

基于毛细管电泳和离子迁移率经验公式测定洛伐他汀的绝对淌度和解离常数

罗芳¹, 郭泽华², 曹成喜², 樊柳荫^{3*}, 张薇^{1*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240;

2. 上海交通大学电子信息与电气工程学院, 上海 200240; 3. 上海交通大学学生创新中心, 上海 200240)

摘要:作为一种可以预防动脉粥样硬化和冠心病的潜在药物洛伐他汀,其绝对淌度 m_0 和解离常数 pK_a 值的测定有助于其性质与应用的研究。在前期相关研究基础上,该文提出了一种基于毛细管区带电泳(CZE)和离子淌度经验公式测定洛伐他汀 m_0 和 pK_a 的新方法。首先,根据经验公式由实际淌度(m_{act})、有效淌度(m_{eff})和 m_0 之间的关系推导出 m_0 的计算公式。对于一元酸 HA,根据之前 m_0 的计算公式,以氢离子的浓度为自变量, m_{eff} 的倒数为因变量可得到一条直线。根据这条直线的斜率计算得到 pK_a 。为了验证该方法的可行性和可靠性,应用该方法测定了巴比妥酸、苯甲酸、苯胺、苯酚、间甲酚等有机酸碱的 m_0 和 pK_a 值。同时,对于 pH 值低于 6 的缓冲体系,采用反向毛细管电泳技术,测定其 pK_a ,并将测得的实验结果与理论参考值进行对比,发现两者具有较高的一致性, m_0 的标准偏差小于 6.0%, pK_a 的标准偏差小于 6.2%,且由线性回归方程的相关系数(R)可以看出测定 pK_a 时的线性回归直线拟合度较好,说明该文建立的新方法具有较高的可靠性。最后基于这种 CZE 与经验公式结合的新方法,采用二甲基亚砜(DMSO)作为电渗流标记物测定了洛伐他汀的 m_0 和 pK_a ,得到的值分别为 $-1.70 \times 10^{-8} \text{ m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$ 和 9.00。该方法适用于酸性和碱性分析物 m_0 和 pK_a 等理化参数的测定,在药物分析尤其是新药理化特性研究中具有重要意义。

关键词:毛细管区带电泳;经验方程;淌度;解离常数;洛伐他汀

中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2021)12-1362-06

Determination of absolute mobility and dissociation constant of lovastatin using capillary electrophoresis and empirical equation of ion mobility

LUO Fang¹, GUO Zehua², CAO Chengxi², FAN Liuyin^{3*}, ZHANG Wei^{1*}

(1. School of Life Science and Biotechnology, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao

Tong University, Shanghai 200240, China; 2. School of Electronic Information & Electrical Engineering,

Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 3. Student Innovation Center,

Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: In capillary electrophoresis, determination of the basic physical and chemical properties of compounds, such as absolute mobility (m_0) and dissociation constant (pK_a), is of great practical significance. This is because the aforementioned properties are often used for the qualitative or quantitative analyses of the relevant compounds toward their application as potential drugs. Lovastatin is a potential drug candidate that can reduce the levels of cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol in the blood, as well as prevent atherosclerosis and coronary heart disease. For a more convenient and rapid investigation of the properties and applications of lovastatin, it is necessary to determine its m_0 and pK_a values. However, existing research on

收稿日期:2021-01-12

* 通讯联系人.E-mail:linda_z@sjtu.edu.cn(张薇);E-mail:lyfan@sjtu.edu.cn(樊柳荫).

基金项目:国家自然科学基金(22074091,21605101).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (Nos. 22074091, 21605101).

capillary electrophoresis for lovastatin and other related drugs focus on their quantitative determination, and their action mechanism and functions. Unfortunately, there are very few studies aimed at the determination of the m_0 and pK_a values of lovastatin. Based on related studies, this paper herein proposed a novel method to determine m_0 and pK_a of lovastatin. The present study mainly included a calculation method and experimental verification. The calculation method was based on capillary zone electrophoresis (CZE) and the empirical formula of ion mobility. First, on the basis of the empirical formula, the calculation formula for m_0 was derived from the relationship between the actual mobility (m_{act}), effective mobility (m_{eff}) and m_0 . Second, for a monovalent acid (HA), according to the calculation formula for m_0 part, considering the hydrogen ion concentration as the independent variable and the reciprocal of m_{eff} as the dependent variable, a straight line was obtained on the coordinate axis. From the slope of this straight line, the dissociation equilibrium constant K_a was obtained directly, and pK_a was calculated easily. After the derivation of m_0 and pK_a in the theoretical part, the feasibility and reliability of this method were verified by using it to determine the m_0 and pK_a values of several organic acids and bases (barbituric acid, benzoic acid, benzylamine, phenol, and *m*-cresol) in the experimental part. Note that for the buffer system with $pH < 6.0$, reverse capillary electrophoresis was used for the determination of pK_a , because this technique helped shorten the migration time and facilitates the detection of analytes that could not reach the cathode. After obtaining m_0 and pK_a , the theoretical reference values for these parameters were obtained by PeakMaster 5.1. The experimental data were well consistent with the theoretical m_0 and pK_a values. The standard deviation (SDs) of m_0 and pK_a were less than 6.0% and 6.2%, respectively. From the correlation coefficient (R) of the linear regression equation, it was found that the linear regression lines of pK_a fit well, indicating the excellent reliability of this method. Finally, with this simple and reliable method, dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a marker for electroosmotic flow to determine the m_0 and pK_a values of lovastatin ($-1.70 \times 10^{-8} \text{ m}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$ and 9.00, respectively). This method is suitable for the determination of m_0 and pK_a of acidic and basic analytes. The method has high accuracy and is expected to play an indispensable role in drug analysis.

Key words: capillary zone electrophoresis (CZE); empirical equation; mobility; dissociation constant; lovastatin

近年来,生物化学工程的迅速发展使得大量化合物成为潜在候选药物,了解这些化合物理化性质的需求也日益增长。这也对如绝对淌度(m_0 , $\text{m}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$)和解离常数(pK_a)等理化参数的测定方法提出了更高要求。其中, m_0 指化合物在离子强度趋于零的条件下的淌度,而 pK_a 是水溶液中具有一定解离度的溶质的极性参数。

洛伐他汀是胆固醇合成通路中重要酶羟甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMG-CoA还原酶)的抑制剂,可减少血胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的含量,预防动脉粥样硬化和冠心病等^[1]。洛伐他汀的最大吸收波长 λ_{max} 为238 nm,可溶于碱性溶液。洛伐他汀包括内酯型和酸型(见图1),而内酯型洛伐他汀的亲脂性较强,口服吸收率低,须在肝脏中水解成酸

引用本文:罗芳,郭泽华,曹成喜,樊柳荫,张薇. 基于毛细管电泳和离子迁移率经验公式测定洛伐他汀的绝对淌度和解离常数. 色谱, 2021, 39(12):1362-1367.

LUO Fang, GUO Zehua, CAO Chengxi, FAN Liuyin, ZHANG Wei. Determination of absolute mobility and dissociation constant of lovastatin using capillary electrophoresis and empirical equation of ion mobility. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(12):1362-1367.

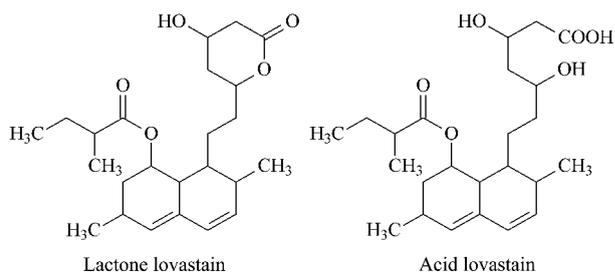


图 1 内酯洛伐他汀和酸性洛伐他汀的结构

Fig. 1 Structures of lactone lovastatin and acid lovastatin

型后才能发挥药理作用。当环境 pH 值高于 7.7 时,内酯型洛伐他汀转化为酸型洛伐他汀^[2]。因而有必要对洛伐他汀的重要理化参数进行测定,了解其理化特性,从而为更深入的研究提供基本数据和信息。但是,目前大多数对洛伐他汀药物的研究工作主要聚焦于含量测定、作用机理和功能方面,关于测定洛伐他汀 m_0 和 pK_a 值的研究则较少^[1-3]。

当前已经有许多关于其他化合物 pK_a 值的测定方法,其中最经典的方法是电位计滴定法和光谱法^[4-8]。但这些方法相对来说需要耗费大量样品,并且对于纯度低的化合物测定结果不够准确^[9,10]。自 20 世纪 70 年代以来,高效液相色谱法 (HPLC) 也已应用于化合物 pK_a 的测定中^[11-15]。Bartolini 等^[16]使用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 测定乙酰胺的 pK_a ,但液相色谱方法流动相溶液消耗较多,而且单个样品分析时间至少 10 min 以上,比较耗时。包括毛细管等速电泳法 (ITP) 和毛细管区带电泳法 (CZE) 等在内的毛细管电泳法 (CE) 也广泛应用于水溶性化合物 pK_a 值的测定中^[17-25]。

本研究基于 CZE 和离子淌度的经验方程^[26-28],建立了一种精确测定洛伐他汀 m_0 和 pK_a 的新方法。根据经验方程,可以由测得的实际淌度 (m_{act} , $m^2/(V \cdot s)$) 计算 m_0 ,再通过 m_0 进一步计算得到 pK_a 。在方法验证部分,使用该方法测定了巴比妥酸、苯甲酸、苄胺、苯酚、间甲酚等有机酸碱的 m_0 和 pK_a 。对 pH 值低于 6 的缓冲体系,加入阳离子表面活性剂,采用反向毛细管电泳技术,测定其 pK_a 值。将测定值和理论参考值进行比较,结果发现二者一致性较高,说明该方法具有较高的可靠性。最后应用该方法测定洛伐他汀的 m_0 和 pK_a 。

1 理论推导

1.1 m_0 的计算方法

在 CZE 中,有效淌度的计算方法如下^[29]:

$$m_{eff} = m_{app} - m_{EOF} = \frac{L_{tot} L_{eff}}{V} \left(\frac{1}{t_{obs}} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (1)$$

其中, m_{eff} 和 m_{app} 分别表示分析物的有效淌度和表观淌度 ($m^2/(V \cdot s)$), m_{EOF} 表示其电渗流淌度 ($m^2/(V \cdot s)$), L_{tot} 和 L_{eff} 分别为毛细管的总长度和有效长度 (m), V 表示所施加的电压 (V), t_{obs} 是观察到的分析物迁移时间 (s), t_{EOF} 是电渗流下观察到的中性标记物迁移时间 (s)。

对于一价弱酸来说, m_{act} 与 m_{eff} 之间的关系为^[30]:

$$m_{eff} = m_{act} \alpha \quad (2)$$

其中, m_{act} 是实际淌度,即在给定的离子强度下完全质子化或去质子化离子的淌度 ($m^2/(V \cdot s)$)。 α 是解离度。对于一价酸 HA, 解离度可定义为:

$$\alpha = \frac{C_{HA} - [HA]}{C_{HA}} = \frac{[A^-]}{C_{HA}} \quad (3)$$

式中, C_{HA} 是反应开始时一元酸的浓度 (mol/L), $[HA]$ 、 $[A^-]$ 和 $[H^+]$ 分别是反应达到平衡时溶液中一元酸 HA、 A^- 和 H^+ 的浓度。当分析物 100% 电离时,其解离度 α 趋于 1,此时式(2)可写为:

$$m_{eff} = m_{act} \quad (4)$$

一价离子 m_0 的经验公式^[26-28,30-32]可以写成:

$$m_{act} = m_0 \exp(-\eta \sqrt{zI}) \quad (5)$$

其中, η 为常数,当电荷数 z 为 1 时 (即一元酸或碱), η 为 0.503 0; 当 z 大于等于 2 时, η 为 0.662 9。 I 为离子强度,根据以下公式来计算:

$$I = 1/2 \sum c_i z_i^2 \quad (6)$$

式中, c_i 和 z_i 代表组分 i 的浓度 (mol/L) 和电荷数。将式(4)代入式(5)可得 m_0 为:

$$m_0 = \frac{m_{act}}{\exp(-\eta \sqrt{zI})} = \frac{m_{eff}}{\exp(-\eta \sqrt{zI})} \quad (7)$$

需要注意,等式(5)和(7)仅适用于 $I \leq 0.1$ mol/L 和 25 °C 条件下。

综上,当分析物处于完全解离状态时,全部以离子形式存在,溶液中无分析物的分子形态。因此可以根据分析物的 pK_a 理论参考值,选择合适 pH 值的缓冲液以确保分析物能完全解离。在固定的 pH 下,可以得到分析物在特定离子强度下的 m_{act} ,并根据公式(7)计算分析物在不同离子强度下的 m_0 。

1.2 pK_a 的计算方法

对于一元酸 HA 来说,解离平衡常数为:

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \quad (8)$$

将式(3)代入式(8),得:

$$K_a = \frac{\alpha [H^+]}{1-\alpha} \quad (9)$$

由式(9)进一步可得:

$$pH = pK_a + \log \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (10)$$

根据式(10),如果溶液的 pH 值比酸性(或碱性)分析物的 pK_a 值大(或小)3,即 $\log(\alpha/(1-\alpha))$ 的值为 3 时,经计算 α 为 0.999,则分析物处于完全解离状态,此时满足 1.1 节中 m_0 的测定条件。结合公式(2)和(9),可得:

$$\frac{1}{m_{\text{eff}}} = \frac{1}{m_{\text{act}}} + \frac{[H^+]}{m_{\text{act}} K_a} \quad (11)$$

由式(11)可知, $1/m_{\text{eff}}$ 与 $[H^+]$ 成正比,可通过计算 pH 值得到。当离子强度一定时,在不同的 pH 值下可以得到一系列 m_{eff} 值。以氢离子浓度为自变量(x), $1/m_{\text{eff}}$ 为因变量(y),得到一条线性回归直线。该直线的斜率 $1/(m_{\text{act}} K_a)$ 。由斜率和公式(5)中计算得到的 m_{act} ,可以求得分析物的 K_a ,从而进一步求得其 pK_a 。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

高效毛细管电泳仪(1229型,北京新技术仪器有限公司);未涂覆熔融石英毛细管(总长 50 cm(有效长度为 25 cm 和 40 cm)、内径 75 μm ,中国河北永年光纤厂);超纯水系统(德国 SG Water 公司)用以生产电导率低至 0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 的超纯水;pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸三钠、磷酸二氢钠、二甲基亚砜(DMSO)、乙酸、醋酸钠、丙酮、巴比妥酸、苯甲酸、苯酚、间甲酚等试剂均购自上海化学试剂公司;苄胺(纯度>99%)购自美国 Fluka 公司;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)(纯度>99%)购自中美生物科技有限公司;洛伐他汀片(20 mg/片)购自浙江海正股份有限公司。

2.2 背景电解质溶液的制备

对于 m_0 的测定,制备表 1 所示的一系列 pH 值相同而离子强度不同的磷酸盐缓冲液,每种缓冲液均制备 5 种离子强度(0.01、0.04、0.05、0.09 和 0.1 mol/L)。

表 1 测定 m_0 所用缓冲液

Buffer system	pH	Analyte
Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4	8.00	barbituric acid
Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4	8.00	benzoic acid
Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4	6.00	benzylamine
Na_2HPO_4 -NaOH	12.50	phenol
Na_2HPO_4 -NaOH	12.50	<i>m</i> -cresol

All pH were measured at 25 $^\circ\text{C}$.

对于 pK_a 的测定,制备表 2 所示的一系列离子强度相同(0.05 mol/L)而 pH 值不同的磷酸盐和醋酸盐缓冲液。所有缓冲液用 0.45 μm 过滤器过滤并保证在两周内使用。

表 2 测定 pK_a 所用缓冲液

Buffer system	pH	$I/(\text{mol/L})$
Na_2HPO_4 -NaOH	12.50-12.00	0.05
Na_2HPO_4 - Na_3PO_4	11.00-9.00	0.05
Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4	8.00-6.00	0.05
NaAc-HAc	5.00-4.00	0.05

I : ionic strength. All pH were measured at 25 $^\circ\text{C}$

2.3 样品的制备

巴比妥酸、苯甲酸、苄胺、苯酚、间甲酚样品分别以 1、30、10、0.8、2 mg/mL 溶于纯水中。用相应缓冲液将样品分别稀释至终浓度为 0.02、0.06、2、0.08、0.10 mg/mL 后进样。洛伐他汀样品以 1 mg/mL 溶解于 75% 乙醇中,用对应缓冲液稀释至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后进样。

2.4 毛细管预处理及电泳条件

每次进样前将毛细管依次用 1.0 mol/L NaOH、超纯水和 1.0 mol/L HCl 分别冲洗 20、10 和 20 min,最后用该样品对应的缓冲液冲洗 30 min。当缓冲液的 pH 值等于或低于 6.0 时(本实验中为乙酸缓冲液),在缓冲体系中加入 0.8% (v/v) 阳离子表面活性剂 CTAB,并用含有 CTAB 的缓冲液冲洗毛细管 10 min,然后进行电泳实验。

实验控制在 25 $^\circ\text{C}$ 室温下进行,设置分离电压为 10~15 kV,并以 1.33 kPa 的压力从毛细管阳极端(在常规 CZE 下)或从毛细管阴极端(反向 CZE 下)注入样品。进样过程持续 10 s,根据分析物的性质选择合适的吸收波长(巴比妥酸和间甲酚用 214 nm,苯甲酸、苄胺和苯酚用 254 nm)。使用二甲基亚砜(214 nm 紫外吸收波长)或丙酮(254 nm 紫外吸收波长)作为中性标记物来标记电渗流(EOF)。

3 结果与讨论

3.1 不同分析物 m_0 和 pK_a 的测定结果

实验结果根据 1.1 节和 1.2 节推导的公式, 计算得到不同分析物的 m_0 和 pK_a 实验测定值, 同时使用通用软件 PeakMaster 5.1 计算得到其对应 m_0 和 pK_a 的理论参考值(见表 3)。测定值与理论参考值相减得到差值, 该差值与理论参考值的比值为标准偏差(SD)。从计算结果可以看出, 对于 m_0 和 pK_a 的测定, 其 SD 分别不超过 6.0% 和 6.2%。在 pK_a 的测定中, 线性回归方程相关系数(R) 的范围为 0.940~0.999, 表明该线性回归直线拟合度较好。这说明该方法得到的 m_0 和 pK_a 测定值与理论参考值一致度较高, 证明该测量方法是可靠的, 可以用于分析物 m_0 和 pK_a 的测定。

表 3 m_0 和 pK_a 的实测值和参考值

Table 3 Measured and reference values of m_0 and pK_a

Analyte	$m_0 \times 10^{-8} / (m^2 / (V \cdot s))$		pK_a	
	Measured	Reference	Measured	Reference
Barbituric acid	-3.31	/	3.81	4.01
Benzoic acid	-3.42	-3.36	4.05	4.18
Benzylamine	3.66	3.47	9.90	9.33
Phenol	-3.46	-3.44	10.03	9.99
m-Cresol	-3.34	-3.34	10.36	10.02

Reference data from Software PeakMaster 5.1; /: no data in the software database.

3.2 洛伐他汀 m_0 和 pK_a 的测定结果

采用 DMSO 作为电渗流标记物, 利用一系列经验公式测定洛伐他汀的 m_0 , 利用得到的洛伐他汀 m_0 值和线性回归直线进一步得到 pK_a 值, 分别为 $-1.70 \times 10^{-8} m^2 / (V \cdot s)$ 和 9.00。

本工作采用一系列不同离子强度的 Na_2HPO_4 -NaOH 缓冲液(pH 12.00)测定洛伐他汀的 m_0 。由前文可知, 当溶液的 pH 值等于 12.00 时, 比分析物的 pK_a 值大 3 ($pK_a = 9.00$), 此时 m_{act} 几乎等于 m_{eff} , 故式(6)适用于 m_0 的计算。同时, 如引言所述, 当 pH 值大于 7.7 时, 内酯型洛伐他汀会转化为酸型洛伐他汀, 此时洛伐他汀的 pK_a 应大于 7.7。而测得的值为 9.00, 与假设相符, 这说明结果具有较高的可靠性。

4 结论

本工作建立了毛细管电泳测定洛伐他汀的 m_0 和 pK_a 的方法。该方法基于毛细管区带电泳和离

子淌度经验公式, 且适用于酸性和碱性分析物 pK_a 值的测定。同时, 在 pH 值低于 6 的缓冲体系中, 采用具有缩短迁移时间和检测无法到达阴极分析物的能力的反向毛细管电泳法测定 pK_a 。通过与理论参考值对比可知, 本文所建立的方法具有较高可靠度和准确性, 这将在药物分析中发挥重要作用。本文所建立的方法简单快速, 准确率高, 能满足化合物 m_0 和 pK_a 的测定需要, 同时也为测定化合物其他理化性质提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Friedrich J, Zuzek M, Bencina M, et al. J Chromatogr, 1995, 704(2): 363
- [2] Yang Y, Zheng R J, Hua Y Y, et al. Chinese Journal of Health Inspection, 2014, 24(12): 1714
杨艳, 郑仁锦, 华永有, 等. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(12): 1714
- [3] Lily Y, Firby P S. Ther Drug Monit, 2000, 22(6): 737
- [4] Wang B P. Chemical Intermediates, 2015, 11(3): 39
王宝品. 化工中间体, 2015, 11(3): 39
- [5] Amrutkar R D, Shahare H V, Rakibe V D. Asian J Pharm Sci, 2018, 8(4): 215
- [6] Dickhaus B N, Priefer R. J Colloid Surface A, 2016, 488(2): 15
- [7] Shen J, Yang Y H, Wang H. Fertilizer and Health, 2020, 47(6): 70
沈洁, 杨云洪, 王欢, 等. 肥料与健康, 2020, 47(6): 70
- [8] Wu X Q, Guo Z M, Zhang S Y, et al. Journal of Jining Normal University, 2017, 39(3): 17
郭学清, 郭振明, 张淑云, 等. 集宁师范学院学报, 2017, 39(3): 17
- [9] Albert A, Sergeant P E. Ionization Constants of Acids and Bases. London: Chapman and Hall, 1984
- [10] Barták P, Pechová D, Tarkowski P, et al. Anal Chim Acta, 2000, 421(2): 221
- [11] Krisztina, Takács N K, Tam K Y. J Pharm Biomed Anal, 2000, 21(6): 1171
- [12] Wiczling P, Struck L W, Kubik L, et al. J Pharm Biomed Anal, 2014, 94: 180
- [13] Vishwakarma R A, Kumar V, Bharate S S. J Comb Chem High Throughput Screen, 2016, 19(6): 461
- [14] Saingam W, Sakunpak A. J Rev Bras Farmacogn, 2018, 28(6): 669
- [15] Volná T, Motyka K, Hlavá J, et al. J Pharm Biomed Anal, 2017, 134(5): 143
- [16] Bartolini M, Bertucci C, Gotti R, et al. J Chromatogr A, 2002, 958(1): 59
- [17] Stolz A, Joo K, Hcker O, et al. Electrophoresis, 2018, 286(6): 669
- [18] Qian C, Wang S, Fu H Q, et al. Electrophoresis, 2018, 39(14): 1786
- [19] Tmová T, Monincová L. Electrophoresis, 2016, 37(23/24): 3186

- [20] Robert L C, Voeten I K, Haselberg R, et al. *Anal Chem*, 2018, 90(3): 1464
- [21] Viktoria V, Sursyakova V, Galina V, et al. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(7): 1253
- [22] Barbosa J, Barron D, Jimenez-Lozano E. *J Chromatogr A*, 1999, 839(1/2): 183
- [23] Jankowsky R, Friebe M, Noll B, et al. *J Chromatogr A*, 1999, 833(1): 83
- [24] Guo G H, Guo Z. *Electrophoresis*, 2019, 40(12/13): 1639
- [25] Ansorge M, Ga B, Milan B, et al. *Electrophoresis*, 2020, 41(7/8): 514
- [26] Friedl W, Reijenga J C, Kenndler E. *J Chromatogr A*, 1995, 709(1): 163
- [27] Reijenga J C, Kenndler E. *J Chromatogr A*, 1994, 659(2): 403
- [28] Cao C X. *J Chromatogr A*, 1997, 771(1/2): 374
- [29] Khaledi M G. *High Performance Capillary Electrophoresis Theory, Techniques and Applications*. New York: Wiley-Interscience, 1998
- [30] Cao C X. *J High Resolut Chromatogr*, 1997, 20(12): 701
- [31] He Y C, Wu X J, Kong F Z, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2016, 34(6): 625
和雨晨, 吴雪静, 孔凡志, 等. 色谱, 2016, 34(6): 625
- [32] Reijenga J C, Kenndler E. *J Chromatogr A*, 1994, 659(2): 417