

生物分子的分离与检测

邹汉法, 黄晓冬

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116011)

关键词: 毛细管电泳 (capillary electrophoresis); 生物色谱 (biochromatography); 生物质谱 (biomass spectrometry); 生物分子 (biomolecule)

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2003)04-0311-05

21世纪是生命科学的世纪, 生命科学的发展离不开研究手段(主要是分离、分析、测试手段)的创新和发展。而分析方法的发展也推动了生命科学的研究向更高、更深入的层次进展。分析生物化学(analytical biochemistry)在这种背景下应运而生, 它是利用现代的分析、分离手段来获取生物体系中的有关化学信息以及各种相互作用间联系的一门新兴学科。“21世纪生命科学的特点将首先是分析与综合的统一, 分析将密切地与功能研究相结合, 而综合将越来越多地建立在分析的基础上。”虽然过去存在对分析工作的生物学意义重视不够的问题, 但这一情况正在迅速改变。当前的分析工作的任务不仅远远没有完成, 而且还面临着大量的、水平要求愈来愈高的分析工作^[1]。20世纪90年代末期诞生的系统生物学(systems biology)包括基因组学、蛋白质组学、代谢组学和生物信息学, 分别通过基因、蛋白质和代谢产物水平上的整体分析来研究和探索生命的现象和本质。很显然针对这些复杂的生物体系, 首先要解决的重大问题是生物系统物质组成的高通量分离分析和结构鉴定。生物分子识别作用与其生物功能的产生密切相关, 因此从分子水平上建立高通量、高灵敏度的生物活性分子相互作用研究与分析的新技术和新方法是生物分析化学的另一大发展趋势。当代物理学、数学、电子学、生物学以及工程科学的发展使分析化学进入了一个新的境界, 大量新的分析方法、技术和原理不断涌现出来。如激光技术的引入, 促进了诸如激光共振电离光谱、激光诱导荧光光谱和激光质谱的开展, 大大提高了分析方法的灵敏度, 使得检测单个原子或单个分子成为可能。以下结合我们的研究工作对生物活性分子分离与检测领域的一些新技术和新方法进行介绍。

1 现代色谱分析技术

复杂体系中生物分子的分离和测定已成为分析化学家所面临的艰巨任务。由液相色谱、气相色谱、超临界流体色谱和毛细管电泳等所组成的色谱学是

现代分离、分析的主要组成部分。应生命科学高速发展的要求, 近年来色谱分析技术也取得了许多新的进展。尤其是在基因组、蛋白质组以及代谢组学的研究中, 大量新的高选择性、高分辨率色谱技术发挥着不可替代的作用。

1.1 毛细管电泳技术

毛细管电泳(CE)是目前对生物大分子分辨率最高的分离分析技术。由于CE采用极细内径的弹性石英毛细管作为分离载体, 进样量小, 可操作性强, 分离快速、高效, 因而它在蛋白质分离、糖分析、脱氧核糖核酸(DNA)测序、单细胞分析中发挥着越来越重要的作用。其分离效率可达百万理论塔片, 进样体积只需nL, 并且易于同其他检测方法联用, 最低检测限可达 10^{-19} mol, 是微分离分析中最有效的方法之一^[2,3]。近年来, 毛细管电泳技术已被应用于基因组、蛋白质组以及代谢组学的研究中。其中阵列毛细管电泳、亲和毛细管电泳、芯片毛细管电泳以及和其他高灵敏检测技术的联用最为引人注目。阵列毛细管电泳平台可允许同时操作多根毛细管进行分析, 大大提高了分离分析的效率。正是这种技术的发展实现了高通量的DNA测序, 使人类基因组计划提前完成。亲和毛细管电泳是研究生物活性分子间相互作用的有效手段。这种方法样品消耗量小、速度快、柱效高并且所用溶液体系非常接近生物体液组成, 可以得到较为真实的生物分子相互作用信息, 已被用于生物活性物质如蛋白质、核酸、糖类等与药物分子之间的相互作用的研究, 是一种非常具有潜力的药物先导化合物的高效筛选工具^[4]。我们曾利用毛细管区带电泳测定了人生长激素与单克隆抗体的免疫反应活性及其计量数^[5]。毛细管电泳和激光诱导荧光技术的联用已经实现了单分子水平的检测, 其检出限可达 10^{-12} mol/L^[6]。目前我们正在利用这种技术进行单细胞成分的分析研究。此外CE与质谱(MS)的联用也是一个令人兴奋的技术。它能在高效分离的同时在线提供化合物的结构信息, 在肽链测序及蛋白结构、相对分子质

量测定、单细胞分析等方面有卓越的表现^[7]。近来这种方法在蛋白质组学的研究中得到应用。Smith 等^[8]用毛细管等电聚焦与超高精确度和灵敏度的电喷雾傅里叶离子回旋共振质谱联用,分析了大肠杆菌蛋白质表达的变化,300 ng 的样品总量中,在 2 000~100 000 的相对分子质量范围内可以确定 400~1 000 个蛋白。芯片毛细管电泳将电泳操作进一步缩小至芯片上的微通道中,由于分离通道短、场强大,因此分离速度更快、效率更高,是目前微全分析系统(μ -TAS)的主流技术。1999 年,Haab 和 Mathies^[9]将单分子检测与芯片毛细管电泳相结合,利用芯片本身的微通道迫使更多的分子通过检测区,同时利用鞘流聚集技术使单分子检测效率从毛细管电泳的 0.01% 提高到了 1.1%。此外,利用毛细管电泳技术分析细胞代谢产物中某些改性核苷含量的变化,有可能应用于肿瘤以及艾滋病的诊断^[10]。

毛细管电色谱(CEC)是在毛细管中填充或在毛细管壁涂布、键合色谱固定相,依靠电渗流推动流动相,使中性和带电荷的样品分子根据它们在色谱固定相和流动相间吸附、分配平衡常数和电泳速率的差异而达到分离分析的一种电分离模式^[11~15]。它结合了毛细管电泳的高效性和高效液相色谱的高选择性,具有高效、快速、微量的特点,是一种新兴的微柱分离分析技术。CEC 技术也将逐步在本世纪内生物分子的分离分析中获得应用^[16]。

1.2 多维色谱技术

尽管近年来高效液相色谱和毛细管电泳技术的进展为生物活性分子的分离分析提供了有效的手段,但是面对非常复杂的体系,一维的分离模式所能提供的分辨率和峰容量往往十分有限。Giddings 曾指出,用一维分离方法对含有 100 个随机分布组分的样品进行分离,完全分离 82 个组分就需要有大约四百万的理论塔片数^[17]。因此,单纯从目前的分离手段出发不足以对复杂样品体系中随机峰组分进行完全分离。根据 Giddings 建立的数学模型^[18],多维分离模式的峰容量是其构成的各个一维分离模式的峰容量的乘积,因此多维色谱相比于一维色谱能提供更大的峰容量,更适合于复杂样品的分析。根据分离机理的不同,可以将多维分离模式大致分为多维 HPLC、多维 CE 以及多维 HPLC-CE 三大类。

1.2.1 多维高效液相色谱

同一维液相色谱系统相比,多维液相色谱分离系统最主要的优势在于提供了不同寻常的峰容量。这使得大多数目标化合物和化合物族可以获得基线分离。同时组分峰在多维分离空间中被多重定位,减少了干扰,定性可靠。另外,相对于同族的其他化合物来说,每个峰在每次运行中其位置是稳定的,容

易识别。因此,多维液相色谱技术已经广泛地应用于复杂样品的分析研究中,特别是蛋白质组学研究和药物分析方面。与传统二维凝胶电泳相比,多维液相色谱系统最突出的优点是:(1)快速、灵敏,便于自动化,能够满足蛋白质组学研究高通量的要求。(2)对蛋白质全组分进行分析时的歧视效应大大减小。从目前的发展方向看,多维液相色谱-质谱联用有望成为蛋白质组学分离技术的一个新的生长点,而且越来越受到关注。Regnier 等人^[19]建立了全自动化特征肽鉴定蛋白质的方法,利用多维液相色谱技术对复杂体系中蛋白质鉴定所需的还原和烷基化反应、胰蛋白酶酶解、固载化金属亲和色谱、反相色谱以及电喷雾电离-质谱(ESI-MS)分析等全流程操作实现了在线自动化。整个系统中可以任意在其中的一个步骤添加多根柱子,并联运行以实现高通量分析。该方法对脱脂牛奶中蛋白质鉴定的全过程不超过 2 h,耗时仅为传统方法的十分之一。Yates 等人^[20,21]将不同的色谱分离模式以串联方式合并于同一色谱柱中进行,即在同一色谱柱的前半部分装填强阳离子色谱填料,后半部分填充反相色谱填料。经酶解的多肽混合物进样到强阳离子交换柱,以台阶梯度增加盐浓度,依次将馏分直接洗脱进入反相色谱填料上,线性增加乙腈浓度,对反相色谱填料上有保留的组分进行洗脱分离,并由质谱鉴定。这种方法称为多维蛋白质鉴定技术(multidimensional protein identification technology, MudPIT),一个分析周期可检测 100 多种蛋白质,适用于蛋白质组学研究中蛋白质的大规模分离鉴定。Koller 等人^[22]利用这种基于多维液相色谱技术的 MudPIT 方法进行了水稻蛋白质组研究,同时还与传统的经二维凝胶电泳分离,质谱鉴定的方法进行了结果比较。传统方法识别了 556 个水稻蛋白质(1 509 个肽段),而 MudPIT 方法共检出和识别了 2 363 个水稻蛋白质(5 189 个肽段),这是至今由多维液相色谱技术鉴定蛋白质数目最多的文献报道,充分体现了多维色谱在蛋白质组研究中的巨大潜力。

中药是一个非常复杂的体系,常常含有从无机物到有机物、从极性到非极性、从小分子到生物大分子的各种成分。中药的质量控制离不开其化学成分的提取、分离、纯化、结构鉴定和定量分析。因此,对中药提取物中某些特定组分的分离分析将有助于质量控制。Yang 等^[23]利用多维逆流液相色谱成功地从银杏的粗提物中分离纯化了鼠李醚、四羟基黄酮和槲皮甙等组分。

尽管多维液相色谱最适用于分离复杂混合物,但它也适用于对含有相对简单目标化合物的混合物进行快速扫描分析。在对富含蛋白质的体液,如血浆等样品中的药物进行血清药代动力学分析时,往

往需要进行复杂的样品预处理,如液液萃取,存在着过程复杂、耗时长等缺点。Stopher 等^[24]利用多维色谱的柱切换功能,在第一维柱上将待测药物 voriconazole 与干扰的生物大分子进行分离,然后在后续柱上完成样品分析,从而实现了血浆样品直接进样检测。在对生物样品中的对映体进行拆分时,由于内源性物质及代谢产物的干扰,仅由手性色谱柱拆分容易造成谱峰重叠,将手性拆分柱与常规分析柱串联组成的多维色谱系统已经成功地解决了这一问题^[25]。

1.2.2 多维毛细管电泳

和多维 HPLC 相比,多维 CE 在蛋白质组研究中的应用正处于起步阶段。Sheng 等^[26]用毛细管胶束电泳和毛细管等电聚焦在线二维分离模式在 4 min 内完成了对一种蛋白质水解产物的浓缩、分离和检测。Mohan 等^[27]通过微透析界面实现了毛细管等电聚焦和毛细管区带电泳的二维分离模式并将该模式应用到蛋白水解肽的分析中,峰容量可以达到 1 600 左右。张玉奎等^[28]采用中空纤维膜实现了毛细管等电聚焦和毛细管凝胶电泳的二维连接,并用于血红蛋白的多态性研究。

1.2.3 多维高效液相色谱-毛细管电泳

多维 HPLC-CE 系统是由 Jorgenson 等^[29,30]提出的。它们设计了两种不同的接口——阀/环设计 (valve/loop design) 和横向流控界面 (transverse flow gating interface),实现了反相色谱和毛细管区带电泳二维分离模式以及排阻色谱-反相色谱-毛细管区带电泳三维分离模式,并将它们用于蛋白质降解产物的分析中。Chen 等^[31]以微进样器作为接口建立了毛细管等电聚焦和毛细管反相色谱二维分离体系并将其应用于从果蝇唾液腺中提取的肽类样品的分析,峰容量可达约 1 800。张祥民等^[32]利用全二维毛细管液相色谱和毛细管电泳串联对中药复方承气汤中的中性组分进行分离,得到 110 个良好分离的组分,系统的峰容量高达 2 000。最近,Stahl 等^[33]实现了排阻色谱-加压电色谱-质谱多维分离模式。

1.2.4 多维液相分离系统的微型化

由于微型化分析仪器具有分析速度快、高通量、易于优化设计、样品及试剂消耗少等优点,近来发展十分迅速。多维分离系统的微型化工作也已经开展。Ramsey 研究组^[34]将胶束电动色谱和快速毛细管电泳这两种分离模式设计在玻璃芯片上构成了全二维微型分离装置,与单独采用任意一维分离模式相比大大提高了系统的分辨率。该装置可以电动控制进行自动化分析,对多肽混合物的分析时间在 10 min 之内,全系统的峰容量大约为 500 ~ 1 000。Slentz 等^[35]将固载化胰蛋白酶酶解、固定化金属离子螯合亲和色谱、反相色谱分离等三维操作系统集

成在聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 芯片上,构成多维微全分析系统 (multidimensional micro-total analysis systems, MD μ TAS),并对牛血清白蛋白样品进行了全自动芯片蛋白质酶解组分分析的尝试。

1.3 生物色谱技术

生物色谱是利用生物活性物质的特异性相互作用进行生物样品分离分析和生物活性参数测定的新兴技术。我们将牛生长激素释放因子及其抗体固载到灌流色谱填料上,发展出快速测定牛生长激素释放因子及其抗体的免疫亲和色谱法,该方法还被用于分离纯化牛生长激素抗体与酶的共价聚合物^[36]。同时通过对牛生长激素释放因子的抗体进行异硫氰酸盐荧光素 (FITC) 标记,采用夹心免疫检测原理建立了牛生长激素免疫亲和色谱柱上荧光检测方法,使牛生长激素释放因子的检测下限达到 200 ng/L^[37]。

药物分子或手性药物的对映体由于在体内与生物活性分子(如血浆蛋白)之间相互作用存在差异,因此它们在体内的代谢过程以及生理活性表现出明显不同。利用生物活性分子作为配体的生物色谱可以有效地应用在手性药物的拆分以及中药的成分分析、活性成分和药物先导物的筛选上。我们研究了一些非甾类抗炎药在人血清白蛋白柱上的拆分,建立了吸附蛋白质固定相毛细管电色谱拆分手性药物的新方法^[38-40]。利用微透析和生物分子色谱联用技术测定了药物和人血清白蛋白之间的立体相互作用^[41-43]。此外利用人血清白蛋白生物色谱柱对多种单味中药有效成分进行了筛选^[44,45]。

生物色谱的发展离不开新型固定相材料的研究。我们已经发展出适合于生物大分子分离纯化的膜色谱介质,并成功应用于人血清白蛋白、Catalase 酶、人体 IgG 等生物大分子的分离纯化^[46-50]。最近我们发展了新型的整体材料固定相,这种材料具有制备过程简单、重复性好、易于化学工业改性、柱压低以及传质速度快等优点,特别适用于生物大分子的分离分析。我们制备了蛋白 A 和模拟生物特异性配体亲和色谱整体柱用于免疫球蛋白 G 的快速分离分析及血浆中过量 IgG 的清除^[51],制备了金属螯合亲和整体柱用于蛋白质的分离^[52],以整体材料为载体的固定化木瓜蛋白酶生物反应器成功用于酶解人 IgG^[53]。分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymers) 是一种特异性的分子识别材料,它能特异性地识别目标分子,被称为“人工抗体”。我们以氨基酸衍生物和辛可纳生物碱为模板合成了分子印迹整体柱并将其用于氨基酸衍生物和辛可纳生物碱的手性拆分中^[54-56]。此外,我们通过在传统硅球表面涂覆或键合卵磷脂建立了模拟生物膜色谱并将其用于预测药物的小肠吸收以及中药活性成分

的筛选^[57~59]。

2 基体辅助激光解吸电离生物质谱

生物质谱的兴起源自于人们对生命科学过程中有关活性物质分析的迫切要求,而新的质谱电离技术的出现,尤其是基体辅助激光解吸电离技术(MALDI)和电喷雾电离技术,为质谱从近代结构化学和分析化学领域进入生命科学范畴提供了可能性。2002年诺贝尔化学奖授予了发明MALDI和ESI生物质谱技术的二位学者,更加体现这种技术在生命科学研究中的重要性。生物质谱主要用于解决两个问题,其一是精确测量生物大分子的相对分子质量,并提供它们的分子结构信息,其二是对存在于生命复杂体系中的微量或痕量小分子活性物质进行定性或定量分析。目前生物质谱已在多肽、蛋白质、寡核苷酸、多糖和寡糖等生物样品的分析与结构鉴定方面获得广泛的应用。而在临床医学分析方面,通过微量体液中标记物的快速测定,质谱可以为癌症等疾病的早期诊断提供有效的手段。

MALDI生物质谱是使一些易吸收激光能量的弱有机酸碱类物质作为基体先吸收激光能量,之后再将能量传递给样品分子,使样品分子获得足够的能量气化,得到完整的分子离子质谱峰。基体的引入克服了由于过量的激光能量直接轰击样品而使得样品裂解的问题,从而可以对大分子物质进行精确的质量分析,目前可测定的最大相对分子质量超过1 500 000。通常基体分子起着能量传递、样品分子隔离以降低解吸能以及质子化或去质子化剂的作用,而对其系统的研究结果表明,作为基体物质必须具有一定的可溶性、光吸收性以及比较低的反应活性,且一般含有苯环及一个至数个羧基、羟基或伯氨基。常用的基体有 α -氰基-4-羟基-肉桂酸、2,5-二羟基苯甲酸和3-羟基吡啶甲酸等。利用MALDI生物质谱,我们主要开展了以下三方面的工作(1)中草药MALDI分析。中药的真伪鉴别和质量控制是中药现代化、国际化的重要前提,目前中药材的鉴别方法主要为色谱法、紫外及红外光谱法,相对分析时间比较长。MALDI质谱除具分析速度快、灵敏度高的特点外,还具有抗干扰能力强及可以用于复杂体系中混合物同时测定的特点。我们尝试利用该技术对中药进行分析,通过对不同产地药物提取物进行质谱分析得到对应质谱图,通过指纹峰和专属性较强的峰来判断药物的真伪,从而建立中草药的MALDI指纹谱库,对中草药进行快速鉴别^[60]。(2)固定化酶蛋白质肽谱分析。在游离酶肽谱分析中一个比较大的缺点是酶自水解产物会干扰分析结果,同时酶寿命短不能重复利用,而这个问题可以通过固定化酶水解蛋白质来避免。通过共价或金属螯合

的方法,我们在不同的载体如甲基丙烯酸缩水甘油酯复合膜^[61]、多孔硅以及石英熔融毛细管上键合蛋白酶制得酶微反应器,并将其用于蛋白质的肽谱分析。其中利用毛细管管壁共价键合胰蛋白酶微反应器,5 min内对9 fmol的马心细胞色素C成功地进行肽谱分析,获得了76%的序列覆盖度^[62]。(3)小分子分析。通过使用多孔硅材料,能够有效的克服使用有机基体分析样品时所带来的基体信号干扰问题,因而十分适合药物等小分子的分析^[63]。同时通过处理多孔硅表面而键合上特定官能团,可以进行物质相互作用研究、蛋白质肽谱分析。在硅表面键合牛血清白蛋白得到亲和质谱靶,然后用质谱检测药物分子与靶体上共价键合的蛋白质的分子识别作用情况^[64],从而为药物的筛选提供了质谱快速检测的途径,同时通过对多孔硅制备工艺的改进和微加工技术的引入,可以进一步实现生物活性分子识别作用的高通量筛选技术。我们还发现表面活性剂与常规有机基体的混合物和碳纳米管作为MALDI的基体,可以有效抑制基体信号的产生^[65],对一系列小分子化合物成功地进行高通量分析。

参考文献:

- [1] Zou Chenglu. Bulletin of the Chinese Academy of Sciences, 2001, 16(1):1
邹承鲁. 中国科学院院刊, 2001, 16(1):1
- [2] Chen Yi. Capillary Electrophoresis and Its Application. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 2
陈义. 毛细管电泳技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2000. 2
- [3] Lin Bingcheng. Introduction of Capillary Electrophoresis. Beijing: Science Press, 1996. 3
林炳承. 毛细管电泳导论. 北京: 科学出版社, 1996. 3
- [4] He Xinya, Lin Bingcheng, Ding Yongsheng. Advance in Chemistry, 2002, 14(5):332
何新亚, 林炳承, 丁永生. 化学进展, 2002, 14(5):332
- [5] Zou H F, Lu P Z, Krull I S. Biomed Chromatogr, 1996, 10:78
- [6] Gai Hongwei, Bai Jiling, Lin Bingcheng. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2002, 30(7):869
盖宏伟, 白吉玲, 林炳承. 分析化学, 2002, 30(7):869
- [7] Mao Yu, Xu Jianming. Chemistry Research and Application, 2001, 13(1):4
毛煜, 徐建明. 化学研究与应用, 2001, 13(1):4
- [8] Jensen P K, Pasa-Tolic L, Peden K K, Martinovic S, Lipton M S, Anderson G A, Tolic N, Wong K K, Smith R D. Electrophoresis, 2000, 21(7):1372
- [9] Haab B B, Mathies R A. Anal Chem, 1999, 71:5137
- [10] Mei Surong, Xu Guowang, Wu Caiying. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2000, 28(4):507
梅素蓉, 许国旺, 吴采樱. 分析化学, 2000, 28(4):507
- [11] Wu R A, Zou H F, Ye M L, Lei Z D, Ni J Y. Anal Chem, 2001, 73:4918
- [12] Wu Ren'an, Zou Hanfa, Ye Mingliang, Xiong Bohui, Ni Jianyi. Chinese Journal of Chromatography, 2001, 19(3):193
吴仁安, 邹汉法, 叶明亮, 熊博晖, 倪坚毅. 色谱, 2001, 19(3):193
- [13] Ye Mingliang, Zou Hanfa, Liu Zhen, Ni Jianyi, Zhuang Qianyi, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography, 1999, 17(2):142

- 叶明亮, 邹汉法, 刘震, 倪坚毅, 庄谦义, 张玉奎. 色谱, 1999, 17(2): 142
- [14] Shi Wei, Zhang Lihua, Dong Lifu, Zou Hanfa, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography, 1997, 15(3): 201
施维, 张丽华, 董礼孚, 邹汉法, 张玉奎. 色谱, 1997, 15(3): 201
- [15] Shi Wei, Zou Hanfa, Zhang Jin, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography, 1997, 15(5): 388
施维, 邹汉法, 张津, 张玉奎. 色谱, 1997, 15(5): 388
- [16] Fu H J, Huang X D, Jin W H, Zou H F. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14: 96
- [17] Davis J M, Giddings J C. Anal Chem, 1985, 57: 2168
- [18] Giddings J C. J High Resolut Chromatogr, 1987, 10: 319
- [19] Riggs L, Sioma C, Regnier F E. J Chromatogr A, 2001, 924: 359
- [20] Link A J, Eng J, McDonald W H, Schieltz D M, Carmack E, Mize G J, Morris D R, Garvik B M, Yates J R III. Nat Biotechnology, 1999, 17: 676
- [21] Wolters D A, Washburn M P, Yates J R III. Anal Chem, 2001, 73: 5683
- [22] Koller A, Washburn M P, Lange B M, Andon N L, Decui C, Haynes P A, Hays L, Schieltz D, Ulaszek R, Wei J, Wolters D, Yates J R III. Proc Natl Sci USA, 2002, 99: 11969
- [23] Yang F, Quan J, Zhang T Y, Ito Y. J Chromatogr A, 1998, 803: 298
- [24] Stopher D A, Gage R. J Chromatogr B, 1997, 691: 441
- [25] Chiarotto J A, Wainer I W. J Chromatogr B, 1995, 665: 147
- [26] Sheng L, Pawliszyn J. Analyst, 2002, 127: 1159
- [27] Mohan D, Lee C S. Electrophoresis, 2002, 23: 3160
- [28] Yang C, Zhang W B, Zhang Y K. Anal Chem, 2003, in press
- [29] Lemmo A V, Jorgenson J W. Anal Chem, 1993, 65: 1576
- [30] Lemmo A V, Jorgenson J W. J Chromatogr A, 1993, 633: 213
- [31] Chen J Z, Lee C S, Shen Y F, Smith R D, Baehrecke E H. Electrophoresis, 2002, 18: 3143
- [32] Zhang X, Hu H, Xu S, Yang X, Zhang J. J Sep Sci, 2001, 24: 385
- [33] Stahl M, Jakob A, von Brocke A, Nicholson G, Bayer E. Electrophoresis, 2002, 23: 2949
- [34] Rocklin R D, Ramsey R S, Ramsey J M. Anal Chem, 2000, 72: 5244
- [35] Slentz B E, Penner N A, Regnier F E. J Chromatogr A, 2003, 984: 97
- [36] Zou H F, Lu P Z, Krull I S. Biomed Chromatogr, 1996, 10: 126
- [37] Cho B Y, Zou H F, Krull I S. J Chromatogr, 1996, 743: 181
- [38] Liu Z, Zou H F, Ye M L, Ni J Y, Zhang Y K. Electrophoresis, 1999, 14: 2891
- [39] Ye Mingliang, Zou Hanfa, Lei Zhengdeng, Wu Ren'an, Ni Jianyi. Chinese Journal of Chromatography, 2001, 19(5): 390
叶明亮, 邹汉法, 雷政登, 吴仁安, 倪坚毅. 色谱, 2001, 19(5): 390
- [40] Liu Zhen, Zou Hanfa, Ye Mingliang, Ni Jianyi, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography, 1999, 17(3): 245
刘震, 邹汉法, 叶明亮, 倪坚毅, 张玉奎. 色谱, 1999, 17(3): 245
- [41] Wang H L, Zou H F, Zhang Y K. Anal Chem, 1998, 70: 373
- [42] Guo Ming, Kong Liang, Li Xin, Zou Hanfa. Chinese Journal of Chromatography, 2003, 21(2): 147
郭明, 孔亮, 厉欣, 邹汉法. 色谱, 2003, 21(2): 147
- [43] Wang Hailin, Zou Hanfa, Sun Shengcai, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography, 1996, 14(6): 441
汪海林, 邹汉法, 孙生才, 张玉奎. 色谱, 1996, 14(6): 441
- [44] Kong L, Li X, Zou H F, Wang H L, Mao X Q, Zhang Q, Ni J Y. J Chromatogr A, 2001, 936: 111
- [45] Wang Hailin, Zou Hanfa, Kong Liang, Ni Jianyi, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography, 1999, 17(2): 123
- 汪海林, 邹汉法, 孔亮, 倪坚毅, 张玉奎. 色谱, 1999, 17(2): 123
- [46] Zhou D M, Zou H F, Ni J Y, Yang L, Jia L Y, Zhang Y K. Anal Chem, 1999, 71: 115
- [47] Jia Lingyun, Yang Li, Zou Hanfa, Zhang Yukui, Zhao Jiuyang, Fan Chengming, Sha Liyan. Chinese Journal of Chromatography, 1999, 17(2): 107
贾凌云, 杨利, 邹汉法, 张玉奎, 赵久阳, 范成明, 沙丽艳. 色谱, 1999, 17(2): 107
- [48] Yang Li, Chen Xiaoming, Jia Lingyun, Zou Hanfa, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography, 1998, 16(3): 195
杨利, 陈小明, 贾凌云, 邹汉法, 张玉奎. 色谱, 1998, 16(3): 195
- [49] Zhou Dongmei, Zou Hanfa, Yang Li, Jia Lingyun, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography, 1998, 16(3): 195
周冬梅, 邹汉法, 杨利, 贾凌云, 张玉奎. 色谱, 1998, 16(3): 195
- [50] Jia Lingyun, Yang Li, Zou Hanfa, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography, 1998, 16(6): 476
贾凌云, 杨利, 邹汉法, 张玉奎. 色谱, 1998, 16(6): 476
- [51] Luo Q Z, Zou H F, Zhang Q, Xiao X Z, Ni J Y. Biotech Bioeng, 2002, 80: 481
- [52] Luo Q Z, Zou H F, Zhang Q, Xiao X Z, Guo Z, Kong L, Mao X Q. J Chromatogr A, 2001, 926: 255
- [53] Luo Q Z, Mao X Q, Kong L, Huang X D, Zou H F. J Chromatogr B, 2002, 776: 139
- [54] Huang X D, Zou H F, Chen X M, Luo Q Z, Kong L. J Chromatogr A, 2003, 984: 273
- [55] Huang Xiaodong, Zou Hanfa, Mao Xiqin, Luo Quanzhou, Chen Xiaoming, Xiao Xiangzhu. Chinese Journal of Chromatography, 2002, 20(5): 436
黄晓冬, 邹汉法, 毛希琴, 罗权舟, 陈小明, 肖湘竹. 色谱, 2002, 20(5): 436
- [56] Huang Xiaodong, Kong Liang, Li Xin, Chen Xueguo, Guo Baochuan, Zou Hanfa. Chinese Journal of Chromatography, 2003, 21(3): 195
黄晓冬, 孔亮, 厉欣, 陈学国, 郭宝川, 邹汉法. 色谱, 2003, 21(3): 195
- [57] Mao X Q, Kong L, Li X, Guo B C, Zou H F. Anal Bioanal Chem, 2003, 375: 550
- [58] Mao X Q, Kong L, Luo Q Z, Li X, Zou H F. J Chromatogr B, 2002, 779: 331
- [59] Mao Xiqin, Zou Hanfa, Luo Quanzhou, Kong Liang, Li Xin, Sun Naichang. Chinese Journal of Chromatography, 2001, 19(5): 433
毛希琴, 邹汉法, 罗权舟, 孔亮, 厉欣, 孙乃昌. 色谱, 2001, 19(5): 433
- [60] Yuan Xianglin, Zhang Yukui, Zou Hanfa. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2001, 21: 7
袁湘林, 张玉奎, 邹汉法. 药物分析杂志, 2001, 21: 7
- [61] Jiang Honghai, Zou Hanfa, Wang Hailin, Ni Jianyi, Zhang Qiang. Chemical Journal of Chinese Universities, 2000, 21: 702
姜泓海, 邹汉法, 汪海林, 倪坚毅, 张强. 高等学校化学学报, 2000, 21: 702
- [62] Guo Zhong, Zhang Qingchun, Lei Zhengdeng, Kong Liang, Mao Xiqin, Zou Hanfa. Chemical Journal of Chinese Universities, 2002, 23: 1277
郭忠, 张清春, 雷政登, 孔亮, 毛希琴, 邹汉法. 高等学校化学学报, 2002, 23: 1277
- [63] Zhang Q C, Zou H F, Guo Z, Zhang Q, Chen X M, Ni J Y. Rapid Commun Mass Spectrom, 2001, 15: 217
- [64] Zou H F, Zhang Q C, Guo Z, Guo B C, Zhang Q, Chen X M. Angew Chem Int Edit, 2002, 41: 646
- [65] Guo Z, Zhang Q C, Zou H F, Guo B C, Ni J Y. Anal Chem, 2002, 74: 1637