

亲和色谱技术在天然药物研究中的应用

陈芳有, 罗永明*, 吴样明, 蒋晨星, 张雪莲
(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] 亲和色谱是利用生物分子与亲和色谱固定相表面配位体之间特效性亲和吸附作用来进行选择性分离生物分子的分离方法, 具有高选择性、高活性回收率和高纯度等特点, 广泛的用于分离、检测或研究复杂样品中的目标分子, 已逐渐成为天然药物研究中的重要手段。本文概述了免疫亲和色谱、凝集素亲和色谱、细胞膜色谱法、固定化金属亲和色谱、分子烙印色谱、染料配基亲和色谱、核酸适配体亲和色谱、亲和膜色谱、前沿亲和色谱等几种常用亲和色谱技术的配基的种类和选择方法, 重点介绍了它们在天然药物研究中的应用进展, 并对其应用前景进行了展望。

[关键词] 亲和色谱; 天然药物研究; 生物分子

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0230-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110230

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1547.010.html>

[网络出版时间] 2014-03-24 15:47

Applications of Affinity Chromatography in Natural Medicine Research

CHEN Fang-you, LUO Yong-ming*, WU Yang-ming, JIANG Chen-xing, ZHANG Xue-lian
(Pharmacy School of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Affinity chromatography is a method using the specific affinity adsorption between biological molecules and surface-ligand of affinity chromatography stationary phase for selective separation of biomolecules. It has been widely used for separation, detection or study among the target molecules of complex samples with the advantages of high selective, high recovery efficiency and high purity. Affinity chromatography has become a very important method in natural medicine research gradually. The commonly used categories consist of immunoaffinity chromatography, lectin affinity chromatography, cell membrane chromatography, immobilized metal affinity chromatography, molecular imprinting, dye ligands affinity chromatography, aptamer affinity chromatography, affinity membrane chromatography and frontal affinity chromatography. The applications in natural medicine research of the main categories of affinity chromatography, the types and the preparations and choice methods of ligands are introduced in this review, and its application is prospected as well.

[Key words] affinity chromatography; natural medicine research; biomolecules

从天然药物中寻找活性成分是天然药物研究的一项重

要任务, 应用分析化学技术对天然药物成分进行分离和分析, 结合药理学的药效试验, 构成了天然药物研究的重要方法。亲和色谱 (affinity chromatography, AC) 是利用生物分子与亲和色谱固定相表面配位体之间存在的生物学和生物化学过程的特效性亲和吸附作用来进行选择性分离生物分子的分离方法^[1]。亲和色谱技术已在新型高效药物研究、分子生物学、蛋白质组学、临床医学等领域成为常规的分、分析和制备的有效工具^[2-3]。在亲和色谱分析中, 用化学键合方法可以制备多种依据不同作用机制的亲亲和固定相, 通过产生多种模式和多点相互作用的分离机制, 可提供充分利用亲和配位体对目标分子独特分子识别特性的、种类繁多的色谱

[收稿日期] 20131209(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21262019); 江西省研究生创新基金项目(YC2013-S234); 学校研究生创新基金项目(JZYC12B09)

[第一作者] 陈芳有, 硕士, 从事天然药物活性成分研究, E-mail: tedchenfy@163.com

[通讯作者] * 罗永明, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础的研究, Tel: 0791-87118850, E-mail: loym999@163.com

柱,因此在亲和色谱分析中,提高色谱分离的选择性,可通过变换不同分离机制的色谱柱而容易解决。该方法将天然药物效应成分的分离和活性筛选结合在一起,特别适合于中药及天然药物物质基础研究。本文对常用的几种亲和色谱技术及其在天然药物研究领域的应用进行了综述。

1 亲和色谱技术的分类

1.1 免疫亲和色谱

免疫亲和色谱 (immunoaffinity chromatography, IAC) 是一种高效、简便的样品前处理技术。IAC 是将抗体偶联到固相载体而制成免疫亲和色谱柱,根据待测物与抗体之间有选择性的和可逆的相互作用从而将分析物从复杂的样品基质中分离出来。IAC 是基于免疫反应的基本原理,利用色谱的差速迁移理论,实现样本的分离和分析的一种方法^[4,5]。首先,将特异性的抗体固定在担体上,制成免疫亲和担体,然后填入柱中;分析时,样品中的待测组分与吸附剂上的抗体发生抗原-抗体结合反应而被保留在柱上,其他成分则直接被洗脱;随后,再使用适当的洗脱溶剂将待测组分洗脱下来,进行下一步的分析。该方法可以大大简化提取、净化、衍生化等复杂的前处理过程。

1.2 凝集素亲和色谱

凝集素亲和色谱 (lectin affinity chromatography, LAC) 以偶联了凝集素的基质为固定相,它们能识别不同的糖基,广泛用于分离和鉴定糖蛋白、糖肽、糖脂、寡糖。凝集素 (lectin) 是从植物 (菜豆、大豆、扁豆、花生、蓖麻、小麦胚等) 中提取的糖蛋白被认为是阐明糖“密码”的蛋白质,这种与碳水化合物键合的蛋白质,其由 1~60 个官能基以线性或分支结构排布,它不会在免疫系统中产生,并缺少酶活性,常用的凝集素有伴刀豆凝集素 A (ConA)、麦胚凝集素 (WGA)、榴莲凝集素等^[6]。近几年来,凝集素亲和色谱发展很快,在生物化学和制药领域都表现出它特有的优势,在天然药物活性成分研究方面的应用也逐渐引起科研工作者的重视。

1.3 细胞膜色谱法

细胞膜色谱法 (cell membrane chromatography, CMC) 是由贺浪冲教授在 1996 年创建的一种新型的具有生物活性的亲和色谱系统。生物膜上存在多种活性蛋白,化合物能与多种受体或通道蛋白结合^[7]。细胞通过膜上的受体、离子通道等信息靶点与其他细胞、组织进行信息传递、交流、分析、综合,维持机体内外环境的平衡,实现生命活动。现代药理学研究表明,细胞膜上的受体、通道能选择性地识别药物中的化学成分并与其特异性结合,通过影响细胞内第二或第三信使分子导致一定的生物效应,最终产生药理作用。一种化合物的细胞膜通透性对于其活性起关键作用,因为绝大多数药物必须进入细胞才能表现它的活性而且还必须能透过目标细胞的细胞膜才能起作用。

CMC 作为生命科学与色谱分离技术交叉形成的一种极具发展潜力的新兴色谱技术,是将活性组织细胞膜固定在特定载体表面,制备成细胞膜固定相,以缓冲溶液为流动相,药物为溶质添加在流动相中,利用色谱学技术研究药物与固定相之间作用规律的受体动力学新方法。该方法将药物效应成分的分离和活性筛选结合在一起,克服了先从中药中分离

有效部位或单体,再研究其药效,从而使成分分离与效应脱节的弊端,因此特别适合于中药及天然药物物质基础研究。

1.4 固定化金属亲和色谱

固定化金属亲和色谱 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 是一种具有高度通用性的分离方法,特别是磷蛋白和键合钙蛋白的分离和纯化。IMAC 将具有螯合作用的有机官能团或有机螯合剂,键合在已偶联间隔臂的不同类型的亲和色谱载体上,再与 Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} 等金属离子结合,生成稳定的螯合物,利用螯合物中固定化的金属离子 (如 Cu^{2+}) 与溶液中生物分子 (如肽、蛋白质等) 的界面相互作用,即特效性亲和作用来实现生物分子的分离和纯化^[1]。常用的具有螯合作用的有机官能团 (如二巯基甲胺、氨基丁二酸、巯基甲基化天冬氨酸 (CM-ASP) 等) 和有机螯合剂 (如亚氨基二乙酸 (IDA 或 IDAA)、氨三乙酸 (NTA)、8-羟基喹啉等),都可以键合到不同类型的亲和色谱载体 (如多聚糖、苯乙烯-二乙烯基共聚物、硅胶等) 上,生成螯合固定相。IMAC 的选择性会随着螯合配位体的种类、固定化的金属离子的不同及亲和解析洗脱模式的差异而改变^[8,9]。

1.5 分子烙印色谱 (MIC)

分子烙印 (molecular imprinting) 是一种可以制备出对所选目标分子 (一般为模板分子) 具有高度亲和性及选择性聚合物材料的技术。分子烙印聚合物 (MIP) 材料内含有与模板分子空间结构互补官能团相互作用 (氢键、离子作用或范德华力等) 的孔穴,除了能高度特异亲和模板分子以外,对能与分子烙印聚合物孔穴形成匹配作用的模板分子结构类似物也具有很强的亲和性,但对结构上与模板分子不相关的其他化合物只是产生较弱的表面吸附。有机溶剂体系中分子烙印聚合物对目标化合物的良好识别能力,使其有可能成为一种新的亲和材料,快速有效地分离富集中草药中活性成分^[10]。目前,分子烙印聚合物作为亲和色谱固定相,即分子烙印色谱 (MIC) 主要被用于手性化合物分离和药物筛选与分离上。

1.6 染料配基亲和色谱

染料配基亲和色谱 (dye ligands affinity chromatography, DLAC) 的发展始于 20 世纪 70 年代初期。人们偶然发现很多蛋白质在蓝色葡聚糖色谱柱上的性能有明显的差异,推测这是因为染料与蛋白质发生了相互作用,这种相互作用类似生物大分子与其相应的生物配基之间的亲和作用。以后的工作表明,某些活性染料能与琼脂糖等载体共价结合,到的载体-染料联体能够分离纯化许多蛋白质。染料配位体易与多糖基体 (如琼脂糖、葡聚糖) 或硅胶基体构成亲和色谱固定相,对生物分子呈现高的键合容量,并可在中等洗脱条件下,使生物分子顺序解吸,从而获得较高的回收率^[1,11]。三嗪活性染料 (triazine reactive dye) 为主要使用的染料配位体,此类染料分子的结构与生物酶的天然底物相似,故可以与酶或蛋白质的活性作用点结合而用于亲和色谱。染料配基亲和色谱就是在此基础上发展起来的。

1.7 核酸适配体亲和色谱

核酸适配体亲和色谱 (aptamer affinity chromatography, AAC) 是将核酸适配体作为色谱固定相上的亲和配体的一种新型色谱技术。核酸适配体是一种

可以特异性地识别目标物的寡聚核苷酸,与免疫抗体相比,核酸适配体在筛选制备、稳定性及应用等方面都显示出独特的优点。核酸适配体通过分子内的相互作用(如氢键、碱基互补配对),可形成多种特定的空间结构,包括发夹(hairpin)、假节(pseudoknot)、凸环(stemloop)、G 四联体结构(G-quartet)。通过氢键、静电、范德华力、碱基堆积等作用,核酸适配体可与目标分子产生特异性的结合。与小分子目标物结合时,核酸适配体往往折叠形成一定的构象,构成“结合口袋”,将目标分子包裹^[1]。由于小分子与核酸适配体作用的位点有限,所以核酸适配体与小分子的亲和力相对较弱。目标物为蛋白质时,与蛋白质相比,核酸适配体的体积较小,核酸适配体可嵌入到蛋白质表面的特定区域,形成相互作用。核酸适配体与蛋白质的作用位点多,同时在空间上可以形成互补的结构,所以核酸适配体和蛋白质的作用力强^[12]。核酸适配体亲和色谱充分发挥了核酸适配体与亲和色谱技术的优势,已经被应用于小分子、蛋白质和细胞的分离和检测。

1.8 亲和膜色谱 亲和膜色谱(affinity membrane chromatography, AMC)把膜分离与亲和分离结合起来,使之兼具膜分离与亲和分离的特点。它利用膜作基质,对其进行改性,在膜的内外表面活化并偶合上配基,再按吸附、清洗、洗脱、再生的步骤对生物产品进行分离^[13]。亲和膜分离过程与传统的亲和色谱相同,即将制得的亲和膜基质制成膜组件如膜堆和中空纤维膜,让料液以一定的流速流过膜。料液中的生物分子在一定条件下,高度特异性地结合到共价偶联的配基上,然后采用洗脱液有选择地将被分离物质洗脱下来。亲和膜介质再生、平衡后可重复使用。亲和膜色谱与传统的膜分离、亲和色谱相比,不仅具有纯化倍数高、压降小,分析时间短、生物大分子在分离过程中变性概率小,允许较快的加料速度等特点,而且比柱亲和色谱更易实现规模化纯化分离。因此亲和膜色谱技术从出现到现在几十年间发展迅速,已应用于纯化分离多种酶、蛋白质、单克隆抗体等生物分子。

1.9 前沿亲和色谱 前沿亲和色谱(frontal affinity chromatography, FAC)是亲和色谱中的一种,由亲和色谱柱和适宜的检测器组成,是固定化靶酶技术的衍生方法。其基本原理是采用合适的固定方法将靶酶固定于载体柱内,待测化合物分子以恒定流速连续流过固定化柱使其饱和并达到平衡状态,分析前先用结合缓冲液平衡柱子,然后切换到含有配基的结合缓冲液^[14]。在柱中,已与靶酶结合的化合物不断地被亲和力更强的化合物置换下来,化合物与靶酶的亲和力越强保留时间越长,根据亲和力的不同,相应有不同的突破体积(breakthrough volume),与突破体积相对应的是突破时间,通过测定其配体浓度随时间的变化,得到呈 S 形的亲和色谱图,所有配基由弱到强依次流出,反应亲和力的 Kd 常数也同时测定。通常在运用前沿亲和色谱技术的同时将会联用其他的检测技术,如质谱(MS)技术,即前沿亲和色谱-质谱联用技术^[15]。

2 亲和色谱技术在天然药物研究中的应用

2.1 纯化和分离天然药物中的活性蛋白 朱利芬等^[16]通过硫酸铵分级沉淀和 ConA-Sepharose 4B 亲和色谱从膜荚黄芪根浸提液中分离纯化一种凝集素单亚基糖蛋白,具有对家兔红细胞的凝集性。车东升等^[17]以 D-半乳糖胺为配基、FF-sepharose 4B 为固定相,制备大豆凝集素亲和层析填料,分离和纯化大豆中的大豆凝集素蛋白,测定其纯度、免疫原性和凝集活性。汪波^[18]在对半夏活性成分研究中,利用 Mannose-Sepharose 4B 亲和色谱技术从硫酸铵沉淀的蛋白质成分中截留富集甘露糖特异性结合的反夏蛋白成分,此步回收的蛋白质样品纯度较高,仅含有少量的杂质。孔景临等^[19]根据槲寄生 II 型 RIPs(II 型核糖体失活蛋白)的糖结合特性和等电点的差异,采取了硫酸铵沉淀,半乳糖亲和色谱、离子交换色谱法,对该植物中的槲寄生蛋白进行了纯化。康洪钧^[20]采用硫酸铵沉淀、疏水色谱、Sepharose CL-6B 亲和色谱与分子筛层析从中国特有的珍稀植物蒜头果的种子分离到一种高毒性的植物毒蛋白——蒜头果毒蛋白,得率为 1.1%。PAN 等^[21]采用硫酸铵分级沉淀和酸化的 Sepharose-4B 亲和色谱分离得到桑寄生凝集素,通过 MTT 法对所得到的凝集素进行体外抗肿瘤活性研究,发现凝集素具有抗肿瘤效果,对肝癌 BEL-7402 细胞和胃癌 MGC-823 细胞的 IC₅₀ 分别为 24.2, 20.9 mg·L⁻¹。

2.2 筛选天然药物中的活性成分 天然药物的作用是由它的活性成分产生。对于成分复杂的研究对象,亲和色谱法由于固定相能够特异性、选择性的与活性成分结合,可以排除大量非活性杂质成分的干扰。在这个领域,亲和色谱技术已经证明是一种有效的筛选技术。

王海林等^[22-23]根据油茶籽多糖 I 所拥有的特异性磷酸基因,运用固化金属离子亲和色谱法获得合适的金属螯合剂,使得具有一定降血脂作用的油茶籽多糖 I 能特异性的被结合到琼脂糖凝胶上,从而获得纯度较高的油茶籽多糖 I。Wang 等^[24-25]分别使用 α_{1A} 受体细胞膜色谱法和 A431 细胞膜联合 HPLC-MS 对小檗科植物红毛七的活性成分进行筛选,发现木兰花碱和 caulophine 是作用于 α_{1A} 受体的有效成分,塔斯品碱和 caulophine 是作用于 EGFR(表皮生长因子受体)的活性成分。Hou 等^[26]使用 VSM/CMC(血管平滑肌细胞膜色谱法)联合 GC-MS 对中药杭白芷、羌活、北沙参、蛇床子提取物中的活性成分进行鉴别和分离。He 等^[27]通过细胞膜色谱法联合 HPLC-MS 对黄芩活性成分进行筛选,发现汉黄芩素是作用于 EGFR 的有效成分。曹岩等^[28]用自制的大鼠心肌细胞膜色谱柱确定了附子中 8 个可能的有效成分。李域等^[29]应用 β_2 -AR 亲和色谱分别对当归、黄芩和葶苈子进行筛选,发现了阿魏酸、木犀草素苷、黄芩苷、野黄芩苷、芥子碱硫酸盐等 9 个作用于 β_2 -AR 的活性成分。

2.3 对天然药物进行质量控制 亲和色谱法建立以有效部位定性和有效成分定量的分析方法,可全面有效控制中药质量。朱丽华等^[30]结合 RP-HPLC 与 CMC 对葛根有效部位进行指纹图谱定性分析,对葛根有效部位中的有效成分进行定

量测定。邱文倩等^[31]建立了红曲产品中桔青霉素的免疫亲和色谱净化(IAC)-高效液相色谱(HPLC)检测方法;岳苑等^[32]使用免疫亲和层析荧光光度法测定枸杞中的黄曲霉素的含量。

2.4 促进天然药物作用机制的研究

2.4.1 药物-血清蛋白作用研究

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是由585个氨基酸残基组成的一条单肽链,是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白。HSA上有多个药物结合位点,药物进入血浆后,首先与血清白蛋白结合,然后再被输送到身体的各个部位产生药效。药物进入体内后的许多重要的药动学参数(包括药物的代谢、排泄、分布、扩散等)都与药物和蛋白的结合率有关^[33]。由此可见,在中药的现代化过程中,研究中药有效成分与血清白蛋白间的相互作用,对于提高中药用药的科学性,了解中药药物分子在体内的转运和代谢等具有特别重要的意义。

蔡晓明等^[34]采用高效亲和色谱技术(HPAC)测定了葛根素和告依春两种中药成分与HSA的相对结合率分别为10.26%,10.20%。张君才等^[35]利用亲和色谱法模拟人体生理环境研究了丹皮酚与同定化人血清白蛋白(HSA)的相互作用,发现丹皮酚与HSA的结合位点为indole点。何媛等^[36]采用亲和色谱法研究了咖啡酸(CA)与人血清白蛋白(HSA)之间的结合作用。通过前沿色谱法测得了CA与HSA的结合常数及结合位点数,前沿色谱法说明CA与HSA存在一类作用位点。雷根虎等^[37]用亲和色谱研究了两种中药小分子阿魏酸(FA)、丹皮酚(PAE)在人体生理条件缓冲液(pH 7.4)条件下与人血清白蛋白(HSA)的相互作用,并分析研究了FA,PAE与HSA之间的竞争性相互作用,发现FA,PAE与HSA存在一类位点,且FA与PAE竞争HSA上的indole位点。

2.4.2 药物-受体相互作用研究

受体是药物作用的主要靶点,研究受体与药物间的相互作用对于理解在生命科学、医学、药学领域中涉及到的分子之间的相互作用以及相互识别过程具有重要意义。在亲和色谱技术中,细胞膜色谱法(CMC)作为一种新的受体药理学研究方法,通过将细胞膜受体同定于硅胶载体表面,用高效液相色谱研究药物与受体的特异结合,体现药物的体内过程。该法简便可靠,细胞膜色谱柱可以反复使用^[38]。使受体研究和药物筛选效率提高。如果实现自动化测定,可发展为药物高通量筛选的新方法。CMC被广泛地用于研究药物受体的相互作用和衡量药物和受体之间的亲和力。Zeng等^[39]人研究了9种 $\alpha 1$ 受体在大鼠HEK293 $\alpha 1$ D细胞株色谱柱的容量因子,结果表明,CMC在评价药物与受体,药物和受体亚型间的亲和力以及检测药物对 $\alpha 1$ D肾上腺素能受体的选择性方面是有效的。这些发现表明,亲和色谱方法可以用来模拟研究体内药物与受体的相互作用。

3 展望

中药和天然药物的效应、物质基础研究一直是研究的重点和难点,中药的物质基础和作用机制的澄清是中药走向国

际市场的前提,将色谱技术与生物医学结合起来,可望成为极有发展前景的新方法、新技术,将极大地推动中药研究的水平。亲和色谱技术发展至今已具备了比较完整的体系,以其高选择性和可逆性开创了生化分离的新纪元,并在这一领域独领风骚。该项技术不仅可以有效地消除无活性成分对分析结果的干扰,而且还可以大大缩小中药活性成分筛选的范围。但是,多数亲和色谱的固定相还没有实现量产,需要有一定条件的实验室自己制备。色谱柱寿命通常比较短等特点,也限制了其推广和应用。随着技术上的问题不断的得到解决及研究的不断深入,特别是与其他分离技术联用而成为特殊的分离技术的飞速发展,相信在不久的将来,在中药活性成分、药动学、药效学、药物毒性研究及合理开发新药等领域的应用必将有自己的广阔天地。

[参考文献]

- [1] 于世林. 亲和色谱方法及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2008:235.
- [2] Ohlson S, Hansson L, Larsson P, et al. High performance liquid affinity chromatography (HPLAC) and its application to the separation of enzymes and antigens [J]. FEBS Letters, 1978, 93:5.
- [3] David S H, Jeanethe A, Anguizola C B, et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 52(69):93.
- [4] 王炜,侯艳. 浅谈免疫亲和色谱技术的应用[J]. 黑龙江科技信息, 2012(7):113.
- [5] Hage D S. Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography [J]. J Chromatogr, 1998, 715(1):3.
- [6] Hage D S, Bian M, Burks R, et al. Handbook of affinity chromatography [M]. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005:107.
- [7] 王瑜,邓秀玲,袁秉祥,等. 一种提高细胞膜色谱精确性和灵敏性的方法[J]. 南京医科大学学报, 2009, 29(12):2362.
- [8] 刘望才,朱家文. 亲和色谱技术研究进展[J]. 上海化工, 2007, 32(4):27.
- [9] Takeda N, Matsuoka T, Gotoh M. Potentiality of IMAC as sample pretreatment tool in food analysis for veterinary drugs [J]. Chromatographia, 2010, 72(7/8):127.
- [10] 张兰,李存保. 分子烙印技术及其应用[J]. 内蒙古医学院学报, 2008, 51:692.
- [11] 陈天翔,聂华丽,朱利民. 染料配基在亲和色谱研究进展及其在分离纯化中的应用[C]. 西安:2007年生物产业技术研讨会暨工业生物技术及分离纯化技术研讨会. 2007.
- [12] Han B, Zhao C, Yin J. et al. High performance aptamer

- affinity chromatography for single-step selective extraction and screening of basic protein lysozyme [J]. *J Chromatogr B, Analy Technol Biomed Life Sci*, 2012, 903:112.
- [13] 甘宏宇, 商振华, 王俊德. 亲和膜色谱技术研究进展 [J]. *分析化学*, 1999, 27(1):111.
- [14] 凌春英, 钱俊青. 酶为标靶的前沿亲和色谱筛选天然药物的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2011, 18(6):544.
- [15] Calleri E, Fracchiolla G, Montanari R. Frontal affinity chromatography with MS detection of the ligand binding domain of PPAR γ receptor: Ligand affinity screening and stereoselective ligand-macromolecule interaction [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1232:84.
- [16] 朱利芬, 闫巧娟, 江正强, 等. 一种膜荚黄芪凝集素的分离纯化研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(5):714.
- [17] 车东升, 刘飞飞, 穆成龙, 等. 大豆凝集素的分离纯化及活性鉴定 [J]. *吉林大学学报: 理学版*, 2012, 50(5):1041.
- [18] 汪波. 半夏蛋白的纯化结晶、表达及 microRNA 研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2012.
- [19] 孔景临等. 生物质谱技术鉴定槲寄生 II 型核糖体失活蛋白 CM1 [C]. 镇江: 中国化学会第六届全国仪器分析及样品预处理学术研讨会, 2011.
- [20] 康洪钧. 一种新型植物双链核糖体失活蛋白——蒜头果毒蛋白的分离纯化、性质鉴定与化学修饰 [D]. 昆明: 云南大学, 2009.
- [21] 潘鑫, 刘山莉. 中药桑寄生凝集素的分离及体外抗肿瘤活性的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(2):210.
- [22] 王海林. 亲和层析法分离、纯化油茶籽多糖 I 及其单糖组分的测定 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [23] 王海林. 亲和层析法分离纯化油茶籽多糖 I 的研究 [J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(11):34.
- [24] Wang Lan, Ren Jing, Sun Meng, et al. A combined cell membrane chromatography and online HPLC/MS method for screening compounds from Radix Caulophylli acting on the human α_{1A} -adrenoceptor [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2010, 51:1032.
- [25] Sun Meng, Ren Jing, Du Hui, et al. A combined A431 cell membrane chromatography and online high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening compounds from total alkaloid of Radix Caulophylli acting on the human EGFR [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878:2712.
- [26] Hou Xiaofang, Zhou Mingzhe, Jiang Qiao, et al. A vascular smooth muscle/cell membrane chromatography-offline-gas chromatography/mass spectrometry method for recognition, separation and identification of active components from traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216:7081.
- [27] He Huai-zhen, Han Sheng-li, Zhang Tao, et al. Screening active compounds acting on the epidermal growth factor receptor from Radix scutellariae via cell membrane chromatography online coupled with HPLC/MS [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2012, 62:196.
- [28] 曹岩, 景晶, 吕狄亚, 等. 用细胞膜色谱法和 HPLC-TOF/MS 研究附子中的有效成分 [J]. *药学实践杂志*, 2011, 29(5):339.
- [29] 李域. β_2 -肾上腺素受体色谱模型在中药有效成分筛选中的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2009.
- [30] 朱丽华, 贺浪冲. 葛根中有效部位及有效成分的高效液相色谱分析 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2005, 26(3):216.
- [31] 邱文倩, 刘晓霞, 郑奎城, 等. 免疫亲和层析净化-高效液相色谱法检测红曲产品中桔青霉素方法研究 [J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 46(8):750.
- [32] 岳苑, 贾冰凝. 免疫亲和层析荧光光度法测定枸杞中黄曲霉毒素 [J]. *食品工程*, 2013, 32(1):45.
- [33] 张礼和, 王梅祥. 化学生物学进展 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005:498.
- [34] 蔡晓明. 高效亲和色谱法测定 2 种中药成分与人血清白蛋白的结合率 [J]. *色谱*, 2011, 29(4):358.
- [35] 张君才, 于雪, 卫引茂. 高效亲和色谱法对丹皮酚和人血清白蛋白相互作用的研究 [C]. 西安: 陕西药物分析学术研讨会, 2009.
- [36] 何媛, 王超展, 卫引茂. 亲和色谱法研究咖啡酸与人血清白蛋白的结合作用 [C]. 重庆: 全国生物医药色谱及相关技术学术交流会, 2012.
- [37] 雷根虎, 刘丽亭, 戴小军, 等. 中药小分子阿魏酸和丹皮酚与人血清白蛋白的竞争结合作用研究 [J]. *化学学报*, 2010, 26(1):55.
- [38] 张聪聪. 细胞膜色谱法在中药分析中的应用进展 [C]. 重庆: 首届两岸四地中药高峰论坛, 2011.
- [39] Zeng Aiguo, Yuan Bingxiang, Wang Changhe, et al. Frontal analysis of cell-membrane chromatography for determination of drug- α_1D adrenergic receptor affinity [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(20):1833.

[责任编辑 邹晓翠]