

不同缓冲体系对毛细管电泳法分离  
15种核苷类化合物效果的比较史倩<sup>1</sup>, 陈军辉<sup>1\*</sup>, 李鑫<sup>1</sup>, 曹为<sup>1</sup>, 郑立<sup>1</sup>, 臧家业<sup>1</sup>, 王小如<sup>1,2</sup>

(1. 国家海洋局第一海洋研究所, 青岛市现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061;

2. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 对毛细管电泳法分离 15 种核苷类化合物所用的不同缓冲液体系进行了系统比较, 确定不同模式毛细管电泳法分析多种核苷类化合物的最适合背景缓冲液体系 (BGE)。分别以四硼酸钠、磷酸氢二钠、乙酸钠、碳酸氢钠、乙酸铵和乙二胺 (DEA) 为背景电解质, 对毛细管区带电泳 (CZE)、毛细管电泳-电喷雾飞行时间质谱 (CE-ESI-TOF/MS) 以及胶束电动毛细管电泳 (MEKC) 3 种模式进行比较, 并对其中几种优势缓冲体系进行了优化。结果表明, CZE 模式下使用四硼酸钠和磷酸氢二钠缓冲体系无法同时分离 15 种核苷类化合物, 因此只适用于分析核苷类化合物数量较少的样品。而使用含有 2% 丙酮的 300 mmol/L DEA 能完全分开 15 种核苷类化合物, 且分辨率和峰形良好。MEKC 模式下, 以 25 mmol/L 磷酸氢二钠 (添加 70 mmol/L 十二烷基磺酸钠 (SDS)) 为缓冲盐的分离结果最佳, 并且此方法能成功应用于海洋生物海藻中核苷类化合物的分离。CE-ESI-TOF/MS 分析中, 以 20 mmol/L 乙酸铵 (pH 10.0) 为背景电解质, 正离子模式检测, 15 种核苷类化合物的质谱信号均良好, 检测灵敏度明显优于文献中报道的使用 DEA 缓冲体系的结果。本研究阐明了不同缓冲体系对 15 种核苷类化合物分离的适用性, 为毛细管电泳技术在复杂基质中多种核苷类化合物的分离方法中的应用奠定了基础。

**关键词:** 毛细管电泳; 电喷雾飞行时间质谱; 核苷类化合物; 缓冲体系

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)06-0481-07

Comparison of different buffer systems for separation of  
15 nucleosides by capillary electrophoresisSHI Qian<sup>1</sup>, CHEN Junhui<sup>1\*</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, CAO Wei<sup>1</sup>, ZHENG Li<sup>1</sup>, ZANG Jiaye<sup>1</sup>, WANG Xiaoru<sup>1,2</sup>

(1. Qingdao Key Lab of Analytical Technology and Standardization of Chinese Medicines, The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The most suitable background electrolytes (BGEs) for simultaneous separation of 15 nucleosides by different modes of capillary electrophoresis (CE) were obtained. Various modes of CE were performed including capillary zone electrophoresis (CZE), capillary electrophoresis-electrospray ionization-time of flight mass spectrometry (CE-ESI-TOF/MS) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC). The electrolyte buffers using sodium tetraborate decahydrate, disodium hydrogen phosphate, sodium acetate, sodium bicarbonate, ammonium acetate or 1,2-diaminoethane (DEA) were tested, and the best of them were systematically optimized. In CZE mode, the nucleosides could not be separated completely with sodium tetraborate decahydrate or disodium hydrogen phosphate as BGEs, demonstrating the limited applicability of the two buffer systems for complex samples. However, with 300 mmol/L DEA (containing 2% acetone) as BGE, 15 nucleosides could be separated with good resolution and peak shape, which proved that the DEA buffer was most suitable in CZE. The best buffer system in

\* 通讯联系人: 陈军辉, 博士, 助理研究员, 主要从事色谱-质谱联用分析研究工作. Tel: (0532) 88966705, E-mail: jhchen@fio.org.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20905017)、海洋公益性行业科研专项项目 (201005034-3)、海洋局青年基金项目 (2010140)、海洋一所基本科研业务专项项目 (2010G25) 和中国科学院实验海洋生物学重点实验室开放基金课题。

收稿日期: 2011-02-28

MEKC mode was 25 mmol/L disodium hydrogen phosphate with 70 mmol/L sodium dodecyl sulfate (SDS), and it was successfully applied for the separation of the nucleosides in Chinese *Anthopleura lanthogrammica* Berkly. The optimum buffer system for CE-ESI-TOF/MS analysis was 20 mmol/L ammonium acetate (pH 10.0). In the positive ion mode, the MS signals of each compound were better than those in the literature using DEA as BGE. The results of this study demonstrated the applicability of different buffer systems for the simultaneous separation of 15 nucleosides, and were helpful for the development of CE method in complex sample separation.

**Key words:** capillary electrophoresis (CE); electrospray ionization-time of flight mass spectrometry (ESI-TOF/MS); nucleosides; buffer systems

核苷类化合物(核苷、碱基及其类似物)是生物细胞维持生命活动所需的基本物质,是脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)的基本组成。人体所患的许多疾病也与这类物质及其代谢产物的异常有关。核苷类化合物具有广泛的生理活性,可以作为药物用于抗肿瘤、抗病毒等方面<sup>[1-3]</sup>。此外,人尿液中的核苷类化合物及其代谢物种类和含量的变化可以用于疾病诊断<sup>[4]</sup>。因此,多种核苷类化合物的快速有效检测成为天然药物化学、药物分析、疾病诊断等领域亟须解决的重要课题。

目前,高效液相色谱法(HPLC)<sup>[5-7]</sup>、高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)<sup>[8-10]</sup>、毛细管电泳法(CE)<sup>[11,12]</sup>、气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[13]</sup>、薄层色谱法(TLC)<sup>[14]</sup>等分析方法已用于核苷类化合物的分析。其中,CE技术由于其消耗试剂少、分离效率高、分离速度快已被广泛应用于啤酒<sup>[15]</sup>、尿液<sup>[16]</sup>、冬虫夏草<sup>[11,12]</sup>等物质中核苷类化合物的分析。而毛细管区带电泳(CZE)和胶束电动毛细管电泳(MEKC)是两种最常用的CE分离模式。将CE与MS联用可以提高检测的灵敏度和选择性,获得大量的结构信息,更适合复杂基质中多种核苷类化合物的分析。目前,已有学者采用CE-MS技术对冬虫夏草、啤酒、肝细胞瘤和尿液等样品中的核苷类化合物进行了分析研究,并证明该技术有可能替代HPLC、HPLC-MS等方法<sup>[4,17-19]</sup>。

毛细管电泳分离过程中,选择合适的缓冲体系是决定分离成败的最主要因素。目前文献报道中,采用CE或CE-MS分析核苷类化合物的研究较多,但能同时分离的核苷类化合物数目较少,而且CE-MS方法的灵敏度较低,信号响应较差。本研究以15种常见核苷类化合物为研究对象,对其在不同缓冲体系中的分离效果进行了系统比较,筛选出适于不同CE分离模式(CZE、MEKC和CE-MS)的最佳缓冲体系,为开发针对多种核苷类化合物分析的

CE方法提供了依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

HP<sup>3D</sup>毛细管电泳仪,配有二极管阵列检测器(DAD)(美国Agilent公司);G1969A型飞行时间质谱仪,配有电喷雾离子源(美国Agilent公司);G1607A毛细管电泳-电喷雾飞行时间质谱同轴鞘液接口(美国Agilent公司);鞘液液使用Agilent 1100单元泵泵入,配有1:100分流器;Agilent未涂层扩展光程毛细管柱(内径75 μm,长度64.5 cm,有效长度56 cm,用于CE-DAD);Agilent未涂层毛细管柱(内径50 μm,长度80.5 cm,用于CE-MS);超纯水由Milli-Q系统(美国Millipore公司)纯化制备;828型pH测试仪(美国Orion公司);KQ-600B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

用于电泳分析的十二烷基磺酸钠(SDS)和腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷、胸苷、肌苷、2'-脱氧鸟苷、虫草素等15种核苷类化合物均购自美国Sigma-Aldrich公司。甲醇、丙酮和乙腈为色谱纯(德国Merck公司);氢氧化钠、碳酸氢钠、乙酸铵、乙酸钠、四硼酸钠、磷酸二氢钠和乙二胺(DEA)均为分析纯。

### 1.2 仪器条件

毛细管柱在第一次使用前要进行活化,依次用1 mol/L氢氧化钠冲洗30 min、超纯水冲洗20 min、相应缓冲液冲洗10 min。两次进样之间,依次用0.1 mol/L氢氧化钠冲洗2 min、超纯水和相应缓冲液各冲洗3 min。

CZE条件:未涂层扩展光程毛细管柱(64.5 cm × 75 μm),分离电压20 kV,毛细管温度25 °C,进样压力5 kPa,进样时间3 s,紫外检测波长260 nm。分别采用碳酸氢钠、乙酸铵、乙酸钠、四硼酸钠、磷酸

二氢钠和 DEA 为分离缓冲溶液。

CE-ESI-TOF/MS 条件: 未涂层石英毛细管 (80.5 cm × 50 μm), 毛细管温度 25 °C, 分离电压 25 kV, 进样压力 5 kPa, 进样时间 12 s, 紫外检测波长 260 nm。ESI-TOF/MS 条件为, 以含 1% 甲酸的 50% 甲醇溶液作为鞘液, 流速 4 μL/min, 正离子模式, 干燥气流速 9 L/min, 雾化气压力 68.95 kPa, 毛细管电压 3 500 V, 锥孔电压 65 V, 全扫描 (Scan) 范围为  $m/z$  50 ~ 1 000。以 DEA 为背景缓冲液时, 干燥气温度 300 °C, 破碎电压 150 V; 以乙酸铵为背景缓冲液时, 干燥气温度 200 °C, 破碎电压 120 V。

MEKC 条件: 未涂层扩展光程毛细管柱 (64.5 cm × 75 μm), 毛细管温度 25 °C, 分离电压 20 kV, 进样压力 5 kPa, 进样时间 3 s, 紫外检测波长 260 nm。分别采用添加 SDS 的碳酸氢钠、乙酸铵、乙酸钠、四硼酸钠、磷酸二氢钠和 DEA 为分离缓冲溶液。

### 1.3 标准溶液的配制

准确称取适量的腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷、胸苷、肌苷和 2-脱氧鸟苷标准品, 溶于 5% 氨水中配制成各化合物质量浓度均为 100 mg/L 的混合标准储备液。准确称取虫草素标准品, 溶于 10% 甲醇水溶液中配制成 100 mg/L 的标准储备液, 置于冰箱中 4 °C 下冷藏保存。使用前将含 14 种核苷类化合物的混合标准储备液、虫草素标准储备液以及超纯水以体积比 2:2:1 混合, 配制成各目标化合物质量浓度均为 40 mg/L 的标准工作溶液。

### 1.4 海葵样品的处理

海葵样品于烘箱中 60 °C 下烘干, 置于干燥阴凉处保存。从中抽取部分个体, 切片、粉碎、过 80 目筛, 混合均匀, 制备成干粉, 封装于样品瓶中备用。准确称取 0.2 g 以上干粉置于比色管中, 加入 60% 甲醇 20 mL, 室温条件下超声 15 min, 收集上清液, 再按上述方法重复提取 2 次。提取液合并后过滤, 滤液于 55 °C 旋转蒸干, 用含 2% 氨水的 4% 甲醇溶液 10 mL 复溶。复溶后的溶液于 6 000 r/min 下离心 10 min, 上清液过 0.45 μm 微孔滤膜并脱气, 作为供试品溶液。

## 2 结果与讨论

根据文献 [15, 18 - 21], 从较常用于核苷类化合物 CE 分离的缓冲体系的数种盐中选取包括四硼酸钠、磷酸氢二钠、乙酸钠、碳酸氢钠、乙酸铵和 DEA 在内的 6 种, 系统比较了不同缓冲体系对 15 种核苷类化合物分离效果的影响。

### 2.1 CZE 不挥发性缓冲盐分离体系

磷酸盐和硼酸盐由于其性质稳定、重复性好, 是 CZE 分离核苷类化合物最为常用的电泳缓冲液成分, 已成功用于冬虫夏草、板蓝根注射液等样品中核苷类化合物的分离测定<sup>[20-22]</sup>。但是文献方法能同时分离的核苷类化合物数量较少, 均不超过 10 个。参考相关文献<sup>[18, 20]</sup>, 本研究分别选取磷酸氢二钠和四硼酸钠两种缓冲盐溶液 (浓度 20 mmol/L, 调节 pH=9.0), 对 15 种核苷类化合物进行了分离 (见图 1)。结果表明, 用磷酸氢二钠或四硼酸钠缓冲液作为背景缓冲液, 均只能使部分核苷类化合物达到基线分离, 且有峰形矮胖、拖尾等现象。即使对这两种电泳缓冲液的 pH、离子强度和分离电压等分离条件进行调节, 仍然不能使 15 种核苷类化合物完全分离。说明以这两种缓冲盐体系为 CZE 背景缓冲液难以实现多种 (15 种及以上) 核苷类化合物的同时分离, 因此这两种缓冲液只适用于核苷类化合物数量较少、基体相对简单的样品。

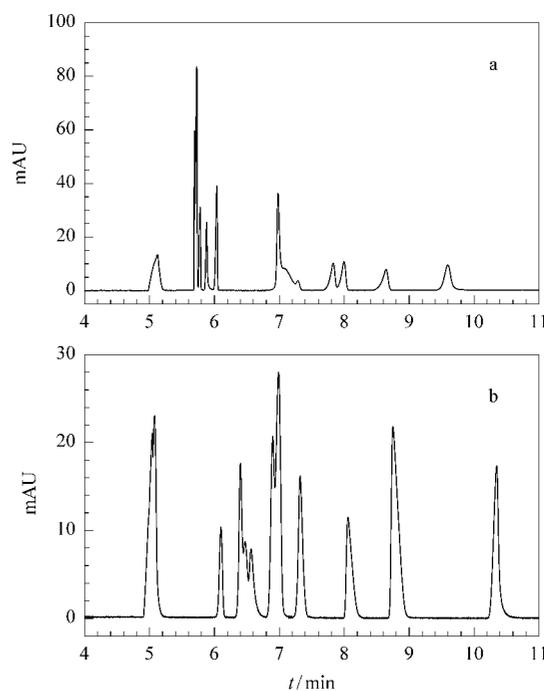


图 1 分别以 (a) 四硼酸钠和 (b) 磷酸氢二钠缓冲液为背景缓冲液分离 15 种核苷类化合物的毛细管电泳图谱

Fig. 1 Electropherograms of 15 nucleosides separated in CZE with BGEs of (a) sodium tetraborate decahydrate and (b) disodium hydrogen phosphate

### 2.2 CZE 挥发性缓冲盐分离体系

CZE 模式下的挥发性缓冲盐体系较不挥发性缓冲盐体系稳定性差, 却非常适合与质谱联用, 可以快速准确地进行化合物定性分析, 尤其适合复杂体系中多种化合物的快速准确鉴定。本研究选取与

MS 兼容的乙酸钠、碳酸氢钠、乙酸铵和 DEA 4 种缓冲体系在 CZE 模式下以 DAD 为检测器,对 15 种核苷类化合物的混合物进行分离。其中前 3 种电泳缓冲液浓度为 20 mmol/L,并调节 pH = 9.0; DEA 浓度为 300 mmol/L,无需调节 pH。结果表明,使用乙酸钠、乙酸铵或碳酸钠缓冲体系时获得的分离结果均不理想,分别得到 10、9、8 个峰。使用 DEA 缓冲体系获得的分离效果较好,可以初步分离 15 种核苷,但仍需要进一步优化分离条件。

根据上述结果,对 DEA 电泳缓冲液浓度(200 ~ 400 mmol/L)、pH 值(10.0 ~ 13.0)、有机改性剂(甲醇、乙腈和丙酮)的添加、毛细管温度、进样体积和分离电压等进行了系统优化。发现各化合物的迁移速度有明显的差别,碱基的迁移速度较慢,除胞嘧啶外,其余碱基均在对应核苷后面出峰。加入有机改性剂、升高电压和温度均有助于加快化合物的迁移速率。在最佳 DEA 缓冲体系条件(300 mmol/L DEA,含 2% 丙酮, pH 12.9)下,15 个核苷类化合物得到较好的分离,并且峰形良好(见图 2)。但该分离体系稳定性相对较差(现用现配),运行数次之后分离度开始下降,峰形变差,需要及时更换缓冲液。

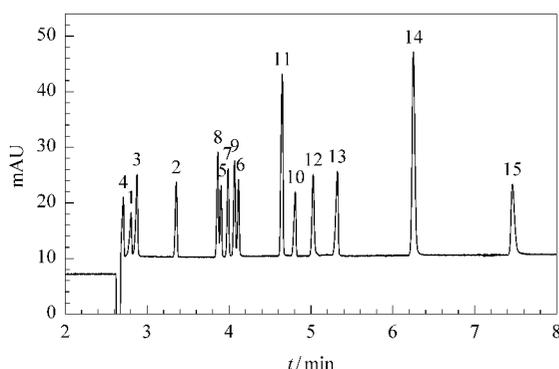


图 2 以 DEA 作为背景缓冲液分离 15 种核苷化合物的毛细管电泳图谱

Fig. 2 Electropherograms of 15 nucleosides separated in CZE with BGE of DEA

Buffer solution: 300 mmol/L DEA with 2% acetone; applied voltage: 30 kV; temperature: 30 °C; injection: 5 kPa, 3 s; detection wavelength: 260 nm.

Peaks: 1. cytidine; 2. cytosine; 3. adenosine; 4. cordycepin; 5. thymidine; 6. uridine; 7. guanosine; 8. 2'-deoxyguanosine; 9. inosine; 10. thymine; 11. adenine; 12. guanine; 13. uracil; 14. hypoxanthine; 15. xanthine.

### 2.3 CE-ESI-TOF/MS 缓冲盐分离体系

采用 CE-MS 对核苷类化合物进行分离检测的研究已有报道<sup>[4,18]</sup>,但 CE 与 ESI-TOF/MS 联用的研究尚未见报道。本研究将 CE 与 ESI-TOF/MS 联用,用于 15 种核苷类化合物的分析。该方法可以提供更高的灵敏度及分析物更精准的相对分子质量信

息,使核苷类化合物的分离鉴定更加方便准确。由于 ESI 离子源与不挥发性缓冲盐分离体系不兼容,因此,参照文献[18,19]并结合前文结果,着重研究了 DEA 与乙酸铵作为背景电解质对 CE-ESI-TOF/MS 分析 15 种核苷类化合物效果的影响。

首先,考察了含有 5% 丙酮的 300 mmol/L DEA 作为缓冲液的分离效果。负离子模式下,选取 75% 甲醇溶液为鞘流液,并加入 0.25% 氨水增强样品的电离能力;正离子模式下,则以含 1% 甲酸的 50% 甲醇溶液为鞘流液。结果发现,负离子模式下,15 种核苷类化合物中多数化合物未产生质谱信号,与文献[18]报道的结果不同。这可能与本实验中鞘流液中加入的是氨水而不是 DEA 有关,同时,由于核苷类化合物本身偏碱性,所以不宜在负离子模式下进行分析。而正离子模式下获得的质谱信号稍优于负离子模式,但灵敏度仍然不高。尿嘧啶和 2'-脱氧胸苷未产生质谱信号;黄嘌呤的质谱信号较弱,只有  $10^2$ 。虽然其余各化合物的信号强度均在  $10^3$  以上,但总体而言信号强度仍然较弱。可能的原因是 DEA 的碱性较强,不适合在正离子模式下与质谱联用。因此,对 15 种核苷类化合物进行 CE-ESI-MS 分析时,无论在负离子模式还是正离子模式下,都不能选用 DEA 作为 CE 背景缓冲液。

因此,又选取乙酸铵(20 mmol/L, pH 10.0)作为 CE 背景缓冲液,考察其对核苷类化合物的 CE-MS 分离效果的影响。参考文献[19]中分离检测核苷酸的方法并稍加修改,本实验选用含 1% 甲酸的 50% 甲醇溶液为鞘流液,流速 4  $\mu$ L/min。由于乙酸铵为两性化合物,作为缓冲液不论正负离子模式均适用。实验结果显示正离子模式下的灵敏度更高,标准工作溶液中 40 mg/L 的各化合物均能产生较强的质谱信号,强度均在  $10^4$  以上(见图 3)。乙酸铵作为 CE 背景缓冲液,虽然对 15 种核苷类化合物的分离度较使用 DEA 缓冲液时差,但是利用 MS 检测器提取离子的方法可以将迁移时间重叠的样品区分开,从而弥补了 CE 分离度的不足,进而实现 15 种核苷类化合物的定性、定量分析。分别计算乙酸铵和 DEA 作为背景缓冲液时 CE-ESI-TOF/MS 分析 15 种核苷类化合物的检出限(将信噪比为 3 时对应的质量浓度作为检出限)。从表 1 中可以看出,使用乙酸铵缓冲液时,所有的化合物均有响应,灵敏度比使用 DEA 缓冲液时更高,并且比文献[18]报道的以 DEA 作为背景电解质获得的结果更好。经过优化最终确定 1.2 节“CE-ESI-TOF/MS 条件”中所述乙酸铵作为电泳缓冲液的最佳实验条件。

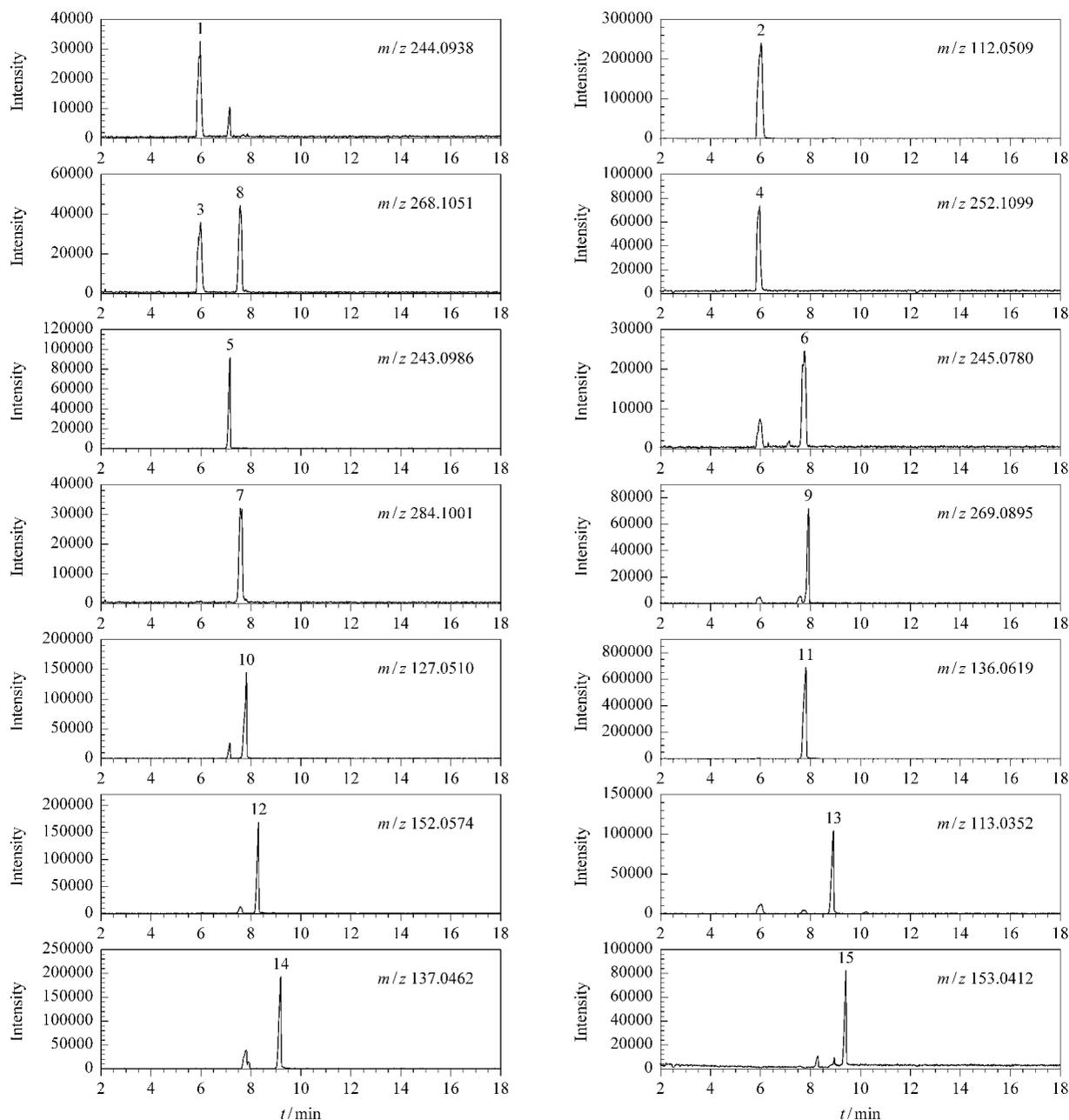


图 3 乙酸铵作为背景电解质分离 15 种核苷类化合物的 CE-ESI-TOF/MS 提取离子色谱图

Fig. 3 Extracted ion electropherograms of 15 nucleoside compounds analyzed by CE-ESI-TOF/MS with ammonium acetate as BGE

Peak assignments are the same as in Fig. 2.

表 1 分别以乙酸铵和 DEA 作为缓冲液时 CE-ESI-TOF/MS 分析 15 种核苷类化合物的检出限 (LOD)

Table 1 Limits of detection (LODs) of 15 nucleoside compounds analyzed by CE-ESI-TOF/MS with ammonium acetate and DEA as electrophoresis buffer respectively

No.	Compound	Ammonium acetate	DEA	No.	Compound	Ammonium acetate	DEA
1	cytidine	2.91	5.54	9	inosine	1.18	20.00
2	cytosine	0.23	2.40	10	thymine	0.71	36.36
3	adenosine	2.67	3.93	11	adenine	0.17	5.27
4	cordycepin	1.64	3.43	12	guanine	0.71	5.22
5	thymidine	0.91	N. D.	13	uracil	0.57	N. D.
6	uridine	4.00	22.86	14	hypoxanthine	0.63	20.00
7	guanosine	2.63	8.57	15	xanthine	1.48	N. D.
8	2'-deoxyguanosine	3.16	6.86				

N. D.: not detected at the concentration of 40 mg/L.

## 2.4 MEKC 缓冲盐分离体系

SDS 是 MEKC 分析中常用的一类表面活性剂<sup>[23]</sup>。在 1.2 节中提到的 6 种缓冲液中分别加入 50 mmol/L SDS, 其他条件不变, 考察不同缓冲盐体系对 MEKC 分离 15 种核苷类化合物效果的影响。结果发现, 除 DEA 外, 其他缓冲液中加入 SDS 均能改善分离度, 这与文献[24]报道的添加 SDS 有助于改善分离度的结果一致。但对于 DEA 缓冲体系的 MEKC 方法, 加入 SDS 只能分出 14 个色谱峰, 分离度下降, 且色谱峰的峰形变差。而对于添加了 SDS 的乙酸铵缓冲体系, MEKC 方法能分出 14 个色谱峰, 但稳定性和重现性较差。使用添加了 SDS 的磷酸氢二钠缓冲体系, 能分出 13 个色谱峰, 峰形好, 选择性好且较稳定。在其余的 3 种缓冲液条件下能分出 12 个或更少的色谱峰。因此选用磷酸氢二钠缓冲体系作优化对象。对磷酸氢二钠浓度(15 ~ 40 mmol/L)、SDS 浓度(20 ~ 100 mmol/L)、缓冲液 pH、添加有机改性剂、分离电压、温度等条件进行了

系统的优化。最终确定最佳的实验条件如下: 磷酸氢二钠 25 mmol/L, 含 70 mmol/L SDS; 分离电压 20 kV; 温度 25 °C; 进样压力 5 kPa, 进样时间 3 s; 检测波长 260 nm。其中, SDS 浓度是影响分离效果的关键因素。同时, 实验中要注意控制分离电压和毛细管温度, 避免电流过高, 产生大量焦耳热造成色谱峰展宽、分辨率下降, 影响化合物的分离。按照如上实验条件, 15 个核苷类化合物分离良好(见图 4a)。除胞嘧啶外的嘌呤和嘧啶都在色谱图的后半部出峰, 这可能是由于磷酸根与核糖发生键合, 使核苷类化合物的迁移速度加快所致。

按照 1.4 节所述方法处理海葵样品, 并在最佳的 MEKC 条件下对海葵样品中所含的核苷类化合物进行分析。从图 4b 可以看出, 除 2、3、4 号峰外, 其余化合物均在海葵中发现, 且各化合物峰的分离度较好, 说明此方法适用于复杂基质中 15 种核苷类化合物的分离检测。

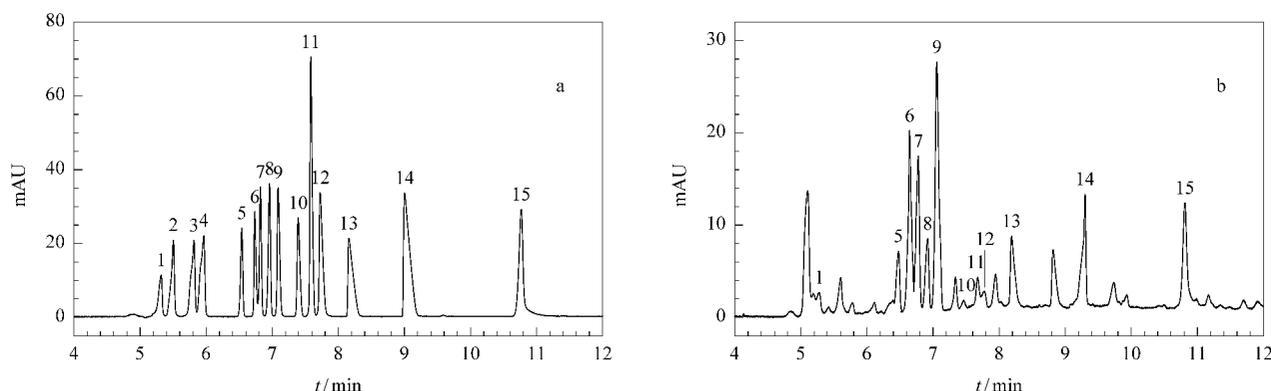


图 4 (a) 15 种核苷类化合物和 (b) 海葵样品的 MEKC 谱图  
Fig. 4 Electropherograms of (a) 15 nucleoside compounds and (b) *Anthopleura lanthogrammica* Berkly sample  
Peak assignments are the same as in Fig. 2.

## 3 结论

阐明了适用于毛细管电泳不同分离检测模式 (CZE, CZE-ESI-MS, MEKC) 分离 15 种核苷类化合物的最佳缓冲液体系。实验表明, CZE-DAD 模式下以 DEA 为背景缓冲液获得的分离效果最佳, 可以实现 15 种核苷类化合物的快速、完全分离, 证明这种方法适用于复杂基质中多种核苷类化合物的同时分离。但是这种缓冲体系的稳定性相对较差。而四硼酸钠和磷酸氢二钠两种缓冲体系稳定性好, 以其为背景缓冲液虽然难以实现多种核苷类化合物的完全分离, 但仍适用于核苷类化合物数量较少、基体相对简单样品的分析。乙酸铵作为背景电解质适用于 15 种核苷类化合物的 CE-ESI-TOF/MS 分析。正

离子模式下, 所有目标化合物均有较高的响应值。并且由于质谱检测器能获得丰富的结构信息, 这种方法在天然药物、食品、尿液、血液等复杂基质样品中核苷类化合物的分析领域具有广阔的应用前景。MEKC 分离模式中, 在四硼酸钠、磷酸氢二钠、乙酸钠、碳酸氢钠或乙酸铵缓冲体系中加入 SDS 均能提高核苷类化合物的分离度。综合考虑分离度、峰形、稳定性等因素, 确定添加 SDS 的磷酸氢二钠缓冲液为多种核苷类化合物 MEKC 分离的最佳缓冲体系。本文系统比较了不同缓冲体系对多种核苷类化合物 CE 分离效果的影响, 下一步研究工作中将采用最佳缓冲液分析体系, 建立基于 CE-ESI-TOF/MS 以及 MEKC 的复杂基质中多种核苷类化合物的定性定量方法。

## 参考文献:

- [1] Dienstag J L. *Hepatology*, 2009, 49(S5): S112
- [2] Haubrich R H, Riddler S A, DiRienzo A G, et al. *AIDS*, 2009, 23(9): 1109
- [3] Li Z C, Chen S H, Jiang N, et al. *Chemical Research and Application* (李子成, 陈淑华, 蒋宁, 等. 化学研究与应用), 2002, 14(1): 15
- [4] Wang S F, Zhao X P, Mao Y, et al. *J Chromatogr A*, 2007, 1147: 254
- [5] Lu D, Luo F, Chi Y M, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (陆丹, 罗芬, 池玉梅, 等. 色谱), 2011, 29(1): 83
- [6] Cao X W, Li J, Chen S B, et al. *J Sep Sci*, 2010, 33(11): 1587
- [7] Zhang D L, Chen J H, Zhou M, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (张道来, 陈军辉, 周明, 等. 色谱), 2010, 28(8): 795
- [8] Guo F Q, Li A, Huang L F, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(3): 623
- [9] Fan H, Li S P, Xiang J J. *Anal Chim Acta*, 2006, 567(2): 218
- [10] Jin Y, Xiao S S, Sun Y Q. *Chinese Journal of Chromatography* (金郁, 肖珊珊, 孙毓庆. 色谱), 2003, 21(6): 558
- [11] Gong Y X, Li S P, Li P, et al. *J Chromatogr A*, 2004, 1055: 215
- [12] Liu Y J, Xu F, Chen B, et al. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (刘玉军, 徐芳, 陈波, 等. 药物分析杂志), 2010, 30(1): 24
- [13] Teixeira A J R, Gommers-Ampt J H, Van de Werken G, et al. *Anal Biochem*, 1993, 214(2): 474
- [14] Malakhova I I, Tyaglov B V, Mironov A S, et al. *Russ J Appl Chem*, 2010, 83(5): 869
- [15] Klampfl C W, Himmelsbach M, Buchberger W, et al. *Anal Chim Acta*, 2002, 454(2): 185
- [16] Jiang Y Q, Ma Y F. *Anal Chem*, 2009, 81(15): 6474
- [17] Yang F Q, Ge L Y, Yong J W H, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(3): 307
- [18] Haunschmidt M, Buchberger W, Klampfl C W. *J Chromatogr A*, 2008, 1213: 88
- [19] Liu C C, Huang J S, Tyrrell D L J, et al. *Electrophoresis*, 2005, 26(7/8): 1424
- [20] Wang Y, Yu R M, Yang G Z, et al. *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army* (汪宇, 于荣敏, 杨光照, 等. 解放军药学学报), 2003, 19(5): 331
- [21] Ruan J H, Sun Y Q. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University* (阮婧华, 孙毓庆, 沈阳药科大学学报), 2002, 19(2): 112
- [22] Guo H Z, Chen R, Li F, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (郭怀忠, 陈蓉, 李芳, 等. 色谱), 2004, 22(5): 539
- [23] Theurillat R, Zimmerli S, Thormann W. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(5): 1313
- [24] Ebber A. *Chromatographia*, 2001, 53: S307