

## 大鼠血浆中胆汁酸、胆红素及牛磺酸的 LC-MS/MS 分析

彭 灿<sup>1,2</sup>, 王 敏<sup>1</sup>, 吕蒙莹<sup>1</sup>, 田 媛<sup>1</sup>, 张尊建<sup>1,3\*</sup><sup>(1)</sup>中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009; <sup>(2)</sup>安徽省食品药品审评认证中心, 合肥 230051;<sup>(3)</sup>中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009)

**摘 要** 建立大鼠血浆中胆汁酸、胆红素和牛磺酸的 LC-MS/MS 同时测定方法。血浆样品经甲醇沉淀蛋白后 LC-MS/MS 分析, 色谱柱为 Zorbax SB-C<sub>18</sub> (150 mm × 2.1 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-10 mmol/L 醋酸铵溶液 (pH 3.0) 梯度洗脱; 检测系统采用电喷雾离子源 (ESI)-三重四极杆质谱仪于负离子模式下进行选择反应检测 (SRM)。方法学验证结果表明, 建立的方法灵敏度高、专属性好, 可用于血浆样品中胆汁酸、胆红素和牛磺酸的含量测定。

**关键词** 胆汁酸; 胆红素; 牛磺酸; 液相色谱-串联质谱; 含量测定

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)04-0343-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130411

## Determination of bile acids, bilirubin and taurine in rat plasma by LC-MS/MS

PENG Can<sup>1,2</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, LÜ Meng-ying<sup>1</sup>, TIAN Yuan<sup>1</sup>, ZHANG Zun-jian<sup>1,3\*</sup><sup>(1)</sup>Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (China Pharmaceutical University), Ministry of Education, Nanjing210009; <sup>(2)</sup>Anhui Center for Food and Drug Evaluation & Certification, Hefei 230051; <sup>(3)</sup>State Key Laboratory of Natural Medicines,

China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** A high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for the simultaneous determination of bile acids, bilirubin and taurine in rat plasma. Plasma samples were protein precipitated with methanol and analyzed by LC-MS/MS. The analytes were well separated on a Zorbax SB-C<sub>18</sub> column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) with gradient elution of methanol and 10 mmol/L ammonium acetate in aqueous solution (pH 3.0). Detection was carried out on a triple quadrupole tandem mass spectrometer by selected reaction monitoring (SRM) in the negative ion mode. The proposed method proved to be sensitive and selective, which is suitable for the determination of bile acids, bilirubin and taurine in rat plasma.

**Key words** bile acids; bilirubin; taurine; LC-MS/MS; determination

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JKY2011037) and the Xiansheng Innovation Foundation (No. CX11B-003XS)

胆汁酸是胆固醇的主要代谢产物, 对机体中胆固醇的消除具有重要的生理学意义, 其主要合成于肝脏并储存于胆囊中, 进食时分泌入肠道, 通过形成胶束结构以促进膳食中的脂类和脂溶性维生素的吸收, 近期研究已将胆汁酸确定为核转录因子的内源性活化剂 (类法尼醇 X 受体), 其对机体中胆固醇和胆汁酸代谢物的稳态调节具有重要作用<sup>[1]</sup>。胆红素为血红蛋白的代谢产物, 可有效氧

化自由基, 防止低密度脂蛋白的氧化修饰, 从而保护血管内皮功能, 多年来一直被认为是肝胆疾病诊断的重要依据<sup>[2]</sup>。而作为哺乳动物体内含硫氨基酸的主要代谢产物, 牛磺酸具有抗氧化、保护心肌、提高机体免疫力、促进脂类消化吸收等多种重要的药理学和生理学作用, 是体内必不可少的一种营养元素<sup>[3-4]</sup>。目前, 对于体内胆汁酸、胆红素及牛磺酸水平的监测已成为疾病诊断的重要依据。因此,

建立一种灵敏、简便的同时测定体内胆汁酸、胆红素及牛磺酸含量的方法对于疾病的预防与治疗具有重要意义。

迄今为止,虽然有研究报道通过 LC-ELSD、LC-MS 等分析手段对动物及人体血浆或组织中胆酸类成分的含量进行测定<sup>[1,5-6]</sup>,但是对于胆红素及牛磺酸的含量测定(尤其是生物样本中的含量测定)仍具有明显不足,系统全面地测定血浆中胆汁酸、胆红素及牛磺酸的含量仍是空白。本研究以大鼠为动物模型,依托 LC-MS/MS 现代分析技术,建立一种简便、灵敏的同时测定大鼠血浆中胆汁酸、胆红素及牛磺酸的方法,旨在为此类成分的检测和临床应用提供方法学借鉴。

## 1 材料

### 1.1 药品及试剂

胆酸(CA)、去氧胆酸(DCA)、鹅去氧胆酸(CDCA)、猪去氧胆酸(HDCA)、熊去氧胆酸(UDCA)、胆红素(BIL)、牛磺酸(TAU)及格列苯脲(GLIB)(中国药品生物制品检定所);石胆酸(LCA)、牛磺胆酸(TCA)、牛磺去氧胆酸(TDCA)、牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)、牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)、甘氨酸(GCA)、甘氨去氧胆酸(GDCA)、甘氨鹅去氧胆酸(GCDCA)、甘氨熊去氧胆酸(GUDCA)(美国 Sigma-Aldrich 公司)。甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司),其余试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪器

Finnigan™ TSQ Quantum Discovery MAX 液质联用系统,包含 Finnigan™ Surveyor 液相色谱仪, Finnigan™ Surveyor 自动进样器, Finnigan™ TSQ Quantum 三重四极杆质谱仪,电喷雾电离源和图谱应用软件 Xcalibur 2.0(美国 Thermo Electron 公司)。

### 1.3 动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠,体重(200 ± 20)g,由中国药科大学动物实验中心提供(许可证号:SCXK2009-0001)。

## 2 方法

### 2.1 LC-MS/MS 测定条件

色谱柱: Zorbax SB-C<sub>18</sub> (150 mm × 2.1 mm,

5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: (A) 甲醇-(B) 10 mmol/L 醋酸铵溶液(甲酸调 pH 至 3.0)梯度洗脱;流速: 0.25 mL/min; 进样量: 10 μL; 梯度程序(A:B)如下: 0 ~ 3 min, 1:99; 7 ~ 20 min, 70:30; 40 min, 80:20; 50 ~ 70 min, 98:2。

质谱采用 ESI 离子源,负离子条件下选择反应监测(SRM)模式测定各成分含量,检测离子和各离子碰撞能量见表 1。ESI-MS/MS 主要工作参数如下。喷雾电压: -4.0 kV; 毛细管加热温度: 370 °C; 鞘气(氮气)压力: 41 arb(1 arb = 6 894.76 Pa); 辅助气(氮气)压力: 25 arb; 碰撞气压力(氩气): 1.5 mTorr(1 mTorr = 0.13 Pa); 扫描时间: 0.5 s。

### 2.2 标准溶液的配制

精密称量标准品制备标准品储备液: BIL 溶于 DMSO-CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH(2:2:1)混合溶剂体系; TAU 溶于 CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O(3:2)混合溶剂体系,其余标准品甲醇溶解。将各标准品储备液以不同比例混合制备混合标准品溶液,各胆汁酸、胆红素及牛磺酸质量浓度分别为 62.5, 125, 250 μg/mL。

### 2.3 血浆样品处理

精密量取血浆样品 100 μL,置 1.5 mL 高速离心管中,精密加入内标格列苯脲溶液(10 μg/mL) 10 μL,甲醇 400 μL,涡旋 5 min 混匀,4 °C、16 000 r/min 离心 10 min,转移上清液 200 μL 至进样小瓶,供 LC-MS/MS 分析。

## 3 结果

### 3.1 方法学研究

3.1.1 标准曲线和检测限 精密量取“2.2”项下制备的混合标准品溶液,按照不同比例稀释得到一系列浓度的混合标准溶液后,加入到空白混合血浆样品 100 μL 中,按照 2.3 项下方法操作,并进行色谱分析(图 1),分别记录各成分色谱峰面积( $A_s$ )、空白血浆中各成分色谱峰面积( $A_0$ )与内标色谱峰面积( $A_r$ )。重复测定 5 次,以峰面积比  $R[R = (A_s - A_0)/A_r]$  对质量浓度( $c$ , μg/mL)进行线性回归( $\omega = 1/c^2$ )。由于血样中含有内源性成分,各物质的最低检测限(LOD)和最低定量限以标准方程中截距标准差与斜率比值的 3.3 及 10 倍计算<sup>[6-7]</sup>,结果见表 1。

**Table 1** LC-MS/MS detection parameters and calibration curves of each analyte

Analyte	[ M - H ] <sup>-</sup> ( m/z )	SRM transition	Collision energy/V	Regression equation	R <sup>2</sup>	Linear range/ ( μg/mL )	LOD/ ( μg/mL )
LCA	375. 3	375. 3→375. 3	18	<i>R</i> = 13. 272 <i>c</i> - 0. 514 7	0. 995 9	0. 05-50	0. 005
UDCA	391. 3	391. 3→391. 3	15	<i>R</i> = 8. 597 5 <i>c</i> - 0. 432 1	0. 997 2	0. 05-50	0. 003
HDCA	391. 3	391. 3→391. 3	15	<i>R</i> = 7. 032 1 <i>c</i> - 0. 117 9	0. 994 7	0. 05-50	0. 007
CDCA	391. 3	391. 3→391. 3	15	<i>R</i> = 6. 712 2 <i>c</i> + 0. 056 6	0. 997 9	0. 05-50	0. 006
DCA	391. 3	391. 3→391. 3	15	<i>R</i> = 26. 315 5 <i>c</i> - 0. 001 8	0. 998 6	0. 05-50	0. 005
CA	407. 3	407. 3→343. 3	36	<i>R</i> = 1. 865 4 <i>c</i> - 0. 071 5	0. 997 1	0. 05-50	0. 004
GUDCA	448. 3	448. 3→74. 0	50	<i>R</i> = 1. 286 9 <i>c</i> + 0. 091 6	0. 998 6	0. 05-50	0. 005
GCDCa	448. 3	448. 3→74. 0	30	<i>R</i> = 1. 232 4 <i>c</i> - 0. 467 7	0. 999 0	0. 05-50	0. 005
GDCA	448. 3	448. 3→74. 0	42	<i>R</i> = 2. 157 8 <i>c</i> - 0. 107 9	0. 999 2	0. 05-50	0. 003
GCA	464. 3	464. 3→74. 0	36	<i>R</i> = 1. 816 9 <i>c</i> - 0. 212 8	0. 998 8	0. 2-200	0. 015
TUDCA	498. 3	498. 3→124. 0	36	<i>R</i> = 1. 024 1 <i>c</i> - 0. 677 7	0. 996 5	0. 05-50	0. 010
TCDCa	498. 3	498. 3→124. 0	32	<i>R</i> = 1. 117 9 <i>c</i> + 0. 232 2	0. 997 6	0. 05-50	0. 003
TDCA	498. 3	498. 3→124. 0	49	<i>R</i> = 0. 686 7 <i>c</i> - 0. 314 9	0. 997 3	0. 05-50	0. 012
TCA	514. 3	514. 3→80. 0	58	<i>R</i> = 0. 512 5 <i>c</i> - 0. 283 6	0. 998 5	0. 05-50	0. 010
TAU	124. 0	124. 0→124. 0	19	<i>R</i> = 0. 215 9 <i>c</i> - 0. 347 5	0. 998 6	0. 2-200	0. 024
BIL	583. 3	583. 3→284. 8	23	<i>R</i> = 5. 012 3 <i>c</i> - 0. 794 6	0. 994 7	0. 15-150	0. 031
GLIB	492. 0	492. 0→169. 8	28	-	-	-	-

3. 1. 2 精密度 按标准曲线测定方法,配制含各组分的 3 种不同浓度水平的样品,按“2. 3”项下方法同样操作。在同一分析批内连续测定 5 次,计算批内精密度;在不同天连续制备并测定 5 批,计算批间精密度。结果表明该方法精密度良好,RSD 在 4. 27% ~ 12. 58% 之间。

3. 1. 3 稳定性 按标准曲线测定方法,配制含各组分的 3 种不同浓度水平的血浆样品,每种浓度水平各 5 份,分别于室温下放置 0 和 24 h,按“2. 3”项下方法处理,测定各组分浓度。结果表明,样品测定的准确度在 90. 07% ~ 112. 45% 之间,RSD% 均小于 15%,说明样品室温放置 24 h 稳定。

3. 1. 4 回收率 取大鼠混合血浆 6 份,不加任何标准品及内标溶液,按“2. 3”项下方法处理后进样分析,计算各组分平均色谱峰面积  $A_0$ ,作为空白以校正血浆中内源性成分的干扰。

另取大鼠混合血浆 18 份,按标准曲线方法配制含各组分的 3 种不同浓度水平的血浆样品各 6 份,按“2. 3”项下方法处理,于上清液中精密加入 10 μg/mL 的内标溶液 10 μL,涡旋混匀 30 s,4 ℃ 高速离心 (12 000 r/min) 5 min,转移上清液供 LC-MS/MS 分析。分别计算各组分(扣除血浆中内源性成分含量)与内标色谱峰面积比  $[(A_s - A_0) - r]$ 。

再取大鼠混合血浆 6 份,按“2. 3”项下方法处理后,于上清液中精密加入与前一步骤等量的

混合标准品溶液及内标溶液适量,配成各浓度水平样品各 2 份,涡旋混匀 30 s,4 ℃ 高速离心 (12 000 r/min) 5 min,转移上清液供 LC-MS/MS 分析。分别计算各组分(扣除血浆中内源性成分含量)与内标色谱峰面积比  $[(A_r - A_0) - r]$ 。

对上述  $(A_s - A_0) - r$ 、 $(A_r - A_0) - r$  按  $[(A_s - A_0) - r] / [(A_r - A_0) - r] \times 100\%$  计算,即得各组分血浆样品处理方法的回收率(%),结果表明,各组分高、中、低 3 种浓度水平的平均回收率均大于 80% 且稳定。

3. 1. 5 基质效应

A 组(空白基质组):取大鼠混合血浆 6 份,不加任何标准品及内标溶液,按“2. 3”项下方法处理后进样分析,计算各组分平均色谱峰面积  $A_0$ ,作为空白以校正血浆中内源性成分的干扰。

B 组(基质样品组):取大鼠混合血浆 18 份,按“2. 3”项下方法处理后,取上清液 200 μL,参照标准曲线方法,于上清液中分别精密加入混合标准品和内标溶液适量,配制成含各组分 3 种浓度水平的血浆样品各 6 份。涡旋混匀 30 s,4 ℃ 12 000 r/min 高速离心 5 min 后,转移上清液供 LC-MS/MS 分析。分别记录各组分和内标的色谱峰面积  $A_s$ 。

C 组(基质对照组):取 1. 5 mL 高速离心管数支,加入甲醇 200 μL,分别精密加入混合标准品和内标溶液适量,配制成含各组分 3 种浓度水平的标准对照品各 6 份。涡旋混匀 30 s,4 ℃ 12 000 r/min

高速离心 5 min 后,转移上清液供 LC-MS/MS 分析。分别记录各组分和内标的色谱峰面积  $A_r$ 。

以上述各组峰面积比值  $(A_s - A_0)/A_r$  考察基质效应。结果表明,生物基质对样品和内标质谱响应的影 响基本稳定。

Table 2 Quantification of each analyte in various plasma samples of rats (μg/mL)

Analyte	No.						Mean/ (μg/mL)	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
LCA	0.134	0.435	0.643	0.241	0.333	0.075	0.310	67.32
UDCA	0.784	3.219	0.888	1.579	4.556	2.132	2.193	66.72
HDCA	0.338	1.133	1.965	2.458	0.965	1.117	1.329	57.06
CDCA	0.905	1.998	4.332	3.219	0.657	2.223	2.222	62.61
DCA	0.736	5.435	3.219	7.938	0.885	2.413	3.438	81.40
CA	1.036	9.545	11.788	14.932	13.213	12.959	10.579	47.29
GUDCA	0.421	0.989	0.556	0.493	0.998	0.785	0.707	35.82
GCDCA	0.328	0.832	0.949	0.536	1.323	0.574	0.757	46.86
GDCA	0.704	0.089	1.354	1.365	1.003	0.545	0.843	58.95
GCA	4.292	1.215	2.343	3.914	1.898	1.076	2.456	55.42
TUDCA	0.117	0.234	0.059	0.053	0.147	0.212	0.137	55.28
TCDCa	0.082	0.055	0.113	0.078	0.059	0.142	0.088	37.98
TDCA	0.105	0.157	0.143	0.088	0.655	0.302	0.242	89.46
TCA	0.051	0.135	0.132	0.265	0.347	0.054	0.164	72.37
TAU	8.785	12.456	10.321	13.145	7.554	9.321	10.264	21.14
BIL	2.579	4.833	2.998	3.219	5.346	6.732	4.285	37.80

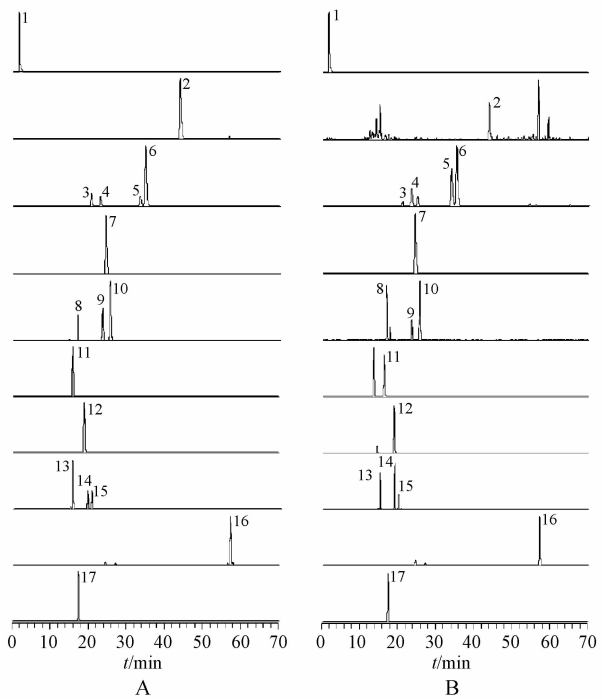


Figure 1 Typical chromatograms of standard solution (A) and plasma sample (B) by LC-MS/MS  
1:TAU;2:LCA;3:UDCA;4:HDCA;5:CDCA;6:DCA;7:CA;8:GUD-CA;9:GCDCA;10:GDCA;11:TCA;12:GCA;13:TUDCA;14:TCDCa;15:TDCA;16:BIL;17:GLIB (IS)

3.2 方法应用

应用所建立的方法,随机测定了 6 只大鼠血浆中各种胆汁酸、胆红素及牛磺酸的含量。结果显示,不同个体中的各待测物质含量存在较大差异(表 2,图 1)。

4 讨论

4.1 样品前处理方法优化

由于胆汁酸、牛磺酸及胆红素溶解性存在较大差异,选择合适的多溶剂体系对溶解和提取多种成分十分重要。胆汁酸类成分由于其强极性可较好地溶于甲醇、水等溶剂,而胆红素仅在二甲基亚砜、氯仿或酸性溶剂中才有较好的溶解性<sup>[8]</sup>,本研究选用二甲基亚砜、氯仿与甲醇的混合溶液溶解胆红素标准品。此外,牛磺酸不能完全溶于纯甲醇溶液,因此在牛磺酸标准品的制备过程中加入了一定比例的水以确保牛磺酸标准品的完全溶解。

合适的样品前处理方法较为显著地影响样品中有效成分的提取效率(尤其是多成分的同时提取)。本研究以各成分峰面积为标准,分别比较了甲醇、乙腈沉淀蛋白法,乙酸乙酯、氯仿溶剂萃取法等不同的样品前处理方法,考虑到单一的溶剂体系不能同时溶解多种待测成分,最终选用甲醇沉淀蛋白法为样品前处理方法。

4.2 色谱条件优化

LC-MS/MS 技术由于其高灵敏性、高选择性,

已越来越多地用于体内外成分的定量分析<sup>[9]</sup>。胆汁酸类物质的同分异构体结构不利于各种构型胆酸的有效分离。本研究系统考察了不同的色谱柱类型、流动相体系、梯度洗脱程序、柱温及流速等色谱条件对分离效果的影响,发现 pH 对各待测成分的分离影响尤为显著,使用甲酸作为改性剂可有效提高各成分的质谱响应和分离效果。

#### 4.3 质谱条件优化

选择性反应监测(SRM)检测模式具有更高的灵敏度和专属性,更适用于分析成分相对复杂的生物样本以及微量成分的定量分析,对于同一成分而言,选择合适的前体离子和产物离子对于提高待测成分的专属性和灵敏度至关重要<sup>[10]</sup>。本研究采取流动注射模式对各待测成分的前体离子、产物离子以及碰撞能进行了系统优化,牛磺酸及非结合胆酸(CA 除外)在不同的碰撞能下均未产生显著的产物离子,最终选用 $[M-H]^-$ 作为前体离子及产物离子,可有效消除基质背景的干扰。此外,在一级质谱模式下胆红素几乎没有明显的准分子离子峰,此种现象可能与该物质本身的热不稳定性有关,然而在 SRM 模式下该物质可获得较为稳定的产物离子( $m/z$  284.8),可满足该物质的定量分析要求。

#### 4.4 含量测定结果分析

既往文献报道牛磺酸的定量测定常需要进行柱前衍生化处理,测定方法繁琐、费时且干扰因素较多,难以应用于基质成分复杂的生物样品测定<sup>[11-14]</sup>;《中华人民共和国药典》(2010 年版)采用分光光度法测定胆红素含量,该方法灵敏度较低,测定结果受背景干扰大,应用范围有限。本研究建立的 LC-MS/MS 分析方法同时测定大鼠血浆中胆汁酸、胆红素及牛磺酸含量,方法简便、灵敏,专属性强,不受血浆中内源性物质的干扰,适用于生物样品中此类成分的定量分析。

#### 参考文献

[1] Burkard I, von Eckardstein A, Rentsch KM. Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2005, **826**(1/2):147-159.

[2] McGeary RP, Szyzew AJ, Toth I. Biological properties and therapeutic potential of bilirubin[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2003, **3**(3):253-256.

[3] van Stijn MFM, Vermeulen MAR, Siroen MPC, et al. Human taurine metabolism; fluxes and fractional extraction rates of the gut, liver, and kidneys[J]. *Metabolism*, 2012, **61**(7):1 036-1 040.

[4] Wojcik OP, Koenig KL, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. The potential protective effects of taurine on coronary heart disease[J]. *Atherosclerosis*, 2010, **208**(1):19-25.

[5] Kong WJ, Jin C, Liu W, et al. Development and validation of a UPLC-ELSD method for fast simultaneous determination of five bile acid derivatives in calculus bovis and its medicinal preparations[J]. *Food Chem*, 2010, **120**(4):1 193-1 200.

[6] Sergi M, Montesano C, Napoletano S, et al. Analysis of bile acids profile in human serum by ultrafiltration clean-up and LC-MS/MS[J]. *Chromatographia*, 2012, **75**(9/10):479-489.

[7] Pellicciari R, Gioiello A, Sabbatini P, et al. Avicholic acid: a lead compound from birds on the route to potent TGR5 modulators[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2012, **3**(4):273-277.

[8] Zhang Q, Yan K, Qian L. Determination of cholesterol in natural bezoar by gas chromatography[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1991, **16**(7):426-428.

[9] Qiao X, Ye M, Pan DL, et al. Differentiation of various traditional Chinese medicines derived from animal bile and gallstone; simultaneous determination of bile acids by liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2011, **1 218**(1):107-117.

[10] Xu L, Tian JX, Song R, et al. LC MS/MS determination and comparison of saikosaponin a, b2, c, d in crude and processed radix bupleuri by vinegar[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2012, **43**(4):334-340.

[11] Wang XY, Sun CJ, Zhang JS. Determination of taurine in milk powder by high performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate[J]. *J Environ Occup Med*, 2009, **26**(3):301-304.

[12] Zinellu A, Sotgia S, Bastianina S, et al. Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection; from clinical field to quality food applications[J]. *Amino Acids*, 2009, **36**(1):35-41.

[13] Sakai T, Nagasawa T. Simple, rapid and sensitive determination of plasma taurine by high-performance liquid chromatography using pre-column derivative formation with fluorecamine[J]. *J Chromatogr B*, 1992, **576**(1):155-157.

[14] Kelly MT, Fabre H, Perrett D. Determination of taurine in plasma by capillary zone electrophoresis following derivatisation with fluorecamine[J]. *Electrophoresis*, 2000, **21**(4):699-705.