

## 脂质体在液相色谱和毛细管电泳中的应用

屈 锋<sup>1</sup>, 邓玉林<sup>1</sup>, 张玉奎<sup>2</sup>

(1. 北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

**摘要** 脂质体具有与细胞膜相似的封闭双层结构, 是接近天然生物膜的理想模型。该文综述了脂质体的制备和性质表征方法, 固定脂质体色谱用于药物在脂质体膜上的吸收和蛋白质与脂质体膜的相互作用研究, 脂质体毛细管电泳在药物分离、蛋白质分离和蛋白质相互作用方面的应用研究。

**关键词** 脂质体; 固定脂质体色谱; 毛细管电泳; 综述

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2006)06-0545-06 栏目类别: 专论与综述

## Application of Liposomes in Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis

QU Feng<sup>1</sup>, DENG Yulin<sup>1</sup>, ZHANG Yukui<sup>2</sup>

(1. School of Life Science & Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract**: Liposome has similar lipid bilayer structure and fluid characteristics to real cell membrane, and plays an important role in mimetic biomembrane research. The preparation and characterization of liposome, studies on drug-liposome partitioning and protein-liposome interaction with immobilized liposome chromatography, application of liposome on drug separation, protein separation and protein interaction by capillary electrophoresis are reviewed.

**Key words**: liposomes; immobilized liposome chromatography (ILC); capillary electrophoresis (CE); review

磷脂是构成生物膜的3种主要成分之一。脂质体(liposomes), 又称磷脂囊泡(vesicle), 是由天然磷脂形成的微球, 具有与细胞膜相似的封闭双层结构。脂质体被视为最接近天然生物膜的简单理想模型, 并以毒性低、制备简单、可使药物包封入脂质双分子层而避免药物的降解和可实现靶向给药等特点而被广泛作为药物载体使用。脂质体还作为模拟人工生物膜和载体制备色谱固定相用于药物筛选和膜的通透性研究。此外, 利用脂质体对受体分子和标记分子的包覆和结合作用, 将其作为信号放大载体用于免疫分析和传感器的研究也有报道。本文综述了脂质体的构成、制备和性质表征方法, 固定脂质体色谱用于研究药物在脂质体膜上的吸收以及蛋白质与脂质体膜的相互作用, 脂质体毛细管电泳在药物分离、蛋白质分离和蛋白质相互作用方面的应用研究。

### 1 脂质体的制备及性质表征

#### 1.1 脂质体的分类及制备

脂质体是分散在水介质中的磷脂分子的两个疏

水性脂酰基烷基链自动聚集形成双层结构, 并闭合形成双层膜的微球型囊泡。脂质体结构与天然生物膜非常接近, 亲水性分子可进入囊泡内或结合在膜外。脂溶性分子和疏水性分子通过与脂质体膜作用可结合或锚定在脂双层表面<sup>[1]</sup>, 故脂质体可结合具有不同亲疏水性的大小分子。根据不同制备方法可得到不同大小和结构的脂质体囊泡。一般将脂质体分为小单层脂质体(SUV, 粒径为25~50 nm)、大单层脂质体(LUV, 粒径为100 nm~1 μm)、巨型单层脂质体(GUV, 粒径为1~200 μm)以及多层脂质体(MLVs, 粒径为0.1~15 μm)。此外, 还可形成多囊泡脂质体(MVVs, 粒径为1.6~10.5 μm)<sup>[1-2]</sup>(见图<sup>[11]</sup>)。通常希望获得粒径单一的SUV和LUV脂质体。由于不同粒径的脂质体在电场中的迁移速度不同, 因此根据脂质体在毛细管电泳中的峰宽可表征其粒径的均一程度<sup>[3-9]</sup>。

脂质体是通过水相取代溶有磷脂的有机溶剂, 再经超声、挤压、匀浆等机械方法处理而制得<sup>[10-19]</sup>。将磷脂溶解在有机溶剂(CHCl<sub>3</sub>)中, 旋转蒸发有机

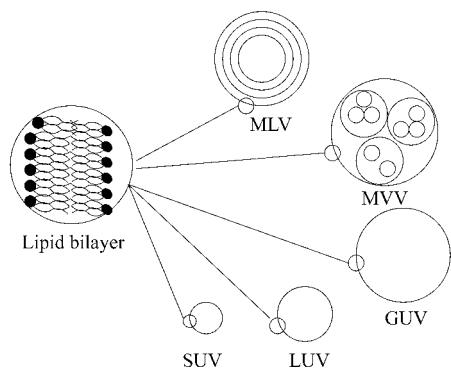


图 1 脂质体的结构及分类

Fig. 1 Liposome structure and types

溶剂后,在烧瓶壁得到干的脂膜层。加入水相介质,通过超声处理,得到非单层结构的脂质体。这些脂质体对水相介质具有很高的包覆效率,但其粒径大小、粒径分布和层结构受磷脂性质和在水相中分散效率的影响,具有不均一性和多样性。利用机械处理方法(如反复冻融、通过聚碳酸酯膜过滤、脱水/水化循环等)能获得 SUV 和 LUV 型脂质体。有机相和水相的比例也决定脂质体的结构。将溶于乙醇溶剂中的磷脂缓慢注入水相中,可形成粒径均匀的单层脂质体<sup>[16]</sup>。通过在有机相/水相中加入表面活性剂<sup>[17]</sup>、离液剂<sup>[18]</sup>,再通过凝胶或透析法除去表面活性剂等也可制备脂质体。最新的溶剂交换法是将含有磷脂的有机相直接转移到水相缓冲液中,制备时间仅在 1~2 min<sup>[19]</sup>,且包覆效率相当高。此外还有如形成囊泡,凝聚技术以及超临界流体、玻璃过滤和气体鼓泡法<sup>[13]</sup>等其他非传统的制备方法。

脂质体可由加在水中的脂类分子自动形成,但其热力学结构不稳定,故在制备脂质体时需要借助超声、挤压、匀浆等外加能量的方法。脂质体中的磷脂和参与的其他组分的性质决定脂质体的性质。卵磷脂(磷脂酰胆碱,PC)因其低成本和电中性而被使用的最多,其他的中性磷脂有鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺(PE)等。脂质体还可通过加入带电分子制备成带电脂质体,如加入带负电荷的两亲分子二乙酰磷酸、磷脂酰甘油、磷脂酸(PA)、磷脂酰丝氨酸(PS)、有机高分子、DNA 等制备成带负电荷的脂质体;也可加入带正电荷的十八烷胺、鞘氨醇等制备成带正电荷的脂质体<sup>[1]</sup>。此外,脂质体的机械性能也可通过选用不同的物质组成得以控制,如生物膜中天然组分胆固醇的加入在控制所制备的脂质体的膜流动性和通透性方面起着关键的作用。脂质体中的双层膜有凝胶和流体两种状态,通常为了得到一定硬度的脂质体,需在高于膜相变温度 5 °C 以上制备<sup>[1]</sup>。

## 1.2 脂质体的性质表征

脂质体的形态、结构和功能等性质可通过改变磷脂的组成、脂质体形成过程中或形成后的处理方法而改变。脂质体的性质包括形态性质(大小、形状、稳定性、粒径分布或多分散性、表面电荷等)、结构性质(脂膜通透性、流动性)、功能性质(包覆效率、稳定性、反应性和融合能力等)。脂质体形态研究需要使用扫描电子显微镜<sup>[20]</sup>、冷冻切片电子显微镜<sup>[21]</sup>等。动态和静态的光散射技术也可用于表征其粒径和多分散性。更多情况下,利用分离技术如尺寸排阻色谱、自由流电泳、毛细管区带电泳<sup>[3-9,22]</sup>等研究脂质体的形态。其双层膜结构的稳定性可利用小角 X-射线散射技术测定<sup>[23]</sup>,双层膜的通透性和流动性可用积分扫描量热计(DSC)直接通过双层膜相转移温度  $T_m$  来表征<sup>[24]</sup>,也可通过脂质体内水相包覆的荧光标记物的透出量进行研究<sup>[25]</sup>。包覆效率是脂质体功能的重要参数,是指脂质体包覆全部物质总量的百分比。目前报道的大多数方法要求除去介质中的非目标物质,但使用电子自旋共振(ESR)<sup>[26]</sup>和核磁共振光谱(NMR)<sup>[27]</sup>技术则不必完全除去非目标物,可直接测定包覆效率。

## 2 固定脂质体色谱

脂质体可通过静电作用、疏水性结合<sup>[28-33]</sup>、空间作用<sup>[28,34-37]</sup>、抗生物素蛋白-生物素亲和结合<sup>[38-42]</sup>或共价作用<sup>[43-49]</sup>连接在凝胶颗粒上成为固定脂质体色谱的固定相。Riekkola 等<sup>[50]</sup>对固定脂质体色谱的脂质体固定方法、固定效率、分离柱性能等给予了较详细的总结。固定脂质体色谱主要用于溶质与脂质体膜的相互作用研究。溶质由流动相扩散进入脂质体膜后得到保留,由此可计算出其在流动相和膜中的分配系数  $K_{LM}$ 。已知各种药物分子在脂质体膜上的保留便可推测药物分子在体内通过细胞膜的吸收和传递过程<sup>[38-40,42,51-54]</sup>。带有负电荷或含有胆固醇的 LUV 型脂质体是预测药物分子与细胞膜作用的有效模型<sup>[42]</sup>。由于静电作用,增加卵磷脂脂质体中的带负电荷的 PS 含量可使带正电荷的药物分子保留增强<sup>[51]</sup>。在模拟小肠结构的 PC-PS-胆固醇和 PC-PS-PE-胆固醇组成的脂质体色谱柱上,各种带正电荷、带负电荷和中性的药物分子的保留表现出与人体药物吸收状态的良好相关性。邹汉法等<sup>[55]</sup>利用固定脂质体色谱进行中药复方制剂的细胞膜通透性成分研究,建立了质量控制方法。他们将固定脂质体色谱用于中药活性成分的筛选<sup>[56-57]</sup>,以及以中药直接提取物为考察对象,建立了固定脂质体色谱与动物小肠吸收模型的相关性

研究的方法<sup>[58]</sup>。该研究表明,当归补血汤在固定脂质体色谱中保留成分的保留值与其通过大鼠在体小肠灌流和离体小肠实验测得的吸收值具有相关性,该方法能为中药的活性筛选和药效物质基础的研究提供重要的信息。将脂质体包覆在 $ZrO_2$ -MgO 基质上得到的新的脂质体固定相<sup>[59-60]</sup>适合碱性组分的分离,它与不适合碱性组分分离的硅胶基质脂质体固定相互为补充,可用于药物在模拟生物膜上的吸收和相互作用研究以及药物筛选。影响药物-脂质体膜分配的因素有脂质体粒径、层状结构以及色谱流动相(如酸度、离子强度和温度)等条件<sup>[42,51,54]</sup>。

将脂质体膜内外不同水性介质作为双水相体系<sup>[45]</sup>,固定脂质体色谱还可用于蛋白质分离和蛋白质与膜的相互作用研究。控制流动相酸度、温度、离子强度等条件将会改变蛋白质构型以及与膜的疏水作用。改变酸度导致蛋白质表面电荷性质和疏水性作用的变化,使其在脂质体上分配的保留因子不同。在 pH 4 条件下, $\beta$ -半乳糖苷酶、碳酸苷酶, $\alpha$ -葡糖苷酶等 3 种酶在固定了脂质体的凝胶柱上得到分离<sup>[48]</sup>。通常,蛋白质大分子不能穿过膜<sup>[61]</sup>,但在极端条件下,其构型发生改变后可以结合在膜上或穿过膜,同时导致膜结构发生扰动<sup>[62-63]</sup>。控制脂质体膜结构的稳定性可提供一个稳定的界面,用于生物分离和生物反应器<sup>[61,64-65]</sup>。部分变性的水溶性蛋白与脂质体作用还可通过脂质体色谱得到定量检测<sup>[66-67]</sup>。脂质体对于经不同浓度盐酸胍处理后导致构型改变的蛋白质具有高选择性结合能力,因此可用于蛋白质结构扰动的特异性识别。膜蛋白与膜的结合作用取决于蛋白质自身和膜的表面结构,膜的功能和膜与蛋白质的相互作用可通过脂质体色谱进行定量评价<sup>[66]</sup>。脂质体色谱还可用于研究蛋白质的卷曲和纯化<sup>[45,66]</sup>。固定脂质体色谱面临的问题是没有商品化的固定相,需要自行制备性能稳定、重复性好、可再生的脂质体色谱固定相。发展大孔凝胶以固载大粒径脂质体,更好地模拟天然膜结构,以及选择磷脂、胆固醇,甚至蛋白质等组分制备与细胞膜尽可能相似的人工膜,甚至使用真正的磷脂膜制成色谱固定相是发展的方向。固定化人工膜(IAM)色谱已经是研究药物跨膜传输的重要方法,但其固定相是硅胶表面通过丙氨基键合的单分子磷脂,且在色谱流动相中常使用有机溶剂,这种非生物环境使其应用受到限制<sup>[68]</sup>。

### 3 脂质体毛细管电泳

目前脂质体毛细管电泳研究主要在使用脂质体为载体或假固定相和脂质体涂布固定在毛细管内壁

用于分离和研究相互作用两个方面。此外,利用毛细管电泳还可进行脂质体的特性研究<sup>[5-9,68-72]</sup>,如脂质体粒径大小、质荷比、粒径分布、稳定性和脂质体药物吸收模型研究<sup>[73-74]</sup>等方面。

#### 3.1 脂质体电动毛细管色谱(liposome electrokinetic capillary chromatography, LEKC)

LEKC 的首篇报道是利用聚丙烯酰胺涂层毛细管,在无电渗流条件下使用 PC 磷脂脂质体溶液为假固定相,用于带负电荷药物分子(乙酰水杨酸、水杨酸、苜蓿香豆素、磺胺吡啶)的分析<sup>[75]</sup>。药物分子与脂质体的相互作用导致其迁移时间减小,据此可计算药物的保留因子,并求得药物分子与脂质体相互作用的自由能变化。

作为分离过程中的载体或假固定相,所用的脂质体通常带负电荷,其分离原理与毛细管胶束电动色谱、微乳电动色谱相似。分析物依据自身性质(电荷、结构、疏水性)在脂质体上分配系数的不同而得到分离。制备的脂质体也采用具有不同酯酰基链的混合磷脂,如 DMPC/DMPG,POPC/DPPC + PG/PA/PS,POPC/PS,DPPG/DPPC 等,其他组分如胆固醇、表面活性剂也是重要的脂质体制备的添加剂<sup>[50]</sup>。单层结构的脂质体可以获得高灵敏度和高分离效率,故常使用粒径均匀的 SUV 和 LUV 型脂质体。脂质体在中性条件下,在毛细管壁表面有很强的吸附,故在用于分离和研究分子/脂质体相互作用时需要使毛细管壁吸附脂质体达到饱和或使用脂质体涂层毛细管以减小吸附。

利用脂质体分离的对象一般是药物分子<sup>[68,76-78]</sup>、甾类<sup>[77,79-80]</sup>、各种取代的芳香类化合物<sup>[5,74,76-77,81]</sup>和酚类化合物<sup>[77]</sup>。而脂质体中磷脂的组成、脂质体的浓度、分离时的温度都直接影响分离。使用含少量阴离子磷脂的 POPC、DPPC,因增加了负电荷的量可改善分离。增加磷脂浓度也可改善分离,而加入胆固醇则明显改善分离的选择性<sup>[50]</sup>。Riekkola 等<sup>[79]</sup>还报道了两性磷脂与阴离子磷脂混合形成的脂质体对 6 种皮质甾类分子分离的影响。增加脂质体中的负电荷量和脂质体总浓度可以改善分离,而分离温度影响磷脂膜的流体性质,继而影响分子与膜的相互作用和分离效果。分子与流体态膜的作用强于与凝胶态膜的作用,故温度升高有利于分离<sup>[79]</sup>。

脂质体电动毛细管色谱也可用于蛋白质分离<sup>[75,82-83]</sup>和蛋白质与脂质体膜的相互作用研究,从而获得蛋白质与生物膜的相互作用研究模型。使用未涂层毛细管和 POPC 脂质体分离 3 种合成的血管紧张肽(I, II, III)和 4 种碱性标准蛋白质也有

报道<sup>[84]</sup>。脂质体浓度的增加使 3 种肽段的迁移时间延长,分离度提高,分离效率略降低。在 pH 7.4 条件下,4 种碱性蛋白(等电点为 9.5~11)带正电荷,与溶液中带负电荷的脂质体相互作用强于其在毛细管壁表面的吸附。POPC 在碱性介质中对毛细管壁有很强的结合,导致电渗流的改变并抑制碱性蛋白质的吸附,因此碱性蛋白质可通过与 POPC 假固定相的作用得到有效分离,其分离选择性的改变表明碱性蛋白质与脂质体之间产生相互作用<sup>[85]</sup>。

目前的研究结果表明,脂质体与胶束和微乳假固定相相比,在分离效率方面并未有显著的改善,但对于研究分子或药物与生物膜的作用、蛋白质-蛋白质的相互作用则是有效的方法<sup>[68,74,81,86-88]</sup>。利用亲和毛细管电泳,用粒径均匀的单层脂质体作为脂蛋白的模型,以生理条件溶液作为毛细管电泳介质,通过载脂蛋白迁移时间的改变,消除其他非特异性作用的影响因素,可精确和稳定地求得载脂蛋白(ApoC III)与脂蛋白相互作用的结合常数  $K_B$ 。该方法是评价高疏水性载脂蛋白与动态脂膜相互作用的物理化学性质的有效方法<sup>[86]</sup>。利用前沿分析毛细管电泳,使用不同结构的阴离子和两性磷脂合成的脂质体,可研究抗心律不齐碱性药物异博定和普萘洛尔与低密度脂蛋白的相互作用<sup>[87]</sup>,以及低密度脂蛋白氧化态与手性药物的相互作用。低密度脂蛋白与药物的结合与其氧化状态相关,氧化状态对药物结合的影响因碱性药物和中性药物表现出差异。低密度脂蛋白的氧化对其与碱性药物结合的影响大于对中性药物结合的影响<sup>[88]</sup>。此外,脂质体电动色谱也是测定分子在脂质体/水体系中分配系数的简单有效的方法,可用于中性分子和带电分子的研究<sup>[68,81]</sup>。

### 3.2 脂质体涂层毛细管电泳

脂质体涂层毛细管电泳也可用于蛋白质分离、分子或药物与脂质体的相互作用研究。要获得性能稳定的脂质体涂层毛细管,制备方法尤为重要<sup>[89-94]</sup>。动态涂敷毛细管的方法操作简单,容易实现。将毛细管中充入含脂质体溶液,脂质体吸附在管壁约 20 min 即可达到平衡<sup>[84]</sup>,此后电渗流不再降低。当使用背景电解质溶液冲洗涂层毛细管 15 min 后,电渗流仅恢复 94%,说明动态法获得的毛细管壁脂质体涂层不稳定<sup>[92]</sup>。将脂质体溶液注入毛细管,室温下用空气流干燥 5 min,使脂质体固定在熔融石英毛细管内壁,可制成开管毛细管柱。使用前用 0.1 mol/L NaOH 和水除去未吸附的脂质体,获得稳定的基线后用背景电解质溶液平衡。脂质体在毛细管表面吸附以及脂质体吸附层的稳定受脂质

体组成成分的影响,单独使用 POPC 和 PS 以及两者与胆固醇的混合物,将获得稳定性不同的脂质体涂层<sup>[92]</sup>。使用不同的缓冲液也影响涂层的稳定性。当脂质体溶液中含有  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  等金属离子时可以增加涂层的稳定性,而使用  $Ca^{2+}$  的效果最好<sup>[94]</sup>。控制不同的温度可获得不同相态的脂质体,凝胶态和流体态的脂质体导致涂层的稳定性有差异,使用凝胶态的脂质体可获得明显稳定的涂层<sup>[94]</sup>。

一种简单快速的脂质体涂层方法是将带有正电荷的季铵衍生的琼脂糖高分子涂敷在毛细管壁上,用带负电的脂质体溶液冲洗毛细管,通过静电作用将脂质体固定在毛细管壁上。电渗流方向的改变表明了毛细管表面正电荷壁和负电荷壁的形成,而脂质体内荧光染料的保持说明形成的脂质体涂层稳定。琼脂糖电荷密度的增加导致中性物质保留的增加,说明脂质体固定量与琼脂糖电荷密度有关,进而说明静电作用是脂质体固定的主要作用力<sup>[91]</sup>。而涂层的稳定性取决于琼脂糖层的稳定和脂质体层的有效电荷数。

利用抗生物素蛋白和生物素的特异性识别和自组装性质将抗生物素蛋白覆盖在毛细管内壁,再与生物素化的脂质体结合,形成脂质体涂层的毛细管,可用于药物或多肽等与膜的相互作用研究<sup>[93]</sup>。利用脂质体涂层毛细管,仅通过分析物、参照物和电渗流的表现迁移时间可以计算分析物与脂质体的相对自由结合能变化  $\Delta(\Delta G_0)^{[90]}$ 。

利用 MIC4(1-(4-碘丁基)-1,4-二甲基哌嗪-1-碘化铵)对毛细管内壁的吸附作用可抑制电渗流,同时还可使脂质体在毛细管内壁形成稳定的涂层,以便使溶菌酶结合在脂质体膜上,制备溶菌酶/脂质体涂层。所制备的溶菌酶/脂质体涂层具有手性识别功能,可以高效地分离 D,L 型色氨酸对映体<sup>[95]</sup>。

使用脂质体作为假固定相时所消耗的脂质体量较多,且不适合与质谱联用。而使用脂质体涂层毛细管,可以明显降低脂质体使用量,同时适用于毛细管电泳-质谱联用检测。目前有关脂质体涂层毛细管电泳的研究报道还很有限。

## 4 展望

脂质体作为模拟生物膜在生物化学、分子生物学、药学研究<sup>[96-97]</sup>等相关领域具有重要的意义。脂质体在分析化学领域的应用还不普遍,未来的研究应集中在解决生物分析和医学分析中存在的问题,在以下方面探寻应用和发展的空间:脂质体对亲脂性受体的亲和作用研究,模拟生物膜的功能研究,药

物-生物膜分配的深入研究,单一结构的脂质体的制备方法及其影响因素研究(脂质体的稳定性(酸度、温度、时间等)研究以及功能性(对酸度、温度、紫外光敏感)脂质体的设计和制备等。

化学品缩写和英文全称对照:

PC ̣phosphatidylcholine

PE ̣phosphatidylethanolamine

PG ̣phosphatidylglycerol

PA ̣phosphatidic acid

PS ̣phosphatidylserine

DNA ̣deoxyribonucleic acid

POPC ̣1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DLPC ̣1 2-dilauroyl-sn-phosphatidylcholine

DDPC ̣1 2-didecanoyl-sn-phosphatidylcholine

DMPC ̣1 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPPC ̣1 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DMPG ̣1 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol

DPPG ̣1 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol

参考文献:

[ 1 ] Gomez-Hens A , Fernandez-Romero J M. Trends Analyt Chem , 2005 , 24( 1 ) : 9

[ 2 ] Lasic D D. Biochem J , 1988 , 256 : 1

[ 3 ] Radko S P , Stastna M , Chrambach A. J Chromatogr B , 2001 , 761 : 69

[ 4 ] Radko S P , Chrambach A. J Chromatogr B , 1999 , 722 : 1

[ 5 ] Roberts M A , Locascio-Brown L , MacCrehan W A , Durst R A. Anal Chem , 1996 , 68 : 3 434

[ 6 ] Tsukagoshi K , Okumura Y , Akasaka H , Nakajima R , Hara T. Anal Sci , 1996 , 12 : 869

[ 7 ] Radko S P , Sokoloff A V , Garner M M , Chrambach A. Electrophoresis , 1995 , 16 : 981

[ 8 ] Kawakami K , Nishihara Y , Hirano K. J Colloid Interface Sci , 1998 , 206 : 177

[ 9 ] Ahmadzadeh H , Dua R , Presley A D , Arriaga E A. J Chromatogr A , 2005 , 1 064 : 107

[ 10 ] Rongen H A H , Bult A , van Bennekom W P. J Immunol Methods , 1997 , 204 : 105

[ 11 ] Nikolelis D P , Hianik T , Krull U J. Electroanalysis , 1999 , 11 : 7

[ 12 ] Locascio L E , Hong J S , Gaitan M. Electrophoresis , 2002 , 23 : 799

[ 13 ] Walde P , Ichikawa S. Biomol Eng , 2001 , 18 : 143

[ 14 ] Gabriels M , Plaizier-Vercammen J. J Pharm Biomed Anal , 2003 , 31 : 655

[ 15 ] Moscho A , Orwar O , Chiu D T , Modi B P , Zare R N. Proc

Natl Acad Sci USA , 1996 , 93 : 11 443

[ 16 ] Wagner A , Vorauer-Uhl K , Katinger H. Eur J Pharm Biopharm , 2002 , 54 : 213

[ 17 ] Paternostre M T , Roux M , Rigaud J L. Biochem , 1988 , 27 : 2 668

[ 18 ] Oku N , Macdonald R C. Biochim Biophys Acta , 1983 , 734 : 54

[ 19 ] Buboltz J T , Feigenson G W. Biochim Biophys Acta , 1999 , 1 417 : 232

[ 20 ] Stanish I , Lowy D A , Lee Y , Fang J , Wong E , Ray R I , Singh A. J Phys Chem B , 2004 , 108 : 127

[ 21 ] Machluf M , Regev O , Peled Y , Kost J , Cohen S. J Control Release , 1996 , 43 : 35

[ 22 ] Haskell R J. J Pharm Sci , 1998 , 87 : 125

[ 23 ] Muller M , Mackeben S , Muller-Goymann C C. Int J Pharm , 2004 , 274 : 139

[ 24 ] Hashizaki K , Taguchi H , Itoh C , Sakai H , Abe M , Saito Y , Ogawa N. Chem Pharm Bull , 2003 , 51( 7 ) : 815

[ 25 ] Gliozzi A , Relini A , Chong P L G. J Memb Sci , 2002 , 206 : 131

[ 26 ] Rossi S , Ristori S , Balzi M , Becciolini A , Martini G. Recent Research Developments in Physical Chemistry , 2002 , 6( Pt 2 ) : 457

[ 27 ] Zhang X M , Patel A B , de Graaf R A , Behar K L. Chem Phys Lipids , 2004 , 127 : 113

[ 28 ] Lundahl P , Yang Q. J Chromatogr , 1991 , 544 : 283

[ 29 ] Sandberg M , Lundahl P , Greijer E , Belew M. Biochim Biophys Acta , 1987 , 924 : 185

[ 30 ] Bartlett G R. J Biol Chem , 1959 , 234 : 466

[ 31 ] Khaleque M A , Oho T , Okumura Y , Mitani M. Chem Lett , 2000 , 29( 12 ) : 1 402

[ 32 ] Zhang Y , Zeng C M , Li Y M , Hjerten S , Lundahl P. J Chromatogr A , 1996 , 749 : 13

[ 33 ] Hu W , Haddad P R , Tanaka K , Mori M , Tekura K , Hasebe K , Ohno M , Kamo N , J Chromatogr A , 2003 , 997 : 237

[ 34 ] Wallsten M , Yang Q , Lundahl P. Biochim Biophys Acta , 1989 , 982 : 47

[ 35 ] Yang Q , Lundahl P. Anal Biochem , 1994 , 218 : 210

[ 36 ] Yang Q , Wallsten M , Lundahl P. J Chromatogr , 1990 , 506 : 379

[ 37 ] Yang Q , Lundahl P. J Chromatogr , 1990 , 512 : 377

[ 38 ] Yang Q , Liu X Y , Ajiki S , Hara M , Lundahl P , Miyake J. J Chromatogr B , 1998 , 707 : 131

[ 39 ] Liu X Y , Yang Q , Nakamura C , Miyake J. J Chromatogr B , 2001 , 750 : 51

[ 40 ] Liu X Y , Yang Q , Hara M , Nakamura C , Miyake J. Mater Sci Eng C , 2001 , 17 : 119

[ 41 ] Liu X Y , Nakamura C , Yang Q , Miyake J. Anal Biochem , 2001 , 293 : 251

[ 42 ] Liu X Y , Yang Q , Kamo N , Miyake J. J Chromatogr A , 2001 , 913 : 123

[ 43 ] Yang Q , Liu X Y , Yoshimoto M , Kuboi R , Miyake J. Anal Biochem , 1999 , 268 : 354

[ 44 ] Bayer E A , Wilchek M. Methods Enzymol , 1990 , 184 : 174

[ 45 ] Yoshimoto M , Schimanouchi T , Umakoshi H , Kuboi R. J Chromatogr B , 2000 , 743 : 93

[ 46 ] Yoshimoto M , Kuboi R , Yang Q , Miyake J. J Chromatogr B , 1998 , 712 : 59

[ 47 ] Yoshimoto M , Kuboi R. Biotechnol Prog , 1999 , 15 : 480

[ 48 ] Shimanouchi T , Morita S , Umakoshi H , Kuboi R. J

- Chromatogr B, 2000, 743 : 85
- [ 49 ] Khaleque M A, Okumura Y, Yabushita S, Mitani M. Chem Lett, 2003, 32 : 416
- [ 50 ] Wiedmer S K, Jussila M S, Riekkola M L. Trends Analyt Chem, 2004, 23( 8 ) : 562
- [ 51 ] Beigi F, Gottschalk I, Hagglund C L, Haneskog L, Brekkan E, Zhang Y, Osterberg T, Lundahl P. Int J Pharm, 1998, 164 : 129
- [ 52 ] Liu X Y, Nakamura C, Yang Q, Kamo N, Miyake J. J Chromatogr A, 2002, 961 : 113
- [ 53 ] Ding Gang, Dong Zibo, Li Zhili, Sheng Longsheng, Xiang Bingren, An Dengkui. Journal of China Pharmaceutical University ( 丁岗, 董自波, 李智立, 盛龙生, 相秉仁, 安登魁. 中国药科大学学报 ), 2002, 33( 4 ) : 354
- [ 54 ] Boija E, Lundquist A, Martinez-Pla J J, Engvall C, Lundahl P. J Chromatogr A, 2004, 1 030 : 273
- [ 55 ] Sheng Lianghong, Li Ruiyan, Li Ping, Zou Hanfa, Kong Liang. Chinese Journal of Analytical Chemistry ( 盛亮洪, 李睿岩, 李萍, 邹汉法, 孔亮. 分析化学 ), 2004, 32( 12 ) : 1 595
- [ 56 ] Mao Xiqin, Zou Hanfa, Feng Shun, Kong Liang, Huang Xiaodong, Li Xin, Luo Quanzhou. Chinese Journal of Analytical Chemistry ( 毛希琴, 邹汉法, 封顺, 孔亮, 黄晓冬, 厉欣, 罗权舟. 分析化学 ), 2003, 31( 8 ) : 992
- [ 57 ] Mao X Q, Kong L, Luo Q Z, Li X, Zou H F. J Chromatogr B, 2002, 779 : 331
- [ 58 ] Sheng Lianghong, Li Ping, Zou Hanfa. Chinese Journal of Analytical Chemistry ( 盛亮洪, 李萍, 邹汉法. 分析化学 ), 2005, 33( 1 ) : 13
- [ 59 ] Zhang W N, Hua Z X, Liu Y, Feng Y Q, Da S L. Talanta, 2005, 67 : 1 023
- [ 60 ] Hua Z X, Zhang W N, He H B, Feng Y Q, Da S L. J Chromatogr B, 2005, 827 : 173
- [ 61 ] Walde P, Marzetta B. Biotechnol Bioeng, 1998, 57 : 216
- [ 62 ] Umakoshi H, Yoshimoto M, Shimanouchi T, Kuboi R, Komasa I. Biotechnol Prog, 1998, 14 : 218
- [ 63 ] Umakoshi H, Shimanouchi T, Kuboi R. J Chromatogr B, 1998, 711 : 111
- [ 64 ] Yoshimoto M, Walde P, Umakoshi H, Kuboi R. Biotechnol Prog, 1999, 15 : 689
- [ 65 ] Blocher M, Walde P, Dunn I J. Biotechnol Bioeng, 1999, 62 : 36
- [ 66 ] Yoshimoto M, Kuboi R, Yang Q, Miyake J. J Chromatogr B, 1998, 712 : 59
- [ 67 ] Yoshimoto M, Kuboi R. Biotechnol Prog, 1999, 15 : 480
- [ 68 ] Esuder-Gilabert E, Martinz-Pla J J, Sagrado S, Villanueva-Camannas R M, Medina-Hernandez M J. J Chromatogr B, 2003, 797 : 21
- [ 69 ] Tsukagoshi K, Okumura Y, Nakajima R. J Chromatogr A, 1998, 813 : 402
- [ 70 ] Chen D, Cole D L, Srivatsa S. J Pharm Biomed Anal, 2000, 22 : 791
- [ 71 ] Radko S P, Stastna M, Chrmbach A. Anal Chem, 2000, 72 : 5 955
- [ 72 ] Duffy C F, Gafoor S, Richards D P, Admadzadeh H, O 'Kennedy R, Arriaga E A. Anal Chem, 2001, 73 : 1 855
- [ 73 ] Agbodjan A A, Bui H, Khaledi M G. Langmuir, 2001, 17 ( 10 ) : 2 893
- [ 74 ] Burns S T, Agbodjan A A, Khaledi M G. J Chromatogr A, 2002, 973 : 167
- [ 75 ] Zhang Y, Zhang R, Hjerten S, Lundahl R. Electrophoresis, 1995, 16 : 1 519
- [ 76 ] Nakamura H, Sugiyama I, Sano A. Anal Sci, 1996, 12 : 973
- [ 77 ] Wiedmer S K, Hautala J, Holopainen J M, Kinnunen P K G, Riekkola M L. Electrophoresis, 2001, 22 : 1 305
- [ 78 ] Manetto G, Bellini M S, Deyl Z. J Chromatogr A, 2003, 990 : 205
- [ 79 ] Wiedmer S K, Holopainen J M, Mustakangas P, Kinnunen P K J, Riekkola M L. Electrophoresis, 2000, 21 : 3 191
- [ 80 ] Wiedmer S K, Jussila M S, Holopainen J M, Alakoskela J M, Kinnunen P K J, Riekkola M L. J Sep Sci, 2002, 25 : 427
- [ 81 ] Burns S T, Khaledi M G. J Pharm Sci, 2002, 91 : 1 601
- [ 82 ] Masucci J A, Caldwell G W, Foley J P. J Chromatogr A, 1998, 810 : 95
- [ 83 ] Holland L A, Leigh A M. Electrophoresis, 2003, 24 : 2 935
- [ 84 ] Corradini D, Mancini G, Bello C. Chromatographia Suppl, 2004, 60 : S125
- [ 85 ] Corradini D, Mancini G, Bello C. J Chromatogr A, 2004, 1 051 : 103
- [ 86 ] Breyer E D, Howard S, Raje N, Allison S, Apkarian A, Brown W V, Strasters J K. Anal Chem, 2003, 75 : 5 160
- [ 87 ] Kuroda Y, Watanabe Y, Shibukawa A, Nakagawa T. J Pharm Biomed Anal, 2003, 30 : 1 869
- [ 88 ] Kuroda Y, Cao B, Shibukawa A, Nkagawa T. Electrophoresis, 2001, 22 : 3 401
- [ 89 ] Cunliffe J M, Barylina N E, Lucy C A. Anal Chem, 2002, 74 : 776
- [ 90 ] Manetto G, Bellini M S, Deyl Z. J Chromatogr A, 2003, 990 : 281
- [ 91 ] Ornskov E, Ullsten S, Soderberg L, Markides K E, Folestad S. Electrophoresis, 2002, 23 : 3 381
- [ 92 ] Hautala J T, Linden M V, Wiedmer S K, Ryhanen S J, Saihj M J, Kinnunen P K J, Riekkola M L. J Chromatogr A, 2003, 1 004 : 81
- [ 93 ] Yang Q, Liu X Y, Miyake J, Toyotama H. Supermolecular Science, 1998, 5 : 769
- [ 94 ] Linden M V, Wiedmer S K, Susanna Hakala R M, Riekkola M L. J Chromatogr A, 2004, 1 051 : 61
- [ 95 ] Bo T, Wiedmer S K, Riekkola M L. Electrophoresis, 2004, 25 : 1 784
- [ 96 ] Sun Jin, Zhang Tianhong, He Zhonggui. Chinese Journal of Chromatography ( 孙进, 张天虹, 何仲贵. 色谱 ), 2005, 23 ( 4 ) : 378
- [ 97 ] Pan Jinquan, Liu Yun. Life Science Research ( 潘进权, 刘耘. 生命科学研究 ), 2002, 6( 4 ) Suppl : 159