

混合模式色谱分离材料的研究及其应用进展

董雪芳, 蔡晓明, 沈爱金, 魏 杰, 郭志谋*, 梁鑫淼*

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 近年来混合模式色谱以其独特的分离特性受到人们越来越多的关注。混合模式色谱的种类主要集中在反相/离子交换混合模式色谱(reversed-phase/ion-exchange mixed-mode chromatography, RPLC/IEX), 亲水作用/离子交换混合模式色谱(hydrophilic interaction/ion-exchange mixed-mode chromatography, HILIC/IEX), 反相/亲水作用混合模式色谱(reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography, RPLC/HILIC)等混合模式。两种或多种机理混合使用, 往往在分离选择性和色谱峰形等方面能得到不同于单一模式操作所得到的效果, 分离选择性以及色谱峰形等都能得到极大的改善与提高, 这使得混合模式色谱渐渐进入研究者的视野。混合模式色谱的研究多数集中在色谱填料的设计。混合模式色谱填料的应用主要针对生物样品的分离分析。该文综述了近年来混合模式色谱的研究及其应用进展, 并展望了混合模式色谱的发展。

关键词: 高效液相色谱; 混合模式色谱; 色谱填料; 亲水作用/离子交换混合模式色谱; 反相/亲水作用混合模式色谱; 反相/离子交换混合模式色谱

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)04-0297-06

Development and application of separation materials for mixed-mode chromatography

DONG Xuefang, CAI Xiaoming, SHEN Aijin, WEI Jie, GUO Zhimou*, LIANG Xinmiao*

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Mixed-mode chromatography has received more and more attention due to its unique chromatographic characteristics recently. In this review, a summary of the development and applications of mixed-mode chromatography is presented. According to the types of hydrophilic interaction/ion-exchange mixed-mode chromatography (HILIC/IEX), reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography (RPLC/HILIC) and reversed-phase/ion-exchange mixed-mode chromatography (RPLC/IEX), the preparation and applications of each type are introduced. Compared with single mode chromatography, the selectivity as well as the sample loading capacity of the mixed-mode chromatography can be improved. The researches mostly focus on the design of mixed-mode stationary phases and the applications especially to bio-analysis. The mixed-mode chromatography will be a potent approach for the analysis and separation of complex samples, and it will also be an effective and complementary tool in practical separation work.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); mixed-mode chromatography; chromatographic stationary phases; hydrophilic interaction/ion-exchange mixed-mode chromatography (HILIC/IEX); reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography (RPLC/HILIC); reversed-phase/ion-exchange mixed-mode chromatography (RPLC/IEX)

1 混合模式色谱概述

高效液相色谱作为一种分离技术与方法, 是开展生命科学、材料科学、环境科学研究必不可少的手段和工具, 为许多重要学科的发展做出了极大的贡

献。与经典的液相色谱法比较, 高效液相色谱法具有分离效能强、选择性好、灵敏度高、分析速度快等优点; 同时, 高效液相色谱法因使用了全多孔微粒固定相并将其填装在小内径、不锈钢短柱管内, 可在短时间内实现高柱效与高分离能力^[1-3]。分离材料是

* 通讯联系人. Tel: (0411) 84379519, E-mail: guozhimou@dicp.ac.cn(郭志谋); E-mail: liangxm@dicp.ac.cn(梁鑫淼)。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(21005077)。

收稿日期: 2012-12-03

色谱的核心,也是分离科学研究的重要课题。分离材料的发展对于高效液相色谱的发展以及解决当前复杂样品分离分析和纯化制备等问题具有重要的意义。

常用的色谱种类主要有反相色谱、正相色谱、疏水作用色谱、亲水作用色谱和离子交换色谱等。根据色谱模式的不同,分离材料分为反相色谱填料、正相色谱填料、亲水色谱填料、离子交换色谱填料等。目前反相色谱仍是色谱中应用最广泛的色谱模式^[1],同时反相色谱填料也是使用频率最高的一种填料。亲水作用色谱近年来受到越来越多的关注^[2],随着研究的不断深入,亲水作用色谱填料的种类也在不断的发展中^[7-14]。随着离子交换色谱填料的不断研究与发展,离子交换色谱在多肽、蛋白质样品等各类离子型样品的分离工作上发挥了很重要的作用^[15-19]。但这些单一的色谱模式在复杂样品分析等实际操作中都遇到新的问题:在反相色谱中,往往是根据样品与固定相之间的疏水作用力强弱进行样品分离选择性的调控,当样品疏水性相近时,若想再对样品进行分离就较为困难。亲水作用色谱通常用于极性化合物的分离,但是亲水色谱的使用常常因为需要使用较高比例的有机相而在很大程度上限制了大部分样品的溶解度,故亲水作用色谱在用于样品的大规模制备上受到了很大的限制。几乎每种色谱模式都在特定的条件下存在各自的局限性。如何能够克服这些局限性,更好地发挥这些色谱模式的优势,已经成为色谱研究者十分关注的问题^[20]。

混合模式色谱 (mixed-mode chromatography, MMC) 是在一根色谱柱上能够实现两种或多种分离机理共同主导的分离技术^[21-24],但混合模式色谱并不是一个全新的概念,多年前就已经被色谱技术研究者发现且在固相萃取材料与毛细管色谱中应用得十分广泛。混合模式色谱分离的基础是色谱固定相能同时提供多种作用力,如键合相若同时包含烷基链和电荷中心,则可以提供疏水作用力和静电作用力,实现反相/离子交换混合模式色谱 (reversed-phase/ion-exchange mixed-mode chromatography, RPLC/IEX) 分离。由于多种作用力的存在,混合模式色谱可以显著地提高分离选择性。直到近几年,研究者们才逐渐意识到这种固定相上存在多种功能基团的色谱模式可能会是对现有液相色谱模式的一种重要补充。在一次分离中同时有多种作用力的存在,是混合模式色谱的最主要特点,这样就可以实现根据样品的不同特性进行分离,进而提高分离选择

性。多种保留机理的存在将十分利于复杂样品的分离工作。此外,这种色谱模式的色谱柱不仅能够与其他类型色谱柱构成很好的正交性,它本身的两种或多种分离机理之间也具有正交性。将其应用到代谢组学、蛋白质组学、天然产物分离等相关分离工作中都可以获得很好的分离结果。

近年来,随着复杂样品分离需求的日益增长,混合模式色谱研究重新受到越来越多的重视,色谱研究专业期刊 *Journal of Separation Science* 出版了“混合模式色谱”专刊,Guiochon 等^[25]、Lindner 等^[26,27]、McCalley 等^[28]、耿信笃等^[22,23]、邹汉法等^[28,29] 国内外著名色谱研究学者对混合模式色谱表现出了极大的兴趣和关注,国外知名色谱技术企业菲罗门公司、沃特世公司、戴安公司等也显示出了兴趣,并推出了商品化混合模式色谱柱产品。但困扰混合模式色谱的问题(包括样品适用范围有限、方法开发困难以及混合模式色谱分离材料合成方式、分离材料稳定性等)依然存在。

2 混合模式色谱填料及应用

正如前面所述,混合模式色谱分离的基础是填料同时具有多种作用力。在较早期的高效液相色谱技术研究中,常将两根或多根色谱柱串联,可以看作是混合模式色谱的一种组合形式。随着色谱填料制备技术的发展,这种混合模式的填料制备可以用以下两种方式实现:一种方式是将多种色谱填料进行混合,然后填充到色谱柱中;另一种方式是发展具有多种功能基团的色谱固定相,这种方法是这几年研究比较多且效果较好的。前一种方法制备的填料往往因为功能基之间相距较远而导致分离效果不理想,重复性差;相比之下,后一种方法更理想一些。理论上,任何两种或两种以上的分离模式都可以组成一种混合模式色谱,其类型可多种多样,但近年来的研究主要集中在将两种正交性比较好的色谱模式进行组合,例如 RPLC/IEX^[27,30]、亲水/离子交换作用 (hydrophilic interaction/ion-exchange mixed-mode chromatography, HILIC/IEX)^[24,31,32] 以及反相/亲水作用 (reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography, RPLC/HILIC)^[33] 混合后组成的混合模式色谱。下面将针对混合模式色谱种类以及填料类型进行介绍,同时针对近年来相关研究工作做以报道与评述。

2.1 RPLC/IEX 混合模式色谱

RPLC/IEX 是在反相色谱填料表面上引入带有静电作用的极性基团,将静电作用与疏水作用结合,

将两种具有正交性的分离机理结合到一次分离中,使分离效果不同于以往的普通反相色谱分离效果。一些在常规的反相色谱上难以实现分离的化合物在此模式下会有与反相色谱不同的洗脱顺序和更好的分离选择性。而分离选择性是考察色谱性能最重要的指标之一,对于选择性要求较高的分析与制备工作的发展提供了一种互补分离方法。因此 RPLC/IEX 混合模式色谱柱在多种色谱柱筛选时显示出较大的优势。

事实上,这种混合模式色谱现象在硅胶基质的反相色谱固定相发展的早期就被认识到了。例如,反相色谱填料表面没有进行封尾操作,残余的硅羟基解离后具有阳离子交换活性,往往在分离某些碱性化合物时发生作用,导致峰形拖尾,柱效下降。近几年,随着硅胶制备技术的改良与发展,一些研究者致力于发展 RPLC/IEX 这类混合模式固定相,并实现了很好的应用。例如,Nogueira 等^[64]将十一酰-3-氨基奎宁、十一酰-3-氨基托烷接到疏基修饰的硅胶表面制备了一系列混合模式固定相,这些固定相能够提供疏水作用(烷基链)和阴离子交换作用(奎宁环)。

McCalley 等^[65]对于碱性化合物在商品化的 RPLC/IEX 色谱柱上的过载行为进行了详细的研究。文献报道的商品化色谱柱是将羧基包埋在疏水链中,通过比较发现这些混合模式色谱柱相比于传统的 C18 反相色谱柱,在分离碱性化合物时能够获得十分良好的峰形,这很可能是由于包埋的离子基团改变了残余的硅羟基在疏水链中的性质;同时这些混合模式色谱填料对于碱性化合物的载样量高于传统的 C18 反相柱。

梁鑫淼等^[66]通过使用极性共聚的方法制备出一种 C18WCX(反相/弱阳离子交换)混合模式色谱填料(见图1),该填料表面上键合了正十八烷基和 3-羧丙基两种基团,分别提供了疏水性和弱阳离子交换性质,其在多肽的二维分离中得到很好的应用。这种混合模式色谱填料在酸性条件下以疏水作用为主,在中性条件以及弱碱性条件下以疏水作用和阳离子交换为主。使用这种混合模式色谱柱构建二维色谱分离方法,对鼠脑样品进行检测,可以检测到 1 031 个蛋白质以及 4 397 个特征多肽。相对于以往只用一维的色谱方法,能够检测到的蛋白质与多肽数量都有极大的提高^[66]。

基于上述方法,梁鑫淼等^[67,68]又制备出 C18SAX(反相/强阴离子交换)和 C18SCX(反相/强阳离子交换)两种混合模式色谱填料(见图2)。C18SAX 填料表面相应键合了疏水链以及季铵基团,具有反相作用

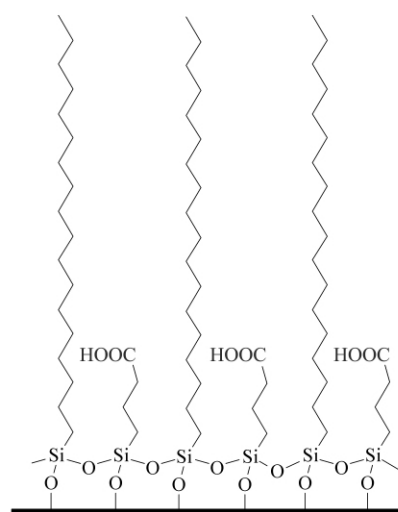


图1 C18WCX 混合模式色谱固定相

Fig. 1 C18WCX mixed-mode stationary phase

的同时也具备了强阴离子交换能力。与普通反相色谱柱不同,这种混合模式色谱填料能够在 100% 水相条件下操作且其柱效性能能够与商品化色谱柱 Sun-Fire™ C18 柱相当。使用这种色谱填料发展的 SPE 方法能够高效地富集到马兜铃酸各组分。对于中药这种相对复杂样品的前处理,能够提供一种十分有效、快速的方法^[67]。C18SCX 填料表面相应键合了疏水链以及磺酸基团,具有反相作用的同时也具备强阳离子交换能力;将这种填料用于磷酸化肽的富集,可以将单磷酸化肽和多磷酸化肽依照疏水作用与离子交换作用混合作用的不同进行先后的洗脱。这种填料相对于磷酸化肽富集工作中常用的二氧化钛材料,其选择性更高^[68]。

2.2 HILIC/IEX 混合模式色谱

Alpert^[69]于 1990 年提出“亲水作用色谱”的概念并对其保留机理进行了一定的阐述。随后 Hodges 等^[69,40]在分离多肽样品时发现,在亲水作用色谱模式下分离多肽,固定相与样品之间还存在离子交换作用,因此提出了 HILIC/IEX 混合模式色谱的概念。大多数生物分子具有一定的极性和很好的亲水性,适合使用 HILIC 进行分离。另外,多肽等具有很明显的电荷性质,在使用 HILIC 分离过程中电荷性质可以发挥重要作用。目前 HILIC/IEX 模式应用最多的领域还是多肽、蛋白质的分离。自此概念提出后,使用离子交换材料在该模式下分别对环肽^[41]、 α -螺旋多肽^[42]、合成多肽^[43]等多种样品进行了成功的分离。2008 年 Hodges 等^[24]在关于 HILIC/IEX 综述文章中论述了这种混合模式方法在多肽分离工作中的发展与应用。这种模式的主要特征

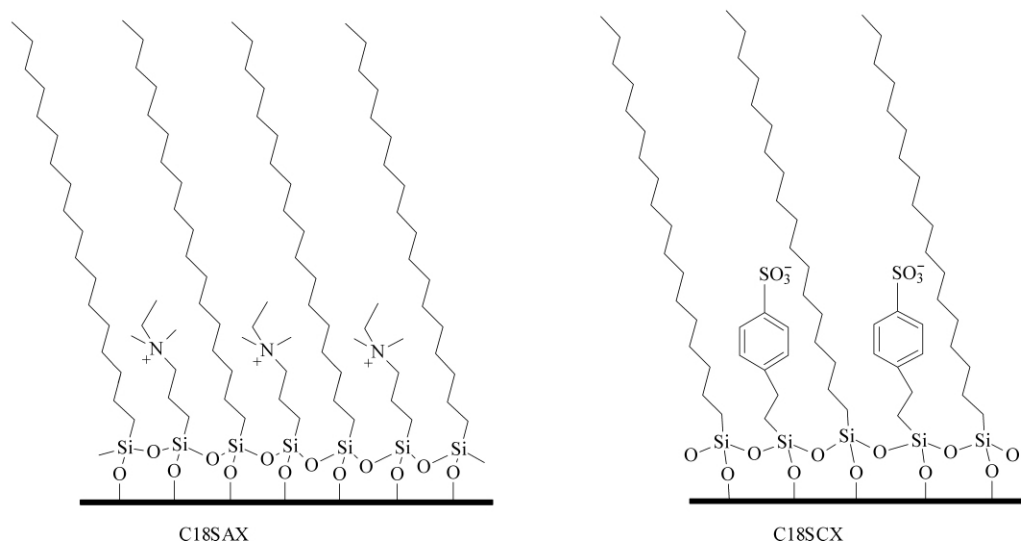


图 2 C18SAX 和 C18SCX 混合模式固定相

Fig. 2 C18SAX and C18SCX mixed-mode stationary phases

是使用带有电荷的极性固定相和含有高比例有机相的流动相,溶质通过与固定相发生亲水作用和电荷作用达到分离。这种混合模式对于反相色谱模式是一个极大的补充。样品可以先按照电荷作用强弱进行洗脱,若其中含有相同带电量的多肽则可以按照亲水作用的大小再次进行洗脱;相比单一的 HILIC 或 IEX,混合模式色谱的选择性更好。

很多离子交换材料虽带有一定的电荷,但因为基团本身是极性的,因此完全可以在亲水作用模式下使用,且这些离子交换材料往往可以表现出很强的亲水性。梁鑫淼研究组^[3]使用一种 HILIC/IEX 混合模式固定相(见图 3)色谱柱分离了亮寡糖。寡糖类大分子因带有大量的羟基而亲水性极强,亲水色谱可以对寡糖进行十分有效的分离,因此亲水色谱在糖类分析中得到了较广泛的应用;亮寡糖是一种碱性糖,带有一定的正电荷,可以采用阳离子交换模式进行分析。因此基于以上两种机理,采用这种商品化的弱阳离子交换材料成功实现了亮寡糖的分离。HILIC/IEX 混合模式色谱方法相对于亲水模式可以显著降低乙腈的使用量,又可以获得亲水模式的高分离度;相对于离子交换模式,HILIC/IEX 混合模式可以很好地改善色谱峰的峰形,同时较温和的流动相条件(乙酸铵/乙腈/水)的使用,使其可以直接与质谱串联实现结构鉴定,又为亮寡糖的工业级制备提供了一种可靠、简便的选择。

某些两性离子可以通过调控 pH 而带有不同的电荷,这些两性离子也可以很好地应用在混合色谱模式中。Irgum 等^[4]设计了一种以磷脂为功能基团的两性离子固定相,这种固定相能够很好地对简单

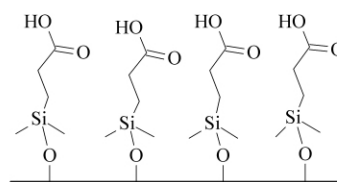


图 3 HILIC/IEX 混合模式固定相

Fig. 3 HILIC/IEX mixed-mode stationary phase

的多肽进行分离。这种固定相上同时带有磷酸根基团和季铵基团,受 pH 影响十分显著。这些简单的多肽都能够通过亲水作用模式和离子交换模式两种色谱模式的混合调控而实现成功的分离。

梁鑫淼等^[8,9]应用“巯基-乙烯基”点击化学方法将半胱氨酸键合到硅胶表面上,并将其命名为“Click TE-Cys”固定相(见图 4)。由于氨基酸是两性离子,这种填料显示出典型的两性特性,即在不同的 pH 下带电情况不同。这种固定相具有极强的亲水性,能够很好地分离寡糖、多肽以及碱性化合物等,并显示出极强的富集糖肽能力,为糖组学以及糖肽组学的研究提供了一种极具潜力的材料。

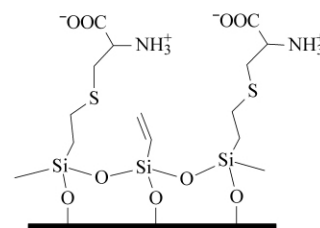


图 4 Click TE-Cys 固定相

Fig. 4 Click TE-Cys stationary phase

2.3 RPLC/HILIC 混合模式色谱

反相色谱往往应用于极性较弱以及中等极性化合物的分离,而亲水色谱则应用于极性较强的化合物的分离,两种模式单独使用在实际分离工作中会存在一定的局限性。亲水色谱与反相色谱有很好的正交性,在低比例有机溶剂条件下显示疏水保留特性,在高比例有机溶剂条件下显示亲水保留特性,将这两种模式进行结合不仅可以改善极性化合物的分离,还可以提高分离选择性以及保留性质。在现代分离纯化工作中,遇到的样品常常是极其复杂的混合物,极性与非极性物质往往混合在一起,因此将这两种模式有机结合,将为这些复杂样品的实际分离工作提供一种极具潜力的途径。

梁鑫淼等^[3]基于点击化学的方法在硅胶表面键合上环糊精,环糊精本身结构特殊——内腔疏水,外沿亲水(见图5),故具备反相/亲水特性。这种固定相在分离黄酮苷类化合物时呈现“U形”特征保留曲线,说明了这种固定相具有混合模式行为。

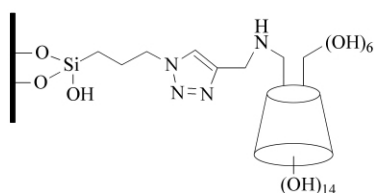


图5 Click-环糊精固定相

Fig. 5 Click-cyclodextrin stationary phase

Liu等^[4]发展了一种HILIC/RPLC混合模式色谱填料(见图6),其结构中包含一个疏水烷基链和二羟基亲水极性头。这种固定相可以在亲水模式与反相模式下使用,具有独特的色谱保留特性。

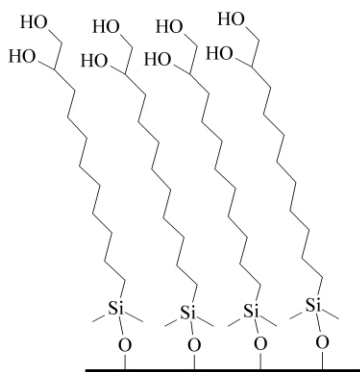


图6 HILIC/RPLC混合模式固定相

Fig. 6 HILIC/RPLC mixed-mode stationary phase

2.4 RPLC/CEX/AEX 混合模式色谱

近年来,Liu等^[46-48]设计了一种集反相/阳离子交换/阴离子交换色谱3种模式于一体的混合模式色谱填料——RPLC/CEX/AEX。这种填料是在

高纯度硅胶表面先键合具有疏水作用的阴离子交换基团,再通过静电驱动自组装过程,使得带有负电荷的纳米聚合物粒子与带正电荷的烷基链结合,这样制备出的填料能够同时具备3种作用力,即疏水作用、阴离子交换作用和阳离子交换作用。通过对这种固定相进行色谱评价,发现这种固定相的保留特性受流动相的离子强度、pH、有机溶剂含量影响,离子交换作用与亲水作用都对碱性化合物和中性化合物的保留产生影响。作者还将这种色谱填料在各种色谱性能上与其他商品化的色谱柱进行了比较,发现不同工艺制备得到的色谱柱的色谱性能差异较大。

3 混合模式色谱的展望

高柱效的混合模式色谱柱的开发仍然是这部分工作的一个热点。提高色谱柱的柱容量、色谱柱的分离性能,并使其使用效率高于两根串联使用的色谱柱的使用效率;键合相种类的选择、键合工艺的开发与优化也将成为这部分工作的一个重要研究点。值得注意的是,在目前众多开发的色谱柱中,有很多色谱柱是具有这种混合模式能力的。如何将已制备出的色谱柱的混合模式分离能力发挥到最大,也是需要研究者在长期工作中不断进行探索的。探索混合模式色谱柱的机理往往因混合模式种类不同而具有一定的差异性。这些机理的详细研究与报道还相对较少,若能将混合机理进行细致的考察与探索,对于混合模式色谱的深入研究也是一种推进。

混合模式较传统的RPLC、IEX、HILIC模式等有较大的区别,综合各分离模式的分离功能,同时以疏水作用、离子交换作用或亲水作用多种机理协作进行样品分离,可以很好地提高分离选择性,达到传统单一色谱模式所不能达到的效果。但是值得注意的是,正是由于多种机理同时存在,对这些作用的合理调控往往需要一定的时间与精力进行探索。此时,多种因素比如流动相极性、离子强度、pH等多个因素就需要协调平衡。这些因素都要同时考虑就使得混合模式色谱方法的开发具有一定的难度。

目前多种混合模式色谱填料已有合成,如何充分利用这些混合模式色谱柱发展高效、高选择性的色谱方法十分必要。依托之前研究发展的混合模式色谱基础,考察各种类型样品(标准样品与实际样品)在混合模式色谱柱上的色谱保留特性,总结混合模式色谱对这些样品的保留规律,发展混合模式色谱分离方法,将是十分有价值的工作。

综上所述,混合模式色谱已经受到研究者的

广泛关注,这种模式具有广泛的应用前景,探索空间巨大。无论是新型混合模式色谱填料的制备,还是混合模式色谱柱的实用方法开发,都十分值得研究者们深入研究。混合模式色谱也必将在色谱领域成为一种值得瞩目的强大工具!

参考文献:

- [1] Rafferty J L, Zhang L, Siepmann J I, et al. *Anal Chem*, 2007, 79(17): 6551
- [2] Qiu H D, Liang X J, Sun M, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(10): 3307
- [3] Miyabe K. *J Sep Sci*, 2009, 32(5/6): 757
- [4] McCalley D V. *J Chromatogr A*, 2007, 1171(1/2): 46
- [5] Francois I, Sandra K, Sandra P. *Anal Chim Acta*, 2009, 641(1/2): 14
- [6] Alpert A J. *J Chromatogr*, 1990, 499: 177
- [7] Fu Q, Liang T, Zhang X L, et al. *Carbohydr Res*, 2010, 345(18): 2690
- [8] Shen A J, Guo Z M, Cai X M, et al. *J Chromatogr A*, 2012, 1228: 175
- [9] Shen A J, Guo Z M, Yu L, et al. *Chem Commun*, 2011, 47(15): 4550
- [10] Gama M R, Silva R G D, Collins C H, et al. *Trac-Trends Anal Chem*, 2012, 37: 48
- [11] Guo H Y, Liu R H, Yang J J, et al. *J Chromatogr A*, 2012, 1223: 47
- [12] Liu Y J, Du Q, Yang B C, et al. *Analyst*, 2012, 137(7): 1624
- [13] West C, Khater S, Lesellier E. *J Chromatogr A*, 2012, 1250: 182
- [14] Yang J, Dong J B, Ye Z D, et al. *Acta Chim Sinica*, 2012, 70(16): 1725
- [15] Zhang F, Li Y, Guo Z, et al. *Talanta*, 2011, 85(1): 112
- [16] Gaur S. *J Chromatogr A*, 1996, 733(1/2): 57
- [17] Weiss J, Jensen D. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 375(1): 81
- [18] Chang S P, Wang F Q, Gong B L. *Chin J Chem*, 2011, 29(4): 793
- [19] Hao J X, Wang F Q, Dai X J, et al. *Talanta*, 2011, 85(1): 482
- [20] Davies N H, Euerby M R, McCalley D V. *J Chromatogr A*, 2007, 1138(1/2): 65
- [21] McLaughlin L W. *Chem Rev*, 1989, 89(2): 309
- [22] Yang Y, Geng X D. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(49): 8813
- [23] Geng X D. *Chinese Journal of Chromatography (耿信笃. 色谱)*, 2012, 30(1): 1
- [24] Mant C T, Hodges R S. *J Sep Sci*, 2008, 31(15): 2754
- [25] Stevenson P G, Fairchild J N, Guiochon G. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(14): 1822
- [26] Wu J Y, Bicker W G, Lindner W G. *J Sep Sci*, 2008, 31(9): 1492
- [27] Lammerhofer M, Nogueira R, Lindner W. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(8): 2517
- [28] Dong J, Ou J J, Dong X L, et al. *J Sep Sci*, 2007, 30(17): 2986
- [29] Lin H, Ou J J, Zhang Z B, et al. *Anal Chem*, 2012, 84(6): 2721
- [30] Borges E M, Euerby M R, Collins C H. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(6): 2043
- [31] Alpert A J. *Anal Chem*, 2008, 80(1): 62
- [32] Dong X F, Shen A J, Guo Z M, et al. *Carbohydr Res*, 2012, 361: 195
- [33] Guo Z M, Jin Y, Liang T, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(2): 257
- [34] Nogueira R, Lubda D, Leitner A, et al. *J Sep Sci*, 2006, 29(7): 966
- [35] Guo Z M, Wang C R, Liang T, et al. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(27): 4555
- [36] Cai X M, Guo Z M, Xue X Y, et al. *J Chromatogr A*, 2012, 1228: 242
- [37] Wei J, Guo Z M, Zhang P J, et al. *J Chromatogr A*, 2012, 1246: 129
- [38] Li X L, Guo Z M, Sheng Q Y, et al. *Analyst*, 2012, 137(12): 2774
- [39] Zhu B Y, Mant C T, Hodges R S. *J Chromatogr*, 1991, 548(1/2): 13
- [40] Zhu B Y, Mant C T, Hodges R S. *J Chromatogr*, 1992, 594(1/2): 75
- [41] Mant C T, Kondejewski L H, Hodges R S. *J Chromatogr A*, 1998, 816(1): 79
- [42] Mant C T, Litowski J R, Hodges R S. *J Chromatogr A*, 1998, 816(1): 65
- [43] Litowski J R, Semchuk P D, Mant C T, et al. *J Peptide Res*, 1999, 54(1): 1
- [44] Jiang W, Fischer G, Girmay Y, et al. *J Chromatogr A*, 2006, 1127(1/2): 82
- [45] Liu X D, Pohl C. *J Chromatogr A*, 2008, 1191(1/2): 83
- [46] Liu X D, Pohl C A. *J Sep Sci*, 2010, 33(6/7): 779
- [47] Liu X D, Pohl C, Woodruff A, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(22): 3407
- [48] Liu X D, Pohl C A. *J Chromatogr A*, 2012, 1232: 190