2007 年 11 月 November 2007
色 谱 Chinese Journal of Chromatography
Vol. 25 No. 6 814 ~ 819

反相离子对色谱法分析 3′, 5′反向寡核苷酸

骆雪芳[1], 陈 蓉[1], 付静静[1], 胡育筑[2]

(1. 中国药科大学分析化学教研室, 江苏 南京 210009;
2. 中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要: 3′,5′反向寡核苷酸是碱基组成和长度完全相同、碱基顺序相反的两个寡核苷酸序列。以三乙胺为离子对试剂,研究了缓冲液浓度(0.025 ~ 0.15 mol/L)、pH (5.0 ~ 6.8)、柱温(25 ~ 45 ℃)、流速(0.3 ~ 0.7 mL/min)以及不同初始洗脱强度和洗脱梯度条件下,6 个 3′,5′反向寡核苷酸模拟样品保留和分离的变化特点。三组反向序列在缓冲液浓度为 0.05 mol/L,pH 6.8 和流速 0.4 mL/min 条件下获得最大分离,温度对分离的影响不大,而初始洗脱强度对反向序列的影响远大于洗脱梯度。实验结果表明 3′,5′反向寡核苷酸的分离和保留趋势不完全一致,色谱条件的优化应有利于实现样品在柱上的弱保留。研究结果还显示寡核苷酸序列中 5′末端的保留强于 3′末端。

关键词: 反相离子对色谱法; 3′,5′反向寡核苷酸; 保留行为

中图分类号: O658 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-8713(2007)06-0814-06 **栏目类别**: 研究论文

Analysis of 3′,5′ Reversed-Sequence Oligonucleotide Isomers by Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography

LUO Xuefang[1], CHEN Rong[1], FU Jingjing[1], HU Yuzhu[2]

(*1. Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;*
2. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance of Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: 3′, 5′ Reversed-sequence oligonucleotides are isomers with the same length and base composition, except with reversed base sequence. In the current work, 6 oligonucleotide model samples were designed to study chromatographic behaviour of 3′,5′ reversed-sequence isomers by optimizing effects on retention and separation. The retention factor and resolution of isomers were investigated under triethylamine-acetic acid (TEAA) concentrations of 0.025 – 0.15 mol/L, pH values of 5.0 – 6.8, temperatures of 25 – 45 ℃ and flow rates of 0.3 – 0.7 mL/min by reversed-phase ion-pair chromatography (RP-IPC). The best resolution was observed under TEAA concentration of 0.05 mol/L, pH 6.8 and flow rate of 0.4 mL/min. While the effect of temperature on the separation was not apparent, effect of initial organic strength was stronger than that of the elution gradient. The retention and separation trends of the model samples were different, and weak retention of the samples on the solid phase contributes to good separation. It is concluded that 5′end of oligonucleotide sequence showed stronger interactions with the stationary phase than the 3′end did. This research might help to understand the retention mechanism of oligonucleotides by RP-IPC.

Key words: reversed-phase ion-pair chromatography (RP-IPC); 3′,5′ reversed-sequence oligonucleotides; retention behavior

寡核苷酸在生物医药领域已有诸多应用[1-4], 特别在反义药物的研究中寡核苷酸的分离分析显得尤其重要。至今已有包括聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)[5]、阴离子交换色谱(AEC)[6]、毛细管凝胶电泳(CGE)[7,8]、反相高效液相色谱(RP-HPLC)[9]等在内的多种方法用于寡聚核苷酸及其修饰物的分离分析。其中反相离子对色谱法(RP-IPC)以其特殊的分离机理不仅可实现不同长度寡

收稿日期: 2007-06-13
第一作者: 骆雪芳,女,博士研究生,讲师,E-mail: liuluo21998@126.com.
通讯联系人: 胡育筑,女,博士生导师,教授,Tel: (025)83271280,E-mail: njhuyuzu@126.com.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 20375046).

核苷酸的分离纯化[10,11],在一定条件下还可能识别同长异列的寡核苷酸或同长同列的修饰物[12]。

3′,5′反向寡核苷酸是碱基组成和长度完全相同、碱基顺序相反的两个序列。作为一类特殊的 SCDS (same composition different sequence) 寡核苷酸异构体,由于影响离子对色谱分离的两个重要因素净电荷和碱基疏水性差异为零,因此两个序列在 RP-IPC 中可能具有相同的色谱行为。有关寡核苷酸的 RP-IPC 分离优化的文献目前主要集中在不同长度样品的分离分析上[11,13]。由于样品的净电荷差异、碱基疏水性差异以及分子的空间结构差异等均会影响 RP-IPC 的分离过程,因此不同长度寡核苷酸样品的分析结果对同长异列样品的分析难以完全适用,尤其是 3′,5′反向寡核苷酸这类特殊的 SCDS 样品,各因素的影响与基于长度差异的寡核苷酸分离可能会有很大的不同,因此有必要深入研究这类特殊的寡核苷酸异构体的 RP-IPC 分离特性。本文设计了 6 个共 3 组 20 个碱基的核酸模拟样品,并系统考察了影响其保留和分离的诸因素(包括柱温、流动相流速、缓冲液 pH 值、离子对试剂的浓度以及梯度洗脱程序等)。通过优化过程对 3′,5′反向寡核苷酸的保留差异进行了探索性研究。

1　实验部分

1.1　仪器及试剂

岛津液相色谱仪(SCL-10 AVP System Controller/SPD-M10 AVP Diode Array Detector/LC-10 ADVP Pump/DGU-12A Degasser/CLASS-VP Work Station),ODS 色谱柱(YMC,Japan,AQ-C_{18},150 mm × 4.6 mm,3 μm),色谱条件见图注。

乙腈(ACN,色谱纯,Tedia Company,Inc),三乙胺(TEA,分析纯,北京益利精细化学品有限公司),冰醋酸(AA,分析纯,南京化学试剂有限公司),重蒸水(自制)。

1.2　实验用样品的设计、合成与纯化

目前反义寡核苷酸药物大多以 15 ~ 30 mers 的序列为研究对象;聚合酶链反应(PCR)技术中所用的寡核苷酸长度一般也为 15 ~ 30 mers;因此各种用途寡核苷酸样品的典型长度是 20 个碱基左右[14]。根据常用样品的序列长度和碱基组成比例,我们设计了表 1 中的 6 个 3′,5′反向寡核苷酸样品,由上海博亚生物技术有限公司合成,序列经 PAGE 纯化,纯度达 95% 以上。

1.3　混合样品的制备

分别取 O3-1 和 O5-1 各 1 OD_{260}(optical density,约相当于 33 μg),用 500 μL 注射用水溶解并充分涡旋混匀,分别吸取上述溶液各 50 μL,混匀即得。O3-2/O5-2 及 O3-3/O5-3 混合溶液的制备方法同上。

表 1　20 个碱基的反向寡核苷酸样品

Table 1　20-mer reversed-sequence oligonucleotide isomers used in this study

Identity	Sequence	Base composition/%
O3-1	3′-CACTCCATCTCCCGTTGTTT-5′	40% T;10% A;40% C;10% G
O5-1	5′-CACTCCATCTCCCGTTGTTT-3′	40% T;10% A;40% C;10% G
O3-2	3′-CACTCCATCTCTCGTTGTTT-5′	45% T;35% C;10% A;10% G
O5-2	5′-CACTCCATCTCTCGTTGTTT-3′	45% T;35% C;10% A;10% G
O3-3	3′-TACTCCATCTCCCGTTGTTT-5′	45% T;35% C;10% A;10% G
O5-3	5′-TACTCCATCTCCCGTTGTTT-3′	45% T;35% C;10% A;10% G

1.4　缓冲溶液的配制

100 mmol/L 的醋酸三乙胺缓冲溶液(pH 6.8)的配制方法如下:将约 2.21 mL 的冰醋酸溶解在约 400 mL 的重蒸水中,混匀后缓慢加入约 5.58 mL 的三乙胺,搅拌均匀后,用冰醋酸和三乙胺调节该溶液至 pH 6.8 即得。其他浓度和 pH 值的缓冲溶液均按上述方法配制,并做相应调整。

2　结果及讨论

2.1　流动相 pH 的影响

SCDS 寡核苷酸由于序列间无电荷和碱基疏水性差异,在 IPC 中的色谱保留差异较小,且主要来自空间结构中不同位置碱基的疏水性空间容量。为了突出这种差异对分离的贡献,本实验选用弱离子对试剂三乙胺(pK_a = 10.72)。在本文所采用的三乙胺-醋酸(pK_a = 4.75)体系(TEAA)中,不同 pH 条件对试剂和样品的解离与保留有不同的影响。参考两试剂和寡核苷酸的解离特性,本文考察了流动相 pH 为 5.5,5.8,6.0,6.5 和 6.8 条件下各组样品的保留和分离情况,结果见图 1。

图 1 显示 6 个序列的保留均随流动相 pH 的增加而逐渐减小,但三组反向寡核苷酸样品的分离度却随 pH 的增加而逐渐加大,在 pH 为 6.8 的条件下实现最大分离。由于实验用色谱柱固定相的 pH 最大耐受值为 7.0,为保证色谱柱的正常使用,本文只做了 O3-3/O5-3 在 pH 为 6.8 和 7.0 条件下的对比实验,两序列在上述两个条件下的保留和分离情况基本相同,因此其他因素的优化实验均在 pH 6.8 的条件下进行。

从保留因子和分离度的变化趋势看,在低 pH

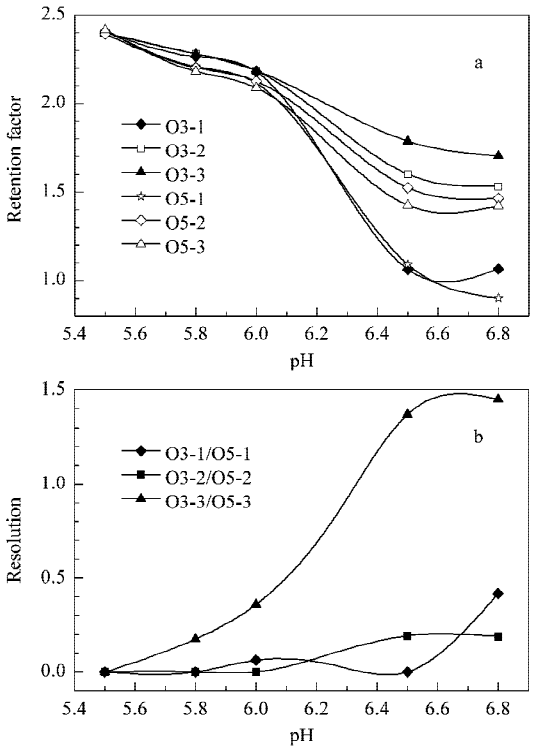

图 1 流动相 pH 对反向寡核苷酸(a)保留行为与(b)分离度的影响

Fig. 1 Effect of pH on (a) retention behaviour and (b) resolution of reversed-sequence oligonucleotides

Chromatographic conditions: flow rate 0.4 mL/min, 25 ℃, pH = 5.5 – 6.8. Mobile phase A: 0.05 mol/L triethylamine-acetic acid (TEAA) aqueous buffer solution. Mobile phase B: 100% ACN. The gradient started from 12% B. Gradient slope was 0.53% B/min.

条件下,TEA 的解离度大,在色谱柱上强保留,但离子对试剂的强保留导致各组样品在 pH 6.0 以下的流动相中不能分离。随着 pH 值的逐渐增加,TEA 的解离度下降,保留减弱,各组 3′,5′反向寡核苷酸有了不同程度的分离。这可能主要是由于 3′,5′反向序列的碱基净疏水性差异为零,分离的贡献主要来自空间结构,离子对试剂、寡核苷酸样品和反相固定相间较弱的相互作用有利于突显空间结构的不同而实现保留行为的差异。因此根据样品和试剂的特点,继续增加流动相的 pH 值可能会进一步改善分离,但已经趋缓的变化趋势说明继续增加 pH 对分离度的影响不会太大。

2.2 离子对试剂的浓度

离子对试剂的种类和浓度是实现 IPC 良好分离的关键因素。强离子对试剂季铵盐由于其对荷负电样品产生的强保留而在不同程度上消除了碱基疏水性差异对保留的贡献[14],不利于 SCDS 样品的分离;而本文采用的三乙胺体系,文献显示寡核苷酸类样品均在 0.1 mol/L 的条件下产生稳定保留[13],是目前寡核苷酸分析的主要条件。本文选择浓度为 0.025, 0.050, 0.080, 0.10, 0.12, 0.15 mol/L 的 TEAA 系统考察离子对试剂的浓度对 3′,5′反向寡核苷酸保留和分离的影响,样品的保留结果与文献[13]相似(见图 2-a),6 个序列从 0.1 mol/L开始产生稳定的保留特征。但三组反向序列的分离趋势却与保留结果不同,如图 2-b 所示,除了 O3-1/O5-1 完全未实现分离外,其余两组样品均在 0.050 mol/L 的条件下实现了完全分离,而 0.10 mol/L的分离度远小于最佳分离值。产生这种结果的原因可能正如前面讨论的保留与分离的关系,稳定(强)的保留不一定会带来良好分离。因此,浓度的影响实验结果也说明,实现样品的弱保留是反向寡核苷酸分离的关键。但在 RP-IPC 中较低浓度的离子对试剂需要长时间的系统平衡,给实验带来诸多不便,因此在选择实验条件时应针对具体样品的保留特点兼顾分离度与分析速度。

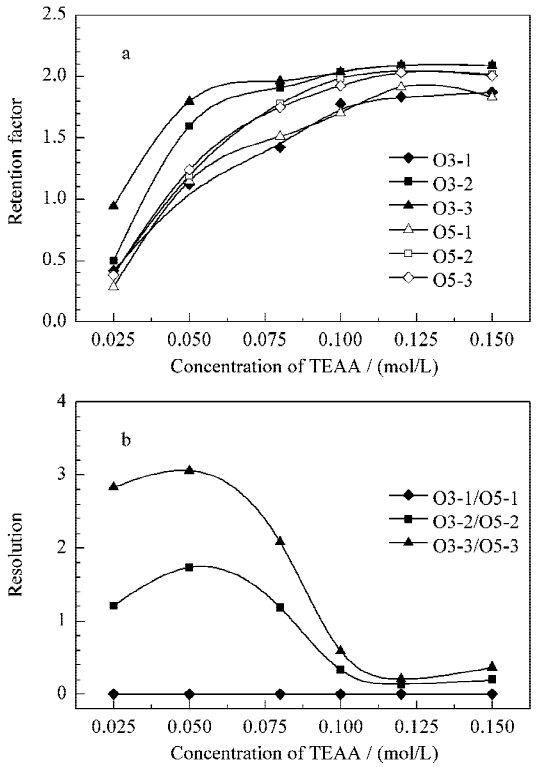

图 2 离子对试剂浓度对反向寡核苷酸(a)保留行为和(b)分离度的影响

Fig. 2 Effect of concentration of TEAA on (a) retention behaviour and (b) resolution of reversed-sequence oligonucleotides

Chromatographic conditions: flow rate 0.4 mL/min, 25 ℃, pH = 6.8. Mobile phase A: 0.025 – 0.150 mol/L TEAA aqueous buffer solution. Mobile phase B: 100% ACN. The gradient started at 12% B. Gradient slope was 0.53% B/min.

2.3 柱温的影响

在液相色谱分析中,很早就有人关注到生物大分子不同于小分子的保留特征。由于大分子纵向扩散系数小,根据 van Deemter 方程[15],影响塔板高

度的主要因素为传质阻抗,因此凡是影响传质速度的因素都将显著影响大分子的分离。在优化寡核苷酸分离条件时,主要从提高传质速度的角度出发,而温度则被认为是影响传质的重要因素[13],温度增加,传质速度加快。基于这样的结论,目前在寡核苷酸样品及类似物的研究中,绝大多数分析过程是在 50 ℃左右的柱温下进行的[11-13],甚至有专利产品专门用于高温下分析合成的寡核苷酸样品[16]。因此合适的分析温度是实现该类样品分离的重要条件。

为系统考察温度对反向寡核苷酸样品分析的影响,本文结合固定相的最高耐受温度(50 ℃)分别考察了温度为 25,30,35,40 和 45 ℃条件下的分离过程,影响趋势分别见图 3-a 和图 3-b。从 6 个序列的保留因子随温度的变化趋势图上看,除 35 ℃条件下各序列的保留略有下降外,其余温度下 6 个序列没有明显变化。正是由于在不同温度下各序列相对稳定的保留特点,三组反向序列样品的分离度才未随温度产生显著改变。除了 O3-1/O5-1 始终未能实现分离外,其余两组样品的分离度随温度的变化表现出振荡的形式。相对而言,低温下可获得较好的分离。这个结果说明温度对 3′,5′反向寡核苷酸分离的影响并非简单地来自传质速率,影响传质只是其中一个途径;另一方面,对于寡核苷酸这类柔性分子来说,温度的改变会在不同程度上影响其空间结构,而空间结构的变化会在不同程度上影响序列中每个碱基的空间容量,从而影响序列的保留,这种影响在同长异列的寡核苷酸分离中占主导地位。对于 SCDS 寡核苷酸样品,由于其碱基组成相同,随着温度的逐渐增加,不同位置碱基的空间容量趋于相同而产生逐渐接近的色谱保留,将会产生分离度随温度下降的结果。而本实验中并未出现同长异列寡核苷酸的分离度随温度升高而线性下降的现象。这可能是由于 3′,5′反向序列的净电荷和碱基疏水性差异完全相同,碱基在序列中的位置相对固定而产生了相对一致的空间结构变化。同时实验结果也说明文献[13]报道的关于寡核苷酸类样品高温有利于分离的结论有一定的局限性。对于长度相同的序列,仅仅考虑提高传质速率是不够的,由不同序列引起的空间结构差异在这类样品的分离中占有更加重要的地位。

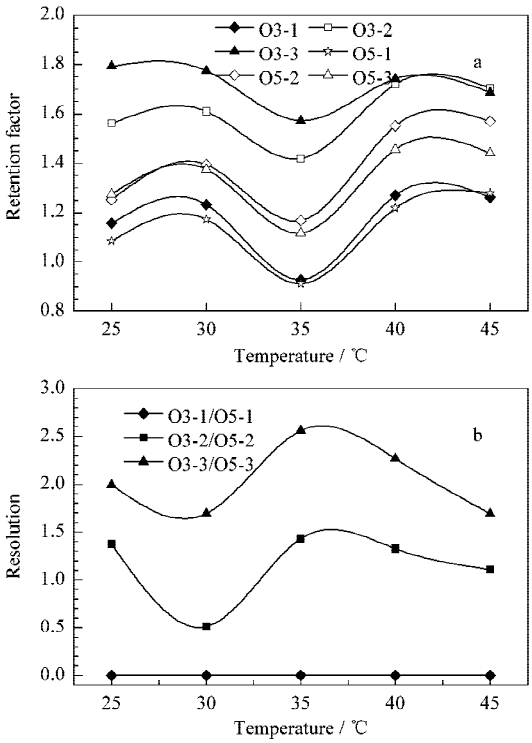

图 3　温度对反向寡核苷酸序列(a)保留行为和(b)分离度的影响

Fig. 3　Effect of column temperature on (a) retention behaviour and (b) resolution of reversed-sequence oligonucleotides

Chromatographic conditions: flow rate 0.4 mL/min, pH = 6.8, 25 – 45 ℃. Mobile phase A: 0.05 mol/L TEAA aqueous buffer solution. Mobile phase B: 100% ACN. The elute programs under different temperature are as following: 25 ℃, started at 12.2% B with gradient slop of 0.52% B/min; 30 ℃, started at 12% B with gradient slop of 0.53% B/min; 35 ℃, started at 11.8% B with gradient slop of 0.55% B/min; 40 ℃, started at 11.3% B with gradient slop of 0.58% B/min; 45 ℃, started at 11% B with gradient slop of 0.60% B/min.

2.4　流动相初始洗脱强度和洗脱梯度的影响

流动相的洗脱程序对寡核苷酸的分离非常重要。若要在具有有限柱效的色谱柱上区分相对分子质量在 1 万左右的样品之间的微小差异,洗脱程序和初始洗脱强度的优化是实现分离的关键。在液相色谱中大分子与小分子的保留和分离过程并不相同,大分子可能是先吸附于柱头,然后被一定强度的流动相快速洗脱[13]。Snyder 等[17]对生物大分子的分离特点进行了分析和论证。研究表明经典的色谱理论在应用于大分子液相色谱分离时需要对部分参数进行调整。该文通过对 van Deemter 方程中各因素对不同大小分子的影响,阐述了大分子不同于小分子的保留特点以及梯度洗脱对大分子分离的必要性。实验中我们选择 7 个洗脱程序分别对 3 组反向序列的分离和保留进行了考察,各洗脱程序见图 4 注,图 4 中 a 和 b 分别是 O3-2/O5-2 和 O3-3/O5-3 序列组在 7 个洗脱程序下的比较色谱图。

比较图 4-a 和图 4-b 的色谱曲线可以看出,12% B 的初始洗脱强度下两组序列都获得较好的分离,即使洗脱梯度成倍的增加或减小,对两组序列的分离也没有产生明显的影响(见图 4-a 和图 4-b 中色谱图 4,5,洗脱梯度分别由 0.53% B/min 减小至

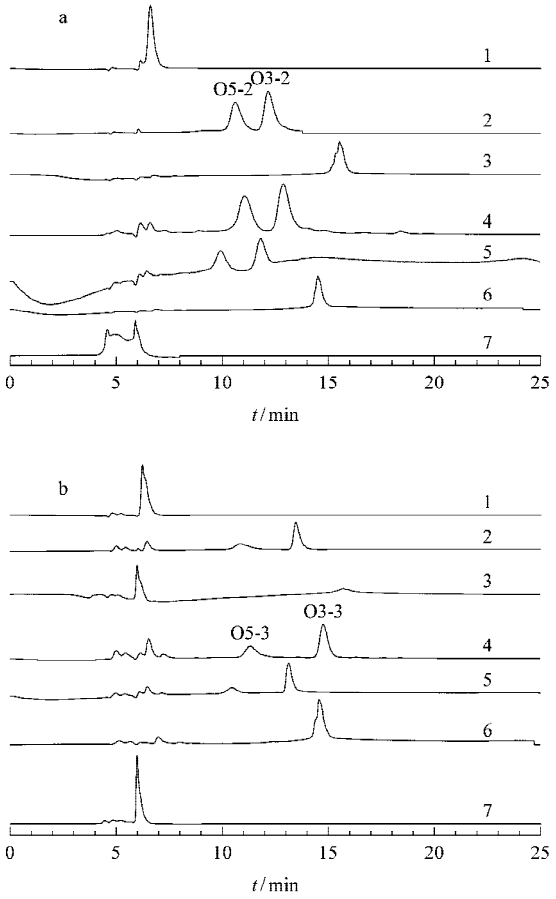

图 4 流动相初始有机溶剂强度和洗脱梯度对(a) O3-2/O5-2 和(b) O3-3/O5-3 保留与分离的影响

Fig. 4 Effect of initial organic strength and gradient program on retention of (a) O3-2/O5-2 and (b) O3-3/O5-3

1. initial strength 13% B, gradient slope 0.53% B/min; 2. initial strength 12% B, gradient slope 0.53% B/min; 3. initial strength 11% B, gradient slope 0.53% B/min; 4. initial strength 12% B, gradient slope 0.20% B/min; 5. initial strength 12% B, gradient slope 0.87% B/min; 6. initial strength 11% B, gradient slope 0.93% B/min; 7. initial strength 13% B, gradient slope 0.13% B/min.

Other conditions: flow rate 0.4 mL/min, 25 ℃. Mobile phase A: 0.05 mol/L TEAA aqueous buffer solution. Mobile phase B: 100% ACN.

0.20% B/min 或增加至 0.87% B/min);但初始洗脱强度的微小变化却会产生极大的分离差别,如图 4 所示,1% 初始乙腈的改变(色谱图 1 和 3 分别为 13% B 和 11% B 的初始比例)在相同的洗脱程序下使原来完全分离的两组样品分离度迅速下降,甚至完全无法分离,而且这种影响无法通过洗脱程序的改变加以改善(见图 4-a 和图 4-b 中的色谱图 6,7)。这种现象也在一定程度上反映了寡核苷酸的液相色谱保留特点。因此合适的初始溶剂强度是3′,5′反向寡聚核苷酸实现良好分离的关键,即使 1% 洗脱强度的改变也会对分离产生极大的影响;同时洗脱程序的优化也会对该类样品的分离有所影响,但与初始强度相比,这种影响相对较小,且不合适的初始强度无法通过洗脱程序的优化加以消除。

2.5 流速的影响

正如前面所提及的,生物大分子的色谱保留与小分子不同,传质阻抗被认为是影响寡核苷酸柱效的主要因素,这个观点对改善脱氧核糖核酸(DNA)等大分子的分离有重要的指导意义。根据这个结论,低流速可以提高传质速率从而有利于寡核苷酸类样品的分离。为考察 3′,5′反向寡聚核苷酸的保留和分离受流动相流速影响的特点,结合色谱柱的有关性能指标,本文在 0.3 ~ 0.7 mL/min的流速下分别进行了分离实验。由于寡核苷酸对有机溶剂的比例非常敏感,相同的洗脱程序在不同流速下到达色谱柱时流动相有机溶剂比例会有一定的差异,这个差异会使流速对保留和分离的影响变得复杂,无法分辨高流速下分离度的下降是由流速增加有机溶剂比例增大还是由高流速带来的强洗脱导致的,因此,考察流速的影响应先校正洗脱程序,使不同流速下洗脱强度的变化相近。本文利用丙酮的吸收特性对不同流速下流动相的柱前流路时间进行了测定,在测定的基础上对各流速下的洗脱梯度进行了校正。校正后流动相流速对 3′,5′反向寡聚核苷酸样品保留和分离的影响结果分别见图 5-a 和图 5-b。

图 5-a 的实验结果说明 6 个寡核苷酸序列随流速的增加在色谱柱上的保留有了不同程度下降;由于不同序列的保留行为随流速改变不同,各流速下三组样品的分离度也不同。在高流速下各序列的保留趋于相同,使反向序列在高流速下的分离度迅速下降为零。同时对比保留与分离的趋势图可以看出,O3-1,O5-1 两个序列的保留在 0.4 mL/min条件下有一定的差异,但该组样品在相同色谱条件下并未实现分离,而其他两组样品在各流速下的分离度也没有相同条件下保留行为的差异大,说明这类生物大分子的分离除受到其自身保留特点的影响外,还可能与其他相互作用(包括序列间的相互作用)因素有关。

从分离度随流速的变化趋势看,除 O3-1/O5-1 未实现分离外,其余两组样品均在 0.4 mL/min的条件下获得最大分离,且随着流速的增加分离度逐渐下降。因此合适的流速对反向序列的分离尤其重要,0.1 mL/min的流速变化可能会使良好分离的样品完全重合。原因除了流速增加导致样品传质速度降低外,也会使来自空间结构的保留贡献快速减小,尤其是 SCDS 寡核苷酸,其色谱差异仅来自空间结构,而高流速条件下,样品与离子对试剂以及固定相间的相互作用由于传质速率低而无法完全表征样品

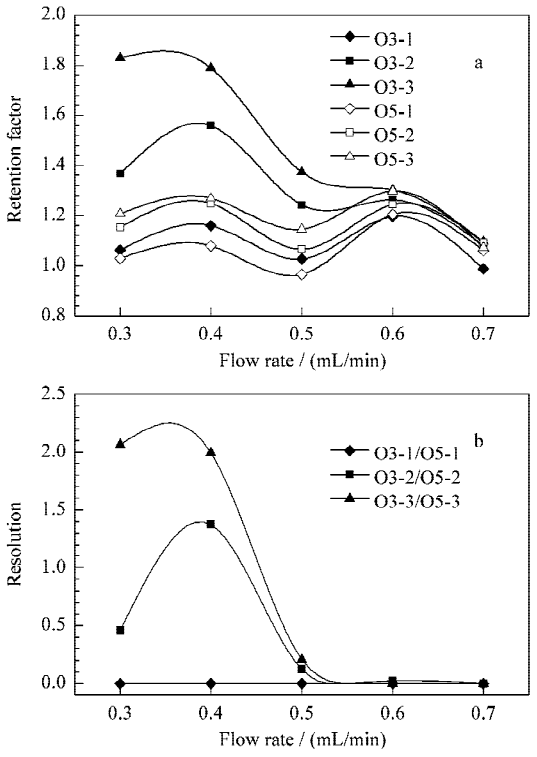

图 5　校正后流动相流速对反向寡核苷酸(a)保留行为和(b)分离度的影响

Fig. 5　Effect of flow rate after calibration on (a) retention and (b) resolution of reversed-sequence oligonucleotides

Chromatographic conditions: flow rate 0.3 – 0.7 mL/min, pH = 6.8, 25 ℃. Mobile phase A: 0.05 mol/L TEAA aqueous buffer solution. Mobile phase B: 100% ACN. The elution programs changed accordingly under different flow rates.

空间结构的差异,实现色谱分离。同时研究结果也显示过低的流速会对分离产生影响,当流速低于某一临界值后,分子扩散开始影响分离,导致分离度下降。因此,在进行流速优化时,应兼顾反向序列的扩散和传质,选择合适的流速以实现良好分离。

3　结论

研究结果表明温度对 3′,5′反向寡聚核苷酸分离的影响较小,相对而言低温有利于该类样品的分离;在 pH 为 6.8 的流动相条件下分离效果较好,离子对试剂与寡核苷酸样品间的弱相互作用有利于反向序列的分离;同时较低的流速是实现反向序列分离的重要条件;离子对试剂浓度对反向序列保留的影响虽然显示了与文献[13]一致的趋势,但从分离效果考虑,实验结果却提示色谱体系对反向寡聚核苷酸样品的弱保留可以突显空间结构的差异,因此该类样品稳定的柱上保留未必会产生良好的分离,分离条件的优化应有利于实现样品在柱上的弱保留。在本文的不同条件下,三组 3′,5′反向寡聚核苷酸实现了不同程度的分离,对比各组保留时间和序列的关系,可以看出每组样品中 O3-1、O3-2、O3-3 的保留均强于各自的反向序列,这个结果说明在寡核苷酸的 RP-IPC 分离过程中 3′和 5′末端对保留的贡献不同,其中 5′末端对保留的贡献大于 3′末端,这个结果有可能对核酸探针的标记和纯化提供一定参考,例如在序列的两个末端进行单双标记时,如果标记位点不影响探针的使用,可以选择与未标记序列有较大色谱差异的位点进行,以利于分离纯化。3′,5′反向寡聚核苷酸 RP-IPC 的保留机理和规律的阐释尚需进一步的空间结构和大量的相关实验研究。

参考文献:

[1] Erdmanns S, Senkel S, Arndt T, Lucas B, Lausen J, Klein-Hitpass L, Ryffel G U, Thomas H. Biol Chem, 2007, 388(1): 91

[2] Lovrinovic M, Fruk L, Schroder H, Niemeyer C M. Chem Commun (Camb), 2007(4): 353

[3] Boecker D, Zybin A, Horvatic V, Grunwald C, Niemax K. Anal Chem, 2007, 79(2): 702

[4] Park S, Dong B, Matsumura F. Biochemistry, 2007, 46(3): 899

[5] Tennila T, Ketomaki K, Penttinen P, Tengvall U, Azhayeva E, Auriola S, Lonnberg H, Azhayev A. Chem Biodivers, 2004, 1(4): 609

[6] Buncek M, Backovska V, Holasova A, Radilova H, Safarova M, Kunc F, Haluza R. Anal Biochem, 2006, 348(2): 300

[7] Chen R, Luo X F, Di X, Li Y, Sun YQ, Hu Y Z. J Chromatogr B, 2006, 843(2): 334

[8] Zhang W, Yang B H, Liang Q D, Lu D D, Lin R X, Wang S Q. Chinese Journal of Chromatography (张嵬, 杨秉呼, 梁乾德, 鲁丹丹, 林汝仙, 王升启. 色谱), 2005, 23(4): 374

[9] Zhang W J, Leighl N, Zawisza D, Moore M J, Chen E X. J Chromatogr B, 2005, 829(1/2): 45

[10] Fountain K J, Gilar M, Gebler J C. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17(7): 646

[11] Dai G W, Wei X H, Liu Z F, Liu S J, Marcucci G, Chan K K. J Chromatogr B, 2005, 825(2): 201

[12] Gelhaus S L, Lacourse W R. J Chromatogr B, 2005, 820: 157

[13] Gilar M, Fountain K J, Budman Y, Neue U D, Yardley K R, Rainville P D, Russell R J, Gebler J C. J Chromatogr A, 2002, 958(1/2): 167

[14] Lloyd L L, Millichip M I, Mapp K J. J Chromatogr A, 2003, 1 009: 223

[15] Sun Y Q, Hu Y Z, Wu Y T, Li Z W. Analytical Chemistry. 2nd Ed. Beijing: Science Press (孙毓庆, 胡育筑, 吴玉田, 李章万. 分析化学. 2 版. 北京: 科学出版社), 2006: 445

[16] Gjerde D T, Haefele R M, Togami D W. US Patent No. 5772889, 1998

[17] Snyder L R, Stadalius M A, Quarry M A. Anal Chem, 1983, 55(8): 1 412A