

亲水作用色谱固定相及其在中药分离中的应用

郭志谋, 张秀莉, 徐 青, 梁鑫淼*

(中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 亲水作用色谱 (HILIC) 作为一种分离极性化合物的液相色谱模式, 近年来越来越受到关注和重视。一方面是因为强极性化合物的分离问题引起了各个研究领域的重视, 如药物分析、代谢组学、蛋白质组学等研究领域都不同程度地涉及强极性化合物的分离问题; 另一方面是由于 HILIC 具有流动相组成简单、分离效率较高、与质谱兼容以及反压较低等优势。固定相是 HILIC 发展和应用的基础, 本文主要从固定相分子结构的角度对 HILIC 固定相的结构特征、保留特性以及应用概况等进行了综述。对传统正相色谱固定相用于 HILIC 以及专门设计的 HILIC 固定相进行了介绍, 评述了各自的优缺点和应用概况; 对近年来 HILIC 固定相在中药分离中的应用进行了介绍; 并对 HILIC 固定相的发展进行了展望。

关键词: 亲水作用色谱; 固定相; 强极性化合物; 色谱保留特性; 中药分离

中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2009)05-0675-07 **栏目类别:** 专论与综述

Stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography and their applications in separation of traditional Chinese medicines

GUO Zhimou ZHANG Xuli XU Qing LIANG Xinmiao*

(Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is an alternative of reversed-phase liquid chromatography (RPLC) for the separation of polar compounds. The main characteristic of HILIC is the use of polar stationary phases and aqueous/organic (usually acetonitrile) mobile phases. In recent years, HILIC has attracted more and more attentions for the demanding of the separation of polar compounds in many research fields and the advantages of HILIC, such as the good retention of polar compounds, orthogonality to RPLC and compatibility with mass spectrometry (MS), etc. Stationary phases are the basis of the development and application of HILIC. The structure of the bonded phases, retention properties and applications of the HILIC stationary phases are reviewed in the present article. The conventional stationary phases for normal phase liquid chromatography used in HILIC and the stationary phases specially developed for HILIC are introduced. The advantages, drawbacks and the general situation of applications of the different stationary phases are commented. The applications in the separation of traditional Chinese medicines are also reviewed. The further development of HILIC stationary phases is looked ahead.

Key words hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC); stationary phases; very polar compounds; chromatographic retention properties; separation of traditional Chinese medicines

反相液相色谱 (RPLC) 是当前分离分析和分离制备中应用最为广泛的色谱模式, 其依靠疏水固定

相与溶质之间的疏水相互作用实现弱极性和中等极性化合物的高效分离。但是, RPLC 对强极性化合

* 通讯联系人: 梁鑫淼, 研究员, 博士生导师. Tel (0411) 84379519, E-mail liangxm@dicp.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (Nos. 20775079, 20805046).

收稿日期: 2009-09-09

物(如寡糖、糖苷和强极性寡肽等)的保留很弱,甚至不保留,因此强极性化合物在 RPLC 上不能得到很好的分离。用来分离强极性化合物的液相色谱方法主要有离子交换色谱法(IEC)、正相色谱法(NPLC)和亲水作用色谱法(HILIC)。它们可以作为 RPLC 的补充用于强极性化合物的分离;然而,它们又各自存在一定的局限性。

HILIC 作为一种分离极性化合物的液相色谱模式,其概念最早是由 Alpert^[1]于 1990 年提出的。HILIC 的主要特征是使用类似于正相色谱的极性固定相和水/有机溶剂(通常是乙腈)流动相(其中水是强洗脱溶剂)。与正相色谱类似,在 HILIC 模式下化合物的保留时间随化合物极性的增强而增加。但是,由于 HILIC 使用含水流动相,这就可以解决正相色谱中水溶性物质不溶于流动相的问题。早在 1970 年代, HILIC 的概念提出之前, Linden 等^[2]就使用氨基硅胶作为固定相、以含 75% 乙腈的水溶液作为流动相用于糖的分离分析。这种分离技术是典型的 HILIC 模式,也是最早的关于 HILIC 的报道,虽然其中并未涉及 HILIC 的定义。

近年来, HILIC 越来越受到关注和重视^[3]。一方面是因为强极性化合物的分离问题引起了各个研究领域的重视,如药物分析、代谢组学、蛋白质组学等研究领域都不同程度地涉及强极性化合物的分离问题;另一方面是由于 HILIC 具有其自身的优势。首先, HILIC 模式对强极性化合物和亲水化合物具有很好的保留和分离选择性,是解决各类强极性化合物和亲水化合物分离问题的可靠手段。其次, HILIC 模式使用的流动相体系相对简单,操作方便,而且克服了 NPLC 的流动相对水溶性物质溶解性差、保留时间对流动相中水含量敏感以及与质谱检测器不兼容等缺点。另外, HILIC 的分离机理与 RPLC 完全不同,两者的分离选择性有很好的正交性,而两者的流动相体系却相似,十分适合用于构建 HILIC-RPLC 二维色谱系统^[4]。将其用于多肽等复杂样品的分离,弥补了常用的 IEC-RPLC 二维体系的不足^[5],成为解决复杂样品分离问题的有效手段之一。自 2006 年 Irgum 等^[6]对 HILIC 的分离机理、分离材料和各方面的应用进行了全面的综述以来,近几年关于 HILIC 的综述文章逐渐增多^[3, 6-15],它们都在一定程度上涉及了 HILIC 固定相。但专门针对 HILIC 固定相进行综述的文章较少。

HILIC 固定相的主要特征是固定相表面是与水有很好的亲和性的强极性基团,如氨基、羟基、酰胺基等。早期的亲水作用色谱分离材料主要是原有的正相色谱固定相,如硅胶、氨基键合硅胶、二醇基键

合硅胶等^[6, 11, 16, 17]。近年来,专门用于亲水作用色谱的分离材料也已出现,其主要是将含酰胺基、羟基、两性离子等强极性基团的分子键合到硅胶上作为 HILIC 分离材料。虽然按照 Alpert 提出的观点,亲水色谱的保留主要是依靠溶质在固定相表面吸附的“富水层”与流动相中的分配机理^[1],但是由于溶质与固定相直接相互作用的存在,不同固定相的保留性质表现出较大的差异^[16-18]。本文将主要从固定相分子结构的角度对 HILIC 固定相的结构特征、保留特性以及应用概况等进行综述。

1 传统的 NPLC 固定相直接用于 HILIC

NPLC 使用极性固定相和非极性流动相,依靠溶质分子在极性固定相表面的吸附实现分离。NPLC 使用的极性固定相主要有纯硅胶、氨基键合相、氰基键合相和二醇基键合相等(见图 1)。这些固定相具有较强的极性和亲水性,都能直接用于 HILIC。

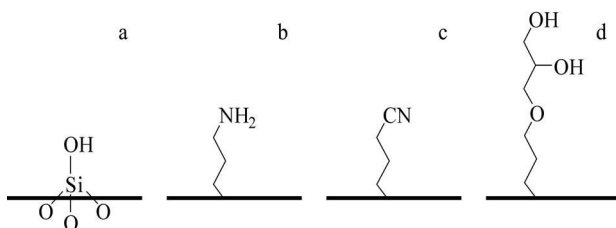


图 1 用于 HILIC 的正相固定相的结构

Fig. 1 Structures of the NPLC stationary phases used in HILIC

a silica b amino c cyano d diol

1.1 纯硅胶固定相

纯硅胶表面的硅羟基具有很好的极性和亲水性,可以直接用作 HILIC 固定相^[11, 16, 17, 19]。美国 Waters 公司还专门推出了硅胶亲水色谱柱——Atlantis silica HILIC column。纯硅胶固定相在 HILIC 模式下对强极性化合物(特别是碱性化合物)具有一定的分离选择性。硅羟基的酸性还使硅胶固定相表现出一定的离子交换作用^[17, 19]。由于硅胶表面没有修饰层,因而硅胶的表面吸附活性、表面结构不均匀性和硅羟基的酸性使色谱峰形和分离重复性产生一定的问题。另外,由于缺乏修饰层的保护,纯硅胶固定相在 HILIC 模式下的使用寿命较短,一般只能进样 500 次左右^[20]。近年来, Waters 公司提出了有机/无机杂化硅胶的概念并推出了系列色谱柱,乙基桥杂化硅胶被应用于 HILIC,其使用寿命比纯硅胶柱有了很大提高^[20-23]。但是,由于有机杂化基团的存在,其表面疏水性增加导致该固定相对强极性化合物的保留较弱,需要使用甲醇或乙醇取代水

作为流动相以延长溶质的保留时间^[20]。总体来讲, 硅胶和杂化硅胶固定相用于 HILIC 模式时, 溶质保留时间较短, 分离重复性也不是十分理想, 适用范围有限。

1.2 氨基键合相

在 HILIC 条件下, 氨基键合相从 1970 年代开始用于糖的分离分析, 且一直沿用至今^[2, 24, 25]。氨基键合相表现出典型的亲水色谱特性, 对糖、有机酸、核苷等强极性化合物表现出很好的分离选择性。但是, 由于氨基具有弱碱性, 在色谱分离过程中表现出一定的离子交换性质, 尤其是分离酸性化合物时表现较明显^[17-19]。此外, 流动相的 pH 值和盐浓度对溶质的保留时间有影响也证实了氨基固定相用于 HILIC 分离时阴离子交换机理的存在。阴离子交换机理的存在对于提高固定相的选择性有一定的积极意义, 但是也容易造成酸性化合物保留时间过长和峰形拖尾等问题^[18]。

1.3 二醇键合相和氰基键合相

二醇基键合相和氰基键合相等正相固定相也可以用于 HILIC 模式, 但同样由于键合相亲水性不足, 存在着溶质保留时间较短的问题^[16]。

综上所述, 传统的正相色谱固定相虽然可直接用于 HILIC 模式, 但是在亲水性、选择性、重复性和使用寿命方面存在很多问题, 其应用范围有限, 不是理想的 HILIC 固定相。

2 专为 HILIC 设计的固定相的发展

由于 HILIC 模式的快速发展和强极性化合物分离需求的增强, 专为 HILIC 设计的固定相得到了越来越多的关注和应用, 并且已经有多种类型的专门用于 HILIC 的固定相实现了商品化。虽然当前 HILIC 固定相的种类很多, 但是根据键合相的化学结构进行分类, HILIC 固定相可分为酰胺型、多元醇羟基型和两性离子型等。这几类基团具有很好的亲水性, 十分适合作为亲水色谱的固定相, 而且在一定程度上可以解决传统正相固定相用于 HILIC 所存在的问题。值得注意的是, 使用不同合成方法制备的 HILIC 固定相, 其极性功能基团的连接方式和空间排布不同, 得到的 HILIC 固定相的表面化学结构和分离性能会有很大区别^[16]。

2.1 酰胺固定相

酰胺基团有很好的亲水性和稳定性, 而且是电中性基团。因此, 酰胺固定相十分适合作为 HILIC 固定相, 可以避免氨基固定相的使用寿命短、分离重复性差和色谱峰形不佳等问题出现。在酰胺型固定相中, Tosoh 公司的 TSKgel Amide-80 固定相 (见图

2) 应用较为广泛, 其在 HILIC 模式下用于分离核苷、核苷酸、肽、糖、糖醇和有机酸等亲水化合物^[26-29], 取得了很好的分离效果。

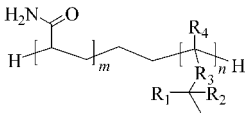


图 2 酰胺型固定相 TSKgel Amide-80 的结构
Fig 2 Structure of the bonded amide stationary phase — TSKgel Amide-80

2.2 醇羟基固定相

醇羟基具有很好的极性和亲水性, 同时又不会发生电离, 反应活性也较低, 具有很好的稳定性, 因此十分适合作为亲水色谱固定相。与正相色谱中常用的二元醇羟基固定相相比, 多元醇羟基固定相具有更丰富的表面醇羟基和特异的空间构型, 因而其对强极性化合物的保留和分离选择性也有较大的增强。Amstrong 等^[30, 31]使用 β -环糊精固定相分离寡糖, 取得了很好的结果, 并且从保留值和分离效率两个方面分析了分离原理, 认为分离过程中分配作用和氢键作用同时存在。Alpert^[1]提出 HILIC 的概念时就使用多元醇羟基固定相对糖、氨基酸、肽等多种强极性样品进行了分离。Advanced Separation Technology 公司的环糊精固定相 Cyclobond 2000 和 Cyclobond III 以及 PolyLC 公司的多元醇羟基固定相 PolyHydroxylethyl A (见图 3) 已经实现了商品化。

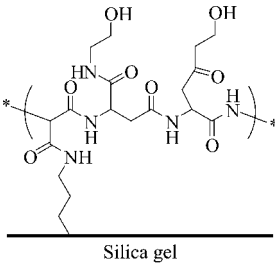


图 3 多元醇羟基固定相 PolyHydroxylethyl A 的结构
Fig 3 Structure of the polyhydroxyl stationary phase — PolyHydroxylethyl A

Liang 和 Lei 等^[32]发展了使用点击化学 (click chemistry) 合成 HILIC 固定相的方法, 并制备了一系列以醇羟基为功能基团的 HILIC 固定相, 主要包括单羟基固定相、多元羟基固定相、环糊精固定相 (Click CD)、葡萄糖固定相 (Click Glucose) 和麦芽糖固定相 (Click Maltose) 等 (见图 4)^[33-35]。上述基于点击化学的醇羟基固定相中醇羟基的空间分布与传统的醇羟基固定相有所不同, 特别是以葡萄糖和麦芽糖为功能基团的糖基固定相中的醇羟基分布

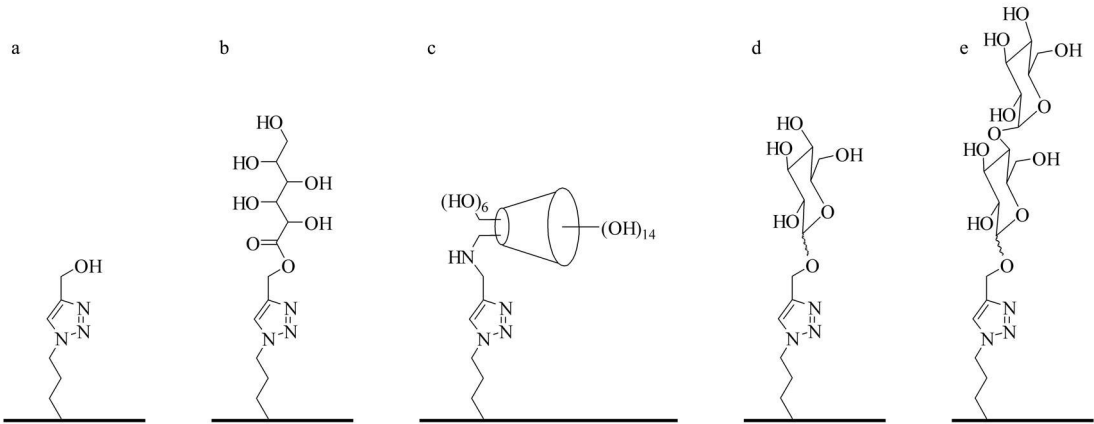


图 4 基于点击化学的 HILIC 固定相
Fig 4 Structures of the HILIC stationary phases based on click chemistry
a monohydroxy; b multihydroamino; c cyclodextrin; d glucose; e maltose

在自由的糖单元上, 结构上具有独特之处^[33]。基于点击化学的 HILIC 固定相被用于分离单糖、二糖、糖醇、寡糖、碱基、核苷、肽以及中药中的强极性组分^[33-35]。由于环糊精分子具有亲水的外表面和疏水的内腔, Click CD 除了具有 HILIC 特性外, 还对弱极性化合物表现出 RPLC 性质, 即表现出反相/亲水作用混合色谱模式的保留行为^[35]。另外, 基于点击化学的固定相具有独特的三唑环结构。三唑环具有一定的碱性, 在酸性条件下容易质子化而带上正电荷, 因此基于点击化学的 HILIC 固定相表面具有明显的正电荷, 在分离过程中表现出静电吸引或排斥作用^[35]。

2.3 两性离子固定相

两性离子 (zwitterion) 是指在一个分子中同时存在正电荷中心和负电荷中心。Irgum 等^[36-39]将两性离子固定相应用于离子色谱中, 发现使用纯水就可以进行离子色谱分离。该固定相的结构见图 5a。两性离子固定相在离子色谱模式下的分离机理说明了其具有很好的亲水性, 适合用于 HILIC 模式。

随着 HILIC 模式的快速发展, 两性离子固定相迅速进入了 HILIC 领域, 以 ZIC-HILIC 的名称实现了商品化, 并且得到了十分广泛的应用^[40-46]。两性离子固定相由于同时具有正电荷和负电荷中心, 其总体的表面电荷效应较小 (理论上应该为电中性)。Guo 等^[17]的研究结果表明具有电荷中心的 ZIC-HILIC 的离子交换作用小于以酰胺为功能基团的 TSKgel Amide-80。

Irgum 等^[47]从电荷排布的角度考虑, 又设计了一种以磷脂为功能分子的两性分子固定相 (结构见图 5b)。与 ZIC-HILIC 的负电荷中心位于键合相末端不同, 该固定相的正电荷中心位于键合相末端。Irgum 等期望通过改变正负电荷中心的排布来改变



图 5 两性离子固定相的结构
Fig 5 Structures of the zwitterionic stationary phases
a sulfoalkylbetaine; b phosphorylcholine

固定相的总体电荷效应, 但该固定相表面依然带有部分负电荷。该固定相对肽具有很好的分离选择性, 而且固定相和溶质分子的电荷状态对分离选择性的影响很大。

3 离子交换固定相用于 HILIC

除了上述类型的 HILIC 固定相外, 常用于离子交换色谱的离子型固定相具有很好的亲水性, 因此也可以应用于 HILIC 模式, 例如 PolyLC 公司的 PolySulphoethylA (见图 6)。由于离子型固定相表面带有较强的表面电荷, 因此用于 HILIC 模式时仍然表现出离子交换 (或排斥) 作用, 是一种离子交换 (或排斥) 亲水作用混合色谱模式^[12, 48-54]。基于磷酸化肽在 HILIC 模式下离子型固定相上的保留特性, Apert^[55]于 2008 年提出了电荷抑制的亲水作用色谱 (ERLIC), 实质即为离子排斥与亲水作用混合

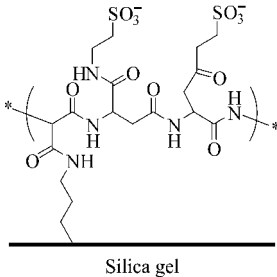


图 6 强阳离子交换固定相 PolySulphoethylA 的结构
Fig 6 Structure of the bonded strong cation exchange stationary phase — PolySulphoethylA

色谱模式。值得注意的是, HILIC 模式使用高含量的乙腈作为流动相, 其离子型固定相与离子型溶质的相互作用和常规 IEC 模式(乙腈含量较低, 一般为 10% 左右)下两者的相互作用有较大的不同, 可以带来分离选择性的巨大差异^[12, 49, 53]。

4 亲水作用色谱在中药分离中的应用

中药通常是以水煎给药, 其水溶性成分中包含着大量的在反相液相色谱上没有保留的强极性组分, 如多糖、寡糖、强极性糖苷、强极性生物碱、有机酸等。这些强极性组分可能是中药活性组分的重要组成部分, 或者对中药发挥药效起着重要的作用。但是, 受到反相液相色谱分离能力的限制, 这些强极性组分没有得到很好的分离和表征, 造成了中药物质科学研究中强极性组分方面的严重不足。近年来, 随着 HILIC 分离机理和分离方法研究的深入, HILIC 被用于中药分离分析和分离制备, 显示出了一定的应用潜力。

本研究小组利用 HILIC 分离技术, 以川芎水提物为对象, 发展了亲水作用色谱指纹图谱技术^[56]。川芎水提物中存在着大量在 RPLC 上没有保留的强极性物质, 因此在传统的 RPLC 指纹谱中这些强极性物质的信息往往被忽略。在亲水作用色谱上强极性物质得到了很好的分离, 可作为一种新的中药指纹图谱, 揭示中药强极性物质的组成信息。HILIC 指纹图谱技术与传统的 RPLC 指纹图谱技术相结合, 能更全面地反映中药全成分信息^[56], 克服了传统 RPLC 指纹图谱技术不能反映强极性组分信息的缺陷, 有利于提高中药质量控制的技术水平。

由于中药组成十分复杂, 单维色谱分离往往难以满足分析的需要, 大量重叠峰的存在严重制约了色谱定性、定量的准确性, 对一些低丰度的微量成分的分离分析尤为不利。因此, 发展二维色谱分离方法对于中药的分离分析具有重要意义。HILIC 和 RPLC 具有完全不同的分离机理, 十分适合用于与 RPLC 相结合构建二维液相色谱系统^[4]。我们使用 C18 固定相和本课题组发展的环糊精固定相, 构建了 RPLC-HILIC 二维色谱模式, 并以红花中的中等极性组分为分析对象, 系统评价了该二维色谱系统的正交度和峰容量, 结果显示该二维液相色谱系统具有非常好的正交性, 在对红花样品的分离中获得了 1 487 的峰容量^[57]。此外, 使用 TSKgel Amide-80 柱和本课题组发展的 Click CD 柱以及 Click Maltose 柱构建了 HILIC-HILIC 二维液相色谱系统, 用于红花强极性组分的分离, 取得了较好的分离

效果^[58]。在 2D-HILIC-HILIC 系统中, 两维均适用于强极性化合物的分离分析, 因此相对于 RPLC-HILIC 二维模式, 所分离化合物的极性也更强, 且不会因样品在某一维不保留而降低整个系统的分离能力, 能够使二维的分离能力得到最大程度的体现。

Xu 等^[59, 60]发展了 HILIC 和 RPLC 在线串联的液相色谱分离模式, 并对金银花提取物进行了分离分析, 只需一次进样就可同时获得强极性物质和弱极性物质的分离。该研究小组还使用 TSKgel Amide-80 柱和 PolyHydroxyethyl A 短柱构建了 HILIC-HILIC 在线二维液相色谱系统, 与四极杆飞行时间质谱(Q-TOF-MS)联用, 用于分析金银花提取物, 从中鉴定了 46 种皂苷类成分。此外, 通过色谱分离结果和质谱的相对分子质量信息发现该二维液相色谱系统可实现皂苷异构体的分离^[61]。

在 HILIC 用于中药物质基础研究中还发现, 亲水作用色谱不仅能用于中药强极性物质的分离, 而且可以作为 RPLC 的重要补充用于分离某些在 RPLC 上有很好保留的共流出组分, 拓展了亲水色谱的应用范围^[62, 63]。我们分别使用 Waters 公司的 Atlantis HILIC 柱和自制的 Click CD 柱对从甘草中获得的一个黄酮苷共流出组分进行了分离。该组分在 RPLC 上有很好的保留, 但是由于其所含化合物的疏水性相似, 无法获得很好的分离(见图 7)。在 HILIC 模式下, 该组分得到了很好的分离(见图 8)。较 Atlantis HILIC 柱, Click CD 柱表现出更好的分离选择性和重复性^[62]。在分离分析的基础上, 我们使用 Click CD 制备柱对该组分进行了纯化分离, 制备得到了 4 种黄酮苷类化合物^[63]。

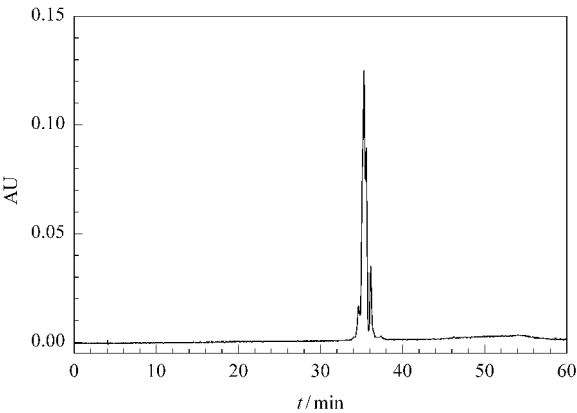


图 7 甘草中共流出黄酮苷组分的 RPLC 谱图
Fig 7 RPLC chromatogram for the co-eluted flavonoids
Tigerkin C18 column 250 mm × 4.6 mm, 5 μm. Mobile phase A: formic acid-water (0.1: 99.9 v/v); B: formic acid-acetonitrile (0.1: 99.9 v/v); gradient 0–40 min 5% B–25% B; 40–45 min 25% B–40% B; 45–50 min 40% B–95% B. Detection wavelength 330 nm.

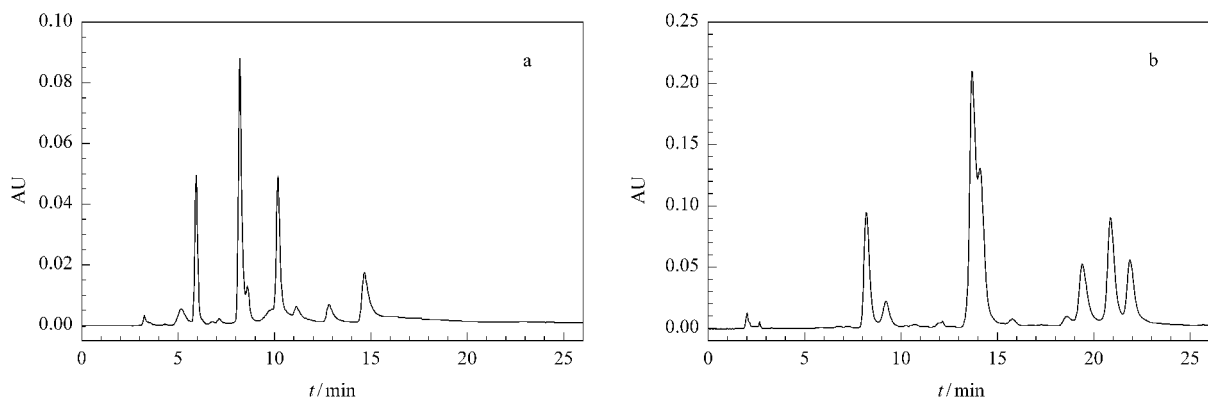


图 8 甘草中共流出黄酮苷组分在 (a) HILIC Silica 柱和 (b) Click CD 柱上的 HILIC 谱图

Fig 8 HILIC chromatograms for the co-eluted flavonoids on (a) the Atalantis HILIC Silica column and (b) Click CD column

Mobile phase A: formic acid-water (0.1:99.9, v/v); B: formic acid-acetonitrile (0.1:99.9, v/v). Detection wavelength: 330 nm.
a. HILIC Silica column: 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; mobile phase gradient: 0–30 min, 98% B–95% B; 30–35 min, 95% B.
b. Click CD column: 150 mm × 4.6 mm, 5 μm; mobile phase gradient: 0–30 min, 98% B–90% B; 30–35 min, 90% B.

5 问题与展望

HILIC 模式的分离机理不是十分明确,存在着多种复杂的相互作用。溶质除了在流动相和固定相表面水层中的分配作用以外,还存在与固定相直接的相互作用。例如,多篇文献报道证实了多种 HILIC 固定相与溶质分子发生静电相互作用,而且对色谱保留性质产生十分重要的影响^[16–19,35]。另外,溶质与固定相直接的氢键相互作用和偶极作用也存在于 HILIC 模式中^[30,31]。HILIC 固定相的种类繁多,不同 HILIC 固定相具有不同的选择性和适用范围,而对 HILIC 固定相的保留特性缺乏系统的研究,因此选择“合适”的 HILIC 色谱柱十分困难^[17]。另外,当前 HILIC 色谱柱在分离某些标准样品时具有和 RPLC 类似的分离效率,但是对实际样品中的多数极性化合物(如糖、多肽等)的分离效率较低^[10,30]。

针对各类强极性样品的分离问题,结合 HILIC 模式的分离特性,设计和制备结构新颖的极性固定相仍是未来 HILIC 研究的重要方向。由于键合相的结构直接影响溶质与固定相的相互作用,而相互作用不仅决定色谱保留特性,而且对色谱分离效率也产生重要影响,因此 HILIC 固定相的发展除了需要考虑键合相结构对保留特性影响之外,还需要兼顾键合相结构对分离效率的影响,期望发展出适用范围广的 HILIC 固定相。

对主要的 HILIC 色谱柱进行系统的色谱评价也是推广 HILIC 应用的基础,但是当前缺乏 HILIC 的评价方法和评价样品。色谱柱生产商评价 HILIC 色谱柱时所选择的样品也不尽相同,大多数只是给出少数几个样品的柱效,不能全面地反映色谱柱的

特性。HILIC 色谱柱评价缺乏具有典型代表性的样品。因此,需要建立包含几种典型极性(亲水)物质的 HILIC 色谱柱“评价样品体系”,为 HILIC 应用中色谱柱的选择提供参考。

参考文献:

- [1] Alpert A J. J Chromatogr. 1990; 499: 177.
- [2] Linden J C, Lawhead C L. J Chromatogr. 1975; 105(1): 125.
- [3] Hao Z G, Xiao B M, Weng N D. J Sep Sci. 2008; 31(9): 1449.
- [4] Gilar M, Olivova P, Daly A E, et al. Anal Chem. 2005; 77(19): 6426.
- [5] Boersma P J, Mohammed S, Heck A J R. Anal Bioanal Chem. 2008; 391(1): 151.
- [6] Hemström P, Igum K. J Sep Sci. 2006; 29(12): 1784.
- [7] Iwasaki Y, Ishii Y, Ito R, et al. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2007; 30: 2117.
- [8] Dejaegher B, Mangels D, Heyden Y V. J Sep Sci. 2008; 31(9): 1438.
- [9] Hsieh Y S. J Sep Sci. 2008; 31(9): 1481.
- [10] Ikegami T, Tamamoto K, Takubo H, et al. J Chromatogr A. 2008; 1184(1/2): 474.
- [11] Jandera P. J Sep Sci. 2008; 31(9): 1421.
- [12] Mant C T, Hodges R S. J Sep Sci. 2008; 31(15): 2754.
- [13] Nguyen H P, Schug K A. J Sep Sci. 2008; 31(9): 1465.
- [14] Jinno K, Quinlan N S, Deno N L, et al. Anal Bioanal Chem. 2009; 393(1): 137.
- [15] Wang Y, Gu H X, Lu X, et al. Chinese Journal of Chromatography (王媛, 顾惠新, 路鑫, 等. 色谱), 2008; 26(6): 649.
- [16] Strega M A. Anal Chem. 1998; 70(13): 2439.
- [17] Guo Y, Gaiki S. J Chromatogr A. 2005; 1074(1/2): 71.
- [18] Guo Y, Srinivasan S, Gaiki S. Chromatographia. 2007; 66(3/4): 223.
- [19] Olsen B A. 24th international symposium on high performance liquid phase separations and related techniques (HPLC 2000). Seattle, Washington: Elsevier Science Bv; 2000. 113.

- [20] Grumbach E S, Diehl D M, Neue U D. *J Sep Sci* 2008, 31 (9): 1511
- [21] Grumbach E S, Wheat T E, Mazzeo J R. *LC GC N Am*, 2006, 70
- [22] New L S, Chan E C Y. *J Chromatogr Sci* 2008, 46(3): 209
- [23] Fountain K J, Grumbach E S, Xu J, et al. *LC GC Eur* 2009, 42
- [24] Chums S C. *J Chromatogr A*, 1996, 720(1/2): 75
- [25] Kazłowski B, Pan C L, Ko Y T. *Carbohydr Res* 2008, 343 (14): 2443
- [26] Yoshida T. *J Biochem Biophys Methods* 2004, 60(3): 265
- [27] Karlsson G, Winge S, Sandberg H. *J Chromatogr A* 2005, 1092(2): 246
- [28] McNulty D E, Annan R S. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7 (5): 971
- [29] Tolstikov V V, Fiehn O. *Anal Biochem*, 2002, 301(2): 298
- [30] Berthod A, Chang S S C, Kullman J P S, et al. *Talanta* 1998, 47(4): 1001
- [31] Liu Y, Ugaonkar S, Verkade J G, et al. *J Chromatogr A* 2005, 1079(1/2): 146
- [32] Guo Z M, Lei A W, Liang X M, et al. *Chem Commun* 2006(43): 4512
- [33] Guo Z M, Lei A W, Zhang Y P, et al. *Chem Commun* 2007(24): 2491
- [34] Jin G W, Guo Z M, Zhang F F, et al. *Talanta* 2008, 76 (3): 522
- [35] Guo Z M, Jin Y, Liang T, et al. *J Chromatogr A* 2009, 1216(2): 257
- [36] Jiang W, Irgum K. *Anal Chem*, 1999, 71(2): 333
- [37] Viklund C, Irgum K. *Macromolecules* 2000, 33(7): 2539
- [38] Jiang W, Irgum K. *Anal Chem*, 2001, 73(9): 1993
- [39] Jiang W, Irgum K. *Anal Chem*, 2002, 74(18): 4682
- [40] Boersma P J, Divecha N, Heck A J R, et al. *J Proteome Res* 2007, 6(3): 937
- [41] Takegawa Y, Deguchi K, Keira T, et al. 18th international symposium on glycoconjugates Florence, Italy Elsevier Science Bv, 2005: 177
- [42] Takegawa Y, Deguchi K, Ito H, et al. *J Sep Sci* 2006, 29 (16): 2533
- [43] Xuan Y, Scheuermann E B, Meda A R, et al. *J Chromatogr A* 2006, 1136(1): 73
- [44] Diener M, Erler K, Christian B, et al. *J Sep Sci* 2007, 30 (12): 1821
- [45] Lindegardh N, Hanpithakpong W, Phakdeeraj A, et al. *J Chromatogr A* 2008, 1215(1/2): 145
- [46] Lindegardh N, Hanpithakpong W, Wattanagoon Y, et al. *J Chromatogr B* 2007, 859(1): 74
- [47] Jiang W, Fischer G, Gimay Y, et al. *J Chromatogr A* 2006, 1127(1/2): 82
- [48] Mant C T, Hodges R S. *J Sep Sci* 2008, 31(9): 1573
- [49] Zhu B Y, Mant C T, Hodges R S. *J Chromatogr* 1992, 594 (1/2): 75
- [50] Mant C T, Kondejewski L H, Cachia P J, et al. *Analysis of synthetic peptides by high performance liquid chromatography//Solid-Phase Peptide Synthesis Vol 289* San Diego Academic Press Inc 1997: 426
- [51] Mant C T, Litowski J R, Hodges R S. 17th international symposium on the separation and analysis of proteins peptides and polynucleotides (ISPPP 97). Rockville Maryland Elsevier Science Bv, 1997: 65
- [52] Litowski J R, Semchuk P D, Mant C T, et al. *J Pept Res* 1999, 54(1): 1
- [53] Hartmann E, Chen Y X, Mant C T, et al. 22nd international symposium on the separation of proteins peptides and polynucleotides (ISPPP 02). Heidelberg Germany Elsevier Science Bv 2002: 61
- [54] Hodges R S, Chen Y, Kopecky E, et al. *J Chromatogr A* 2004, 1053(1/2): 161
- [55] Albert A. *J Anal Chem*, 2008, 80(1): 62
- [56] Jin Y, Liang T, Fu Q, et al. *J Chromatogr A* 2009, 1216 (11): 2136
- [57] Liu Y M, Xue X Y, Guo Z M, et al. *J Chromatogr A* 2008, 1208(1/2): 133
- [58] Liu Y M, Guo Z M, Feng J T, et al. *J Sep Sci* 2009, 32 (17): 2871
- [59] Wang Y, Lehmann R, Lu X, et al. *J Chromatogr A* 2008, 1204(1): 28
- [60] Wang Y, Lu X, Xu G W. *J Sep Sci* 2008, 31(9): 1564
- [61] Wang Y, Lu X, Xu G W. *J Chromatogr A* 2008, 1181(1/2): 51
- [62] Zhang H, Guo Z M, Zhang F F, et al. *J Sep Sci* 2008, 31 (9): 1623
- [63] Zhang H, Guo Z M, Li W, et al. *J Sep Sci* 2009, 32(4): 526