

新型荧光衍生试剂用于尿样中痕量游离雌二醇和雌三醇的反相高效液相色谱-荧光检测和质谱定性

赵怀鑫¹, 孙志伟^{2,3}, 夏 莲^{2,3}, 孙学军¹, 索有瑞², 李玉林², 尤进茂^{1,2*}

(1. 山东省生命有机分析重点实验室, 曲阜师范大学化学科学学院, 山东 曲阜 273165;

2. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 :合成了新型高灵敏度的荧光标记试剂 10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯(EASC)。采用 EASC 柱前衍生化实现了雌二醇(E2)和雌三醇(E3)的反相高效液相色谱(RP-HPLC)-荧光分析及柱后质谱鉴定。试剂 EASC 比丹磺酰氯(DNS-Cl)具有更高的紫外、荧光和质谱检测灵敏度,其荧光发光强度是丹磺酰氯的 1 000 倍以上。EASC 与 E2 和 E3 在 NaHCO₃ 缓冲液(pH 10.5)中,于 60 ℃ 下反应 3 min 即可获得稳定的荧光产物,最大激发波长(λ_{ex})和最大发射波长(λ_{em})分别为 270 nm 和 430 nm。所建立的方法具有良好的重现性,线性回归系数大于 0.999 0,检出限($S/N=3$)为 31 fmol 和 40 fmol。对实际根田鼠尿样中的雌二醇和雌三醇含量进行了测定,结果令人满意。

关键词 :10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯;柱前衍生;反相高效液相色谱;丹磺酰氯;雌二醇;雌三醇;尿

中图分类号 :O658 **文献标识码** :A **文章编号** :1000-8713(2009)02-0164-05 **栏目类别** :研究论文

A novel fluorescence reagent for the analysis of trace free oestradiol and oestriol in urine by reversed-phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry identification

ZHAO Huaixin¹, SUN Zhiwei^{2,3}, XIA Lian^{2,3}, SUN Xuejun¹, SUO Yourui²,
LI Yulin², YOU Jinmao^{1,2*}

(1. *Key Laboratory of Life-Organic Analysis of Shandong Province, College of Chemistry Science,*

Qufu Normal University, Qufu 273165, China; 2. *Northwest Plateau Institute of Biology,*

the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 3. *Graduate University*

of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract : A new fluorescent derivatization reagent, 10-ethyl-9-oxo-9,10-dihydroacridine-2-sulfonyl chloride (EASC), was synthesized. A pre-column derivatization with EASC and reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method with fluorescence (FL) detection and mass spectrometry (MS) identification was performed for the trace analysis of oestradiol (E2) and oestriol (E3) in urine. This reagent shows higher sensitivities in ultraviolet (UV), FL and MS detection than those of dansyl chloride (DNS-Cl), and the fluorescence intensity of EASC is 1 000 times higher than that of DNS-Cl. The results of derivatization indicated that the derivatives can be obtained by the labeling reaction of EASC with estradiol (E2) and estriol (E3) in the presence of NaHCO₃ buffer (pH 10.5) at 60 ℃ for 3 min. The excitation wavelength (λ_{ex}) and emission wavelength (λ_{em}) were 270 nm and 430 nm, respectively. The established method exhibited excellent reproducibility and recovery. The calibration curves were linear with regression coefficients over 0.999 0, and the detection limits ($S/N=3$) were 40, 31 fmol for the studied compounds. The practical applicability of the method was demonstrated by analyzing trace of free oestradiol and oestriol in the urine of root voles.

Key words : 10-ethyl-9-oxo-9,10-dihydroacridine-2-sulfonyl chloride (EASC); pre-column deri-

* 通讯联系人: 尤进茂, 博士, 教授, 博士生导师. Tel : (0537) 4458501, E-mail : jmyou6304@163.com.

基金项目 : 国家自然科学基金资助项目(No. 20075016)和中国科学院“百人计划”项目(No. 328).

收稿日期 : 2008-11-19

vatization ; reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ; dansyl chloride (DNS-Cl) ; oestradiol ; oestriol ; urine

雌二醇(oestradiol , E2)和雌三醇(oestriol , E3)是由卵巢的卵泡和黄体分泌的雌激素,后者是前者的代谢产物。它们的活性比例为 100:3。测定组织或排泄物中雌二醇和雌三醇等激素的含量能直接为临床诊断有关繁殖、掠夺、哺乳及极端环境下的生理行为提供科学依据。目前,雌二醇和雌三醇的测定方法主要有气相色谱法^[1-9]、高效液相色谱法(HPLC)^[10-14]。丹磺酰氯(DNS-Cl)作为酚羟基化合物的标记试剂被广泛应用于含酚羟基雌激素的荧光和质谱测定中^[15-17],但其荧光灵敏度相对较弱。本研究以高荧光量子产率的吡啶酮为荧光发色团,制备了新型的吡啶酮磺酰氯荧光试剂 10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯(EASC)。实验结果表明,该试剂比丹磺酰氯具有更强的荧光发光强度,在质谱条件下表现出比丹磺酰氯衍生物更强的质谱离子化效率。采用 EASC 建立了柱前衍生 HPLC-荧光检测和质谱鉴定方法,实现了对根田鼠尿样中痕量雌二醇和雌三醇的简便、快速、准确的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司),配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器、100 位自动进样器、大气压化学电离源(APCI),PHMK 型显微熔点仪(上海精密仪器厂);NEXUS-470 红外光谱仪(KBr 压片)(美国 Nicolet 公司);CARY300 紫外/可见分光光度计(美国 Varian 公司);F50-10S 荧光分光光度计(日本日立公司)。

10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯(纯度为 97%,自制^[18]);丹磺酰氯(纯度为 99%,美国 Alfa Aesar 公司);雌二醇和雌三醇标准品(DNS-Cl ,98%,美国 Sigma 公司);乙腈(色谱纯,山东禹王公司);其他试剂均为分析纯。水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

根田鼠尿样由中科院西北高原生物研究所生态研究室提供。

1.2 标准溶液的配制

准确称取一定量的雌二醇和雌三醇标准品,用乙腈-水(体积比为 1:1)混合液配成 5.0 mmol/L 的溶液,相应低浓度的标准溶液(如 0.1 mmol/L)用上述乙腈-水混合液稀释而成。

称取 16.05 mg 的 10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯,用乙腈溶解并定容至 50 mL,其浓度为 1.0 mmol/L。

称取 13.5 mg 的丹磺酰氯,用乙腈溶解并定容至 50 mL,其浓度为 1.0 mmol/L。

1.3 标准品的衍生过程

向安瓿瓶中依次加入 80 μ L NaHCO₃ 缓冲液(pH 10.5),20 μ L 雌二醇和雌三醇混合标准溶液(两者的浓度均为 0.1 mmol/L)、100 μ L 衍生试剂(1.0 mmol/L)、100 μ L 乙腈,封口,摇匀 30 s 后于 60 $^{\circ}$ C 恒温水浴中振荡反应 3 min。取出放冷后,加入 30 μ L 乙酸-水(体积比为 1:1)、70 μ L 乙腈-水(体积比为 1:1)后直接进样 10 μ L 分析。

1.4 色谱-质谱条件

Hypersil BDS-C18 色谱柱(200 mm \times 4.6 mm , 10 μ m ,大连依利特分析仪器有限公司)。流动相 A 为 30% 乙腈水溶液,流动相 B 为 100% 乙腈;线性梯度洗脱条件:15 min 内由 15% B 梯度升至 100% B,保持 10 min,流速为 1.0 mL/min。进样量为 10 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C。荧光激发(λ_{ex})和发射波长(λ_{em})分别为 270 nm 和 430 nm。

大气压化学电离源(APCI),正离子模式,喷雾压力 413.2 MPa,干燥气流量为 5 L/min,干燥气温度为 350 $^{\circ}$ C,气化温度为 450 $^{\circ}$ C,毛细管电压为 3 500 V,电晕电流为 4 000 nA(Pos)^[19,20]。

1.5 根田鼠尿样中雌二醇、雌三醇的提取衍生

在 200 μ L 根田鼠尿样中加入 0.5 mL 水、2 mL 乙酸乙酯剧烈摇匀,取有机层 1.5 mL,吹干,用 100 μ L NaHCO₃(pH 10.5)溶解,剧烈摇匀 1 min 后加入 100 μ L 衍生试剂 EASC(1.0 mmol/L)摇匀 30 s 后于 60 $^{\circ}$ C 恒温水浴下振荡反应 3 min,取出放冷后加 30 μ L 乙酸-水(体积比为 1:1)混合液中和,加 70 μ L 乙腈-水(体积比为 1:1)稀释后直接进样分析。

2 结果与讨论

2.1 衍生条件的优化

EASC 不仅能衍生较高浓度的雌二醇和雌三醇,而且还能成功地衍生并检测出浓度为 nmol/L 级的雌二醇和雌三醇,能够满足痕量分析要求。对影响 EASC 衍生雌二醇和雌三醇的 4 个因素(缓冲溶液 pH 值、衍生反应的时间和温度及衍生试剂用量)的优化结果表明:当缓冲溶液 pH 为 10.5 时,衍生产率最大,pH 值进一步增大,衍生产率因 EASC 的水解而降低。衍生反应 3 min 时衍生产物的信号强度最强,衍生时间延长则信号强度有所降低。对衍生温度的考察结果表明:随温度升高产率增大,60

℃下具有最高的响应信号强度;进一步提高衍生化温度,将引起试剂和衍生产物的水解,导致响应信号降低。对衍生试剂用量考察结果表明:试剂总用量为雌二醇和雌三醇总量的 7 倍后响应信号恒定。

2.2 EASC 与 DNS-Cl 性质的比较

2.2.1 紫外光谱

EASC 和 DNS-Cl 相比,具有不同的紫外发色团:DNS-Cl 的母体环为 *N,N*-二甲基萘基为主的二元环状共轭结构,*N* 原子的 sp^2 杂化轨道与母环形成共价键后剩余一对孤电子与萘环形成 $p-\pi$ 共轭,作为增色团增强萘环的紫外吸光度。EASC 的母体环为吡啶酮,具有更大的三元环状共轭结构,环中同时含有富电子的 O 和 N 原子,与母体环形成 $p-\pi$ 共轭体系,因而具有更强的紫外吸收。EASC 乙腈溶液有 4 个紫外吸收带,分别为 238 nm ($\epsilon = 2.51 \times 10^4$ L/(mol·cm)), 256 nm ($\epsilon = 2.87 \times 10^4$ L/(mol·cm)), 288 nm ($\epsilon = 1.38 \times 10^4$ L/(mol·cm)) 和 331 nm ($\epsilon = 0.65 \times 10^4$ L/(mol·cm))^[18]。在各自的最大紫外吸收波长下,EASC 的摩尔吸光系数与 DNS-Cl 的摩尔吸光系数^[21,22]的比值 $\epsilon_{\text{EASC}}/\epsilon_{\text{DNS-Cl}} = 6.67$,表明 EASC 比 DNS-Cl 具有更强的紫外吸收^[18]。

2.2.2 荧光光谱

EASC 乙腈溶液的荧光光谱显示出 3 个激发波长(270, 320 和 404 nm)和一个最大发射波长(430 nm)。为了减小拉曼或瑞利散射对荧光检测的影响,本文选择 270 nm 作为激发波长。DNS-Cl 的 $\lambda_{\text{ex}} = 348$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 556$ nm^[23],在其他条件相同时,两者的荧光发射强度比 $I_{\text{F(EASC)}}/I_{\text{F(DNS-Cl)}} = 1\,063 \sim 1\,142$;荧光量子产率之比 $\Phi_{\text{F(EASC)}}/\Phi_{\text{F(DNS-Cl)}} = 43.2$ 。该结果表明:EASC 与 DNS-Cl 相比,显示出更强的荧光强度。

2.2.3 质谱

分别用相同浓度的标记试剂 EASC 和 DNS-Cl 按照“1.3”节衍生相同浓度的分析物,衍生液等体积混匀后进样,得到的两种标记试剂的雌二醇和雌三醇衍生物的总离子流图见图 1。试剂 EASC 与 DNS-Cl 对雌二醇和雌三醇衍生物的质谱离子流强度(I_{C})比为 $I_{\text{C(EASC)}}/I_{\text{C(DNS)}} = 5.0$ (雌三醇)和 $I_{\text{C(DNS)}}/I_{\text{C(EASC)}} = 8.5$ (雌二醇)。结果表明:EASC 表现出比 DNS-Cl 具有更强的离子流强度。

2.3 质谱增敏机理

在 LC-APCI-MS 条件下,EASC 衍生物表现出较高的质谱总离子流强度,主要是因为普通的含水流动相中,EASC 分子即可实现向烯醇式异构的转变,形成分子内季胺离子^[18]。在 APCI 软电离源的质谱条件下形较强的离子流,质谱检测灵敏度得

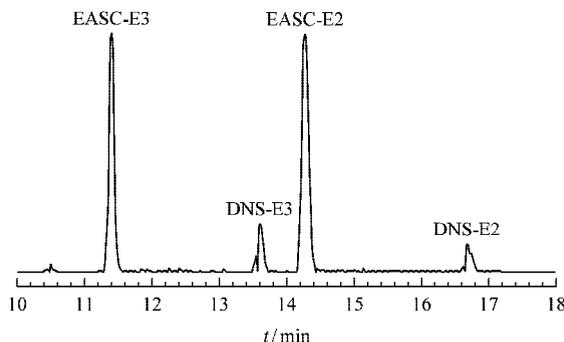


图 1 雌二醇、雌三醇的 EASC、DNS-Cl 衍生物的质谱信号强度对比

Fig. 1 Comparison of the mass intensities for derivatized oestradiol and oestrinol with EASC and DNS-Cl in total ion current chromatogram

Derivatization reagents: EASC, 1.0 mmol/L × 100 μL; DNS-Cl, 1.0 mmol/L × 100 μL; oestradiol and oestrinol: 0.1 mmol/L × 20 μL; injected amount: 100 pmol.

到提高。这一结果可由对表观解离常数(pK_a)的估算得到验证。运用 ACD/p K_a DB 软件(Advanced Chemistry Development, 加拿大多伦多)计算出在标准条件下的表观解离常数(以 25 ℃ 纯水溶液的离子强度为 0 计),进而评价表观解离常数。计算得到 DNS-Cl 分子中 N 原子的 $pK_a = 5.06 \pm 0.30$,而 EASC 分子中 N 原子的 $pK_a = -1.30 \pm 0.20$ 。这一推断也可运用 ACD/p K_a DB 软件对酸、碱官能团的 pK_a 计算后进行验证。由公式(1)和(2)分别对酸性和碱性官能团的离子化效率(I)进行评定。计算结果见表 1(计算时考虑了取代常数和诱导电子效应,结果的置信度为 95%)。由表 1 知,在 $pH < 7.0$ 的任何酸性水溶液中 EASC 的离子化效率均大于 DNS-Cl,这一计算结果与实际质谱条件下的测定结果完全吻合。

$$I = \frac{100}{1 + 10^{pK_a - pH}} \times 100\% \quad (1)$$

$$I = \frac{100}{1 + 10^{pH - pK_a}} \times 100\% \quad (2)$$

2.4 雌二醇、雌三醇的 EASC 衍生物的质谱定性

采用大气压化学电离源进行在线的柱后质谱定性。雌二醇的一级质谱图和二级质谱见图 2-a, b, 裂解模式见图 2-c。质谱数据解析如下:准分子离子峰 $[M + H]^+$ 的 m/z 为 558.9。特征碎片离子峰(m/z 540.8)归属于 EASC-E2 分子脱除一分子水 $[M + H - H_2O]^+$ 的结果。特征碎片离子峰(m/z 304.8)归属衍生物分子裂解后丢失雌二醇母体环结构 $[M + H - (E2 - H_2O)]^+$ 。特征碎片离子峰(m/z 222.8)归属分子裂解后释放出的 10-乙基吡啶酮母体环。

表 1 雌二醇(E2)、雌三醇(E3)及其 DNS-Cl 和 EASC 衍生物的质谱增敏官能团、 pK_a 预测值和离子化效率(I)Table 1 Estimated pK_a , ionization efficiency (I) and mass spectrometry enhancing functional groups in DNS-Cl and EASC derivatives of oestradiol (E2) and oestriol (E3)

Compound	Function group	$pK_a^{1)}$	$I/\%^{2)}$						
			pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
E3	3-OH	10.25 ± 0.70	5.62×10^{-6}	5.6×10^{-5}	5.62×10^{-4}	5.62×10^{-3}	5.62×10^{-2}	0.56	5.32
	16-OH	15.55 ± 0.60	2.82×10^{-11}	2.82×10^{-10}	2.82×10^{-9}	2.82×10^{-8}	2.82×10^{-7}	2.82×10^{-6}	2.82×10^{-5}
	17-OH	14.55 ± 0.60	2.82×10^{-10}	2.82×10^{-9}	2.82×10^{-8}	2.82×10^{-7}	2.82×10^{-6}	2.82×10^{-5}	2.82×10^{-4}
EASC-E3	9-OH	3.12 ± 0.30	43.14	88.35	98.69	99.86	99.98	99.99	99.99
	16-OH	15.52 ± 0.60	3.02×10^{-11}	3.02×10^{-10}	3.02×10^{-9}	3.02×10^{-8}	3.02×10^{-7}	3.02×10^{-6}	3.02×10^{-5}
	17-OH	14.51 ± 0.60	3.09×10^{-10}	3.09×10^{-9}	3.09×10^{-8}	3.09×10^{-7}	3.09×10^{-6}	3.09×10^{-5}	3.09×10^{-4}
DNS-Cl-E3	5-NH	3.23 ± 0.30	37.06	85.48	98.33	99.83	99.98	99.99	99.99
	16-OH	15.52 ± 0.60	3.02×10^{-11}	3.02×10^{-10}	3.02×10^{-9}	3.02×10^{-8}	3.02×10^{-7}	3.02×10^{-6}	3.02×10^{-5}
	17-OH	14.51 ± 0.60	3.09×10^{-10}	3.09×10^{-9}	3.09×10^{-8}	3.09×10^{-7}	3.09×10^{-6}	3.09×10^{-5}	3.09×10^{-4}
E2	3-OH	10.27 ± 0.60	5.37×10^{-6}	5.37×10^{-5}	5.37×10^{-4}	5.37×10^{-3}	5.37×10^{-2}	0.534	5.09
	17-OH	15.09 ± 0.40	8.13×10^{-11}	8.13×10^{-10}	8.13×10^{-9}	8.13×10^{-8}	8.13×10^{-7}	8.13×10^{-6}	8.13×10^{-5}
EASC-E2	9-OH	3.12 ± 0.30	43.14	88.35	98.69	99.87	99.98	99.99	99.99
	17-OH	15.04 ± 0.40	9.12×10^{-11}	9.12×10^{-10}	9.12×10^{-9}	9.12×10^{-8}	9.12×10^{-7}	9.12×10^{-6}	9.12×10^{-5}
DNS-Cl-E2	5-NH	3.23 ± 0.30	37.06	85.48	98.33	99.83	99.98	99.99	99.99
	17-OH	15.05 ± 0.40	8.91×10^{-11}	8.91×10^{-10}	8.91×10^{-9}	8.91×10^{-8}	8.91×10^{-7}	8.91×10^{-6}	8.91×10^{-5}

1) The apparent dissociation constant $pK_a \pm 95\%$ confidence limit was estimated using the ACD/ pK_a DB software. 2) The ionization efficiencies were calculated using the equations 1 and 2.

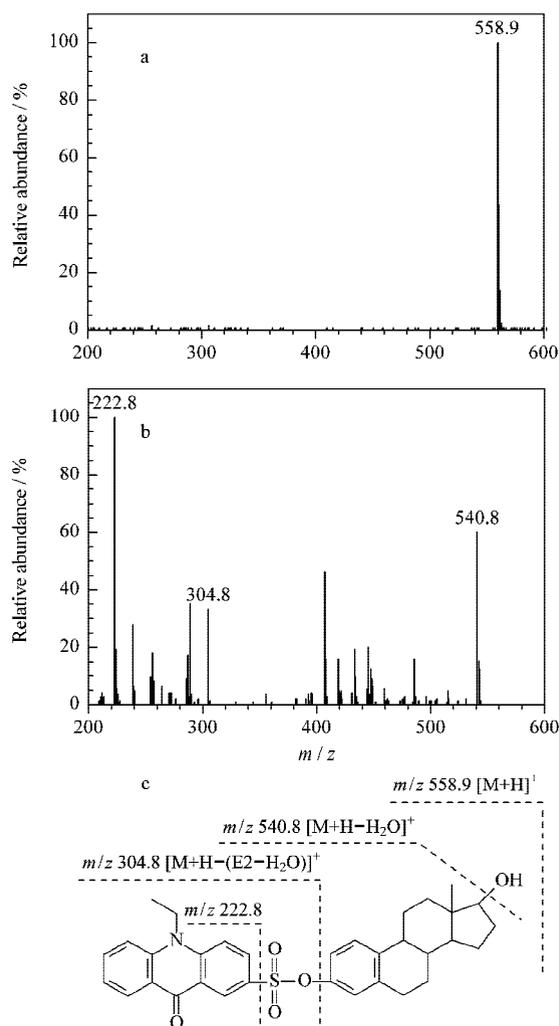


图 2 (a) 雌二醇衍生物的一级质谱图、(b) 二级质谱图及其 (c) 裂解模式

Fig. 2 (a) MS spectrum, (b) MS/MS spectrum and (c) cleavage mode for oestradiol derivatives

2.5 标准品的色谱分析

结构对比表明, EASC 是一个含氮杂原子并具有三元环状共轭分子, 其疏水性本应大为增强, 然而由于吡啶酮母体环所产生的烯醇式转变, 使衍生物分子极性极大地增加, 亲水性增强, 各衍生物组分在色谱体系下的保留时间提前(见图 1, EASC 衍生物比丹磺酰氯衍生物的保留时间提前约 2 min), 有利于色谱体系下对衍生物的快速洗脱。优化条件下雌二醇和雌三醇标准品衍生物的荧光检测色谱图及质谱总离子流图见图 3。由图 3-b 可知, 质谱总离

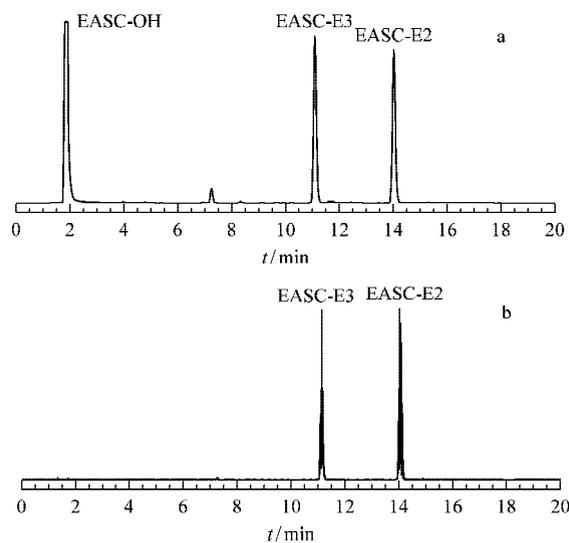


图 3 (a) 标准品雌二醇、雌三醇衍生物的色谱分离图和 (b) 质谱总离子流图

Fig. 3 (a) Chromatogram and (b) total ion current chromatogram of oestradiol and oestriol standard derivatives

Injection: 200 pmol.

子流图中仅出现 EASC-E2 和 EASC-E3 两个峰,原因是试剂水解后的 EASC-OH 是 10-乙基吡啶酮-3-磺酸,在 APCI-MS 正离子检测模式下不被检测。

2.6 重复性、线性回归方程和检出限

在相同洗脱条件下,采用在线荧光检测,对雌二醇和雌三醇衍生物平行测定 6 次,保留时间相对标准偏差(RSD)在 0.011%~0.014% 之间,峰面积的 RSD 在 0.20%~0.39% 之间。

进样量在 40.0 pmol~50 fmol 范围内,依据峰面积(Y)和实际进样量(X)进行线性回归,得到雌二醇衍生物和雌三醇衍生物的回归方程、线性相关系数和检出限(S/N=3)见表 2)。检出限为 40 和 31 fmol,线性相关系数不低于 0.999 1。

表 3 根田鼠尿样中雌二醇、雌三醇的含量及加标回收率和相对标准偏差(RSD)(n=6)

Table 3 Contents of oestradiol and oestriol in the urine of root voles, recoveries and relative standard deviations (RSDs) for oestradiol and oestriol spiked in urine sample of root voles (n=6)

Compound	Content/ (μg/L)	Added/ (μg/L)	Found/ (μg/L)	Recovery/ %	RSD/ %	APCI-MS identification
EASC-E2	2.30	13.60	15.90	90.18	2.56	Yes
EASC-E3	4.08	14.40	18.48	81.78	4.36	Yes

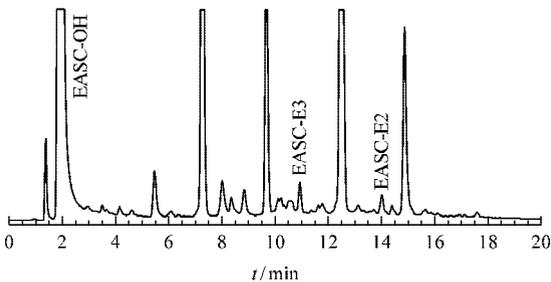


图 4 根田鼠尿样中雌二醇、雌三醇的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of oestradiol and oestriol in the urine of root voles

3 结论

以 10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯为柱前衍生化试剂,通过对衍生化条件的优化,建立了灵敏、快速测定雌二醇和雌三醇的方法。实验结果表明,10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯比丹磺酰氯具有更强的紫外吸收和荧光发光特性,对雌二醇和雌三醇的标记具有灵敏、快速等特点,标记的产物具有强的荧光并展示高的 APCI-MS 灵敏度,对实际样品中的雌二醇和雌三醇测定能够获得很好的柱后在线质谱鉴定。目标物的峰面积和保留时间的重现性良好,测定结果令人满意。

参考文献:

[1] Xu L, Spink D C. Anal Biochem, 2008, 375(1): 105
 [2] Biddle S, Teale P, Robinson A, et al. Anal Chim Acta, 2007, 586: 115
 [3] Wu H, Ramsay C, Ozaeta P, et al. Clin Chem, 2002, 48: 364
 [4] Santen R J, Demers L, Ohorodnik S, et al. Steroids, 2007,

表 2 雌二醇、雌三醇 EASC 衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients and detection limits of oestradiol and oestriol EASC derivatives

EASC derivative	Regression equation	r	LOD/fmol
Oestradiol (E2)	$Y = 44.4814X - 16.1912$	0.9991	40
Oestriol (E3)	$Y = 45.668X - 27.1719$	0.9993	31

Y : peak area ; X : injected amount , pmol.

2.7 回收率实验及实际样品的测定

根田鼠尿样中雌二醇和雌三醇的色谱分离结果见图 4。向 200 μL 根田鼠尿样中定量加入雌二醇和雌三醇标准品后,按照本文所建立的方法进行提取及衍生化,测得的 6 次平行测定的平均回收率和 RSD 见表 3。

72(8): 666

[5] Biancotto G, Angeletti R, Traldi P, et al. J Mass Spectrom, 2000, 37(12): 1266
 [6] Croley T R, Hughes R J, Koenig B G, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(13): 1087
 [7] Huang C, Jiang L Y, Chen J M, et al. Chinese Journal of Chromatography (黄成, 姜理英, 陈建孟, 等. 色谱), 2008, 26(5): 618
 [8] Chen J, Qin Y, Zhang M J. Chinese Journal of Chromatography (陈捷, 秦燕, 张美金. 色谱), 2006, 24(1): 19
 [9] Zhang H, Mao J, Sun C J, et al. Chinese Journal of Chromatography (张宏, 毛炯, 孙成均, 等. 色谱), 2003, 21(5): 451
 [10] Russell J A, Malcolm R K, Campbell K, et al. J Chromatogr B, 2000, 744(1): 157
 [11] Zhang H W, Henion J. Anal Chem, 1999, 71(18): 3955
 [12] Ma Q, Wang C, Wang X, et al. Chinese Journal of Chromatography (马强, 王超, 王星, 等. 色谱), 2007, 25(4): 541
 [13] Xiao X H, Yin Y, Hu Y L, et al. Chinese Journal of Chromatography (肖小华, 尹怡, 胡玉玲, 等. 色谱), 2007, 25(2): 234
 [14] Zhao S, Wu D N, Wang P. Chinese Journal of Chromatography (赵珊, 吴大南, 王鹏. 色谱), 2004, 22(3): 267
 [15] Tai S S C, Welch M J. Anal Chem, 2005, 77(19): 6359
 [16] Gong Y, Yip S C, Thamarai S K, et al. J Chromatogr B, 2007, 860(2): 166
 [17] Friso S, Choi S W, Do Inikowski G G, et al. Anal Chem, 2002, 74(16): 4136
 [18] Zhao H X, Sun X J, Sun Z W, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (赵怀鑫, 孙学军, 孙志伟, 等. 分析化学), 2009, 37(2): 187
 [19] Simonetta F, Sangw C, Gregory G, et al. Anal Chem, 2002, 74(17): 4526
 [20] Ndjoko K, Wolfender J L, Hostettmann K. J Chromatogr B, 2000, 744(2): 249
 [21] Chen R F. Anal Biochem, 1968, 25: 412
 [22] Kosoy A, Möller C, Perdomo D, et al. J Bio Mol Bio, 2004, 37(2): 260
 [23] Geuns J M C, Orriach M L, Swennen R, et al. Anal Biochem, 2006, 354(1): 127