

金纳米粒子富集-高效液相色谱同时测定人血浆中三种氨基硫醇

蒙 芳¹, 刘承伟², 陈 敏², 卢 昕^{1*}, 赵书林¹

(1. 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室 广西师范大学化学化工学院, 广西 桂林 541004;

2. 桂林医学院基础医学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 建立了金纳米粒子富集-高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UVD)同时测定人血浆中3种氨基硫醇(半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcys)、谷胱甘肽(GSH))的新方法。以Tween 20修饰的金纳米粒子作为选择探针萃取富集氨基硫醇。经二巯苏糖醇脱附后,采用Spursil™ C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离氨基硫醇,以60 mmol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 2.0)等度洗脱,检测波长为200 nm。3种氨基硫醇的浓度分别在0.025~350 μmol/L、0.02~60 μmol/L、0.01~50 μmol/L内与峰面积具有良好的线性关系,相关系数均高于0.99。方法检出限(信噪比为3)分别为5.0、6.0和2.5 nmol/L,回收率为92.8%~106.0%。该方法能显著降低血浆样品中内源性物质的干扰,提高HPLC-UVD的选择性和灵敏度。将该方法应用于心血管病人血浆中上述氨基硫醇的分离测定,结果显示:与对照组相比,疾病组血浆中的Hcys和GSH水平存在显著性差异,Cys不存在显著性差异。

关键词: 高效液相色谱; 紫外检测; 金纳米粒子; 富集; 氨基硫醇; 人血浆

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)10-1056-06

Simultaneous determination of three aminothiols in human plasma by high performance liquid chromatography with gold nanoparticle enrichment

MENG Fang¹, LIU Chengwei², CHEN Min², LU Xin^{1*}, ZHAO Shulin¹

(1. Key Laboratory for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources (Ministry of Education), College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China;

2. College of Basic Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography (HPLC) method with ultraviolet detection (UVD) for the simultaneous determination of cysteine (Cys), homocysteine (Hcys) and glutathione (GSH) in human plasma was established. Tween 20-capped gold nanoparticles (Tween 20-AuNPs) were used as selective probes for the extraction and enrichment of aminothiols. The aminothiols removed from the Tween 20-AuNPs by dithiothreitol were separated on a Spursil™ C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of 60 mmol/L phosphate buffer solution (pH 2.0). The column eluent was monitored using UVD at the wavelength of 200 nm. The linear ranges were found between peak area and concentration in the ranges of 0.025–350 μmol/L for Cys, 0.02–60 μmol/L for Hcys and 0.01–50 μmol/L for GSH, with linear regression coefficients all above 0.99. The limits of detection (LOD, signal to noise ratio of 3) for the aminothiols were between 2.5 nmol/L and 6.0 nmol/L and the recoveries were between 92.8% and 106.0%. Due to the significant interference reduction of endogenous substances in the plasma and the subsequent improvement of the selectivity and sensitivity of HPLC-UVD, the present method was applied for the simultaneous analysis of the forementioned aminothiols in the plasma samples of cardiovascular disease patients. The results showed that the levels of Hcys and GSH had significant differences between the patients and the controls, while that of Cys had no significant difference.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); ultraviolet detection; gold nanoparticles;

* 通讯联系人: 卢 昕, 教授, 研究方向为液相色谱方法及其在生物、医药领域的应用。Tel: (0773) 5846279, E-mail: luxin-chem@163.com.

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(10124001B-58)和桂林市科学研究与技术开发计划项目(20100511)。

收稿日期: 2012-05-08

enrichment; aminothiols; human plasma

小分子的氨基硫醇,如半胱氨酸(cysteine, Cys)、高半胱氨酸(homocysteine, Hcys)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)广泛分布于人类及动物的组织和体液中,参与细胞组成及代谢等多种生理活动。其水平的改变以及相互关系与某些疾病密切相关,诸如阿尔茨海默氏症^[1]、动脉硬化及心血管疾病^[2]等,因此,生物体内多种氨基硫醇含量的同时测定对于相关疾病的病理机制研究、临床病理诊断以及风险预测^[3,4]都具有重要意义。

目前主要采用高效液相色谱法(HPLC)^[5-13]及毛细管电泳法^[14,15]对氨基硫醇进行分离分析。由于氨基硫醇分子结构中没有发色基团,直接采用短波长的紫外检测(UVD)虽然方法简单且费用低廉,但缺点亦很显著,除灵敏度低外,更重要的是干扰严重,尤其是在基底复杂的生物样品中,很难获得准确结果。因此,上述已报道的方法一类是基于氨基硫醇的衍生化反应-荧光检测而建立;另一类无需衍生的检测方法包括电化学或与质谱联用。但前者的测定精度问题仍然是其难以克服的缺点,后者则因分析费用昂贵与实际需要仍存在一定的距离。

金纳米粒子(gold nanoparticle, AuNPs)由于具有独特的光学特性、良好的生物相容性以及易于表面修饰等优点,在生物和医药等领域^[16]的应用越来越受到人们的关注。近年来的研究证实,AuNPs经含氟表面活性剂修饰后,能够在适当的高温下被小分子巯基化合物引起特异性的快速积聚,因而可作为柱后探针试剂进行在线检测^[17],亦可用于复杂样品中巯基化合物的富集分离^[18],通过去除基底干扰物质、富集纯化目标物,帮助提高传统检测技术的选择性、灵敏度及准确度。通常依照 Tseng 法^[19]制备的 AuNPs(即以氯金酸和柠檬酸钠进行制备)因溶液中存在的柠檬酸根致使 AuNPs 表面带有负电荷,因此会因静电作用吸附而带有相反电荷的物质,难以获得高的富集效率。其改进的做法是采用非离子表面活性剂进行修饰,以构成复合纳米粒子从而降低表面负电荷数量,有效提高其对氨基硫醇的捕获能力。本文以非离子表面活性剂 Tween 20 修饰 AuNPs 利用氨基硫醇中的-SH 与 AuNPs 的特异性作用,选择性富集样品中的氨基硫醇,建立了无需衍生的 HPLC-UVD 同时测定 3 种氨基硫醇的新方法,并应用于人血浆测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

10ATVP 高效液相色谱仪,包括 SPD-10AVP 紫外检测器、LC-10AT 二元高压梯度泵、CLASS-VP 5.03 色谱工作站(日本岛津公司),TU1901 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),TGL-16G-A 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),PHSJ-4A 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

Hcys、GSH、三(2-羧乙基)膦(Tris(2-chloroethyl) phosphate, TCEP)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)标准品均购自美国 Sigma 公司,Cys 标准品、氯金酸($\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA, 分析纯)和乙腈(色谱纯)均购自上海国药集团。其余试剂均为分析纯,超纯水由 Direct-Q 制得(美国 Millipore 公司)。

1.2 溶液的配制

1.2.1 标准溶液的配制

准确称量适量的 Cys、Hcys 和 GSH 标准品,用超纯水配制成 0.01 mol/L 储备液,置于 4 °C 冰箱中保存,用前以流动相逐级稀释至所需浓度。将上述 Cys、Hcys 和 GSH 储备液分别稀释成 1.0 mmol/L 溶液后,各移取 4 mL、4 mL、1 mL 定容于 100 mL 容量瓶中,配制成含 40 $\mu\text{mol/L}$ Cys、40 $\mu\text{mol/L}$ Hcys、10 $\mu\text{mol/L}$ GSH 的混合标准液;各移取 1 mL、1.5 mL、4 mL 定容于 100 mL 容量瓶中,配制成含 10 $\mu\text{mol/L}$ Cys、15 $\mu\text{mol/L}$ Hcys、40 $\mu\text{mol/L}$ GSH 的混合标准液。

1.2.2 HAuCl_4 溶液(100 g/L)的配制

准确称取 1.21 g $\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 用超纯水定容于 10 mL 容量瓶中,置于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.3 缓冲溶液的配制

配制 60 mmol/L 的 NaH_2PO_4 溶液,加入适量的 H_3PO_4 ,调节至所需酸度,得到磷酸盐缓冲液,于 4 °C 冰箱中保存。

配制 20 mmol/L 的醋酸钠溶液,加入适量等浓度的醋酸溶液,调节 pH 至 4.0,得到醋酸盐缓冲液,于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.4 TCEP 溶液和 DTT 溶液的配制

分别准确称取适量的 TCEP 和 DTT 标准品,用超纯水配制成 1 mol/L 储备液,置于 4 °C 冰箱中保存。用前视需要稀释成所需的浓度。

1.2.5 TCA 溶液的配制

称取 20 g TCA 溶解于 100 mL 超纯水中,配制成 200 g/L TCA 溶液。

1.3 AuNPs 的制备与修饰

13 nm 粒径 AuNPs 的制备: 所有玻璃仪器用新配制的洗液浸泡 2 h, 超声波清洗 30 min 后备用。参照 Tseng 方法^[19] 取 60 mL 0.75 g/L 柠檬酸钠溶液移入烧瓶中, 加热回流到溶液近沸时, 迅速加入 54 μ L 100 g/L 氯金酸溶液, 保持沸腾并继续搅拌回流反应 30 min, 除去加热源后继续搅拌并冷却至室温, 最后将得到的纳米金溶胶保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

Tween 20-AuNPs 的制备: 将 120 μ L 20% (v/v) Tween 20 均匀混合于上述 AuNPs 溶液中, 室温条件下静置过夜, 所制备的 Tween 20-AuNPs 溶液浓度为 4.8 nmol/L, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。用前采用离心方式、按需要浓缩成适宜的浓度。

1.4 血浆样品预处理及结果分析

心血管病人血浆样品由桂林医学院附属医院提供, 采集后及时进行避光处理。之后进行的预处理均需全程避光以避免 GSH 的氧化。

将 100 μ L 血浆、100 μ L 100 mmol/L TCEP 与 200 μ L 20 mmol/L 醋酸盐缓冲液混合于离心管中, 静置 30 min, 按照血浆与 20% TCA 体积比为 2:1 加入 TCA 溶液沉降蛋白。旋涡振荡 3 min, 静置 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min。取上层清液于离心管中, 用水稀释至 1 mL。加入 200 μ L 144 nmol/L Tween 20-AuNPs, 室温下静置 2 h, 离心 (12 000 r/min) 10 min, 沉淀物用水清洗 2 次, 保留下层溶液 15 μ L, 向其中加入 1 mol/L DTT 溶液 2.0 μ L, 静置 1.0 h 后, 离心 (12 000 r/min) 10 min。取上层清液 10 μ L 注入 HPLC 进行分析测定。

测定数据采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。

1.5 色谱分离条件

Spursil™ C18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m; 北京迪马科技有限公司) 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 流动相为 60 mmol/L NaH_2PO_4 - H_3PO_4 缓冲溶液 (pH = 2.0), 等度洗脱, 流速为 0.5 mL/min, UVD 波长为 200 nm。

2 结果与讨论

2.1 富集步骤及机理

Tween 20-AuNPs 对氨基硫醇的富集过程如图 1 所示: (1) 经 Tween 20 修饰后, AuNPs 表面负电荷被覆盖, 降低了静电引力; (2) 氨基硫醇结构中的 -SH 与 AuNPs 形成 S-Au 键, 被特异性捕获于 Tween 20-AuNPs 表面; (3) DTT 分子以配位交换的方式取代 Tween 20-AuNPs 表面的氨基硫醇, 使之游离于溶液^[18]。

2.2 富集条件的优化

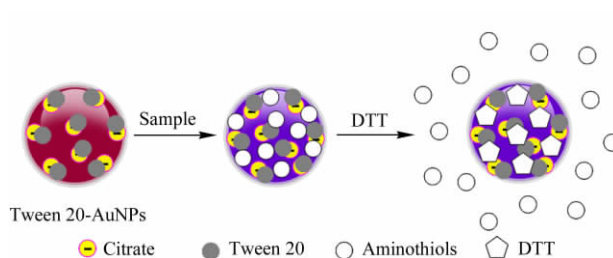


图 1 Tween 20-AuNPs 对氨基硫醇的富集步骤示意图
Fig. 1 Illustration of the procedure for the enrichment of aminothiols using Tween 20-AuNPs

2.2.1 Tween 20-AuNPs 浓度的影响

溶液中的氨基硫醇分子能否被 Tween 20-AuNPs 完全捕获是决定方法准确度的关键因素之一, 故实验首先考察 Tween 20-AuNPs 的使用浓度。控制其他萃取条件不变, 为保证被其吸附的氨基硫醇能够完全脱附, 采用高浓度 (1 mol/L) 的 DTT 溶液。为避免对样品产生不同程度的稀释, 固定 Tween 20-AuNPs 的溶液加入量为 200 μ L, 考察其浓度分别为 72、96、120、144、156 nmol/L 时对 1 mL 标准品溶液 (含 40 μ mol/L Cys、40 μ mol/L Hcys、10 μ mol/L GSH) 峰面积的影响。结果显示, 当 Tween 20-AuNPs 浓度在 144 nmol/L 时, Cys、Hcys、GSH 的峰面积出现最大值, 且不再继续增加。因此确定 144 nmol/L 为实验所用最佳浓度。

2.2.2 DTT 浓度和样品体积的影响

氨基硫醇从 Tween 20-AuNPs 表面的脱附程度取决于 DTT 的浓度。经实验考察发现, 未参与交换反应的剩余 DTT 并不会干扰氨基硫醇的检测, 因此, 确定适当过量的 DTT 浓度既可保证交换洗脱的完全又可减少试剂用量。保持标准品溶液体积为 1 mL (浓度同 2.2.1 节)、Tween 20-AuNPs 溶液浓度为 144 nmol/L, 考察了 DTT 浓度分别为 100、150、200、300、500 mmol/L 时的脱附效果。实验结果表明, 最佳脱附出现在 DTT 浓度为 300 mmol/L 时, 3 种氨基硫醇的峰面积达到最大值且不再随 DTT 浓度增大而继续增加。由于血浆样品中共存其他多种氨基硫醇, 导致 Tween 20-AuNPs 的实际吸附量会大幅增加, 为了保证目标氨基硫醇能够完全洗脱, 根据文献^[18], 本实验采用高浓度 (1 mol/L) 的 DTT 溶液。

上述条件确定后, 实验研究了氨基硫醇总浓度为 500 μ mol/L 时不同样品体积对富集效果的影响。当样品体积大于 480 μ L 时, 氨基硫醇的峰面积不再

发生变化,即 200 μL 144 nmol/L Tween 20-AuNPs 的富集能力达到饱和。针对 100 μL 血浆样品中氨基硫醇类物质的测定,上述实验条件能够保证测定目标物完全被 Tween 20-AuNPs 捕获,并完全被 DTT 洗脱。

2.3 色谱分离条件的优化

3 种氨基硫醇均为亲水性物质,其中 Cys、Hcys 亲水性更强而导致在普通 C_{18} 柱上保留困难,加之血浆样品中大量亲水性物质的存在,更增加了分离难度。故选择纯水柱 SpursilTM C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm) 作为本实验分离用色谱柱。

由于氨基硫醇中同时存在酸性基团巯基和碱性基团氨基,为抑制电离、增强保留、矫正峰形从而改善分离度,实验选用磷酸二氢钠作为缓冲盐添加于流动相中。

根据 Cys、Hcys、GSH 的等电点 pI 分别为 5.05、5.55、2.86,实验对流动相 pH 值进行了考察。结果证实,随着 pH 的降低,分离度不断提高,即 $pH < pI$ 值时带正电荷的氨基硫醇分子有助于在反相色谱柱上的保留。考虑到色谱柱对酸性的耐受能力,确定 $pH = 2.0$ 为流动相溶液的最佳酸度。

实验对色谱分离各因素的考察范围和最佳选择结果见表 1。在最佳分离条件下氨基硫醇标准品按 1.4 节方法富集处理后测定得到的色谱图见图 2。

表 1 色谱分离参数的考察范围及最佳参数
Table 1 Testing ranges of chromatographic separation parameters and optimal values

Parameter	$c(\text{NaH}_2\text{PO}_4) /$ (mmol/L)	pH	Flow rate / (mL/min)	Column temp. / $^{\circ}\text{C}$
Investigation range	30 – 80	1.5 – 5.0	0.2 – 0.8	25 – 40
Optimal value	60	2.0	0.5	30

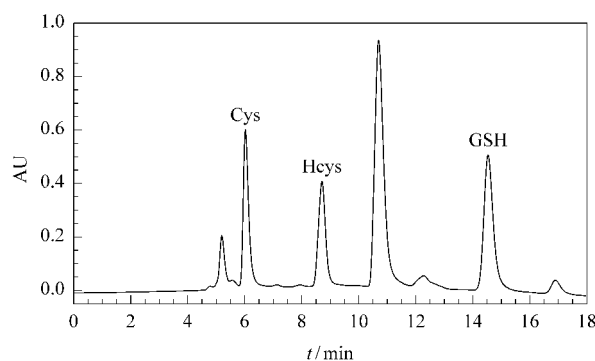


图 2 Cys、Hcys、GSH 混合标准溶液的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of a standard mixture of Cys, Hcys and GSH

SpursilTM C_{18} column: 250 mm $\times$ 4.6 mm; mobile phase: 60 mmol/L phosphate buffer solution ($pH = 2.0$); flow rate: 0.5 mL/min; column temperature: 30 $^{\circ}\text{C}$; detection wavelength: 200 nm.

2.4 工作曲线、线性范围和检出限

配制一系列浓度的 Cys、Hcys、GSH 混合标准溶液,在所选择的最佳实验条件下进行测定,以浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 为横坐标 (C),峰面积为纵坐标 (A),得到线性范围、回归方程和相关系数 (r^2);以信噪比 (S/N) 为 3 确定检出限。结果见表 2。

表 2 氨基硫醇测定的方法学参数
Table 2 Methodology parameters for the determination of aminothiols

Aminothiol	Regression equation	Linear range/($\mu\text{mol/L}$)	Correlation coefficient (r^2)	LOD/(nmol/L) ($S/N = 3$)
Cys	$A = 3655.1C + 18865$	0.025 – 350	0.9901	5.0
Hcys	$A = 4365.9C + 13547$	0.020 – 60	0.9983	6.0
GSH	$A = 21318C + 21612$	0.010 – 50	0.9985	2.5

A: peak area; C: concentration, $\mu\text{mol/L}$. LOD: limit of detection.

2.5 日内、日间精密度

在所选择的最佳实验条件下,同一天内对浓度分别为 10、15、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cys、Hcys、GSH 标准溶液平行富集、测定 5 次,计算峰面积的相对标准偏差 (RSD) (日内精密度);以相同的方法测定日间精密度。结果见表 3。

表 3 方法的日内和日间精密度 ($n = 5$)
Table 3 Intra- and inter-day precisions (relative standard deviations, RSDs) of the method ($n = 5$) %

Aminothiol	Intra-day	Inter-day
Cys	4.5	4.8
Hcys	4.6	5.0
GSH	3.8	4.3

2.6 样品分析

2.6.1 氨基硫醇峰位的确定以及富集效果比较

图 3a 为富集处理后人血浆样品的色谱图。为对色谱峰进行定性,向样品中加入微量的标准品,按照相同的方法进行分离检测,经比较确定 Cys、Hcys、GSH 的保留时间分别为 6.01、8.98、14.5 min。

为了体现本方法的除杂和富集效果,将未经富集的样品直接进行测定,所得色谱图见图 3b。将两图进行比较,发现未富集的样品出现许多强峰,目标峰被掩盖。这是由于血浆中存在的大量亲水物质均在紫外区短波长段有吸收,对氨基硫醇的测定产生严重干扰。而采用 Tween 20-AuNPs 进行样品富集

后,仅保留了分子中有巯基的物质,色谱峰数量明显减少,基底干扰得到消除。结果表明 Tween 20-AuNPs 对样品的纯化、富集效果显著,有效地提高了 HPLC-UVD 测定氨基硫醇的选择性、灵敏度和准确度。

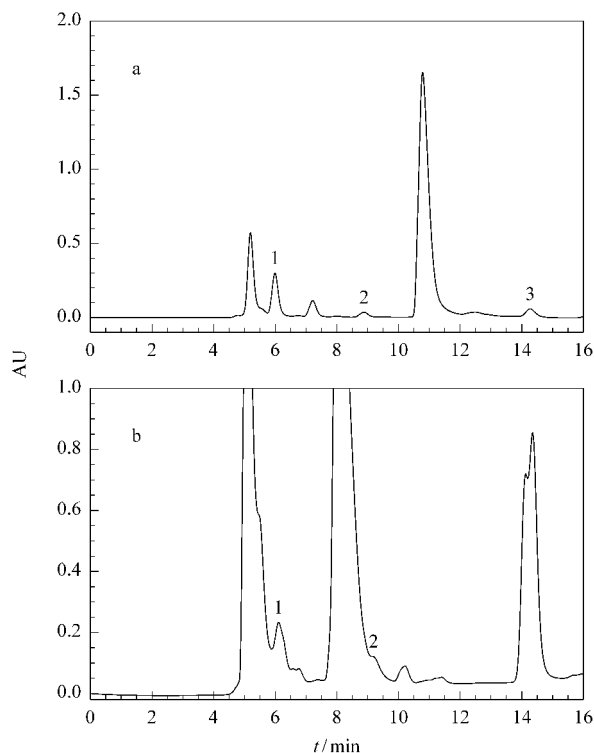


图 3 (a) 经富集处理及 (b) 未经富集处理的人血浆样品的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of aminothiols in a human plasma sample (a) treated with Tween 20-AuNPs and (b) without treatment

Chromatographic conditions were the same as in Fig. 2.

Peak identifications: 1. Cys; 2. Hcys; 3. GSH.

2.6.2 回收率的测定

在血浆中加入 Cys、Hcys、GSH 标准品,按照 1.4 节的方法进行富集处理后,进行色谱分离测定,结果见表 4。

2.6.3 样品测定

在优化的实验条件下,对 7 例心血管疾病病人血浆中 Cys、Hcys、GSH 水平进行测定,并与文献^[9]报道的健康人血浆氨基硫醇水平进行了对比(见表 5)。独立样本 *t* 检验结果提示,疾病组 Hcys 血浆水平高于健康组,差异呈极其显著性 ($P < 0.01$),说明 Hcys 与心血管疾病具有高度相关性;疾病组 GSH 血浆水平亦显著低于健康组 ($P < 0.05$),是否可作为心血管疾病的评估参考指标还有待进一步论证;而 Cys 血浆水平两组无差异。

表 4 氨基硫醇在血浆样品中的加标回收率 ($n=3$)

Table 4 Recoveries of aminothiols spiked in a plasma sample ($n=3$)

Aminothiol	Added / ($\mu\text{mol/L}$)	Found / ($\mu\text{mol/L}$)	Recovery / %	RSD / %
Cys	50.0	46.4	92.8	4.3
	100.0	101.1	101.1	2.6
	150.0	141.5	94.3	4.0
Hcys	5.0	4.8	96.0	4.8
	10.0	10.1	101.0	3.9
	15.0	15.4	102.6	3.0
GSH	2.5	2.6	104.0	5.2
	5.0	4.9	98.0	4.7
	10.0	10.6	106.0	3.1

表 5 心血管病人血浆中的氨基硫醇含量 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=7$)

Table 5 Contents of aminothiols in plasma samples of cardiovascular disease patients

Aminothiol	Patient group	Control group (literature value ^[9])
Cys	193.8 $\pm$ 45.6	209.7 $\pm$ 43.0
Hcys	29.2 $\pm$ 13.2*	8.9 $\pm$ 2.0
GSH	7.9 $\pm$ 3.0**	10.9 $\pm$ 3.1

* $P = 0.009 < 0.01$, ** $P = 0.032 < 0.05$, compared with controls.

3 结论

本文以 Tween 20 修饰的 AuNPs 进行样品预富集-HPLC 分离-UVD 检测,建立了无需衍生、同时测定 Cys、Hcys、GSH 3 种氨基硫醇的新方法。优化了氨基硫醇的富集及脱附条件、色谱分离条件,并考察了相关方法学参数。此方法仅采用 UVD 即可获得较高灵敏度及良好的可靠性,具有显著的实际应用价值。该方法已成功应用于心血管病人血浆中上述氨基硫醇水平的测定,并可用于其他生物样品中氨基硫醇类物质或者巯基药物的富集测定。

参考文献:

- [1] Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. N Eng J Med, 2002, 346: 476
- [2] Brattström L, Wilcken D E L. Am J Clin Nutr, 2000, 72: 315
- [3] Zhang T. Practical Clinical Medicine (张涛. 实用临床医学), 2007, 8(9): 136
- [4] Zhao Y F, Jiang X J, Ju X D, et al. Modern Medical Journal (赵玉芳, 江晓津, 鞠兴东, 等. 现代医学), 2003, 31(5): 296
- [5] Liu Z, Yang W B, Jin Y J, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘忠, 杨文博, 金永杰, 等. 色谱), 2004, 22(3): 231
- [6] Kusmierek K, Chwatko G, Glowacki R, et al. J Chromatogr B, 2009, 877: 3300
- [7] McMenamin M E, Himmelfarb J, Nolin T D. J Chromatogr B, 2009, 877: 3274

- [8] Benkova B , Lozanov V , Ivanov I P , et al. J Chromatogr B , 2008 , 870: 103
- [9] Cevasco G , Piatek A M , Scapolla C , et al. J Chromatogr A , 2010 , 1217: 2158
- [10] Sakhi A K , Blomhoff R , Gundersen T E. J Chromatogr A , 2007 , 1142: 178
- [11] Lavigne V , Pons A , Dubourdieu D. J Chromatogr A , 2007 , 1139: 130
- [12] Bakirdere S , Bramanti E , D'ulivo A , et al. Anal Chim Acta , 2010 , 680: 41
- [13] Jiang Z T , Liang Q L , Luo G A , et al. Talanta , 2009 , 77: 1279
- [14] Bayle C , Caussé E , Couderc F. Electrophoresis , 2004 , 25: 1457
- [15] Kong Y , Zheng N , Zhang Z C , et al. Chinese Journal of Chromatography (孔宇 , 郑凝 , 张智超 , 等. 色谱) , 2003 , 21(2) : 135
- [16] Wang Z X , Tan B , Hussain I , et al. Langmuir , 2007 , 23: 885
- [17] Lu C , Zu Y B , Yam V W W. J Chromatogr A , 2007 , 1163: 328
- [18] Huang Y F , Chang H T. Anal Chem , 2006 , 78: 1485
- [19] Chang C W , Tseng W L. Anal Chem , 2010 , 82: 2696