硅胶为基质的固相萃取柱，洗脱溶剂的用量及其过柱的流速可以参考下表：

洗脱溶剂

	填料重量	洗脱溶剂体积, mL	洗脱溶剂流速, mL/min
硅胶填料	25 mg	0.1-0.5	0.05-0.2
	50 mg	0.25-1	0.1-0.05
	100 mg	0.5-2	0.25-1
	130 mg	1-2	0.5-1
	200 mg	1-2	0.5-1
	500 mg	2-4	1-2
	1000 mg	3-6	1.5-3

7. 固相萃取参数的优化

在建立了初步的固相萃取方法后就可以用空白样品添加目标化合物后对添加物进行萃取。然后，根据分析结果对初步的固相萃取方法进行优化，以达到最佳的效果。优化过程主要考虑的因素有：

- 回收率是否达到检测要求？
 - 能否将萃取过程缩短以提高效率？
 - 能否将溶剂使用量减少以节省成本、提高效率、减少污染？
- 如果检测结果发现回收率较低，应该首先检查整个操作过程是否有错。如果没有，就要从方法本身查找原因了。可以从以下几个方面着手检查：

1. 洗涤溶剂是否合适

- 理想的洗涤溶剂是溶于基质，但对目标物溶解度低。

2. 目标化合物是否没有完全洗脱

- 选择更强的洗脱溶剂（如改变 pH、离子强度、有机溶剂%含量）
- 选择作用力相对较弱的 SPE 柱

3. 目标化合物是否没有被完全吸附

可以采用原萃取方法以双柱叠加的方式将两个性质相同的固相萃取柱串连在一起进行柱子预处理及样品添加操作，然后将两根柱子分开，分别对两根萃取柱洗脱。如果在下方的柱子上发现有目标化合物就表明目标化合物在萃取过程发生了穿透。也就是说目标化合物在样品添加过程中没有按照方法设计要求不很好地吸附。有部分目标化合物在样品添加过程中随样品基质穿过固相萃取柱。发生穿透的原因可能是：萃取机理选择不合适；固相萃取柱的吸附容量不够。目标化合物没有被完全吸附还有另外一种可能性就是对于某些样品来说，由于部分目标化合物没有呈游离状态。如生物样品中的目标化合物与蛋白质结合在一起，所以随着样品基质通过固相萃取柱。

4. 目标化合物与固相萃取填料功能团之间的吸附作用过强

洗脱溶剂的洗脱强度不足以将目标化合物全部洗脱下来。这种情况可以改用吸附力较弱的固相萃取柱或改用洗脱强度更大地溶剂进行洗脱。

在达到预期回收率的前提下，我们希望萃取过程越短越好。提高效率可以从以下几个方面入手：

- 1、提高流速。包括预处理溶液流速、样品过柱流速。
- 2、减少洗脱溶液的体积

放射性同位素法优化固相萃取参数

在有条件的实验室，可以通过放射性标记物来查找回收率偏低的原因，优化固相萃取参数。通过同位素示踪的方法可以快速查出回收率偏低的原因，从而优化固相萃取参数。

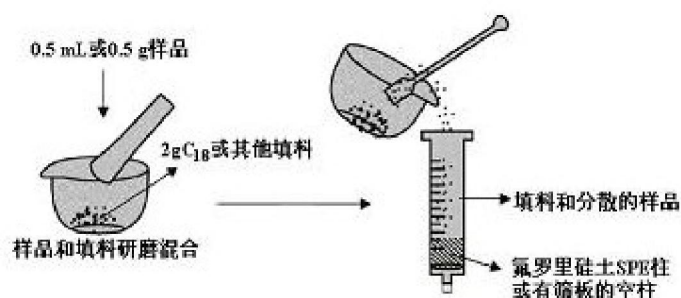
统计学方法优化固相萃取参数

应用统计学方法或相关的软件（如：Design of Experiment, DOE）可以减少实验次数，加快固相萃取方法的建立与参数的优化。

8. 基质分散固相萃取(MSPD)

基质分散固相萃取原理与操作

基质固相分散萃取（Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD）是 Barker 等人在 1989 年首次提出，并将其应用于哺乳动物组织中目标化合物的萃取。如下所示，与经典的固相萃取装置不同，MSPD 萃取是将样品与固相吸附剂（C18、硅胶等）一起研磨之后，使样品成为微小的碎片分散在固相吸附剂表面。然后将此混合物装入空的 SPE 柱或注射针筒，用适当的溶剂将目标化合物洗脱下来。



基质固相分散萃取的主要优点是：适用于固体、半固体及粘稠样品的萃取；萃取溶剂与目标化合物的接触面增大，有利于目标化合物的萃取；溶剂完全渗入样品基质中，提高了萃取效率；使用的萃取溶剂比传统的 LLE 减少约 95%，而且所需样品量小、萃取速度也比 LLE 快约 90%。

经典的基质固相分散萃取是将 2 g 固体吸附剂放入无孔的玻璃、铝或玛瑙研磨盆中，并将 0.5 g 或 0.5 mL 样品倒在载体上面。然后用磨棒进行温和的研磨，大约 30 sec~45 sec 样品基本分散在载体表面。

将研磨好的样品/吸附剂转移至有塞片或滤纸的空 SPE 柱或玻璃注射针筒中，也可以根据需要将样品/吸附剂转移至装有吸附剂的 SPE 柱（例如，氟罗里硅土 SPE 柱）中。氟罗里硅土 SPE 柱的作用是吸附基质固相分散萃取共流出干扰物以达到样品净化的目的。也可以将基质固相分散萃取柱叠加在 SPE 净化柱之上进行洗脱。干燥的氟罗里硅土不但可以对基质固相分散萃取洗脱物进行净化，还可以除去洗脱物中的水分。通常每种洗涤或洗脱溶液的用量为 8 mL。洗脱可以利用重力进行，为了提高样品处理的通量，也可以加以真空或正压。洗脱通常是用不同的溶剂按一定的顺序进行，可以按照溶剂的极性大小，由低极性至高极性顺序洗脱，分别收集每个溶剂组分。例如按照正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙腈、甲醇、水的顺序洗脱。为了减少杂质对目标化合物的干扰，有时也需要对萃取柱进行洗涤或对萃取物进行进一步的净化。

9.分散固相萃取 (d-SPE)

分散固相萃取 (dispersive solid phase extraction, d-SPE) 与基质固相分散萃取有相同之处，两者都是使用分散的固相萃取吸附剂而不是经典的固相萃取柱对样品进行萃取。但是，与基质固相分散萃取不同，d-SPE 是将固相萃取吸附剂颗粒分散在样品的萃取液中，而不是直接加入到原始样品中。d-SPE 最典型的应用就是在多农药残留检测中使用的 QuEChERS 样品前处理方法。

QuEChERS 萃取方法

QuEChERS (发音 :catchers) 是英文 Quick ,Easy ,Cheap ,Effective ,Rugged ,Safty 的缩写。即为：“快速、简易、廉价、有效、稳定、安全”的萃取方法。该方法是 Anastassiades 等人于 2002 年在首先在 EPRW 会议提出，并于 2003 年正式发表的一个用于农产品中多农药残留物分析的前处理方法。Anastassiades 等人最初旨在针对水果、蔬菜、谷物等低脂农产品而建立一个快速、低花费的多农药残留物样品前处理方法。d-SPE 在该方法中被应用于除去样品中的杂质干扰物。该方法已经得到 AOAC 和欧盟农残监测委员会的认可，并且在食品安全检测实验室得到广泛的使用。

QuEChERS 方法的具体步骤如下：



QuEChERS 方法的图解示意图如下，其中图中标号 1-3 是上述步骤的第一步；4-7 是第二步；8-11 是第三步。



10. 固相萃取柱的重复使用

固相萃取柱生产厂商一般都强调其固相萃取柱是一次性使用的。但在实际工作中，人们为了降低成本往往希望固相萃取柱能够多次使用。我们曾经对美国瓦瑞安公司生产的 Bond Elut Certify 键合硅胶固相萃取柱的重复使用的可能性进行过评估 (J. Chromatogr. 137:619 ; 1993)。当样品基液是血浆时，这种固相萃取

柱在经过再生后可重复使用 2-3 次 (保持 80%以上的回收率)。也有人报道固相萃取柱可重复使用 10 次 (J. Chromatogr. 307:371 ;1986)。新型的薄膜型固相萃取柱的再生相对较为容易,反复使用的次数也会多一些。有人曾经试验重复使用这种固相萃取柱 15 次之多。对固相萃取柱的重复使用在很大程度上取决于样品基液的复杂程度。样品基液越复杂, SPE 柱重复使用的可能性就越小。

固相萃取膜片(SPE disk)的重复使用也是如此,在很大程度上取决于样品基质。如果样品中的干扰物在固相萃取膜片上不保留,或虽然保留,但通过一定的清洗、再生溶剂处理后能够基本恢复其原有的功能,则可以考虑重复使用。有的可以重复使用高达 10 次。

对固相萃取材料的重复使用必须谨慎。首先,使用过的固相萃取柱必须进行再生。而且最好是在使用完后马上进行再生。其次,对再生后的固相萃取柱必须进行评估以保证其本底和回收率都可以接受。另外,还要考虑一下再生的成本是否值得。

11. 固相萃取中的常见问题

问 题	原 因	解 决 方 法
在用反相 SPE 柱萃取时,洗脱馏份中有水。	1. 分析物洗脱之前 SPE 柱没有很好的干燥。	1. 用氮气或空气干燥 SPE 柱:用 20-100 微升含 60-90%甲醇的水将 SPE 柱上的残留水分除去。
最后馏份中含有干扰物。	1. 干扰物与分析物被同时洗脱。 2. 干扰物来自 SPE 柱。	1. 在洗脱分析物之前选用中等极性的溶剂将干扰物洗涤出 SPE 柱。可将两种或更多中兼容的溶剂混合以达到不同的极性。选用对分析物亲合力更大而对干扰物亲合力低的 SPE 柱。 用两根不同极性的 SPE 柱以除去干扰物。如反相柱然后离子交换柱或硅胶柱。 2. 在柱子预处理之前用洗脱溶剂洗涤 SPE 柱。
SPE 柱流速降低或阻塞。	1. 样品存在过多的颗粒。 2. 样品溶液粘度太大。	1. 对样品进行过滤或离心。 2. 用溶剂对样品进行稀释。
反相柱从固态样品中用萃取非极性分析物。	1. 分析物不在液体溶液中。	1. 用甲醇、异丙醇或乙腈对样品进行均浆处理。然后过滤或离心,再用水对清液进行稀释为含水量为 70-90%的水溶液。
用正相柱从固态样品中萃取分析物。	1. 分析物不在液体溶液中。	1. 用非极性溶剂 (如: 正己烷、石油醚、氯仿等)均浆。
用正相柱从脂肪样品中萃取分析物。	1. 脂肪可与分析物一起被洗脱出来或降低 SPE 柱的吸附容量。	1. 用正己烷溶解脂肪。冰冻除去凝结的脂肪。
用反相柱从含蛋白质的溶液 (血、血清、血浆) 中萃取分析物。	1. 分析物与蛋白质键合使分析物通过 SPE 柱而没有被保留。	1. 通过改变样品的 pH 值或用水对样品稀释破坏蛋白键合。 2. 加酸除蛋白质 (如: HClO ₄ 、TFA、TCA)。

		3. 加有机溶剂除蛋白质 (如: 乙腈、丙酮或甲醇)。离心、然后用水或缓冲溶液将上清液稀释至有机溶剂含量少于 10%。
从含有表面活性剂的溶液中萃取分析物。	1. 表面活性剂与 SPE 柱表面起作用。	1. 如果分析物是非离子状态, 可用离子交换柱除去表面活性剂离子。 2. 用二醇基柱除去非离子化的表面活性剂。
用常规柱 (60Å) 回收率低。	1. 蛋白质体积太大不能进入萃取柱的微孔。 2. 蛋白质不可逆地被吸附在反相 SPE 柱上。蛋白质在 SPE 柱担体微孔内变性。	1. 用 BAKERBOND 大孔径反相柱或离子交换柱。 2. 用 BAKERBOND 大孔径反相柱或离子交换柱。
分析物回收率低 被吸附在萃取柱上 (如分析物与基液一起通过 SPE 柱)	1. SPE 柱没有很好地被预处理。 2. SPE 柱的极性不合适。 3. 分析物对样品溶液的亲和力远远大于对 SPE 柱的亲和力。 4. 当大体积水样品。 5. 通过 SPE 柱时, 反相柱担体失去柱子预处理时留下的甲醇。	1. 反相柱: 用甲醇、异丙醇或乙腈处理柱子, 然后用稀释样品的溶剂处理柱子。注意不能让 SPE 柱变干。 2. 选择对分析物有明显选择性的 SPE 柱。 3. 改变极性 or 样品溶液的 pH 使分析物在样品溶液中的亲和力降低。 4. 在样品溶液中加入 1-2% 的甲醇或异丙醇或乙腈。
分析物回收率低 分析物没有被洗脱出 SPE 柱	1. SPE 柱的极性不合适。 2. 洗脱溶剂不够强, 无法将分析物从 SPE 柱上洗脱。 3. 洗脱溶剂体积太小 4. 分析物被不可逆地吸附在 SPE 担体上。担体-分析物作用力太强。	1. 选择其它低极性 or 选择性弱的 SPE 柱。 2. 改变洗脱溶剂的 pH 值以增加其对分析物的亲和力。 3. 增加溶剂体积。 4. 反相: 选择疏水性弱的担体。如果原来用的是 C18, 则改为 C8、C2 或 CN。 阳离子交换: 用羧酸取代苯磺酸。 阴离子交换: 用伯、仲胺代替叔胺。
萃取重现性差	1. 在添加样品之前 SPE 柱已枯。 2. SPE 柱超容量。 3. 样品过柱流速太快。 4. 洗脱液流速太快。 5. 分析物在样品中的溶解度太大, 分析物在样品过柱时与样品同时通过柱子而没有被保留。 6. SPE 柱用极性溶剂处理而洗脱溶剂是不兼容的非极性溶剂。	1. 重新进行 SPE 柱预处理。 2. 减少样品量 or 选择大容量柱。 3. 降低流速。特别是离子交换时流速应低于 5 mL/min。 4. 在使用外力之前让洗脱液渗透过柱。两次 500 微升洗脱可能比一次 1000 微升更有效。 5. 通过改变样品极性或 pH 值而改变分析物的溶解度。 6. 在使用非极性溶剂之前对 SPE 柱进行干燥。

	7. 洗涤杂质用的溶剂太强,部分分析物与杂质同时被从 SPE 柱洗涤。分析物在这一步损失的多少取决于洗涤溶剂的流速、SPE 的特性以及洗涤溶剂的体积。 8. 洗脱剂的体积太小。	7. 降低洗涤溶剂的强度。 8. 增加洗脱溶剂的体积。
--	--	---

12. 固相萃取中的 pKa 和 lg Kow

12.1 固相萃取中的 pKa

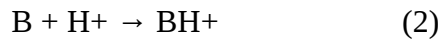
pKa 的基本定义

在固相萃取中,环境的 pH 值常常会对萃取结果起到十分重大的影响,特别是对弱酸性或弱碱性化合物。如果环境的 pH 选择不恰当,将会导致目标化合物回收率低,在离子交换固相萃取中,pH 的影响就更加显著。应此,在固相萃取中必须注意 pH 的影响。

根据酸碱质子理论,认为给出质子的为酸,其产物为对应的共轭碱,相应接受质子为碱,其产物为对应共轭酸。



HA 给出 H^+ 为酸,产物 A^- 为 HA 对应的共轭碱;



B 接受 H^+ 为碱,产物 BH^+ 为 B 对应的共轭酸。

对于 HA 和 A^- 组成的共轭酸碱对缓冲溶液,由(1)式可以推导出:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{A}^-]/[\text{HA}] \quad (3)$$

对于弱碱 B 和共轭碱 BH^+ 组成的溶液,由(2)可推导出:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{B}]/[\text{BH}^+] \quad (4)$$

由公式(3)和(4)可以看出,对于一个弱酸性(或弱碱性)化合物,当该化合物在溶液中 50%呈中性 50%呈离子状态时,溶液的 pH 就是该化合物的 pKa。

根据化合物 pKa 调节 pH

既然在固相萃取中萃取环境的 pH 十分重要。那么,在什么情况下应该注意 pH 值?应该如何调节 pH,在什么 pH 条件下进行固相萃取才是最佳的?

当目标化合物是弱酸性或弱碱性化合物时,就应该注意环境的 pH。

当用非极性机理进行固相萃取时(如使用 C18 SPE 柱),要调节环境的 pH,以保证目标化合物呈中性状态而被 SPE 柱的非极性官能团(例如:C18)吸附。要保证目标化合物 99%以上呈中性状态,就要根据目标化合物的 pKa 来调节 pH。根据 pKa 的基本定义中的公式(3)和(4)可知,环境的 pH 应该至少比目标化合物 pKa 低两个 pH 单位。

当用离子交换机理进行固相萃取时(如使用阳离子交换柱或阴离子交换柱),在吸附时(样品过柱)要调节 pH,以保证 99%以上的目标化合物呈离子状态,根据 pKa 的基本定义中的公式(3)和(4)可知,对于弱酸性化合物,吸附时的 pH 值应该调节到至少高于该酸性化合物 pKa 两个 pH 单位,在洗脱时,要保证 99%以上的弱酸性化合物呈中性状态,就要调节 pH 至少低于酸性化合物两个 pH 单位;对于弱碱性,则与弱酸性化合物相反,在吸附时,环境的 pH 应该比弱碱性化合物 pKa 低两个 pH 单位,而洗脱时,pH 至少要比弱碱性化合物

高两个 pH 单位。

例如，氯霉素的 $pK_a=9.61$ 。在用阳离子交换固相萃取对氯霉素（弱碱性化合物）进行萃取时，环境的酸碱度应该调节到 pH 7.61 以下。在此 pH 条件下，99% 的氯霉素呈阳离子状态，被阳离子交换树脂吸附；洗脱时，应该调节到 pH 11.61 以上。此时 99% 的氯霉素转化为中性状态，很容易被洗脱溶剂从阳离子交换柱上洗脱下来。

12.2 固相萃取中的 $\lg K_{ow}$ (辛醇-水分配系数 K_{ow})

有机化合物的正辛醇-水分配系数（ K_{ow} ）是指平衡状态下化合物在正辛醇和水相中浓度的比值。它反映了化合物在水相和有机相之间的转移能力，是描述有机化合物在环境中行为的重要物理化学参数。通常用其对数值 $\lg K_{ow}$ 来表示，也称为 $\lg P$ （疏水常数）。分配系数的数值越大，有机物在有机相中溶解度也越大，即在水中的溶解度越小。

$\lg K_{ow}$ 可以通过实验测定，也可以按一定的公式进行估算。在许多化合物理化手册或文献中和可以查到。