

基于微阵列聚焦电泳的糖尿病血样临床阳离子交换高效液相色谱图中血红蛋白 A₃ 峰位置推测

郭泽华¹, 罗芳², 李思², 樊柳荫^{3*}, 伍贻新⁴, 曹成喜^{1*}

(1. 上海交通大学电子信息与电气工程学院仪器科学与工程系, 上海 200240;

2. 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240;

3. 上海交通大学学生创新中心, 上海 200240; 4. 上海交通大学医学院附属瑞金医院内分泌科, 上海 200230)

摘要: 血红蛋白 A_{1c} (HbA_{1c}) 是糖尿病诊断的关键生物标志物, 目前其常用的分析方法为阳离子交换高效液相色谱法 (CX-HPLC, 5/50 mm 分离柱), 此方法虽然具有稳定、快捷与自动化等众多优点, 但临床 CX-HPLC (VARIANT II system) 谱图中仍存在未知峰, 尤其干扰 HbA_{1c} 准确测定的谷胱甘肽化血红蛋白 A₃ (HbA₃) 在色谱图中的相对位置仍不清楚。针对这一问题, 该文以人新鲜血液为样本, 首先利用低分辨 CX-HPLC 对血样进行分析, 提示未知峰 P3 存在。然后通过微阵列等电聚焦 (IEF) 电泳和高分辨阳离子交换 HPLC (Mono-S 5/50 mm 分离柱) 对血样的主要血红蛋白 (Hb) 成分进行分析, 提示未知峰 P3 为 HbA₃ 峰。随后, 通过血红蛋白谷胱甘肽化实验, 利用 HbA_{1c} 峰降低、HbA₃ 峰明显增强这一信息, 进一步推测未知峰 P3 即是 HbA₃ 峰, 其在 CX-HPLC 中的保留时间在 1.50 min 左右。最后, 结合前期研究讨论了体内应激情况下 Hb 谷胱甘肽化对 HbA_{1c} 检测的影响。该研究丰富了 CX-HPLC 的未知峰 P3 的色谱信息, 为更精准诊断糖尿病提供了有价值的参考。

关键词: 阳离子交换高效液相色谱; 等电聚焦; 血红蛋白 A₃; 血红蛋白 A_{1c}; 血样; 糖尿病

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2021)11-1273-06

Speculation of hemoglobin A₃ peak position in clinical cation exchange high performance liquid chromatogram of the diabetic blood sample with microarray isoelectric focusing

GUO Zehua¹, LUO Fang², LI Si², FAN Liuyin^{3*}, WU Yixin⁴, CAO Chengxi^{1*}

(1. Department of Instrument Science and Engineering, School of Electronic Information and Electrical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. State Key Laboratory of

Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 3. Student Innovation Center, Shanghai Jiao Tong University,

Shanghai 200240, China; 4. Endocrine Institute, Ruijin Hospital, School of

Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200230, China)

Abstract: Hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) is a major component of glycated hemoglobin in human red blood cells. It has been proven to be a significant biomarker for the diagnosis of diabetes; its content in fresh red cells in diabetes blood reflects the average level of blood glucose over the previous three months. Thus, HbA_{1c} level has been used for the assessment of long-term glycaemic control in diabetes; the level of 6.5% HbA_{1c} has been certified as a critical cut-off for the diabetes diagnosis. The current commonly used method for HbA_{1c} quantification is based on cation-exchange high performance liquid chromatography (CX-HPLC). The method has advantages

收稿日期: 2020-12-31

* 通讯联系人. E-mail: lyfan@sjtu.edu.cn (樊柳荫); E-mail: cxcao@sjtu.edu.cn (曹成喜).

基金项目: 国家自然科学基金 (31727801, 22074091); 国家科学仪器装备重大开发项目 (2011YQ030139).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31727801, 22074091); National Scientific Instruments Key Development Project (No. 2011YQ030139).

such as high stability, rapidity, and automation, but there are still some unidentified peaks of Hb species in CX-HPLC (VARIANT II system); in particular, the presence of HbA₃ (a glutathiolated Hb) affects the accurate determination of HbA_{1c}. HbA₃ is usually present in healthy adult blood samples at 2%–4%, but the concentration of HbA₃ increases due to the protection of erythrocytes from oxidation, resulting in decreased HbA_{1c}. However, the relative location of the HbA₃ peak in the CX-HPLC clinical chromatogram has not been established.

To address this issue, we extracted Hb species from fresh blood samples obtained from a hospital in an anaerobic environment to avoid possible redox reactions of Hb and glutathione. After the extraction, the Hb samples were analyzed using two methods: a low-resolution CX-HPLC (5/50 mm column) currently used for diabetes diagnosis and a high-resolution cationic exchange HPLC (Mono-S 5/50 mm column), to identify the peak corresponding to HbA₃. The CX-HPLC analysis of fresh blood samples indicated that the unknown peak P3 located between HbA_{1c} and HbA₀ peaks corresponded to the HbA₃ peak between HbA_{1c} and HbA₀ in the Mono-S-HPLC. Microarray isoelectric focusing (IEF) was used for the micro-preparation of HbA₃, HbA_{1c}, and HbA₀ in healthy blood samples; then, the micro-prepared species of HbA₃, HbA_{1c}, and HbA₀ were individually identified via Mono-S-HPLC. The results of the CX-HPLC, Mono-S-HPLC, and microarray IEF experiments indicated that the P3 peak might correspond to HbA₃. To confirm this, glutathiolated Hb samples were synthesized via acetylphenylhydrazine and analyzed using both the Mono-S- and CX-HPLC systems. The results showed that the content of both glutaminated hemoglobin of HbA₃ in Mono-S-HPLC and P3 in CX-HPLC increased, implying the peak of P3 with the retention time of 1.50 min in CX-HPLC was the peak corresponding to HbA₃ in Mono-S-HPLC and microarray IEF.

Based on the above experiments and our previous results, the influence of HbA₃ on both the analysis of HbA_{1c} in blood samples and the diabetes diagnosis needs to be considered and discussed. The study results are significant for the tentative assignment of peak P3 and for offering more information on diabetes diagnosis using CX-HPLC in the clinical setting.

Key words: cation exchange high performance liquid chromatography (CX-HPLC); isoelectric focusing (IEF); hemoglobin A₃ (HbA₃); hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}); blood sample; diabetes

血红蛋白 A_{1c} (HbA_{1c}) 是人类红细胞中糖化血红蛋白 (Hb) 的主要成分, 由葡萄糖分子或其他还原性糖分子与血红蛋白 A 的 β 链之间通过非酶促缩合反应形成^[1,2]。在糖尿病筛查研究中, 一些研究者利用电泳技术发现了 HbA_{1c}, 并证明 HbA_{1c} 是糖尿病诊断的重要标志物^[3-5]。在人红细胞的 120 天细胞生长周期中, HbA_{1c} 含量与人体内血糖浓度正相关, 可以用来反映最近 2~3 个月时间内的血糖控制。因此, HbA_{1c} 含量常被用于评估糖尿病的长

期血糖控制情况^[3-5]。

目前, 人血 HbA_{1c} 检测方法有 30 种以上^[6,7], 其中, 阳离子交换高效液相色谱 (CX-HPLC) 是主要方法, 能够较好地实现对临床血样 HbA_{1c} 的检测。HPLC 具有稳定、线性好和自动化等优点, 能够满足大量糖尿病临床诊断的需求^[8]。在临床血样 CX-HPLC 图谱中, 主要有 HbA_{1a}、HbA_{1b}、HbA_{1c} 和 HbA₀ 峰^[9,10], 但在大多数 CX-HPLC 图谱中, 在主峰 HbA₀ 的左侧始终存在未知峰 (见图 1)。Little 等^[9]

引用本文: 郭泽华, 罗芳, 李思, 樊柳荫, 伍贻新, 曹成喜. 基于微阵列聚焦电泳的糖尿病血样临床阳离子交换高效液相色谱图中血红蛋白 A₃ 峰位置推测. 色谱, 2021, 39(11): 1273-1278.

GUO Zehua, LUO Fang, LI Si, FAN Liuyin, WU Yixin, CAO Chengxi. Speculation of hemoglobin A₃ peak position in clinical cation exchange high performance liquid chromatogram of the diabetic blood sample with microarray isoelectric focusing. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(11): 1273-1278.

与 Rohlffing 等^[10]指出,未知峰 P3 的出现常会导致 CX-HPLC 检测可信度的丧失。但是,目前对 CX-HPLC 中未知峰 P3 的信息了解非常少。

研究^[11-13]提示未知峰可能是 HbA₃。HbA₃ 是一种谷胱甘肽化的 Hb 产物,性质较为稳定,在人红细胞中浓度较低^[14,15]。但在人体遭受强烈的氧化应激时(如吸烟和药物作用),血液中的 HbA_{1c} 会与谷胱甘肽结合,导致 HbA₃ 浓度显著上升,使 HbA_{1c} 检测结果低于真实值^[16-19],影响临床诊断结果。Jeppsson 等^[20]利用高分辨 Mono-S 色谱柱实现了 HbA₃ 与 HbA_{1c} 之间的高效分离。基于微阵列等电聚焦(IEF)电泳,我们^[21-24]从真实血样中分离纯化了 HbA₃,并利用质谱和酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)技术对 HbA₃ 进行了鉴定和含量测定,结合 Mono-S-HPLC 技术,证实了 HbA₃ 的生物合成造成 HbA_{1c} 检测结果的降低^[22]。虽然 HbA₃ 在 Mono-S-HPLC 和微阵列 IEF 中已得到鉴定,但至今仍不清楚 HbA₃ 在低分辨率 CX-HPLC 谱图中的相对位置。

针对以上问题,本文在前期工作^[21-26]的基础上结合微阵列 IEF 和高分辨的 Mono-S-HPLC 方法进

一步推测在临床低分辨率 CX-HPLC 中 HbA₃ 与 P3 峰的相关性,讨论了其对糖尿病诊断的影响,为临床研究和潜在应用提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

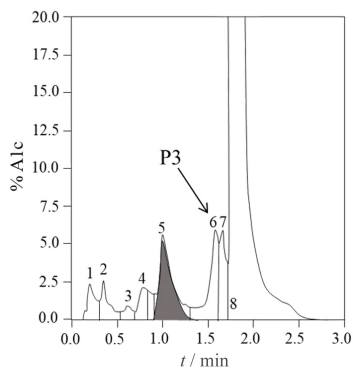
临床 Bio-Rad VARIANT II 全自动血红蛋白分析仪,即现广泛用于临床糖尿病 HbA_{1c} 值检测的 CX-HPLC 设备(Hercules,美国),该仪器使用阳离子交换柱与 Bis-Tris/磷酸盐缓冲液,为全自动封闭型检测设备。Mono-S-HPLC 色谱仪为配备了 Mono S 5/50 GL 阳离子交换色谱柱^[20](GE Healthcare Life Sciences,美国)的 HPLC 系统(Thermo Fisher Scientific,美国)。该仪器为手动开放型检测设备,用户可以对设备、方法和缓冲液进行调整,其中 5/50 指 5/50 mm,5 mm 指色谱柱前的预柱长度,50 mm 为该色谱柱长度。Mettler-Toledo Delta 320 pH 计(梅特勒-托利多集团,上海)。微阵列 IEF 设备(上海伯楷安生物科技有限公司,上海),用于红细胞中不同种类的 Hb 高分辨分离与微量制备纯化,该设备的详细信息详见本课题组其他工作^[22-26]。

丙二酸二钠(纯度>99%)购自 TCI(日本东京)。氯化锂(纯度 99%)购自阿法埃莎化学有限公司(天津)。丙烯酰胺(超纯级,纯度>99.9%)购自阿拉丁试剂有限公司(上海)。亚甲基双丙烯酰胺(超纯级,纯度>99.9%)和四甲基乙二胺(TEMED)(纯度>99%)购自 Sigma-Aldrich(美国)。IEF 微阵列分离柱(pH 6~8,长度 20 mm×厚度 10 μm×宽度 1.2 mm)和载体两性电解质(carrier ampholytes(CA),pH 6~8)购自上海伯楷安生物科技有限公司(上海)。其他化学药品均为分析纯,购自国药控股化学试剂有限公司(上海)。超纯水使用超纯水系统(亚荣,上海)制备。

1.2 样品准备

人体血液样本取自上海交通大学医学院附属瑞金医院参加体检的志愿者,其采集和检测结果的告知均符合医院的操作要求以及医疗道德规范标准。新鲜血样的 HbA_{1c} 结果由临床医院使用的 VARIANT II CX-HPLC 系统检测得到。

血样预处理^[20]:将全血样品采集到含有 EDTA 抗凝剂的试管中,4 ℃ 保存,预处理在采集后 24 h 内完成。将血样离心 15 min 以除去血浆。将红细



Peak No.	Name	Calibrated area/%	Area/%	Retention time/min	Peak area
1	HbA _{1a}	-	1.1	0.17	23968
2	HbA _{1b}	-	1.0	0.32	21789
3	HbF	-	0.5	0.58	9577
4	HbLA _{1c}	-	0.8	0.75	17380
5	HbA _{1c}	5.2	-	0.99	74621
6	P3	-	3.1	1.53	65079
7	P4	-	1.6	1.62	34910
8	HbA ₀	-	87.3	1.73	1850039

图 1 新鲜血样通过 VARIANT II CX-HPLC 系统得到的 HbA_{1c} 分析结果

Fig. 1 Analytical result of HbA_{1c} in fresh blood samples by VARIANT II CX-HPLC system

% A1c: calibrated area of hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}).

胞悬浮于 3 倍体积的 0.15 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4, 0.9% (质量分数) NaCl) 中洗涤 3 次, 然后加入 0.4 mL 四氯化碳并混合 15 min, 最后将混合物离心 (约 6 000 g) 10 min, 并提取含 Hb 的上清液。为了防止 Hb 在 Mono-S-HPLC 和微阵列 IEF 仪器中发生自氧化, 向混合溶液通入一氧化碳 1~2 min 使其饱和, 4 °C 保存。血样中 Hb 的谷胱甘肽化参照文献^[22,27]中的方法。取制备好的血样 1 mL、0.15 mol/L 磷酸盐-氯化钠缓冲液 1 mL、10 μmol/L 谷胱甘肽 1 mL 和纯水 3 mL 混合并调节 pH 至 7.0; 然后将混合后的样品 (0.5 mL) 转移到装有 0.2 mg 乙酰基苯胍的 Eppendorf 管中, 并在 37 °C 下孵育 1 h。通过与乙酰基苯胍一起孵育, 使谷胱甘肽与血红蛋白反应, 生成谷胱甘肽化 Hb, 即 HbA₃。将孵育的混合物离心 10 min 以去除血红蛋白颗粒沉淀, 然后用 CX-HPLC 和 Mono-S-HPLC 分析样本中 HbA₃ 的含量。

1.3 HPLC 分析

临床低分辨 CX-HPLC 系统: 放置样品至室温, 在高离子强度的 Bis-Tris/磷酸盐缓冲液环境下, 分离柱中的血红蛋白与柱基质由于离子相互作用而分离, 最后用光度计检测分离后的血红蛋白在 415 nm 波长处的吸光度。

高分辨 Mono-S-HPLC 系统^[20,22]: 分离柱为 Mono S 5/50 GL 阳离子交换色谱柱; 柱温为 25 °C; 流动相 A 为 10 mmol/L 的丙二酸钠和 0.2 g/L 叠氮化钠的混合溶液 (pH 5.7), 流动相 B 为 0.3 mol/L 的氯化锂溶液, 使用前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤; 流速为 2 mL/min。洗脱程序: 0~5.5 min, 0.2% B; 5.5~7.5 min, 40% B; 7.5~12 min, 50% B; 12~14 min, 100% B; 14~20 min, 0.2% B。检测波长为 415 nm, 进样量为 0.2 μL。

1.4 微阵列 IEF 及微量 Hb 的制备纯化

微阵列 IEF 分离血红蛋白: 详细 IEF 分析方法介绍见文献^[22,24]。所用聚焦电泳分离柱为 IEF 微分离柱 (pH 6~8, 长度 20 mm×厚度 10 μm×宽度 1.2 mm)。将处理好的溶血样本与 CA 混合, 最终样本中 CA 的质量分数为 0.4%, 血样稀释 900 倍。电场程序设置: 0~2 min, 40 V; 2~4 min, 80 V; 4~6 min, 120 V; 6~120 min, 600 V。进样量为 20 μL。

微量 Hb 制备纯化: 同一样本同时进行 12 根微阵列柱上样, 同步进行微阵列 IEF 聚焦电泳实

验^[22,24]。在微阵列 IEF 结束后, 取出 IEF 微阵列柱, 在解剖镜下利用解剖刀从 12 根微阵列柱中分别切下 HbA₃、HbA_{1c} 以及 HbA₀ 组分。合并同类 Hb 组分, 放置在离心管中用水溶液提取; 之后对提取的 Hb 开展 Mono-S-HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 CX-HPLC 未知峰

图 1 是临床 CX-HPLC 系统对新鲜血样 (24 h 内采集) 进行分析的结果。样品中 HbA_{1c} 的值为 5.2%。在色谱图中 HbA₀ 峰面积最大, 同时也检测了糖化 Hb 次要成分, 包括 HbA_{1a} 和 HbA_{1b}, 但所报告色谱图结果中未提及 HbA₃; 正常生理条件下血液中 HbA₃ 含量通常在 2%~4% 之间, 高于 HbA_{1a} 和 HbA_{1b} 的含量^[28-30], 显然不应将 HbA₃ 忽略。

2.2 基于 IEF 和 Mono-S-HPLC 的 HbA₃ 鉴定

一些 Hb 变体会影响阳离子交换 HPLC 法测量 HbA_{1c} 的结果^[31,32], 因此, 补充 HbA₃ 信息能增强色谱图的可信度。在对 Hb 样品进行人工谷胱甘肽化之前, 首先用微阵列 IEF 对含有 5.2% HbA_{1c} 的血液样品进行分析^[22-24]。如图 2 所示, 根据 Battelino 等^[32]的报道和本课题组前期研究结果^[22], 从阳极侧到阴极侧, 得到的主要 Hb 成分依次为 HbA₃、HbA_{1c} 和 HbA₀。为了进一步确认, 本研究用 Mono-S-HPLC 对新鲜血样进行再次分析^[20], 结果如图 3a 所示, 该图显示了 HbA₃ 存在时血样中各血红蛋白成分的分离情况。此外, 利用微阵列 IEF 技术^[21-24] 微分离后提取的各个 Hb 成分再用 Mono-S-HPLC 进行分析。结果如图 3b、3c 和 3d 所示, 每个峰保留时间均与混合样品分离得到的峰对应, 同时基于

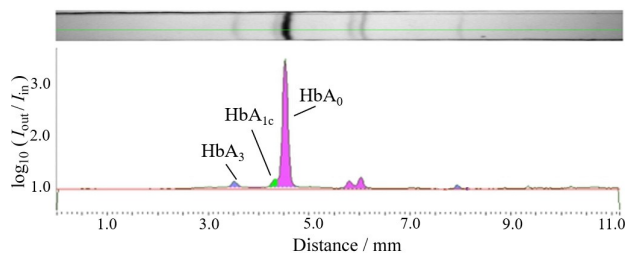


图 2 健康成人红细胞中血红蛋白成分的微阵列 IEF 电泳图谱
Fig. 2 Electropherogram of microarray isoelectric focusing (IEF) of hemoglobin species from human adult red blood cells

The upper panel shows the IEF image. The lower panel shows the position and relative contents of HbA₃, HbA_{1c}, and HbA₀.

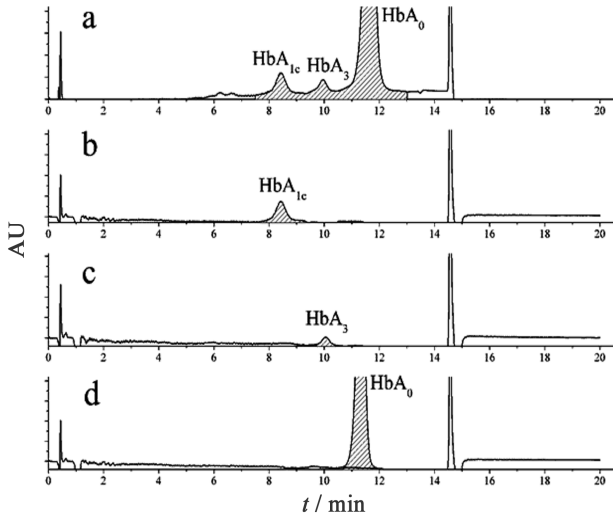


图 3 新鲜血样与微阵列 IEF 分离所得各血红蛋白成分的 Mono-S-HPLC 谱图
Fig. 3 Mono-S-HPLC chromatograms of a fresh blood sample and main Hb fractions extracted from microarray IEF

(a) normal blood sample; (b) HbA_{1c}, (c) HbA₃, and (d) HbA₀ fraction corresponding to HbA_{1c}, HbA₃, and HbA₀ in Fig. 2.

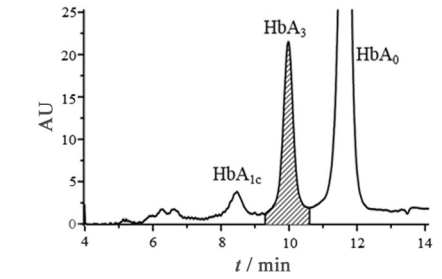


图 4 谷胱甘肽化样品的 Mono-S-HPLC 谱图
Fig. 4 Mono-S-HPLC chromatogram of glutathiolated sample

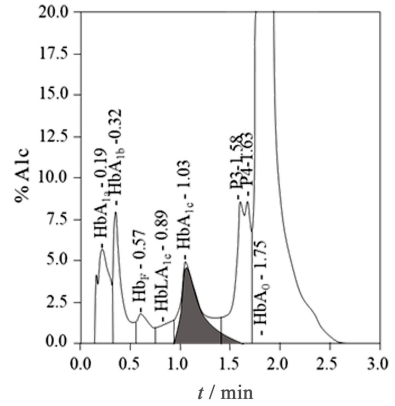


图 5 谷胱甘肽化样品通过 VARIANT II CX-HPLC 系统得到的 HbA_{1c} 分析结果
Fig. 5 Analytical results of HbA_{1c} in glutathiolated sample by VARIANT II CX-HPLC system

前期质谱鉴定和 ELISA 测定结果^[22], 图 3 验证了 HbA₃ 峰的存在。

2.3 交叉分析推测 P3-HbA₃ 峰

为进一步确认 CX-HPLC 中的 P3 峰与 Mono-S-HPLC 的 HbA₃ 峰的关系,在试管内模拟机体应激过程,加速血液样本中 HbA₀ 的谷胱甘肽化反应;之后,分别用 Mono-S-HPLC 和 CX-HPLC 对谷胱甘肽化的血样进行分析(见图 4 和图 5)。比较图 4 和图 3a 可以发现,谷胱甘肽化后 HbA_{1c} 峰明显降低,而 HbA₃ 峰明显增加;表明谷胱甘肽化降低了血液样品中 HbA_{1c} 的含量,而显著提高了血液样品中 HbA₃ 含量。图 5 显示了图 1 血样谷胱甘肽化后的 CX-HPLC 结果,与图 1 相比,图 5 中大部分峰保留时间基本与图 1 相对应,但图 5 中 P3 峰的峰面积相比图 1 明显增大,且迁移时间由 1.53 min(见图 1)延长至 1.58 min(见图 5),推测图 5 中的 P3 峰变化是由于谷胱甘肽化导致的含量增加而使峰的保留时间延后,因而推测 P3 峰即为 HbA₃ 峰。同时,P3/HbA₃ 相对峰面积明显提高,与 Mono-S-HPLC 系统得到的结果一致(见图 4),再次提示 CX-HPLC 中的 P3 峰为 Mono-S-HPLC 的 HbA₃ 峰。

在本课题组的前期研究中,基于微阵列 IEF、质谱技术和 ELISA 方法,我们证明了血样中 HbA₃ 会

造成 HbA_{1c} 检测结果显著偏低^[22],为了提高糖尿病检查中 HbA_{1c} 测定值的准确性,结果中有必要添加 HbA₃ 峰的信息,包括保留时间和相对峰面积等。但当前在对糖尿病的检测评估中,检验科医师没有考虑 P3 峰或 HbA₃ 峰对 HbA_{1c} 峰面积的影响;并且,临床医生依赖自身的经验,不可避免地存在主观因素的影响。本研究推测了 HbA₃ 峰在 CX-HPLC 中的相对位置,利用 IEF、Mono-S-HPLC 推测 CX-HPLC 中未知 P3 峰是 HbA₃ 峰。相关研究结果有望提高糖尿病血样的 HbA_{1c} 检测结果的可信度。

3 结论

在本文中,我们通过 Mono-S-HPLC、微阵列 IEF 和临床 CX-HPLC 系统的交叉分析推测了先前工作^[22]中提到的未知 P3 峰即为 HbA₃ 峰,并确定了其在各个检测系统中的相对位置。此外,本文基于前期工作^[22],并通过比较谷胱甘肽化和非谷胱甘肽化血样的交叉分析结果,讨论了 HbA₃ 对糖基化血红蛋白检测的明显干扰。

参考文献:

- [1] Bookchin R M, Gallop P M. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968, 32 (1): 86
- [2] Kaur J, Jiang C, Liu G. *Biosens Bioelectron*, 2019, 123: 85
- [3] Koenig R J, Peterson C M, Jones R L, et al. *N Engl J Med*, 1976, 295(8): 417
- [4] Lee J H, Kim S, Jun S H, et al. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34 (11): e23504
- [5] Stevenson A J, McCartney D L, Hillary R F, et al. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 1
- [6] John W G. *Clin Chem Lab Med*, 2003, 41(9): 1199
- [7] Inih O S, Esther Y E, Adetola F O, et al. *Curr Diabetes Rev*, 2018, 14(3): 298
- [8] Seferovic J P, Claggett B, Seidelmann S B, et al. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(5): 333
- [9] Little R R, Rohlfing C L, Tennill A L, et al. *Diabetes Technol Ther*, 2007, 9(1): 36
- [10] Rohlfing C L, Hanson S, Tennill A L, et al. *Diabetes Technol Ther*, 2012, 14(3): 271
- [11] Nakajima K, Higuchi R, Iwane T, et al. *BMC Res Notes*, 2020, 13: 1
- [12] Zeida A, Trujillo M, Ferrer-Sueta G, et al. *Chem Rev*, 2019, 119(19): 10829
- [13] Bartolini D, Torquato P, Piroddi M, et al. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, 1863(1): 130
- [14] Lankadeva Y R, May C N, Cochrane A D, et al. *Acta Physiol*, 2020, e13583
- [15] Chari R V, Miller M L, Widdison W C. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(15): 3796
- [16] Chen X X, Niu L Y, Shao N, et al. *Anal Chem*, 2019, 91 (7): 4301
- [17] Shukla K, Sonowal H, Saxena A, et al. *Biochem Pharmacol*, 2018, 152: 1
- [18] Kleinman W A, Komninou D, Leutzinger Y, et al. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65(5): 741
- [19] Choi S, Krishnan J, Ruckmani K. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 79
- [20] Jeppsson J, Jerntorp P, Sundkvist G, et al. *Clin Chem*, 1986, 32(10): 1867
- [21] Li S, Dong J Y, Guo C G, et al. *Talanta*, 2013, 116: 259
- [22] Li S, Guo C G, Chen L, et al. *Talanta*, 2013, 115: 323
- [23] Dong J, Li S, Wang H, et al. *Anal Chem*, 2013, 85(12): 5884
- [24] Li G Q, Li H G, Dong F F, et al. *Anal Chim Acta*, 2019, 1063: 178
- [25] Huo C H, Li Y H, Qiao Z, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(8): 863
霍春晖, 李英华, 乔智, 等. *色谱*, 2019, 37(8): 863
- [26] Sun K B, Shang Z, Sun Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2016, 34(12): 1234
孙凯博, 尚志, 孙妍, 等. *色谱*, 2016, 34(12): 1234
- [27] Adem S, Ciftci M. *Protein Expr Purif*, 2012, 81(1): 1
- [28] Lin Y S, Wu C W, Lin T S, et al. *Anal Chem*, 2019, 92(1): 724
- [29] Prakash A S, Kabli A M, Bulleid N, et al. *Anal Chem*, 2018, 90(24): 14173
- [30] Niu J C, Zhou T, Niu L L, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(6): 1689
- [31] Min E Y, Ahn T Y, Kang J-C. *Fish Aquatic Sci*, 2016, 19 (1): 1
- [32] Battelino T, Danne T, Bergenstal R M, et al. *Diabetes Care*, 2019, 42(8): 1593