

基于 pH 响应涂层柱的毛细管电泳法在线富集和分离糖蛋白

张 剑, 徐彩凤, 马彩莲, 贺茂芳, 张 博, 刘春叶*

(西安医学院药学院, 陕西 西安 710021)

摘要:本研究通过静电自组装法制备了一种 3-氨基苯硼酸 (APBA) 修饰的纳米金 (AuNPs@ APBA) 涂层毛细管柱, 该毛细管柱兼具抗非特异性吸附性和富集选择性, 将其作为分离通道, 建立了基于 pH 响应涂层柱的糖蛋白在线富集与分离方法。首先, 采用柠檬酸钠还原法制备金纳米颗粒 (AuNPs), 再将 APBA 通过静电自组装修饰到 AuNPs 表面, 制得 AuNPs@ APBA 纳米材料; 利用离子吸附作用将 AuNPs@ APBA 吸附到毛细管内壁上, 制得 AuNPs@ APBA 涂层毛细管柱。在 pH 为 8 的条件下, 糖蛋白能够与毛细管内表面的硼酸基团结合形成硼酸酯, 从而被吸附; 当 pH 为 3 时, 硼酸酯发生解离并释放出糖蛋白, 基于上述原理, 该方法能够实现糖蛋白的选择性在线富集与分离。实验结果表明, 与使用普通电泳法的裸柱相比, 经 AuNPs@ APBA 涂层毛细管柱富集后, 卵清蛋白 (OVA) 的峰面积增大了 26.46 倍, 而牛血清白蛋白 (BSA) 的峰面积仅增大了 8.47 倍; 并且, 将鸡蛋清样品稀释 1×10^6 倍后, 仍可利用该方法对糖蛋白进行检测。该方法样品用量少, 操作简单, 分离效率高, 可用于实际样品中痕量糖蛋白的在线富集与分离。

关键词:毛细管电泳; 在线富集; 离子吸附; 糖蛋白; 苯硼酸

中图分类号: O658 **文献标识码:** A

On-line enrichment and separation of glycoprotein by capillary electrophoresis based on pH response coating column

ZHANG Jian, XU Caifeng, MA Cailian, HE Maofang, ZHANG Bo, LIU Chunye*

(School of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Abstract: A capillary column coated with 3-aminophenylboronic acid (APBA)-functionalized gold nanoparticles (AuNPs@ APBA) was prepared via electrostatic self-assembly. The coated column exhibited anti-nonspecific adsorption of glycoproteins, enabling selective online enrichment during capillary electrophoresis (CE). First, gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized using the sodium citrate reduction method. Then, APBA was self-assembled electrostatically on the surface of the AuNPs to obtain AuNPs@ APBA. This nanomaterial was bonded to the inner wall of a capillary through ion adsorption to produce a AuNPs@ APBA-coated capillary column. Glycoproteins were adsorbed via bond formation with boric acid groups under alkaline conditions (pH 8) to generate borate esters. Under acidic conditions (pH 3), the borate esters dissociated to release the glycoproteins, thereby achieving the selective online enrichment and separation of glycoproteins. The AuNPs and AuNPs@ APBA were characterized using Fourier

收稿日期: 2023-09-21

* 通讯联系人. Tel: (029) 86177549, E-mail: doris8976@163.com.

基金项目: 陕西省科学技术厅社会发展项目 (2023-YBSF-202); 西安医学院大学生开放实验科研基金项目 (2021DXSS50, 2021DXS68); 西安医学院秦创原·科技成果产业化培育项目 (21CYH01); 西安医学院校内人才项目 (2018XNRC03); 西安医学院科研能力提升计划项目 (2022NLTS063, 2022NLTS069)。

Foundation item: Social Development Project of Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (No. 2023-YBSF-202); Open Experimental Research Fund Project for College Students of Xi'an Medical University (Nos. 2021DXS50, 2021DXS68); Qin Chuangyuan Science and Technology Achievement Industrialization Cultivation Project of Xi'an Medical University (No. 21CYH01); Campus Talent Project of Xi'an Medical University (No. 2018XNRC03); Research Capability Enhancement Plan Project of Xi'an Medical University (Nos. 2022NLTS063, 2022NLTS069)。

本文为“第 24 届全国色谱学术报告会优秀论文专辑”稿件。

transform infrared spectroscopy, and their sizes and Zeta potentials were determined. In addition, the electroosmotic flow (EOF) of the AuNPs@ APBA-coated capillary column was measured. The results showed that the surface of the AuNPs was successfully modified with APBA and that AuNPs@ APBA was adsorbed on the inner wall of the capillary. The peak area of ovalbumin (OVA) on the AuNPs@ APBA-coated column was 26.46 times higher than that on a bare column via conventional electrophoresis. In contrast, the peak area of bovine serum albumin (BSA) only increased by 8.47 times, indicating that the AuNPs@ APBA coated column selectively enriched glycoproteins. Evaluation of the reproducibility and stability of this method revealed that the AuNPs@ APBA coated capillary column could be used continually for 33–67 h. The relative standard deviations (RSDs) of the peak areas for intra-day ($n=5$) and inter-day ($n=6$) analyses were 2.2% and 3.0%, respectively. The developed method was successfully applied to enrich glycoproteins in a 1×10^6 -fold diluted egg white sample. Glycoproteins were not detected using conventional electrophoresis on the bare column, whereas the AuNPs@ APBA-coated capillary column effectively enriched and separated glycoproteins, resulting in a peak area of 10 469 mAU · ms. Furthermore, the entire enrichment and separation process was completed within 3 min. This new online enrichment and separation method for glycoproteins has the advantages of low sample consumption, simple operation, and high separation efficiency.

Key words: capillary electrophoresis (CE); on-line enrichment; ion adsorption; glycoprotein; phenylboronic acid

糖蛋白是生物体内重要的功能蛋白,主要包括转录因子、染色质结合蛋白、RNA 聚合酶 II、核孔蛋白、蛋白质翻译调控因子等。糖蛋白不仅具有独特的理化性质,还参与多项生理活动;同时,糖蛋白在病原对宿主的感染、癌症的发生和转移等生物过程中也起着重要作用,这使其成为癌症预后和诊断的重要靶点^[1,2]。此外,不同细胞阶段表达的糖蛋白水平及糖蛋白类型的改变与许多人类疾病相关^[3]。因此,针对蛋白质糖基化过程的研究不仅有利于加深对糖蛋白生物功能的认识,而且对探讨疾病发生、发现疾病标记物^[4,5]和开发新药均具有重要意义。

糖蛋白在生物样品中的含量较低,对糖蛋白的含量进行测定时会同时受到其他高丰度组分的干扰,因此建立痕量糖蛋白的高选择性分离富集方法,对糖蛋白的研究至关重要^[6]。针对糖蛋白结构中的糖链或其本身的理化性质,现有的富集策略主要包括凝集素亲和色谱法^[7]、硼亲和色谱法^[8,9]、胍化学方法^[10]和亲水作用色谱法(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)^[11]。硼亲和色谱法

是糖蛋白分离富集的有效方法之一,其可通过改变 pH 来实现糖蛋白的选择性吸附与释放,但该方法存在试剂用量大、分析耗时久等问题。毛细管电泳(CE)具有分析速度快、试剂用量小、分离效率高等优点,已广泛应用于蛋白质的分离分析^[12,13],但将 CE 用于糖蛋白的分离分析却报道较少^[14,15],并且用于糖蛋白富集毛细管柱的制备步骤繁琐,耗时较长(>30 h)^[14]。针对以上情况,将硼亲和色谱法与 CE 结合,将有利于简化 CE 对糖蛋白的富集过程^[16]。

基于上述问题,本研究首先制备了 3-氨基苯硼酸(APBA)修饰的纳米金(AuNPs@ APBA),利用离子吸附作用将 AuNPs@ APBA 吸附到毛细管内壁,制得 pH 响应型涂层毛细管柱,并以此涂层毛细管柱为分离通道,实现了糖蛋白的在线富集与分离。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P/ACE MDQ 毛细管电泳仪(美国贝克曼库尔特有限公司); TENSOR 27 傅里叶红外光谱仪(德

引用本文:张剑,徐彩凤,马彩莲,贺茂芳,张博,刘春叶. 基于 pH 响应涂层柱的毛细管电泳法在线富集和分离糖蛋白. 色谱, 2024, 42(9):903–908.

ZHANG Jian, XU Caifeng, MA Cailian, HE Maofang, ZHANG Bo, LIU Chunye. On-line enrichment and separation of glycoprotein by capillary electrophoresis based on pH response coating column. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(9):903–908.

国布鲁克公司);熔融石英毛细管柱(60.2 cm×75 μm)(永年县锐沣色谱器件有限公司);MalvernZen3600 激光粒度仪和 Zeta 电位仪(英国马尔文公司);PB-10 pH 计(德国赛多利斯股份公司)。

氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,纯度 99.5%,上海阿拉丁试剂有限公司);柠檬酸钠(纯度 99%,天津市盛奥化学试剂公司);APBA(纯度 98%,北京百灵威科技有限公司);柠檬酸(分析纯,西安化学试剂厂);海美溴铵(HDB,纯度≥94.0%,西格玛化学试剂有限公司);牛血清白蛋白(BSA,纯度≥98.0%,上海源叶生物技术有限公司);卵清蛋白(OVA,纯度 95.0%,北京索莱宝生物科技有限公司);二甲基亚砜(DMSO,分析纯,天津市天力化学试剂有限公司);所有实验用水均为去离子水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 AuNPs@APBA 的制备

采用柠檬酸钠还原法制备 AuNPs。精密量取 3.5 mL 氯金酸水溶液(25.4 mmol/L)和 96.5 mL 去离子水于配有磁力搅拌子的 250 mL 三颈烧瓶中,在油浴中加热并搅拌至沸腾;加大搅拌速度,快速加入 10 mL 柠檬酸钠水溶液(38.8 mmol/L),待溶液颜色变为透亮的酒红色后,继续搅拌 10 min;之后在搅拌状态下将溶液自然冷却至室温,并在室温下继续搅拌 15 min,即得到 AuNPs。移取 5 mL AuNPs 分散液于 15 mL 烧杯中,加入 0.25 mg APBA,在室温下搅拌反应 6 h,即得 AuNPs@APBA,于 4 ℃冰箱中保存。

1.3 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱的制备

取熔融石英毛细管柱,分别用 1 mol/L NaOH 溶液、去离子水、1 mol/L HCl 溶液、去离子水冲洗 60、5、15、5 min,以活化毛细管柱。

在 137.9 kPa 压力下,向活化后的毛细管柱内通入质量分数为 0.1% 的 HDB 水溶液,持续 2 min,

停留 5 min,之后吹去未吸附的溶液,获得 HDB 涂覆的正电荷涂层毛细管柱;在 137.9 kPa 压力下,将 AuNPs@APBA 分散液(1.14 nmol/L)注入上述毛细管柱,持续 2 min,在柱内停留 5 min 后吹去未吸附的 AuNPs@APBA,重复上述操作进行二次涂层,即得到 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱。

1.4 样品制备

分别精密称取 0.504 8 g OVA 和 0.501 3 g BSA,加入去离子水溶解,并分别定容于 50 mL 容量瓶中,混匀,即得质量浓度为 1.0 mg/mL 的 OVA 和 BSA 样品溶液。

将新鲜鸡蛋清样品用去离子水稀释 20 倍,于室温下搅拌 10 min,在 4 ℃、10 000 r/min 下离心 10 min,所得到的上清液即为鸡蛋清母液;用去离子水对鸡蛋清母液进行稀释,即得到不同稀释倍数的鸡蛋清样品。

1.5 糖蛋白的在线富集与分离

基于 pH 响应涂层柱的 CE 法:在 137.9 kPa 压力下,用磷酸盐缓冲液(PBS, 10 mmol/L, pH 8)冲洗 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱 5 min,在 20 kV 电压下预电泳 2 min,之后将糖蛋白样品在 3.4 kPa 压力下进样,进样时间 5 s;在 137.9 kPa 压力下,用 PBS(10 mmol/L, pH 8)冲洗 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱 1 min,在 34.5 kPa 压力下向毛细管柱中注入 PBS(10 mmol/L, pH 3),持续 10 s,随后在 20 kV 电压下、pH 为 3 的 PBS(10 mmol/L)中进行分离(图 1)。实验过程中柱温设置为 25 ℃,紫外检测波长设置为 214 nm。

普通电泳法:在 137.9 kPa 压力下,用 PBS(10 mmol/L, pH 7)冲洗裸柱 5 min,之后将糖蛋白样品在 3.4 kPa 压力下进样,进样时间 5 s。实验过程中电压设置为 20 kV,柱温设置为 25 ℃,紫外检测波长设置为 214 nm。

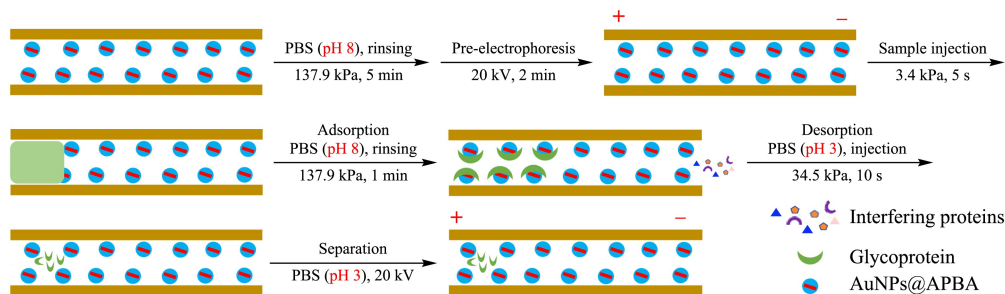


图 1 糖蛋白的在线富集与分离示意图

Fig. 1 Illustration of the on-line enrichment and separation for glycoproteins
AuNPs@APBA: 3-aminophenylboronic acid (APBA)-functionalized gold nanoparticles.

2 结果与讨论

2.1 AuNPs 与 AuNPs@APBA 的表征

利用柠檬酸钠还原法制备的 AuNPs 表面含有羧基,而 APBA 的表面含有氨基,二者通过静电相互作用结合。对 AuNPs 和 AuNPs@APBA 进行红外光谱(FT-IR)表征,结果如图 2 所示,AuNPs@APBA 在 $1\,358\text{ cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰归属于苯硼酸中的 B-O,证实了 AuNPs@APBA 的成功制备。对 AuNPs 和 AuNPs@APBA 进行粒径和 Zeta 电位表征,结果表明,AuNPs 的粒径为 $(29.33 \pm 1.26)\text{ nm}$,Zeta 电位为 $(-69.50 \pm 1.12)\text{ mV}$; AuNPs@APBA 的粒径为 $(37.03 \pm 0.30)\text{ nm}$,Zeta 电位为 $(-48.10 \pm 0.41)\text{ mV}$;在修饰了 APBA 后,AuNPs 的粒径和 Zeta 电位均增大,表明 APBA 已成功修饰到 AuNPs 的表面。此外,根据测得的 AuNPs 粒径及文献[17],计算得到本实验所制备的 AuNPs 浓度为 1.14 nmol/L 。

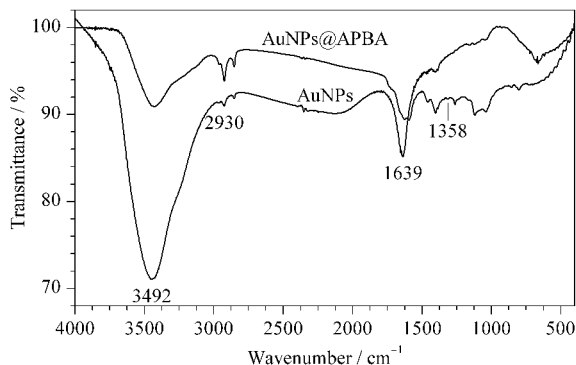


图 2 AuNPs 和 AuNPs@APBA 的 FT-IR 图

Fig. 2 FT-IR spectra of AuNPs and AuNPs@APBA

2.2 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱的表征

本研究利用 DMSO 来验证 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱的性能。实验结果表明,经 HDB 涂覆后,DMSO 的出峰时间由 5.05 min 延长至 10.88 min ,电渗流(EOF)值从 $2.978 \times 10^{-2}\text{ cm}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$ 降低至 $1.383 \times 10^{-2}\text{ cm}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$,由此可知毛细管柱内壁已成功修饰正电荷涂层;经 AuNPs@APBA 涂覆后,DMSO 的出峰时间由 10.88 min 缩短至 9.70 min ,EOF 值增大至 $1.552 \times 10^{-2}\text{ cm}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$,该结果表明 AuNPs@APBA 已成功涂覆至毛细管柱内壁。

2.3 解吸附条件的考察

在 pH 为 8 的条件下,糖蛋白能够与 AuNPs@

APBA 表面的硼酸基团结合形成硼酸酯,从而被吸附;当 pH 为 3 时,硼酸酯发生解离,糖蛋白被释放。基于上述原理,AuNPs@APBA 涂层毛细管柱可实现糖蛋白的选择性在线富集与分离。在糖蛋白的解吸附过程中,PBS 的注入压力会对糖蛋白的富集分离效果产生影响。本实验以稀释 1×10^6 倍的鸡蛋清样品为考察对象,优化了解吸附过程中 PBS(pH 3)的注入压力。由图 3 可知,当 PBS(pH 3)的注入压力分别为 137.9 kPa 和 103.4 kPa 时(注入时间均为 10 s),电泳峰的基线不稳且存在拖尾现象;当注入压力降低至 34.5 kPa 时,电泳峰基线平稳,样品峰的峰面积可达 $17\,226\text{ mAU} \cdot \text{ms}$,理论塔板数可达 $134\,485\text{ 个/m}$,对称因子为 0.991 ,可见适当减小注入压力有助于提高糖蛋白样品的富集分离效果。分析其原因,注入压力过大可能会导致样品的解吸附速度产生差异,从而会导致电泳峰基线不稳及拖尾现象等。因此,本实验最终选择在 34.5 kPa 压力下注入 PBS(pH 3),注入时间为 10 s 。

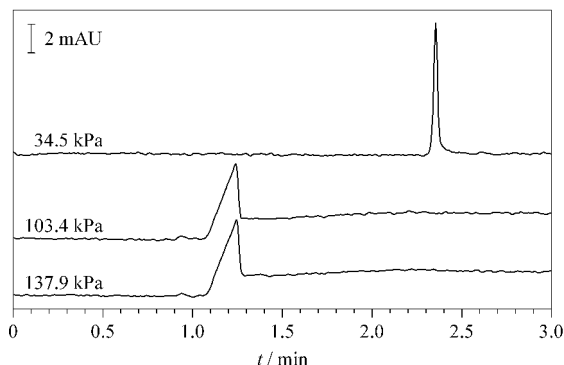


图 3 鸡蛋清样品(稀释 1×10^6 倍)在不同注入压力下的电泳图

Fig. 3 Electropherograms of egg whites (1×10^6 -fold diluted) under different injection pressures

2.4 OVA 和 BSA 的在线富集与分离

利用本文所建方法对 OVA(1.0 mg/mL)和 BSA(1.0 mg/mL)样品溶液进行在线富集与分离,并通过峰面积的增大倍数来评价富集效果,其中峰面积的增大倍数为样品在基于 pH 响应的 AuNPs@APBA 涂层柱和基于普通电泳法的裸柱中所得峰面积之比。如图 4a 和 4b 所示,经 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱分离后,OVA 和 BSA 的峰面积分别增大了 26.46 倍和 8.47 倍,表明本文所制备的 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱对糖蛋白的富集效果优于普通蛋白(BSA),具有选择性富集作用;此外,与普通电泳法的裸柱相比,pH 响应涂层柱的富集效果

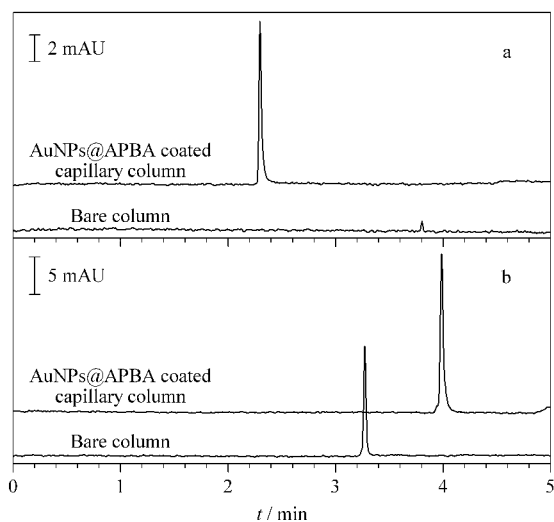


图 4 (a) OVA 和 (b) BSA 经 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱和裸柱分离后的电泳图

Fig. 4 Electropherograms of (a) ovalbumin (OVA) and (b) bovine serum albumin (BSA) after separated by AuNPs@APBA coated capillary column and bare column

明显更好。与本课题组^[16]前期制备的 APBA-聚甲基丙烯酸缩水甘油酯微球 (PGMA@APBA) 涂层毛细管柱相比, OVA 的峰面积增大了约 20 倍, 这可能是因为与 PGMA 微球 (粒径 (138.00 ± 0.20) nm) 相比, AuNPs 的比表面积更大, 能够吸附更多的 APBA 分子, 有助于提高糖蛋白的富集效果。

2.5 重复性和稳定性考察

以 OVA 样品溶液 (1.0 mg/mL) 为例, 利用本文所建方法进行在线富集与分离, 测定 OVA 的电泳峰面积; 于 1 d 内平行测定 5 次, 计算日内精密度; 连续测定 6 d, 计算日间精密度。实验结果表明, OVA 电泳峰面积的日内和日间精密度分别为 2.2%

($n=5$) 和 3.0% ($n=6$), 方法重复性良好。在使用过程中, 缓冲液的冲洗或其他因素都容易造成毛细管柱的涂层脱落, 使其稳定性变差, 故本实验对 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱的稳定性进行了考察。实验结果表明, 当 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱连续运行 100 次 (总计 33~67 h) 时, 其对鸡蛋清样品 (稀释 1×10^6 倍) 中的糖蛋白仍具有一定的富集效果 (第 100 次时峰面积仍达 $6\,505$ mAU · ms), 说明本工作所制备的 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱稳定性良好, 能够满足实际应用需求。

2.6 实际样品中糖蛋白的富集与分离

以不同稀释倍数下的鸡蛋清为实际样品, 考察本方法对鸡蛋清样品中痕量糖蛋白的富集分离效果。不同稀释倍数下鸡蛋清样品的电泳图如图 5 所示, 将鸡蛋清样品稀释 20 倍后, 与使用普通电泳法的裸柱相比, 其在 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱上的峰面积增大了 1.15 倍 (图 5a); 将鸡蛋清样品稀释 2×10^3 倍后, 与使用普通电泳法的裸柱相比, 其在 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱上的峰面积可增大至 33.93 倍 (图 5b); 将鸡蛋清样品稀释 1×10^6 倍后, 裸柱 (普通电泳法) 已无法检测到糖蛋白, 而 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱对糖蛋白的富集分离效果仍非常明显, 峰面积为 $10\,469$ mAU · ms (图 5c), 且整个富集分离过程可在 3 min 内完成。实验结果证明, 该方法可用于实际样品中痕量糖蛋白的在线富集与分离。此外, 对于稀释了 20 倍和 2×10^3 倍后的鸡蛋清样品, 通过本方法富集后的糖蛋白峰面积相差不大, 推测可能与毛细管内壁所吸附的 AuNPs@APBA 数量有关: 当涂覆至毛细管内壁的 AuNPs@APBA 数量一定时, 毛细管柱所能捕获的糖蛋白数

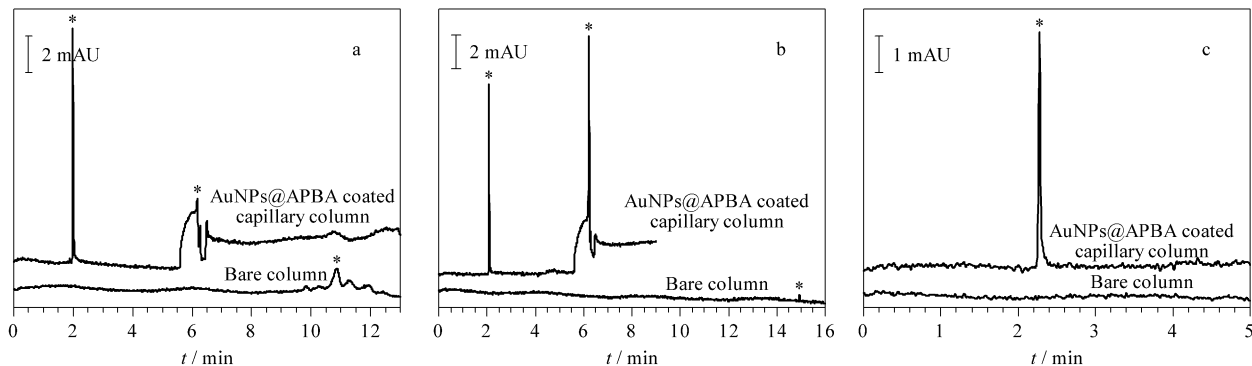


图 5 不同稀释倍数下的鸡蛋清样品经 AuNPs@APBA 涂层毛细管柱和裸柱分离后的电泳图

Fig. 5 Electropherograms of egg white samples at different dilution ratios separated by AuNPs@APBA coated capillary column and bare column

a. 20-fold diluted; b. 2×10^3 -fold diluted; c. 1×10^6 -fold diluted; * chromatographic peak of glycoprotein.

量存在上限。因此,对糖蛋白含量较高的样品进行富集分离时,需进一步提高毛细管柱内壁单位面积上硼酸基的数量,以吸附更多的糖蛋白分子。

3 结 论

本研究通过静电自组装法制备了 AuNPs@ AP-BA 涂层毛细管柱,建立了一种基于 pH 响应涂层柱的糖蛋白在线富集与分离方法。该方法利用 APBA 与糖蛋白之间的特异性相互作用,并通过改变 pH 条件实现了糖蛋白的在线富集与分离。该方法操作简单,省时,高效,弥补了化学键合涂层柱的不足,但利用本方法所涂覆的 APBA 数量有限,限制了该涂层柱对高含量糖蛋白样品的富集效果,未来可考虑采用含有多个硼酸基的聚合物刷对毛细管进行涂覆,通过改变聚合物刷的长度来调控硼酸基数量,从而满足不同含量糖蛋白样品的富集要求。

参考文献:

[1] Bao H M, Xie L Q, Lu H J. Chinese Journal of Chromatography, 2016, 34(12): 1145
包慧敏, 谢力琦, 陆豪杰. 色谱, 2016, 34(12): 1145

[2] An C W, Li H X, Jiao L L. International Journal of Laboratory Medicine, 2020, 41(21): 2645
安崇文, 李海霞, 焦莉莉. 国际检验医学杂志, 2020, 41(21): 2645

[3] Zhou Y X, Zhang J Q, Wen P. Journal of Jiangsu University (Medicine Edition), 2004, 14(3): 58
周云祥, 张建琴, 闻平. 江苏大学学报(医学版), 2004, 14(3): 58

[4] Liu Z. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(6): 497
刘震. 色谱, 2022, 40(6): 497

[5] Gabius H. Biochem SOC T, 2011, 39: 399

[6] Chang Y C, Huang C N, Lin C H, et al. Proteomics, 2010, 10(16): 2961

[7] Goumenou A, Delaunay N, Pichon V. Front Mol Biosci, 2021, 8: 746822

[8] Cerrato A, Cavaliere C, Montone C M, et al. Anal Chim Acta, 2023, 1245: 340862

[9] Liu D, Meng L, Huang L, et al. Anal Methods, 2020, 12: 5635

[10] Bai H H, Pan Y T, Qi L, et al. Talanta, 2018, 186: 513

[11] Saleem S, Sajid M S, Hussain D, et al. Anal Bioanal Chem, 2020, 412: 1509

[12] Grosas A B, Du Plessis M D, Thevarajah J J, et al. Chem-biochem, 2024, 25(11): e202400108

[13] Hajba L, Guttman A. J Chromatogr A, 2024, 1716: 464642

[14] Shao H, Reider B, Jarvas G, et al. Anal Chim Acta, 2020, 1134: 1

[15] Zhang C, Schumacher K N, Dodds E D, et al. J Chromatogr B, 2021, 1179: 122855

[16] Zhang J, Miao Y, Jing H, et al. J Chromatogr B, 2024, 1234: 124013

[17] Haiss W, Thanh N T, Aveyard J, et al. Anal Chem, 2007, 79(11): 4215