

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是我在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。

作者签名：王清江 日期：2004.5.3

学位论文使用授权声明

本人完全了解华东师范大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅。有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名：王清江

导师签名：杨高之

日期：2004.5.3

日期：2004.5.3

毛细管电泳-安培检测联用技术及其应用研究

毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 是近二十年来发展最快的分离分析技术之一, 它将分离柱效提高到上百万理论塔板数, 进样量也从微升水平进入纳升水平, 其研究和应用涉及环境分析、药物分析、生化分析等几乎所有的分析化学领域。但毛细管电泳较小的进样量和极细的毛细管通道内径也给检测也带来了困难。紫外、激光诱导荧光、质谱等各种检测方法都具有一定的优点, 但往往存在仪器比较昂贵、衍生化步骤烦琐等缺点。电化学检测中的安培检测技术, 具有比紫外检测更高的灵敏度, 且仪器简单、价格成本低、线性范围宽、操作简便, 因而其与毛细管电泳联用后在分析化学领域得到了广泛的研究和应用。

同高效液相色谱分离相比, 毛细管电泳在分离效率和仪器等方面有明显的优势。但由于毛细管电泳进样量远远小于液相色谱, 利用紫外或荧光检测时光程很短, 导致浓度检测灵敏度较低, 不能满足有些痕量分析的要求。利用毛细管电泳本身的一些特殊性质, 通过改变其进样和分离时的一些条件, 如采用电堆集、场放大进样和等速电泳等简单易行的方法, 可以显著提高毛细管电泳检测灵敏度。

本论文的目的之一是研究毛细管电泳-安培检测联用技术(CE-AD)中提高灵敏度的方法, 包括场放大进样和等速电泳等。论文也探讨了毛细管电泳-安培检测联用技术在药物分析、生化分析、食品分析中的一些应用。主要内容共分为六章:

第一章为绪论。在该章中综述了毛细管电泳的特点、分离模式和理论基础、联用的检测器、提高灵敏度的方法、毛细管电泳-安培检测的理论研究和应用现状等, 并简单介绍了本论文的目的意义。

第二章共分为两节。在第一节中探讨了毛细管电泳-安培检测法测定复方降压中药珍菊降压片中两个含量较高的有效成分: 芦丁和氢氯噻嗪。在最佳条件下, 这两种分析物在 12min 内能够被很好的检测出, 在碳电极上也有较大的电流响应, 检测灵敏度分别是 $7.02 \times 10^4 \text{ nA} \cdot \text{L/mol}$ 和 $2.17 \times 10^5 \text{ nA} \cdot \text{L/mol}$, 检测限分别是 $5.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ 和 $2.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ ($S/N=3$)。应用该联用技术成功测定了这两种有效成分体内代谢后在尿液中的含量。

在第二节中探讨了使用不同稀释剂时毛细管电泳-安培检测中的场放大进样

现象。我们通过研究用不同稀释溶剂对在水溶液中分别带正电荷、中性电荷、负电荷的盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁三种组分稀释后电流响应的变化,探索了在毛细管电泳电动进样时稀释溶剂对场放大进样的影响规律。从实验中发现: a. 改变样品溶液的酸度,可以实现带正电荷、负电荷的离子同时进行场放大进样,该法比以往改变电极极性的方法简单易行; b. 使用更高的缓冲溶液稀释样品,也可以使带负电荷的离子达到场放大进样; c. 通过选择合适的稀释溶剂,可以调节同一样品中不同成分的检测灵敏度,使其电流响应可以达到同一数量级水平。如在珍菊降压片中,盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁三种有效成分的相对含量相差上百倍,若用缓冲溶液稀释样品,其电流响应难以在同一张电泳图上反映出,但用水做稀释剂,它们的电流响应可以在同一张电泳图上直观地反映出来。

第三章包括两节内容。在第一节中讨论了毛细管区带电泳-安培检测法间接测定 Fenton 反应中的羟基自由基的条件。在 $30\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ (pH 7.4) 缓冲溶液中,实现了水杨酸、2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的完全分离,检测限达到了 10^{-8}mol/l 数量级。并且通过对当归多糖对羟基自由基的清除能力的研究,证明该方法可用来鉴定不同药物对羟自由基的清除能力。

在第二节中探讨毛细管电泳-安培检测中的等速电泳富集现象。由于人体内新陈代谢产生的自由基的浓度极低,如在尿样中羟自由基捕获剂的浓度在 10^{-9}mol/l 数量级,所以毛细管电泳-安培检测法尚不能直接进行生化样品中羟自由基的测定。我们尝试了用毛细管瞬时等速电泳的方法对 2,3-DHBA 进行了管内富集,选用对甲基苯甲酸为前导电解质,运行缓冲溶液为终止电解质,使 2,3-DHBA 的检测限降低了 20 倍,在灵敏度上达到了进行生化样品中羟自由基分析的要求。本文对适合于毛细管电泳-电化学检测特性的等速电泳条件也作了初步的探讨。

第四章利用胶束电动毛细管电泳-安培检测联用同时测定了食品中的活性胺及其前体氨基酸。我们以碳圆盘电极为工作电极,用胶束电动毛细管电泳-安培检测法(MECC-AD)同时分离和检测食品中生物活性胺及其前体氨基酸,即色胺、酪胺、色氨酸和酪氨酸。所建立的方法简单、可靠、重现性较好。分离和检测的最佳条件是: $0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$) ~ 氢氧化钠 (NaOH) 缓冲溶液 (PH 10.35) 作为运行缓冲液,其中含 $0.03\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 十二烷基硫酸钠 (SDS); 分离电压为

20kV; 检测电位为+0.80V(Vs. SCE)。在优化条件下, 色胺、酪胺、色氨酸和酪氨酸得到完全分离, 在三个数量级范围内, 峰电流与待测物呈良好的线性关系, 检测限(S/N=3)达到 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将建立的方法用于实际样品米酒的测定, 测定结果令人满意。

第五章应用毛细管电泳-安培检测测定中药杂多糖的组成。中药杂多糖的组成分析多使用气相色谱法和液相色谱法, 在分离和检测过程中往往需要复杂的衍生化步骤。我们利用毛细管区带电泳-安培检测法可以直接测定中药多糖水解后的单糖组成。在选定的最佳条件下, 当归多糖和亚麻多糖的水解产物-岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖在 25min 内实现完全分离而且在铜电极上有很好的电流响应。这六种单糖的线性范围都在 $5.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 检测限低于或接近 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (S/N=3)。实验表明当归多糖由岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖组成, 其摩尔比为 1.0 : 13.6 : 15.0 : 8.7 : 21.3 : 3.7, 亚麻多糖由半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖组成, 其摩尔比为 1.0 : 4.98 : 1.1。所提取的两种多糖的纯度分别为 98.3% 和 97.6%。该方法具有分析速度快、仪器简单、灵敏度高和重现性好等优点。

第六章内容是血浆中水溶性小分子抗氧化剂的毛细管电泳-电化学检测研究。人体内的水溶性小分子抗氧化剂包括抗坏血酸(Vc)、谷胱甘肽(GSH)、尿酸(UA)、色氨酸(Try)和半胱氨酸(Cys)等。这些小分子抗氧化剂的分析主要以高效液相色谱-紫外/电化学检测联用为主, 其中电化学检测比紫外检测有更高的灵敏度。本文应用毛细管电泳-电化学检测方法, 以金属铜电极为检测电极, 探索了测定人血浆中水溶性小分子抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)、尿酸(UA)、色氨酸(Try)和半胱氨酸(Cys)的最佳条件。在最佳实验条件下各组分的线性范围在 $1.0 \times 10^{-6} - 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 检测限在 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 数量级。该法具有分析速度快、灵敏度高等优点, 对血浆样品的测试获得了满意的结果。

关键词: 毛细管电泳; 安培检测; 场放大进样; 瞬时等速电泳; 氨基酸; 羟自由基; 氨基酸; 中药多糖; 抗氧化剂

Study on Technique and Application of Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection

Capillary Electrophoresis (CE) is one of the most important separation techniques in recent twenty years. Because the theoretical plate number is great developed to tens of thousands and even millions and the volume of sample injection reaches nano milliliter level in CE analysis, it is studied and applied to most analytical areas. However, the small sample injection volume and very thin capillary bring about difficulties to detections. The common used detection methods are ultra-violet (UV), laser induced fluorescence (LIF), mass spectra (MS) and electrochemical detection (ED). Every detection method performs some advantages and suffers from some shortages too. For example, LIF and MS are very sensitive but the instrumentations are very expensive, and some complicated derivation procedures are needed. Amperometric detection (AD), one kind of electrochemical detections, is more sensitive than the common used UV detection, and have many merits when coupled with CE, such as simple instrumentation and operation, low cost, wide linear range, etc. The combination of CE with AD is extensively studied and applied in most analytical fields for its above advantages.

The advantages of CE in separation efficiency and instrumentation are obvious when compared to HPLC. However, the concentration detection sensitivity of CE is much lower than HPLC owing to its smaller sampling volume and the short light distance when coupled with UV or FI detectors. The detection sensitivity of CE could be great improved by some special characters itself such as field-amplification-injection and isotachopheresis.

One goal of this dissertation is to explore the methods of improving the sensitivity of CE-AD. Another one is applying this CE-AD technique to resolve some actual analytical problems in pharmaceutical analysis, biochemical analysis and food analysis. The contents of this dissertation include six chapters:

In the first chapter, the characteristics of CE, the separation models and basic

theories of CE, the detectors, the sensitivity-enhanced methods, the studies and applications of CE-AD simply is introduced. The goal and significance of this dissertation are introduced too.

Chapter 2 includes two sections. In the first section, capillary zone electrophoresis (CZE) with amperometric detection (AD) was firstly applied to the simultaneous determination of rutin (RT) and hydrochlorothiazide (HCT) in compound Chinese herb medicines and human urine samples. The two analytes could be perfectly analyzed within 12 min and showed significant current responses at carbon electrode under the optimum conditions and their detection limits were $5.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ and $2.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ respectively (S/N=3).

In the second section of this chapter, we explored the effects of diluents during electro-kinetic sampling on field amplification injection by studying the changes of current responses of clonidine hydrochloride, hydrochlorothiazide and rutin which are originally positive, neutral, negative respectively in water solution when diluted in different solvents. It was found that the simultaneous field amplification injection for positive and negative particles could be carried out by changing the acidity of samples. This method is much easier than converting electricity polarity. The effect for negative particles could be also reached by using buffer solution with higher concentration as diluents. The detection sensitivity of different ingredients existed in one sample could be adjusted and then their current responses could be reach the same magnitude level by using suitable diluents. For example, the current responses of clonidine hydrochloride, hydrochlorothiazide and rutin are difficult to compare clearly in the same electropherogram if using the running buffer as diluent because their contents are different in one hundred times. But, their current responses could be compared clearly in one electropherogram if water is used as the diluent.

Chapter 3 includes two sections too. In the first section, the indirect determination of hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) by CZE-AD was studied by measuring its reaction products with salicylic acid (SAL): 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA) and 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA). The optimum conditions of CZE-AD for the determination of 2,3-DHBA and 2,5-DHBA were explored. Under the optimum

conditions, SAL, 2,3-DHBA and 2,5-DHBA could be perfectly separated within 15 min, and the detection limits were as low as $2 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$, which were much better than CE-UV method. The method was also applied to study the scavenging activity of angelica polysaccharide. The experimental results showed that the introduced CZE-AD method was very sensitive and practical in both the determination of free $\text{OH}\cdot$ and evaluation of the activities of $\text{OH}\cdot$ scavengers.

In the second section of this chapter, the method of transient capillary isotachophoresis with AD was studied. Because the concentration of $\text{OH}\cdot$ produced during the metabolism in human beings is very low, such as it is about at 10^{-9} mol/l level in urine sample, it is impossible to directly detect $\text{OH}\cdot$ in biochemical samples by CE-AD. We tried to gather 2,3-DHBA 20 times by transient isotachophoresis by selecting p-methyl benzoic acid as lead electrolyte and running buffer as terminate electrolyte, so the detection sensitivity could reach the requirement of biochemical analysis. The special conditions of transient isotachophoresis coupled with AD were tentatively studied too.

In chapter 4, the simultaneously determining biogenic amines and their precursor amino acids in food by MECC-AD was studied. The optimal conditions of separation and detection of typtamine, tyramine, tryptophan and tyrosine were $0.020 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ borate-NaOH (pH 10.35) containing $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium dodecylsulphate (SDS) as running buffer, 20 kV as separation voltage, and +800 mV (vs. SCE, at carbon disk electrode) as detection potential. Under the optimum conditions, the four analytes were separated completely within 15 minutes, and good linearity, reproducibility and recovery results were obtained. Based on three times standard deviation of a low level sample, the detection limit for the four analytes were as low as at $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ level. This method was also successfully used in the analysis of actual rice spirit, and satisfactory assay results were obtained.

Chapter 5 is determining the constituent monosaccharides of hetero polysaccharides in traditional Chinese herbs by CE-AD. GC and HPLC are usually to the constituent monosaccharides analysis of hetero polysaccharides, but complicated derivation procedures are necessary both in separation and detection. In

this paper, CE-AD applied to indirectly determine the compositions of hetero-polysaccharides angelica sinensis and flax by analyzing their hydrolyzed products: fucose, galactose, glucose, arabinose, rhamnose and xylose. Under the selected optimum conditions, the six monosaccharides could be perfectly separated within 25 min and showed significant current responses at copper electrodes. The linear ranges of the six monosaccharides were all from 5.0×10^{-6} to 2.0×10^{-4} molL⁻¹ and their detection limits were lower or near 1.0×10^{-6} molL⁻¹ (S/N=3). Experiments showed that the angelica sinensis polysaccharides were composed of fucose, galactose, glucose, arabinose, rhamnose (mole ratio 1.0 : 13.6 : 15.0 : 8.7 : 21.3 : 3.7) and the flax polysaccharides were composed of galactose, glucose and arabinose (mole ratio 1.0 : 4.98 : 1.1), and the purity of these polysaccharides leached by the introduced leaching method were 96.3% and 94.6% respectively. Analyzing polysaccharides by this method has some merits of quickness, low-volume sampling, simple instrument, high sensitivity and high reproducibility.

Chapter 6 is determining the small water-soluble antioxidants in plasma by CE-AD. The small water-soluble antioxidants in plasma including GSH, UA, Try and Cys are very important to human being health and their detection is significant too. The optimum conditions of determining GSH, UA, Try and Cys by CZE-AD based on metallic copper electrode were detailed studied. The optimum conditions of CZE-AD were separation voltage 15 kV, running buffer 25mmolL⁻¹Na₂B₄O₇- 50molL⁻¹ NaH₂PO₄ (pH 7.9) , kinetic injection time 30 s and detection potential 0.5 V. The linear ranges of the four analytes were $(1.0 \sim 5.0) \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-4}$ molL⁻¹ and the limits of detection were about 10^{-6} molL⁻¹ under the optimal experimental conditions. This method performed some advantages in quickness, high sensitivity and simple instrumentation, and satisfactory results were obtained when it was applied to analyzing human plasma samples.

Key words: Capillary electrophoresis; Amperometric detection; Field amplification injection; Transient isotachopheresis; Amino acids; Hydroxyl radical; Polysaccharides; Antioxidants

第一章 绪 论

第一节 毛细管电泳概述

毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 是近二十年来发展最快的分离分析技术之一, 是分析科学中继高效液相色谱之后的又一重大进展, 它将分离柱效提高到上百万理论塔板数, 进样量也从微升水平进入纳升水平, 其研究和应用涉及环境分析、药物分离、生化分析等几乎所有的分析领域, 尤其是多通道集成芯片毛细管电泳技术的出现, 极大提高了 DNA 测序的速度, 使人类基因组草图的绘制工作提前三年完成。

毛细管电泳是一类以毛细管为分离通道、高压直流电场为驱动力的新型色谱分离分析技术, 其仪器部分包括高压电源、样品/缓冲溶液池、毛细管、样品检测器、数据采集器等[见图 1]。在高压直流电场的作用下, 缓冲溶液中的带正电荷的离子会从正极往负极移动, 带负电荷的离子会从负极向正极移动, 从而达到分离。实际上, 石英毛细管在 pH 大于 3 时, 其表面带有负电荷, 和缓冲溶液形成双电层, 当外加电压时, 双电层中的水合阳离子层会导致缓冲溶液整体向负极移动, 形成电渗流(EOF)。因而离子在毛细管内的实际迁移速率为其电泳速率和电渗流速率的矢量和。

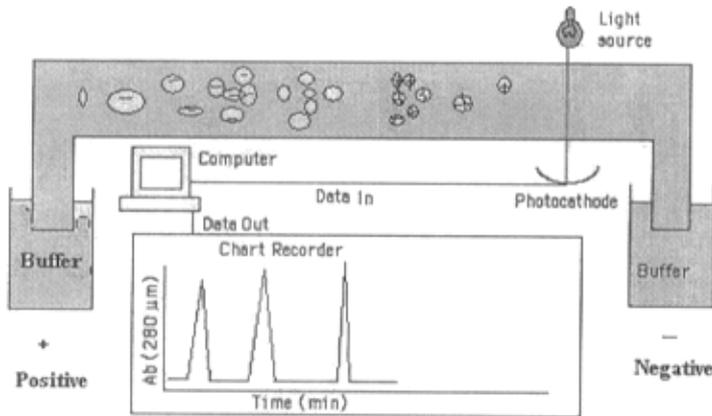


Fig. 1 Normal Instruments of Capillary Electrophoresis

毛细管电泳技术是瑞典科学家 Hjerten 首先提出的[1]，他用壁涂甲基纤维素的 3 mm ID（内径）石英管进行电泳分离。1970 年，Everaerts 用等速电泳系统做 CZE 分离，操作简单但柱效较低[2]。1979 年，Mikkers 等进行了理论研究，通过减少进样量并采用较细的毛细管可以抑制区带电场畸变和对流，从而获得高效率。实验证明在 pmol 级进样量下，0.2mm i.d 的管子可以获得小于 10 μ m 板高的效率[3]。1981 年，Jorgenson 和 Lukacs [4] 用 75 μ m i.d 的毛细管，在 30 kV 的电压下进行电泳，可以产生 40 万理论塔板数的效率，并实现了正、负离子的同时分离，同时对高电场和小内径对柱效的决定性影响、分离机理等问题进行了探讨。他们的研究使 CZE 取得了突破性进展，奠定了毛细管电泳的理论基础。1987 年 Hjerten 用毛细管进行传统的等电聚焦电泳，提出了毛细管等电聚焦（Capillary Isoelectric Focusing, CIEF）[5]。同年，Cohen 和 Karger 发表了所做的毛细管凝胶电泳工作（Capillary Gel Electrophoresis, CGE）[6]，这是现代效率最高的分离方法。到 1988 年，出现了第一批毛细管电泳商品化仪器，CE 开始突飞猛进的发展。

与高效液相色谱(HPLC)相对应，毛细管电泳也称为 HPCE，它具有以下一些优点：

a) 分离效率高，灵敏度高，分析速度快。在毛细管电泳中，柱效一般为每米几十万理论塔板数，高的可达每米 100 万以上，而在凝胶电泳中这一指标可达几百万甚至上千万，可以完成其他分离方法不能完成的手性分离等。商品仪器的操作已可全部自动化，通常的分析时间不超过 30min，在采用电化学检测器时，毛细管电泳的检测限可达 10^{-7} - 10^{-8} mol/l，而激光诱导荧光检测器的灵敏度更高。

b) 分离适用范围广。从无机离子到 DNA 片段，都可用于分离，尤其多用于分离生物多聚体如肽类、蛋白质、核苷酸、金属离子、无机离子及药物。

c) 多种分离模式。在同一硬件条件下提供毛细管区带电泳（CZE），胶束电动力学毛细管色谱（MEKC），毛细管色谱（CEC），毛细管等电聚焦（CIEF），毛细管凝胶电泳（CGE），毛细管等速电泳（CITP）等多种分离模式，可根据样品的不同理化特性，选择合适的分离模式。

d) 样品、试剂用量小，经济意义大。CE 的样品用量只需几纳升，缓冲液只需几毫升，仅为 HPLC 的几分之一。而且 CE 有很大的选择性，可以根据分子

的性质（如大小，电荷数，手性，疏水性等）对极广泛的对象进行有效分离，为达到相似的目的，HPLC 则要消耗许多价格昂贵的柱子和溶剂。

e) 易微型化。毛细管电泳技术中的石英柱内径为几十微米，外径为 300~500 微米左右，分离通道可以较短，由于进样量、缓冲溶液流量都相当小，样品池可以很小，这样各个系统可以集中制作在一片玻璃或硅胶片上，实现微型化。毛细管电泳芯片是目前研究广泛的微流控分析技术的核心。

f) 仪器简单，柱子价格低廉，进样、清洗等操作简单。

目前，国际上的毛细管电泳研究侧重于应用，但方法本身的完善和发展工作也同步进行。一般来讲这种发展和完善主要涉及到毛细管电泳的分离模式、进样和检测器几个重要方面。

第二节 毛细管电泳分离模式及其理论基础

2.1 毛细管区带电泳 (CZE)

毛细管区带电泳是一种最简单的毛细管电泳分离技术，是目前毛细管电泳中最基本、应用最为广泛的一种分离模式。整个分离过程在内部充满缓冲液、两端施加高压的石英毛细管中进行。其机理是溶液中的被检测物在电场的作用下根据不同的荷质比发生迁移，由于粒子淌度不同而实现分离。但是，CZE 只能分析荷电粒子，对于中性粒子，由于其不存在淌度差异而不能实现多种粒子的分离 [4]。

毛细管电泳中带电离子的迁移速度和淌度（电迁移率）为：

$$\gamma = \mu_{em} E$$

(γ : 迁移速度, μ_{em} : 电泳迁移率, E : 电场)

$$\mu_{em} = q / 6 \pi \eta r$$

(q : 离子电荷数, η : 溶液粘度, r : 离子半径)

但由于毛细管中的溶剂因轴向直流电场作用而导致电渗，其速率为

$$\mu_{eo} = (\epsilon \zeta / 4 \pi \eta r)$$

(μ_{eo} : 电渗率, η : 黏度, ζ : 管壁的电动势, r : 毛细管半径)

因此, μ_H 带电离子在毛细管电泳中的实际迁移速率为:

$$\mu_H = \mu_{em} + \mu_{eo}$$

在 CZE 模式中影响分离的最主要因素是缓冲液的成分和 pH 值。一种理想的缓冲液应该使电导率低(为了在高电压下不产生高电流)且对分离的干扰最小,常见的有磷酸、硼酸、柠檬酸、磷酸/硼酸缓冲液。CZE 可应用于蛋白质和肽类的分离,但由于会在毛细管表面产生 ζ -电势造成区带扩展或分离失败,所以分离设定的 pH 值应高于被检物等电点 1-2 个单位,或者增加缓冲液的离子强度。

2.2 胶束电动毛细管色谱 (MEKC)

1984年, Terabe 用含 SDS (十二烷基磺酸钠)的胶束溶液分离了中性分子[7],建立了毛细管电泳的一个重要分支,即胶束电动毛细管色谱 (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MEKC)。MEKC 弥补了 CZE 分离模式的不足,它不仅可以测定荷电离子,而且可以测定中性粒子。在该分离模式中,要向缓冲溶液中加入表面活性剂(如十二烷基磺酸钠, SDS)使之与被测物分子形成胶束,它可以作为“准固定相”,由于胶束相的电泳速度不同,从而实现各种粒子的分离。近年来,各种各样的表面活性剂得到了研究,如环糊精、聚乙烯吡啶等,并在许多样品测试中得到了应用[8~11]。

2.3 等电聚焦 (CIEF)

由于两性电介质在分离介质中的迁移形成了 pH 梯度,由此蛋白质可以根据各自不同的等电点进行分离。当蛋白质顺着这一梯度迁移到相当于其等电点的位置时,就在该点停下来,由此产生一个非常窄的区带,不同蛋白质等电点不同,所形成区带位置不同,从而实现蛋白质的分离。该分离模式可以用来测定蛋白质的等电点,分离异构体或其它方法难以分离的蛋白质,而且由于其分辨率极高,可以用来获取适量的蛋白质纯品[12~14]。

2.4 毛细管凝胶电泳 (capillary gel electrophoresis, CGE)

毛细管凝胶电泳是以凝胶为载体的电泳方式,常用的凝胶是聚丙烯酰胺和琼

脂糖。凝胶是毛细管电泳的理想介质，能限制谱带展宽，所得峰形尖锐，柱效极高。其原理为交联的聚丙烯酰胺具有三维多孔结构，是一种优良的筛分介质，溶质按分子大小进行分离。该分离模式在DNA测序和限制片段分析方面展现出优异性能，成为蛋白质、多肽、寡核苷酸和DNA等生物大分子分离分析的有利工具。由于在毛细管中灌制凝胶有一定的难度，近年来发展了非胶筛分介质，如线性聚丙烯酰胺，甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯醇等，这些物质适合于DNA测序[15~17]。

2.5 毛细管电色谱(CEC)

毛细管电色谱是将高效液相分离技术中的诸多固定相微粒填充到毛细管中，以样品与固定相之间的相互作用为分离机制，以电渗流为流动相驱动力的色谱分离技术。它突出的优点是可以同时分离带电离子与中性分子，而且通过控制分离条件实现更好的分离效率。它结合了毛细管电泳和高效液相的优点，既有毛细管电泳的高效率，又有高效液相的高选择性，是一种很有发展前景的分离模式，在药物分析中已经取得了很好的应用[18~20]。

2.6 毛细管矩阵电泳(CAE) [21]

毛细管矩阵电泳(capillary array electrophoresis, CAE)是将几十根甚至上百根等长的毛细管平行并列在一起，同时分离检测大量样品。它是在常规 CE 原理和技术的基础上,结合微型制造技术设计出来的一种检测技术，它具有物料通量大，可以实现几十或几百个样品同时分析，单个样品分析成本低的特点，同时，由于毛细管很多，起到了分流作用可以施加更高的电压，在保证分离效率的同时减少了分离时间。CAE 在高效快速的分离、高灵敏度的检测、灵活性的设计和多功能单元的集成方面的潜力已逐渐显示出来。如将 PCR 反应器集成在芯片上,可实现对 PCR 扩增的实时监测[22]。

2.7 毛细管电泳芯片[23]

微流控毛细管电泳是“芯片实验室”(laboratory on-chip)的一个重要方面，它通过石英、玻璃、PDMS 板上刻蚀的网状结构实现样品分离，毛细管槽和其他贮样池可以通过激光刻蚀或化学法刻蚀，分离段长度一般在 5 厘米左右，电压为几

百伏。该模式由于柱短，场强大，因此分离速度快，比常规的毛细管分离时间大大缩短。分离效率也很高，同时样品用量少，检测限低，目前多在实验室研究阶段，刚刚开始商品化[24~27]。

2.9 非水毛细管电泳 (NACE)

CE 通常是在以水为溶剂的缓冲溶液中进行的，这限制了分析物的使用范围，而如果用纯有机溶剂替代水介质来完成特殊样品的电泳分离，即非水毛细管电泳法(nonaqueous capillary electrophoresis, NACE)，则可以解决这个问题。这种分离模式具有灵敏度高、改善分离、减少毛细管内壁吸附等很多优点。NACE 由 Walbrohel 等[28]于 1984 年首次以乙腈为非水溶剂分离了几何异构体喹啉和异喹啉，取得了不错的效果。目前，NACE 应用的研究热点集中在有机溶剂、电解质、检测器的选择以及方法的优化等方面。NACE 主要用于分析不易溶于水而易溶于有机溶剂的物质，分离在水溶剂 CE 中淌度十分相似的物质，但仍存在很多限制性因素，而且要选择合适的有机溶剂有一定的难度。

第三节 毛细管电泳分析中的检测联用技术

毛细管电泳以其高效、快速、进样量少的优势赢得了分析化学和生物化学研究人员的普遍重视，但毛细管内径极细、进样体积为纳升级、溶质区带超小体积的特性对检测系统提出了很高的要求，因此检测系统成了毛细管电泳技术的难点和薄弱环节。目前已实现了多种检测器与毛细管电泳联用，涉及紫外检测器、荧光检测器、质谱检测器、电化学检测器等。

3.1 紫外检测器

该类结构简单、通用性较好、商品化仪器性能较高，是目前应用最广泛的毛细管电泳检测器。其通用性好，适用于小分子如药物类分析，但是由于毛细管内径很细，所以光路狭窄，影响了检测灵敏度。Tsuda T [29]采用 $50\ \mu\text{m} \times 1000\ \mu\text{m}$ 的矩形毛细管，将光路长度扩展了 20 倍，同时也增大了检测体积，检测限达到了 $10^{-7}\ \text{mol/l}$ 。Hartwich R. A [30]等采用一个纳升级多反射单元，光路长度扩展了 44

倍, 检测限提高了40倍, 达到了 $6.5 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ 。

3.2 荧光检测器

激光诱导荧光检测的原理是用激光作为光源, 通过诱导被测样品的荧光基团发出荧光信号来测定分析物, 是目前最灵敏的检测器之一, 其灵敏度高达 10^{-9} - $10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [31], 可以进行单分子和单细胞检测[32]。 Mathies R A [33]等用微管道深为 $50 \mu\text{m}$ 的电泳芯片, 采用四路荧光检测, 20 min 内完成了600 碱基对(bp) 的DNA测序, 准确率达99.4%。但是只能用于本身或衍生能产生荧光的物质的检测, 因而往往需要比较复杂的柱前或者柱后衍生步骤。

3.3 质谱检测器

质谱检测的原理与其他检测方法不同, 它是根据分子的荷质比的不同达到分离的目的。它不仅可以区分不同分子质量的分析物, 还可以区分不同质量分裂模式的分析物, 能提供分子结构信息。毛细管电泳与质谱联用实现了分离与检测的“强强联合”, 目前, 该技术主要用于基因和重要复杂体系的分析。质谱检测的灵敏度高, 结构分析能力强, 但是也有成本高、与其他方法联用技术难度大等缺点[34~37]。

3.4 化学发光检测器

化学发光检测具有灵敏度高、仪器结构相对简单等优点, 近年来已经开始同毛细管电泳联用。化学发光检测的原理是在检测窗口引入发光试剂, 使它与分析物复合发光, 通过检测此光信号达到检测分析物的目的。Gilman S D [38]等采用电产生的化学发光检测鲁米诺, 达到了 $9.2 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ 的检测限。如用此联用技术分析蛋白质, 检测限比紫外降低4个数量级[39,40]。

3.5 电化学检测器

电化学检测的优点表现在: (1) 灵敏度高, 检出限可达pg-ng级; (2) 选择性好, 特别适合复杂体系如生物体液、匀浆等中的电活性物质的检测, 对于非电活性物质也可以采用间接法进行测定; (3) 线性范围宽, 一般为3-4个数量级; (4)

设备装置简单, 成本较低, 可用于一般实验室[41]。常用的电化学检测方法有电导检测、电位检测和安培检测等:

3.5.1 电导检测

电导检测是根据两指示电极间在恒定的小电流通过时溶液电导变化进行检测。常用的有在柱电导率检测器[42] 和柱端电导率检测器[43]。电导检测器是非选择性检测器, 在毛细管电泳中可直接检测紫外吸收小的无机离子和氨基酸等有机小分子, 进一步拓宽了毛细管电泳的应用范围。但是由于电导检测器没有使用抑制器, 所以有以下不足: (1) 由高压引起的背景干扰将会影响检测灵敏度; (2) 灵敏度依赖于溶质与缓冲液当量电导之差, 由于此差别较小, 因而灵敏度也较低; (3) 除柱后电导检测外, 其它的电导检测装置设计相对困难。抑制电导检测可将缓冲液的平衡离子从流出液中扣除, 仅有待测离子的溶质在这除去缓冲液的平衡离子的溶液中流经电解池, 提高了检测灵敏度。 Avdalovic 等[44]设计了一种抑制电导检测器的装置, 对一般无机和有机离子的检出限可达 10^{-8} - 10^{-9} mol·L⁻¹。

3.5.2 电位检测

电位检测是利用离子选择性电极 (ISE) 对待测物质的选择性响应而定量的方法[45]。电位检测仪器简单, 测量的线性范围宽, 选择性好, 而且由于 ISE 的内阻很高, 不易受高压电场的干扰, 尤其现今离子选择性电极分析方法已获得了长足的发展, 利用离子选择性电极可以同时检测较多的无机和有机离子[46,47]。但这种方法的重现性欠佳, 另外由于 ISE 的种类有限, 因而可测定的物质受到了一定限制。

3.5.3 安培检测法

安培检测由于其良好的选择性、高灵敏度、低成本等特点成为 CE 很好的检测方式, 尤其是对于那些不适于直接光学检测的物质(如脂肪族化合物)具有良好的实用价值。同毛细管电泳联用的安培检测技术最早是 1987 年由 Ewing 提出的[48]。目前, 常用的两种方式为离柱检测方式 (Off-column) 和柱端偶合检测方式(End-column)。其同毛细管电泳联用的发展现状将在第五节详细介绍。

第四节 毛细管电泳的样品富集技术

同高效液相色谱分离相比,毛细管电泳在分离效率和仪器等方面有明显的优势。但由于毛细管电泳进样量远远小于液相色谱,毛细管的内径小于 $100\ \mu\text{m}$,利用紫外或荧光检测时光程很短,导致检测灵敏度较低。如一般商品化仪器所配备的紫外检测器检测灵敏度仅为 $10^{-6}\sim 10^{-5}\text{mol/l}$,电化学安培检测灵敏度在 $10^{-7}\sim 10^{-6}\text{mol/l}$,不能满足痕量分析的要求。一些常用的预富集方法,如固相微萃取、膜富集、超临界萃取等,可以在毛细管电泳分离前对痕量的待测组分进行富集,但这些方法往往操作复杂,时间较长,也容易带来误差。利用毛细管电泳本身的一些特殊性质,通过改变其进样和分离时的一些条件,也可以提高毛细管电泳检测灵敏度。其具体操作有三种方式:电堆集、场放大进样和等速电泳[49,50]。

4.1 电堆集富集

电堆集富集是通过毛细管电泳中电场强度的不均匀分配而实现的一种在线样品浓缩技术。若将样品溶解到低浓度的电解质中,由于样品溶液的电阻率大于运行缓冲溶液的电阻率,当施加高压后,导致分配在样品区带中的电场强度高于充满运行缓冲溶液部分的电场强度,使得样品区带的样品离子在高电场下,电泳迁移速度大大提高。当样品离子迁移到样品溶液和运行缓冲溶液的交界处时,在低电场作用下,电泳迁移速度降低。这样在样品溶液和运行缓冲溶液的界面处形成一个狭窄的区带,样品离子的浓度从而得到浓缩[见图 2]。

样品离子浓度的电堆集富集倍数取决于Kohlrausch regulation function (KRF)。对于单电荷和多电荷的强电解质和单电荷的弱电解质来说,其KRF正比于电解质溶液的浓度[51]。所以样品离子的电堆集富集倍数可以用运行缓冲溶液和样品溶液的浓度比表示[52,53]。电堆集富集也同时会带来峰展宽现象[54, 55]。中性物质的电泳迁移速度始终为零,只能在电渗流作用下移动,因而不能得到富集。但人们采用胶束电动色谱 (MEKC)通过带电胶束的浓缩来实现中性物质的浓缩,而且富集的倍数可以达到上百万倍[56,57]。

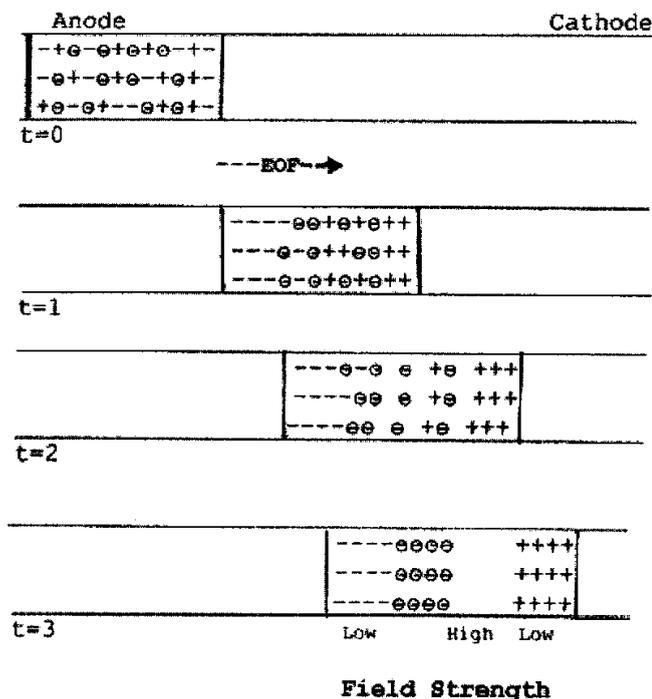


Fig. 2 The process of electro-stacking. [58]

4.2 场放大进样

场放大进样又称为柱头电堆集富集,它是采用电动进样将低浓度的样品溶液加入到充有高浓度缓冲液的毛细管中,其富集的原理与电堆集富集相似[59,60]。在电动进样时,如果样品缓冲溶液的浓度低于运行缓冲溶液的浓度,进样口端的电场强度就会大大高于毛细管内的电场强度,这样,带正电荷的离子就会具有很高的电泳迁移速度,使进样量达到原来的几百倍。但是,中性离子不能被浓缩进样,而带负电荷的离子的进样量则被减小[61~63]。

在实验中,通常在场放大进样前加一段水柱,这样不仅可以使样品溶液和背景电解质溶液的界面更加清晰,检测灵敏度得到提高,在一定程度上减少样品歧视,同时可以克服不能实现阴、阳离子的同时富集的缺点[64,65]。也可以通过反转电压极性的办法,先将带负电荷的离子放大进样,再将带有正电荷的离子放大进样[66~68]。

通过酸碱中和反应生成电导率低的水也可以实现场放大进样。如将碱性强的

多肽样品进入到强酸性的运行缓冲溶液中,或者将多肽样品进入到强碱和强酸缓冲溶液之间,都可以达到场放大进样的目的[69]。

但对于电化学检测来说,为了保证安培检测器的安全,高压电源的极性反转是不可行的。方禹之等采用改变样品缓冲溶液酸度的方法,通过改变样品离子的电荷特性,可以使原来带有不同电荷的样品离子达到同时的场放大进样[70]。

4.3 毛细管等速电泳[IITP]

等速电泳是通过改变运行缓冲溶液的性质,造成不连续的介质从而使样品组分在电泳过程中得到富集的方式 [71,72]。在毛细管中首先充入电泳迁移速度高于样品中任何离子的背景电解质溶液(称为前导电解质),然后注入样品溶液,紧接着再充入第二种背景电解质溶液(该溶液的电泳迁移速度小于样品中任何离子,称为终止电解质)。施以高压后,样品中离子依据各离子的电泳迁移速度在样品溶液-背景电解质溶液的界面发生分离。随着样品各组分的分离,每个样品组分所分得的电场在发生变化。电泳迁移速度大的离子,电导较大,分得的电场较小,电泳迁移速度逐渐降低,至平衡时,样品各组分均以与前导电解质相同的速度在毛细管中移动,这就是等速电泳[见图 3]。在等速电泳中,根据分析组分的实际淌度,有时只选择前导电解质,而用运行缓冲溶液作为终止电解质,或者以运行缓冲液为前导电解质,而选择另外一种终止电解质[73,74]。

根据 Kohlrausch 公式,等速电泳的浓缩效应可表达为:

$$c_A = c_L \mu_A (\mu_L + \mu_C) / [(\mu_L (\mu_A + \mu_C))] = c_L K$$

c_A 为样品浓度, c_L 为前导离子浓度。K 为比例因子,表示 IITP 富集能力。样品经过 IITP,浓度可达前导离子浓度量级,可显著改进浓度检出限。

比较简单的等速电泳是在同一根毛细管中进行富集和分离的,叫瞬时等速电泳(CITP),该法操作简单,分析过程相对较快,一般富集倍数达10~100倍,便于自动化。首次报告瞬时 CITP的是 Verheggen等,他们发现,当阴离子样品含高浓度的氯化物时,可以得到增强的尖锐峰,氯离子成为等速电泳的前导离子。按运行缓冲液(BGE)与样品(S)离子淌度大小,分为两种方式:当 $\mu_{BGE} > \mu_S$ 时,将样品溶解在背景缓冲液中,压力流动进样,用尾随电解质($\mu_T < \mu_S$)进行 CITP,再将尾随换成背景缓冲液进行CZE分离;当 $\mu_{BGE} < \mu_S$ 时,将样品加在前导

电解质中 ($\mu_L > \mu_S$), 背景缓冲液作尾随缓冲液[76,77]。

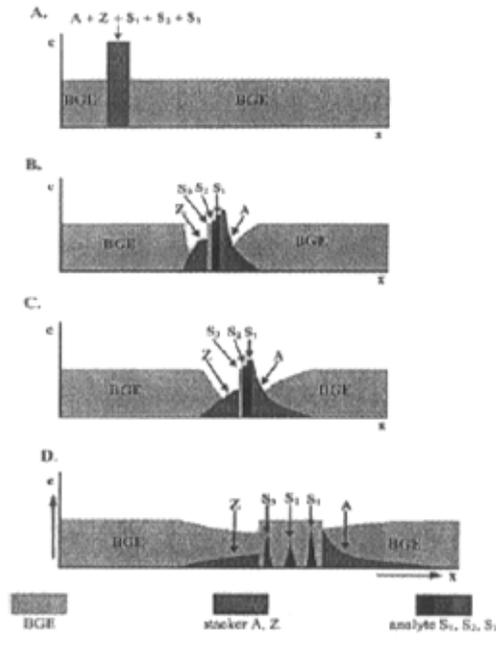


Fig. 3 Scheme of transient ITP stacking.[75]

ITP的另外一种模式是通过两根毛细管的偶合联用来完成等速电泳和毛细管电泳分离两个过程。ITP过程在内径较大的毛细管中完成(通常0.2mm左右), 当样品中的其他成分, 尤其是高浓度的电解质成分流出后, 再输入小内径的毛细管进行CZE分离[78~80]。这种偶合系统可增加样品注入量, 尤其是可以消除样品中存在的浓度较大的共存离子对等速电泳的干扰。但需增加设备, 增加了控制难度。常见的三种ITP-CZE在线连用的模式见图4。这种在线联用技术可富集 10^{-7} mol/l数量级的痕量组分, 进样量在10-100 μ l之间, 可以用通常的紫外检测器进行检测[81~83]。

目前对毛细管等速电泳的研究已经逐步从理论应用到具体实践中。在具体生物化学分析中, 应用等速电泳需要克服的一个问题就是细胞组织中较高浓度的氯化钠等电解质的干扰问题。除了前面介绍的两根毛细管偶联技术外, 一些离柱预

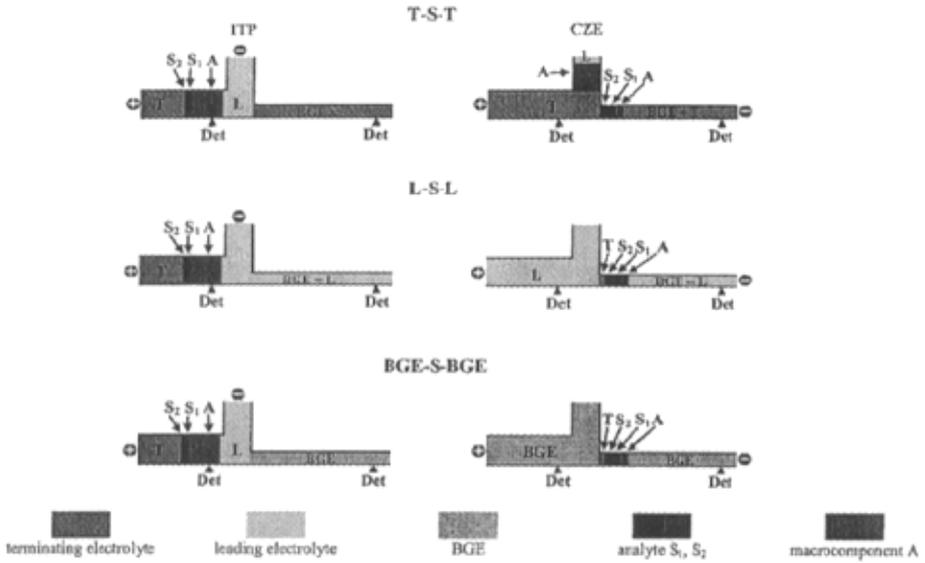


Fig. 4 Three different interfaces of electrolytes for the on-line ITP-CZE combination with column coupling.[84]

处理技术也可以完成这一任务，如超临界萃取和液-液萃取等。Hynnily, H. K等利用超临界萃取技术，提取了帕金森氏病人尿样中的复杂成分，然后用较稀的缓冲溶液进样，用CE-ESI-MS进行测定 [85]。其他研究人员利用类似的方法测定了食品中的有机酸[86]。也有应用于其他的药物分析[87~91]、食品分析[92~95]、蛋白质分析等的报道[96~98]。

第五节 毛细管电泳-安培检测联用技术的发展现状

如前所述，毛细管电泳具有高分离效率、样品用量极少等优点，但其较小的样品量和极细的毛细管通道内径也给检测也带来了困难。紫外、激光诱导荧光、质谱等各种检测方法都具有一定的优点，但往往存在仪器比较昂贵、衍生化步骤烦琐等缺点。电化学检测中的安培检测技术，具有比紫外检测更高的灵敏度，且仪器简单、价格成本低、线性范围宽、操作简单，得到了广泛的研究并应用到几乎涉及分析化学的所有领域。尤其是近年来毛细管电泳芯片技术的快速发展，使

电化学检测同毛细管分离的结合更加紧密,因为只有安培检测器具备体积很小的特点,同微流控芯片结合起来使“掌上实验室”成为可能。

5.1 安培检测的有关理论

安培检测是在固定电位的电极上实现的。适用于安培检测的物质首先为电活性物质,如醇、酚类、氨基酸、糖、多肽、生物碱等,应用范围很广。在电极表面上,电活性物质发生氧化或还原反应产生电流响应,该电流响应同其浓度成一定的比例关系[99,100]。对于没有电化学活性的物质,也可以通过一些间接的方法用安培法检测。安培检测法比电导检测、紫外检测的灵敏度高,选择性也更好一些。

用于毛细管电泳安培检测的电极从材料上分主要有金属电极、碳电极、酶电极、化学修饰电极等,其中常用的金属电极包括 Pt, Au, Cu, Ni 等,碳电极有玻碳电极、碳纤维电极、石墨电极等;从电极的形状来分,主要包括柱状电极、圆盘电极和微电极。柱状电极的噪音较大,从而影响检测的检测限,所以选择圆盘电极效果会更好一些。

对于圆盘电极,其电流响应可以表示为: [101,102]

$$I = nFCU[1 - m_1 \exp(-m_2 DA/bU)] r E_f [L_i/4] D t_m^{1/2}$$

其中 U 为流速, A 为电极面积, b 为电极与毛细管出口之间的距离, L_i 为进样长度, t_m 为迁移时间, m_1 和 m_2 为常数。

对于毛细管电泳-安培检测的峰带展宽,方禹之等推导出了有关的公式: [103]

$$\sigma_{tot}^2 = 2Dt_m + (d\eta/dT)^2 (1/\lambda\eta)^2 (IV/4\pi) + \mu_{app}^2 V_{inj}^2 t_{inj}^2 / 12 l^2 + v^2 / \pi^2 r^4$$

其中包括死体积、轴向扩散、热效应和样品带长度等因素分别导致的峰展宽:

$$\sigma_{ax}^2 = lH = v^2 / \pi^2 r^4$$

$$\sigma_{ax}^2 = 2Dt_m$$

$$\sigma_{temp}^2 = (d\eta/dT)^2 (1/\lambda\eta)^2 \cdot (IV/4\pi)$$

$$\sigma_{inj}^2 = \mu_{app}^2 V_{inj}^2 t_{inj}^2 / 12 l^2$$

5.2 安培检测中的电极连接方式

毛细管电泳-安培检测中的电极连接方式,主要有离柱安培检测和(柱端)偶联安培检测两种方式。其中离柱安培检测操作比较简单,而偶联安培检测操作较为复杂,而且对电极的尺寸要求也较高。

5.2.1 偶联安培检测

安培检测通常是在 1V 左右的工作电位下进行的,分析物产生的电流也仅仅在 nA 数量级。但在毛细管电泳分离过程中,毛细管两端施加了 10-30 kV 的高压,毛细管中的电流要远远大于电化学电流,这样对检测不可避免地产生影响。为了防止电流信号把电泳信号覆盖,必须将毛细管分离系统和检测系统进行电隔离,即将毛细管分为分离部分和检测部分。

Walling 和 Ewing [104]最早设计了一种导电套管接口,将接口放入接地的缓冲液槽中,探针式微电极插入毛细管检测部分,利用惯性使溶质区带和缓冲液顺利通过接口进入检测毛细管部分。后来, Yik[105]等使用多孔石墨接头代替多孔玻璃接头,但是玻璃接头和石墨接头制作都很困难。1992 年, Lunte[106,107] 等用 Nafion 管作为接口,由于 Nafion 管易于制作和耐用,所以这一工作应用到更为广泛的领域。Kok[108,109]等用钼管作为接口,检测限达到 fmol 数量级。此外,还出现了多孔纤维素接口[110,111]和粘合素烧陶瓷接口[112]。由于接口管的不规则及毛细管和检测毛细管间有缝隙,不可避免地会造成区带展宽,为了提高分离效率, Olefirowicz 和 Ewing 研制了一种柱上烧结玻璃接口,但是该接口制作工艺复杂,技术难度高,一般不易掌握[113]。最新的偶联技术是通过激光蚀刻毛细管然后导入微工作电极[114,115]。

5.2.2 离柱安培检测技术

尽管偶联安培检测技术的接口不断改进,但其复杂的制作工艺仍然制约着这一技术的推广。再者固定的工作电极难以进行彻底的表面处理,不能保证安培检测的重现性。1991 年, Huang 等[116]设计了一种简单的柱后安培检测装置。他们使用内径 5 μm 的毛细管,将直径 10 μm 的碳纤维工作电极正对在毛细管的出口端,由于通过毛细管电流很小,因而电干扰很小,同时微电极没有直接插入毛细管内,不再需要用接口来隔离高压电场的影响,可直接实现柱端安培检测。Lu

等[117]发现当毛细管内径小于 $25\ \mu\text{m}$ 时, 高压电场对柱后安培检测无明显影响。使毛细管电泳电化学检测的研究得到进一步发展。Ewing 等[118]将毛细管口腐蚀成喇叭状, 有利于电极的定位, 提高了方法的重现性。Ye 等[119,120]使用柱端喷壁技术, 用铜电极实现了多种糖类和氨基酸的检测, 大大改善了该方法的稳定性和重现性。S. Lunte 等利用脉冲安培离柱检测分析了糖类物质[121,122]

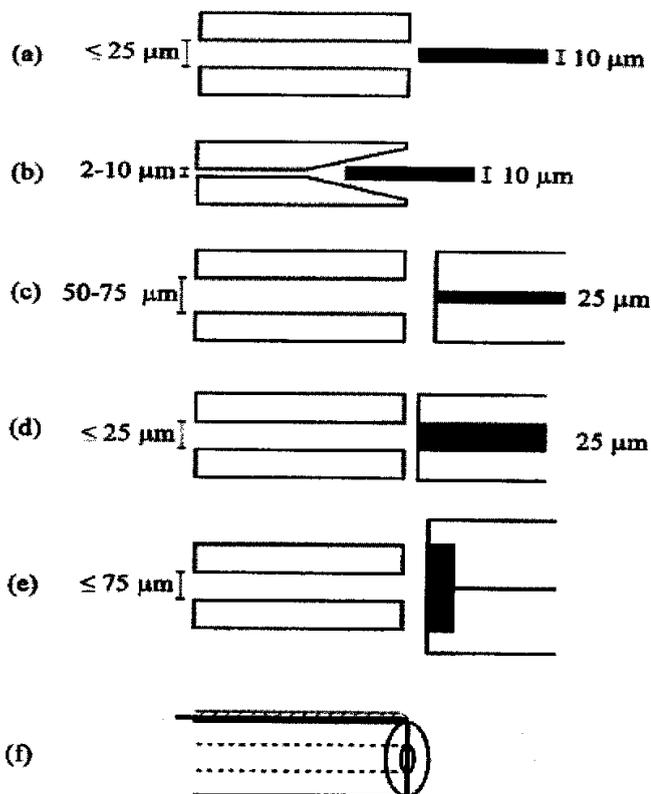


Fig. 5 Typical capillary-to-electrode arrangements used for CE-AD without decoupling.[130]

对于消除或降低分离高压对离柱安培检测的影响, 也有人做了许多尝试。可以利用循环伏安、方波极谱和流体伏安来研究流体流出毛细管进行检测时的 iR 降, 结果证明其大小取决于分离电压、毛细管的内径、电极的形状和毛细管同电极之间的距离[123~126]。Lu 等研究了毛细管电泳-离柱安培检测中电极材料、电解质、毛细管尺寸对本底电流的影响[127], Wallenborg 等研究证明电渗流对本底电流不会产生影响, 尽管电渗流的大小同分离电压有着直接的关系[128]。对于

内径较大的毛细管,若使用非水溶剂作为缓冲溶液,也可以大大地降低本底电流。[129]常见的离柱安培检测方式如图 5 所示。

5.3 毛细管电泳-安培检测联用的研究应用现状

毛细管的高分辨率、低样品消耗量同安培检测的高灵敏度、仪器简单方便相结合,使该联用技术的研究和应用得到了飞速的发展,涉及到生命科学、药理学、临床医学、环境科学、食品科学等所有与分析化学有关的领域,研究对象大到生命大分子,小到单细胞分析和无机离子分析,非常广泛。

5.3.1 简单离子分析

对无机离子分析可采用 UV 检测,但许多离子在 200-800nm 无明显吸收光谱,因此电化学方法也被较多地用于无机离子的测定,而且不需要复杂的衍生步骤。Cassidy 等将安培法用于亚硝酸根离子的测定,并将脉冲伏安法也用于金属离子的测定[131,132]。Lai 等利用金圆盘电极测定了沉底物中的二价汞和甲基汞,灵敏度达 ng/ml[133]。Wallenborg 等用碳纤维电极测定了饮用水中的次氯酸根[134]。Fang Y 等用 mvRuFeCN 修饰石墨电极间接测定了铈离子[135], You T 等也利用化学修饰铂电极测定了联胺等小分子[136], Jin W 等利用 Au/Hg 双电极测定了一价铊离子[137]。

对于无机阳离子的测定,一般在缓冲溶液中加入络合剂来改变离子电泳迁移率,提高分离选择性并增加灵敏度[138]。早在 1974 年, Virtanen 等测定了 K^+ 、 Na^+ 、 Li^+ 等无机阳离子[139], Ito 等报道在碱金属离子、碱土金属离子的 CE 分析中的改进措施提高了分离效率[140]。对阴离子分析要加入 CTAB 等阳离子表面活性剂作为电渗流改性剂,这种改性剂对分离影响颇大[141~143]。Cooper 等研究了影响阴离子定量分析的各种因素[144],据报道无论柱效及分离时间均优于离子色谱[145]。CE-AD 还可用于元素形态分析, Schleger 分离了 As 和 Se 的各种价态的化合物,并用电导检测,可检测到 0.06mg/L[146]。

5.3.2 单细胞分析

十多年来,许多研究者都努力将毛细管电泳用于单细胞分析,使其成为活细胞生化研究的重要工具。单细胞分析至少有四个特点:(1)超小的体积;(2)超痕量的组分;(3)组分多结构相似;(4)某些组分的结构不稳定。单细胞内组分含量极低,发展高灵敏度检测器是关键。Ewing, Jorgenson 和 Sweedler 研究组开创性地将毛细管电泳用于非哺乳动物神经细胞分析[147~153]。

Ewing 研究组首先证明了毛细管电泳在研究哺乳动物细胞方面的巨大潜力[154,155]。Wightman 等开创的快速循环伏安法,可以高时空分辨监测单个细胞释放神经递质[156]。Swanek 等用毛细管电泳扫描伏安法分离测定神经细胞内的多巴胺时,证实了“神经细胞内有两类功能完全不同的泡囊存在有多巴胺的假设”[157]。化学修饰电极用于分离检测单细胞已有报道[158]。Ewing 等用 CE-ED 测定了蜗牛单个神经元中用 DNA 衍生的胺类神经递质物质的量[159]。W. Jin 利用毛细管电泳-安培检测测定了单个老鼠细胞腹膜巨噬细胞中的六种氨基酸和谷胱甘肽,细胞的溶解等操作都是在毛细管内完成的[160,161]。W Jin 还利用电极化方法将双氯酚酸注入人红血球细胞中,然后用毛细管电泳-碳电极安培检测测定单个细胞中双氯酚酸的浓度为 $4.2\mu\text{m}$ [162]。

5.3.3 药物分析

随着科学技术的发展和人们生活水平的不断提高,药物分析越来越受人们重视。毛细管电泳-安培检测技术在药物分离中的应用研究越来越多,包括西药含量分析、中药有效成分分析、药物中杂质分析、药物对映体拆分等。

在西药分析方面, Fang 等用 CZE 安培检测法测定了复方磺胺类药物、复方感冒药中的有效成分[163,164]。李关宾等用自制的 CE-电化学检测系统,对 VC、VB₁ 和 VB₆ 进行分离与检测[165]。牛长群等用 HPCE 法,在 $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 缓冲液 (pH8.3) 中,分离测定了氨苄青霉素的聚合物[166]。大部分样品以开环和闭环的二聚物为主要聚合体,可对多个组分进行定量,以控制此类成分对氨苄青霉素的质量影响。辛慧君等用高效 CZE 柱端安培检测技术,在 $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸- NaH_2PO_4 缓冲液 (pH6.56) 中,对异丙嗪及其尿样进行了检测,方法适用于临床病人的尿样分析和血药浓度监测[167]。许丹科等用 HPCE-电化学检测法,分离了烟酰胺酰嘌呤二核苷酸与腺酸,用微型碳糊电极测定了 NADH 的含量[168]。方禹之

等测定了血清样品中具有兴奋作用的 β -受体激动剂[169,170]。周小棉等用 $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂-SDS缓冲系统(pH8.5)MECC模式,成功地分离并检测了血浆中肝素G与肝素钙,低、中、高样品液的平均回收率 $>95.6\%$,方法适用于临床肝素浓度检测[171]。

中药的有效成分种类繁多,其中具有明显药效的黄酮苷类、维生素类、生物碱、酚类等成分都具有电化学活性,可以通过毛细管电泳-安培检测技术进行分析。Liu等和朱萱萱等建立了测定麻黄中6种生物碱的CZE方法[172,173]。Sun等采MECC模式研究9种阿朴琳类生物碱的分离[174]。Unger等将场放大技术(Field Amplified Sample Injection FASI)用于生物碱的分析[175]。黄酮类化合物有很多重要的生理活性,广泛存在于植物中,多用MECC模式分离。方禹之、叶建农等用碳圆盘电极分离测定了多种中草药及其制剂中的电活性有效成分,可用于对药物质量进行控制和检测[176~191]。Aramendia等[192]和Shihabi等以CZE分离了5种异黄酮[193]。Liu等以MECC分离了黄芩中的七种成分[194]。Morin等研究了糖基不同的槲皮素糖苷的CZE分离,继而推广到香豆素类、强心苷、皂苷类、有机酚酸类等非挥发性成分的分析[195,196]。另外,还可用于蒽醌类的分析,如宗玉英等将 $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-环己氨基-1-丙烷磺酸与 $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS乙腈(100:10)混合作为电解液(pH10.96)可分离大黄中5种蒽醌类化合物,并测定掌叶大黄、唐古特大黄和藏边大黄中的芦荟大黄素、大黄素和大黄酸[197,198],Ochxcka等以CZE分离了野菊花中7种香豆素类化合物[199],Chou等测定了厚朴中的和厚朴酚及厚朴酚的含量,最低检测限分别为 0.2ng 和 0.5ng [200],Iwagami等对苷类物质做了研究[201]。

Hadwiger等通过微渗析得到异丙肾上腺素样品,然后在含有环糊精的缓冲溶液里,用CE-AD分离了异丙肾上腺素的两个对映体[202]。Fang等用MEKC分离分析了手性化合物ANP和DNAP[203]。廉经武等以 β -环糊精的两种衍生物作CE的手性分离添加剂,对盐酸美西律的对映体进行分析[204]。

5.3.4 食品分析

CE-AD可以广泛地应用于食品、饮料中电化学活性物质的分析测定。Lugurra等用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定了葡萄酒在生产过程中蛋白质的变化[205]。Chen

等用 CZE 分离了牛乳蛋白后, 研究牛乳是否掺假[206]。由于大多数氨基酸没有紫外吸收, 所以可用电化学检测: J. Ye 等用毛细管电泳-安培法测定了食品中的维生素和氨基酸等[207,208]。Y. Fang 等也用该方法检测了食品中的色胺及其前体氨基酸的含量[209]、饮料中的咖啡因[210]。食品中的矿物质是用 CE 测定最多、测定范围最广的一部分。Schmitt 等用间接紫外测定了牛奶中 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、氯化物及硫酸盐[211]。Swallow 等用 CZE 分离、间接测定了桔子汁中的硝酸盐、氯化物和硫酸盐[212]。目前报道可用 CE-AD 测定的食品中的有机酸有: 柠檬酸、苹果酸、酒石酸、琥珀酸、草酸、醋酸等[213,214]。由于合成的食品添加剂多有毒性, 所以对食品添加剂的测定是食品分析的一大内容。Kuo 等用二极管阵列检测器的 CE 在 10min 内同时测定了 8 种合成色素[215]。此法可用于冰淇淋和水果苏打饮料的色素测定。Hall 等以 pH11.0 的磷酸盐为电泳介质, 用 CZE 和紫外检测器分离测定了一些加工食品中的甜味素[216]。CZE 还可用于食品中农药残留量的测定。Galceran 等用 CZE 和紫外检测法测定了酒中季铵盐除草剂[217]。Nemoto 等用高压液相萃取, 检测了大豆中的六种除草剂[218]。另外还可用于食品中生物毒素、糖类、维生素和黄酮类物质的测定[219]。

5.3.5 糖类物质分析

糖类化合物是人类生存必不可少的营养元素之一, 参与生命过程, 随着生命科学的发展, 糖类化合物在细胞识别、生长与分化、免疫等方面的作用逐渐为人们所认识, 因此, 糖类化合物的分离与检测具有重要的现实意义。

由于多数糖类没有合适的发色基团或荧光基团, 所以直接进行紫外或荧光检测灵敏度很低, 只有少数糖类在紫外区有明显的吸收峰。用紫外间接检测或荧光检测灵敏度较高, 其检出限可达 fmol 级[220], Bergholdt 等用该方法对 D-葡萄糖和 D-半乳糖进行检测, 灵敏度可达 18fmol, 但衍生化操作非常复杂, 且容易带来误差[221]。由于糖类具有电活性羟基, 所以适用于电化学安培检测, 而且灵敏度很高。J. Ye 和 Y. Fang 等利用铜金属电极, 在强碱性缓冲溶液中, 很好地分离了多种单糖和中药多糖的水解产物[222~225]。Zare 等以铜电极作为工作电极, 在 NaOH 介质中, 对 15 种单糖进行了分离, 检测限达 pmol 级[226]。Lunte 等用脉冲安培检测法, 用 $50\mu m$ 微电极检测 4 种带电荷的葡萄糖胺, 并用于血

样中葡萄糖的检测[227,228]。此外, Baldwin 等还利用葡萄糖氧化酶修饰的碳糊电极检测葡萄糖[229,230]。

5.3.6 其他生化分析

毛细管电泳-安培检测技术还广泛地应用于生物化学中的氨基酸、多肽、蛋白质、神经递质、重大疾病的生物标志物的分析检测。

毛细管电泳安培法检测生化样品中的氨基酸时, 碳电极可以检测酪氨酸、色氨酸和半胱氨酸[231~233]; 汞齐化的金电极可以检测半胱氨酸和其他的硫醇类物质, 因为在金电极表面上可以形成汞-硫醇盐络合物。也可以用铜电极在碱性条件下来检测氨基酸, 在铜电极表面上, 铜可以跟氨基酸通过氧化反应形成络合物[234]。由于多数氨基酸会污染电极而导致不能直接检测, 可以通过电化学生化的办法达到安培法直接测定[235,236]。

由于多肽和蛋白质中含有电活性的氨基酸和其他还原性成分, 因而也可以通过毛细管电泳安培法检测。通常使用的电极为碳电极、多孔性的氧化亚铜修饰碳电极[237~239]。也有毛细管电泳安培检测谷胱甘肽时采用化学修饰电极的报道[240]。S. Lunte 研究了多肽在碳电极上的氧化行为, 并应用到毛细管电泳安培检测中测定了多种多肽, 而且可以用于检测血浆中多肽的生物活性[241]。

神经递质在生物体神经系统中起着重要的作用, 毛细管电泳安培检测法也广泛应用于神经递质的检测, 如多巴胺、5-羟色胺、肾上腺素等, 所用的电极有碳电极、金电极、铂电极和化学修饰电极等[242~245]。毛细管电泳安培法还用于DNA 损伤生物标志物 8-羟基脱氧鸟苷的检测, 但需要固相微萃取预富集 20 倍后才能进行测定[246]。其他生化样品还有测定头发中的大麻酚、尿样中的无环鸟苷、汗水中的丙酮酸盐等[247~249]。

第六节 本论文的研究目的和意义

如前所述, 毛细管电泳-安培检测联用技术由于其分离效率高、灵敏度高和仪器简单等优点而在分析化学领域已经得到了广泛的研究和应用。但是, 对于一

些超低浓度的分析成分,由于毛细管电泳的进样量小而其导致检测灵敏度达不到直接测定,需要较为复杂的固相微萃取等预富集处理。本论文的一个目的就是研究毛细管电泳-安培检测联用技术中提高灵敏度的方法,即毛细管特有的场放大进样和等速电泳等管内预富集技术。以往的毛细管内预富集技术基本上是以紫外检测和电导检测,同安培检测联用几乎属于空白,因而该研究对于提高毛细管电泳-安培检测的分析效率和拓宽其应用范围具有较好的研究意义。

在论文中我们首先探讨了毛细管电泳-安培检测检测中使用不同溶剂时的场放大进样现象。在本文中我们通过研究用不同稀释溶剂对在水溶液中分别带正电荷、中性电荷、负电荷的盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁三种组分稀释后电流响应的变化,探索了在毛细管电泳电动进样时稀释溶剂对场放大进样的影响。实验发现,改变样品溶液的酸度,可以实现带正电荷、负电荷的离子同时进行场放大进样,比以往改变电极极性的方法简单易行。使用更高的缓冲溶液稀释样品,也可以使带负电荷的离子达到场放大进样。通过选择合适的稀释溶剂,可以调节同一样品中不同成分的检测灵敏度,使其电流响应可以达到同一数量级。如在珍菊降压片中,盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁三种有效成分的相对含量相差上百倍,若用缓冲溶液稀释样品,其电流响应难以在同一张电泳图上反映出,但用水做稀释剂,他们的电流响应可以在同一张电泳图上直观地反映出来。

论文中也初步探讨了毛细管电泳-安培检测中的等速电泳预富集现象及有关因素的影响规律。由于人体内新陈代谢产生的自由基的浓度极低,如在尿样中羟自由基捕获产物 2,3-DHBA 的浓度在 10^{-9} mol/l 数量级,所以毛细管电泳-安培检测法尚不能进行该类生物物质的直接测定。我们尝试了用毛细管瞬时等速电泳的方法对 2,3-DHBA 进行了管内富集,选用对甲基苯甲酸为前导电解质,运行缓冲溶液为终止电解质,使 2,3-DHBA 的检测限降低了 20 倍,在灵敏度上达到了直接进行生化的要求。本文针对毛细管电泳-电化学检测的特性,对等速电泳的条件也作了探讨,如选择的前导或后导电解质必须是无电化学活性的物质、浓度为主要影响因素等等。

由于毛细管电泳分析技术是近二十多年来才兴起的分析技术,而且安培检测同毛细管电泳联用起步略晚于紫外、激光诱导荧光等检测技术,尽管其优势明显,但在药物分析、生化分析、食品分析等领域还有许多空白,所以本论文的另一个

目的是拓宽毛细管电泳-安培检测的应用范围。主要内容涉及以下几个方面:

1. 探讨了毛细管电泳-安培检测法测定复方降压中药珍菊降压片中两个含量较高的有效成分: 芦丁和氢氯噻嗪。在最佳条件下, 这两种分析物在 12min 内能够被很好的检测出, 在碳电极上也有较大的电流响应按照线性回归方程所得到的灵敏度分别是 $7.02 \times 10^4 \text{ nA} \cdot \text{L/mol}$ 和 $2.17 \times 10^5 \text{ nA} \cdot \text{L/mol}$, 检测限分别是 $5.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ 和 $2.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ ($S/N=3$)。应用该联用技术成功测定了这两种有效成分体内代谢后在尿液中的含量。

2. 进行了 CZE-AD 法间接测定 Fenton 反应中的羟自由基的研究。在 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ ($\text{pH } 7.4$) 缓冲溶液中, 实现了水杨酸、2, 3-DHBA 和 2, 5-DHBA 的完全分离, 检测限达到了 10^{-8} mol/l 数量级。并且通过对当归多糖对羟自由基的消除能力的研究, 证明该方法可用来鉴定不同药物对羟自由基的清除能力。

3. 我们以碳圆盘电极为工作电极, 用胶束电动毛细管-安培检测法 (MECC-AD) 同时分离和检测食品中生物活性胺及其前体氨基酸, 即色胺、酪胺、色氨酸和酪氨酸。在优化条件下, 色胺、酪胺、色氨酸和酪氨酸得到完全分离, 在三个数量级范围内, 峰电流与待测物呈良好的线性关系, 检测限 ($S / N=3$) 达到 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所建立的方法简单、可靠、重现性较好。将建立的方法用于实际样品米酒的测定, 测定结果令人满意。

4 应用毛细管电泳-安培检测测定中药杂多糖的组成。我们利用毛细管区带电泳-安培检测法可以直接测定中药多糖水解后的单糖组成。在选定的最佳条件下, 当归多糖和亚麻多糖的水解产物-岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖在 25min 内实现完全分离而且在铜电极上有很好的电流响应。这六种单糖的线性范围都在 $5.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 检测限低于或接近 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N=3$)。实验测定了当归多糖和亚麻多糖的单糖组成和所提取的两种多糖的纯度。该方法具有分析速度快、操作仪器简单、灵敏度高和重现性好等优点。

5. 血浆中水溶性小分子抗氧化剂的毛细管电泳-安培检测研究。人体内的水溶性小分子抗氧化剂包括抗坏血酸 (Vc)、谷胱甘肽 (GSH)、尿酸 (UA)、色氨酸 (Try) 和半胱氨酸 (Cys) 等。本文应用毛细管电泳-电化学检测方法, 以金属铜电极为检测电极, 探索了测定人血浆中水溶性小分子抗氧化剂谷胱甘肽 (GSH)、尿酸 (UA)、色氨酸 (Try) 和半胱氨酸 (Cys) 的最佳条件。在最佳实验条件下各组分

的线性范围在 1.0×10^{-6} – $5.0 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ 内, 检测限在 10^{-6}molL^{-1} 数量级。该法具有分析速度快、灵敏度高等优点, 对血浆样品的测试取得了满意的结果。

参考文献:

- 1 S. Hjerten, *Rev. Chromatogr*, 1967, 9: 1222.
- 2 F. M. Everaerts, W. M. L. Hoving-Keulemans, *Sci. Tools*, 1970, 17: 253.
- 3 F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr*, 1979, 169: 111.
- 4 J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem*, 1981, 53: 1298.
- 5 A. Hjerten, J. Liao, K. Yao, *J. Chromatogr.*, 1987, 387: 127.
- 6 A. Cohen, B. Karger, *J. Chromatogr*, 1987, 397: 409.
- 7 S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem*, 1984, 56: 111.
- 8 C. Stathakis, P. L. Walburton, R. M. Cassidy, *J. Chromatogr, A*, 1994, 659: 443.
- 9 K. Otsuka, M. Higashimori, R. Koike, K. Karahuha, Y. Okada, S. Terabe, *Electrophoresis*, 1994, 15: 1280.
- 10 H. Ozaki, N. Itou, S. Terabe, Y. Takeda, M. Sakairi, H. Koizumi, *J. Chromatogr. A*, 1995, 716: 69.
- 11 S. Yang, J. G. Baumgartner, M. G. Khaledi, *J. Chromatogr, A*, 1996, 738: 265.
- 12 P. J. Landers, *Handbook of capillary electrophoresis*, Boca Raton, CRC Press, 1993, 9.
- 13 S. M. Chen, J. E. Shively, T. D. Lee, *the protein society, second symposium*, Seattle WA, Forward Press, 1998, 908.
- 14 M. N. Schultz, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.*, 1993, 65: 3161.
- 15 Q. Gao, E. S. Yeung, *Anal. Chem*, 1998, 70: 1382.
- 16 H. Ren, A. E. Karger, F. Oaks, S. Menchen, G. W. Slater, G. Drouin, *Electrophoresis*, 1999, 20: 2501.
- 17 H. Zhou, A. Miller, Z. Sosic, B. Buchholz, A. Barron, L. Kotler, B. Karger, *Anal. Chem*, 2000, 72: 1045.

- 18 H. Rebscher, V. Pyell, *J. Chromatogr*, 1996, 737 : 171.
- 19 G. Choudhary, Cs. Horvath, *J. Chromatogr, A*, 1997, 781 : 161.
- 20 C. Yan, R. Dadoo, R. N. Zare, D. J. Rakestran, D. S. Anex, *Anal. Chem*, 1996, 68 : 2726.
- 21 A. T. etal. Woolley , *AnalChem*, 1996, 68(23) : 4081.
- 22 Z. Rosenzweig, E. S. Yeung, *Anal. Chem*, 1994, 66:1771.
- 23 CherkaouiSetal, *Electrophoresis*, 2001, 22(3): 491.
- 24 D. J. Harrison, K. Fleni, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz, *Science*, 1993, 261 : 895.
- 25 S. C. Jacobson, R. Hergenroden, L. B. Koutny, R. J. Warmack, J. Ramsey, *Anal. Chem*, 1994, 66 : 1107.
- 26 S. C. Jacobson, R. Hergenroder, L. B. Koutny, J. M. Ramsey, *Anal. Chem*, 1994, 66 : 1114.
- 27 C. S. Effenhauser, A. Manz, *Int. Laboratory* , 1994, 24(9) : 10.
- 28 Y. Walbroehl, J. W. Jorgenson, *J. Chromatogr*, 1984, 315:135.
- 29 T. Tsuda, J. V. Sweedler, R. N. Zare , *Anal Chem*, 1990, 62 : 2149.
- 30 T. Wang, J. H. Aiken, C. W. Huie, *et al. Anal Chem*, 1991, 63: 1372.
- 31 J. P. Chevret, R. E. J. Van Soest, M. Ursem, *J. Chromatogr*, 1991, 543 : 439.
- 32 D. F. Swaile, M. J. Sepaniak, *J. Microcol, Sep*, 1989, 1:155.
- 33 A. T. Wooley, F. S. George, R. A. Mathies, *AnalChem*, 1997, 69: 2181.
- 34 J. V. Sweedler, J. B. Shear, H. A. Fishman, *Anal. Chem*, 1991, 63 : 469.
- 35 R. A. Smith, Olivares, N. T. guyeu, H. R. Zare, *Anal. Chem*, 1988, 60: 436.
- 36 D. E. Jee, W. Muck, J. D. Henion, T. R. Covery, *Biomed. Environ, Mass Spectrum*, 1989, 18 : 844.
- 37 M. Moselry, L. Deterding, K. Tomei, J. Jorgenson, *J. Chromatogr*, 1989, 480:197.
- 38 S. D. Gilman, C. E. Silverman, A. G. J. Ew ing, *Microcol. Sep* , 1994, 6: 97.
- 39 J. P. Chevret, R. E. J. Van Scost, M. Ursem, *J. Chromatogr*, 1991, 543:439.
- 40 L. B. Koutny, D. Schmalzing, *et al. Anal. Chem*, 1996, 68:18.
- 41 L. A. Holland, S. M. Lunte, *Anal. Commun*, 1998, 35 : 1.
- 42 X. Huang, T. K. J. Pang, M. J. Gordon, R. N. Zare, *Anal.Chem*, 1987, 59 : 2747.

- 43 X. Huang, R. N. Zare, S. Sloss, A.G. Ewing, *Anal.Chem*, 1991, 63:189.
- 44 N. Avdalovic, C. A. ohl, R. O. Rocklin, J. R. Stillia, *Anal. Chem*, 1993, 65:1470.
- 45 A. Nann, W. Simon, *J. Chromatogr*, 1993, 633: 207.
- 46 A. Nann, I. Silvestri, W. Simon, *Anal.Chem*, 1993, 65:1662.
- 47 A. Nann, I. Silvestri, W. Simon, *J. Chromatogr*, 1993, 633:207.
- 48 R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Anal.Chem*, 1987, 59 : 1762.
- 49 D. M. Osbourn, D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis*, 2000, 21: 2768.
- 50 J. P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr, A*, 2000, 902:119.
- 51 F. Kohlrausch, *Ann. Physik*, 1897, 62: 209.
- 52 D. Kaniansky, V. J. Marak *Chromatogr, [J]*,1990, 498:191.
- 53 D. S. Steghuis, H. Irth, U. R. Tjaden, J. J. van der Greef, *Chromatogr, [J]*, 1991, 538 : 393.
- 54 Z. K. Shihabi, J. Cap, *Electrophoresis*, 1995, 2 : 267.
- 55 M. A. Friedberg, M. Hinsdale, Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr, A*, 1997, 781 : 35.
- 56 J. P. Quirino, S. Terabe, *Science*, 1998, 282:465.
- 57 J. P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem*, 1999, 71:1638.
- 58 Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr, A*, 2000, 902 : 107.
- 59 F. E. Mikker, F. M. Everaets, T. P. Verheggen , *J Chromatogr*, 1979, 169 : 1.
- 60 X. Zhang, W. Thormann, *Anal Chem*, 1998, 70 :540.
- 61 R. L. Chien, D. S. Burgi , *J Chromatogr*, 1991, 559:153.
- 62 B. M. Michov, *Electrophoresis*, 1989, 10 : 244.
- 63 S. E. Moring, J. C. Colburn, P. D. Grossman, et al. *LC-GC* , 1989, 8:34.
- 64 C. X. Zhang, W. Thormann, *Anal. Chem*, 1996, 68 : 2523.
- 65 A. B. Wey, C. X. Zhang, W. Thormann, *J. hromatogr, A*, 1999, 853 : 95.
- 66 Y. S. Fung, J. L. L. Mak, *Electrophoresis*, 2001, 22: 2260.
- 67 R. Taylor, S. Toasaksiri, R. G. Reid, *Electrophoresis*, 1998, 19 : 2791.
- 68 B. F. Liu, X. H. Zhong, Y. T. Lu, *J. Chromatogr, A*, 2002, 945 : 257 .
- 69 R. Aebersold, H. D. Morrison, *J. Chromatogr*, 1990, 516:79.
- 70 Q. Wang, F. Ding, H. Li, P. He, Y. Fang, *Electrophoresis*, 2003, 24:1687.
- 71 D. S. Burgi, R. L. Chien, *Anal. Chem*, 1991, 63 : 2042.

- 72 D. S. Burgi, R. L. Chien, *Anal. Chem*, 1992, 64: 1046.
- 73 L. Krivánková, P. Pantucková, P. Bocek, *J. Chromatogr, A*, 1999, 838 : 55.
- 74 P. Gebauer, P. Bocek, *Anal. Chem*, 1997, 69: 1557.
- 75 M. Urbanek, L. Krivankova, P. Bocek, *Electrophoresis*, 2003, 24:466.
- 76 L. Krivánková, P. Gebauer, W. Thormann, R. Mosher, P. A. Bocek, *J. Chromatogr*, 1993, 638 :119.
- 77 L. Krivánková, F. Foret, P. Gebauer, P. Bocek, *J. Chromatogr*, 1987, 390 : 3.
- 78 D. Kaniansky, J. Marák, *J. Chromatogr*, 1990, 498 : 191.
- 79 D. Kaniansky, J. Marák, V. Madajová, E. Simunicová, *J. Chromatogr*, 1993, 638 : 137.
- 80 L. Krivánková, P. Gebauer, P. Bocek, *J. Chromatogr, A*, 1995, 716 : 35.
- 81 L. Krivánková, P. Bocek, *J. Chromatogr, B*, 1997, 689: 13.
- 82 A. Procházková, L. Krivánková, P. Bocek, *Electrophoresis*, 1998, 19: 300.
- 83 A. Procházková, L. Krivánková, P. Bocek, *J. Chromatogr, A*, 1999, 838 : 213.
- 84 M. Urbanek, L. Krivankova, P. Bocek, *Electrophoresis*, 2003, 24:466.
- 85 H. Hynnälä, K. J. Taskinen, R. Kostianen, *J. Chromatogr, B*, 2000, 749 : 253.
- 86 S. Kodama, A. Yamamoto, A. Matsunaga, T. Soga, K. Minoura, *J. Chromatogr, A*, 2000, 875 : 371.
- 87 M. Polásek, M. Pospíšilová, M. Urbánek, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal*, 2000, 23: 135.
- 88 M. Pospíšilová, M. Polásek, V. Jokl, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal*, 2001, 24: 421.
- 89 M. Cakrt, A. Hercegová, J. Lesko, J. Polonsky, J. Sádecká, I. Skacáni, *J. Chromatogr. A*, 2001, 916 : 207.
- 90 M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polásek, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal*, 2002, 28 : 509.
- 91 T. Buzinkaiová, J. Polonsky', I. Skacani, *J. Chromatogr. B*, 2001, 757 : 215.
- 92 J. Sádecká, M. Cakrt, A. Hercegová, J. Polonsky', I. Skacani, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2001, 25 : 881.

- 93 J. Jezek, M. Suhaj, *J. Chromatogr. A*, 2001, 916 : 185.
- 94 J. Sádecká, J. Polonsky', *Eur. Food Res. Technol*, 2001, 212 : 511.
- 95 J. Sádecká, J. Polonsky', P. Simko, G. Karasová, *Eur. FoodRes. Technol*, 2001, 213 : 161.
- 96 A. Böttcher, J. Schlosser, F. Kronenberg, H. Dieplinger, G. Knipping, K. J. Lackner, G. Schmitz, *J. Lipid Res*, 2000, 41 : 905.
- 97 U. Zorn, C. Haug, E. Celik, R. Wennauer, A. Schmid-Kotsas, M. G. Bachem, A. Grünert, *Electrophoresis*, 2001, 22 : 1143.
- 98 K. Inano, S. Tezuka, T. Miida, M. Okada, *Ann. Clin. Biochem*, 2000, 37 : 708.
- 99 R.P. Baldwin, *Electrophoresis*, 2000, 21: 4017.
- 100 L. Holland, A. Leigh, *Electrophoresis*, 2002, 23: 3649.
- 101 W. Jin, J. Chen, *Electroanal. Chem*, 1979, 425: 155.
- 102 W. Jin, Chen, *J. Chromatogr.* 1997, 765: 307.
- 103 傅崇岗, 王安宝, 宋立南, 方禹之, *分析化学*, 1998, 26 : 1085.
- 104 R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Anal.Chem*,1988, 60:258.
- 105 Y. F. Yik, H. K. Lee, S. F. K. Y. Li, *J.Chromatogr*, 1991, 585:139.
- 106 T. J. O'shea, R. D. Greenhagen, S. M. Lunte, M. R. Smyth, D. M. Radzik, N. Watanabe, *J. Chromatogr, A*, 1992, 593:305.
- 107 I. C. Chen, C. W. Whang, *J. Chromatogr, A*, 1993, 64: 208.
- 108 W. T. Kok, T. Sahin, *Anal. Chem.*1993, 65: 2497.
- 109 X. Huang, W. T. Kok, *J. Chromatogr, A*, 1995, 716:347.
- 110 I.C. Chen, C.W. hang , *J. Chromatogr*,1993, 644:208.
- 111 C.W. hang, I.C. Chen, *Anal.Chem*, 1992, 64:2461.
- 112 金文睿, 李文宾, *第一届全国毛细管电泳报告会文集*, 1993, 32.
- 113 T. M. Olefirowicz, A. G. Ewing, *Anal. Chem*, 1990, 62:1872.
- 114 S. S. Zhang, Z. B. Yuan, H. X. Liu, H. Zhou, Y. J. Wu, *J. Chromatogr, A*, 2000, 872: 259.
- 115 D. M. Osbourn, C. E. Lunte, *Anal. Chem*, 2001, 73 : 5961.
- 116 X. Huang, R. N. Zare, *Anal. Chem*, 1991, 63 : 189.

- 117 W. Lu, R. M. Cassidy, *Anal. Chem*, 1993, 65:1649.
- 118 S. Sloss, A. G. Ewing, *Anal. Chem*, 1993, 65 : 577.
- 119 J. Ye, R. P. Baldwin, *Anal. Chem*, 1993, 65 : 3525.
- 120 J. Ye, R. P. Baldwin, *Anal. Chem*, 1994, 66 : 2669.
- 121 T. J. O'shea, S. M. Lunte, W. R. Lacourse , *Anal. Chem*, 1993, 65:948.
- 122 W. Lu, R. M. Cassidy, *Anal. Chem*, 1993, 65 : 2828.
- 123 F. M. Matysik, *Anal. Chem*, 2000, 72: 2581.
- 124 G. C. Gerhardt, R. M. Cassidy, A. S. Baranski, *Anal. Chem*, 1998, 70:2167.
- 125 S. R. Wallenborg, L. Nyholm, C. E. Lunte, *Anal. Chem*, 1999, 71:544.
- 126 X. Huang, T. You, T. Li, X. Yang, E. Wang, *Electrophoresis*, 1999, 11:969.
- 127 W. Lu, R. M. Cassidy, *Anal. Chem*, 1994, 66:200.
- 128 S. R. Wallenborg, S. M. Dorholt, A. Faibushevich, C.E. Lunte, *Electroanalysis*, 1999, 11:362.
- 129 F. M. Matysik, L. Nyholm , K. Markides, J. Fresenius' *Anal. Chem*, 1999, 363:231.
- 130 F. M. Matysik, *electroanalysis*, 2000, 12: 1349.
- 131 J. Wen, R. M. Cassidy, *Anal. Chem*, 1998, 70: 2504.
- 132 W. Lu, R. M. Cassidy, *Anal. Chem*, 1993, 65: 1649.
- 133 E. P. C. Lai, W. Zhang, X. Trier, A. Georgi, S. Kowalski, S. Kennedy, T. Mdmuslim, E. Dabek-Zlotorzynska, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 364:63.
- 134 S. R. Wallenborg, S. M. Dorholt, A. Faibushevich, C. E. Lunte, *Electroanalysis*, 1999, 11:362.
- 135 C. Fu, L. Wang, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 391:29.
- 136 T. You, L. Niu, J. Y. Gui, S. Dong, E. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 1999, 19: 231.
- 137 W. Jin, Q. Dong, D. Yu, X. Ye, W. Li, *Electrophoresis*, 2000, 21:1540.
- 138 I. Haumann, K. J. Bachmann, *Chromatogr. A*, 1995, 717:385.
- 139 R. Virtanen, *Acta. Polytech. Scand*, 1974, 123 : 1.
- 140 K. Ito, T. Hirokawa, *J. Chromatogr*, 1996, 742(1-2) : 281.
- 141 W. R. Jone, P. Janaik, *J. Chromatogr*, 1992, 608 : 385.

- 142 H. Anchony, E. Harakuwe, *J.Chromatogr.A*, 1994, 685 : 161.
- 143 D. Z. Ewa, F. O. Joseph, *J.Chromatogr.A*, 1994, 685 : 145.
- 144 K. R. Cooper, R. G. Kelly, *J.Chromatogr.A*, 1996, 739 : 183.
- 145 W. R. Jones, H. C. E. Boka Raton, CRC press, Inc, 1994, 21.
- 146 D. Schlegel, J. Mattusch, R. Wennrich, et al. *Anal.Chem*, 1996, 354 : 535.
- 147 J. A. Jankowski, S. Tracht, J. V. Sweedler, *Tr. Anal. Chem*, 1995, 14 : 170.
- 148 T. M. Olefirowice, A. G. Ewing, *Anal. Chem*, 1990, 62(17) : 1872.
- 149 L. Cruz, L. L. Moroz, R. Gillette, J. V. Sweedler, *J. Neurochem*, 1997, 69 : 110.
- 150 R. T. Kennedy, M. O. Oates, B. Cooper, *Retal.Science*, 1989, 246 : 57.
- 151 B. L. Hogan, E. S. Yeung, *Anal. Chem*, 1992, 64(22) : 2841.
- 152 S. J. Lillard, E. S. Yeung, *Anal. Chem*, 1996, 68(17) : 2897.
- 153 W. Tong, E. S. Yeung, M. A. McCloskey, *J.Chromatogr.B*, 1997, 689 : 321.
- 154 J. Berquist, A. Tarkowski, R. Ekman, A. G. Ewing, *Proc.Natl.Acad.Sci*, 1994, 91 : 12912.
- 155 S. D. Gilman, A. G. Ewing, *Anal. Chem*, 1995, 67(1) : 58.
- 156 R. M. Wightman, J. M. Finnegan, K. Tr. Pihel, *Anal.Chem. [J]*, 1995, 14 : 154.
- 157 F. D. Swanek, G. Chen, A. G. Ewing, *Anal.Chem.[J]*, 1996, 68(22) : 3912.
- 158 M. A. Malone, P. L. Weber, M. R. Smyth, et al. *Anal.Chem*, 1994, 66 : 3782.
- 159 F. D. Swanek, G. Chen, A. G. Ewing, *E. I. Symp, HPCE*, 1996, 502.
- 160 Q. Weng, W. Jin, *Electrophoresis*, 2001, 22 : 2797.
- 161 W. Jin, W. Dong, X. Ye, D. Yu, *Anal. Biochem*, 2000, 285 : 255.
- 162 Q. Dong, W. Jin, *Electrophoresis*, 2001, 22 : 2786.
- 163 L. Zhang, Q. Hu, G. Chen, Y. Fang, *Anal.Chem.Acta*, 2000, 424 : 257.
- 164 L. Zhang, G. Chen, Q. Hu, Y. Fang, *Anal.Chem.Acta*, 2000, 431 : 287.
- 165 李关宾, 范春生, 邢存章, *色谱*, 1997, 15(1) : 6515.
- 166 牛长群, 祝仕清, *药学学报*, 1997, 32(3) : 2071.
- 167 辛慧君, *分析化学*, 1997, 25(5) : 55517.
- 168 许丹科, 陈洪渊, *分析化学*, 1997, 25(4) : 45621.
- 169 Q. Hu, L. Zhang, Y. Fang, *Anal.Chim.Acta*, 2000, 416 : 15.
- 170 Q. Hu, T. Zhou, L. Zhang, Y. Fang, *Fresenius J. Anal.Chem*, 2000, 368 : 844.

- 171 周小棉, 张荣恩, 刘建武, 药物分析, 1997, 17(5) : 30423.
- 172 Y. M. Liu, S. J. Sheu, J. Chromatogr, 1992, 600 : 370.
- 173 朱萱萱, 陈福林, 茅咏雯等, 中国中药杂志, 1996, 21(10) : 587.
- 174 S. W. Sun, S. S. Lee, L. Y. Chen, J. Chromatogr A, 1997, 767 : 277.
- 175 M. Unger, J. Stockigt, J. Chromatogr A, 1997, 791 : 323.
- 176 X. Fang, X. Liu, J. Ye, Y. Fang, Anal. Lett, 1996, 29 : 1975.
- 177 A. Wang, L. Zhang, Y. Fang, Anal. Chim. Acta, 1999, 394 : 309.
- 178 A. Wang, L. Zhang, S. Zhang, Y. Fang, J. Pharm. Biomed. Anal, 2000, 23 : 429.
- 179 A. Wang, L. Li, F. Zang, Y. Fang, Anal. Chim. Acta, 2000, 419 : 235.
- 180 Q. Wang, F. Ding, H. Li, P. He, Yuzhi Fang, J. PBA, 2003, 30 : 1507.
- 181 G. Chen, X. Ying, J. Ye, Analyst, 2000, 125 : 815.
- 182 G. Chen, H. Zhang, J. Ye, Talanta, 2000, 53 : 471.
- 183 G. Chen, H. Zhang, J. Ye, Anal. Chim. Acta, 2000, 423 : 69.
- 184 X. Li, Y. Zhang, Z. Yuan, Chromatographia, 2002, 55 : 243.
- 185 Y. Cao, C. Lou, Y. Fang, J. Ye, J. Chromatogr. A, 2001, 943 : 153.
- 186 Y. Cao, X. Zhang, Y. Fang, J. Ye, Mikrochim. Acta, 2001, 137 : 57.
- 187 G. Chen, J. Zhang, J. Ye, J. Chromatogr. A, 2001, 923 : 255.
- 188 Y. Pan, L. Zhang, G. Chen, Analyst, 2001, 126 : 1519.
- 189 W. Yang, X. Yu, A. Yu, H. Chen, J. Chromatogr. A, 2001, 910 : 311.
- 190 G. Chen, H. Luo, J. Ye, C. Hu, Planta Med, 2001, 67 : 665.
- 191 G. Chen, H. Luo, J. Ye, C. Hu, Talanta, 2001, 54 : 1067.
- 192 M. A. Aramendia, I. Garcia, F. Lafont, J. Chromatogr A, 1995, 707 : 327.
- 193 Z. K. Shihabi, T. Kute, L. L. Garcia, J. Chromatogr. A, 1994, 680 : 1811.
- 194 Y. M. Liu, S. J. Sheu, Anal. Chim. Acta, 1994, 288 : 221.
- 195 P. Morin, F. Villard, M. Dreux, J. Chromatogr, 1993, 628 : 161.
- 196 P. Morin, F. Villard, M. Dreux, J. Chromatogr, 1993, 628 : 153.
- 197 宗玉英, 余满堂, 朱志强等, 药学学报, 1995, 30(8) : 594.
- 198 Y. Y. Zong, C. T. J. Che, Nat. Products, 1995, 58(4) : 577.
- 199 R. J. Ochocka, D. Rajzer, P. Kowalski, J. Chromatogr. A, 1995, 709 : 1.
- 200 C. Y. C. Chou, T. H. Tsai, M. F. Lin, J. Chromatogr. A, 1996, 19(12) : 1909.

- 201 S. Iwagami, Y. Sawabe, T. Nakagawa, *Shoyakugaku Zasshi*, 1992, 46(4) : 339.
- 202 M. E. Hadwiger, S. R. Torchia, S. Park, M. E. Biggin, C. E. Lunte, *J. Chromatogr. B*, 1996, 681 : 241.
- 203 X. Fang, F. Gong, Y. Fang; *Anal. Chem.* 1998, 70 : 4030.
- 204 廉经武, *分析化学*, 1997, 25(3) : 290.
- 205 C. Lugucra, V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, *J. Agric. Food. Chem.*, 1997, 45 : 3766.
- 206 F. T. A. Chen, J. H. Zang, *Anal. Chem. Int.*, 1992, 75 : 905.
- 207 叶建农, 赵学伟, 金薇等, *分析测试学报*, 1997, 17 : 34.
- 208 G. Chen, Q. Chu, L. Zhang, J. Ye, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 457 : 225.
- 209 Q. Wang, H. Yu, H. Li, F. Ding, P. He, Y. Fang, *Food. Chem.*, 2003, 83(2) : 311.
- 210 Q. Hu, T. Zhou, L. Zhang, Y. Fang, *Anlyst*, 2001, 126 : 298.
- 211 B. F. Kenndy, *J. Chromatogr.*, 1991, 51 : 155.
- 212 K. W. Swallow, N. I. L. L. Low, *Agric. Food. Chem.*, 1994, 42 : 2808.
- 213 M. Trevaskis, V. C. Trenerry, *Food Chem.*, 1996, 57 : 323.
- 214 R. L. Cotter, M. Benveenuti, *J. Pittsburgh Conf. Labstract*, 1995, 1635.
- 215 K. C. Wakdron, J. Li, *J. Chromatogr. B*, 1996, 638 : 4.
- 216 M. Jimidar, T. P. Hamoir, A. Foriers, *J. Chromatogr.*, 1993, 636 : 179.
- 217 M. T. Galeeran, M. C. Carneiro, M. Dicz, *J. Chromatogr. A*, 1997, 782 : 289.
- 218 C. M. Maragos, J. I. Greer, *J. Agric. Food. Chem.*, 1997, 45 : 4337.
- 219 C. M. Maragos, *Food Agric. Immunol*, 1998, 9 : 147.
- 220 A. Al-Hakim, R. Lindardt, *J. Anal. Biochem.*, 1991, 195 : 68.
- 221 A. Bergholdt, J. Overguard, A. Colding, R. B. Fredresken, *J. Chromatogr.*, 1993, 644 : 412.
- 222 J. Ye, R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, 1993, 65 : 3525.
- 223 C. Fu, L. Song, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 371 : 81.
- 224 Q. Hu, T. Zhou, L. Zhang, Y. Fang, *Analyst*, 2001, 126 : 298.
- 225 Q. Wang, F. Ding, H. Li, P. He, Y. Fang, *Biomed. Chromatogr.*, 2003, 17(7) : 483.
- 226 X. Huang, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 1991, 63 : 189.
- 227 T. J. O'Shea, S. M. Lunte, W. R. Lacourse, *Anal. Chem.*, 1993, 65 : 948.
- 228 M. Zhong, S. M. Lunte, *Anal. Commun.*, 1998, 35 : 209.

- 229 P. D. Voegel, R. P. Baldwin, *Electrophoresis*, 1998, 19 : 2226.
- 230 H. Wei, T. Wang, S. F. Y. Li, *Electrophoresis*, 1997, 18 : 2024.
- 231 G. Chen, J. Cheng, J. Ye, *J. Fresenius'*, *Anal. Chem*, 2001, 370 : 930.
- 232 A. Wang, L. Zhang, S. Zhang, Y. Fang, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2000, 23 : 429.
- 233 W. Jin, Q. Xu, W. Li, *Electrophoresis*, 2000, 21 : 1527.
- 234 M. Goto, S. Inagaki, Y. Esaka, *Anal. Sci*, 1992, 17 : 1383.
- 235 Q. Dong, W. Jin, J. Shen, *Electrophoresis*, 2002, 23 : 559.
- 236 Q. Weng, W. Jin, *Electrophoresis*, 2001, 22 : 2797.
- 237 S. N. Tan, L. Hua, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 450 : 263.
- 238 W. Jin, Q. Dong, D. Yu, X. Ye. *Electrophoresis*, 2000, 21 : 1535.
- 239 Q. Dong, D. Yu, X. Ye, W. Jin, *Electrophoresis*, 2001, 22 : 128.
- 240 T. Inoue, J. R. Kirchhoff, *Anal. Chem*, 2002, 74 : 1349.
- 241 A. J. Gawron, S. M. Lunte, *Electrophoresis*, 2000, 21 : 3205.
- 242 O. Niwa, R. Kurita, Z. Liu, T. Horiuchi, K. Torimitsu, *Anal. Chem*, 2000, 72 : 949.
- 243 Z. Liu, O. Niwa, R. Kurita, T. Horiuchi, *J. Chromatogr. A*, 2000, 891 : 149.
- 244 S. R. Wallenborg, L. Nyholm, C. E. Lunte, *Anal. Chem*, 1999, 71 : 544.
- 245 D. M. Osbourn, C. E. Lunte, *Anal. Chem*, 2001, 73 : 5961.
- 246 D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis*, 2000, 21 : 2080.
- 247 U. Backofen, F. Matysik, C. E. Lunte, *J. Chromatogr. A*, 2002, 942 : 259.
- 248 S. Zhang, Z. Yuan, H. Liu, H. Zou, H. Xiong, Y. Wu, *Electrophoresis*, 2000, 21 : 2995.
- 249 M. Jin, Q. Dong, R. Dong, W. Jin, *Electrophoresis*, 2001, 22 : 2793.

第二章 毛细管电泳-安培检测中的场放大进样预富集 及珍菊降压片中有效成分的测定研究

第一节 毛细管电泳-安培检测法同时测定 珍菊降压片中氢氯噻嗪和芦丁的研究

摘要

本文首次用毛细管区带电泳—安培检测法分别测定了复方中药珍菊降压片和尿液中的氢氯噻嗪(HCT)和芦丁(RT)。在最佳条件下,这两种成分在12min内能够被很好的分离检测,在碳电极上也有较大的电流响应。实验得到HCT和RT的线性范围分别是 $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ 和 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$,按照线性回归方程所得到的灵敏度分别是 $7.02 \times 10^4 \text{ nA} \cdot \text{L/mol}$ 和 $2.17 \times 10^5 \text{ nA} \cdot \text{L/mol}$,检测限分别是 $5.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ 和 $2.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ (S/N=3)。以上结果显示该方法具有灵敏度高、选择性高等优点,可以用于药物代谢动力学的研究。用此方法分析了复方中药珍菊降压片和尿液中HCT和RT的含量,得到了很好的检测结果。

关键词: 毛细管电泳; 安培检测; 芦丁; 氢氯噻嗪; 珍菊降压片

1 前言

珍菊降压片是一种常用的复方降压中药,因其独特的疗效,在中国的高血压患者中得到普遍应用,每年销量达6千万元。芦丁和氢氯噻嗪是珍菊降压片中的主要有效成分。芦丁主要从槐米中提取,具有扩张血管、改善血管通透性的作用。氢氯噻嗪为利尿剂,排钠利尿,使细胞外液和容血量减少,从而使血压降低。

常用于测定芦丁和氢氯噻嗪的方法有高效液相色谱法[1,2]、分光光度法[3-5]、化学发光法[6]、伏安法[7,8]等。直到现在,国内还是多用紫外可见光度法分别检测这两种有效成分,操作较为复杂,也存在灵敏度相对较低的缺点。近年来,毛细管电泳因具有分离效率高、分析速度快、仪器操作简单和试剂用量小等

优点而越来越多地得到研究和应用。M. G. Quaglia 等利用毛细管电泳/毛细管电色谱-线性紫外可见二极管阵列检测法 (linear UV--visible diode array detector) 测定了药物中的氢氯噻嗪, 线性范围为 $0.0244-0.108 \text{ mg ml}^{-1}$ [11]; S. Hillaert 等利用毛细管电泳-紫外检测法测定了血管紧张素转化酶药物中的氢氯噻嗪, 线性范围为 $0.010-0.200 \text{ mg/ml}^{-1}$ [12]。毛细管电泳法往往同紫外、激光诱导荧光等检测方法联用, 前者灵敏度较低, 后者则仪器昂贵且往往需要对分析成分进行衍生化处理。而电化学测试具有灵敏度高、仪器较便宜等优点, 在中药和生化分析中非常适合同毛细管电泳联用。J. Ye 等利用毛细管区带电泳-电化学检测法测定了槐米和 *Pueraria lobata* (Wild.) 中的芦丁 [9,10], 检测限达 $5.11 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。但用毛细管电泳-安培检测法同时分离测定芦丁和氢氯噻嗪的方法未见报道。

因为芦丁和氢氯噻嗪都是电活性物质, 所以安培检测法非常适用于他们的检测。在本文中我们首次探索了毛细管区带电泳-安培法同时分离测定芦丁和氢氯噻嗪的最佳条件, 结果表明这两种成分可以在 12min 内完全分离, 检测限达到 $2 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ 。我们用此方法测定了复方降压中药珍菊降压片中和服用珍菊降压片病人尿液中的芦丁和氢氯噻嗪, 取得了满意的结果。因为该方法具有灵敏度高、进样量少、分离度高、分析速度快、同时检测等优点, 所以在活体生物分析比如药物代谢动力学的研究方面比一般的紫外分析法更实用。

2 实验部分

2.1 仪器

自行组装的毛细管电泳-安培检测系统^[13, 14]; 高压电源 ($\pm 30 \text{ kV}$, 中国科学院上海原子能研究所); 熔融石英毛细管 (长度 40cm, 内径 $25 \mu \text{ m}$, 外径 $360 \mu \text{ m}$, 河北永年光纤厂); BAS LC-3D 安培检测器 (Bioanalytical System, West Lafayette, IN, USA); 台式自动平衡记录仪 (Model XWT-204, 上海大华仪表厂); CHI630 电化学分析仪 (CH Instruments, USA); 三电极系统: 直径为 $300 \mu \text{ m}$ 的碳圆盘电极, 饱和甘汞参比电极和铂丝辅助电极。

2.2 碳圆盘电极的制作

用直径为 $300\ \mu\text{m}$ 的碳棒作为电极材料, 首先将其一端焊接到一段直径 1mm 的细铜棒上, 然后将此细碳棒插入一端已拉成毛细管的玻璃管 (直径约 1mm) 内, 最后用不导电透明聚氨酯树脂将玻璃管两端封住使得碳棒和铜棒牢固, 风干 $24\ \text{h}$ 后即可使用。

碳电极在每次使用前分别用金刚砂纸、氧化铝粉末抛光, 然后用二次蒸馏水在超声波下洗净表面。

2.3 试剂

芦丁 (分析纯, 上海试剂一厂)、氢氯噻嗪 (分析纯, 上海源聚试剂公司), 珍菊降压片 (上海中药三厂)。

$1.0 \times 10^{-3}\ \text{molL}^{-1}$ 芦丁和氢氯噻嗪标准储备液用甲醇配制, 实验前用运行缓冲液稀释至所需浓度。 $0.5\ \text{molL}^{-1}$ 硼砂和 $0.5\ \text{molL}^{-1}$ 磷酸二氢钠储备液用二次水配制。

其他试剂均为分析纯。实验用水为二次水。所有溶液在实验前均用聚丙烯过滤膜 ($0.22\ \mu\text{m}$) 过滤, 并在超声波下脱气后使用。

2.4 实验方法

实验前将工作电极、参比电极和辅助电极分别固定在电解池中相应的位置上, 然后通过三维微调节器将毛细管的检测端出口同工作电极有效偶联。

毛细管在每次使用前依次用 $1.0\ \text{molL}^{-1}$ 盐酸, 二次水, $1.0\ \text{molL}^{-1}$ NaOH 溶液润洗 $3\ \text{min}$ 然后用运行液润洗直至管内电流稳定以得到可重现的电渗流。

每次样品分析后, 先用 $1.0\ \text{molL}^{-1}$ NaOH 溶液洗涤 $10\ \text{min}$, 然后用缓冲溶液洗涤至管内电流稳定后再进样, 以保证得到稳定的电渗流。

实验的最佳条件为: 分离电压 $17\ \text{kV}$, $25\ \text{mmolL}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $50\ \text{molL}^{-1}$ NaH_2PO_4 ($\text{pH}7.9$) 缓冲溶液为运行液, 进样时间 $7\ \text{s}$, 检测电位 $0.80\ \text{V}$ 。

2.5 样品处理

本实验的一个样品是复方中药珍菊降压片。把药片小心压碎然后用甲醇提取, 滤液用甲醇稀释到 $10\ \text{ml}$, 用毛细管电泳分析时再用缓冲溶液稀释 50 倍。

另一个样品是高血压病人服用 5 片珍菊降压片三小时后的尿样。该尿样经过聚丙烯过滤膜 ($0.22\mu\text{m}$) 过滤后用缓冲溶液稀释 5 倍进行分析。

3 结果与讨论

3.1 安培法检测条件的选择

芦丁分子结构中含有羟基 (图 1a), 氢氯噻嗪分子结构中含有氨基 (图 1b), 因而他们都能在碳电极上被氧化并产生电流响应。图 2 是芦丁和氢氯噻嗪在

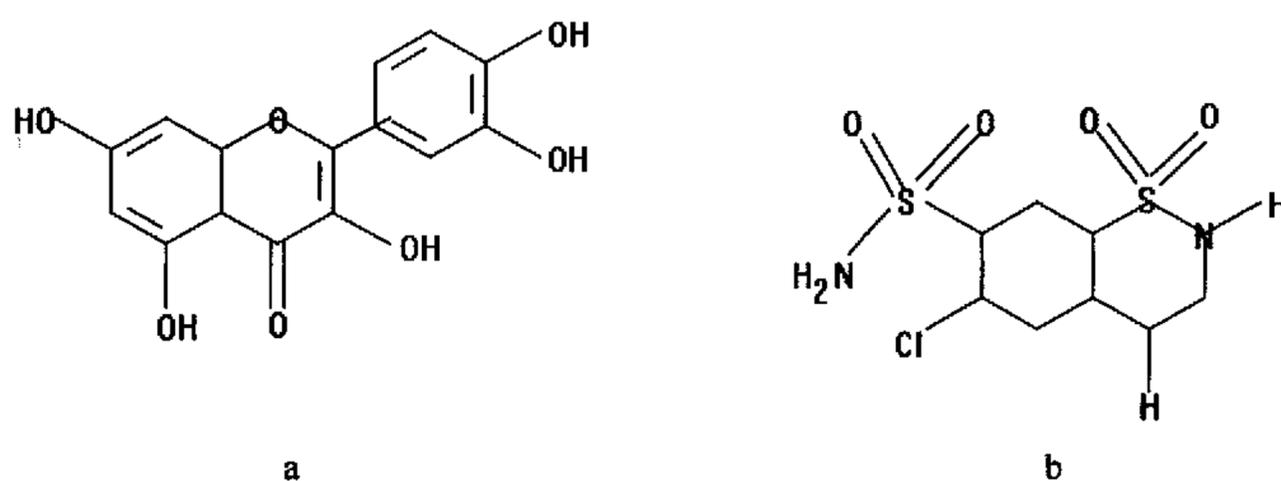


Fig. 1 Molecular structures of RT (a) and HCT (b).

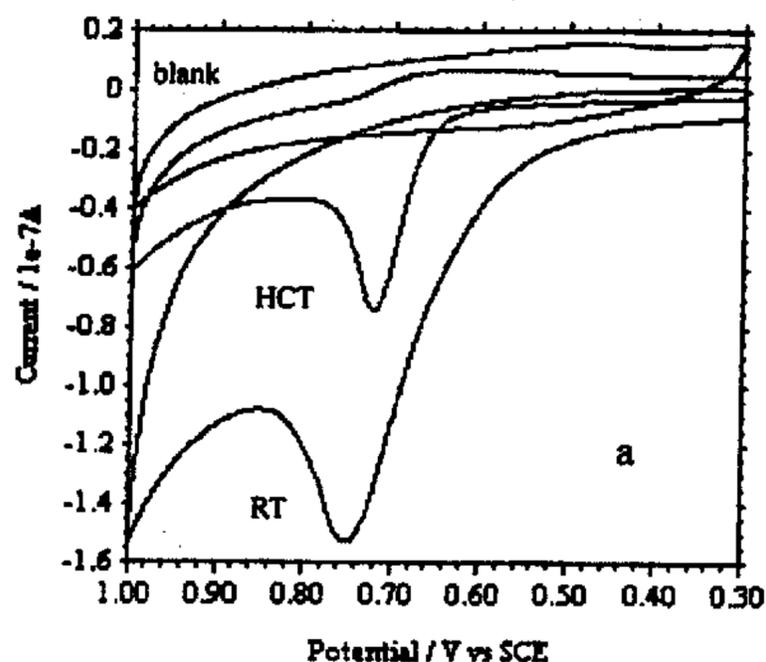


Fig. 2 Cyclic voltammograms of RT and HCT with a concentration of $5.0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ at carbon disk electrode in $25 \text{ mmolL}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $50 \text{ mmolL}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7.9) buffer solution at a scan rate of 100 mV/s .

$25\text{mmolL}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \sim 50\text{mmolL}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7.9)缓冲液和 100mVs^{-1} 扫描速度下的循环伏安图。由图显示当电压为+0.75V 时, HCT 和 RT 有明显的阳极峰。由于两种分析成分和空白液的响应电流都随着检测电位的增大而增大, 为了得到高的灵敏度和好的信噪比, 本实验中选用 0.80 V 作为检测电位。

3.2 毛细管电泳分离条件的选择

在碱性条件下, 芦丁的邻二醇羟基可以与硼酸根形成配阴离子[15, 16], 氢氯噻嗪中的氨基上的氢离子也会发生轻微的电离而带有部分负电荷。从结构上看, 芦丁羟基氢的电离强度要大于氢氯噻嗪氨基上氢的电离, 这样, 两种组分因荷质比的不同, 可以通过在高压电场下的具有不同的电泳速度来进行分离。实验中分别使用单纯的硼酸盐体系和硼酸盐-磷酸二氢盐体系, 结果发现在硼酸盐-磷酸二氢盐体系中芦丁和氢氯噻嗪得到了很好的分离, 这是因为硼酸盐-磷酸二氢盐体系能改变电渗流。

我们以 $25\text{mmolL}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \sim 50\text{mmolL}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 为运行液, 改变其 pH 值从 7.5 至 10.0, 从而探讨运行液 pH 值对毛细管电泳分离的影响。实验结果如图 3 (a,b) 所示, 随着运行液 pH 值的升高, 组分的保留时间相应延长, 二者保留时间的差值也增大, 但电流响应峰也逐降低。因为芦丁和氢氯噻嗪有非常大的分离度, 所以应尽量选择较低的 pH 值, 以缩短分离时间。 $25\text{mmolL}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \sim 50\text{mmolL}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 本身的 pH 值是 7.9, 在此酸度下, 分析时间较短而且也能达到完全的分离。

缓冲液浓度对结果的影响如图 3c 所示。在 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 和 NaH_2PO_4 浓度比 (1: 2) 保持不变的前提下, 从小到大改变运行缓冲液的浓度。随着运行缓冲液浓度的增大, 电渗流速度降低, 分离时间增长, 电流响应减小, 检测限明显降低。所以在低浓度缓冲液条件下可以减少分离时间, 提高灵敏度。综合考虑分离度、电流响应和分离时间, 我们在实验中选择 $25\text{mmolL}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \sim 50\text{mmolL}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 为运行缓冲液。

在 8~20kV 范围内改变分离电压, 其对分离效率的影响如图 3(d)所示。升高分离电压可以缩短芦丁和氢氯噻嗪的保留时间, 电流响应峰增高、变窄。但如果分离电压太高, 毛细管内电流变大, 焦耳热也随之增大, 导致峰形变宽、分离效

率下降。综合考虑上述因素，分离电压为 17kV 时最合适。

实验中使用电动进样，在其他最优化条件下，改变进样时间从 4 s 到 16 s，发现峰电流相应增加。但是如果进样时间超过 12 s，峰形会明显展宽。所以，为了得到最佳结果，实验中选择 7s 作为进样时间。

综上所述，实验的最优化条件是：分离电压 17kV，运行缓冲液 $25\text{mmolL}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-50\text{mmolL}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.9)，进样时间 7s，检测电位 0.8 V。在此条件下得到的芦丁和氢氯噻嗪混合液 ($4.0\times 10^{-6}\text{molL}^{-1}$) 的电泳图见图 4a。

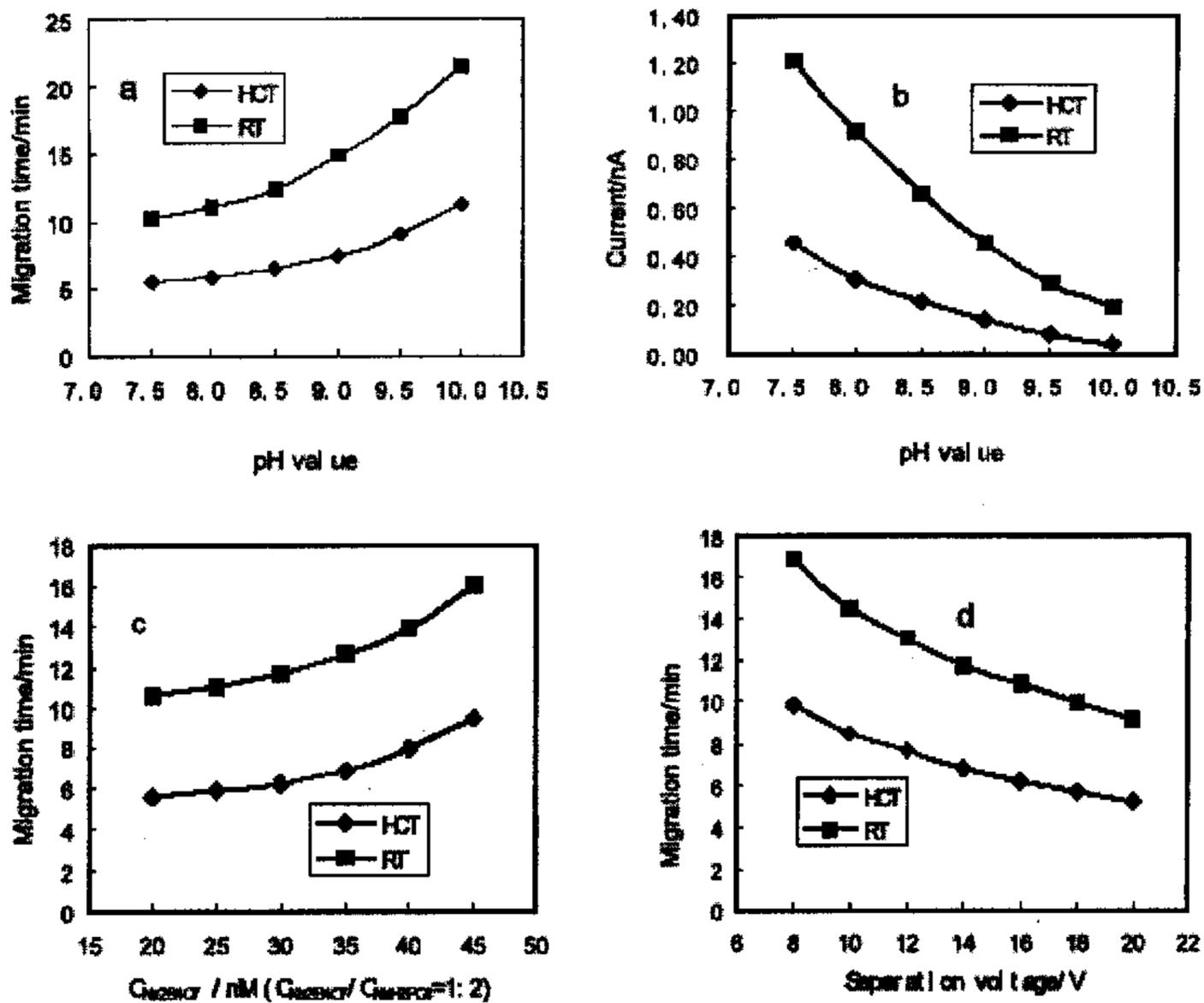


Fig. 3 Effects of pH value of running buffer on migration time (a), pH value of running buffer on current response (b), concentration of running buffer on migration time (c) and separation voltage on migration time (d).

3.3 线性范围、检测限和重现性

在最佳条件下分析了一系列浓度从 $1.0\times 10^{-7}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $5.0\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCT 和 RT 的标准溶液，结果见表 1。HCT 和 RT 的线性范围分别是 $2.0\times 10^{-6}\sim$

$1.0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ 和 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, 由线性回归方程得到的灵敏度分别是 $7.02 \times 10^4 \text{ nA} \cdot \text{L/mol}$ 和 $2.17 \times 10^5 \text{ nA} \cdot \text{L/mol}$, 检测限分别是 $5.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ and $2.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ ($S/N=3$)。以上结果显示该方法的灵敏度较好。表 2 列出了分析组分浓度为 $5.0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ 时, 在相同条件下平行检测六次所得的保留时间和峰电流的相对标准偏差。由表 2 可知, 所有的相对标准偏差都小于 3%, 说明该方法有很好的重现性。

Table 1 Regression equation and detection limit^a

Analyte	Regression Equation I(nA); C(molL ⁻¹)	R	Linear Range (molL ⁻¹)	Detection Limit (molL ⁻¹)
HCT	$I=7.02 \times 10^4 C - 0.041$	0.9992	$2.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$	5.0×10^{-7}
RT	$I=2.17 \times 10^5 C - 0.089$	0.9998	$1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$	2.0×10^{-7}

^a Detection limit was estimated according to three times of signal-noise ratio.

Table 2 Precision of the present method (n=6)^a

Analyte	Migration Time (Min)		Peak Height (nA)	
	Average	RSD(%)	Average	RSD(%)
HCT	5.9	0.96	0.31	1.89
RT	11.1	0.67	0.99	2.68

^a The concentrations of all the two analytes were $5.0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$.

3.4 样品测定及回收率

3.4.1 珍菊降压片样品的测定

根据第二部分的步骤分析珍菊降压片中 HCT 和 RT, 所得的电泳谱图如图 4b, 分析结果在表 3 中列出。用此方法测出一片药中 HCT 和 RT 的含量分别是 4.9 mg 和 19.8 mg, 相对标准偏差小于 2.4%。为了证实此方法是可靠的, 用药典法—UV 做对比实验, 测出一片药中 HCT 和 RT 的含量分别是 4.9 mg 和 19.7 mg, 相对标准偏差分别是 2.4%和 2.1% (n=6)。所以此方法不但是可行的, 而且还有灵敏度高等优点。

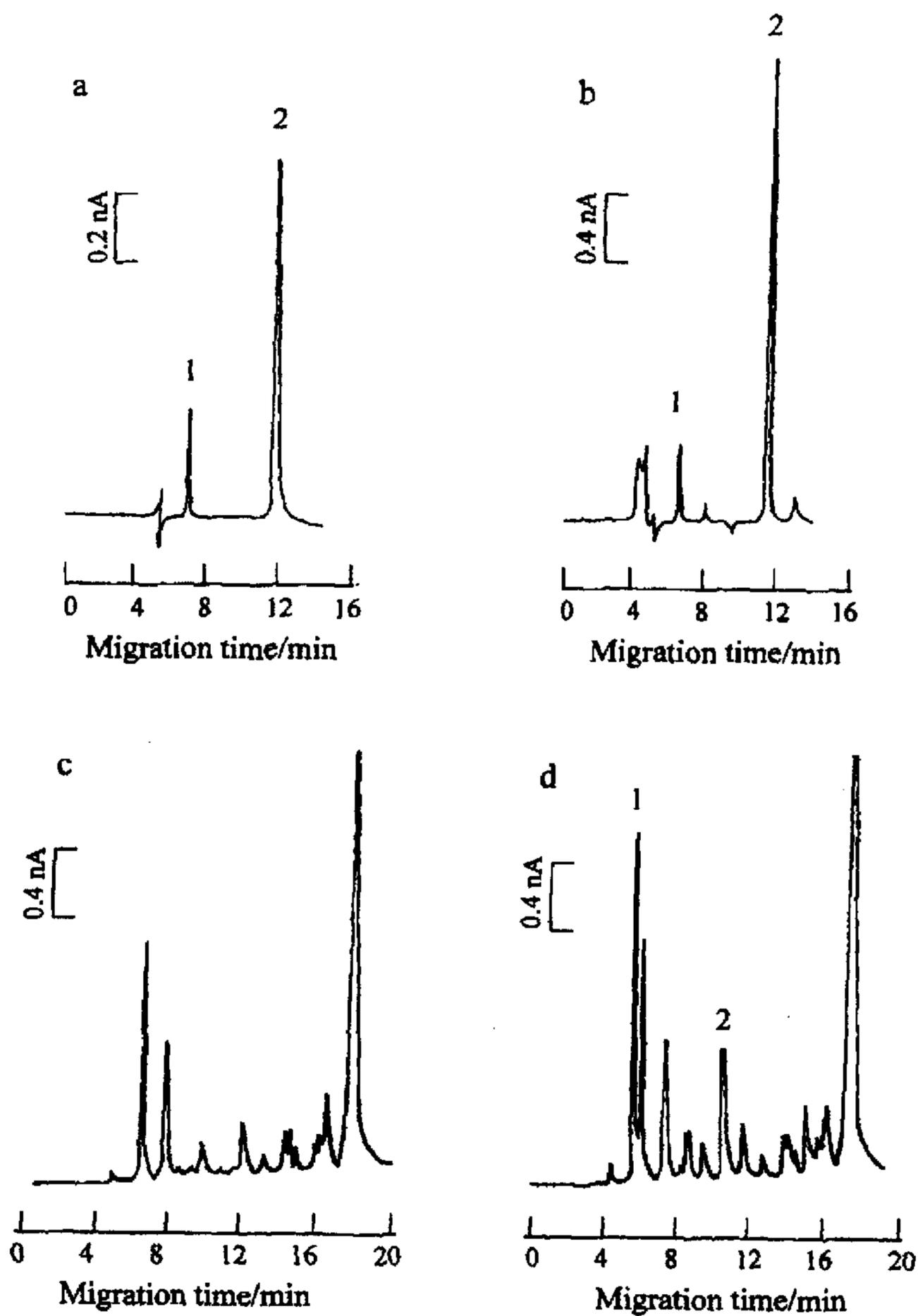


Fig. 4 Electropherograms of standard RT and HCT with a concentration of $4.0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ (a), Zhen Ju Jiang Ya Pian (b), blank urine sample before drug administration (c) and urine sample after drug administration (d). 1-HCT, 2- RT under optimum conditions.

3.4.2 尿样分析

根据 2.5 所述步骤分析尿样。服药之前的空白尿样的电泳谱图如图 4c, 服药之后的尿样电泳谱图如图 4d, 分析结果在表 3 中列出。结果显示此方法可以被用来研究珍菊降压片在人体内的代谢动力学而且不需要任何的预处理。

Table 3 Analytical results of samples (n=6)

Sample	Component	Label claim	Found amount	RSD(%)
Zhen Ju Jiang Ya Pian	HCT	5 mg/tablet	4.9 mg/tablet	2.0
	RT	20 mg/tablet	19.8 mg/tablet	2.4
Urine sample	HCT	--	$2.6 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$	3.4
	RT	--	$4.1 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$	3.6

通过分别向珍菊降压片和尿样中加入一定量的 HCT 和 RT 的方法做了四次回收实验。结果在表 4 中列出, 显示 HCT 和 RT 的回收率在 94% 到 99%。由此表明此方法是准确可行的。

Table 4 Recoveries of HCT and RT in sample analysis (n=4)

Sample	Component	Added amount(molL^{-1})	Found amount(molL^{-1})	Recovery(%)	RSD(%)
Zhen Ju Jiang Ya Pian	HCT	5.0×10^{-6}	4.9×10^{-6}	98.0	2.1
	RT	5.0×10^{-6}	4.9×10^{-6}	98.0	1.9
Urine sample	HCT	5.0×10^{-6}	4.8×10^{-6}	96.0	3.2
	RT	5.0×10^{-6}	4.7×10^{-6}	94.0	3.8

4 结论

实验结果证明用毛细管区带电泳—安培检测法同时检测中药和尿样中的 HCT 和 RT 是可行的。此方法显示出了快速、低进样量、高效、重现性好等优点。特别是与一般的 UV 方法相比, 此方法更加灵敏, 能进行同时检测, 不需要任何前浓缩预处理, 为药物的代谢动力学研究提供了新方法。

5 参考文献:

- [1] Kazuo Ishii, Takashi Furuta and Yasuji Kasuya, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, Volume 759, Issue 1, 5 August 2001, Pages

161-168

- [2] Alaa El-Gindy, Ahmed Ashour, Laila Abdel-Fattah and Marwan M. Shabana, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 25, Issues 5-6, July 2001, Pages 923-931
- [3] H. N. A. Hassan, B. N. Barsoum and I. H. I. Habib, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 20, Issues 1-2, June 1999, Pages 315-320
- [4] Kazem Kargosha and Amir H. M. Sarrafi, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 26, Issue 2, September 2001, Pages 273-279
- [5] Nevin Erk *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 27, Issue 6, 1 March 2002, Pages 901-912
- [6] Zhenghua Song and Shuang Hou, *Talanta*, Volume 57, Issue 1, 22 April 2002, Pages 59-67
- [7] G. J. Volikakis and C. E. Efstathiou, *Talanta*, Volume 51, Issue 4, 3 April 2000, Pages 775-785, [8] Nikolaos E. Zoulis and Constantinos E. Efstathiou, *Analytica Chimica Acta*, Volume 320, Issues 2-3, 29 February 1996, Pages 255-261
- [9] Gang Chen, Hongwei Zhang and Jiannong Ye, *Analytica Chimica Acta*, Volume 423, Issue 1, 20 September 2000, Pages 69-76
- [10] Gang Chen, Jianxia Zhang and Jiannong Ye, *Ohwi Journal of Chromatography A*, Volume 923, Issues 1-2, 20 July 2001, Pages 255-262
- [11] M. G. Quaglia E. Donati, G. Carlucci, P. Mazzeo and S. Fanali, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 29, Issue 6, 1 August 2002, Pages 981-987
- [12] S. Hillaert, K. De Grauwe, W. Van den Bossche, *Journal of Chromatography A*, 924 (2001) 439-449
- [13] Y. Fang, X. Fang and J. Ye, *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* 10(1995)1514.
- [14] C. Fu, L. Song and, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta* 399(1999)259.
- [15] Hoffatetter-Kuhu S., Paulus A., Gassmann E. et al. *Anal. Chem.* 1991, 63: 1541-1547.
- [16] Kaneta T., Tsanaka S., Yoshida H., *J. Chromatogr.* 1991,538(1): 385-391.

第二节 毛细管电泳-安培检测中的场放大进样预富集及珍菊 降压片中中西药有效成分的同时测定研究

摘要

场放大是毛细管电泳特有的一种简单的预富集方法,但只有通过改变高压电极的极性才能使带正电荷和负电荷的离子都达到预富集。对于电化学检测,由于仪器方面的原因,不能通过这一方法达到正、负离子的同时富集。本文中我们通过研究用不同稀释溶剂对在水溶液中分别带正电荷、中性电荷、负电荷的盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁三种组分稀释后电流响应的变化,探索了在毛细管电泳电动进样时稀释溶剂对场放大进样的影响。实验发现,改变样品溶液的酸度,可以实现带正电荷、负电荷的离子同时进行场放大进样,比改变电极极性的方法简单易行。使用更高浓度的缓冲溶液稀释样品,也可以使带负电荷的离子达到场放大进样。同时,通过选择合适的稀释溶剂,可以调节同一样品中不同成分的检测灵敏度,使其电流响应达到同一数量级。如在珍菊降压片中,盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁三种中西药有效成分的相对含量相差上百倍(含量分别为 0.03 mg : 5 mg : 20 mg/片),若用缓冲溶液稀释样品,其电流响应难以在同一张电泳图上反映出,但用水做稀释剂,他们的电流响应可以在同一张电泳图上直观地反映出来。

关键词: 稀释溶剂; 场放大进样; 灵敏度; 毛细管电泳; 安培检测

1 前言

近年来,毛细管电泳作为一种高效分离方法在分析化学领域得到了广泛的研究和应用。毛细管电泳经常和紫外-可见或激光诱导荧光检测器联用,但是紫外-可见的检测限不高,激光诱导荧光的灵敏度虽然很高但是对无荧光特性的物质需要进行柱前或柱后衍生,而且仪器昂贵。电化学检测器灵敏度比紫外-可见检测器高,比激光诱导荧光检测器便宜,因此毛细管电泳-电化学检测联用技术在无机离子、糖类、手性药物、氨基酸、多肽、蛋白质等的分离分析中是一种较为理想的方法[1-3]。

在毛细管电泳分离中，缓冲溶液、pH 和缓冲液浓度、分离电压、温度和进样方式是影响灵敏度和检测限的重要因素，很多论文对其进行了详细研究[4-5]。在本实验中，我们研究了不同样品稀释溶剂对毛细管电泳-安培检测法场放大进样的影响。盐酸可乐定（clonidine hydrochloride）、氢氯噻嗪（hydrochlorothiazide）和芦丁（rutin）是降压药珍菊降压片中的中西药活性成分，用它们作为分析对象研究不同稀释溶剂对其检测灵敏度的影响。三种待测样品结构如 Fig. 1 所示。

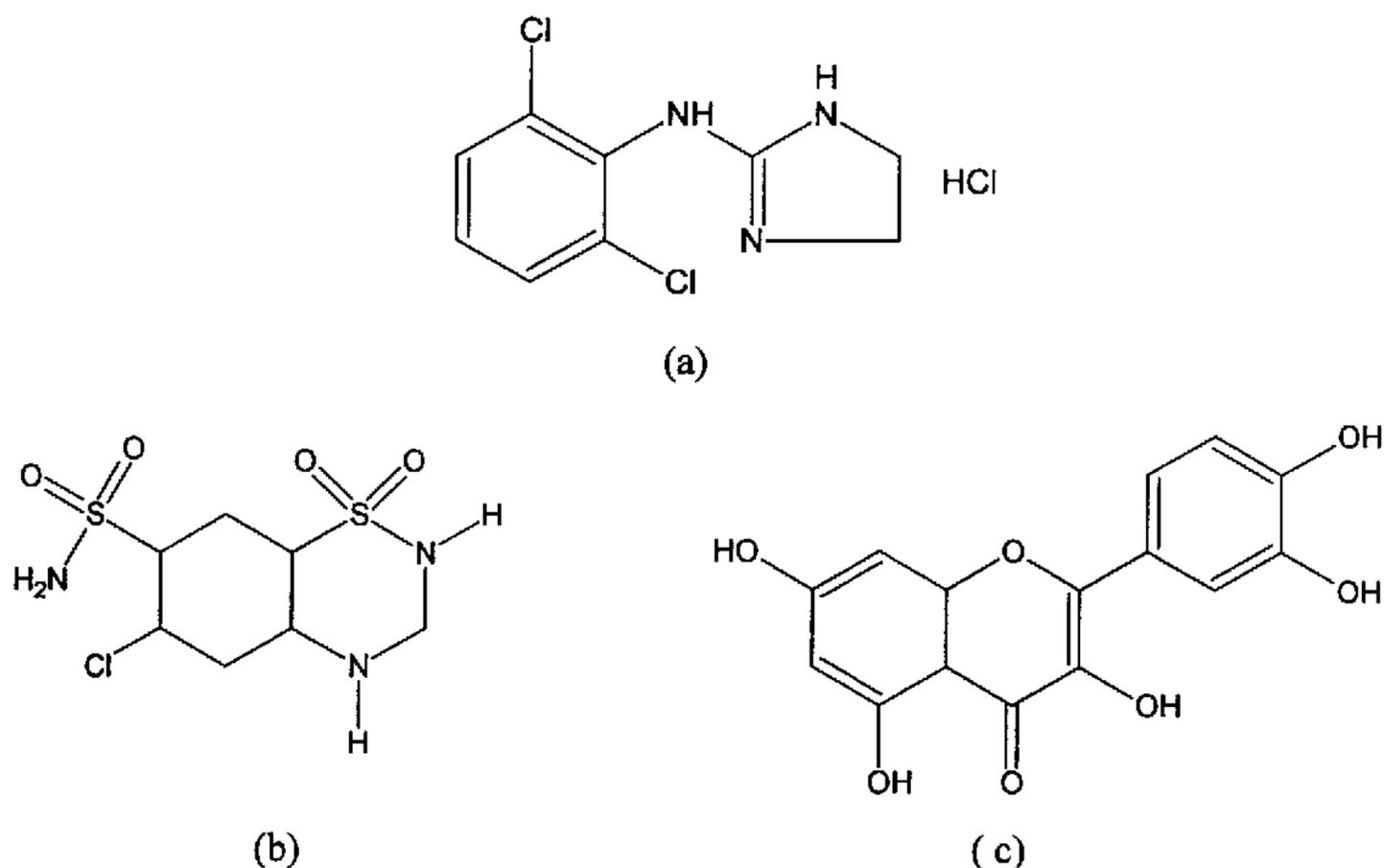


Figure 1. Molecular structures of clonidine hydrochloride (a), hydrochlorothiazide (b) and rutin (c).

在 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 为缓冲液中，由于盐酸可乐定（clonidine hydrochloride）、氢氯噻嗪（hydrochlorothiazide）和芦丁（rutin）中分别带正电荷、不带电荷和负电荷，所以它们能用毛细管电泳法进行分离。因为它们都是电活性物质又都能在碳电极上产生明显的电流响应，所以可以选择高灵敏度的安培检测法与毛细管电泳联用进行分离分析。毛细管电泳-安培检测盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁与所报道的其它方法比如高效液相色谱[6-7]、分光光度法[8-9]、化学发光法[11]、伏安法[12-13]和 CE-UV [14-15]法相比有灵敏度高、选择性好、操作简单、仪器造价低等优点。

每片珍菊降压片中盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁的含量分别为 0.03 mg, 5.0 mg 和 20.0 mg。根据它们的分子量 266.6, 297.7, 664.6 得出氢氯噻嗪和芦丁摩尔数分别为盐酸可乐定的 100 倍和 300 倍左右, 因此, 用毛细管电泳-安培检测时, 其电流响应因差别太大而难以在同一张电泳图上反映出来。

在其它条件不变的情况下, 我们分别用水、甲醇、甲酰胺、不同浓度的缓冲液、盐酸、氢氧化钠作为稀释溶剂来探讨其对检测灵敏度的影响。实验结果表明: 在电动进样条件下, 三种待测组分的电流响应随稀释溶剂的改变发生明显改变, 而且稀释溶剂对扩散电流的影响机理与场放大理论一致[16,17]。实验发现当水做稀释溶剂时, 盐酸可乐定的电流响应提高 5 倍左右, 而氢氯噻嗪和芦丁却分别降低 3 倍和 20 倍。因此, 用水做稀释溶剂时, 珍菊降压片中的三种有效成分的电流响应在同一张毛细管电泳图上较好地反映出来, 而且实验结果令人满意。

2 实验部分

2.1 化学试剂

所有试剂都是分析纯。盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁购自上海东方试剂公司和上海源聚试剂公司。样品储备液浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲醇溶液。珍菊降压片购自上海第三中药厂。在毛细管电泳分离以前, 所有溶液都要用 $0.22 \mu\text{m}$ 聚丙烯膜过滤, 然后超声 5min 除去气泡。

2.2 实验仪器与实验条件

实验室自组装毛细管区带电泳-安培检测系统[17,18]。高压电源 ($\pm 30\text{kV}$, 上海原子核所)。分离在石英毛细管中进行($25 \mu\text{m}$ 内径, $360 \mu\text{m}$ 外径, 长 45 cm, Polymicro. Tech. Ltd., USA)。电位控制和电流信号检测通过 BAS LC-3D 安培检测器实现(Bioanalytical System, West Lafayette, IN, USA)。电泳图谱用记录仪记录(XWT-204 型, 上海大华仪器厂)。CHI 630 电化学工作站(CH Instruments, USA)。三电极体系包括碳工作电极($\Phi 350 \mu\text{m}$)、饱和甘汞参比电极(SCE)、和铂丝对电极。

实验前, 碳电极表面分别在金相砂纸和氧化铝粉末上抛光, 然后在二次水中

超声 3min 清洁表面。然后把三电极系统固定在电化学池的相应孔中，用三维调节系统小心调整碳电极与毛细管末端有效连接。每次实验前，毛细管分别用 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 盐酸、二蒸水、 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氢氧化钠润洗 3min，然后用缓冲液润洗直到毛细管内电流稳定为止，这对于保证得到具有重现性电渗流具有重要意义。

在电动进样之前，盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁的储备液分别用水、甲醇、甲酰胺、运行缓冲液、盐酸、氢氧化钠稀释至 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 和其它所需浓度。进行样品分析时，取一片珍菊降压片磨成粉末用 10ml 甲醇稀释制成储备液，进样前，样品储备液用水做稀释剂稀释至 100ml。

3 结果与讨论

3.1 安培检测条件

盐酸可乐定分子中含电活性咪唑环，芦丁分子中含羟基，氢氯噻嗪中含氨基 (Fig.1)，它们都可以在石墨电极上被氧化产生电流响应。Fig. 2 是上述物质的流体伏安图(HDVs)，由图可见待测样品的电流响应随着所加电位的升高而增大。为了得到高的灵敏度和好的信噪比，选择 0.80V 为实验检测电位。

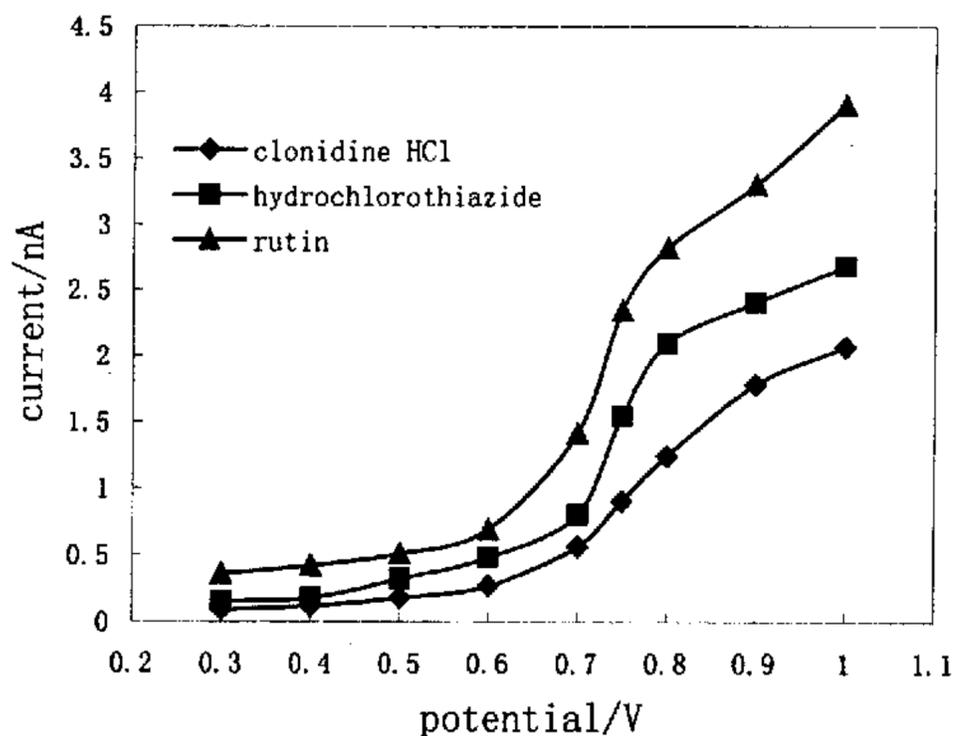


Figure 2. Hydrodynamic voltammograms (HDVs) of clonidine hydrochloride, hydrochlorothiazide and rutin ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) under the optimum CE separation conditions: running buffer $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.9), separation voltage 15 kV, electrokinetic injection time 6s at 15 kV.

3.2 毛细管电泳分离条件

因为盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁有不同的离子化特性，它们在水溶液中分别带正电荷、中性电荷、负电荷，因而有不同的质-荷比。在硼砂缓冲液中，芦丁分子中的邻羟基与硼砂离子络合生成负络离子[20-21]，氢氯噻嗪因为磺胺基电离出氢离子而带部分负电荷，盐酸可乐定仍带部分正电荷，从而在毛细管电泳的高电场作用下有不同的电泳速率而得以实现分离。在实验过程中，选用单纯的硼砂和硼砂-磷酸二氢盐缓冲液进行比较，发现由于在硼砂中加入磷酸二氢盐改变了缓冲液的电渗流，分离效果较好，因此选用此混合溶液作为缓冲液。实验对 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - NaH_2PO_4 缓冲液的浓度进行了研究，发现当 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - NaH_2PO_4 缓冲液比例保持 1:2 而总浓度增加时，电渗流降低而迁移时间延长。本实验中还发现随着缓冲液浓度升高盐酸可乐定的电流响应降低。因此，较低的缓冲液浓度有助于减少迁移时间和提高灵敏度。在本实验中，用 $25\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 做运行缓冲液。

pH 值是影响迁移时间和灵敏度的重要因素之一。因为电动进样影响待测样品的进样量，所以峰电流受溶液 pH 值的影响比较严重。当 pH 值在 7.5 到 10.0 变化时，峰电流随 pH 值的增加而明显降低，这一现象主要是由于随着 pH 值增大，进样量显著减少造成的。但是如果采用压力进样，pH 值从 6.0 变到 10.0，三种分离物的峰电流变化很小。在酸性缓冲溶液中，分离物的迁移时间缩短，所以应选择 pH 值较低的缓冲溶液以减少分离时间，但是如果 pH 值太低，盐酸可乐定和氢氯噻嗪的淌度相近，峰电流会出现部分重叠。在强碱性缓冲溶液中，迁移时间明显延长。例如，在本实验中 pH 9.1 时，芦丁的迁移时间延长 50%。综上所述，本实验应选择近中性条件进行分离。在 $25\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 的原始 pH 值(pH 7.9)条件下，可以得到满意的分离效率，迁移时间为 16 min。

同时我们改变分离电压从 8kV 到 20kV 来研究其对分离效率的影响。当分离电压增加时，分析物的迁移时间显著缩短，相应的电流峰变尖。但是，若分离电压太高，毛细管内的电流增加产生过多的焦耳热致使分离效率降低。综合考虑上述因素，本实验选用 15 kV 为最佳分离电压和电动进样电压。在选定的最佳

条件下,进样时间从 4 s 到 14s 变化。实验发现,当进样时间超过 10s 时,分析物的电流峰明显变宽。因此,本实验选择进样时间为 6s,在该条件下分析结果令人满意。为了研究不同溶剂对进样量的影响,本实验中采用压力进样作对比,压力进样时间为 30s,压差高度为 20cm。

综上所述,本实验采用的最佳分离条件为:分离电压 15kV,检测电压 0.8V,缓冲溶液 $25\text{m mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-}50\text{m mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7.9),进样时间为 6s。

3.3 样品稀释溶剂对场放大进样的影响

盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁的甲醇储备液浓度均为 $1.0\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 。为了研究稀释溶剂的影响,分别把样品储备液用水、甲醇、甲酰胺、不同浓度的硼砂-磷酸二氢钠缓冲液、盐酸、氢氧化钠稀释至 $1.0\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 。当采用电动进样其条件如上,所有分析物的迁移时间没有明显变化,但是用不同稀释溶剂进行稀释时,样品的电流响应有很大变化,如 Tab. 1 所示。

当用硼砂-磷酸二氢钠缓冲液作为稀释溶剂时,盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁的电流响应在同一数量级(见 Fig. 3 (a))。但是,随着稀释溶剂总浓度的增加,盐酸可乐定的电流响应逐渐降低,氢氯噻嗪的电流响应没有明显变化,芦丁的电流响应逐渐增大。这一现象与场放大理论的在低电导溶液缓冲溶液,电动进样时,由于在毛细管入口处有高电场所以阳离子进样量增加,阴离子在管口被排斥进样量减少理论一致。在本实验中,在近中性 (pH 7.9) 缓冲溶液中,芦丁与硼砂离子形成阴离子络合物,氢氯噻嗪仍然显中性,盐酸可乐定带正电荷。所以,当用不同浓度的缓冲溶液作为稀释溶剂时,电动进样量有明显变化。如果要使带负电荷的离子达到场放大进样,可以通过用高浓度的缓冲溶液来稀释样品的途径实现。

当用盐酸做稀释溶剂时,样品的电流响应最高(见 Fig. 3 (b))。电流响应大约是用缓冲液做溶剂时的 2 倍。这一现象也可以用场放大理论来解释。在强酸性溶液中,所有样品都带正电荷,所以进样量增加,电流响应随之增加。这一事实说明通过调节溶液的 pH 值使碱性分析成分变成其阳离子形式是同时提高阴、阳离子检测灵敏度的有效方法。对于紫外或荧光检测的毛细管电泳分析来说,往往通过改变高压电源的极性才能使带正电荷和负电荷的离子都达到预富集[21-23]。但

对于电化学检测, 由于仪器方面的原因, 不能通过这一方法达到正、负离子的同时富集。因此, 本实验结果说明改变样品溶液酸度是毛细管电泳-安培检测中以达到阴、阳离子的同时场放大进样的可行方法。

Table 1 Current responses of analytes with different diluting agents^a

Diluting agents	Concentration of diluting agents	Current (nA)		
		Clonidine HCl	Hydrochlorothiazide	Rutin
Borate-dihydrophosphate	5mM-10mM	2.12	2.24	0.32
	12.5mM-25mM	1.56	2.20	0.88
	25mM-50mM	1.24	2.26	2.82
	50mM-100mM	0.76	2.44	3.54
Hydrochloric acid	10mM	3.98	4.04	4.64
	20mM	4.44	3.80	5.28
	40mM	3.88	3.92	5.72
Sodium hydroxide	10mM	2.06	0.68	0.14
	20mM	1.84	0.48	0.14
Water	40mM	1.28	0.20	0.16
	-	7.04	0.92	0.12
Methanol	-	0.80	1.08	0.08
Formamide	-	1.20	2.72	0.26

^a Clonidine hydrochloride, hydrochlorothiazide and rutin solutions with a concentration of $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ were prepared with methanol, and then diluted to $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ with different diluents respectively.

当用 NaOH 作溶剂时, 也有同样的现象。因为所有分析成分在强碱性溶液中都带负电荷, 在电动进样时被排斥, 所以随着 NaOH 浓度的增加, 盐酸可乐定和氢氯噻嗪的电流响应逐渐降低, 芦丁的也很低。与硼砂-磷酸二氢钠做溶剂相比, 氢氯噻嗪的电流响应降低大约 5 倍, 芦丁降低大约 10 倍。

当用有机物-甲醇、甲酰胺作稀释溶剂时, 盐酸可乐定和氢氯噻嗪的电流响

应大约是用硼砂-磷酸二氢钠作稀释溶剂的一半，而芦丁的却大大降低。也许是因为在有机介质中离子的迁移速率太慢，所以有机稀释溶剂不适合电动进样。

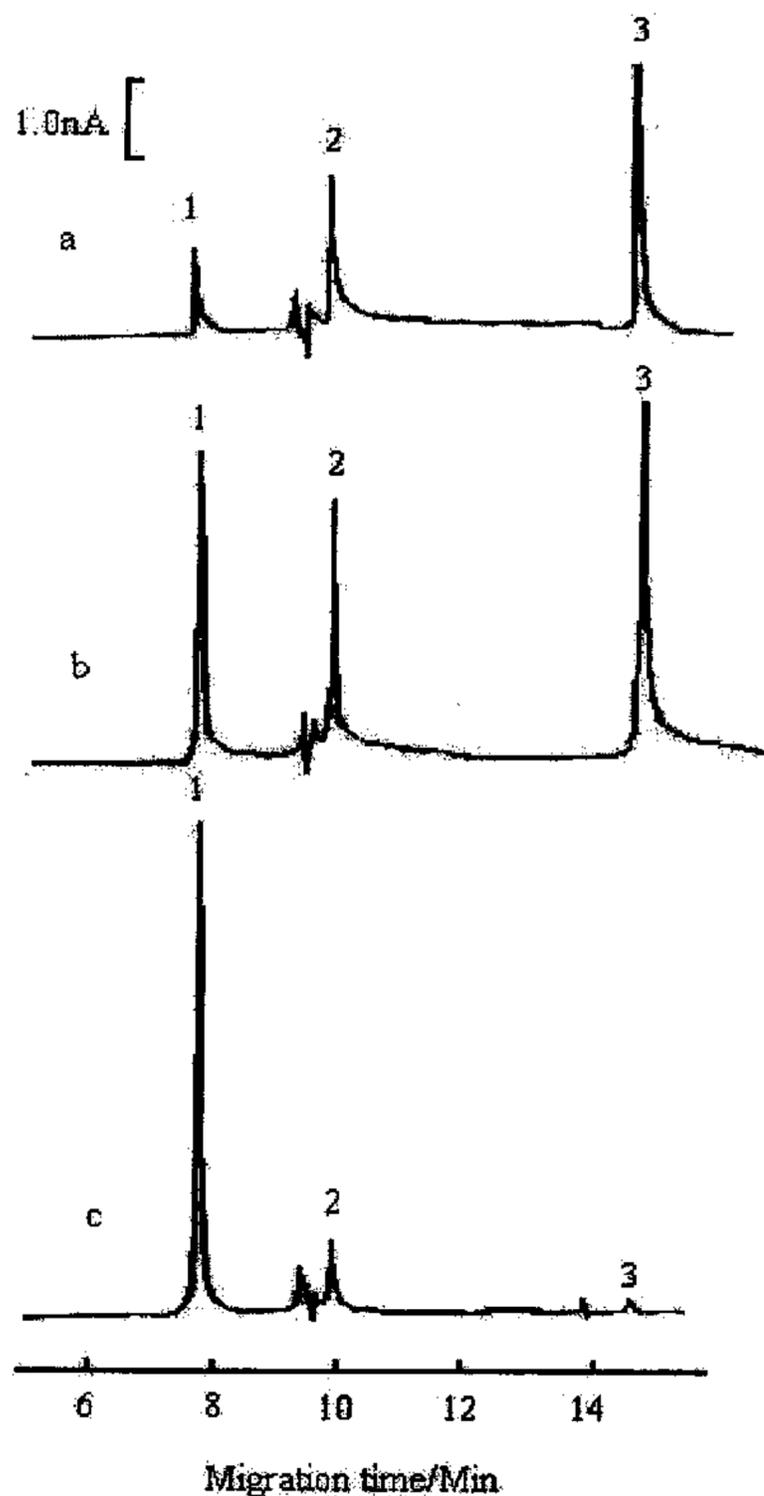


Figure 3. Electropherograms of clonidine hydrochloride (1), hydrochlorothiazide (2) and rutin (3) with same concentration of $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ diluted with $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ (a), $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ hydrochloric acid (b) and water (c) respectively under the optimum CE separation conditions.

如图 Fig. 3 (c), 当水做稀释溶剂时, 与硼砂-磷酸二氢钠缓冲液作稀释溶剂相比, 盐酸可乐定的电流响应提高大约 5 倍, 而氢氯噻嗪和芦丁的分别降低 3 倍和 20 倍。这是场放大效应的一个特例。当纯水作溶剂时, 场放大效应比低浓度缓冲液作溶剂时要大的多。只有在这种条件下, 珍菊降压片中的盐酸可乐定、氢

氯噻嗪和芦丁含量差别虽然很大（在一片药中，盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁的含量分别为 0.03 mg, 5.0 mg, 20.0）却可以在同一电泳图谱反映出它们的电流响应。

实验中用压力进样法进行了对比。在压力进样条件下，用不同稀释溶剂稀释样品的电流响应没有明显的变化。由此可见，当采用电动进样进行毛细管电泳分离时，阴阳离子的进样量受所用的稀释溶剂的不同，导致场放大进样的程度不同，从而影响了其检测灵敏度。

3.4 样品分析

按照第二部分的步骤同时分析珍菊降压片中盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁。在最佳分离条件下以水作稀释溶剂，实验测得盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁的线性范围分别为 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 和 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 。每片药用 10 ml 甲醇溶解然后用水稀释至 100ml 是合适的。

该药的电泳图谱如 Fig. 4 所示，分析结果见 tab. 2。用标准加入法测得盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁的含量分别为 0.03 mg/片, 4.9 mg/片 and 19.6 mg/片，与所报标准含量 0.03 mg/片, 5 mg/片, 20 mg/片相比误差不超过 2%。重复进样四次，样品的标准偏差小于 4%，说明该方法重现性较好。

Table 2 Analytical results of Zhen Ju Jiang Ya Pian (n=4)

Component	Label claim (mg/tablet)	Found amount (mg/tablet)	RSD(%)
Clonidine hydrochloride	0.03	0.03	2.9
Hydrochlorothiazide	5.0	4.9	1.0
Rutin	20.0	19.6	3.8

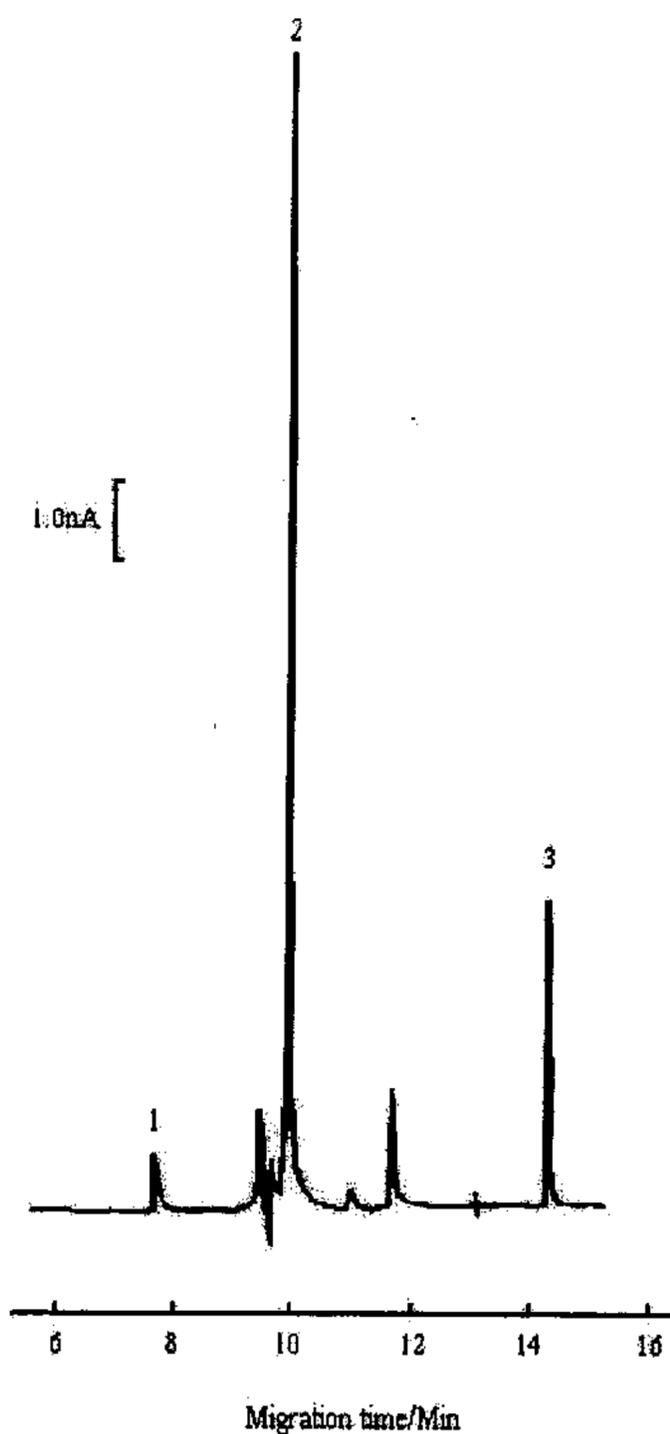


Figure 4. Electropherograms of Zhen Ju Jiang Ya Pian diluted with water under the optimum CE separation conditions: $1.13 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ clonidine hydrochloride (1), $1.65 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ hydrochlorothiazide (2) and $2.96 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ rutin (3).

4 结论

在本文中我们通过研究用不同稀释溶剂对在水溶液中分别带正电荷、中性电荷、负电荷的盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁三种组分稀释后电流响应的变化，探索了在毛细管电泳电动进样时稀释溶剂对场放大进样的影响。实验发现，改变样品溶液的酸度，可以实现带正电荷、负电荷的离子同时进行场放大进样，比改变电极极性的方法简单易行。使用更高的缓冲溶液稀释样品，也可以使带负电荷的

离子达到场放大进样。通过选择合适的稀释溶剂,可以调节同一样品中不同成分的检测灵敏度,使其电流响应达到同一数量级。如在珍菊降压片中,盐酸可乐定、氢氯噻嗪和芦丁三种中西药有效成分的相对含量相差上百倍(含量分别为 0.03 mg : 5 mg : 20 mg/片),若用缓冲溶液稀释样品,其电流响应在同一张电泳图上很难看出,但用水做稀释剂,他们的电流响应可以在同一张电泳图上直观地反映出来。

5 参考文献

- [1] Wang, A., Fang, Y., *Electrophoresis* 2000, 21, 1281-1290.
- [2] Baldwin, R. P., *Electrophoresis* 2000, 21, 4017-4028.
- [3] Matysik, F. M., *Electroanalysis* 2000, 12, 1349-1355.
- [4] Lin B. (Ed.), *Mao Xi Guan Dian Yong Dao Lun*, Science Publishers, Beijing 1996, pp. 83-103.
- [5] Chen Y. (Ed.), *Mao Xi Guan Dian Yong Ji Shu ji Ying Yong*, Chemical Technology Publishers, Beijing 2000, pp. 46-57.
- [6] Ishii, K., Furuta, T., Kasuya, Y., *J. Chromatogr. B* 2001, 759, 161-168.
- [7] El-Gindy, A., Ashour, A., Abdel-Fattah, L. Shabana, M. M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 25, 923-931.
- [8] Hassan, H. N. A., Barsoum B. N., Habib, I. H. I., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 20, 315-320.
- [9] Kargosha K., Sarrafi, A. H. M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 26, 273-279.
- [10] Erk, N., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 901-912.
- [11] Song, Z., Hou, S., *Talanta* 2002, 57, 59-67.
- [12] Volikakis, G. J., Efstathiou, C. E., *Talanta* 2000, 51, 775-785.
- [13] Zoulis, N. E., Efstathiou, C. E., *Anal. Chim. Acta* 1996, 320, 255-261.
- [14] Quaglia, M. G., Donati, E., Carlucci, G., Mazzeo, P., Fanali, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 29, 981-987.
- [15] Hillaert, S., Grauwe, K. D., Bossche W. V. D., *J. Chromatogr. A* 2001, 924,

439-449.

[16] Huang, X., Gordon, M. J., Zare, R. N., *Anal. Chem.* 1988, 60, 375.

[17] Fang, Y., Fang, X., Ye, J., *Chem. J. Chin. Univ.* 1995, 16, 1514-1518.

[18] Fu, C., Song, L., Fang, Y., *Anal. Chim. Acta* 1999, 399, 259-263.

[19] Hoffatetter-Kuhu, S., Paulus, A., Gassmann, E., Widmer, H. M., *Anal. Chem.* 1991, 63, 1541-1547.

[20] Kaneta, T., Tsanaka, S., Yoshida, H., *J. Chromatogr.* 1991, 538, 385-391.

[21] Fung, Y. S., Mak, J. L. L., *Electrophoresis* 2001, 22, 2260.

[22] R. Taylor, S. Toasaksiri, R.G. Reid, *Electrophoresis* 1998 19: 2791.

[23] Liu, B. F., Zhong, X. H., Lu, Y. T., *J. Chromatogr. A* 2002, 945, 257-265.

第三章 毛细管区带电泳/瞬时等速电泳-安培检测联用 间接测定羟自由基的研究

第一节 毛细管电泳-安培检测间接测定羟自由基的研究

摘要

本文研究了利用毛细管区带电泳-安培检测 (CZE-AD) 来间接测定羟基自由基的方法。以 Fenton 反应体系为模型产生羟自由基, 然后将水杨酸加入到该体系中, 它可以捕获羟自由基生成具有电化学生活性的 2,3-二羟基苯甲酸(2,3-DHBA) 和 2,5-二羟基苯甲酸 (2,5-DHBA), 根据 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 在电极上的电流响应可间接测定羟自由基的含量。在最佳条件下, 水杨酸 (SAL)、2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 可以在 15min 内得到了完全分离并检测, 其线性范围为 1.0×10^{-7} - $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $2.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (S/N=3)。在此基础上研究了当归多糖对羟自由基的消除能力。试验结果表明当归多糖加入到 Fenton 反应体系中后, 检测到的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 浓度减少了, 这表明部分的羟自由基已经被消除, 因此, 可用该方法来鉴定不同抗氧化剂对羟自由基的清除能力。

关键词: 羟基自由基; 毛细管电泳; 安培检测; 当归多糖

1 前言

人体内的氧自由基可以攻击蛋白质、核酸和不饱和脂肪酸等生物高分子, 从而破坏细胞的结构和功能, 导致癌症、心血管疾病、阿尔茨海默病和帕金森症等 [1, 2]。羟自由基是最具活性的氧自由基, 当自由基过多或者细胞内的抗氧化剂不足的时候就会导致细胞受损伤。因为羟自由基极其活泼并且在体内存在的时间很短, 所以对其检测具有一定的难度 [3-5]。

羟自由基很难进行直接检测, 可以利用一些间接的方法来进行分析。在羟自由基以及其导致损伤的间接分析中, 常用戊烷、丁烷、8-羟基脲酐等作捕获剂, 也可用水杨酸盐 (SAL)、二甲基亚砷 (DMSO) 和二甲基硫脲等作捕获剂 [6]。

目前检测羟自由基的方法有电子自旋共振 (ESR)、电子顺磁性共振 (EPR) [7,8]、高效液相色谱 (HPLC) 与紫外 (UV) /电化学 (ED) /质谱 (MS) 技术联用[9-13]、气质联用技术 (GC-MS) [14,15]、化学发光等[16-18]。尽管电子自旋共振 (ESR) 被认为是一种很好的检测羟自由基的方法,但在检测过程中要用硝酸、亚硝酸化合物, 5, 5-二甲基-L-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO) 等作旋转捕获剂, 实验过程复杂, 又需要价格高昂的仪器, 而且灵敏度低, 容易被干扰。高效液相色谱是非常有效的羟自由基检测方法, 通常用水杨酸作捕获剂, 然后检测其羟基化产物 2, 3-DHBA 和 2, 5-DHBA。高效液相色谱 (HPLC) 与安培检测法 (AD) 联用, 灵敏度比一般的紫外检测高。但是高效液相色谱 (HPLC) 也同样需要昂贵的仪器, 试剂消耗量也较大。化学发光检测分析羟自由基在灵敏度方面有一些优势, 但是反应产生的荧光试剂还会与超氧化物、过氧化氢或氧原子发生反应从而产生一些误差。

最近几年, 由于毛细管电泳 (CE) 具有分离速度快、样品用量少、操作简单和仪器便宜等特点, 而在分析化学领域得到广泛的研究和应用。但是利用毛细管电泳来分析羟自由基的报道较少[19-21]。N. Gokoren 第一次使用胶束电动毛细管电泳 (MECC) -紫外检测来测定水杨酸、2, 5-DHBA 和 2, 3-DHBA [22]。Coolen 使用毛细管电泳与紫外检测法测定水杨酸中的羟基化产物 2, 3-DHBA 和 2, 5-DHBA, 线性范围为 $10^{-6} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [23]。

本文用毛细管电泳-安培法 (CZE-AD) 间接检测了羟自由基。当水杨酸加入到 Fenton 反应体系中, 它可以捕获羟自由基生成具有电化学活性的 2, 3-DHBA 和 2, 5-DHBA (Figure 1) [24]。

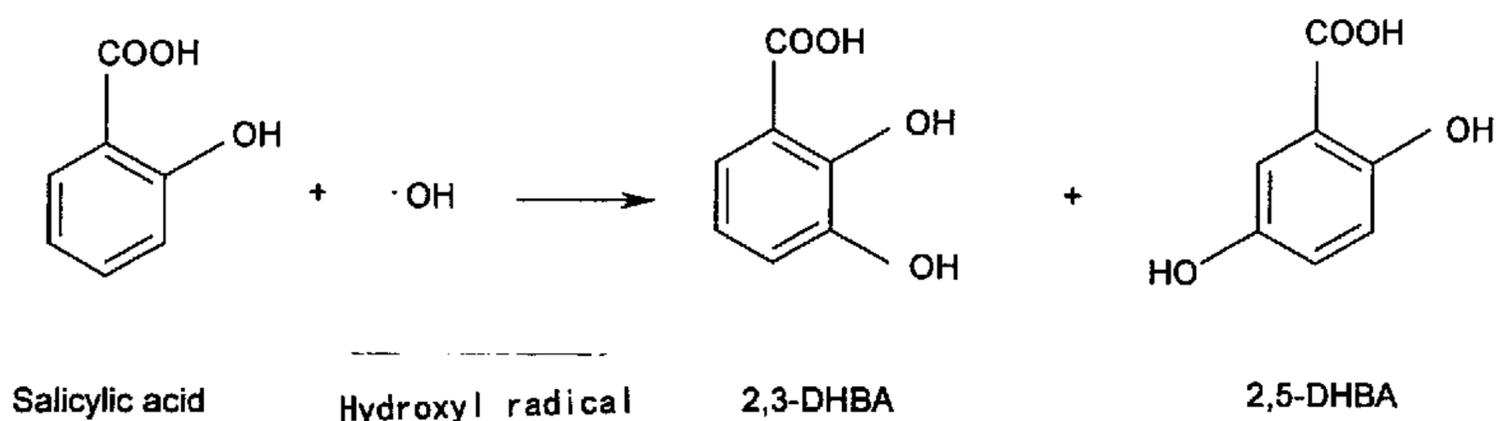


Fig.1 Structures of SAL, 2,3-DHBA, 2,5-DHBA and chemical equation of Fenton reaction.

我们探索了毛细管电泳-安培法检测2,3-DHBA和2,5-DHBA的最佳条件。在最佳条件下,水杨酸、2,3-DHBA和2,5-DHBA可以在15min内得到完全分离;2,3-DHBA和2,5-DHBA的线性范围是 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$;检测限为 $2 \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,优于CE-UV方法。此外,我们利用该法研究了当归多糖对羟基自由基的消除能力。把当归多糖加入到Fenton反应体系中,2,3-DHBA和2,5-DHBA的峰高降低了,说明部分的羟自由基已被消除,因此,可以用该方法来分析不同抗氧化剂对羟自由基的清除能力。

2 实验部分

2.1 仪器部分

毛细管电泳-安培检测自组装系统[25, 26]。高压电源($\pm 30\text{kv}$) (上海原子核研究所);石英毛细管($25 \mu\text{m I.D.}$, $360 \mu\text{m O.D.}$, 60 cm long , Polymicro. Tech. Ltd., USA); BAS LC-3D 安培计(Bioanalytical System, West Lafayette, IN, USA);记录仪(Model XWT-204, 中国上海大华仪器公司);CHI660 电化学分析仪(CH Instruments, USA);电化学检测装置使用三电极体系,碳工作电极($\Phi 300 \mu\text{m}$),饱和的甘汞参比电极(SCE)和铂丝对电极。

2.2 试剂部分

所用试剂均为分析纯试剂。2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 购自 Sigma 化学公司。用二次蒸馏水配制 2,3-DHBA、2,5-DHBA 和水杨酸储备液。当归购买于上海复兴药业有限公司中药部。

实验之前,所有溶液都用 $0.45 \mu\text{m}$ 聚丙烯滤膜过滤,然后超声 5min 除去气泡。

2.3 碳工作电极的制备

碳电极的制备参照文献[27]。在使用之前,碳电极表面用金相砂纸打磨,然后在二次蒸馏水中超声洗涤 3min,以保证电极表面足够的清洁。

2.4 电泳操作条件

在毛细管电泳实验之前,将三个电极固定在电解池上的相应孔中,用三维定位器仔细调节碳工作电极使其与毛细管口对准,从而达到有效的连接。每一次实验前毛细管分别用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液、二次蒸馏水和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液各清洗 3min,然后用缓冲溶液冲洗直到毛细管中的电流达到稳定为止,以保证电渗流的重现性。

最佳实验条件为:检测电压为 0.9V;缓冲溶液为 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ 体系 (pH 7.4);分离电压为 15kV;电动进样时间 6s (在 15kV 时)。

2.5 当归多糖的提取

首先精确称取一定量的当归粉末,分别用丙酮洗涤、1:1 的乙醇-乙醚溶液在沸水中煮沸 2h 以除去色素。过滤,残渣在 $90\text{-}100^\circ\text{C}$ 的水中搅拌浸取 6h,重复三次。过滤,将滤液合并,加热浓缩到 150ml 左右,加入无水乙醇沉淀多糖。离心分离,所得沉淀物用 4:1 的氯仿-异戊烷溶液洗涤以除去所含蛋白质。低温冷冻干燥,得到当归多糖粗品。利用纤维素柱色谱法提纯得到纯的当归多糖。

2.6 水杨酸与 Fenton 体系中产生的羟自由基之间的反应

37°C , 在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲体系 (pH 7.4) 中依次加入 5ml 的 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ 、 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 、 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ EDTA}$ 、 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸钠 (H_2O_2 和 Fe^{2+} 溶液要立即用事先除去气泡的水配置并且亚铁盐要事先加入络合剂 EDTA), 混合反应一个小时后,将溶液稀释 50 倍,利用电动进样进行分离检测。

3. 结果和讨论

3.1 安培检测条件

由于 2,3-DHBA, 2,5-DHBA 和水杨酸的分子结构中具有电化学生活性的羟基,能够在碳电极表面被氧化而产生电流响应。Fig. 2 是在 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸盐的溶液中浓度为 $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,3-DHBA, 2,5-DHBA 和水杨酸的循环伏安

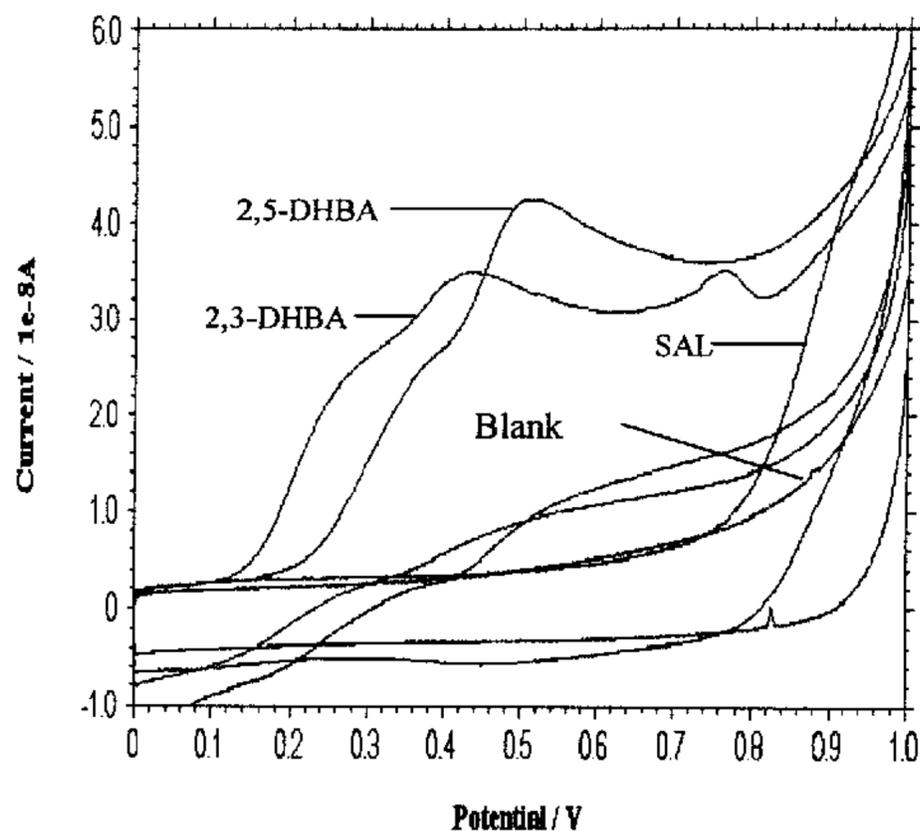


Fig. 2 Cyclic voltammograms of SAL, 2,3-DHBA and 2,5-DHBA with same concentration of $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ at carbon disk electrode in $0.02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ borate-HCl buffer (pH 7.4). Reference electrode: SCE; auxiliary electrode: platinum wire. Scan rate: 0.1 v/s.

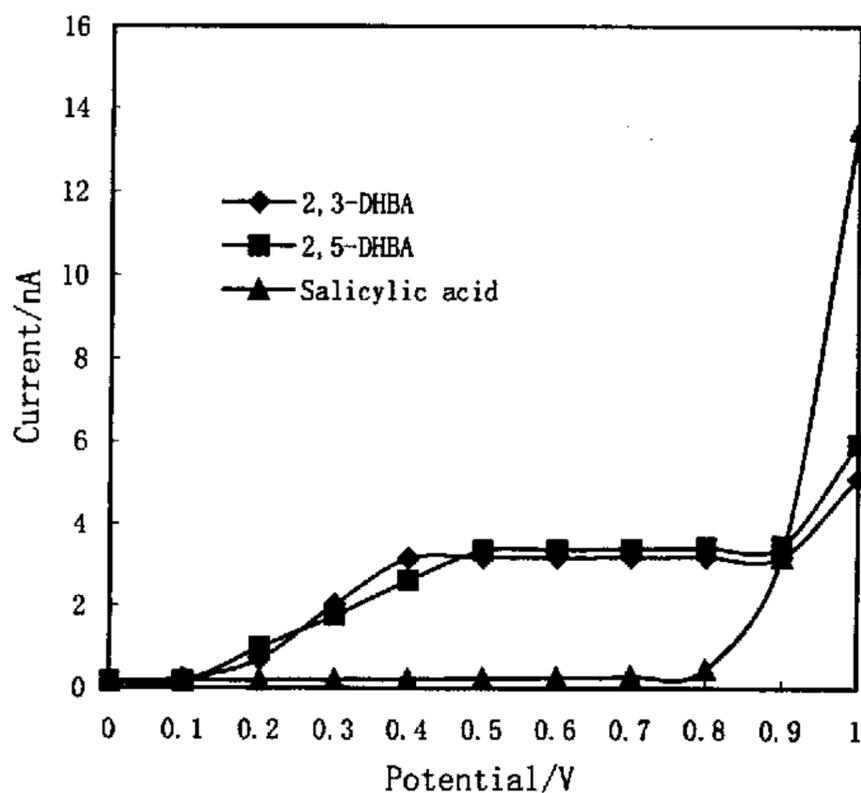


Fig. 3 Hydrodynamic voltammograms of SAL, 2,3-DHBA and 2,5-DHBA with same concentration of $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in CZE under different detection voltages

from 0 to +1.0 V. Other conditions as the optimum.

图。2,3-DHBA, 2,5-DHBA 的最大电流响应的电位分别在 0.41V 和 0.51V, 但是当外加的电压少于 0.78V 时, 水杨酸的电流响应比较小。Fig. 3 是三种分析组分的流体伏安图, 显示了在 0 V 到 1.0 V 的电压范围内, 三种分析组分通过毛细管电泳分离后的电流响应。可以发现三种物质的电流响应随着外加电压的增加而增大。为了保证 2,3-DHBA, 2,5-DHBA 和水杨酸的高灵敏度以及最佳的信噪比, 我们选择 0.9 伏为检测电压。

3.2 毛细管电泳分离条件

由于 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 是同分异构体从而有着相似的电离常数 ($pK_{a1(2,3-DHBA)}=2.94$, $pK_{a1(2,5-DHBA)}=2.98$), 在 CE 中它们表现为相似的电泳淌度, 因此在中性或者碱性缓冲溶液中不能分离。但是在硼砂缓冲溶液中, 因为 2,3-DHBA 有邻位羟基基团, 它能够和硼酸形成络合物从而有着较大的电离常数 (Fig. 4), 而 2,5-DHBA 不发生这个反应。所以在毛细管电泳中以硼砂为缓冲溶液可以实现 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的完全分离。由于水杨酸分子比 DHBA 分子少一个羟基, 可以根据它们不同的质荷比实现其完全分离。缓冲液的浓度对分离度有一定的影响, 当缓冲溶液的浓度增加时, 电渗流降低, 迁移时间延长。所以, 较低浓度的缓冲溶液更适合于减少迁移时间和增加灵敏度。本实验我们采用 $30\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂作为缓冲溶液。

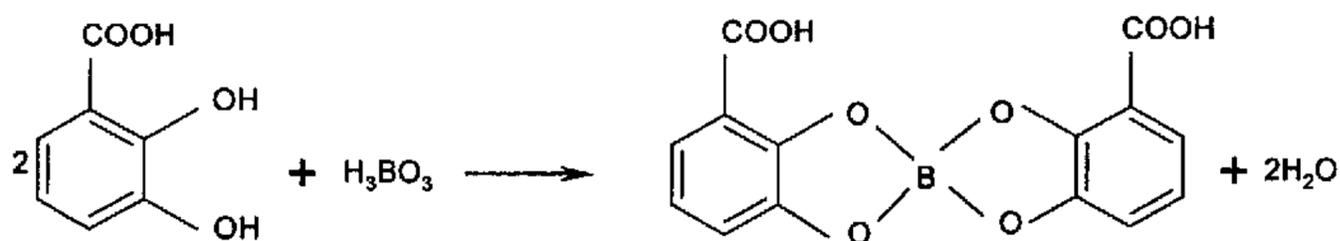


Fig. 4 Chemical reaction between 2,3-DHBA and boric acid.

pH 值是影响分离的最重要因素。改变缓冲液的 pH 值从 4.0 到 11.0, 实验结果如图 5 所示。pH 值在 4.0 到 6.0 之间, 2,3-DHBA、2,5-DHBA 的电流峰部分重合, 在 7.0 到 9.0 之间, 三种物质完全的分离, 但是随着 pH 值的增加它们的

电流响应降低且迁移时间明显增长。故实验中, 选择 pH 值为 7.4。该 pH 值由硼酸盐中加入一定量的盐酸得到。

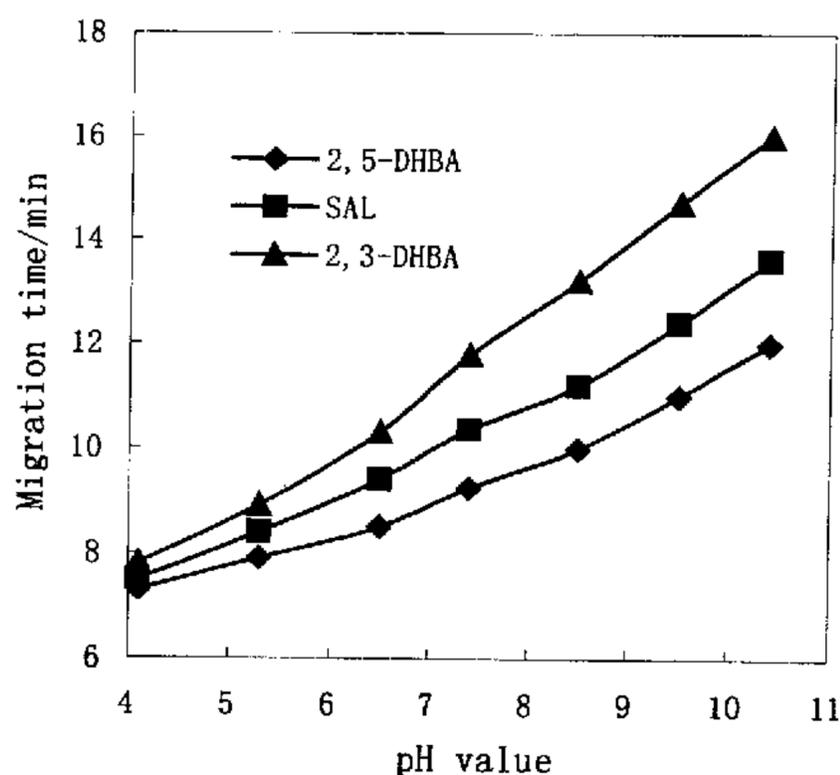


Fig. 5 Effect of buffer pH value on migration time of 2,5-DHBA, SAL and 2,3-DHBA

在分离电压为 10-22kV 的范围内, 可以发现毛细管电泳的分离效率随着分离电压的增加, 分析物的分离时间显著缩短并且它们相应的电流峰也变得尖锐。但是如果分离电压过高, 产生大量的焦耳热, 导致电流峰变宽从而降低分离效率。从综合考虑上述因素, 我们在实验中选择 15kV 作为分离电压。

实验采用电动进样。在 4s 到 12s 之间改变进样时间来探讨其对分离效率的影响。实验发现当进样时间延长, 电流响应增加。但当进样时间超过了 10s, 待测物的峰形就会明显的增宽。所以, 实验选择进样时间为 6s。

在选定条件下, 相同浓度 ($1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 2,3-DHBA, 2,5-DHBA 和水杨酸标准溶液的电泳图如 Fig. 6(a) 所示: 1 2,5-DHBA; 2 SAL; 3 2,3-DHBA.

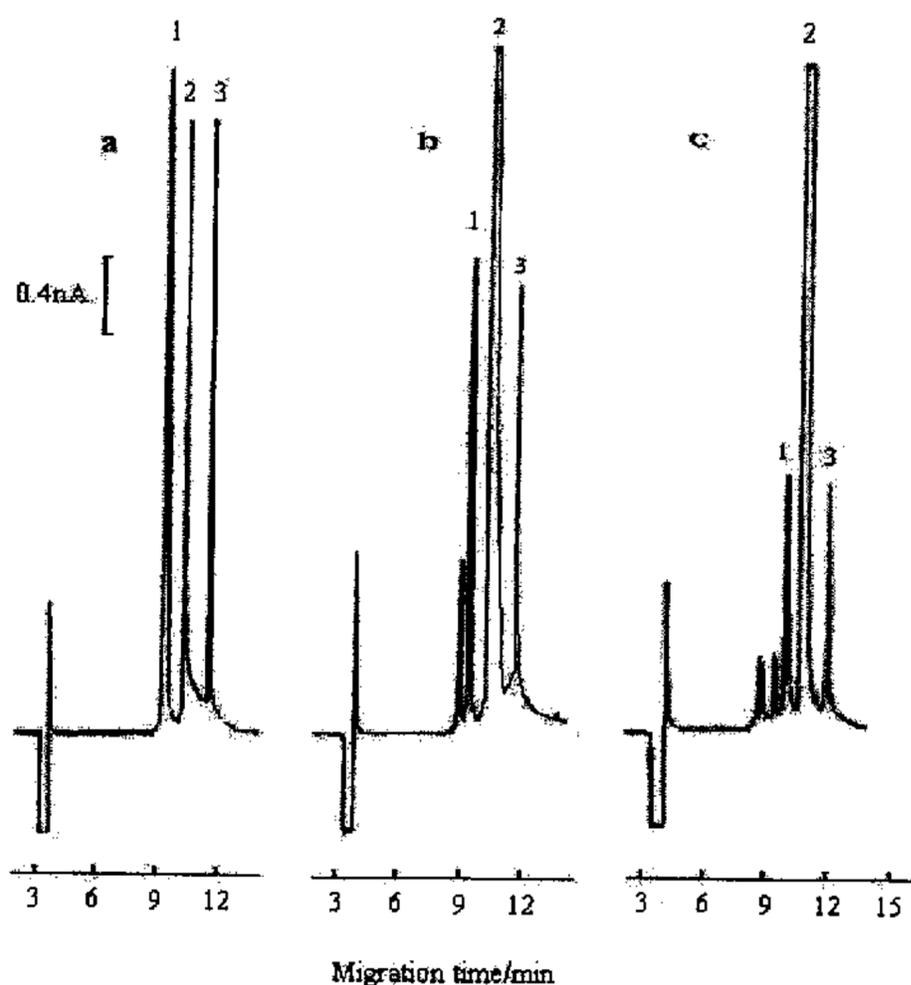


Fig. 6 Electropherograms of standard SAL, 2,3-DHBA and 2,5-DHBA with same concentration of $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (a), products of Fenton reaction (b), and products of Fenton reaction when 1.0 mg/ml angelica polysaccharide was present (c) under the optimum conditions of CZE-ED.

3.3 线性范围、重现性和检测限

在最佳条件下分析了一系列浓度从 $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,3-DHBA, 2,5-DHBA 和水杨酸标准溶液, 结果见 Tab. 1。三种分析组分的线性范围从 1.0×10^{-7} 到 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $2.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N=3$)。以上结果说明该法是灵敏度高。Tab. 2 是相同浓度 ($1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的标准溶液在相同条件下重复测定 6 次后的迁移时间和电流峰的相对应的标准偏差。所有的 RSD 都小于 2%, 说明测定方法具有的良好重现性。

Table 1 Regression equation and detection limit^a

Analyte	Regression Equation	Linear Range	R ²	Detection Limit
	I(nA); C(mol·l ⁻¹)	(mol·l ⁻¹)		(mol·l ⁻¹)
2,3-DHBA	I=3.12×10 ⁶ C+0.08	1.0 × 10 ⁻⁷ ~1.0×10 ⁻⁴	0.9989	2.0 × 10 ⁻⁸
2,5-DHBA	I=3.42×10 ⁶ C+0.06	1.0 × 10 ⁻⁷ ~1.0×10 ⁻⁴	0.9975	2.0 × 10 ⁻⁸
SAL	I=3.10×10 ⁶ C+0.10	1.0 × 10 ⁻⁷ ~1.0×10 ⁻⁴	0.9988	2.0 × 10 ⁻⁸

^a Detection limit was estimated according to three times of signal-noise.

Table 2 Precision of the present method (n=6)^a

Analyte	Migration time (Min)		Peak height (nA)	
	Average	RSD (%)	Average	RSD (%)
2,5-DHBA	9.24	0.8	3.48	0.9
SAL	10.36	1.0	3.20	1.5
2,3-DHBA	11.78	1.0	3.21	1.2

^a The concentrations of all the two analytes were 5.0×10⁻⁶ mol·l⁻¹.

3.4 当归多糖对羟自由基的清除能力

按照实验部分的方法,在 Fenton 体系中加入当归多糖。Fig. 6(b)是 Fenton 反应体系后的毛细管电泳图, Fig. 6(c)是当加入 1.0 mg ml⁻¹ 当归多糖到 Fenton 反应系统的毛细管电泳图。比较 Fig. 6(b)和(c),发现 2,5-DHBA 和 2,3-DHBA 的电流峰值明显减小了。因此,当归多糖对羟自由基的消除百分比可以根据 Fenton 反应体系中比较 2,5-DHBA 和 2,3-DHBA 的最初电流响应和加入不同浓度的当归多糖的电流响应差异来计算。实验结果如 Tab. 3 所示。

Table 3 Free hydroxyl radical scavenging ratio of angelica polysaccharide

ASP concentration (mg/ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
OH· scavenging percentage (%)	13.6	24.2	32.1	38.4	44.9

4 结论

实验表明毛细管电泳-安培法 (CZE-AD) 是一种简单灵敏的间接检测羟自由基的方法。毛细管电泳-安培法 (CZE-AD) 检测水杨酸、2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的最佳条件是检测电压 0.9V、缓冲溶液 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ (PH7.4)、分离电压 15kV、电动进样时间 6s (15kV)。在最佳条件下, 水杨酸、2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 能在 15min 内实现完全分离, 线性范围为 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外, 该方法可用于研究当归多糖的对羟自由基的清除能力。实验结果表明, 毛细管电泳-安培法 (CZE-AD) 方法在检测羟自由基和鉴定自由基清除剂的清除能力方面具有一定的实用性。

5 参考文献:

1. B. Halliwell, J.M. Gutteridge, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 1.
2. B.Halliwell, *J. Br. Exp. Pathol.* 70 (1989) 737.
3. H. B.Michaels, J. W.Hunt, *Radiat. Res.* 56 (1973) 57.
4. J.E. Repine, R.B. Fox, E.M. Berger, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 7094.
5. L. Sarma, T.P. Devasagayam,, H.Mohan, J.P. Mittal, P.C. Kesavan, *Int. J. Radiat. Biol.* 69 (1996) 633.
6. J.J. Hageman, A.Bast, N.P.E. Vermeulen, *Chem.-Biol.Interactions.* 82 (1992) 243.
7. N.J. Stokes, et al., *Chemosphere*, 28 (1994) 999.
8. S. Stolc, et al., *Free Radical Biol. Med.* 20 (1996) 89.
9. D.R.. McCabe, T.J. Maher, I.N. Acworth, *J. Chromatogr. B* 691 (1997) 23.
10. V.Bergh, I.Vanhees, R.De-Boer, F. Compernelle, C.Vinckier, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 135.
11. T.H. Tsai, F.C. Cheng, L.C. Hung, C.F. Chen, *J. Chromatogr. B* 734 (1999) 277.
12. J.M. Duine, F. Floch, C. Cann-Moisson, P. Mialon, J. Caroff, *J. Chromatogr. B* 716

- (1998) 350.
13. K. Hiramoto, A. Nasuhara, K. Michikoshi, T. Kato, K. Kikugawa, *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutag.* 395 (1997) 47.
 14. F. Vargas, I. Martinez-Volkmar, J. Sequera, H. Mendez, J. Rojas, G. Fraile, M. Velasquez, R. Medina, *J. Photochem. Photobiol. B* 42 (1998) 219.
 15. B. Ferger, S. Rose, A. Jenner, B. Halliwell, P. Jenner, *Neuroreport*. 12 (2001) 1155.
 16. G. Yildiz, A.T. Demiryurek, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 39 (1998) 179.
 17. K.I. Ohno, H. Arakawa, R. Yoda, M. Maeda, *Luminescence*. 14 (1999) 355.
 18. Y. Yoshiki, T. Kahara, K. Okubo, K. Igarashi, K. Yotsuhashi, *J. Biolumin. Chemilumin.* 11 (1996) 131.
 19. A. Wang, Y. Fang, *Electrophoresis*. 21 (2000) 1281.
 20. R.P. Baldwin, *Electrophoresis*. 21 (2000) 4017.
 21. F.M. Matysik, *Electroanalysis*. 12 (2000) 1349.
 22. N. Gokoren, M. Tuncel, *Pharmazi*. 52 (1997) 726.
 23. S.A.J. Coolen, F.A. Huf, J.C. Reijenga, *J. Chromatogr. B* 717 (1998) 119.
 24. M.J. Sanz, M. Ferrándiz, M. Cejudo, M.C. Terencio, B. Gil, G. Bustos, A.Úbeda, R. Gunasegaran, M.J. Alcaraz, *Xenobiotica*. 24 (1994) 689.
 25. Y. Fang, X. Fang, J. Ye, *Chem. J. Chin. Univ.* 16 (1995) 1514.
 26. C. Fu, L. Song, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta* 399 (1999) 259.
 27. Q. Wang, F. Ding, H. Li, P. He, Y. Fang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1507.

第二节 毛细管瞬时等速电泳-安培检测法 及其间接测定自由基捕获产物的研究

摘要

毛细管电泳是一种高效的分离技术,但是由于进样量较小,其浓度检测灵敏度低于高效液相色谱。等速电泳是毛细管电泳特有的一种提高灵敏度的方法。本文用水杨酸捕获羟自由基的产物-2,3-二羟基苯甲酸作为分析对象,探讨了毛细管瞬时等速电泳-安培检测法的适宜条件。实验中选用 p-甲基苯甲酸为 2,3-二羟基苯甲酸的前导电质,运行液被作为后导电质。研究了前导电质、运行缓冲溶液、共存离子的有关参数如浓度、pH、进样时间等对富集倍数的影响。在最佳瞬时等速电泳条件下,2,3-二羟基苯甲酸的灵敏度提高了近 20 倍,检测限达到 10^{-9} mol/l。实验结果显示该方法可用于间接检测活体内的羟自由基。

关键词: 羟自由基; 毛细管瞬时等速电泳; 安培检测;

1 前言

在过去的二十年里,毛细管电泳由于具有分离效率高、毛细管简单便宜、样品消耗小、仪器简单等优点而在理论和应用方面都得到了快速的发展。毛细管电泳是一种高效的分离手段,几乎可以完成以前由 HPLC 进行的所有分离工作。但是由于 CE 的进样量比 HPLC 低很多,用 UV 检测器时光程太短,所以当使用相同的检测器时灵敏度比 HPLC 低[1]。

但是 CE 的两个特别的性质-场放大进样和等速电泳可将 CE 的灵敏度提高数千倍[2-5]。当两者联用,灵敏度会大幅度提高甚至可以达到以前的一百万倍。另外,此浓缩处理方法也比微固体萃取和离子交换等方法更简单、经济和准确。P. Bocek, S. Terabe 及其他研究者研究了一些瞬时等速电泳的模型[6-12]。瞬时等速电泳的主要机理是在同一根毛细管内,稀释的分析物可被高迁移率的前导液或低迁移率的后导液堆积或者同时被两者堆积。在毛细管中首先充入电泳迁移速度高于样品中任何离子的背景电解质溶液(称为前导电质 L),然后注入样品溶

液,紧接着再充入第二种背景电解质溶液(该溶液的电泳迁移速度小于样品中任何离子,称为后导/终止电解质 T)。施以高压后,样品中离子依据各离子的电泳迁移速度在样品溶液-背景电解质溶液的界面发生分离。随着样品各组分的分离,每个样品组分所分得的电场发生变化。电泳迁移速度大的离子,电导较大,分得的电场较小,电泳迁移速度逐渐降低,至平衡时,样品各组分均以与前导电解质相同的速度在毛细管中移动,形成等速电泳。瞬时等速电泳常常与其他检测方法联用,其中包括电导分析[13, 14]、紫外分析[15, 16]、质谱分析[17, 18]、激光诱导荧光分析[19]、拉曼光谱[20]、X 射线[21]等。因为紫外和电导分析的灵敏度较低,电泳谱图的延长也对定量分析产生影响。而且当目标分析物区的宽度小于检测窗口时,紫外分析法就不能被使用。质谱、红外、激光诱导荧光、拉曼光谱的仪器非常昂贵。综合考虑灵敏度和仪器成本等因素,安培检测与瞬时等速电泳联用是完全可行的,甚至有可能比紫外和电导更适合。因为在样品或前导/后导液中共存的无电化学活性的成分会在分析物的分离峰产生不连续的电泳谱图,更容易进行定性和定量分析。但是非常遗憾,就我们所知,目前此方法只有 D. Kaniansky 有所尝试[22]。

本文用水杨酸捕获羟自由基后的产物 2,3-二羟基苯甲酸作为分析物来讨论毛细管瞬时等速电泳—安培检测法的最佳分析条件。生物学认为在食物的摄入过程中由于酶的作用,乙酰水杨酸转化成水杨酸,水杨酸可以捕获体液中的羟基自由基生成 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA(见图 1) [23]。因为 2,5-DHBA 也可以由 P₄₅₀ 酶形成,所以只有 2,3-DHBA 能作为羟自由基的生物标记物[24]。HPLC—ED 可以 2,3-DHBA 作为生物标记物间接检测生物体内的羟自由基[25-27]。可是当用于检测活体内的羟基自由基时,简单而又有效的 CE—AD 检测法达不到要求的灵敏度。

本实验中选用 p-甲基苯甲酸为 2,3-二羟基苯甲酸的前导电解质,运行缓冲溶液为后导电解质,研究了前导电解质、运行缓冲溶液,共存离子的有关参数如浓度、PH、进样时间等对毛细管瞬时等速电泳-安培检测的影响,进而讨论了等速电泳-安培检测的一些重要因素。在最佳瞬时等速电泳条件下,2,3-二羟基苯甲酸的灵敏度提高了近 20 倍,检测限达到 10^{-9} mol/l。实验结果显示该方法可用于间接检测活体内的羟自由基。

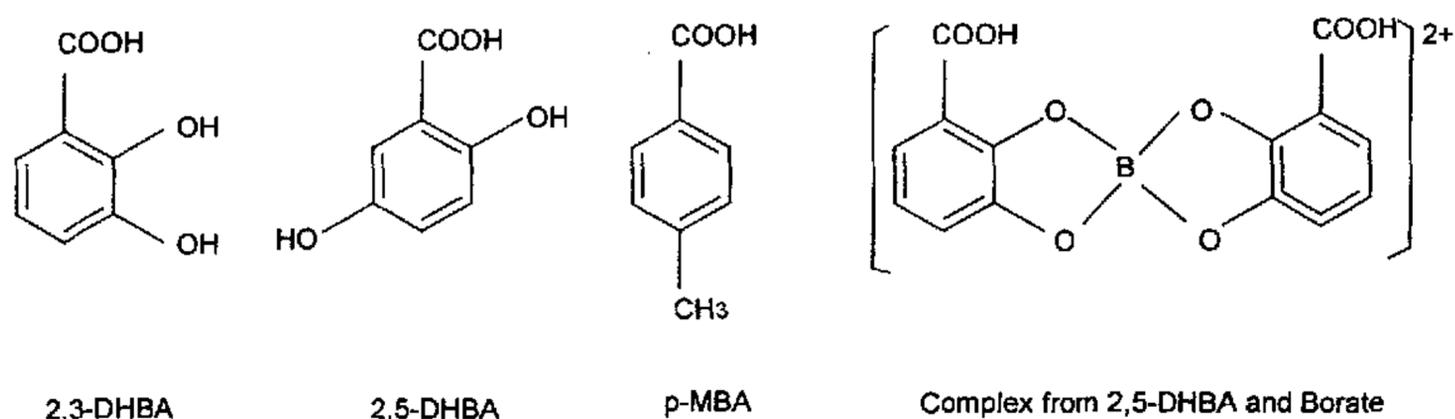


Fig. 1 Structures of 2,3-DHBA, 2,5-DHBA, p-MBA and Complex from 2,5-DHBA and Borate

2 实验部分

2.1 仪器

毛细管电泳-安培检测自组装系统[28, 29]。高压电源 ($\pm 30\text{kV}$) (上海原子核研究所); 石英毛细管 ($25\ \mu\text{m}$ I. D., $360\ \mu\text{m}$ O. D., $75\ \text{cm}$ long, Polymicro. Tech. Ltd., USA); CH-2 毛细管电泳安培检测计 (中国江苏江分电化学仪器厂); 记录仪 (Model XWT-204, 中国上海大华仪器公司); CHI660 电化学分析仪 (CH Instruments, USA); 电化学检测装置使用三电极体系, 碳工作电极 ($\Phi 300\ \mu\text{m}$), 饱和的甘汞参比电极 (SCE) 和铂对电极。

2.2 试剂部分

所用试剂均为分析纯试剂。2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 购自 Sigma 化学公司。p-甲基苯甲酸、次硫酸和 EDTA 购自上海试剂进出口公司。 $1.0 \times 10^{-3}\ \text{mol l}^{-1}$ 的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 储备液用二次蒸馏水稀释, 实验时用运行液稀释到所需浓度。 $0.1\ \text{mol l}^{-1}$ 的 p-甲基苯甲酸钠由 p-甲基苯甲酸与氢氧化钠中和得到。

实验之前, 所有溶液都用 $0.45\ \mu\text{m}$ 聚丙烯滤膜过滤, 然后超声 $5\ \text{min}$ 除去气体。

2.3 操作步骤

2.3.1 碳工作电极的制备

碳电极的制备参照文献[30]。在使用之前, 碳电极表面先用金相砂纸抛光再用氧化铝粉打磨, 然后放在二次水中超声 $3\ \text{min}$ 清洁表面。

2.3.2 电泳操作条件

在毛细管电泳实验之前,将三个电极固定在电解池上的相应孔中,用三维定位器仔细调节碳工作电极使其与毛细管口对准,从而达到有效的接合。每一次实验前毛细管分别用 0.5 mol/l 的盐酸溶液、二次蒸馏水和 0.2 mol/l 的氢氧化钠溶液各清洗 3min,然后用缓冲溶液冲洗直到毛细管中的电流达到稳定为止,以保证电渗流的重现性。

参照第一节毛细管区带电泳的实验方法,测得最佳实验条件为:检测电压为 0.7V;缓冲溶液为 12.5 mmol l⁻¹Na₂B₄O₇-25 mmol l⁻¹NaH₂PO₄;分离电压为 15kV;前导液为 40 mmol l⁻¹p-甲基苯甲酸钠 (pH 9.8);前导液电动进样时间 30s;分析组分电动进样时间为 30 s。

3. 结果和讨论

3.1 前导电解质与后导电解质的选择

在一般的毛细管区带电泳—安培检测条件下,2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 能被完全分离并在碳圆盘电极上产生相应的响应电流。可是 DHBA 的灵敏度只有 2×10⁻⁸ mol/L,在活体羟基自由基检测中需要进一步提高。

根据等速电泳的基本原理,2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 能被前导电解质 L 和后导电解质 T 堆集,它们的有效迁移速率应该符合以下原则: $\bar{u}_L > \bar{u}_{2,5\text{-DHBA}} > \bar{u}_{2,3\text{-DHBA}} > \bar{u}_T$ 。但是对于安培检测,如果选用的 L 和 T 符合以上顺序,由于 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的响应电流峰之间距离狭窄,两峰之间会重叠。所以,为了只检测 2,3-DHBA 这一生物学目标和考虑到安培检测性质的特点,L 和 T 应该符合以下原则: $\bar{u}_{2,5\text{-DHBA}} > \bar{u}_L > \bar{u}_{2,3\text{-DHBA}} > \bar{u}_T$ 。当然,L 必须是无电化学活性的。

弱酸的有效迁移率通过他们的离解常数和分子量得到。由于运行液的影响,如果仅仅根据有限的资料所提供的数据,寻找合适的前导电解质或后导电解质将非常烦琐。根据我们的理解,如果将前导/后导电解质的范围限制在其结构与分析对象相似的范围,将会避免过多的尝试。

由于 p-甲基苯甲酸的结构同 2,3-DHBA 相近,其迁移率在 2,3-DHBA 和

2, 5-DHBA 之间, 只会对 2, 3-DHBA 产生堆集作用, 因此在本次实验中被选为前导电解质 L。检测电压为 0.7V 时, p-甲基苯甲酸在碳电极上不产生响应电流, 这对安培检测来说非常重要。因为如果 L 电解液有电化学活性, 由于 L 的浓度更大, 其电流响应峰会与目标分析物重叠甚至完全覆盖。实验还发现高浓度的 p-甲基苯甲酸会对 2, 5-DHBA 起反堆积效果。

因为缓冲液 $12.5 \text{ mmol l}^{-1} \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $25 \text{ mmol l}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 的迁移率小于 2, 3-DHBA, 所以实验用缓冲液作为 T。

3.2 前导电解质浓度的影响

由实验发现, L 的浓度很大程度上影响着 2, 3-DHBA 的灵敏度和保留时间。如图 2 所示, 当缓冲液为 $12.5 \text{ mmol l}^{-1} \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $25 \text{ mmol l}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 而且浓度不变时, 如果逐渐改变 L 的浓度, 2, 3-DHBA 响应电流也相应的改变。当 L 的浓度

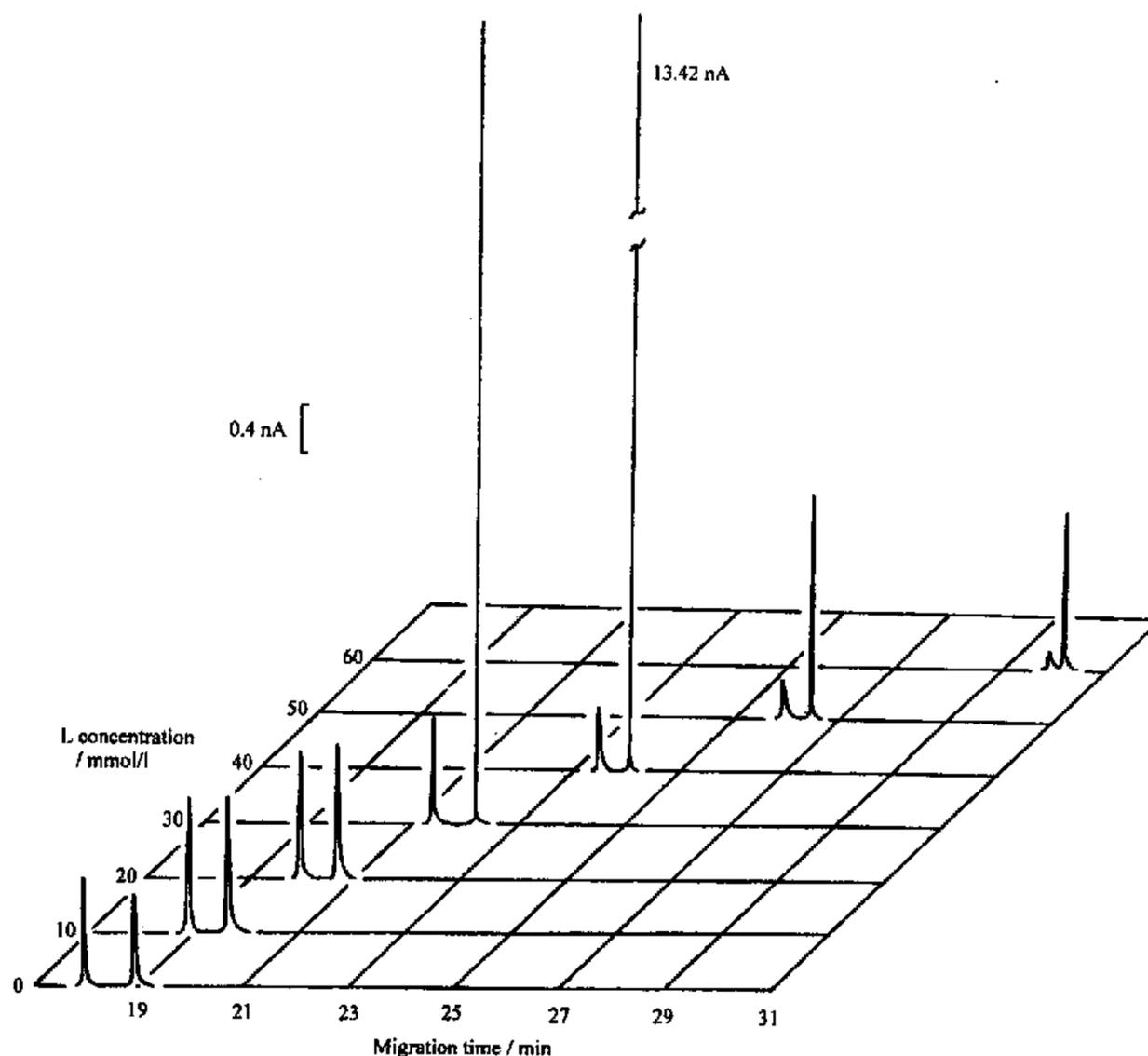


Fig. 2 Effects of L concentration on current response and migration time

在 $25 \sim 45 \text{ mmol l}^{-1}$ 范围内, 2, 3-DHBA 的响应电流也提高 10~20 倍。可是, 当 L 的浓度过高, 2, 3-DHBA 响应电流的提高会明显降低。在所用 L 浓度范围内, 2, 5-DHBA 的响应电流随着 L 浓度的增大而逐渐减小, 显示此时 L 起着反累积的作用。这个现象是由有效迁移率对浓度的依赖导致的。因为 L 的浓度大大高于 DHBA, 其有效迁移率改变的比 DHBA 更大。

L 的浓度对瞬时等速电泳的另一个影响是保留时间。由图 2 可以明显看出随着 L 浓度增大保留时间也延长。

通过进一步的实验发现 2, 3-DHBA 响应电流的提高程度取决于 L 和运行液的浓度比。当 L 的浓度在 $50 \sim 90 \text{ mmol/l}$ 内, 运行液的浓度加倍, 2, 3-DHBA 响应电流也增大。

3.3 前导电解质 pH 值的影响

因为在酸性条件下, L 是不溶于水的, 所以我们研究了在 pH 7.5 ~ 12.2 范围内 L 的 pH 值对 2, 3-DHBA 响应电流的影响。实验发现在 pH 为 7.5~10.5 时, 其变化基本不影响响应电流。但是当 pH 大于 11 时电流突然下降。本实验中选择 pH 为 9.8, 这由 p-甲基苯甲酸用氢氧化钠等摩尔反应得到的。

3.4 L 进样时间的影响

通过改变进样时间 15 s ~ 120 s 来研究进样时间的影响。结果发现 L 的进样时间严重影响了 2, 3-DHBA 响应电流。这也说明 L 的浓度是主要的影响因素。本实验中采用 30s 作为 L 的进样时间。

3.5 高浓度共存物质的影响

为了研究生物样品中的微量成分, 共存大组分的影响在瞬时等速电泳中非常重要。因为在动物的体液中氯化钠的含量最高, 所以本实验探究氯化钠浓度的影响。由图 3 发现 2, 3-DHBA 响应电流随着氯化钠浓度的增加而增大。另一个现象是 2, 3-DHBA 的保留时间随着氯化钠浓度的变化产生明显的变化, 2, 3-DHBA 的保留时间随着氯化钠浓度的增加而逐渐缩短。为了消除共存大组分的影响, 一种方法是稀释样品, 但是此方法不可行, 因为分析物的浓度已经非常低了。另一种方

法是在标准分析液中加入相似浓度的氯化钠以抵消此影响。进行生化样品分析时,可采用后一种方法,即在运行液中加入 0.15 mol/l NaCl。

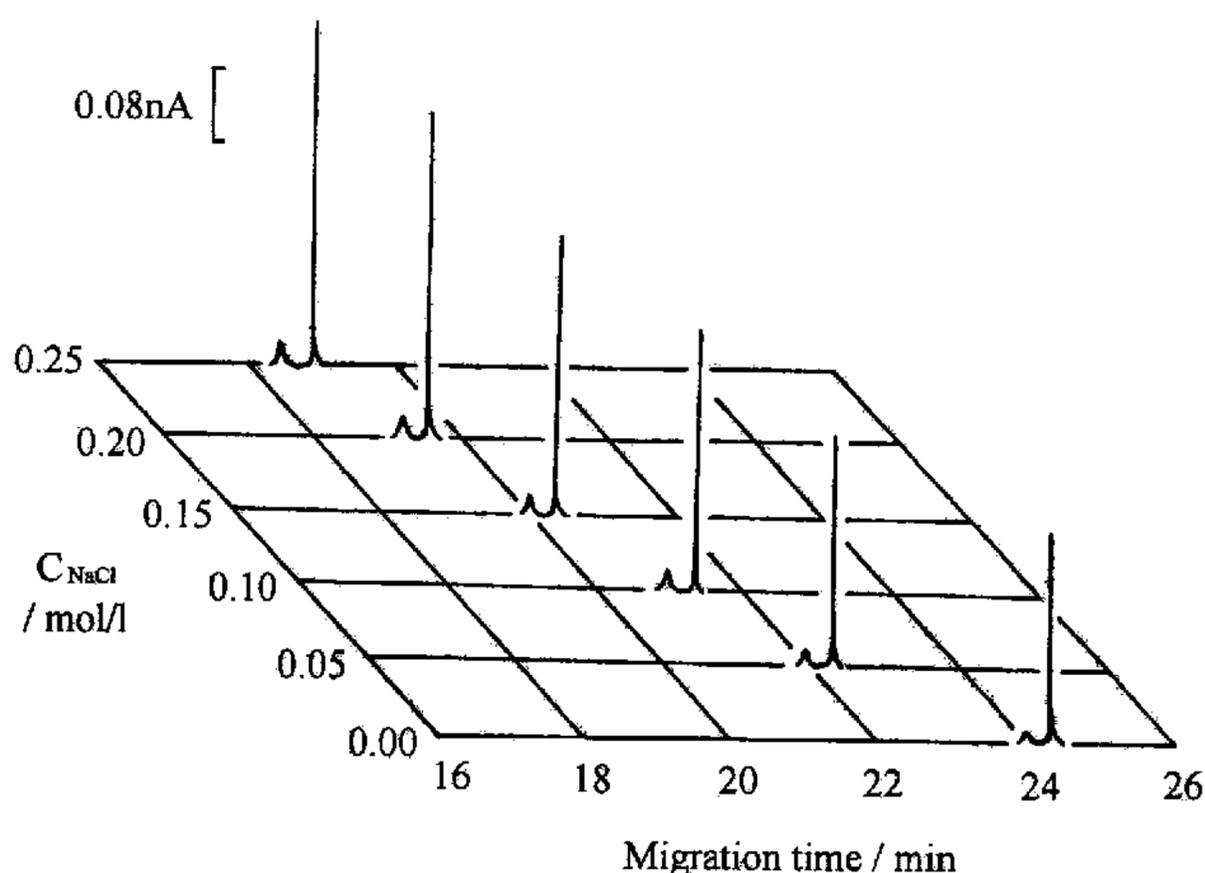


Fig. 3 Effect of NaCl concentration on current response and migration time

3.6 进样顺序的影响

实验中的进样顺序是 L 在标准样品之前进样。如果此顺序颠倒, 2, 3-DHBA 和 2, 5-DHBA 的响应峰都会非常低且宽。

3.7 线性范围和检测限

在最佳条件下分析了一系列浓度从 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准 2, 3-DHBA 溶液。回归方程是 $I(\text{nA}) = 5.72 \times 10^7 C(\text{mol/l}) + 0.001$ ($R^2 = 0.9885$), 线性范围从 1.0×10^{-7} 到 $5.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N=3$)。以上得到的结果显示, 同一般的毛细管区带电泳相比, 此方法测定 2, 3-DHBA 的灵敏度提高了 20 倍。在相同条件下重复测定 $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 3-DHBA 6 次, 保留时间和峰电流的相对标准偏差分别是 3.0% 和 8.0%, 这些都能很好的说明这个测定方

法具有的较好重现性。

4 结论

本文用水杨酸捕获羟自由基的产物-2,3-二羟基苯甲酸作为分析对象,探讨了毛细管瞬时等速电泳—安培检测法的适宜条件。在安培检测中,由于前导和后导电解质的浓度很高,所以必须是无电化学生活性的,否则样品的电流响应峰就会被掩盖。前导电解质的有效淌度必须略大于被测单一组分的有效淌度,否则会导致多个电活性组份响应峰的重叠。在最佳瞬时等速电泳条件下,2,3-二羟基苯甲酸的灵敏度提高了近20倍,检测限达到 10^{-9} mol/l。实验结果显示该方法的灵敏度可用于间接检测活体内的羟基自由基。

5 参考文献

1. Marek Urbánek, Ludmila Křivánková, Petr Boček, Electrophoresis 2003,24,466-485.
2. Burgi, D.S., Chien, R.L., Anal. Chem. 1991,63,2042-2047;
3. Burgi, D.S., Chien, R.L., Anal. Chem. 1992,64,1046-1050;
4. Ludmila Křivánková, Gebauer, P., Boček, P., electrophoresis, 2002, 23,1833-1843;
5. Locke, S., Figeys, D. Anal. Chem. 2000, 72,2684-2689;
6. Gebauer, P., Boček, P., anal. Chem. 1997,69,1557-1563;
7. Křivánková, L., Procházková, p., Boček, P. J. of Chromatogr. A. 1999, 838, 55-70;
8. Quirino, J.P., Terabe, S., Anal. Chem. 2000, 72, 1023-1030;
9. Quirino, J.P., Terabe, S., Science 1998, 282, 465-468;
10. Quirino, J.P., Terabe, S., J. Chromatogr. A 2000,892, 187-194;
11. Sounart, T. L., Baygents, J. C., electrophoresis, 2000, 21,2287-2295;
12. Potoček, B, Chmela, E., Maichel, B., Tesařová, E., Kenndler, E., Gaš, B., Anal. Chem. 2000, 74, 74-80;
13. Buzinkaiová, T., Polonsky, J., electrophoresis 2000, 21, 2839-2841;
14. Čakrt, M., Hercegová, A., Leško, J., Polonsky, J., Sádecká, J., Skačáni, I., J.

- Chromatogr. A 2001, 916, 207-214.
15. Procházková, p., Křivánková, L., , Boček, P., electrophoresis, 1998, 19, 300-304;
 16. Blatny P., Kvasnička, F., Kenndler, E., J. Chromatogr. A 1997, 757, 297-302
 17. Zhang B., Liu, H., Karger, B. L., Foret, F., Anal. Chem., 1999, 71, 3258-3264;
 18. Larsson, M., Lutz, E. S. M., Electrophoresis 2000, 21, 2851-2858
 19. Church, M. N., Spear, J. D., Russo, R. E., Klunder, G. L., Grant, P. M., Andresen, B. D., Anal. Chem. 1998, 70: 2475-2480
 20. Li, H. M., Walker, P. A., Morris, M. D., J. microcol. Sep. 1998, 10, 449-453
 21. Hirokawa, T., Nishimoto, K., Jie, Y., Ito, K, Nishiyama, F, Ikuta, N., Hayakawa, S., J. Chromatogr. A, 2001, 919, 417-426
 22. D. Kaniansky, P. Havaši, J. Marák, R. Sokolík, Journal of chromatography, 1986, 366, 153-160
 23. Leonards, J. R., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962, 110: 304-308
 24. Ingelman-Sundberg, M., Kaur, H., Terelius, Y., Pearson, J. O., Halliwell B., Biochem. J., 1991, 276:753-757
 25. Charles Coudray, Alain Favier, Free Radical Biology & Medicine, 2000, 29: 1064-1070;
 26. T.H. Tsai, F.C. Cheng, L.C. Hung, C. F. Chen, J. Chromatogr. B, 1999, 277, 734;
 27. S. R. Powell, D. Hall, Free Radic. Biol. Med. 1990, 9: 133
 28. Y. Fang, X. Fang, J. Ye, Chem. J. Chin. Univ. 16 (1995) 1514.
 29. C. Fu, L. Song, Y. Fang, Anal. Chim. Acta 399 (1999) 259.
 30. Q. Wang, F. Ding, H. Li, P. He, Y. Fang, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2003) 1507.

第四章 胶束电动毛细管电泳-安培检测法同时测定食品中的活性胺及其前体氨基酸的研究

摘要

本文以碳圆盘电极为工作电极,用胶束电动毛细管-安培检测法(MECC-AD)同时分离和检测了食品中生物活性胺及其前体氨基酸,即色胺、酪胺、色氨酸和酪氨酸。所建立的方法简单、可靠、重现性较好。分离和检测的最佳条件是:含 $0.03\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 十二烷基硫酸钠(SDS)的 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)~氢氧化钠(NaOH)缓冲溶液(PH 10.35)作为运行缓冲液;分离电压为20kV;检测电位为+0.80V(Vs. SCE)。在优化条件下,色胺、酪胺、色氨酸和酪氨酸得到完全分离,在三个数量级范围内,峰电流与待测物呈良好的线性关系,检测限(S/N=3)达到 $1.0\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将建立的方法用于实际样品米酒的测定,测定结果令人满意。

关键词:胶束电动毛细管电泳;安培检测法;生物活性胺;氨基酸

1 引言

生物活性胺在很多人类生理活动中都起着重要的作用,但是如果在食物中的含量过高,会导致一些类似中毒症状的疾病,例如头痛、恶心、郁闷、高血压、精神分裂症、心悸等。其中,酪胺是引起偏头痛和类似注射迷幻药的症状的主要因素[1]。生物活性胺除了可以在人、植物和微生物的正常新陈代谢活动中产生和消失以外,还能由前体氨基酸的微生物获得。一旦生物活性胺形成,就很难通过低热灭菌或者蒸煮的方法破坏。因此,严格控制食物在加工过程中的环境从而尽可能降低生物活性胺的聚集是非常重要的。为了检测在不同环境因素的影响,应确定生物活性胺及其前体氨基酸的定量关系。正因如此,很有必要建立一个可靠而又方便的方法同时检测食物中可能同时存在的生物活性胺及其前体氨基酸。

用于机体组织和食品中活性胺检测的方法已有报道[2~4]。比如气相色谱法[5],离子交换色谱法[6]和高效液相色谱法(HPLC)[7~9]。近些年来,毛细管电泳法作为一种简单、方便、高效的分离手段,已广泛应用于食品分析中[10~13]。

UV, LIF, MS常常作为检测方法和毛细管电泳法一起使用。UV检测法虽然简单,但是其检测限只达到ppm级;LIF检测法非常的灵敏,但是仪器昂贵并且还有包括柱前/后衍生等复杂的过程;MS的仪器也很昂贵。电化学检测法由于具有高灵敏度、价格便宜、操作简单方便的优点及对小尺寸毛细管的兼容性,非常适合同毛细管电泳联用。而采用毛细管电泳-安培检测方法来分离和检测生物活性胺报道不多。

本文首次建立了用胶束电动毛细管电动色谱-安培检测法同时分离和测定米酒样品中的两种生物活性胺及其前体氨基酸的方法。在MECC中,SDS的加入能够明显的提高氨基酸的分离度。在 10^{-6} ~ 10^{-3} mol·L⁻¹浓度范围内,这四种分析物有很好的线性关系。在三倍标准偏差的情况下,四种分析物的检出限能够低至 10^{-7} mol·L⁻¹,确保了在食物的发酵和变质过程中对生物活性胺及其前体氨基酸的监测的实用性。这种方法也成功的应用于米酒的分析并得到了满意的结果。该实验表明该法简单可靠、方便,并在生物活性胺及其前体的生物研究领域有很大的潜力。

2 实验部分

2.1 仪器

自制毛细管电泳-安培检测装置[15]。高压电源 0 -30 kV (上海原子核研究所)。在CHI630电化学系统上进行循环伏安扫描(CH Instruments, USA)。所用石英毛细管尺寸为70 cm×25 μm ×360 μm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA),该毛细管外面包有聚亚酰胺涂层,以增加毛细管的柔韧性,防止断裂。整个毛细管及所有电极均被置于有机玻璃箱内,箱门处设置一保护开关,每当箱门打开,高压即被切断。

电解池是由铂丝辅助电极、SCE参比电极及直径为300μm铅笔芯制作的碳圆盘工作电极组成。

碳电极的制作:用直径为300μm的铅笔芯作电极材料,将此铅笔芯的一端固定在一根裸露的铜丝上,并保持接触良好,再将此铜丝焊在一根铜棒(长为5~7cm,直径为10~2mm)上。拉制一根玻璃吸管,长度约10cm,细端内径约为1mm,然后将铅笔芯一端引入玻璃吸管,并使其伸出吸嘴约0.3 cm长。最后用绝缘胶将

玻璃管两端封住，待胶风干后使用[16]。

2.2 试剂和样品处理

色胺、酪胺购自Sigma公司，色氨酸和酪氨酸由上海第二药厂提供。被测样品绍兴米酒产于浙江湖州环中酒厂(2002年6月1日)。其它试剂均为分析纯，实验水为二次蒸馏水。

标准样品溶解在二次蒸馏水中，储放在暗处，此标准样品能保存一天，实验时用缓冲溶液稀释至所需浓度。缓冲溶液为pH 10.35的0.02mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -NaOH混合液，在缓冲溶液中加入表面活性剂SDS，浓度为0.03 mol/l。

米酒样品以运行缓冲液按1/5体积比稀释后直接进样。所有溶液均用聚丙烯过滤膜(0.22 μm)过滤，超声脱气后使用。

2.3 实验方法

毛细管在使用前先用0.5mol/LNaOH洗涤10min，然后用0.05mol/LNaOH洗涤10min，最后用运行缓冲液洗涤10min。每隔5次进样后，要用0.05mol/LNaOH和运行缓冲液各运行4min，以保证获得稳定的电渗流。分离的最佳条件为：分离电压20kV，含0.03mol/LSDS的0.02mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -NaOH缓冲液(pH 10.35)，检测电位0.80V(vs.SCE)。实验温度为22℃左右。

3 结果与讨论

3.1 工作电极和工作电位的选择

在MECC—AD分析方法中，工作电极的选择是非常重要的。在本实验中，我们分别试用了碳圆盘电极和碳糊电极为工作电极，结果显示在相同的条件下，碳圆盘电极对四种被分析成分的反应比碳糊电极更好。因此，我们选择碳圆盘电极为工作电极。

图1给出了四种被分析物的循环伏安图。从图1中可以看出，在空白液(pH 10.35 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ~ NaOH缓冲液)中，0.00~1.00V电位范围内没有阳极峰。若分别添加四种被分析物于缓冲溶液中，则发现在0.59，0.41，0.45，和0.58 V附近分别有色胺、酪胺、色氨酸和酪氨酸的阳极峰，故当工作电位高于0.59V时，四种被分

析物都可以被氧化。

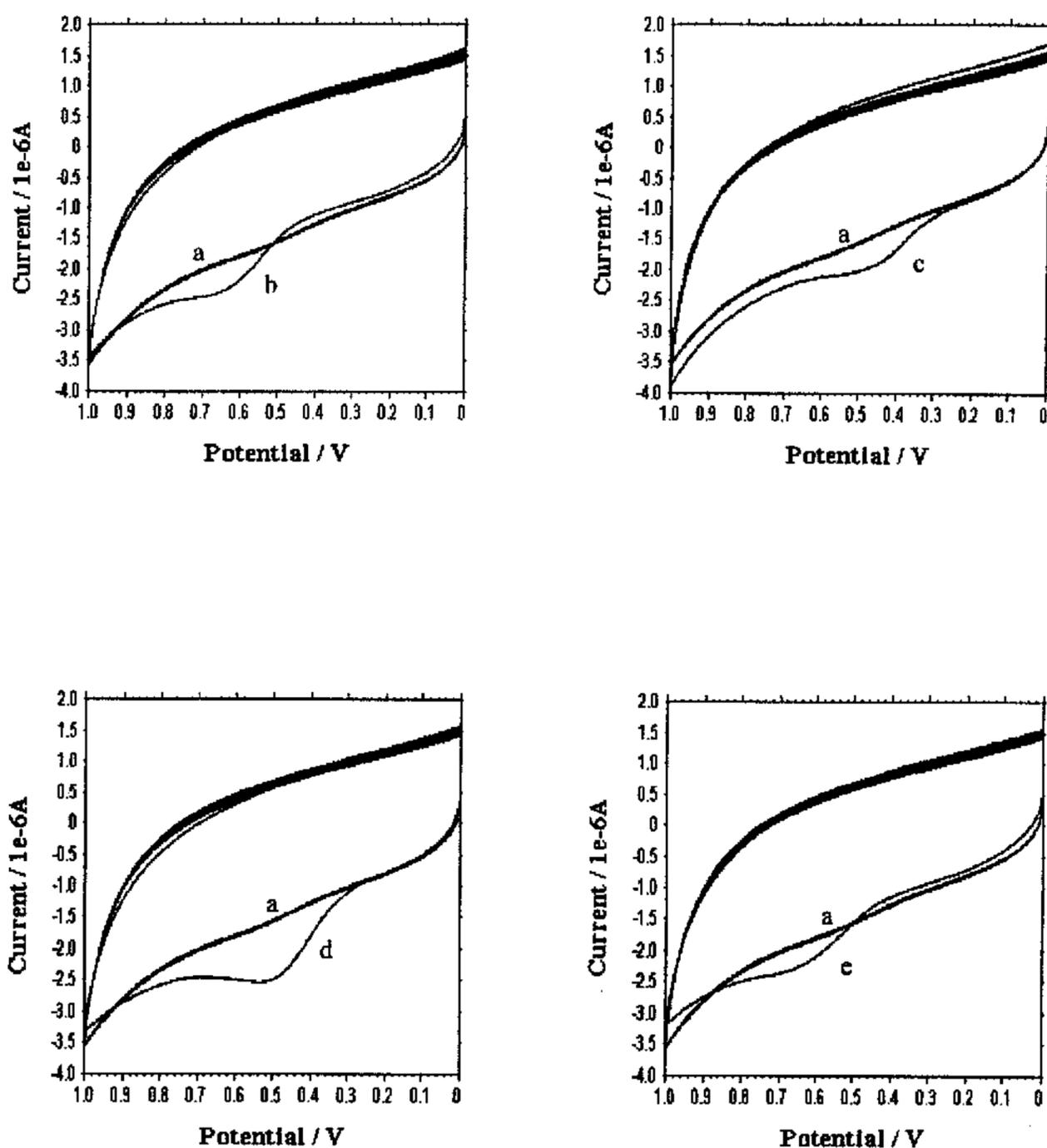


Fig. 1. The cyclic voltammograms of the four analytes at carbon disk electrode in 0.02 mol/l borate-NaOH buffer (pH 10.35). Reference electrode: SCE; auxiliary electrode: platinum wire. (a): blank solution; (b-e): 5.0×10^{-4} mol/l tryptophan, tyrosine, tyramine and tryptamine, respectively. Scan rate: 0.1 v/s.

我们还做了四种被分析物的流体动力学伏安图(图2)。实验结果表明,当电位小于600mV时,色胺和色氨酸不能被检测出,当电位高于600mV时,他们的峰电流特别是色胺的峰电流随着电位的增大而增大。但是当电位大于900mV时,基电流和噪音都会迅速增加。因此,选择800mV为工作电位,此时的本底电流不是

特别高, 而且电极的重现性比较好。

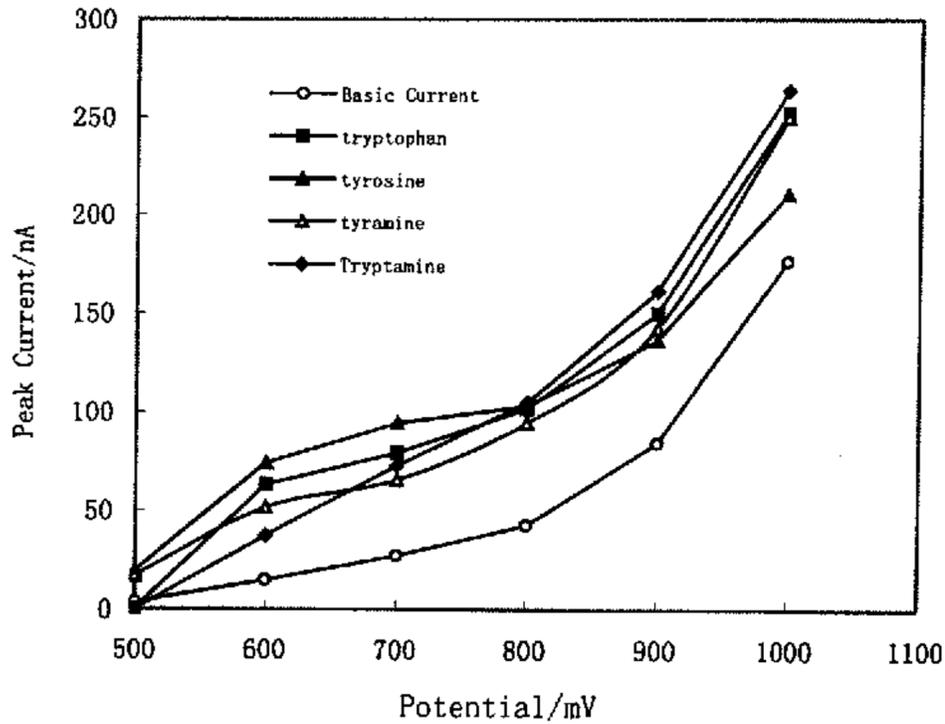


Fig. 2. The hydrodynamic voltammograms obtained from the experiment for tryptophan, tyrosine, tyramine, and tryptamine. The CE conditions were the optimum.

3.2 缓冲溶液的pH值和浓度的影响

分别用三种缓冲溶液 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\sim\text{NaOH}$ 缓冲液、 $\text{H}_3\text{BO}_3\sim\text{NaOH}$ 缓冲液、 $\text{Tris}\sim\text{HClO}_4$ 缓冲液) 进行了实验。结果表明, 在相同pH (pH 10.0—11.0) 条件下, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\sim\text{NaOH}$ 缓冲液分离效果最好。以 $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7\sim\text{NaOH}$ 缓冲液作为运行液, 在 15 min 内这四种被测物可以达到基线分离。在 $\text{H}_3\text{BO}_3\sim\text{NaOH}$ 缓冲液、 $\text{Tris}\sim\text{HClO}_4$ 缓冲液中分离不完全。因此我们在实验中选择 $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7\sim\text{NaOH}$ 缓冲体系。

从图3和图4中可以发现, 四种被分析物的停留时间和分离度与pH值和缓冲液的浓度有很大关系, 这是因为被测分析物的停留取决于包括疏水性和在溶液中的离解程度在内的很多因素。实验证明, pH大于9.0时四个被分析物能够很好地分离。但是事实上pH值的增加会导致峰形变宽和停留时间的延长。为了得到好的分离度和峰形, 实验中选择10.35为最佳pH值。

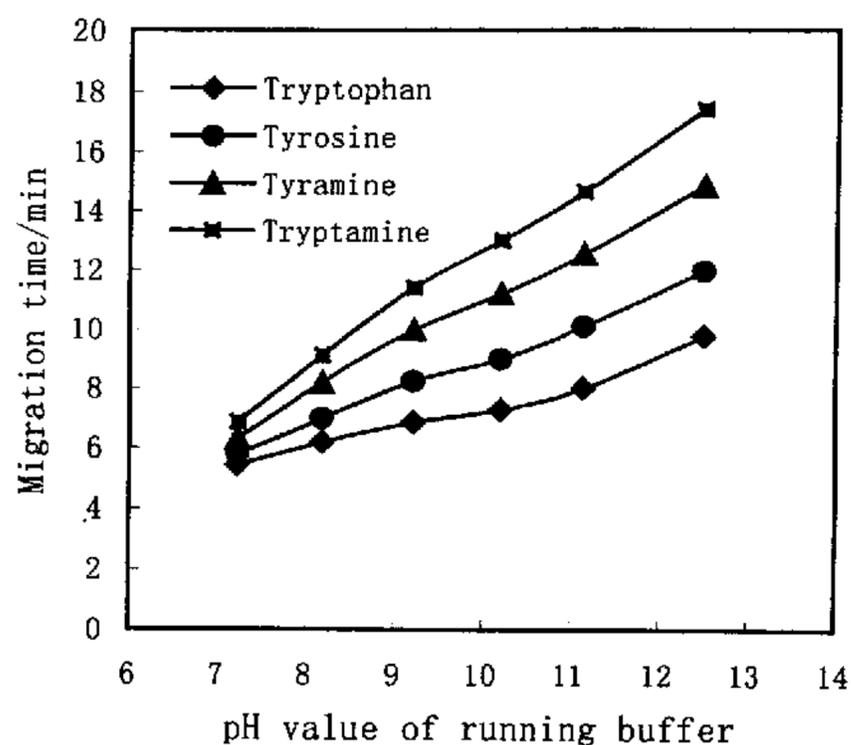


Fig. 3. Effect of running buffer pH on migration time. The concentration of analytes is $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Other conditions were the same as the optimum.

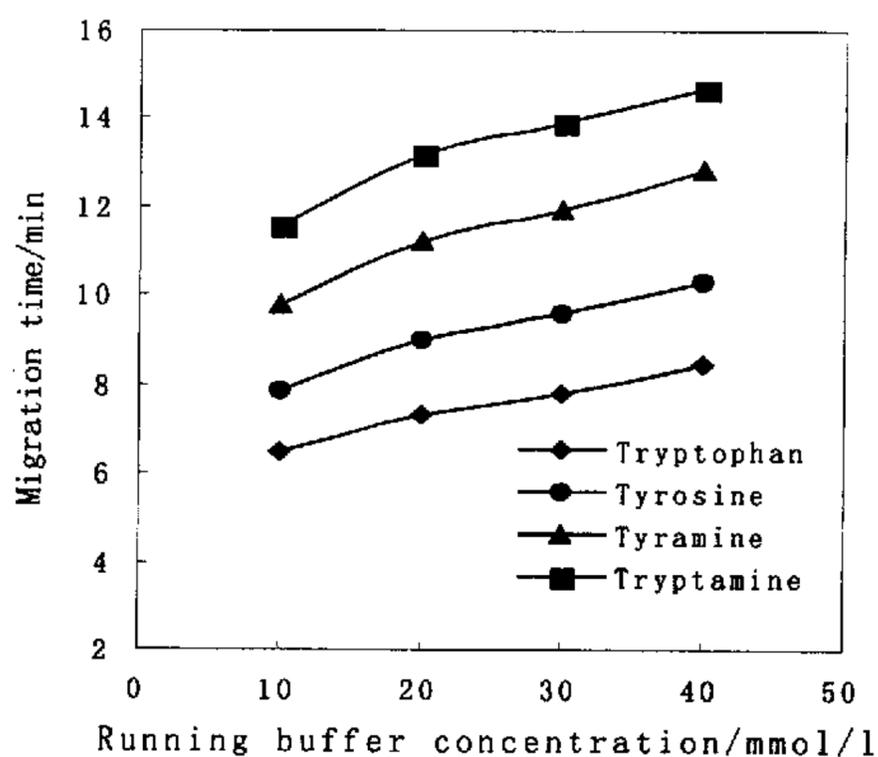


Fig. 4. Effect of running buffer concentration on migration time. The concentration of analytes is $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Other conditions were the same as the optimum.

另外, 通过对一系列浓度为0.01、0.02、0.03、0.04 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\sim\text{NaOH}$ 缓冲液(pH 10.35)进行检测, 考察运行液浓度对峰电流响应的影响。结果显示, 随

随着缓冲液浓度增加, 电流响应增大, 同时迁移时间也变长。这是因为随着缓冲液浓度增大, 缓冲液的离子强度也增大, 这使得毛细管里溶质的流动速度减小, 停留时间变长。同时毛细管中的电流也增加, 它将产生焦耳热并使峰形变宽。考虑到灵敏度、分析时间、分离度等因素, 实验中选用 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\sim\text{NaOH}$ 缓冲液 (pH 10.35) 为运行液。

3.3 SDS浓度的影响

为了得到满意的分离度, SDS作为一种最常用的表面活性剂被加入到运行液中。结果如图5所示, 随着SDS浓度的增大, 分离组分的保留时间变长。色胺、酪胺比色氨酸、酪氨酸停留时间要长, 这是因为与色氨酸、酪氨酸相比, 色胺、酪胺所带负电荷更多, 不能强烈地被胶束吸引。由于SDS的浓度降低会导致分离不完全, 浓度增加(高于 $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)则会增加分析时间。为了尽可能在最短时间内分离所有分析成分, 实验中选择SDS的浓度为 $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

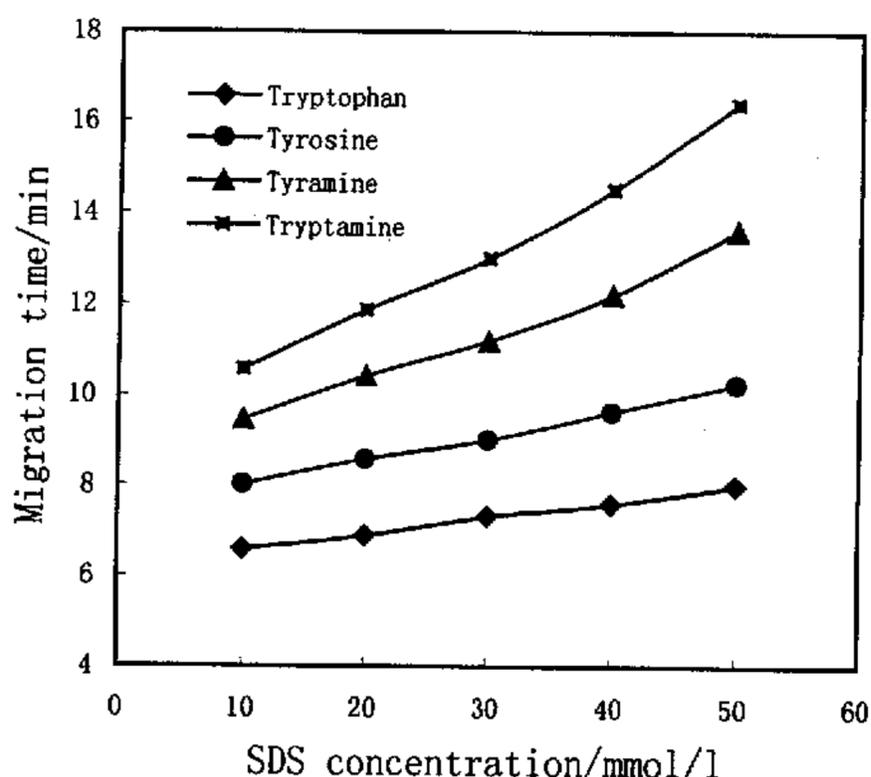


Fig. 5. Effect of SDS concentration on migration time. The concentration of analytes is $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Other conditions were the same as the optimum.

3.4 分离电压的影响

在电场力作用下, 溶质的迁移速度与电压有关。实验结果表明, 分离电压增大, 迁移时间随之变短, 峰形变窄, 如上所述, 当电流太大, 峰形将变宽。分离

电压若太低,毛细管中样品将发生扩散,亦导致电泳图的峰形变宽。为了提高效率,节省分析时间,分离电压采用20kV。

3.5 进样时间的影响

进样时间也是最佳电泳条件的一方面。我们在20kV分离电压下改变进样时间4, 6, 8, 10, 12和14s进行检测,结果表明,进样时间变长,峰电流相应地增加,当进样时间超过12 s时,峰电流减小,而且峰形出现拖尾。故本实验选择进样时间为10s。

综上所述,最佳分析条件为:工作电位800mV(vs. SCE)、分离电压20kV、进样时间10s(在20kV下)、含 $0.03\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS的 $0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\sim\text{NaOH}$ (pH 10.35) 缓冲溶液。

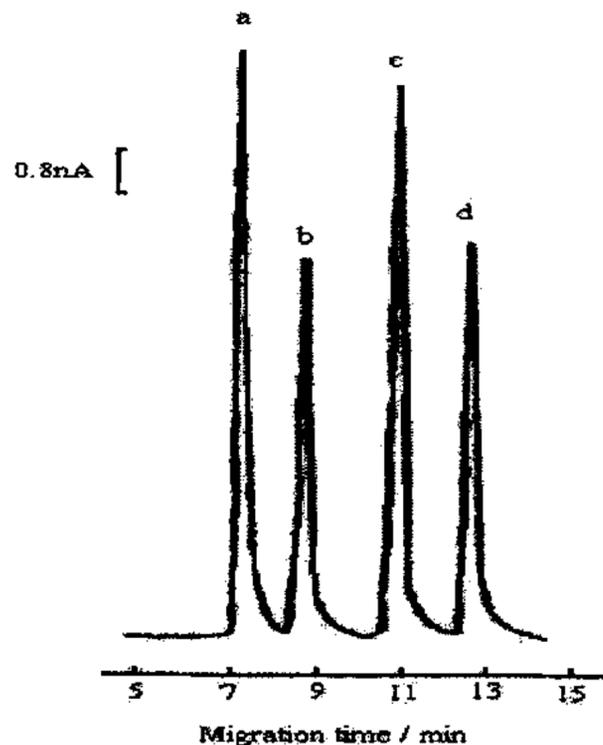


Fig. 6. Electropherograms of a mixture of the four standard analytes. (a) tryptophan; (b) tyrosine; (c) tyramine; (d) tryptamine with same concentration of $1.0\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The conditions were the same as the optimum.

在选择的最佳条件下,四种被分析物混合液的电泳图如图6所示,可明显看出它们在15min内可得到基本分离。

3.6 重复性实验,线性范围和检出限

对 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 色胺、酪胺、色氨酸及酪氨酸平行进样5次,测定其重现性迁移时间的相对标准偏差(RSD)小于2%、电流响应的相对标准偏差(RSD)小于3%。在所选最佳实验条件下,我们用MECC-AD方法在碳圆盘电极上一系列浓度的四种被分析物进行了测定,其线性范围、回归方程、回归系数、检出限在表1中列出。在 $10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,这四种分析物有很好的线形关系。根据三倍的标准偏差计算,得到四种分析物的检出限为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 数量级。

Table 1 The regression equation and detection limits^a

Compounds	Regression equation Y(nA); C(mol·L ⁻¹)	Correlation coefficient	Linear range (mol·L ⁻¹)	Detection limit (mol·L ⁻¹)
Tryptophan	$Y = 0.15 + 1.05 \times 10^5 C$	R=0.9996	$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-3}$	1.5×10^{-7}
Tyrosine	$Y = 0.04 + 6.82 \times 10^4 C$	R=0.9995	$2.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-3}$	2.1×10^{-7}
Tyramine	$Y = 0.06 + 1.00 \times 10^5 C$	R=0.9998	$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-3}$	1.8×10^{-7}
Tryptamine	$Y = 0.10 + 7.04 \times 10^4 C$	R=0.9995	$2.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-3}$	2.3×10^{-7}

^aMECC-AD conditions as the optimum.

3.7 样品测试

为了证明所建立的MECC方法的可行性,我们把它应用于实际样品中。酒中因为含有生物活性胺而被常常认为对身体有害。因此,本实验选择米酒作为样品。

图7为米酒样品的电泳图。我们分别加入不同量的四种被分析物的标准液,确认a峰为色氨酸、b峰为酪氨酸、c峰为酪胺。

测定结果在表2中列出。从测定结果可以看出,色氨酸、酪氨酸及酪胺在米酒样品中被检出。由于样品中色氨酸的含量大大低于酪氨酸,因此,色氨酸的降解产物-色胺未被检出。另外,毒性最强的酪胺的检出量未超出规定范围(在食品中的最大允许量为500-800 $\mu\text{g/g}$),所以所测米酒样品为合格产品。

为验证该方法的可行性,进行了回收率实验。结果也在表2中列出。

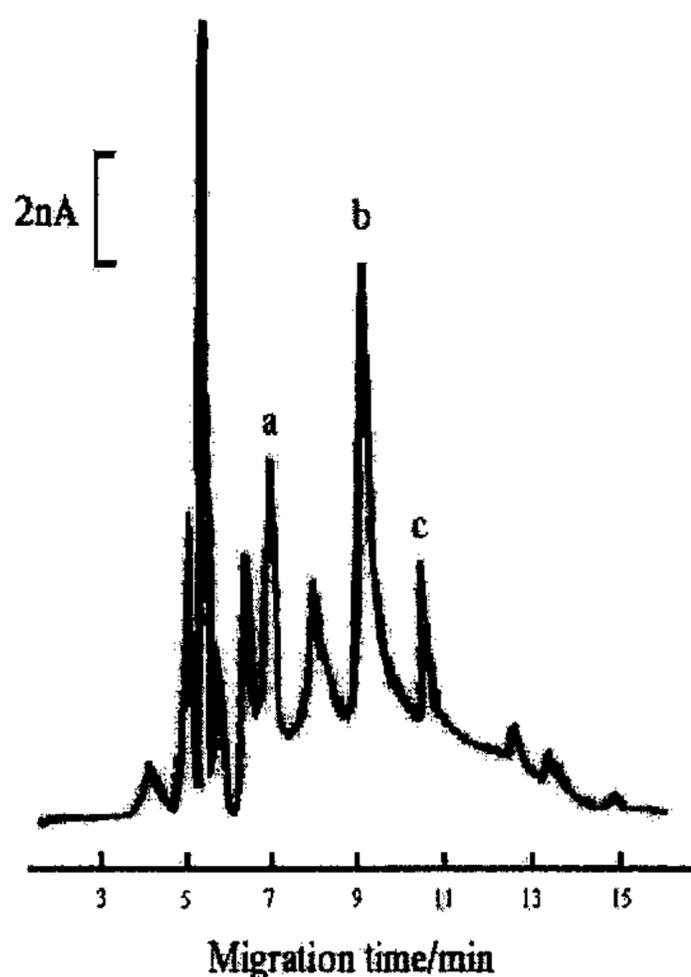


Fig. 7. Electropherograms of the rice spirit sample. (a) tryptophan (b) tyrosine (c) tyramine. The conditions were the same as the optimum.

Table 2 Assay results for the four analytes in rice spirit sample

Compounds	Sample amount ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Added amount (μg)	Found amount (μg)	Recovery	RSD(%) (n=3)
Tryptophan	49.1	20.4	71.2	108.3	1.5
Tyrosine	98.7	20.1	120.2	107.0	3.1
Tyramine	58.6	20.0	80.1	107.5	2.3

4 结论

本文尝试利用胶束电动毛细管电泳-安培检测法同时分离和测定食品中生物活性胺及其前体氨基酸,结果表明所建立的方法具有分离效率高、选择性好、分析时间短、样品处理方便等优点。在最佳条件下,色胺,色氨酸,酪胺,酪胺酸在15 min内完全分离,并且线性、重复性及回收率都很好。根据三倍的标准偏差计算,得到四种分析物的检出限为 $10^{-7}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该方法已经应用于米酒的分析并得到了令人满意的结果。因此,该方法有望用于食品质量监控以及生物降解过程

中生物活性胺及其前体氨基酸定量关系的研究。

参考文献:

1. Baker, G.B., Wong, J.T.F., Coutts, R.T., & Pasutto, F.M. (1987). Simultaneous extraction and quantitation of several of biogenic amines in cheese and chocolate. *Journal of Chromatography*, 392, 317-331.
2. Buteau, C., Duitschaever, C.L., & Ashton, G.C. (1984). High performance liquid chromatographic detection and quantitation of amines in must and wine. *Journal of Chromatography*, 284, 201-210.
3. Hayman, A.R., Gray, D.O., & Evans, S.V. (1985). New high performance liquid chromatography system for the separation of biogenic amines as their DNS derivatives. *Journal of Chromatography*, 325, 462-466.
4. Van Boekel, M.A.J.S., & Arensten-Stasse, A.P. (1987). Determination of aromatic biogenic amines and their precursors in cheese by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 389, 267-272.
5. Yamamoto, S., Itano, H., Kataoka, H., & Makita, M. (1982). Gas-liquid chromatographic method for analysis of di- and polyamines in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 435-439.
6. Sayem-El-Daher, N., Simard, R.E., L'Heurex, L., & Roberge, A.G. (1983). Determination of mono-, di- and polyamines in foods using a single-column amino acids auto-analyser. *Journal of Chromatography A*, 256, 313-321.
7. Auger, J., Boulag, R., Jaillais, B., & Delion-Vancassel, S. (2000). Analysis of biogenic amines by solid-phase microextraction and high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 870, 395-403.
8. Remero, R., Gazquez, D., Bagur, M.G., Sanchez-Vinas, M. (2000). Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 871, 75-83.
9. Standara, S., Vesela, M., & Dradak, M. (2000). Determination of biogenic amines in

- cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung*, 44, 28-31.
10. Agnes K., Simon-Sarkadi, L., & Ganzler, K. (1999). Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 836, 305-313.
 11. Nouadje, G., Simeon, N., Dedieu, F., Nertz, M., Puig, Ph., & Couderc, F. (1997). Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 765, 337-343.
 12. Oguri, S., Watanabe, S., & Abe, S. (1997). Determination of histamine and some other amines by high performance capillary electrophoresis with on-line mode in-capillary derivatization. *Journal of Chromatography A*, 790, 177-123.
 13. Wang, L.S., Yang, X.Y., & Mo, J.Y. (2000). Determination of amines by capillary electrophoresis with pulse voltammetric detector. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xiaobao*, 21, 56-58(Chinese).
 14. Zhou, G., Yu, Q., Ma, Y., Xue, J., Zhang, Y., & Lin, B. (1995). Determination of polyamines in serum by high-performance capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 717, 345-349.
 15. Fang, Y.Z., Fang, X.M., & Ye, J.N. (1995). Determination of polyhydroxy antibiotics by capillary electrophoresis with amperometric detection at a copper electrode. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 16, 1514-1518.
 16. Fang, X.M., Ye, J.N., Fang, Y.Z. (1996). Determination of polyhydroxy antibiotics by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nickel electrode. *Analytica Chimica Acta*, 329, 49-55.

第五章 毛细管电泳-安培检测法测定 中药杂多糖的组成研究

摘要

本文利用毛细管区带电泳-安培检测法测定了当归多糖和亚麻多糖水解后的单糖组成。在选定的最佳条件下,这两种多糖的水解产物-岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖在 25min 内实现完全分离而且在铜电极上有很好的电流响应。这六种单糖的线性范围在 $5.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,检测限低于或接近 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N=3$)。实验表明当归多糖中岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖的摩尔比为 1.0 : 13.6 : 15.0 : 8.7 : 21.3 : 3.7, 亚麻多糖中半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖的摩尔比为 1.0 : 4.98 : 1.1。所提取的两种多糖的纯度分别为 98.3% 和 97.6%。该方法具有分析速度快、操作仪器简单、灵敏高和重现性好等优点。

关键词: 多糖; 毛细管区带电泳; 安培检测; 当归多糖; 亚麻多糖

1 前言

近几十年来,多种传统中草药中的多糖成分被证明在免疫学、抗癌治疗及其他疾病治疗中有很高的药效[1]。如当归多糖能够有效的预防由老鼠嗜血性白血球引起的胃肠疾病[2],也能有效的避免肝脏受到与肝脏中谷氨酸消耗及氮氧化合物活化有关的一种病毒的损害[3]。也有报道说亚麻多糖可以有效地清除自由基并能减缓自由基对生物大分子的损伤[4]。

由于植物多糖是化学性质不活泼的大分子物质,而且常常与蛋白质、色素及其他一些干扰物质结合在一起,因此其分析测定相对来说比较困难。目前,有很多方法都可用于进行多糖定性定量分析,如核磁共振[5]、薄层色谱[6]、凝胶柱层析色谱[7]、紫外分光光度[8]、质谱[9]、气相色谱[10]和高效液相色谱[11]等。但是,上述方法中有些往往需要用到较复杂的仪器和昂贵的试剂,有些仪器操作简单的只能用于定性或半定量分析。

毛细管电泳由于其分离效率高、样品消耗少、分析时间短和操作相对简单等优点被认为是很有吸引力的分析方法,并在近二十年来得到了迅速的发展。近年来,毛细管电泳也用于单糖和简单多糖的测定。因为多糖在动物体内的第一次新陈代谢中可以按组成比例进行水解,所以可以通过毛细管电泳[12, 13]分离分析经过水解的多糖中单糖的种类和含量来测定其组成。

目前,紫外、激光诱导荧光等检测器多与毛细管电泳联用。因为糖类分子中没有发色基团,所以用紫外可见吸收光谱或激光诱导荧光作为毛细管电泳分离检测手段时,必须进行复杂的柱前或柱后衍生[14]。但是,用电化学方法检测单糖时,由于糖类化合物中的电活性羟基可以在铜电极或其它金属电极表面被催化氧化,可以克服以上缺点。而且,电化学检测法的灵敏度比紫外高。所以,毛细管电泳-电化学检测法已成功地应用于糖类特别是单糖的分析[15-17]。

本文利用毛细管电泳-安培检测法对当归多糖和亚麻多糖水解后的单糖成分进行了分离检测。实验结果表明,当归多糖由岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖组成,其摩尔比为 1.0 : 13.6 : 15.0 : 8.7 : 21.3 : 3.7, 亚麻多糖由半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖组成,其摩尔比为 1.0 : 4.98 : 1.1。实验中提取两种多糖的纯度分别为 98.3% 和 97.6%。该方法具有快速、仪器及操作简单、灵敏度高、重现性好的优点。

2. 实验部分

2.1 仪器部分

实验室自组装毛细管电泳-安培检测系统[18, 19]。高压电源(± 30 kV, 上海原子核所); 熔融石英毛细管($25\ \mu\text{m}$ I.D., $360\ \mu\text{m}$ O.D., 50 cm long, 河北永年光纤厂); BAS LC-3D 安培检测器 (Bioanalytical System, West Lafayette, IN, USA)。记录仪 (Model XWT-204, 上海大华仪器厂)。CHI 630 电化学工作站 (CHI Instruments, USA)。三电极体系: 内径 $100\ \mu\text{m}$ 的铜圆盘工作电极, 饱和甘汞参比电极 (SCE), 铂丝对电极。

2.2 工作电极的制备

按照文献方法[20]制备铜电极。使用前,铜电极表面先用金相砂纸抛光再用氧化铝粉打磨,然后放在二次水中超声 3min 清洁表面。

2.3 试剂部分

所有试剂都是分析纯。岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖购自上海源聚试剂公司。储备液浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验时用二次水溶解配成实验所需浓度。中药当归和亚麻购自上海医药公司中药部。毛细管电泳进样前,所有溶液用 $0.45 \mu\text{m}$ 聚丙烯膜过滤,超声 5 min 除去气泡。

2.4 样品处理

精确称取一定量的中药当归和亚麻粉末,分别用丙酮和 1:1 的乙醇-乙醚在沸水浴中回流 2 h 除去色素。残渣在微沸水中浸取 3 次,每次 6h。所得的滤液合并后用无水乙醇浓缩沉淀,离心分离沉淀物,用 4:1 的异戊醇透析提纯以除去异体蛋白质,冰冻干燥后就得到粗糙的多糖。再进一步用纤维素柱层析法净化就得到了高纯度的多糖。

称取 0.5g 上述多糖,在沸水浴中、氮气保护下用 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸和 $5.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸混合溶液回流 2.5 h。过滤,滤液即为多糖水解所得的单糖混合液。把该混合液稀释成 250 mL 作为储备液,用毛细管电泳分析时再稀释 50 倍。

2.5 毛细管电泳实验

实验前,将三电极体系依次放进电解池对应孔内,小心用三维调节系统调节铜电极使其与毛细管的出口实现有效对接。

毛细管依次用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液、二次水、 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液润洗 3 min,然后用运行液润洗直至电流稳定以得到可重现的电渗流。

3. 结果和讨论

3.1 工作电极和检测电位的选择

由于糖类在碳电极上的有较大的过电位,所以毛细管电泳-安培检测常用的

碳电极不能用来测糖类化合物。但是，在碱性条件下糖类化合物在铜电极上表现出较大的电流响应。因此，本实验中选用铜电极做工作电极。

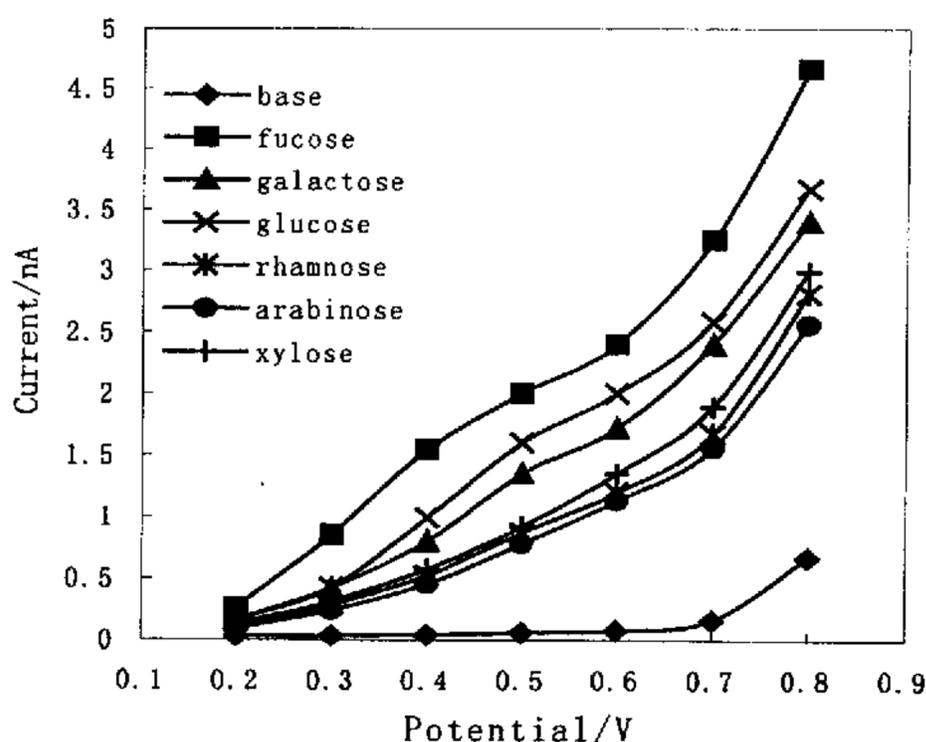


Fig. 1 Hydrodynamic voltammograms of six standard monosaccharides ($4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) in CE under different detection voltages from +0.2 to +0.8V. Other conditions as the optimum.

Fig. 1 是浓度为 $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ 岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖在不同电压下电流响应的流体伏安图(HDVs)。由图可以看出，随着检测电位的增加，单糖的电流响应随之增加。为了得到高的灵敏度和信噪比，本实验中选用 0.60 V 作为检测电位。

3.2 分离条件的选择

在强碱条件下，糖类物质电离带负电荷，由于不同的糖分子有不同的荷质比，在高电场中它们的电泳迁移率也不一样，因此能够在毛细管电泳中实现分离。在本实验中，选用氢氧化钠溶液作为运行液。Fig. 2 是在其它条件都是最佳条件时，岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖在不同浓度 NaOH 运行液中的迁移时间图。实验结果表明，由于六种单糖在 NaOH 溶液中具有相似的电解度和分子量，所以它们的分离度与 NaOH 浓度关系很大。当 NaOH 浓度低于 0.040

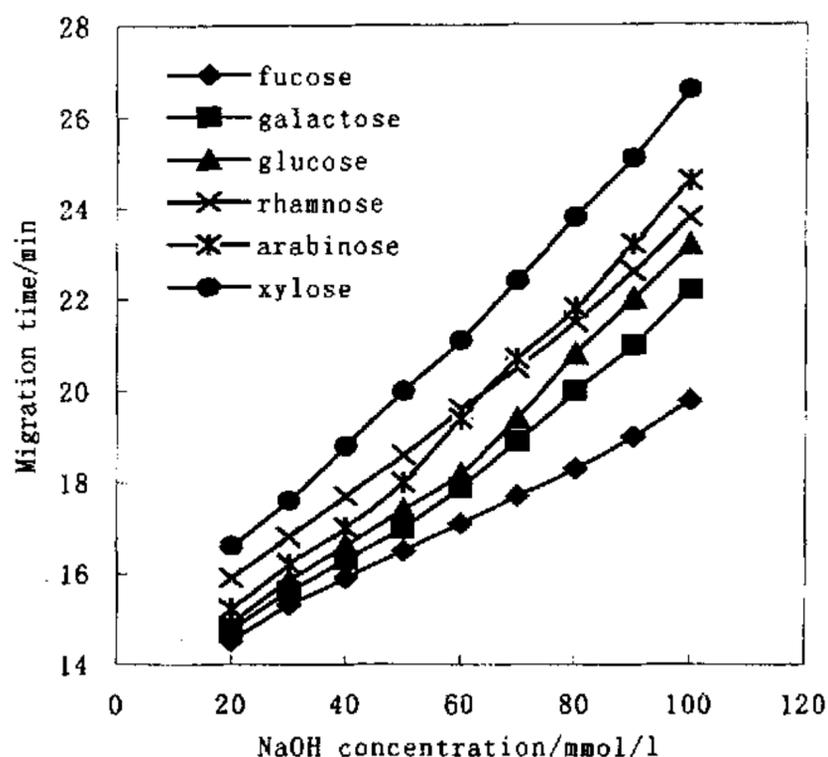


Fig. 2 Effects of NaOH concentrations on migration time. All conditions were the optimum except C_{NaOH} changed from 20 mmol l^{-1} to 100 mmol l^{-1} .

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 半乳糖、阿拉伯糖的响应峰部分重叠; 当NaOH浓度在 $0.040 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ - $0.050 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, 半乳糖和葡萄糖的电流响应峰部分重叠; 当NaOH浓度在 $0.060 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ - $0.070 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, 阿拉伯糖和鼠李糖的响应峰部分重叠; 当NaOH浓度高于 $0.080 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 虽然能实现完全分离但是迁移时间随着NaOH浓度的增加而延长。综合考虑分离度和峰电流的影响, 选择 $0.080 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH为最佳分离浓度。

Fig. 3说明了改变分离电压范围6-18 kV时, 六种单糖的分离情况。当分离电压低于10kV时, 六种单糖可实现完全分离, 但是峰形稍微有些展宽而且迁移时间太长。当分离电压提高时, 单糖的迁移时间显著缩短, 响应电流峰形也响应变尖锐。当分离电压高于16 kV 时, 尽管迁移时间不到20min, 但是由于毛细管中强电流产生了大量的焦耳热, 葡萄糖, 鼠李糖, 阿拉伯糖的电流峰部分重叠。综合考虑迁移时间和分离度因素, 选择12 kV 作为分离电压, 在该条件下六种单糖在25 min 内实现完全分离。

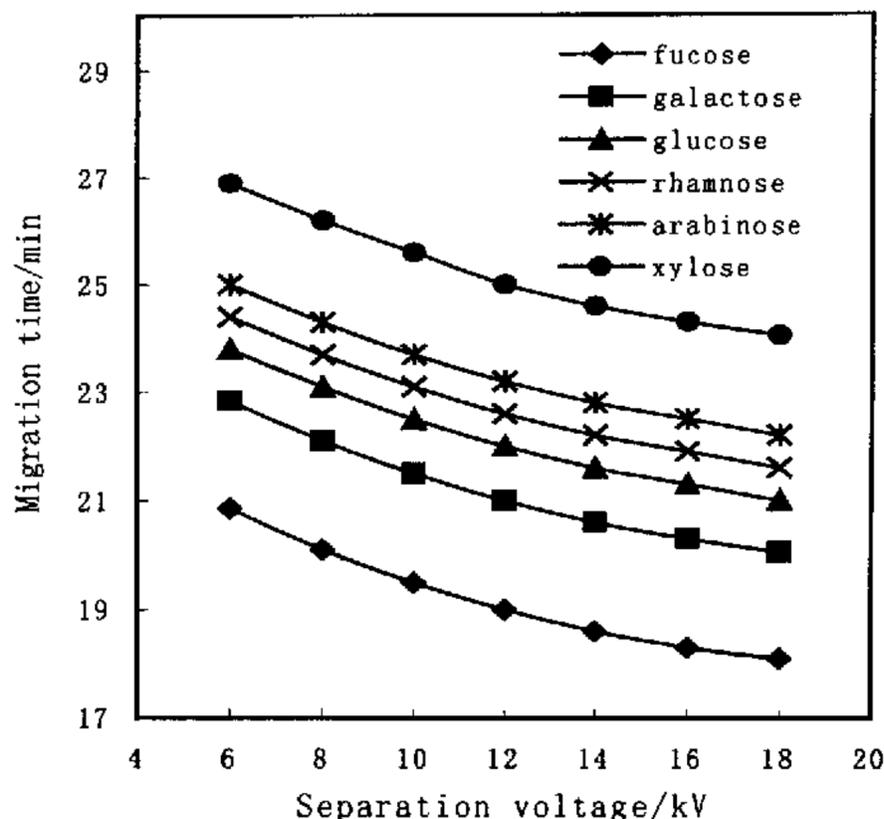


Fig. 3 Effects of separation voltage changed from 6 to 18 kV on migration time. Other conditions as the optimum.

在其它为最佳条件时，在4s到16s内改变电动进样时间，发现当进样时间在5s到12s内改变时，峰电流相应增加。但是，如果进样时间超过12s时，分析物的电流峰明显变宽。在本实验中选择8s作为进样时间，可以得到满意结果。

实验最佳条件为：分离电压 12 kV、NaOH 运行液浓度为 $0.080 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、进样时间为 8 s、检测电压为 0.60 V。Fig. 4 (a) 为在最佳条件下六种单糖的毛细管电泳-电化学检测的电泳图谱。

3.3 线性、重现性和检测限

在最佳条件下分析了一系列浓度从 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的六种单糖的标准溶液，结果如 Table 1 所示。六种单糖的线性范围为 5.0×10^{-6} - $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，检测限达 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N=3$)，这表明该方法具有较高的灵敏度。Table 2 为在同一条件下， $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品重复进样6次所得的迁移时间和峰电流的相对标准偏差(RSD)。所有的相对标准偏差都小于4%，这表明该方法具有很好的重现性。

Table 1

Regression equation and detection limit^a

Analyte	Regression Equation I(nA); C(molL ⁻¹)	R ²	Linear Range (molL ⁻¹)	Detection Limit (molL ⁻¹)
Fucose	$I=5.78 \times 10^4 C+0.11$	0.9995	$5 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$	6.2×10^{-7}
Galactose	$I=4.15 \times 10^4 C+0.07$	0.9983	$5 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$	9.2×10^{-7}
Glucose	$I=4.85 \times 10^4 C+0.06$	0.9979	$5 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$	7.4×10^{-7}
Rhamnose	$I=2.63 \times 10^4 C+0.09$	0.9991	$5 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$	1.4×10^{-6}
Arabinose	$I=2.80 \times 10^4 C+0.08$	0.9985	$5 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$	1.2×10^{-6}
Xylose	$I=2.88 \times 10^4 C-0.02$	0.9992	$5 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-4}$	1.2×10^{-6}

^a Detection limit was estimated according to three times of signal-noise ratio.

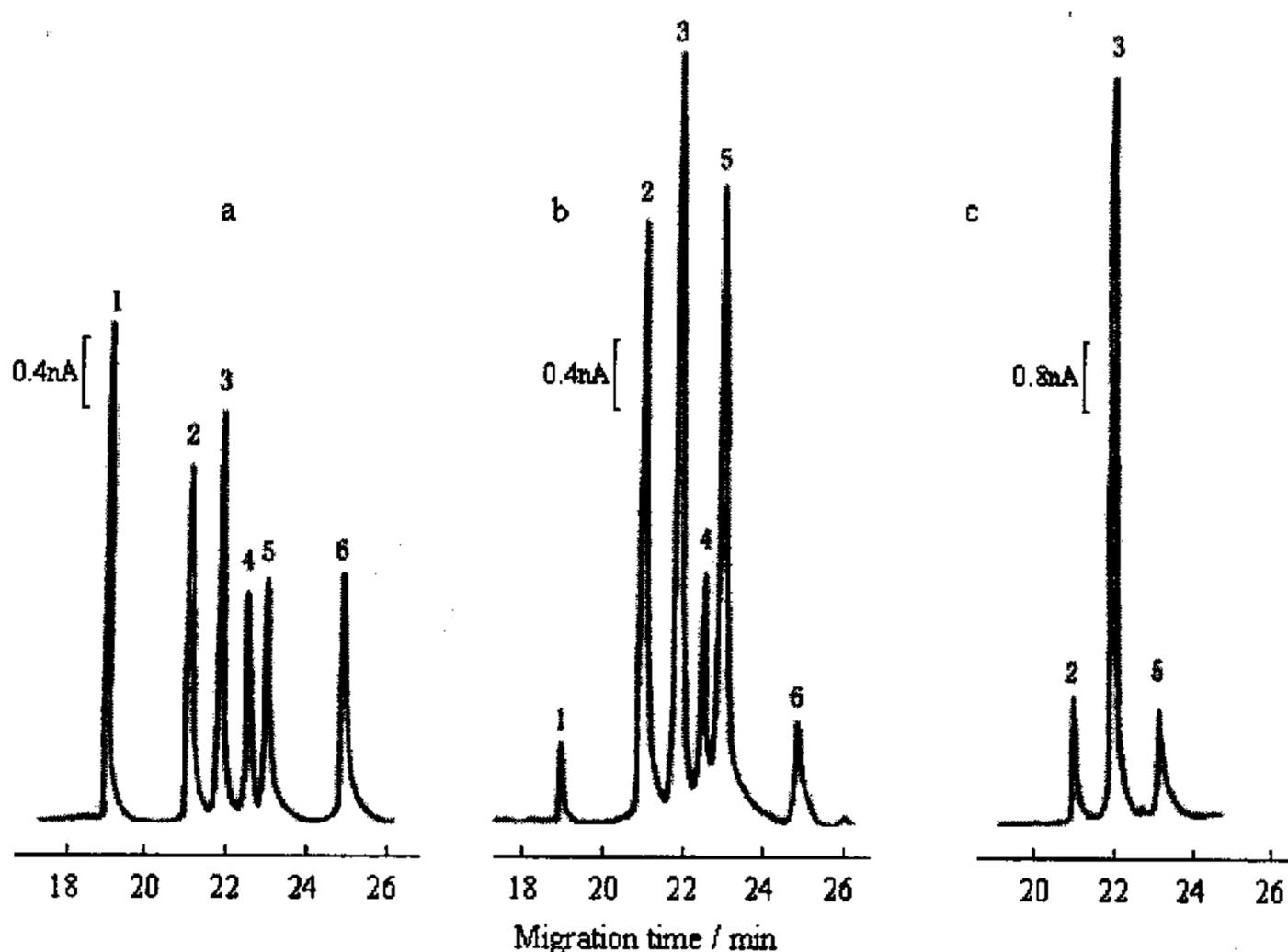


Fig. 4 Electropherograms of the six standard monosaccharides (a), hydrolyzed monosaccharides from *angelica sinensis* polysaccharides (b) and hydrolyzed monosaccharides from flax polysaccharides (c) under the optimum conditions of CE-ED. 1 Fucose, 2 Galactose, 3 Glucose, 4 Rhamnose, 5 Arabinose, 6 Xylose.

Table 2

Precision of the present method (n=6)^a

Analyte	Migration Time (Min)		Peak Height (nA)	
	Average	RSD(%)	Average	RSD(%)
Fucose	19.0	0.83	2.42	1.59
Galactose	21.1	0.56	1.73	2.09
Glucose	22.0	0.69	2.01	2.32
Rhamnose	22.6	1.06	1.14	2.98
Arabinose	23.2	0.98	1.20	3.65
Xylose	25.1	1.60	1.13	3.89

^aThe concentrations of all the four monosaccharides were $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

3.4 样品分析

该方法被用来分析当归多糖和亚麻多糖的单糖组成。在最佳条件下,用该方法分析当归多糖和亚麻多糖的水解产物,所得电泳图谱如 Fig. 4 (b, c)。计算得到当归多糖中岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖的摩尔比为 1.0 : 13.6 : 15.0 : 8.7 : 21.3 : 3.7, 亚麻多糖中半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖的摩尔比为 1.0 : 4.98 : 1.1。样品按照 2.4 的步骤进行提纯,得到当归多糖和亚麻多糖的纯度分别 98.3% 和 97.6%。计算结果如 Table 3。

Table 3

Contents and mole ratio of LLPS hydrolyzates (n=4)

Component	Mole ratio	
	angelica sinensis polysaccharides	flax polysaccharides
Fucose	1.0	---
Galactose	13.6	1.0
Glucose	15.0	4.98
Rhamnose	8.7	---
Arabinose	21.3	1.1
Xylose	3.7	---

水解之前在两种多糖中加入六种标准单糖,使其分析浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,进行 4 次回收实验。结果如 Table 4,六种单糖样品回收率为 94% - 102%,由此证明用该方法分析植物多糖是准确可行的。

Table 4

Recoveries of four monosaccharides in sample analysis (n=4)

Component	Added amount(molL ⁻¹)	Found amount(molL ⁻¹)	Recovery(%)	RSD(%)
Fucose	5.0×10 ⁻⁵	5.0×10 ⁻⁵	100.0	2.1
Galactose	5.0×10 ⁻⁵	4.8×10 ⁻⁵	96.0	2.9
Glucose	5.0×10 ⁻⁵	4.9×10 ⁻⁵	98.0	3.1
Rhamnose	5.0×10 ⁻⁵	4.8×10 ⁻⁵	96.0	2.8
Arabinose	5.0×10 ⁻⁵	4.7×10 ⁻⁵	94.0	3.2
Xylose	5.0×10 ⁻⁵	4.7×10 ⁻⁵	94.0	3.4

4 结论

实验结果表明用毛细管电泳-安培检测法测定中药杂多糖的单糖成分具有快速、灵敏度高、重现性好的优点。与激光诱导荧光的柱前或柱后衍生相比该方法还有进样量少, 仪器简单, 操作相对简单的优点。实验证明当归多糖中岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖的摩尔比为 1.0 : 13.6 : 15.0 : 8.7 : 21.3 : 3.7, 亚麻多糖中半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖的摩尔比为 1.0 : 4.98 : 1.1。该方法也可用于其它植物多糖成分研究, 另外, 在监测人体新陈代谢过程中多糖类药物的药理分析方面有很大的发展前景。

5 参考文献:

1. Hu W, Wang L and Yun L. Medical study on polysaccharides and their derivatives. *Scientific American (Chinese edition)* 1994; **187**: 4-8.
2. Cho C, Mei Q, Sheng P, Lee S, So H, Guo X and Li Y. Study of the gastrointestinal protective effects of polysaccharides from angelica sinensis in rats. *Plant Medica* 2000; **66**: 348-351.
3. Ye YN, Liu ESL, Li Y, So HL, Cho CCM, Sheng HP, Lee SS and Cho CH. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from angelica sinensis on hepatic injury. *Life Sciences* 2001; **69**: 637-646.

4. Sun X, Zhang G, Zhao X, Shi F, Wang Q, Yang L and Liu H. Study on the antioxidation function of linseed pigments and linseed polysaccharide. *Zhongguo Shipin Tianji* 2001; **3**: 34-39.
5. Wang Z and Fang J. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in the structural determination of polysaccharide. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2000; **28**: 240-247.
6. Mukerjea R, Kim D and RobytShang JF. Simplified and improved methylation analysis of saccharides using a modified procedure and thin-layer chromatography. *Carbohydrate Research* 1996; **292**: 11-20.
7. Zhang Y. Structural Analysis of Polysaccharides. *Progress in biochemistry and biophysics* 1983; **5**: 18-23.
8. Kinoshita M, Shiraishi H, Muranushi C, Mitsumori N, Ando T, Oda Y and Kakehi K. Determination of molecular mass of acidic polysaccharides by capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography* 2002; **16**: 141-145.
9. Liu Z. Structural analysis and physio-activity study on polysaccharide from leaves of panaxquinque foliumlinn. *Science and Technology of Food Chemistry* 2001; **22**: 20-21.
10. Ingrid D, Erika L and Bo J. Characterization of process separation media by pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry. *Proc. Biochem. (oxford)* 1999; **35**, 119-126.
11. Shang P, Mei Q and Cao Z. Analysis of angelica sinensis polysaccharide constituents by high performance liquid chromatography. *Chinese Pharmaceutical Journal* 2000; **35**: 332-335.
12. Grill E, Huber C, Oefner P, Vorndran A and Bonn G. Capillary zone electrophoresis of p-aminobenzoic acid derivatives of aldoses, ketoses and uronic acids. *Electrophoresis* 1993; **14**: 1004-1010.
13. Zhou W and Baldwin RP. Capillary Electrophoresis and Electrochemical Detection of Underivatized Oligo- and Polysaccharides with Surfactant-Controlled Electroosmotic Flow. *Electrophoresis* 1996; **17**: 319-324.

14. Ding K and Fang J. Capillary Electrophoresis of polysaccharides and its application. *Chinese Journal of Chromatography* 1999; **17**: 346-350.
15. Ye J and Baldwin RP. Amperometric Detection in Capillary Electrophoresis with Normal Size Electrodes. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 3525-3527.
16. Fu C, Song L and Fang Y. Determination of sugars and organic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 1998; **371**: 81-87.
17. Hu Q, Zhou T, Zhang L and Fang Y. Study of the separation and determination of monosaccharides in soluble coffee by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Analyst* 2001; **126**: 298-301.
18. Fang Y, Fang X and Ye J. Determination of polyhydroxy antibiotics by capillary electrophoresis with amperometric detection at a copper electrode. *Chinese Journal of Chinese Universities* 1995; **16**: 1514-1518.
19. Fu C, Song L and Fang Y. Determination of adenosine phosphate by co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 1999; **399**: 259-263.
20. Wang Q, Ding F, Li H, He P and Fang Y. Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; **30**: 1507-1514.

第六章 血浆中水溶性小分子抗氧化剂的 毛细管电泳-电化学检测研究

摘要

本文应用毛细管电泳-电化学检测方法,以金属铜电极为检测电极,探索了测定人血浆中水溶性小分子抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)、尿酸(UA)、色氨酸(Try)和半胱氨酸(Cys)的最佳条件。在最佳实验条件下,各组分的线性范围在 1.0×10^{-6} – $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 内,检测限在 $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 数量级。该法具有分析速度快、灵敏度较高等优点,对血浆样品的测试取得了满意的结果。

关键词 抗氧化剂; 毛细管电泳; 电化学检测; 铜电极

1 引言

为了防止过量氧自由基及其代谢产物对机体的毒性作用,人体在不断进化中形成了一个完整的抗氧化系统。组成人体抗氧化系统的基础是各种抗氧化剂,包括抗氧化酶、脂溶性抗氧化剂、水溶性小分子抗氧化剂和蛋白性抗氧化剂等。准确检测体内各种抗氧化剂的含量,对相关疾病的诊断和药物的开发都具有重要的意义。[1]

人体内的水溶性小分子抗氧化剂包括抗坏血酸(Vc)、谷胱甘肽(GSH)、尿酸(UA)、色氨酸(Try)和半胱氨酸(Cys)等。除抗坏血酸主要通过食物摄入外,其它几种小分子抗氧化剂都是体内的代谢产物。这些小分子抗氧化剂的分析主要以高效液相色谱-紫外/电化学检测联用为主,其中电化学检测比紫外检测有更高的灵敏度。[2-4]

近十几年来,毛细管电泳由于具有分离效率高、试样用量小、仪器简单等优势而在许多分析领域中得到广泛的应用。[5-7] 电化学检测中的安培检测法因具有灵敏度较高、仪器费用低廉等优点成为一种重要的毛细管电泳检测方法。[8-9] 本文应用毛细管电泳-安培检测法,以金属铜电极为检测电极,探索了测定人血浆中GSH、UA、Try和Cys的最佳条件。该法具有分析速度快、灵敏度较高等优

点, 对血浆样品的测试取得了满意的结果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

自行组装的毛细管电泳-安培检测系统[10, 11]; 45 厘米长的熔融石英毛细管 (内径 $25\ \mu\text{m}$, 外径 $360\ \mu\text{m}$, Polymicro Technologies, USA); CH-2 型毛细管电泳电化学检测仪 (华东师范大学, 江苏电分析仪器厂); CHI630 电化学分析仪 (CH Instruments, USA); 高压电源 (0-30KV, 中国科学院上海原子核研究所); 台式自动平衡记录仪 (上海大华仪表厂); 三电极系统: 直径为 $120\ \mu\text{m}$ 的铜圆盘电极, 饱和甘汞参比电极和铂丝辅助电极。

GSH、UA、Try 和 Cys 为分析纯或生化试剂, 均购自上海化学试剂进出口公司。

$1.0 \times 10^{-3}\ \text{molL}^{-1}$ GSH、Try 和 Cys 标准储备液用二次蒸馏水直接配制, $1.0 \times 10^{-3}\ \text{molL}^{-1}$ UA 标准溶液在碱性条件下配制。标准溶液于冰箱内保存备用, 实验前用运行缓冲液稀释至所需浓度。 $0.5\ \text{molL}^{-1}$ 硼砂和 $0.5\ \text{molL}^{-1}$ 磷酸二氢钠储备液用二次水配制。

其他试剂均为分析纯。实验用水为二次水。

毛细管洗涤溶液、缓冲溶液、标准样品溶液和样品溶液在实验前均用聚丙烯过滤膜 ($0.22\ \mu\text{m}$) 过滤, 并在超声波下脱气后使用。

2.2 铜圆盘电极的制作

铜圆盘电极按照文献方法制备[12]。铜圆盘电极在每次使用前分别用金刚砂纸、氧化铝粉末抛光, 然后用二次蒸馏水在超声波下洗净表面。

2.3 实验方法

实验时将工作电极、参比电极和辅助电极分别固定在电解池中相应的位置上, 然后通过三维微调节器将毛细管的检测端出口同工作电极有效偶联。

毛细管在使用前需要用 $0.2\text{-}1.0\ \text{molL}^{-1}$ NaOH 溶液洗涤, 实验时用缓冲液洗涤

至管内电流达到稳定状态后再进样。每次样品分析后,先用 $0.2 \text{ molL}^{-1} \text{NaOH}$ 溶液洗涤 10 min,然后用缓冲溶液洗涤至管内电流稳定后再进样,以保证得到稳定的电渗流。

实验的最佳条件为:分离电压 15 kV, $25 \text{ mmolL}^{-1} \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - 50 \text{ mmolL}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.9) 缓冲溶液为运行液,压力进样 30 s,检测电位 0.5 V。

2.4 样品制备

先在 2ml 新鲜血样中加入 0.01g 左右 EDTA 以防止其中的还原性物质被金属离子氧化,然后加入 0.1g 磺基水杨酸(SSA),震荡摇匀 5 min,以保证蛋白质完全沉淀。高速离心 5 min,小心移取上层清液,加入缓冲液稀释至 10 倍,过滤后直接进样测试。

3 结果与讨论

3.1 安培法检测条件的选择

在合适的介质条件下,GSH 和氨基酸(包括 Cys 和 Try)在金属电极上有较好的响应,而 UA 在碳电极上有很好的电流响应,在通常使用的 Au、Pt 金属电极上响应不大。在本实验中,我们选择铜圆盘电极,尽管尿酸的响应较其他三种组分小,但实现了四种水溶性小分子抗氧化剂的同时测定。图 1 是在最佳毛细管电泳分离条件下,GSH、UA、Try 和 Cys 的流体伏安图。从中可以看出,在 0.3-0.7 V 电位范围内,四种样品的峰电流大于本底电流。为了获得较好的检测灵敏度,在实验中选择 0.5 V 为检测电位。

3.2 毛细管电泳分离条件的选择

3.2.1 缓冲液酸度的选择

通过比较,实验中选择硼酸盐-磷酸二氢盐体系为运行缓冲液,四种样品得到了很好的分离。由于 UA 在酸性条件下难以溶解,因而本实验不能选择酸性缓冲溶液。实验中以 $25 \text{ mmolL}^{-1} \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - 50 \text{ mmolL}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 为缓冲液,改变其 pH

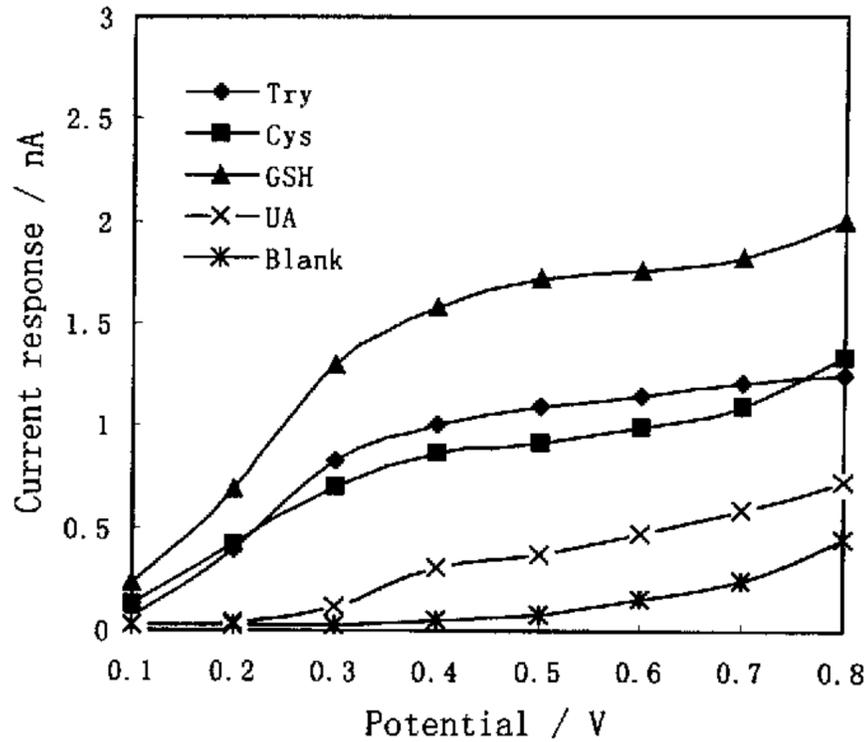


Fig. 1 Hydrodynamic voltammograms of four standard analytes ($1.0 \times 10^{-5} \text{molL}^{-1}$) in CE under different detection potentials from +0.1 to +0.8V. Other conditions as the optimum.

值从 7.0 至 10.0, 从而探讨运行液 pH 值对毛细管电泳分离的影响。实验结果表明, pH 值近中性时, Try 的响应峰同溶剂峰部分重合, 其他组分的分离情况也不理想。随着运行液 pH 值的升高, 组分的保留时间相应延长, 各组分保留时间的差值也增大, 从而达到完全分离, 但电流响应也逐渐降低。综合考虑分离度和灵敏度的要求, 实验中选择 $25 \text{mmolL}^{-1} \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $50 \text{mmolL}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液本身的 pH (7.9), 在此酸度条件下, 电流响应较大, 分析时间较短, 而且也能达到完全的分。

3.2.2 缓冲溶液浓度的选择

在 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 和 NaH_2PO_4 浓度比 (1:2) 保持不变的前提下, 从小到大改变运行缓冲液的浓度。实验结果表明, 当浓度较小时, 分离时间短, 但分离效果降低; 随着运行缓冲液浓度的增大, 电渗流速度降低, 分离时间增长, 分离度增大, 但电流响应减小, 检测灵敏度明显降低。综合考虑分离度、检测限和分离时间, 我们在实验中选择 $25 \text{mmolL}^{-1} \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $50 \text{mmolL}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 为运行缓冲液。

3.2.3 分离电压的选择

升高分离电压可以缩短各组分的保留时间, 加快分析速度, 还可以使电流响应峰增高、变窄。但如果分离电压太高, 毛细管内电流变大, 焦耳热也随之增大,

导致分离效率下降。综合考虑上述因素，分离电压为 15 kV 时比较合适。

3.2.4 进样时间的选择

实验中选择压力进样方式，进样高度为 20 cm。在其他最优化条件下，改变进样时间从 10 s 到 120 s，发现当进样时间为 30 s 时，电流响应较大。故实验中选择进样时间为 30 s。

综上所述，实验的最优化条件是：分离电压 15 kV， $25\text{mmolL}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $50\text{mmolL}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.9) 缓冲溶液为运行液，压力进样 30 s (高度 20cm)，检测电位 0.5 V。图 2 为在此条件下得到的四种组分混合标准液的电泳图。

实验中应注意若混合样放置过久，则在电泳图中出现两个新的电流响应峰，Cys 和 GSH 的响应电流变小，这可能是由于在碱性条件下 Cys 发生二聚和 GSH 发生分解造成的。

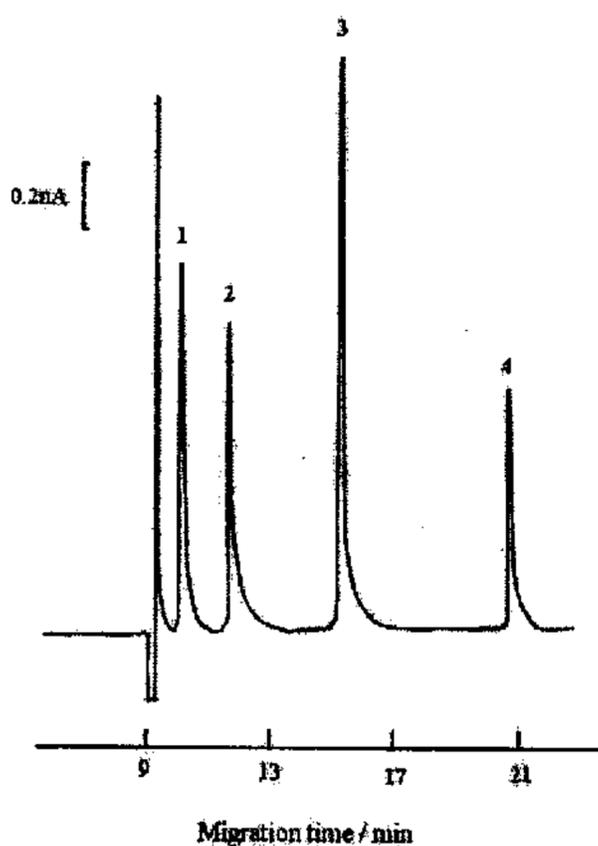


Fig. 2 Electropherograms of the four standard analytes under the optimum conditions of CE-AD. 1 Try ($1 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$), 2 Cys ($1 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$), 3 GSH ($1 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$), 4 UA ($2 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$).

3.3 线性范围、检测限和重现性

通过对一系列浓度的各组分标准溶液的混合液进行测定，得到四种组分的线性方程、线性范围和检测限。结果见表 1。

Table 1 Regression equation and detection limit^a

Analyte	Regression Equation I(nA); C(molL ⁻¹)	R	Linear Range (molL ⁻¹)	Detection Limit (molL ⁻¹)
Try	$I=5.52 \times 10^4 C + 0.02$	0.9990	$5.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-4}$	2.0×10^{-6}
Cys	$I=4.60 \times 10^4 C + 0.01$	0.9995	$5.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-4}$	2.0×10^{-6}
GSH	$I=8.52 \times 10^4 C + 0.04$	0.9998	$2.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-4}$	1.0×10^{-6}
UA	$I=1.81 \times 10^4 C + 0.02$	0.9988	$1.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-4}$	5.0×10^{-6}

^a Detection limit was estimated according to three times of signal-noise ratio.

3.4 样品测定及回收率

随机抽取十份血样，按实验方法预处理后，在最佳毛细管电泳-电化学检测条件下进行测试，每份样品平行测定三次，测得血浆中各种小分子抗氧化剂的含量范围为：Try $(7.2 \sim 10.4) \times 10^{-5}$ (molL⁻¹)、Cys $(3.8 \sim 5.6) \times 10^{-5}$ 、GSH $(6.9 \sim 12.3) \times 10^{-4}$ 、UA $(1.4 \sim 3.3) \times 10^{-4}$ 。同时进行回收率实验，各组分的回收率在 91~97%。图 3 为其中一份样品的毛细管电泳图。

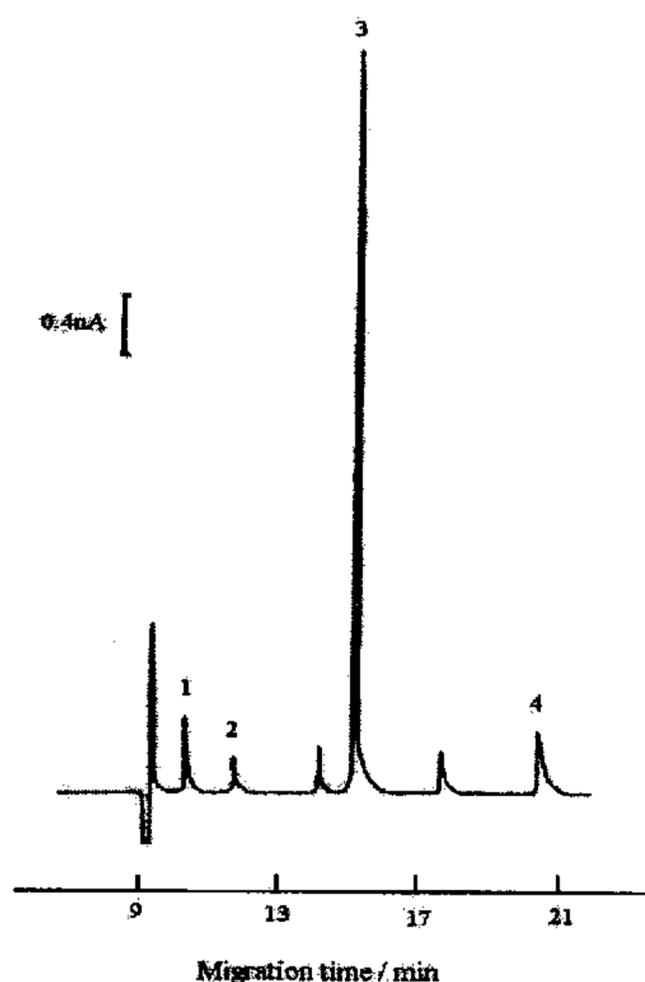


Fig. 3 Electropherograms of one of plasma samples under the optimum conditions of CE-AD. 1 Try, 2 Cys, 3 GSH, 4 UA.

综上所述，以金属铜电极为检测电极，利用毛细管电泳-电化学检测法测定

人血浆中 GSH、UA、Try 和 Cys 等小分子抗氧化剂, 具有分析速度快、灵敏度高优点, 在相关生化检测领域具有一定的实际应用价值。

参考文献

- 1 CHEN Yuan(陈媛), ZHOU Min(周珉). The medical basis and physiopathology of free radical (自由基医学基础与病理生理) [M], Beijing: People Health Press, 2002: 142-149.
- 2 Mecocci P., Polidori M., Troiano L. et al.. Free radical biology & medicine [J], 2000, **28**: 1243-1248.
- 3 Namiki T., Iwasaki Y., Yoshimura O. et al.. J. Chromatogr. B [J], 2003, **785**: 57-63.
- 4 CHENG Jing-Jun (程敬君), KUANG Pei-Gen (匡培根), ZHANG Feng-Ying(张凤英) et al.. Chinese J. Chromatogr. (色谱) [J], 1998, **16**: 167-169
- 5 Wang An-Bao (王安宝), Fang Yu-Zhi (方禹之), Electrophoresis [J]. 2000, **21**: 1281-1290.
- 6 Baldwin R.P., Electrophoresis [J]. 2000, **21**: 4017-4028.
- 7 Matysik F.M., Electroanalysis [J]. 2000, **12**: 1349-1355.
- 8 Ye Jian-Nong (叶建农), Jin Wei(金薇), Zhao Xue-Wei(赵学伟), Fang Yu-Zhi (方禹之), Chem. J. Chin. Univ. (高等学校化学学报) [J]. 1998, **19**: 31-34.
- 9 Song Li-Nan (宋立楠), Fang Rong-Mei (方荣美), Fang Yu-Zhi (方禹之), Chem. J. Chin. Univ. (高等学校化学学报) [J]. 2000, **21**: 541-543.
- 10 Fang Yu-Zhi (方禹之), Fang Xiao-Ming (方晓明), Ye Jian-Nong (叶建农), Chem. J. Chin. Univ. (高等学校化学学报) [J]. 1995, **16**: 1514-1520.
- 11 Fu Chong-Gang (傅崇岗), Song Li-Nan (宋立楠), Fang Yu-Zhi (方禹之), Anal. Chim. Acta [J]. 1999, **399**: 259-263.
- 12 Wang Qing-Jiang (王清江), Yu Hui (余惠), Zong Jun (宗俊), et al., J. Pharm. Biomed. Anal. [J]. 2003, **31**: 473-480.

附录： 博士期间论文发表情况

1. **Qingjiang Wang**, Fei Ding, Hui Li, Pingang He and Yuzhi Fang, Effect of diluting agent on sensitivity in capillary electrophoresis with amperometric detection. **Electrophoresis**. 2003, 24: 1687-1692. (SCI)
2. **Qingjiang Wang**, Fei Ding, Ningning Zhu, Hui Li, Pingang He and Yuzhi Fang, Determination of hydroxyl radical by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **Journal of chromatography A**. 2003, 1016 (1): 123-128. (SCI)
3. **Qingjiang Wang**, Fei Ding, Hui Li, Pingang He and Yuzhi Fang, Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by CZE-AD. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 2003, 30: 1507-1514. (SCI)
4. **Qingjiang Wang**, Hui Yu, Jun Zong, Pingang He and Yuzhi Fang, Determination of the composition of Chinese ligustrum lucidum polysaccharide by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 2003, 31: 473-480. (SCI)
5. **Qingjiang Wang**, Fei Ding, Ningning Zhu, Pingang He and Yuzhi Fang, Determination of polysaccharides from Chinese herbs by CZE-AD. **Biomedical Chromatography**. 2003, 17 (7): 483-488. (SCI)
6. **Qingjiang Wang**, Hui Yu, Fei Ding, Pingang He and Yuzhi Fang, Simultaneous determination of food-related biogenic amines and precursor amino acids by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection. **Food Chemistry**. 2003, 83 (2): 311-317. (SCI)
7. **WANG, Qing-Jiang; DING, Fei; LI, Hui; HE, Pin-Gang; FANG, Yu-Zhi**. Capillary Zone Electrophoresis with Amperometric Detection for Composition Analysis of Laminarin. **Chinese Journal of Chemistry**. 2003, 21: 1198-1203. (SCI)
8. **Qingjiang Wang** and Yuzhi Fang. Invited review: Determination of sugars in Chinese traditional herbs by chromatography. **Journal of chromatography B**. (Accepted) (SCI)
9. Hui Li, **Qingjiang Wang**, Jiming Xu, Wen Zhang, Litong Jin, A novel nano-Au-assembled amperometric SO₂ gas sensor: preparation, characterization and sensing behavior. **Sensors and Actuators B**, 2002, 87: 18-24. (SCI)

10. Xinhui Hu, **Qingjiang Wang**, Pingang He and Yuzhi Fang, Spectroelectro- chemical study on the electrochemical reduction of ethidium bromide. **Analytical Science**, 2002, 18: 645-650. (SCI)
11. Qun Xu, Chun Xu, **Qingjiang Wang**, Kazuhiko Tanaka, Hiroshi Toada, Wen Zhang, Litong Jin, A pplication of a single electrode, modified with polydiphenylamine and dodecyl sulfate, to the simultaneous amperometric determination of electro-inactive anions and cations in ion chromatography, **Journal of Chromatography A**. 2003, 997: 65-71. (SCI)
12. Ningning Zhu, Aiping Zhang, **Qingjiang Wang**, Pingang He, Yuzhi Fang, Lead sulfide nanoparticle as oligonucleotides labels for electrochemical stripping detection of DNA hybridization, **Electroanalysis**, 2004, 16: 577-582. (SCI)
13. Ningning Zhu, Aiping Zhang, **Qingjiang Wang**, Pingang He, Yuzhi Fang, detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes. **Analytica Chimica Acta**, 510 (2004) 163–168. (SCI)
14. Shiyun Ai, Mengnan Gao, Wen Zhang, **Qingjiang Wang**, Yunfeng Xie, Litong Jin. Preparation of Ce-PbO₂ modified electrode and its application in detection of anilines. **Talanta**, 2004, 62(3): 445-450. (SCI)
15. 王清江, 张文, 宗俊, 李辉, 火焰原子吸收分光光度法间接测定海水镁砂中的硼, 华东师范大学学报 (自然科学版), 2001, 4: 71。
16. 李辉, 王清江, 鲜跃仲, 屠惠萍, 金利通, 聚四氨基铜酞菁修饰铂微电极测定溶解氧的研究, 华东师范大学学报 (自然科学版), 2002, 3: 53。

致 谢

本论文是在导师方禹之教授和何品刚教授的精心指导下完成的。衷心感谢方先生三年来在学术上对我的严格要求和孜孜不倦的教诲，先生渊博的学识、诲人不倦的风范、严谨细致的科学态度和全身心投入的工作热情使我受益非浅，也是我以后学习和工作的榜样。也衷心感谢我的另外一位导师何老师，尽管他远在美国，但一直对我的学习和研究工作给予了无微不至的指导和关心，他勇于开创科研新领域的科学精神和勤奋刻苦的研究态度值得我终生学习。

非常感谢在我的学习和生活中给予热情指导和无私帮助的金利通教授、宗巍研究员、叶建农教授、陆嘉星教授、朱民副教授、程圭芳副教授、张文副教授、艾仕云教授、宗俊高工、鲜跃仲副教授、祝宁宁博士、蒋惠芬老师、庄荣华技师。

特别感谢同我一起进行研究工作的余慧、丁飞、陈相、吕金等硕士生同学，论文中的工作是在大家的团结合作、共同努力下完成的，凝聚了大家的集体智慧和辛勤汗水。

非常感谢分析组的其他老师、博士生和硕士生们对我学习和工作上的给予的热情帮助和大力支持！

特别感谢我的妻子李辉博士，感谢她在任何时候都理解我、支持我、鼓励我不断取得进步。特别感谢我的父母对我无微不至的支持和关爱。

最后，再次感谢这么多年来所有关心、帮助过我的老师、同学和朋友！

王清江
2004年4月20日