

微萃取技术在神经递质分析中的应用研究

余忠宁 张卓旻* 李攻科*

(中山大学化学学院, 广州 510275)

摘 要 神经递质 (Neurotransmitters, NTs) 是一类在生物体内起着重要调节作用的内源性化合物, 生物样品中 NTs 含量的准确测定对疾病早期诊断、药物开发、基础医学研究等领域的研究均具有重要意义。但是, 生物样品基体组成复杂, NTs 含量极低, 因此研发高效样品前处理技术是实现复杂生物样品中痕量 NTs 快速准确分析的关键。微萃取技术是使用微量富集介质为核心的绿色萃取技术, 具有成本低、使用方便、适于生物微(无)损分析、环境友好等优点, 是生物样品内源性物质分析的优秀前处理技术。本文系统评述了固相微萃取 (Solid-phase microextraction, SPME)、微固相萃取 (Micro-solid-phase extraction, μ -SPE) 和液相微萃取 (Liquid-phase microextraction, LPME) 等微萃取技术在生物样品中痕量 NTs 的高效富集及分析检测中的应用研究进展, 并对该领域的研究进行了总结与展望。

关键词 微萃取技术; 神经递质; 生物样品; 评述

1 引言

神经递质 (Neurotransmitters, NTs) 是一类在突触传递中担当“信使”的内源性化学物质, 目前已在生物体中鉴定出 200 余种 NTs 化学信使分子^[1]。根据化学组成的不同, 神经递质大致可分为单胺类 (Monoamine neurotransmitters, MNTs)、氨基酸类 (Amino acid neurotransmitters, AANTs)、肽类和其它类 NTs。MNTs 是神经元释放的主要化学信使, 可分为儿茶酚胺 (Catecholamines, CAs) 和吲哚胺两大类。儿茶酚胺主要包括去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE)、肾上腺素 (Epinephrine, E) 和多巴胺 (Dopamine, DA)。吲哚胺主要包括血清素 5-羟色胺 (5-Hydroxytryptamine, 5-HT)、异丙肾上腺素和酪胺等。AANTs 是具有神经递质功能的氨基酸, 由色氨酸 (Tryptophan, Trp)、酪氨酸 (Tyrosine, Tyr)、谷氨酸、天冬氨酸、 γ -氨基丁酸、甘氨酸和牛磺酸等组成。肽类神经递质是神经元所分泌的肽类化学物质^[2,3]。NTs 在调节人体的神经、免疫和心血管系统功能方面起着重要作用, 人体中 NTs 及其代谢物的含量变化已成为多种疾病诊疗过程中重要的诊断指标。如已证明帕金森病和精神分裂症与 DA 神经传递缺乏有关^[4], Trp 代谢失衡与肺癌和乳腺癌的发展密切相关^[5], 人尿液中 CAs 含量的增加与抑郁症的发生有潜在关系^[6]。因此, 生物样品尤其是人体中痕量 NTs 的准确测定, 对疾病早期诊断、药物开发、基础医学研究等领域有重要的科学指导意义。

早期的 NTs 含量测定方法主要为放射酶和免疫学方法, 由于不具备分离功能, 其选择性和灵敏度较低, 影响了分析结果的准确度。20 世纪 80 年代以来, 随着色谱技术的飞速发展, 液相色谱技术 (High performance liquid chromatography, HPLC) 和毛细管电泳 (Capillary electrophoresis, CE) 等技术逐渐取代放射酶和免疫学方法, 成为 NTs 分析测定的主流方法^[7]。色谱技术具有强大的分离分析功能, 且所需样品量少, 非常适合复杂生物样品中痕量 NTs 的准确测定。同时, 色谱技术可与多种检测器联用, 如荧光 (Fluorescence detection, FLD)^[8,9]、电化学 (Electrochemical detection, ECD)^[10]、紫外检测 (Ultraviolet detection, UV)^[11]、化学发光^[12]、生物传感器^[13]、酶联免疫吸附^[14]和质谱 (Mass spectrometry, MS)^[15-17]等, 大大扩展了生物样品中种类多样的 NTs 检测范围。尤其是色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 兼具定性与定量分析功能, 选择性好, 灵敏度高, 目前已成为复杂生物样品中痕量 NTs 分析的常用方法。

虽然, 色谱及色谱-质谱联用技术的发展, 较好地解决了 NTs 的检测问题, 但是生物样品基体组成复

2019-07-19 收稿; 2019-08-27 接受
本文系国家自然科学基金 (Nos. 21475154, 21675178, 21976213) 和广东省食品安全重点领域研发计划 (No. 2019B020211001) 资助
* E-mail: zzm@mail.sysu.edu.cn; cesgkl@mail.sysu.edu.cn

杂,存在大量蛋白质、脂类、磷酸盐等基体成分,易在 NTs 的分析过程中产生严重干扰。同时,NTs 含量低,化学稳定性不佳,容易发生自发异构现象。此外,生物样品常难以获取,数量受限制^[18]。因此,研发适合的高效样品前处理技术是有效提高复杂生物样品中痕量 NTs 分析灵敏度及准确度的关键。目前,文献报道了尿液、脑脊液、血浆、唾液、血清和血小板等生物样品 NTs 分析的前处理技术,主要包括液-液萃取法(Liquid-liquid extraction, LLE)、固相萃取法(Solid-phase extraction, SPE)、微透析技术(Microdialysis, MD)和微萃取技术。LLE 是 NTs 分析的早期样品前处理方法,操作繁琐耗时,使用大量有机溶剂,萃取选择性不佳^[19]。SPE 是目前 NTs 分析研究中应用最广的前处理方法,利用固体吸附介质对目标物的吸附,分离和富集目标物,适用于多种生物样品中 NTs 的分离富集^[20]。与传统 LLE 相比,SPE 具有操作简便、溶剂用量少、回收率高、重现性好等优点,但常需经过溶剂转换、长时间洗脱及氮吹浓缩等繁琐操作步骤,分析检测效率较低。微透析技术是目前常见的原位活体采样方法,兼“采样”和“前处理”于一体,所采样品可直接用于分析,最早用于大脑内部 NTs 释放与代谢的研究^[21]。但是,MD 探针成本高,采样量极少,回收率校准困难,很难重复使用,这些都限制了 MD 技术的实际应用。电子版文后支持信息表 S1 列举了近年来生物样品中 NTs 分析常见的前处理及检测方法^[22~42]。

微萃取技术是使用微量富集介质为核心的无溶剂或少溶剂萃取技术,与传统的提取方法相比,具有成本低、使用方便、环境友好等优点,是新兴的高效分离富集技术。按照形式的不同,微萃取技术主要分为固相微萃取(SPME)、微固相萃取(μ -SPE)和液相微萃取(LPME)。微萃取涂层或萃取相体积微小、富集效率高,非常适合小体积生化样品中痕量目标物的分离富集,容易实现活体生物样品的原位、微损伤分析,因此,微萃取技术已被认为是生物样品内源性物质(如 NTs 及其代谢物等)的优势前处理技术,引起了研究人员的广泛关注^[43]。本文系统评述了 SPME、 μ -SPE 和 LPME 等微萃取技术在生物样品中痕量 NTs 的高效富集及分析检测的应用研究进展,并对该领域的研究进行了总结与展望。

2 固相微萃取

固相微萃取(SPME)是基于待测组分与萃取涂层之间分配平衡的新型前处理方法,集采样、萃取、富集和进样于一体,具有操作简便、耗时短、不(少)使用有机溶剂、萃取效率高且易与其它仪器联用等优点。目前,SPME 技术已广泛用于各种复杂生物样品中痕量 NTs 的分离与分析研究。SPME 技术根据萃取涂层形式的不同,主要可分为纤维头式固相微萃取(Fiber-SPME)、管内固相微萃取(In-Tube-SPME, IT-SPME)和搅拌棒式固相微萃取等,目前用于 NTs 分离分析的 SPME 技术主要是 Fiber-SPME 和 IT-SPME。

2.1 纤维头式固相微萃取

Fiber-SPME 是目前发展最为成熟的 SPME 技术,具有操作简单、携带方便、可重复使用、环境友好等特点,其装置组成包括纤维头、可移动手柄和注射器。Fiber-SPME 纤维头是表面涂覆了不同类型吸附剂的熔融石英纤维涂层,是 Fiber-SPME 技术的核心,决定了 SPME 的选择性和富集容量。Fiber-SPME 涂层一般需要满足以下条件:(1)对目标物具有一定萃取富集能力;(2)萃取后目标物能从涂层上较快解吸下来;(3)有良好的热稳定性及耐酸碱、耐溶剂性能。目前,商品化的 SPME 涂层主要包括聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)、聚二甲基硅氧烷-二乙烯基苯(Polydimethylsiloxane-divinylbenzene, PDMS-DVB)、聚丙烯酸酯(Polyacrylate, PA)、聚乙二醇-模板树脂(Carbowax-templated resin, CW-TPR)、碳分子筛-聚二甲基硅氧烷(Carboxen-polydimethylsiloxane, CAR-PDMS)和聚乙二醇-二乙烯基苯(Carbowax-divinylbenzene, CW-DVB)。商品化 SPME 涂层简单易得,已有研究者将其应用于生物样品中痕量 NTs 的分析研究。Auger 等^[44]对比了 4 种商品化 SPME 涂层(PDMS-DVB、PA、PDMS、CW-TPR)对 MNTs 的萃取效果,其中 CW-TPR 涂层萃取性能最好,结合 HPLC-ED 检测,建立了大鼠纹状体中痕量 MNTs 的定量分析方法,检出限可达 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。衍生化是常用的前处理手段,可将待测物转化为适合分析检测的形式。由于 MNTs 常具有强极性基团,如氨基和酚羟基,因此极性较大,挥发性较弱,常规的气相色谱无法满足检测需求。通过选用合适的衍生化试剂,则可将这些基团转化为弱极性基团,以提高其挥发性。Naccarato 等^[41]采用氯甲酸丙酯快速衍生化 MNTs,使目标物极性降低,挥发性提高,然后采用 PA Fiber-SPME 结合 GC-MS 检测,建立了尿液中 DA、5-HT、NE 的分析方法,检出限分别为

0.59、0.38 和 13.5 $\mu\text{g/L}$ 。

商品化 SPME 涂层的萃取机理主要是基于“相似相溶”原理,由于选择性较差,限制了其更广泛的研究与应用,因而研发高选择性 NTs 的 SPME 涂层成为目前的研究热点。Cudjoe 等^[24]将硅基和聚合物载体基混合制备了多种阴阳离子混合型 SPME 涂层,结合 LC-MS/MS 技术,建立了生物样品中 NTs 的定量分析方法。混合型 SPME 涂层具有疏水和亲水机制下多重相互作用的特点,对 4 种不同极性的 NTs (DA、5-HT、谷氨酸和 γ -氨基丁酸)均可实现高效萃取富集,将该方法应用于脑脊液和大鼠脑组织中 NTs 的分析,检出限为 6 ~ 10 ng/L 。分子印迹聚合物 (Molecularly-imprinted polymer, MIP) 也被称为人工抗体,具有模板分子的特异性识别位点,能有效提高目标分子的选择性识别,同时 MIP 具有化学稳定性高、制备简便、使用寿命长等特点^[45]。因此,将 MIP 固载成 SPME 涂层,可有效提高 SPME 的选择性,并可显著提高复杂生物样品基质中 SPME 的抗干扰性能。Prasad 等^[46]通过溶胶-凝胶法在聚甲基丙烯酸甲酯纤维表面制备了可特异性识别 DA 的 MIP 涂层,并通过悬浮汞滴电极表面修饰 DA-MIP 进行二次预浓缩,结合差分脉冲和阴极剥离伏安法对 DA 进行检测,成功实现了人体血清、脑脊液及药物样品中 DA 含量的准确测定。在双重 MIP 涂层材料的预富集作用下,实际样品中 DA 的分析灵敏度及选择性都得到较大提高,检出限为 1.82 ~ 1.89 $\mu\text{g/L}$,相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD) 为 1.1% ~ 2.1%。Zhang 等^[37]以 E 作为模板,在 25 cm 柔性毛细管模具内通过热诱导甲基丙烯酸 (Methacrylic acid, MAA) 和乙二醇二甲基丙烯酸酯 (Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA) 自由基共聚合,制备了高选择性的 MIP SPME 涂层,并结合 CE 用于人体尿液和血清样品中 CAs 的定量分析。所制备的涂层具有良好的整体性和足够的柔韧性,使用寿命长,同时涂层厚度均匀,萃取分析重现性好。在最优分析条件下,DA、E、NE 的检出限可分别达到 7.4、4.8 和 7.1 nmol/L ,回收率为 85% ~ 103%。

离子液体 (Ionic liquids, ILs) 主要是熔点小于 100 $^{\circ}\text{C}$ 的有机阴阳离子熔融盐,可通过调整有机配体的结构,实现 ILs 极性的有效调控,从而可根据不同极性 NTs 的结构特点实现选择性萃取。此外,ILs 可循环使用、不挥发,避免了传统有机溶剂造成的环境污染,是理想的绿色溶剂。同时,ILs 电导率高、电化学窗口大,有利于与电化学分析技术联用分析生物样品中的 NTs^[47]。因此,将 ILs 作为 SPME 涂层可减少试剂消耗量,提高方法自动化程度,ILs-SPME 在 NTs 的分析研究上有着良好的应用前景。目前,ILs-SPME 用于 NTs 分析的报道主要是 ILs 作为 SPME 脱附剂的应用。Baczek 研究组^[48]首次将 ILs-SPME 技术用于生物样品中 NTs 的含量测定,使用聚苯乙烯-二乙烯基苯 SPME 涂层富集 NTs,并采用离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐作为脱附剂,结合胶束电动色谱-二极管阵列检测技术进行分离分析,使人体尿液样本中 NTs 的分析灵敏度提高了 9 ~ 21 倍。他们成功地将该方法用于不同肿瘤患儿尿液中多种 NTs 的定量分析^[40]。此外,该课题组^[49]还对比了 SPE、分散液液微萃取 (Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)、ILs-SPME 方法对生物样品中 NTs 的分离富集效果,结合胶束电动色谱-二极管阵列检测技术,对大鼠脑样品中 9 种特定的 NTs 进行分离分析。与 DLLME 技术相比,ILs-SPME 对 DA、NE 的萃取率分别提高了 2 和 3.5 倍,且基质去除的效果更好。而与 SPE 技术相比,ILs-SPME 的萃取率也有显著提高,并且无需衍生化,充分说明 ILs-SPME 技术在大鼠脑样品中 NTs 含量测定中具有优势,为神经学临床研究提供了重要工具。

Fiber SPME 由于涂层体积小,非常适合进行生物组织的活体无(微)损采样,同时由于 SPME 涂层高效的富集能力,相比于常用的 MD 活体分析技术,常可原位捕获更多的生物活性物质,提供大量实时的生物信息^[50]。大脑是生物的信息处理中枢,结构复杂,能产生多种 NTs 且含量水平实时变化,为了不改变或丢失有价值信息,最有效的办法便是发展原位活体采样技术,从而获得准确的生物信息。此类研究中生物兼容性 SPME 涂层的研发是发展生物体中 NTs 原位活体采样分析技术的关键。目前,已有一些生物兼容性优良的 SPME 涂层应用于生物活体 NTs 采样分析的研究报道。Pawliszyn 课题组^[51]报道了 Fiber SPME 可有效应用于生物活体中 NTs 的原位实时采样分析,并能获得比常规 MD 技术更多的生物信息。之后,该课题组^[52]选用表面修饰强阳离子交换基团的亲水-亲脂平衡材料作为 SPME 涂层,并通过优化 Fiber SPME 涂层的形状和采样条件,结合 LC-MS/MS 定量分析,建立了猕猴大脑活体内多种 NTs 的实时原位分析方法 (图 1)。研究结果表明,SPME-HPLC-MS/MS 联用活体采样分析方法具有较高

的准确度,适合于生物活体中痕量 NTs 的原位实时检测。这些研究表明 SPME 技术是一种优秀的生物活体 NTs 采样技术,是 MD 技术的有益补充和拓展。未来,随着生物兼容性涂层的进一步研发和原位检测技术的发展,相信 SPME 技术在生物活体 NTs 的原位实时分析方向上将迎来更大的发展。

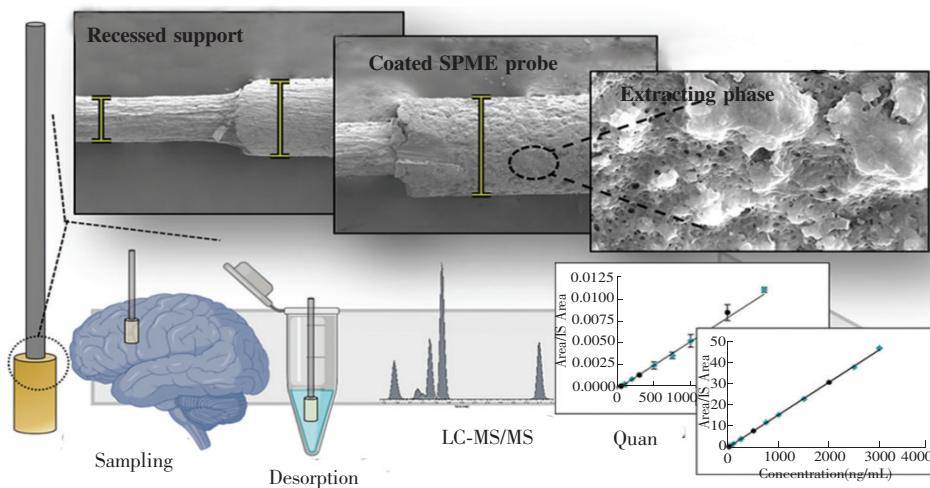


图 1 Fiber SPME-LC-MS/MS 联用活体采样分析方法示意图^[52]

Fig. 1 Schematic of the sampling and analysis method using fiber solid phase microextraction (SPME) coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) *in vivo*^[52]

2.2 管内固相微萃取

IT-SPME 技术采用石英柱或毛细管作为萃取介质的载体,将萃取固定相与毛细管的内表面交联键合,克服了 Fiber-SPME 技术涂层纤维容易折断、吸附量低、固定相涂层容易流失以及萃取平衡时间长等问题,同时它还具有萃取涂层薄、萃取固定相选择范围广、样品扩散迅速、易与其它分析仪器在线联用及自动化程度高等特点,但在萃取效率、选择性和机械稳定性等方面仍有很大提升空间。

柱内萃取涂层是 IT-SPME 技术的核心,决定了萃取柱对目标物的萃取效率和选择性。IT-SPME 通常使用商业毛细管柱进行萃取,其成本较低,适用范围也较广,但由于其吸附剂负载能力不高、稳定性低、选择性差,在用于基质复杂的痕量物质如生物样品中 NTs 分析时有很大的局限性。因此,开发具有更高萃取效率和选择性的新型萃取涂层已成为当前 IT-SPME 技术的主要研究方向。溶胶-凝胶技术是最常见的 IT-SPME 涂层制备技术,将反应前驱体及固定相在石英管壁上直接反应,不同的涂层常具有不同的极性和多孔结构,引入特定官能团则可进一步提高萃取介质的选择性。溶胶-凝胶技术过程简单,制备的 SPME 涂层稳定性较好,目前已有一些报道采用溶胶-凝胶技术制备新型 IT-SPME 涂层并用于 NTs 的分析研究。如图 2 所示,Tran 等^[53]选用乙醇钽(V)作为溶胶-凝胶前驱体,端羟基聚丙烯乙二醇甲基丙烯酸酯作为溶胶-凝胶活性聚合物,通过溶胶-凝胶反应在熔融石英毛细管内合成新型有机-无机杂化涂层。该 IT-SPME 涂层与毛细管内表面通过直接化学键合方式连接,相比传统的硅基涂层具有更高的溶剂稳定性及 pH 稳定性(pH 0~14)。该 IT-SPME 涂层对水样中的多种 NTs 具有优异的萃取效率,检出限在 4.41~28.19 pmol/L 之间,适用于极端 pH 下环境或生物样品的 NTs 分析。Alhendal 等^[54]采用非水解溶胶-凝胶法合成了新型氧化锆-聚丙烯(ZrO₂-PPO) IT-SPME 涂层,用于 CAs 及其脱胺代谢物的微萃取分析。结果表明,ZrO₂-PPO IT-SPME 涂层具有良好 pH 稳定性,对 CAs 及其代谢物具有优异的分选富集性能,检出限为 5.6~9.6 pmol/L。

硼酸盐亲和材料是一种高选择性吸附顺式二醇结构化合物(包括核苷、糖蛋白、糖肽和 CAs 等)的理想吸附介质。硼酸盐在碱性水介质中可通过共价键与顺式二醇生成五元或六元环酯;当介质 pH 值呈酸性时,所生成的环酯可发生可逆电离,释放出硼酸和顺式二醇。因此,只需调整介质 pH 值,即可方便地控制捕获/释放过程^[55]。由于硼酸盐亲和材料的特异性萃取和分离性能,目前已有报道将其用于制备 IT-SPME 涂层,并用于生物样品中 CAs 的萃取分析。He 等^[42]利用乙烯基苯基硼酸

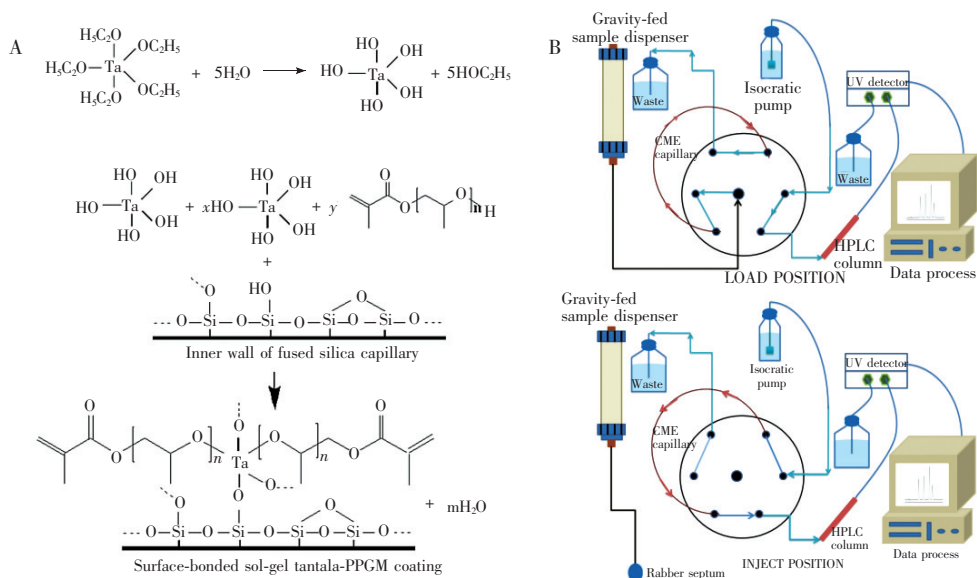


图 2 (A) 熔融石英毛细管内溶胶-凝胶涂层表面键合过程; (B) IT-SPME-HPLC 联用在线分析装置图^[53]

Fig. 2 (A) Sol-gel coating surface-bonded process inside a fused-silica capillary; (B) Schematic of experimental setup for online in-tube-SPME-high performance liquid chromatography (IT-SPME-HPLC) analysis^[53]

(Vinylphenylboronic acid, VPBA) 与乙二醇二甲基丙烯酸酯的共聚反应,在毛细管内表面制备了硼酸盐亲和和萃取涂层,通过与 LC-MS 的在线联用,成功应用于人体尿样中 DA 的检测,检出限可达 $1.2 \mu\text{g/L}$ 。IT-SPME 涂层固载过程除了可将涂层直接固载于管内壁,还可将修饰了特异性吸附剂的纤维填充于管内,从而增加 IT-SPME 萃取相的量,减小管内死体积,显著改善萃取容量和色谱峰型。Ling 等^[56]采用电化学一步合成法将可导电吸附剂聚噻吩-3-硼酸盐在碳纤维束表面进行电化学沉积,并将改性后的纤维束填充入聚醚醚酮 (Polyether ether ketone, PEEK) 管中制备得到硼酸盐萃取柱,结合 HPLC-UV 在线分析了大鼠血浆中的 CAs 含量,方法检出限为 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{g/L}$ 。由于采用电化学方法合成聚合物吸附剂,该方法无需催化剂与致孔剂,其稳定性好,易于改性,并提高了分析过程的选择性。

3 微固相萃取

SPME 虽然具有较高的萃取效率,但受涂层体积的限制,其萃取容量低。传统的 SPE 可填充大量的吸附剂,但由于沟流等现象,使得吸附剂容易流失,重现性和使用寿命不佳,而且,由于 SPE 尺寸较大,不易与后续的检测仪器联用。 μ -SPE 技术的萃取容量大于 SPME 技术,尺寸比常规 SPE 技术小,装置简单、成本低,易实现与后续检测仪器的在线联用^[57],因此成为了生物样品中 NTs 分析的优秀前处理技术。而且, μ -SPE 技术可通过填充或固载不同类型的吸附剂,方便地调节采样过程的萃取容量和选择性,与后续检测技术在线联用后,非常有利于生物样品中痕量 NTs 的高效分离富集和高灵敏检测。目前,应用于生物样品 NTs 分析的 μ -SPE 技术根据吸附剂形式的不同,可分为填充吸附微萃取 (Microextraction by packed sorbent, MEPS)、整体柱微固相萃取 (Monolithic micro solid-phase extraction, MMSPE) 和分散微固相萃取 (Dispersive micro solid-phase extraction, DMSPE)。

3.1 填充吸附微萃取

MEPS 技术通常是将 1 mg 左右的吸附剂填充到 $100 \sim 250 \mu\text{L}$ 注射器或其它柱容器中,待测液上样后,加入小体积洗脱液即可解吸,再进行色谱分析。与传统 SPE 相比,MEPS 技术具有操作简便、可在线全自动、快速、溶剂用量和样品体积小、分析成本低等优点^[58],已被广泛用于生物样品的分离分析,是生物样品 NTs 分析中经常使用的前处理方法之一。但某些大分子基体物质 (如血浆、尿液) 中的大分子量杂质可能造成吸附剂的堵塞,使吸附效率下降;粘附性强的杂质可能在洗脱液中残留使仪器噪音增大^[59],一般可通过稀释样品基质、反复洗脱等方法进行优化,以获得最佳分离富集效果。

商品化 MEPS 吸附剂包括 C_{18} 、 C_8 、 C_8 /SCX 和氨基丙基硅烷 (Amino-propyl silane, APS) 等,具有性能稳定、价格低廉的优点,已被广泛用于生物样品中 NTs 的分离分析。El-Beqqali 等^[36]采用 Slica- C_8 MEPS 技术富集人体尿液中 DA 和 5-HT,并结合 LC-MS/MS 进行测定,检出限为 $1.0\text{ }\mu\text{g/L}$,所选用的 Slica- C_8 MEPS 小柱可重复使用 300 余次。Saracino 等^[60]将 Slica- C_{18} MEPS 与 HPLC-ED 联用,建立了同时测定干燥血浆和尿斑中 CAs 含量的分析方法,回收率 $>85\%$,定量限为 100 ng/L 。该方法选用干燥的血浆和尿斑作为分析样品,由于无需冷冻来阻止细菌和/或酶的降解,方便了生物样本的运输和储存,最终成功应用于健康志愿者、精神病患者及多药滥用者群体中 CAs 水平的监测。Konieczna 等^[61]采用半自动化注射器研发了一种数字控制 MEPS-LC/MS 方法,同时测定了人体血浆和尿液样本中 12 种生物胺及其前体和代谢物。该方法无需衍生化,降低了溶剂和样品消耗,同时有效缩短了分析时间,耗时仅为 12 min。所选用的极性 APS 吸附剂经过 50 次萃取,其效率仍未降低。除了商业吸附剂,已有报道开发了新型 MEPS 吸附剂,并用于生物样品 NTs 的分析研究。本课题组^[28]成功合成了丙烯酰胺功能化石墨烯 (Acrylamide-functionalized grapheme, G-AM) 吸附剂,将 G-AM 填充于自制的 PEEK 微柱中,结合 HPLC 技术构建了在线分离分析系统,并成功用于人尿液和血浆中同香草酸、5-羟基吲哚-3-乙酸、3,4-二羟基苯乙酸等 3 种 MNTs 代谢物的在线分离分析,检出限为 $0.08\sim0.25\text{ }\mu\text{g/L}$ 。G-AM 对 3,4-二羟基苯乙酸的萃取性能相比商业 C_{18} 和多壁碳纳米管提高了 8.5~25 倍,这一方面是由于 G-AM 与分析物之间的强亲和力,另一方面则是丙烯酰胺的功能化大大提高了石墨烯的亲水性,使其更适合于极性分析物的萃取过程。

3.2 整体柱微固相萃取

整体柱是 20 世纪 80 年代后期提出的一种由单体原位聚合得到整体棒状材料的分离介质制备技术,已在液相色谱固定相等领域得到广泛应用^[62]。通过在毛细管、PEEK 管等微管内制备整体柱进行萃取即为整体柱微固相萃取技术,现已成为样品前处理技术的重要形式之一。MMSPE 技术通常采用双连续结构和双孔分布,从而具有优异的分离富集性能,非常适合于高通量分离分析。此外,由于整体柱型萃取介质的总量相比涂层介质有了很大提高,其萃取容量也得到了显著提高。目前已有采用聚丙烯酰胺类整体柱、聚丙烯酸酯类整体柱和聚合物离子液体整体柱对生物样品中 NTs 进行分离分析的报道。

聚丙烯酰胺类整体柱是典型的水相聚合体系,单体可溶于水,具有较好的生物相容性,但其机械强度较差。如图 3 所示,本课题组^[29]在不锈钢毛细管柱上原位聚合硼酸盐亲和材料 VPBA 和 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺 (N,N' -methylenebisacrylamide, MBAA),制备了聚丙烯酰胺类整体柱 poly(VBPA-co-MBAA),并以六通阀为接口,实现与 HPLC 的在线联用,并成功应用于人体尿液中 MNTs 的检测。由于硼酸盐材料的高效萃取能力,该整体柱有良好的渗透性、较高的萃取能力和选择性,所建立的在线分析方法检出限为 $0.06\sim0.80\text{ }\mu\text{g/L}$,日内与日间的 RSDs 分别为 $2.1\%\sim8.2\%$ 和 $3.7\%\sim10.6\%$ 。

聚丙烯酸酯类整体柱具有优异的溶胀性能和理想的机械强度,以及良好的酸碱稳定性,并能通过改性或改变单体调整整体柱的萃取选择性。Espina-Benitez 等^[38]以甲基丙烯酸缩水甘油酯为单体,EGDMA 为交联剂制备了聚丙烯酸酯类整体柱,使用 3-氨基苯基硼酸对整体柱作表面功能化处理,然后在毛细管等电聚焦的模式下成功分离测定了人体尿液中 CAs 的含量。该方法基于等电聚焦过程的特殊聚焦特性,实现了 100 mm 内径整体柱与 50 mm 内径羟丙基涂层毛细管的耦合,显著提高了毛细管电泳紫外检测的灵敏度,检出限可达 $10\sim21\text{ }\mu\text{g/L}$ 。Wu 等^[30]通过苄胺和 1,2-二苯基乙二胺对目标物进行两步柱前衍生化,采用 poly(MAA-co-EGDMA) 整体柱进行萃取,并结合 HPLC-FLD 法建立了尿液中 CAs 及其代谢物 5-羟基吲哚胺的同时分析方法,检出限为 $0.11\sim21\text{ nmol/L}$ 。另外,该课题组^[63]通过所开发的荧光衍生化试剂对样品进行原位衍生化预处理,再采用聚(3-丙烯酰胺基苯基硼酸-二甲基丙烯酸酯)整体柱进行萃取,结合 HPLC-FLD 检测,建立了小鼠血浆样品中 CAs 的分析方法。与常用的 SPE 衍生化方法相比,该方法检出限低至 $0.06\sim0.20\text{ nmol/L}$,且操作步骤更少、灵敏度更高。

聚合物离子液体 (Polymeric ionic liquids, PILs) 不仅结合了 ILs 的优点,还具有优异的热稳定性、高萃取效率和较长使用寿命的特点。将离子液体与交联化合物协同聚合制备得到交联聚合物离子液体,可有效克服有机溶剂溶胀的问题,进一步提高萃取性能。Zhou 等^[64]选用二乙烯基苯为单体,二甲基亚砜为致孔剂,与 1-乙烯基-3-丙基苯基咪唑氯发生共聚反应制备得到 PILs,再将 PILs 与二苯基硼酸交联

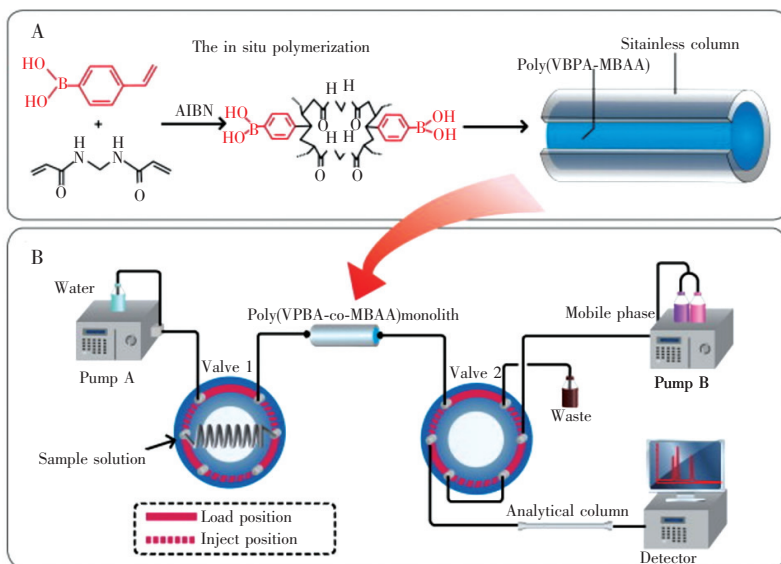


图 3 (A) 整体柱 poly (VBPA-co-MBAA) 制备过程; (B) 整体柱微固相萃取与 HPLC 在线联用系统图^[29]
 Fig. 3 (A) Preparation of poly (VBPA-co-MBAA) monolithic column; (B) Schematic diagram of the online monolithic column μ -SPE system coupled with HPLC^[29]

得到 PILs-二苯基硼酸整体柱,结合 HPLC-ECD 对大鼠血液微透析液中 3 种 CAs 进行了萃取分离和定量分析。PILs 与二苯基硼酸的交联克服了萃取剂在有机溶剂使用后发生溶胀的问题,获得了良好的萃取性能,分析时间仅需 8 min,检出限为 0.02 ~ 0.04 $\mu\text{g/L}$,RSD 为 6.5% ~ 7.7%。

3.3 分散微固相萃取

萃取效率很大程度上取决于吸附剂的粒径和表面积,而吸附剂颗粒的高聚集趋势是制约微固相萃取效率的主要因素之一。通过制备均匀分散的小颗粒吸附介质可有效增加吸附剂的表面积,提高萃取效率。DMSPE 是一种快速、简单的微型化前处理技术,它将吸附剂分散于样品溶液中,通过漩涡离心等外力辅助萃取过程并完成相分离^[65]。与传统 SPE 相比,DMSPE 可避免通道堵塞的问题,增大萃取剂与分析物之间的接触面积,提升萃取容量,节省萃取时间,从而有效提高萃取效率。DMSPE 技术的关键在于用极少量的萃取剂提供很高的萃取效率,从而保证目标物的充分富集,因此,开发具有高比表面积、高稳定性和高选择性的新型萃取材料一直是 DMSPE 技术的研究热点。目前,已有新型 DMSPE 技术用于生物样品中 NTs 高效分离分析的研究报道。Abdolmohammad-Zadeh 等^[66]选用镍-铝层状双氢氧化物 (Layered double hydroxide, LDH) 为萃取剂,从人血清中提取多巴胺。采用 LDH 溶胶溶液作为分散固相微萃取器,并在 285 nm 激发波长和 315 nm 发射波长下采用荧光光谱法直接测定。结果表明,采用 LDH DMSPE 技术可使 DA 荧光强度提高近 5 倍,方法检出限为 0.015 $\mu\text{g/L}$ 。

磁性纳米颗粒作为一种新型 DMSPE 萃取剂,采用磁分离技术实现基体与萃取剂的快速分离,分离富集速度快,操作简单,近年来受到广泛关注^[67]。Jiang 等^[68]采用多步共价修饰法制备了 3-氨基苯基硼酸功能化磁性纳米颗粒,结合 HPLC-ECD 技术对人尿中 3 种 CAs 进行测定,检出限为 2.0 ~ 7.9 $\mu\text{g/L}$ 。由于 3-氨基苯基硼酸仅通过酸碱相互作用吸附在磁性纳米颗粒上,其萃取效率有限,检出限无法满足实际血样中 CAs 的定量要求。Saraji 等^[31]采用溶胶凝胶法制备了含有硅氧层磁性纳米粒子,然后用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷和戊二醛将 3-氨基苯基硼酸通过共价键与纳米粒子交联,制得新型选择性吸附剂,并结合 HPLC-FLD 检测,成功实现了血浆和尿液中 CAs 的定量分析,定量限可达 0.04 ~ 0.06 $\mu\text{g/L}$ 。He 等^[69]制备了亚氨基二乙酸铜(II)功能化 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ 磁性纳米颗粒作为新型吸附剂,结合 HPLC-FLD 检测,建立了家兔血浆中 6 种 MNTs 的定量分析方法。在 pH=5.0 的条件下,MNTs 的氨基与固定化铜之间的特异性配位相互作用可有效提高萃取选择性,同时,弱酸性的萃取条件可有效避免 MNTs 的氧化,提高萃取效率。在最优条件下,该方法检出限为 0.16 ~ 0.43 mg/L。Avan 等^[70]采用共沉

淀法合成了磁性 Fe_3O_4 @Diaion HP-2MG 复合材料作为萃取剂,通过一次性石墨烯丝网印刷碳电极方波伏安法成功测定了尿样中 DA 的含量,检出限为 5.0 nmol/L。此外,还有报道将 MIP 材料用于新型磁性 DMSPE 萃取剂的研究。磁性 MIP(Magnetic molecularly imprinted polymer, MMIP)与 MIP 相比,其纳米级的结构使其具有更好的溶剂分散性,并且由于其能在磁性分离器中被快速分离,大大缩短了繁琐的离心时间,有效提高分离分析效率。Bouri 等^[71]以 DA 为模板分子,甲基丙烯酸为交联剂, Fe_3O_4 为磁性组分,制备了 MMIP 材料,采用毛细管电泳-二极管阵列检测技术测定脱附的分析物,成功建立了人尿液样本中 CAs 的快速、高选择性分离分析方法。萃取完成后,MMIP 和捕获的分析物很容易被外加磁场从样品基体中分离出来。在最佳条件下,方法检出限为 0.04 ~ 0.06 $\mu\text{mol/L}$,RSD 为 2.9% ~ 5.5%。Claude 等^[72]采用 MIP-DMSPE 去除尿样中盐和基质分子,并预浓缩分析物,再通过现场放大样品注射,结合 CE-UV 检测,建立了人尿样本中 CAs、甲肾上腺素和吲哚胺的高灵敏分析方法,检出限为 6 ~ 10 nmol/L。

4 液相微萃取

液相微萃取技术(LPME)自 1996 年首次提出后得到了快速发展^[73]。与传统的 LLE 技术相比,LPME 技术操作简便,所需溶剂极少,富集倍数大,集萃取、净化、浓缩和预分离于一体,并易与 GC、HPLC、CE 等现代分离检测技术联用,已逐渐应用于生物样品前处理中^[74]。目前,将 LPME 技术应用于生物样品中 NTs,可分为直接液液微萃取(Liquid-liquid microextraction, LLME)及衍生化 LLME。

4.1 直接液液微萃取

DLLME 是由 Rezaee 等于 2006 年提出的一种常用的 LLME 技术^[75]。该技术通过加入与水溶液和萃取剂均互溶的分散剂形成乳浊液,再通过离心分离实现水相中待测物的快速萃取。分散剂的加入使萃取相与水相之间的表面接触大大增加,从而加速了分析物从样品基体到萃取剂相的传质。由于 DLLME 具有简单快速、高效、成本低、有机溶剂用量少的优点,成为目前生物样品中 NTs 分析中最常用的 LLME 技术^[76,77]。由于 NTs 多为亲水性化合物,一般有机溶剂难以萃取,为了实现 NTs 的高效富集分离,常在直接 LLME 过程中结合其它技术,以强化萃取过程,提高 LLME 的效率^[78]。

离子液体(ILs)作为绿色萃取溶剂,近年来在 LLME 中得到了广泛应用。Jha 等^[25]通过离子液体超声辅助 DLLME 方法,结合 LC-MS/MS 快速、同时测定了大鼠脑、血浆和细胞样品中的 15 种 NTs。他们选用离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐作为萃取剂,乙腈作为分散剂。该方法无需衍生化,耗时短,从样品制备到定量测定,整个分析过程不超过 15 min,NTs 的检出限为 0.021 ~ 0.978 $\mu\text{g/L}$ 。Xie 等^[79]构建了石墨烯片/离子液体纳米复合修饰电极,用于 DA 的原位电化学 LLME。该研究将石墨烯片浸渍在与水溶液接触的离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸中,形成三相体系,采用控制电位电解法从水样中原位提取预富集 DA 到离子液体中,然后通过方波伏安溶出分析法测定 DA 含量。该方法抗基体干扰能力强,在高浓度的抗坏血酸和尿酸等基底存在下,DA 的检出限仍可达 8.0 nmol/L。

超声辅助乳化微萃取(Ultrasound-assisted emulsification microextraction, USAEME)利用超声乳化作用,将萃取溶剂均匀稳定地分散到液体样本,避免 DLLME 中使用分散剂,具有环保、萃取效率高、有机溶剂少、操作简单等优点。然而,乳化微萃取中使用的萃取相多局限于比水重的有机溶剂,与 CE 分析过程不匹配。为了适应 CE 分析的需求,Huang 等^[39]采用两个串联 USAEMEs 预处理尿液样品,并结合 CE 建立了一种简便、灵敏的同时测定尿液中 5-HT 的分析方法。此串联 USAEMEs 程序包括从样品溶液(含 K_2CO_3 添加剂的尿液)中萃取分析物到有机溶液中,然后从有机相反萃取到少量 HCl 溶液中。样品预处理 15 min 后,采用毛细管区带电泳模式直接分析酸性受体溶液。HCl 不仅提供了有效的反萃取介质,而且在 CE 分析中促进了 pH 介导的柱上堆积。该方法使得 5-HT 检测的灵敏度提高了 360 倍,检出限可达到 7.9 nmol/L。Jiang 等^[34]开发了一种固化剥离相的新型载体介导 LLME 技术,并结合 HPLC-ECD 测定了人体尿液中的 MNTs 含量(图 4)。由于亲水性的 MNTs 难以直接被有机相萃取,他们首先采用二乙基己基磷酸和三辛基氧膦混合载体介导有机相萃取样品溶液中的 MNTs,再利用微量 HCl 溶液作为剥离溶液对有机相进行反萃取。反萃取结束后,将 HCl 冷冻凝固以便于与有机相分离,在室温下融化的剥离相可直接用于 HPLC-ECD 分析。采用水相代替有机相注入 HPLC,不仅避免了有机相注

入对色谱柱的污染,而且提高了 LPME 注射液与 HPLC 流动相的相容性,方法检出限为 5.5 ~ 10.8 $\mu\text{g/L}$,日内和日间相对标准偏差均低于 13%。

4.2 衍生化液相微萃取

衍生化技术通常借助化学反应将衍生化试剂所含有的色谱或质谱增敏功能基团引入到检测物中,从而显著提高分析物的灵敏度、选择性和准确度。近年来,原位衍生化 DLLME 技术因其在简化实验过程,减少样品损失,提高方法灵敏度,降低基体干扰等方面的优势,已应用于生物样品 NTs 的分离与分析。

为了改善色谱分离,提高 LC-MS 检测的灵敏度,He 等^[80]设计了几种具有质谱增敏特性的衍生化试剂。

他们首先采用具有潜在 MS 增敏特性的商业试剂赖氨酸罗丹明 B 磺酰氯(Lissamine rhodamine B sulfonylchloride, LRSC)作为衍生化试剂,对 NTs 中氨基和羟基进行同时标记,结果表明,该衍生化方法不仅提高了 NTs 衍生物离子的质荷比,而且提高了 NTs 在 ESI-MS/MS 分析中的电离效率,从而提高了 UHPLC-MS/MS 检测的灵敏度。然后,选用低毒性的溴苯作为萃取剂,乙腈作为分散剂,对衍生化后的溶液进行超声辅助 DLLME,结合 UHPLC-MS/MS 同时测定了帕金森病大鼠脑微透析液中的多种 CAs 及其前体和代谢物,方法检出限可达 $2 \times 10^{-3} \sim 4 \times 10^{-3} \text{ nmol/L}$ 。与其它传统的 LC-MS/MS 衍生化方法相比,检出限降低了 1 ~ 3 个数量级,且耗时显著缩短。该方法被成功应用于正常大鼠和左旋多巴(DA 前体)诱导运动障碍大鼠的大脑微透析液中的多种 NTs 及其前体和代谢物的分析^[81]。此后,基于罗丹明分子中正电荷带来的 MS 增敏特性,他们设计合成了一种新型 MS 增敏衍生化试剂 4'-羰基氯罗丹明(4'-Carbonyl chloride rosamine, CCR)^[82]。选用低毒性的 4-溴茴香醚作为萃取剂,乙腈作为分散剂,进行 UADLLME 前处理,结合 UHPLC-MS/MS 同时测定了帕金森大鼠脑微透析液中 MNTs 和 AANTs 含量。该方法的前处理过程仅需 3 min,显著缩短了样品前处理时间,检出限降低至 $1 \times 10^{-4} \sim 3 \times 10^{-3} \text{ nmol/L}$ 。随后,他们又采用该方法同时测定了阿兹海默症大鼠尿液中 AANTs 和 MNTs 的浓度,仅用 16 min 便可在 10^{-10} mol/L 浓度水平下分离检测 22 种分析物,表明该方法具有灵敏度高、选择性好、基体效应低的优点^[83]。与商业试剂 LRSC 相比,CCR 衍生化的检出限比 LRSC 低 1 个数量级。这一方面可能是由于 ESI 源中 CCR 衍生物的电离效率更高,另一方面,LRSC 及其衍生物的结构容易受溶剂环境的酸碱度影响而失去分子正电荷,从而使得 CCR 衍生物的 MS 检测灵敏度更高。

除了 CCR 衍生化试剂外,他们还设计合成了 d_0/d_3 -10-甲基-吡啶酮-2-磺酰氯(d_0/d_3 -10-Methyl-acridone-2-sulfonyl chloride, d_0/d_3 -MASC)作为稳定同位素编码衍生化试剂,结合超声辅助 LLME 技术,建立了 UHPLC-MS/MS 快速测定 MNTs 及其生物合成前体和代谢物的新方法,并成功应用于帕金森病大鼠和正常大鼠脑微透析液的测定^[84]。该方法使用 d_0 -MASC、 d_3 -MASC 试剂分别对大鼠脑微透析液样品和混合标准对照品进行衍生化处理,以 d_3 -MASC 衍生物作为 d_0 -MASC 衍生物的内标进行定量分析,克服了传统同位素稀释法的内标缺少或商品化试剂价格昂贵的缺点,并可显著降低基体效应,该方法检出限为 $2 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ nmol/L}$,RSDs 为 4.2% ~ 8.8%。

5 总结与展望

微萃取技术由于其耗时短、溶剂用量少、易于实现自动化等优点,已成为生物样品 NTs 的高效分离富集方法。近年来,高效微萃取介质的研制极大地提高了微萃取技术对生物样品 NTs 的分离富集容量及选择性,提高了分析的灵敏度及准确度。目前,常用于生物样品 NTs 前处理的功能性材料包括 MIP、ILs、硼酸盐亲和材料等。这些材料在微萃取介质中的应用克服了商品化微萃取介质稳定性差,对极性 NTs 选择性差、回收率低的缺点,但仍存在许多尚待解决的问题:如 MIP 可对目标分子进行高选择性识别,但移除模板较难,影响分析准确性,并且适用于水相的功能单体和交联剂种类有限;离子液体既可

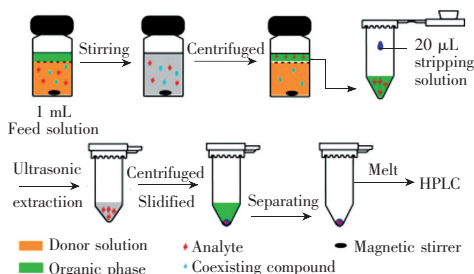


图 4 固化剥离相的载体介导 LLME 技术示意图^[34]

Fig. 4 Schematic illustration of carrier-mediated liquid-liquid microextraction (LLME) based on solidification of stripping phase^[34]

作为优良萃取溶剂,又可作为选择性固定相材料,可满足多种微萃取形式的需要,但其在复杂样品基质中存在适应能力较差的问题;硼酸盐亲和材料可控吸附/解吸顺式二醇的特性,在萃取介质研制中得到广泛应用,但其适用范围偏窄,在对种类丰富的 NTs 进行高通量分析时有所限制。因此,研发选择性强、抗基质干扰能力强、适用范围广的微萃取介质仍是今后的研究热点。

另一方面,微萃取技术形式的研发更新,进一步拓宽了微萃取技术在生物样品 NTs 分析研究的应用范围。在未来的研究中,微萃取技术应朝着更便携化、微型化方向发展,构建生物活体 NTs 的实时动态含量检测方法。活体生物样品 NTs 含量的实时分析常能提供离线分析无法获得的体内时空动态化学信息,对医学、病理学、药学等领域的研究有重要的意义。目前,大部分生物活体 NTs 的分析方法仅用于动物实验,未来应着重开发真正适用于人体 NTs 的分析方法。尤其在脑神经化学研究中,有效的神经通讯依赖于神经突触内外多种 NTs 的瞬时平衡,且 NTs 仅在有限的动态范围内发挥作用,因此,开发可实时检测多个大脑区域 NTs 含量变化的原位活体分析技术,将成为未来生物 NTs 研究的热点。新型高效微萃取技术在生物样品 NTs 的分析研究进展将极大促进人类疾病诊断、药物科学等领域的发展,为人类健康产业的发展起到重要的推动作用。

References

- 1 Kavalali E T. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2014**, 16(1): 5–16
- 2 Kurian M A, Gissen P, Smith M, Heales S J R, Clayton P T. *Lancet Neurol.*, **2011**, 10(8): 721–733
- 3 Mura E, Zappettini S, Preda S, Biundo F, Lanni C, Grilli M, Cavallero A, Olivero G, Salamone A, Govoni S, Marchi M. *PLoS One*, **2012**, 7(1): e29661
- 4 Gupta A K, Kumar G K, Rani K, Pokhriyal R, Khan M I, Kumar D R, Goyal V, Tripathi M, Gupta R, Chadda R K, Vanamail P, Mohanty A K, Hariprasad G. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **2019**, 15: 1031–1044
- 5 Chuang S C, Fanidi A, Ueland P M, Relton C, Midttun O, Vollset S E, Gunter M J, Seckl M J, Travis R C, Wareham N, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Peeters P H M, Bueno-De-Mesquita H B, Boeing H, Wientzek A, Kuehn T, Kaaks R, Tumino R, Agnoli C, Palli D, Naccarati A, Aicua E A, Sanchez M J, Quiros J R, Chirlaque M D, Agudo A, Johansson M, Grankvist K, Boutron-Ruault M C, Clavel-Chapelon F, Fagherazzi G, Weiderpass E, Riboli E, Brennan P J, Vineis P, Johansson M. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2014**, 23(3): 461–468
- 6 Moret C, Briley M. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **2011**, 7(Suppl 1): 9–13
- 7 Peaston R T, Weinkove C. *Ann. Clin. Biochem.*, **2004**, 41(1): 17–38
- 8 Huang D, Jiang Q S, Yang J Q, Cui T, Wang N R, Du T T, Jiang X H. *Biomed. Chromatogr.*, **2018**, 32(11): e4338
- 9 Lozanov V, Benkova B, Mateva L, Petrov S, Popov E, Slavov C, Mitev V. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 860(1): 92–97
- 10 Zhang L, Yang J Q, Luo Y, Shang J C, Jiang X H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, 118: 41–51
- 11 Wu X M, Wang R, Jiang Q Q, Wang S S, Yao Y, Shao L H. *Biomed. Chromatogr.*, **2014**, 28(4): 459–462
- 12 Zhang L L, Zhao Y S, Huang J M, Zhao S L. *J. Chromatogr. B*, **2014**, 967: 190–194
- 13 Ghasemi F, Hormozi-Nezhad M R, Mahmoudi M. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 917: 85–92
- 14 Palus M, Formanova P, Salat J, Zampachova E, Elsterova J, Ruzek D. *J. Med. Virol.*, **2015**, 87(5): 885–892
- 15 Vondroušová J, Mikoška M, Syslová K, Böhmová A, Tejkalová H, Vacek L, Kodým P, Krsek D, Horáček J. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2019**, 170: 139–152
- 16 Wang H Y, Walaszczyk E J, Li K, Chung-Davidson Y W, Li W M. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 721: 147–153
- 17 Shackman H M, Shou M, Cellar N A, Watson C J, Kennedy R T. *J. Neurosci. Methods*, **2007**, 159(1): 86–92
- 18 Marchioni C, de Souza I D, Acquaro V R, Crippa J A D, Tumas V, Queiroz M E C. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1044: 12–28
- 19 Smedes F, Kraak J C, Poppe H. *J. Chromatogr. B*, 1982, 231(1): 25–39
- 20 Xie L, Chen L Q, Gu P, Wei L L, Kang X J. *J. Vis. Exp.*, **2018**, 133: e56445
- 21 Kanthan R, Shuaib A, Goplen G, Miyashita H. *J. Neurosci. Methods*, 1995, 60(1-2): 151–155
- 22 Yao J X, Lu H H, Wang Z H, Wang T W, Fang F F, Wang J, Yu J, Gao R. *J. Chromatogr. B*, **2018**, 1093: 91–99
- 23 Najmanová V, Rambousek L, Syslová K, Bubeníková V, Šlamberová R, Valeš K, Kačer P. *Chromatographia*, **2011**, 73(1): 143–149

- 24 Cudjoe E, Pawliszyn J. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1341: 1–7
- 25 Jha R R, Singh C, Pant A B, Patel D K. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1005: 43–53
- 26 Konieczna L, Roszkowska A, Stachowicz-Stencel T, Synakiewicz A, Baczek T. *J. Chromatogr. B*, **2017**, 1074: 99–110
- 27 Miranda L F C, Goncalves R R, Queiroz M E C. *Molecules*, **2019**, 24(9): 1658
- 28 Yang X T, Hu Y F, Li G K, Zhang Z M. *J. Sep. Sci.*, **2015**, 38(8): 1380–1387
- 29 Yang X T, Hu Y F, Li G K. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1342: 37–43
- 30 Wu Y B, Wu J H, Shi Z G, Feng Y Q. *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877(20–21): 1847–1855
- 31 Saraji M, Shahvar A. *Anal. Methods*, **2016**, 8(4): 830–839
- 32 Thomas D H, Taylor J D, Barnaby O S, Hage D S. *Clin. Chim. Acta*, **2008**, 398(1): 63–69
- 33 Oppolzer D, Moreno I, da Fonseca B, Passarinha L, Barroso M, Costa S, Queiroz J A, Gallardo E. *Biomed. Chromatogr.*, **2013**, 27(5): 608–614
- 34 Jiang L W, Chen Y B, Chen Y J, Ma M, Tan Y M, Tang H, Chen B. *Talanta*, **2015**, 144: 356–362
- 35 Li X G, Li S, Kellermann G. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 409(11): 2859–2871
- 36 El-Beqqali A, Kussak A, Abdel-Rehim M. *J. Sep. Sci.*, **2007**, 30(3): 421–424
- 37 Zhang X F, Xu S X, Lim J M, Lee Y I. *Talanta*, **2012**, 99: 270–276
- 38 Espina-Benitez M B, Marconi F, Randon J, Demesmay C, Dugas V. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1034: 195–203
- 39 Huang H, Chen Z J, Yan X M. *J. Sep. Sci.*, **2012**, 35(3): 436–444
- 40 Kossakowska N, Oledzka I, Kowalik A, Miekus N, Kowalski P, Plenis A, Bień E, Kaczorowska A, Krawczyk M A, Adamkiewicz-Drożyńska E, Baczek T. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2019**, 173: 24–30
- 41 Naccarato A, Gionfriddo E, Sindona G, Tagarelli A. *Anal. Chim. Acta*, **2014**, 810: 17–24
- 42 He J G, Liu Z, Ren L B, Liu Y C, Dou P, Qian K, Chen H Y. *Talanta*, **2010**, 82(1): 270–276
- 43 Musteata M F. *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, **2013**, 45: 154–168
- 44 Auger J, Boulay R, Jaillais B, Delion-Vancassel S. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 870(1–2): 395–403
- 45 Li G Z, Row K H. *Sep. Purif. Rev.*, **2017**, 47(1): 1–18
- 46 Prasad B B, Tiwari K, Singh M, Sharma P S, Patel A K, Srivastava S. *Chromatographia*, **2009**, 69(9–10): 949–957
- 47 Sinha A, Dhanjai, Jain R, Zhao H M, Karolia P, Jadon N. *Microchim. Acta*, **2018**, 185(2): 89
- 48 Miekus N, Oledzka I, Kossakowska N, Plenis A, Kowalski P, Prahl A, Baczek T. *Talanta*, **2018**, 186: 119–123
- 49 Miekus N, Oledzka I, Harshkova D, Liakh I, Plenis A, Kowalski P, Baczek T. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19(6): 1560
- 50 Godage N H, Gionfriddo E. *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, **2019**, 111: 220–228
- 51 Cudjoe E, Bojko B, de Lannoy I, Saldivia V, Pawliszyn J. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2013**, 52(46): 12124–12126
- 52 Lendor S, Hassani S A, Boyaci E, Singh V, Womelsdorf T, Pawliszyn J. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(7): 4896–4905
- 53 Tran M, Turner E B, Segro S S, Fang L, Seyyal E, Malik A. *J. Chromatogr. A*, **2017**, 1522: 38–47
- 54 Alhendal A U, Mengis S, Matthews J, Malik A. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1468: 23–32
- 55 WANG Chao-Ran, WANG Yan, GAO Ye, MA Dan-Dan, GU Xue, YAN Chao. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(8): 1207–1212
- 王超然, 王彦, 高也, 马丹丹, 谷雪, 阎超. *分析化学*, **2012**, 40(8): 1207–1212
- 56 Ling X, Chen Z L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 410(2): 501–508
- 57 Abdel-Rehim M. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217(16): 2569–2580
- 58 Bagheri H, Alipour N, Ayazi Z. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 740: 43–49
- 59 Bagheri H, Ayazi Z, Aghakhani A, Alipour N. *J. Sep. Sci.*, **2012**, 35(1): 114–120
- 60 Saracino M A, Santarcangelo L, Raggi M A, Mercolini L. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2015**, 104: 122–129
- 61 Konieczna L, Roszkowska A, Synakiewicz A, Stachowicz-Stencel T, Adamkiewicz-Drożyńska E, Baczek T. *Talanta*, **2015**, 150: 331–339
- 62 Zou H F, Huang X D, Ye M L, Luo Q Z. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 954(1–2): 5–32
- 63 Fang W L, Xia L J, Huang X, Guo X F, Ding J, Wang H, Feng Y Q. *Chromatographia*, **2018**, 81(10): 1381–1389
- 64 Zhou X G, Zhu A W, Shi G Y. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1409: 125–131
- 65 Anastassiades M, Lehota S J, Stajnbaher D, Schenck F J. *J. AOAC Int.*, **2003**, 86(2): 412–431
- 66 Abdolmohammad-Zadeh H, Talleb Z. *Microchim. Acta*, **2012**, 179(1–2): 25–32

- 67 ZHANG Jun-Cai, CHENG You-Ning, WEI Yin-Mao. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(9): 1464–1471
张君才, 陈佑宁, 卫引茂. 分析化学, **2018**, 46(9): 1464–1471
- 68 Jiang L W, Chen Y B, Luo Y M, Tan Y M, Ma M, Chen B, Xie Q J, Luo X B. *J. Sep. Sci.*, **2015**, 38(3): 460–467
- 69 He M F, Wang C Z, Wei Y M. *Talanta*, **2016**, 147: 437–444
- 70 Avan A A, Filik H. *Anal. Lett.*, **2018**, 51(16): 2626–2642
- 71 Bouri M, Lerma-García M J, Salghi R, Zougagh M, Ríos A. *Talanta*, **2012**, 99: 897–903
- 72 Claude B, Nehmé R, Morin P. *Anal. Chim. Acta.*, **2011**, 699(2): 242–248
- 73 Jeannot M A, Cantwell F F. *Anal. Chem.* **1996**, 68(13): 2236–2240
- 74 Hamidi S, Alipour-Ghorbani N. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2017**, 40(16): 853–861
- 75 Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M R M, Aghae E, Ahmadi F, Berijani S. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1116(1-2): 1–9
- 76 Miekus N, Oledzka I, Plenis A, Kowalski P, Bieñ E, Miekus A, Krawczyk M A, Adamkiewicz-Drożyńska E, Baczek T. *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1036: 114–123
- 77 Konieczna L, Roszkowska A, Niedzwiecki M, Baczek T. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1431: 111–121
- 78 Gill E L, Marks M, Yost R A, Vedam-Mai V, Garrett T J. *Anal. Chem.* **2017**, 89(24): 13658–13665
- 79 Xie X, Gu J, Zhao W B, Liu S J, Qiao Y H, Zhu X Y, Yin X H, Zhu Z W, Li M X, Shao Y H. *Sci. China-Chem.*, **2015**, 58(5): 892–898
- 80 He Y R, Zhao X E, Zhu S Y, Wei N, Sun J, Zhou Y B, Liu S, Liu Z Q, Chen G, Suo Y R, You J M. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1458: 70–81
- 81 Wei N, Zhao X E, Zhu S Y, He Y R, Zheng L F, Chen G, You J M, Liu S, Liu Z Q. *Talanta*, **2016**, 161: 253–264
- 82 Zhao X E, He Y R, Yan P, Wei N, Wang R J, Sun J, Zheng L F, Zhu S Y, You J M. *RSC Adv.*, **2016**, 6(110): 108635–108644
- 83 Zhao X E, He Y R, Li M, Chen G, Wei N, Wang X, Sun J, Zhu S Y, You J M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2017**, 135: 186–198
- 84 Zheng L F, Zhao X E, Zhu S Y, Tao Y D, Ji W H, Geng Y L, Wang X A, Chen G A, You J M. *J. Chromatogr. B*, **2017**, 1054: 64–72

Application of Microextraction in Neurotransmitter Analysis

YU Zhong-Ning, ZHANG Zhuo-Min*, LI Gong-Ke*

(School of Chemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Neurotransmitters play an important regulatory role in organisms as endogenous compounds. Accurate determination of neurotransmitters in biological samples is of great significance in early diagnosis of diseases, drug development, basic medical research and other fields. However, it is difficult to achieve accurate analysis because of their complex matrix composition and extremely low concentrations. Therefore, the key to improve the sensitivity and accuracy for the analysis of trace neurotransmitters in complex biological samples is to develop efficient sample pretreatment technology. Microextraction technology is a green extraction technology based on microscale enrichment media which is considered as an excellent pretreatment technology for the analysis of endogenous substances in biological samples due to its low cost, convenient use, adaptability to nondestructive analysis and environmental friendliness. In this paper, we systematically reviewed the application of solid-phase microextraction, micro-solid-phase extraction, and liquid phase microextraction technologies in the high-efficiency enrichment and analysis of trace neurotransmitters in biological samples.

Keywords Microextraction technology; Neurotransmitters; Biological samples; Review

(Received 19 July 2019; accepted 27 August 2019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21475154, 21675178, 21976213), and the Research and Development Plan for Key Areas of Food Safety in Guangdong Province of China (No. 2019B020211001).