

迁移时间归一化法改善毛细管电泳表征中药大黄的重现性

张红医, 盖丽娟, 陈辉, 景聪, 石志红*

(河北大学化学与环境科学学院, 河北保定 071002)

摘要 探讨了迁移时间归一化法改善中药毛细管电泳分析迁移时间重现性的原理, 并将其应用于实际样品的分析。迁移时间归一化法认为, 在相同的操作电压、缓冲液组成和温度条件下, 多次电泳实验中迁移时间产生差别的主要原因是多次电泳实验中电渗流产生了差异。迁移时间归一化法就是通过选择电泳谱图中的一个或两个峰作为标记峰, 将各次电泳实验的迁移时间都归一到第一次电泳实验中的迁移时间。比较多次电泳实验中迁移时间(t)的相对标准偏差(RSD)、经单峰归一化处理的迁移时间(t')的RSD、经双峰归一化处理的迁移时间(t'')的RSD、迁移时间比(t/t_{istd} , t_{istd} 代表所选择的标记物)的RSD, 发现 $RSD(t'') < RSD(t') < RSD(t/t_{istd})$ 和 $RSD(t)$ 。考察了中药大黄5次胶束电动色谱分离中迁移时间的重现性, 其 $RSD(t')$ 在 0.07% ~ 0.58% 之间。还考察了不同基质的大黄样品在毛细管区带电泳模式下迁移时间的重现性, 发现所选择的7个明显的电泳峰的 $RSD(t')$ 在 0.31% ~ 0.57% 之间。结果表明, 迁移时间归一化法能有效地提高中药大黄样品迁移时间的重现性。该方法有望在中药毛细管电泳表征方面发挥更大的作用。

关键词 毛细管电泳; 迁移时间归一化法; 重现性; 大黄; 中药

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)04-0489-05 栏目类别: 研究论文

Improvement of reproducibility in capillary electrophoretic characterization of rhubarb by normalization of migration time

ZHANG Hongyi, GE Lijuan, CHEN Hui, JING Cong, SHI Zhihong*

(College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: The principle of the normalization of migration time and its application on the traditional Chinese medicine (TCM) analysis by capillary electrophoresis (CE) are presented. It is the core of the normalization of migration time that the fluctuation of apparent migration velocity for each component at different runs is attributed to the difference of electroosmotic flow velocity. To transform migration time (t) to normalized migration time, one peak or two peaks in the original electropherogram are selected as internal peak. The normalization of migration time is therefore classified into two types based on the number of selected internal peaks, one-peak and two-peak approaches. The migration times processed by one-peak normalization and by two-peak normalization are conducted by the following equations, respectively: $(t'_i)_j = 1/\{1/(t_i)_j - [1/(t_{istd})_j - 1/(t_{istd})_1]\}$ and $(t''_i)_j = 1/\{1/(t_i)_j - \{[1/(t_{istd,1})_j - 1/(t_{istd,1})_1] + [1/(t_{istd,end})_j - 1/(t_{istd,end})_1]\}/2\}$, where $(t'_i)_j$ and $(t''_i)_j$ are the normalized migration times obtained by one-peak and two-peak approaches in the j th run for component i , respectively; $(t_i)_j$ and $(t_{istd})_j$ are the migration times in the j th run for component i and the selected internal standard in the sample, respectively; $(t_{istd,1})_j$ and $(t_{istd,1})_1$ are the migration times for the first peak selected as internal peak in the j th run and the first run, respectively; $(t_{istd,end})_j$ and $(t_{istd,end})_1$ are the migration times for the last peak selected as internal peak in the j th run and the first run, respectively. One of the commonly used traditional Chinese medicines (TCM), rhubarb, was chosen as a model to verify the advantage of migration time normalizations in improving reproducibility of CE. Both of the experiments, the five parallel micellar electrokinetic chromatography for rhubarb extract and the capillary zone electrophoresis for the samples pre-

* 通讯联系人: 石志红, 博士, 教授. E-mail: shizhihong@hbu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 20575016, 20875020)和河北省自然科学基金项目(No. B2006000953).

收稿日期: 2008-12-25

pared by mixing rhubarb extract with various solutions, showed $RSD(t'') < RSD(t') < RSD(t/t_{istd})$ and $RSD(t)$. The $RSDs(t'')$ of the five parallel micellar electrokinetic chromatography were in the range of 0.07% - 0.58%, and the $RSDs(t'')$ of the capillary zone electrophoresis were in the range of 0.31% - 0.57%. The results showed that the qualitative precision improvements for rhubarb characterized with CE can be carried out by the normalization of migration time. The normalization of migration time will be gained much more attention to TCM characterized by CE due to its simplicity and reliability.

Key words : capillary electrophoresis (CE); normalization of migration time ; reproducibility ; rhubarb ; traditional Chinese medicine (TCM)

毛细管电泳(CE)因其优越的分离能力而在天然药物复杂物质体系的分离分析中发挥着重要的作用^[1]。在优化的毛细管电泳条件下可实现尽可能多的植物药物质信息的仪器信号表征(中药毛细管电泳指纹图), 为植物药的品质鉴定提供了一种可供选择的新手段^[2-5]。但是由于毛细管电泳迁移时间的重现性差, 在复杂样品定性表征中应用还存在一定的困难。为了解决迁移时间重现性差的问题, 可使用毛细管电泳控温装置^[6]、使用新的记录模式^[7,8]、优化毛细管冲洗方法^[9]、采用有效淌度法^[10]、采用校正有效淌度法^[11]及针对不同盐度样品采用迁移时间校正法^[12]等。从已报道的中药毛细管电泳指纹图谱的研究来看, 为了减少和避免平行实验之间迁移时间的波动, 普遍采用迁移时间校正法^[13], 即选择中药电泳图中某一组分的迁移时间作为基准, 将其他组分的迁移时间(t)与基准迁移时间(t_{istd} , $istd$ 代表所选择的标记组分)的比值(t/t_{istd})作为定性的依据。以 t/t_{istd} 为横坐标, 以检测信号响应值为纵坐标重新绘制谱图, 并将新谱图与原始谱图相比较, 发现很多分离的基本信息(如分离度、迁移时间)发生了人为的变化。另外, 这种方法的定性准确性还有待于进一步提高。

Xue 等^[14]为了提高 96 根阵列毛细管电泳系统中不同毛细管电泳柱间分析结果的可比性, 提出了迁移时间归一化法。最近, Blanco-Heras 等^[15]也采用了同样的方法成功实现了无机和有机阴离子的准确性。本文将迁移时间归一化法应用在中药大黄的定性鉴定中, 考察了胶束电动色谱法(MEKC)和毛细管区带电泳法(CZE)分离大黄时各组分迁移时间的重现性, 并与中药毛细管电泳指纹图谱研究中普遍采用的迁移时间比法^[12]的重现性进行了比较。迁移时间归一化法与毛细管电泳优越分离能力的结合, 有望使毛细管电泳技术在中药指纹图谱研究中发挥重要的作用, 为中药的品质鉴定提供可靠的保证。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

P/ACE MDQ 型电泳仪(美国 Beckman 公司), 石英毛细管柱(总长 60.2 cm, 有效长度 50 cm, 内径 75 μm , 河北永年光导纤维厂), 中药材粉碎机(浙江温岭市创新机械厂)。

甲醇(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 四硼酸钠、氯化钠、无水乙醇(天津市华东试剂厂) 和十二烷基硫酸钠(SDS, 天津市科密欧化学试剂有限公司) 均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

背景电解质 1 : 15 mmol/L 硼砂溶液 + 30 mmol/L SDS + 10% (体积分数) 乙醇, pH 9.5 ; 背景电解质 2 : 15 mmol/L 硼砂溶液, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.6。

将大黄药材(购于保定市龙海大药房) 粉碎至 60 ~ 80 目。称取大黄粉末 0.1 g, 在超声波中用 50 mL 甲醇提取 30 min, 离心分离, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液供实验。

1.2 电泳条件

毛细管柱的冲洗 : 首次使用前用 0.1 mol/L 氢氧化钠冲洗 10 min, 再用水冲洗 10 min, 最后用缓冲液冲洗 5 min ; 两次进样间用缓冲液冲洗 5 min ; 每天实验结束后用 0.1 mol/L 氢氧化钠冲洗 10 min、水冲洗 20 min。检测波长 254 nm ; 分离温度 : 25 $^{\circ}\text{C}$; 分离电压 25 kV ; 压力进样 : CZE 分析时 2.07 kPa (0.3 psi) \times 2 s, MEKC 分析时 3.45 kPa (0.5 psi) \times 3 s。

2 基本原理^[14]

在毛细管电泳分析中, 样品中组分 i 的表观电泳速度($v_{total, i}$)可分解为其自身的电泳速度(v_{ep})和电渗流速度(v_{eo})之和, 即 :

$$(v_{total, i})_j = (v_{ep, i})_j + (v_{eo, i})_j \quad (1)$$

其中 j 为第 j 次电泳实验。理论上讲, 在不同次电泳实验中, 如果电压、温度和背景电解质溶液都一

致,则组分 i 在不同次电泳实验中的电泳速度应该一致,即:

$$(v_{ep,i})_1 = (v_{ep,i})_j \quad (2)$$

但在通常的平行电泳实验中,迁移时间和表观电泳速度的偏差较大,一般把这种重现性差的原因归结为各次实验中产生的电渗流速度不一致。但可认为同次实验中各组分感受到的电渗流速度近似相等,即:

$$(v_{eo,i})_j = (v_{eo})_j \quad (3)$$

因此,为了提高组分 i 在平行电泳实验中表观电泳速度的重现性,可将第一次实验时的电渗流速度作为参照体系,对各次实验的表观电泳速度进行归一化处理,即:

$$\begin{aligned} (v'_{total,i})_j &= (v_{total,i})_j - \Delta(v_{eo})_{j,1} \\ &= [(v_{ep,i})_j + (v_{eo})_j] - [(v_{eo})_j - (v_{eo})_1] \\ &= (v_{ep,i})_j + (v_{eo})_1 = (v_{total,i})_1 \end{aligned} \quad (4)$$

式中, $\Delta(v_{eo})_{j,1}$ 为第 j 次实验时的电渗流速度与第一次实验时的电渗流速度的差值。式(4)表明,经过归一化处理的组分 i 第 j 次实验时的表观电泳速度与第一次实验时的表观电泳速度相同,进而达到提高迁移时间重现性的目的。又因 $\Delta(v_{eo})_{j,1}$ 可以表示为:

$$\begin{aligned} \Delta(v_{eo})_{j,1} &= [(v_{eo})_j + (v_{ep,istd})_j] - \\ & \quad [(v_{eo})_1 + (v_{ep,istd})_1] \\ &= (v_{total,istd})_j - (v_{total,istd})_1 \end{aligned} \quad (5)$$

其中 $(v_{total,istd})$ 为标记物的表观电泳速度。因此可以选取样品中某一组分作为标记物来测定不同次平行实验中电渗流速度之差。故式(4)可改写为:

$$\begin{aligned} (v'_{total,i})_j &= (v_{total,i})_j - [(v_{total,istd})_j - \\ & \quad (v_{total,istd})_1] \end{aligned} \quad (6)$$

由于电泳实验中组分 i 的 $v_{total,i}$ 等于毛细管有效柱长(l)与其迁移时间(t_i)的比值,即:

$$(v_{total,i})_j = l/(t_i)_j \quad (7)$$

所以式(6)可改写为:

$$1/(t'_i)_j = 1/(t_i)_j - [1/(t_{istd})_j - 1/(t_{istd})_1] \quad (8)$$

即:

$$\begin{aligned} (t'_i)_j &= 1/\{1/(t_i)_j - [1/(t_{istd})_j - 1/(t_{istd})_1]\} \\ &= (t_i)_1 \end{aligned} \quad (9)$$

其中 $(t'_i)_j$ 为组分 i 的第 j 次实验的单峰归一化迁移时间, $(t_{istd})_j$ 为所选标记物在第 j 次实验中的迁移时间, $(t_{istd})_1$ 为所选标记物在第一次实验中的迁移时间, $(t_i)_1$ 为组分 i 在第一次实验中的迁移时间。式(9)表明组分 i 的第 j 次实验的 $(t'_i)_j$ 与该组分第一次实验中的 $(t_i)_1$ 相同,从而可以降低平行毛细管电泳实验中迁移时间的波动性。

然而,在平行实验中,同一次实验的温度在毛细

管电泳分离过程中并不能保持恒定,而会有微小的变化,从而影响 v_{eo} 。为了改善这一情况,分别以原始电泳谱图中的第一个峰和最后一个峰为标记峰,然后根据它们在第一次实验中的迁移时间($t_{istd,1}$)、($t_{istd,end}$)₁ 和第 j 次实验中的迁移时间($t_{istd,1}$)_j、($t_{istd,end}$)_j 求出 $\Delta(v_{eo})_{j,1}$ 。那么, $[1/(t_{istd})_j - 1/(t_{istd})_1]$ 就可转化为 $\{[1/(t_{istd,1})_j - 1/(t_{istd,1})_1] + [1/(t_{istd,end})_j - 1/(t_{istd,end})_1]\}/2$,式(9)则可转化为:

$$\begin{aligned} (t'_i)_j &= 1/\{1/(t_i)_j - \{[1/(t_{istd,1})_j - 1/(t_{istd,1})_1] + \\ & \quad [1/(t_{istd,end})_j - 1/(t_{istd,end})_1]\}/2\} \end{aligned} \quad (10)$$

式中, t'_i 为组分 i 的双峰归一化迁移时间。

3 结果与讨论

3.1 平行实验间迁移时间归一化处理的效果

图 1 为采用胶束电动色谱法分离大黄药材的电泳谱图。所用背景电解质溶液 1 参照文献[16]配制。对图 1 中的明显峰标明了序号(1~7),其中峰 4~6 分别为芦荟大黄素、大黄酸和大黄酚。考察了平行电泳实验的 t 、 t' 和 t'' 以及 t/t_{istd} 重现性的差异。其中,单峰归一化时选择 1 号峰为标记峰,按照式(9)进行计算;双峰归一化时选择 1 号峰和 7 号峰为标记峰,按照式(10)进行计算;进行传统的迁移时间比较正时,选择 1 号峰为标记峰。平行实验获得的 1~7 号峰的 t ,计算得到的 t' 、 t'' 和 t/t_{istd} ,以及相应的相对标准偏差(RSD)列于表 1。由表 1 可以看出, $RSD(t'') < RSD(t') < RSD(t/t_{istd})$ 和 $RSD(t)$,表明归一化迁移时间法的水重现性优于目前的毛细管电泳实验中普遍采用的迁移时间法和迁移时间比法,可提高毛细管电泳定性的准确性。另外,双峰归

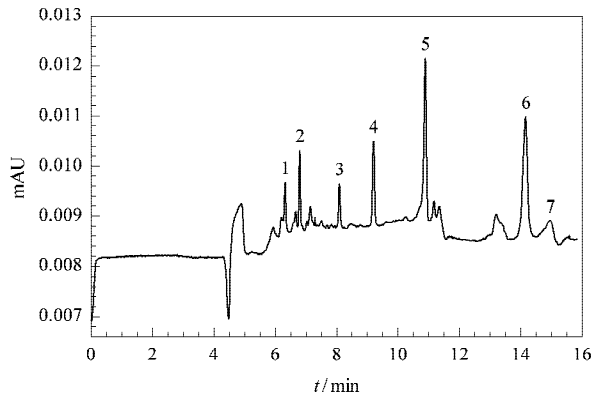


图 1 胶束电动色谱法分离大黄药材的电泳图

Fig. 1 Typical electropherogram of rhubarb by micellar electrokinetic chromatography

Background electrolyte solution: 15 mmol/L borate + 30 mmol/L SDS + 10% (v/v) ethanol, pH 9.5; capillary: 60.2 cm × 75 μm i. d. with the effective length of 50 cm; detection wavelength: 254 nm; temperature: 25 °C; applied voltage: 25 kV.

Peaks: 4. aloë-emodin; 5. rhein; 6. chrysophanol.

一化迁移时间法由于考虑了电渗流在电泳运行中的变化,使其定性的准确性比单峰归一化迁移时间法更好。更为重要的是,以单峰归一化迁移时间或双

峰归一化迁移时间为横坐标、以响应信号为纵坐标重新绘制的电泳谱图保持了原谱图的基本特征,而迁移时间比较正法一般不具备这样的特点。

表 1 大黄药材的 5 次平行胶束电动色谱分析中 7 个峰的迁移时间 (t)、单峰归一化迁移时间 (t')、双峰归一化迁移时间 (t'')、迁移时间比 (t/t_{istd}) 及其相对标准偏差 (RSD)

Table 1 Migration times (t), one-peak normalized migration times (t'), two-peak normalized migration times (t''), migration time ratios (t/t_{istd}) and their relative standard deviations (RSD(t), RSD(t'), RSD(t''), RSD(t/t_{istd})) for seven peaks in five parallel micellar electrokinetic chromatography of rhubarb

Peak No. in Fig. 1	t						t'					
	t_1 /min	t_2 /min	t_3 /min	t_4 /min	t_5 /min	RSD(t)/%	t'_1 /min	t'_2 /min	t'_3 /min	t'_4 /min	t'_5 /min	RSD(t')/%
1	5.92	5.93	5.92	5.90	5.95	0.31	5.92	5.92	5.92	5.92	5.92	0.00
2	6.78	6.79	6.76	6.75	6.80	0.31	6.78	6.78	6.67	6.78	6.76	0.16
3	8.04	8.06	8.01	8.02	8.10	0.44	8.04	8.04	8.01	8.06	8.04	0.22
4	9.20	9.22	9.12	9.12	9.21	0.54	9.20	9.20	9.12	9.17	9.14	0.39
5	10.86	10.89	10.75	10.76	10.89	0.64	10.86	10.86	10.75	10.83	10.79	0.44
6	14.15	14.24	13.90	13.94	14.16	1.06	14.15	14.18	13.90	14.05	13.99	0.82
7	14.92	15.04	14.67	14.72	14.95	1.06	14.92	14.97	14.67	14.84	14.76	0.81

Peak No. in Fig. 1	t''						t/t_{istd}					
	t''_1 /min	t''_2 /min	t''_3 /min	t''_4 /min	t''_5 /min	RSD(t'')/%	$(t/t_{istd})_1$	$(t/t_{istd})_2$	$(t/t_{istd})_3$	$(t/t_{istd})_4$	$(t/t_{istd})_5$	RSD(t/t_{istd})/%
1	5.92	5.93	5.94	5.93	5.93	0.12	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
2	6.78	6.78	6.79	6.78	6.78	0.07	1.15	1.15	1.14	1.14	1.14	0.48
3	8.04	8.05	8.05	8.07	8.07	0.17	1.36	1.36	1.35	1.36	1.36	0.33
4	9.20	9.21	9.17	9.18	9.17	0.20	1.55	1.55	1.54	1.55	1.55	0.29
5	10.86	10.86	10.82	10.84	10.83	0.16	1.83	1.84	1.82	1.82	1.83	0.46
6	14.15	14.22	14.01	14.09	14.06	0.58	2.39	2.40	2.35	2.36	2.38	0.87
7	14.92	15.01	14.79	14.88	14.84	0.56	2.52	2.52	2.48	2.49	2.51	0.95

Subscripts 1, 2, 3, 4 and 5 refer to the five parallel experiments.

3.2 不同样品基质条件下归一化处理的效果

在毛细管电泳分析中,经常可巧妙地利用基质效应使样品的检测响应信号增强,如使样品基质的电导低于背景基质的电导而形成堆积。另外,为了增加样品的溶解性,经常会在样品基质中添加一定浓度的有机溶剂。而样品基质的变化往往会引起分析物的迁移时间变化。选择背景电解质 2 进行毛细管区带电泳实验,考察了 6 种不同样品基质条件下,

中药大黄的 RSD(t)、RSD(t')、RSD(t'')和 RSD(t/t_{istd})。将大黄提取液与下列溶液混合构成 6 种不同样品基质: I. 背景电解质溶液 2-水-大黄提取液(体积比为 1:1:2); II. 甲醇-水-大黄提取液(体积比为 1:1:2); III. 甲醇-大黄提取液(体积比为 1:1); IV. 水-大黄提取液(体积比为 1:1); V. 100 mmol/L NaCl-大黄提取液(体积比为 1:1); VI. 50 mmol/L NaCl-大黄提取液(体积比为 1:1)。图 2a、b 和 c 分

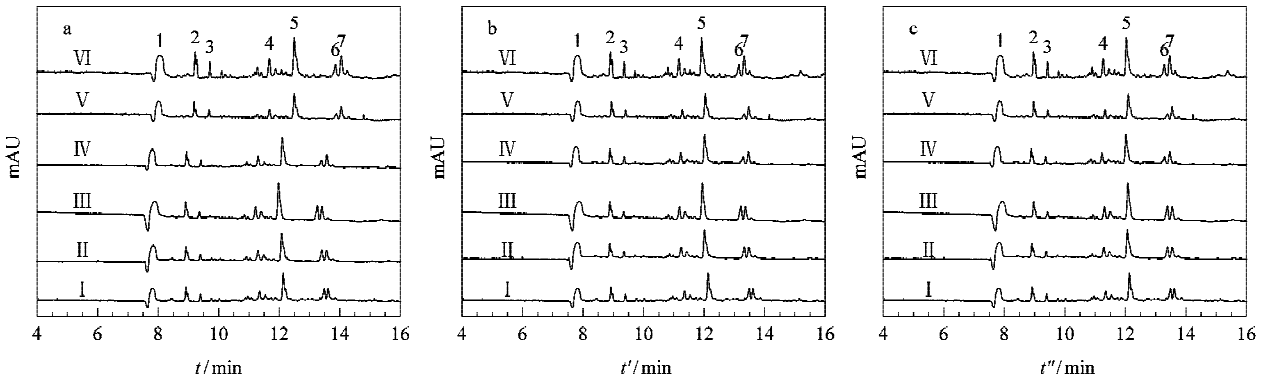


图 2 不同基质大黄样品的 (a) 原始电泳谱图、(b) 经单峰迁移时间归一化处理的电泳谱图(以 1 号峰为标记峰)和 (c) 经双峰迁移时间归一化处理的电泳谱图(以 1 号峰和 7 号峰为标记峰)

Fig. 2 (a) Original electropherograms, (b) electropherograms processed by one-peak normalization of migration times (peak 1 as internal peak) and (c) electropherograms processed by two-peak normalization of migration times (peak 1 and peak 7 as internal peaks) for rhubarb in different matrices

I. background electrolyte solution (15 mmol/L borate, pH 9.6 adjusted by 1 mol/L NaOH)-water-rhubarb extract (1:1:2, v/v/v); II. methanol-water-rhubarb extract (1:1:2, v/v/v); III. methanol-rhubarb extract (1:1, v/v); IV. water-rhubarb extract (1:1, v/v); V. 100 mmol/L NaCl-rhubarb extract (1:1, v/v); VI. 50 mmol/L NaCl-rhubarb extract (1:1, v/v).

别为上述 6 个样品的毛细管电泳谱图、单峰迁移时间归一化处理的毛细管电泳谱图(选择 1 号峰为标记峰)和双峰迁移时间归一化处理的毛细管电泳谱图(选择 1 号峰和 7 号峰为标记峰)。从图 2 可以看出,在原始电泳谱图(图 2a)中,不同基质样品的迁移时间的波动性较大;而在单峰归一化处理的毛细管电泳谱图(图 2b)中,不同基质样品的迁移时间的重现性得到了改善;在双峰归一化处理的毛细管电泳谱图(图 2c)中,不同基质样品的迁移时间的重现性得到了更进一步的提高。

图 2b 是以 1 号峰作为标记峰进行单峰归一化得到的电泳谱图。为了验证选用不同的峰作为标记峰获得的 $RSD(t')$ 有所不同,分别选取 1~7 号峰为

标记峰进行单峰归一化,并将产生的 $RSD(t')$ 绘制成图(见图 3)。由图 3 可见,原始电泳谱图的 $RSD(t)$ 最大,并且迁移时间的重现性从峰 1 至峰 7 依次变差;而经过归一化处理的迁移时间的重现性均好于原始谱图。需要指出的是,由式(9)可知,标记峰对应的 $RSD(t')=0$,因此图 3 中所有 t' 的 RSD 柱状图中均缺少 1 列;另外还可以看出,选择迁移时间比较短的峰作为标记峰时,迁移时间较长的峰的 $RSD(t')$ 较大;反之,选择迁移时间较长的峰作为标记峰时,迁移时间较短的峰的 $RSD(t')$ 较大。由于双峰归一化时选择第一个峰和最后一个峰作为标记峰,消除了同次电泳实验中电渗流速度的波动,而使所有峰的 $RSD(t'')$ 接近(见图 3),也使总体的定性准确性提高。

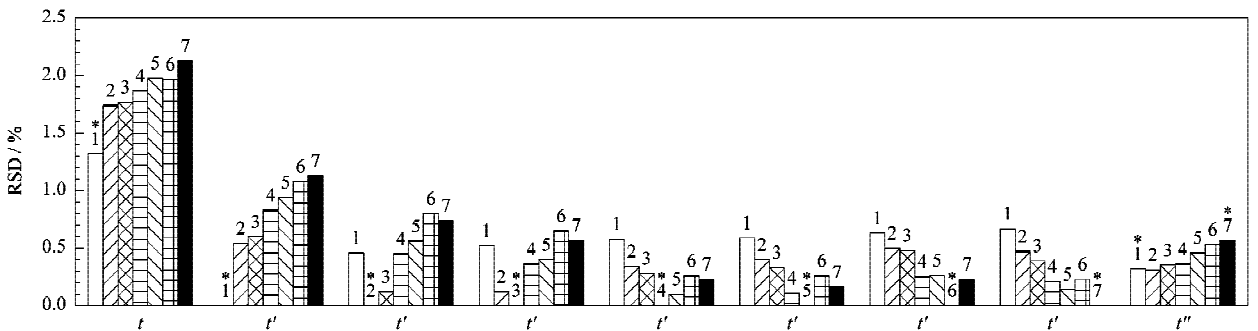


图 3 图 2 中 7 个峰的 $RSD(t)$ 、以不同的峰作为标记峰的 $RSD(t')$ 和以 1 号峰和 7 号峰为标记峰的 $RSD(t'')$
 Fig. 3 Histograms of $RSD(t)$, $RSD(t')$ for different peaks selected as internal peaks, and $RSD(t'')$ for peaks 1 and 7 selected as internal peaks for seven peaks in Fig. 2

The peaks marked with * are the internal peaks.

4 结论

迁移时间归一化法包括单峰归一化法和双峰归一化法。这两种方法都可以改善毛细管电泳迁移时间的重现性,但因双峰归一化法消除了同次实验中电渗流的波动,对迁移时间重现性的提高有更好的作用。迁移时间归一化法不会增加实验成本和附属设备,不需用复杂的计算方法。该方法在保留了毛细管电泳原有的高分离效率的前提下,提高了毛细管电泳定性的可靠性,有望使毛细管电泳技术在中药指纹图谱的研究过程中起到更大的作用,为中药的品质鉴定提供一个可供选择的科学方法。

参考文献:

[1] Ganzera M. *Electrophoresis*, 2008, 29(17): 3489
 [2] Han Y H, Huo F F, Yang Y Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (韩晔华, 霍飞凤, 杨悠悠, 等. 色谱), 2008, 26(2): 142
 [3] Sun Y Q, Sun G X, Jin Y. *Chinese Journal of Chromatography* (孙毓庆, 孙国祥, 金郁. 色谱), 2008, 26(2): 160
 [4] Yan L, Gong P, Yuan L, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (颜磊, 龚萍, 袁林, 等. 色谱), 2007, 25(3): 337

[5] Salinas-Hernández P, López-Bermúdez F J, Barrientos D R, et al. *J Sep Sci*, 2008, 31(4): 741
 [6] Chen Y. *Capillary electrophoresis technology and its application*. Beijing: Chemical Industry Press (陈义. 毛细管电泳技术及应用. 北京: 化学工业出版社), 2000: 29
 [7] Zhang H Y, Li Q F, Liu H T, et al. *Chemical Journal of Chinese Universities* (张红医, 李前锋, 刘慧涛, 等. 高等学校化学学报), 2000, 21(12): 1832
 [8] Zhang H Y, Li Q F, Chen X G, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (张红医, 李前锋, 陈兴国, 等. 分析化学), 2001, 29(7): 775
 [9] Gómez E J, Sandoval J E. *Electrophoresis*, 2008, 29(2): 381
 [10] Schmitt-Kopplin P, Garmash A V, Kudaryavtsev A V, et al. *Electrophoresis*, 2001, 22(1): 77
 [11] Boone C M, Franke J P, de Zeeuw R A, et al. *Electrophoresis*, 2000, 21(8): 1545
 [12] Riaz A, Chung D S. *Electrophoresis*, 2006, 27(3): 553
 [13] Sun Y Q, Ruan J H, Ma X. *Chinese Journal of Chromatography* (孙毓庆, 阮婧华, 马欣. 色谱), 2003, 21(4): 303
 [14] Xue G, Pang H M, Yeung E S. *Anal Chem*, 1999, 71(14): 2642
 [15] Blanco-Heras G A, Turnes-Carou M I, López-Mahía P, et al. *J Chromatogr A*, 2007, 1144(2): 275
 [16] Zhang J Y, Li Q F, Pan Z W, et al. *Journal of Lanzhou University: Natural Science Edition* (张继友, 李前锋, 潘仲巍, 等. 兰州大学学报: 自然科学版), 2003, 39(3): 101