

多柱色谱技术进展

王晓飞, 孙楷越, 张博*

(厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要 :在色谱分析过程中,利用串联、并联或串并联结合的方式将多根色谱柱组合起来,可以实现高通量和高分辨的分离效果。相比于传统单柱色谱技术,多柱技术很好地满足了批量样品分析和复杂生物样品分离分析的需求,因此引起了广泛关注。该文对多柱技术在多维分离、芯片色谱、毛细管电泳、固定相筛选以及串联色谱等领域的应用进行了综述,并对其发展前景进行了展望。

关键词 :多柱色谱;串/并联色谱柱;高通量;芯片色谱;多维色谱;综述

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713 (2019)02-0123-09

Multi-column technologies in chromatographic analysis

WANG Xiaofei, SUN Kaiyue, ZHANG Bo*

(College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : Multi-column chromatographic technologies provide high throughput and high resolution separations through parallel, serial or parallel-serial column combinations. In comparison with classical single-column based chromatography, multi-column chromatography well satisfied the need for separations of large batch samples and highly complex bio-samples, and therefore attracted extensive interests. In this review, we discussed the recent developments in multi-column chromatography and its applications in multidimensional separation, chip chromatography, capillary electrophoresis, stationary-phase screening, and serial column chromatography. We also discussed the limitations and future developments in multi-column chromatography.

Key words : multi-column chromatography; parallel/serial columns; high-throughput; chip separation; multidimensional chromatography; review

色谱技术自20世纪初出现以来,在物质分离和纯化领域发挥了重要作用。现今随着固定相合成工艺的进步和仪器制造技术的发展,色谱性能得到了显著的提升。例如亚 $2\ \mu\text{m}$ 和核壳色谱固定相的出现,以及耐压性能更强、死体积更小色谱仪的研制,都显著提高了液相色谱的分离性能和效率^[1-3]。此外,芯片和微流体技术在色谱领域的应用也使色谱分离系统越来越小型化^[4-7]。在快速发展的色谱技术中,同时利用多根色谱柱进行分离分析逐渐得到了关注^[8]。在面对批量样品和复杂生物样品的分

离分析时,传统的单柱色谱技术往往无法满足分离能力和分析通量的挑战,而串联或并联的多柱组合色谱技术则能很好地满足这样的需求^[8]。例如,在复杂生物样本分析中,基于多柱的多维分离已广泛应用于蛋白质组学和代谢组学研究^[9-11],使用多柱并行分离,一次操作可同时处理数个样品,可以显著提高药物分析和手性固定相筛选的工作通量^[12];此外,基于微流控芯片技术,在芯片上刻蚀多个分离通道,可以实现高通量的微分离分析^[13,14](见图1)。

多柱技术的发展获益于色谱柱技术的创新以及

收稿日期 2018-11-15

* 通讯联系人, Tel : (0592) 2188691, E-mail : bozhang@xmu.edu.cn.

基金项目 :国家自然科学基金 (21475110, 21535007, J1310024); 中国博士后基金项目 (2018M642572); 厦门市科技计划项目 (3502Z20173019); 中央高校基本科研业务费 (20720160051)。

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (Nos. 21475110, 21535007, J1310024); China Post-Doctoral Foundation (No. 2018M642572); Xiamen Municipal Science and Technology Plan Project (No. 3502Z20173019); Fundamental Research Funds for Central Universities of China (No. 20720160051).

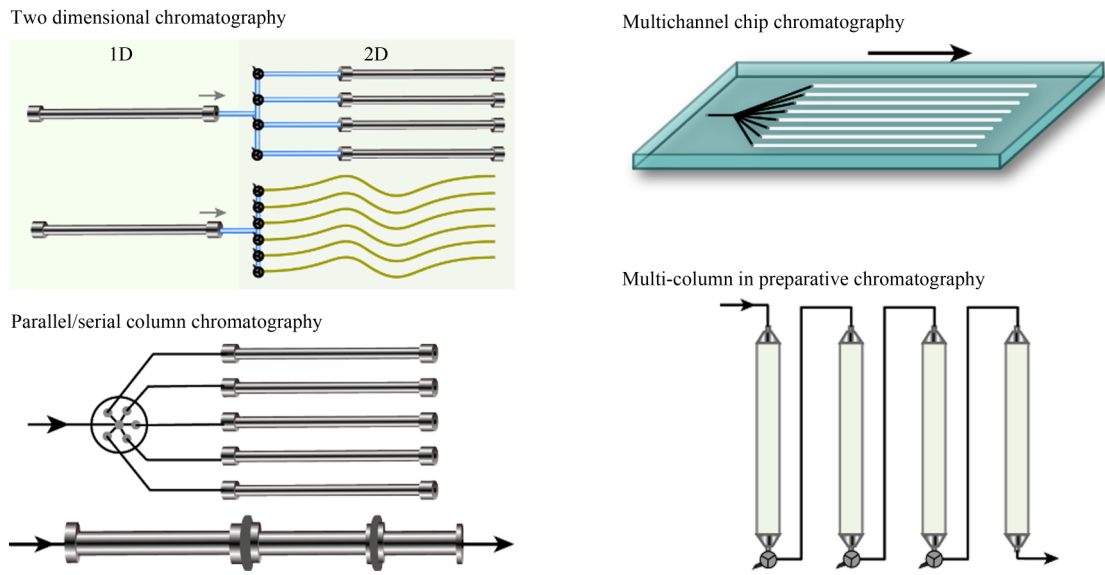


图 1 典型多柱技术应用示例
 Fig. 1 Typical multi-column chromatography applications

分离/检测接口的改进,多柱色谱分析技术的应用可以更好地解决分离科学所面临的挑战,例如提高效率、减少消耗和降低环境污染,这也符合绿色分析化学的原则^[15]。在本文中,我们讨论了多柱色谱技术的研究及应用,指出多柱技术不仅能够提高分离性能和效率,还可以为生命科学与生物医药研究提供更深入、更全面的数据,多柱色谱技术将是未来分离科学发展的重要方向之一。

1 多维色谱系统中的多柱技术

为了获得更大的峰容量和更高的分离效率,多

维色谱系统多数由一系列不同且相对独立的正交色谱分离系统组成,包括二维气相色谱(GC×GC)、二维液相色谱(LC×LC)和二维液相色谱气相色谱混合系统(LC×GC)。多维色谱至少需要两根色谱柱,是典型的多柱技术应用形式,已被广泛应用于科研与生产中。

1.1 多维气相色谱系统

基于两根分离性能正交的气相色谱柱构建 GC×GC 系统(见图 2),可使分辨率、灵敏度都得到数倍增加。GC×GC 系统可以提供复杂挥发性样品的更丰富的成分信息^[16],因此在天然产物、石油化工

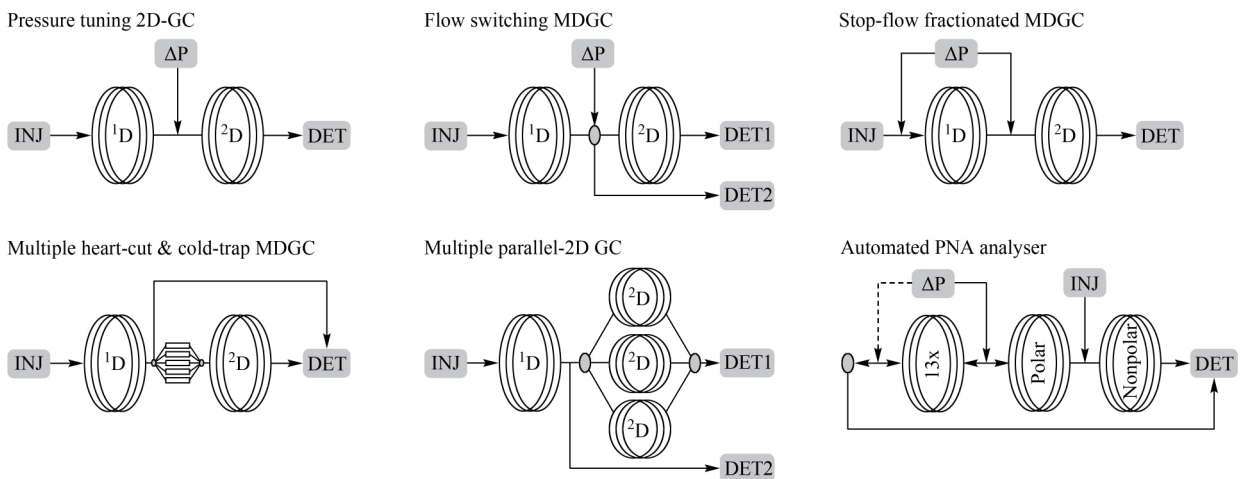


图 2 典型多维气相色谱 (MDGC) 系统配置图^[27]

Fig. 2 Typical multidimensional gas chromatography (MDGC) configurations^[27]

¹D : first-dimension column ; ²D : second-dimension column ; ΔP : pneumatic control ; INJ : injector ; DET : universal , specific or mass-selective detector or infrared spectroscopy.

和烟草等成分复杂样品的分析中,GC×GC 平台得到了广泛应用^[17-24]。在每一维分离中,色谱柱长度、直径和固定相种类的选择是决定 GC×GC 分离性能的关键因素^[25-27]。除了柱型的选择,多维分离系统间的接口是影响 GC×GC 发展与应用的另一个关键技术,接口技术与色谱柱中载气的压力和速度密切相关,进而影响到色谱系统的分离能力。Khan 等^[16]设计了一种全二维气相色谱系统,通过改善接口,引入了第二维压力调谐系统,并证明通过第二维的压力调谐,可以调控极性和非极性化合物在第二维分离系统中的出峰位置。Yan 等^[28]设计了一种全新的并行全二维气相色谱系统(2GC×2GC),它整合了两个相对独立的二维柱系统,通过反向热调制(contra-directional thermal modulation)控制两个 GC×GC 分离系统,使峰容量比单个 GC×GC 系统加倍,并对啤酒花精油中的复杂成分进行分析。结果表明,基于 4 种正交分离性能的色谱柱,2GC×2GC 可提供全面互补的化合物信息。随着新型接口和分析策略的研制和发展,基于不同选择性柱型的多维 GC 系统将为复杂挥发性样品的分析提供更多物质信息。

1.2 多维液相色谱系统

在二维液相色谱系统(LC×LC)的操作过程中,第一维色谱分离后,各个组分经过浓缩、捕集或分流后分别进入第二维分离系统进一步分离;与一维液相色谱系统相比,二维液相色谱系统具有更高的峰容量和分离度^[29]。近年来在复杂体系的分离中得到

了广泛应用,如蛋白质分离分析^[30,31]、代谢组学分析^[32]、中药成分分析^[33,34]和生物样品中农兽药残留检测^[35]等。二维液相色谱有离线分离和在线分离两种分析策略,离线二维分离具有更广的溶剂选择、成本低和峰容量大等优势^[34],不受流动相兼容性的约束^[33],在线分离则需要解决不同分离维度间流动相与流速的兼容性等挑战^[36]。

但随着全二维液相色谱概念的提出,以及方法学^[37]、系统控制^[35]和微加工技术^[38]的改进,全多维液相色谱技术弥补了传统技术的不足,得到了迅速发展,并已广泛应用于生命科学、环境科学等领域。相对于多维气相色谱,多维液相色谱系统有更多不同分离机理的色谱柱可供选择,如离子交换色谱(IEC)、反相色谱(RPLC)、亲和色谱(AC)、尺寸排阻色谱(SEC)和正相色谱(NP)等,通过构建丰富多样的多维正交分离系统,可以实现特定的分离目的。Liu 等^[39]建立了二维毛细管阵列 LC×LC 系统,包含一根强阳离子交换毛细管柱(SCX)作为第一维分离系统,10 个微型三通阀和 10 根反相毛细管柱(RPLC)阵列作为第二维分离系统,结合基质辅助激光解析电离质谱(MALDI)检测,从肝癌组织中检测到数千种多肽,并鉴定出 1 202 种蛋白质(见图 3)。LC×LC 系统也广泛应用于复杂基质样品的分离检测,Zeng 等^[40]成功构建了多通道二维色谱系统,并通过分离纯化蓝莓提取物中的生物活性物质验证了其分离能力,LC×LC 分离也应用于聚合物中单/双官能团物质检测,基于这些信息可以更准确地

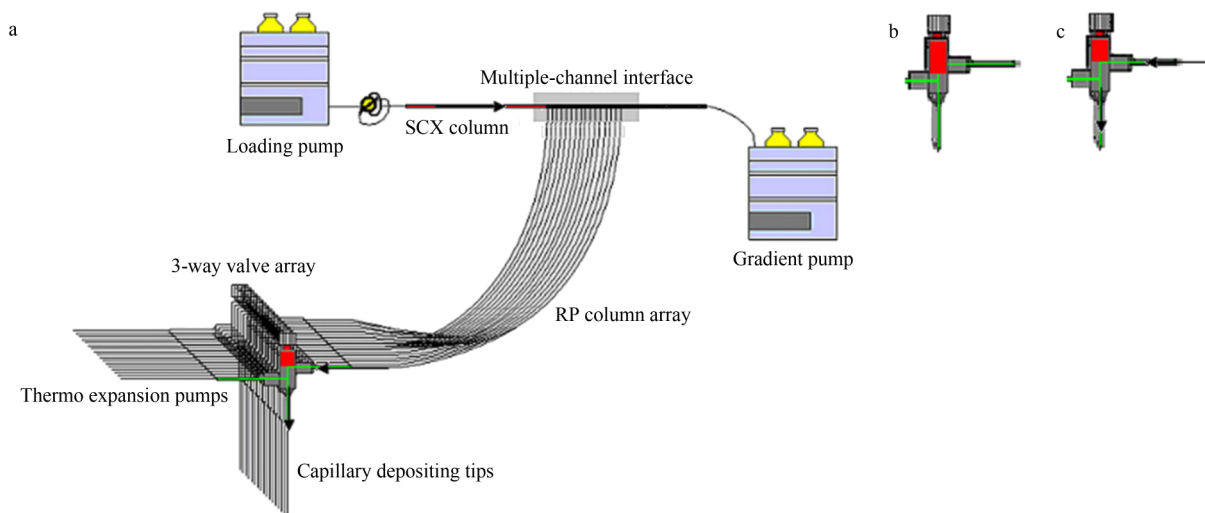


图 3 二维阵列毛细管液相色谱系统^[39]

Fig. 3 Two-dimensional capillary array liquid chromatography system^[39]

a. Schematic diagram of column array-based 2D-LC system; b. post-column micro valve at open state; c. post-column micro valve at close state.

判断聚合物的功能特性^[41]。基于多柱策略的多维色谱法已越来越多地受到分析人员的青睐,并广泛应用于诸多研究领域复杂样品的分离分析。随着接口技术和检测技术的发展和成熟,多维色谱法将得到更为广泛的应用。

2 芯片色谱中的多柱技术

基于芯片的微型色谱分离系统可以减少样品和试剂消耗,并且还大幅减少了分析时间和成本^[42],因此已成为新兴的研究方向^[43-46]。随着微流控技术、微加工技术的发展和改进,基于芯片的多柱技术也得到了发展和应用。

芯片液相色谱发展相对较慢,这主要是因为难以在芯片微通道内构建稳定均一的柱床。而采用通道表面涂覆^[47,48]、原位整体柱^[49,50]技术的芯片色谱系统,其分离性能和样品负载量又远小于颗粒填充柱床系统^[45]。Nagy 等^[51]报道了一种多通道液相色谱芯片的简单制造方法,该方法采用无柱塞技术,在芯片通道内填充了常规色谱固定相颗粒,单个芯片上可以同时制备 3~12 个平行的色谱分离柱,从而获得了较高的样品分析通量。Huang 等^[52]构建了基于纳米银-氧化石墨烯(Ag/GO)纳米材料的阵列式多通道玻璃芯片前处理装置,并结合 HPLC-FLD 法同时对草鱼中的双酚 A (BPA) 和壬基酚(NP)进行痕量检测,BPA 和 NP 分别可以达到 113 和 92 倍的富集。这一基于芯片的阵列色谱柱可以重复使用至少 15 次,且该方法的检出限显著降低。Shintani 等^[53]报道了一种小型化多通道高效液相色谱系统,包括单个高压梯度泵、基于芯片的样品进样单元、单片硅胶毛细管柱阵列和基于光纤的多通道 UV 检测单元。该系统可同时分离检测多个样品,并可获得高重现性的分离效果(RSD<0.9%),在组学分析和组合化学中有应用潜力。为了解决芯片通道内柱床填充均一性的问题,Huft 等^[54]提出了一种低压颗粒柱床填充技术:在分离通道旁开出微米尺寸的旁路通道,实现高质量柱床快速填充。此技术为芯片多柱填充提供了新的解决方案。基于此技术,Huft 等^[55]继而开发出了并行多柱的芯片 HPLC 系统,可以实现自动样品加载、梯度生成、分离、荧光检测和样品回收等步骤。Nagy 等^[56]通过 COMSOL Multiphysics 软件模拟多柱并行芯片色谱系统中的压力和速度分布,找到最优的通道几何形状和压力条件,并使用 12 道并行芯片色谱系统验证了模拟结

果。这种方法大大缩短了复杂几何形状多柱芯片色谱系统的设计和制作时间(见图 4)。与传统色谱仪器相比,芯片色谱系统需要更高的加工精度和集成度、更高的信噪比、更快的响应和更小的检测尺寸,因而对微加工技术提出了更高要求。同时,随着微纳分析技术的发展,多柱芯片色谱系统除满足常规化学分离外,在不久的将来还有望实现化学反应、样品前处理、筛选和后处理等多级单元操作的集成。

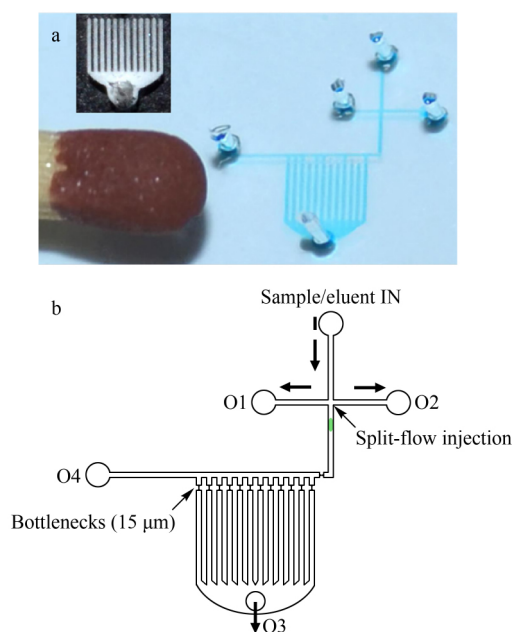


图 4 基于芯片的多柱色谱分离系统^[56]
Fig. 4 Multi-column chromatographic separations on microchip^[56]

(a) Photographic and (b) schematic representation of the microchip with 12 parallel C18 packings (0.1 mm×0.03 mm×10 mm, as width×height×length).

3 多柱毛细管电泳技术

毛细管电泳(CE)又称高效毛细管电泳(HPCE),以毛细管作为分离通道,由高压直流电场驱动,广泛应用于生物大分子的分离,如蛋白质分析和 DNA 测序。在高通量测序方法出现之前,DNA 测序是一个繁琐的过程^[57]。20 世纪 90 年代早期研制出毛细管阵列电泳和配套的检测系统^[58-62],第一代商品化 96 道毛细管电泳测序仪在 1998 年出现,如 GE Healthcare MegaBACE 1000 和 ABI Prism 3700 DNA 分析仪^[57]。多柱阵列 CE 提高了 DNA 测序的效率,降低了测序成本,并实现了自动化,可以轻松实现 DNA 的高通量测序(见图 5)。

多柱 CE 技术也被用于目标分析物的富集以提

高检测灵敏度。Britz-Mckibbin 等^[63]描述了基于 96 通道毛细管阵列电泳和紫外检测的嘌呤代谢物富集和检测系统,该系统具有高灵敏度和高通量的特性。在 Cheng 等^[64]的研究中,以 2~20 根并行毛细管电泳阵列对样品中汞离子 (Hg^{2+}) 和甲基汞 (MeHg) 进行富集和分离,显著降低了目标物的检出限;他们指出,通过使用并行毛细管电泳阵列可以

提高灵敏度,且灵敏度的提高与分离柱数成正比,同时分离效率和分辨率不受平行多柱的影响。

多柱毛细管电泳系统具有一系列优势。其由高压直流电场驱动,且无需使用固定相颗粒填充柱床,更容易实现多柱联用而无需考虑柱型和输液系统。基于以上因素,多柱 CE 系统已逐渐成熟并商业化,并已为生命科学研究做出了显著的贡献。

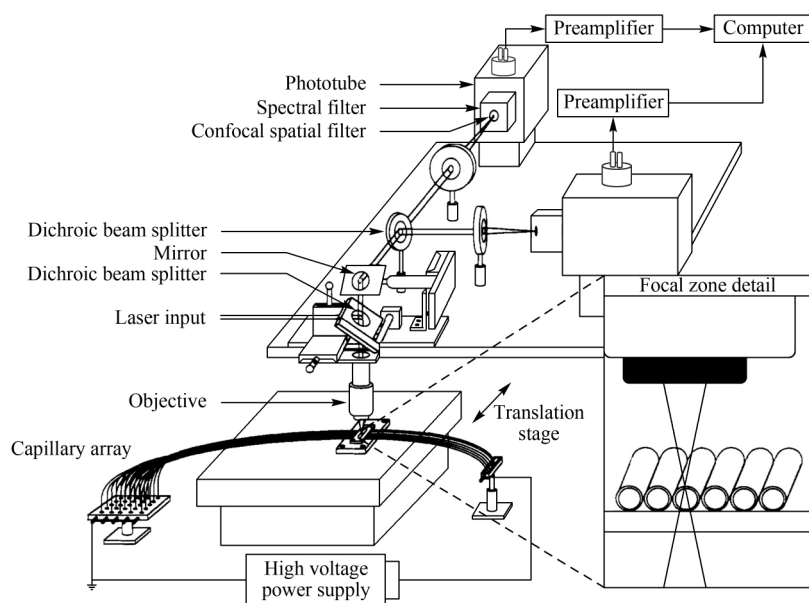


图 5 双色共焦荧光毛细管阵列扫描仪的示意图^[59]

Fig. 5 Schematic of the two-color, confocal-fluorescence capillary array scanner^[59]

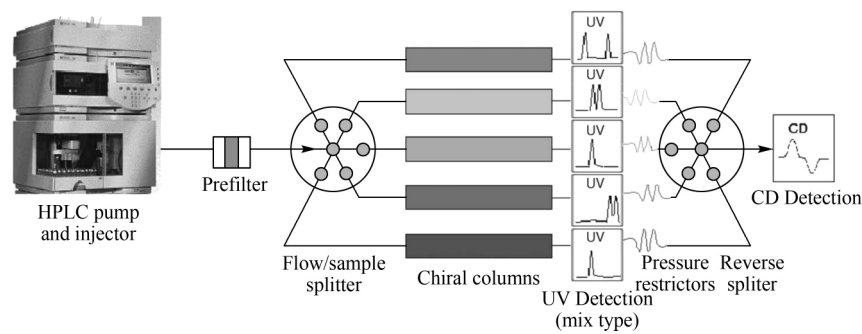
4 高通量手性固定相的筛选

手性色谱是目前使用最广泛的拆分对映体的方法^[65],目前约有 1 300 种手性色谱固定相 (CSP),其中约 170 种已经商品化^[66],并不断有新型 CSP 被开发应用。为了满足新型手性化合物分离分析的需求,开发快速的 CSP 筛选方法非常重要。通过使用短柱和提高柱效缩短单次分离时间^[67,68]、单次运行多次进样^[69,70]、快速超临界流体梯度^[71,72]和并行多柱筛选^[73]均能有效提高分析通量。

通过色谱柱的序列自动切换进行筛选是一种广泛使用的策略^[74,75],但这种方法一次只能测试一种流动相条件。为了提高筛选效率,多柱切换和并行柱筛选方法已经广泛应用并可以提供更准确、更快速的结果^[76]。如 AB Sciex 公司的 Eksigent Express LC 系统、Sepiatec 公司的 Sepmatix 系统都能够提供 8 柱并行的筛选容量。这些并行多柱筛选系统可以显著缩短方法开发的时间,并减少溶剂

消耗量。Zhang 等^[77]开发了一种快速手性柱筛选的新策略,它基于多柱平行分离筛选和圆二色 (CD) 检测器,集成了一个 HPLC 自动进样器、一个输液泵、5 个并行手性柱和 5 个紫外检测器,可以同时筛选 5 种手性柱,包括 Chiralpak AD、Chiralpak AS、Chiralcel OJ、Chiralcel OD、Whelk-O1 手性色谱柱。与广泛使用的顺序柱切换方法相比,该系统的筛选速度提高了 5 倍 (见图 6)。同样,Wang 等^[78]提出了一种针对 3 种不同手性色谱柱的筛选方法,这些色谱柱分别填充了具有互补选择性的环糊精手性固定相;作者研究了偶联柱的保留性和选择性,并与单个或多种混合手性固定相进行了比较。

需要指出,基于多柱并行筛选策略只需几个小时即可完成固定相筛选,而传统的顺序筛选方法往往需要数天才能选出理想的固定相。多柱并行 HPLC 方法的自动筛选策略将显著提高生物医药等领域对映体拆分的效率。

图 6 带有圆二色光谱检测器的 5 柱并行筛选 HPLC 系统^[77]Fig. 6 Customized HPLC system for five-column parallel screening with circular dichroism (CD) signal pooling^[77]

5 高通量分离纯化技术

面对样本数量巨大的分析任务时,发展高通量技术成为必然^[79-80]。通过加大流动相流速、使用粒径更小的填料和长度更短的色谱柱可以实现快速分离,但这都是以增加背压和降低进样量为代价的;另一种提高分离通量的方法是使用多柱技术^[81-82]。面向制药工业对高通量分析的需求^[83],市面上已有 Eksigent Express 8008 通道和 NanostreamVeloce 24 通道液相色谱系统,能够在使用多根不同固定相的色谱柱时,执行快速的梯度分离^[84-85]。

Gross 等^[86]报道了基于双柱的平行 HPLC 系统,单次进样后将样品送入两根色谱柱,使用不同的洗脱条件和单个多波长检测器检测,通过分析芳香族化合物对该平行柱系统进行了测试,结果表明,与传统的单柱方法相比,该系统可获得更高的分离选择性和定量精度,使用传统单柱方法分析 8 种目标物(苯甲醚、苯、苯甲酰胺、氯苯、乙苯、间甲酚、邻甲酚和甲苯)时,在 ZirChrom PBD 和 CARB 两种固定相色谱柱中均存在显著出峰重叠,但当以双柱平行方式使用相同两种固定相色谱柱进行分析定量时,能够实现较高的定量精度(通常 RSD = 2%)。在另一项研究^[87]中,通过在等度洗脱条件下分离 15 种磺胺类药物,考察串联和平行多柱技术的性能,并指出多柱串联技术优于平行多柱技术。

在纯化工艺中,多柱技术也有广泛的应用,这些多柱技术可以分为连续、半连续过程^[88-90]。多柱纯化系统操作中通常有许多变量,因此方法优化变得相当复杂。因此,进化算法(evolutionary algorithm)等先进的优化技术也被应用于多柱色谱纯化过程开发中^[91]。Heinonen 等^[92]设计了一种内部循环的 4 柱平行纯化工艺,并以木质纤维素水解产

物的分离纯化验证了模型,不仅实现电解质和非电解质的同步分离,还获得了优良的分选性能,硫酸的回收率和纯度分别达到 98% 和 94%,单糖为 85% 和 95%,乙酸为 88% 和 93%,该纯化方法不仅单糖产率高,洗脱液消耗量是单柱平行分批纯化法的 1/20。

光学检测器由于具有多通道检测容量,已在大多数多柱色谱中广泛采用,而质谱检测器由于其其在定性和定量方面的双重优势,也被尝试应用于多柱色谱系统中。在复杂生物样本的分析中,通过使用两个集成的 LC 单元(每个单元带有自动进样器和输液泵组件),可以充分利用色谱柱的平衡时间来提高质谱仪的检测通量和使用效率^[93]。该分析策略也被用于基于质谱的蛋白质组学研究中,可以消除色谱柱的再生/平衡时间延迟,使分析通量提高一倍^[94]。基于此分析策略,Livesay 等^[95]进一步引入了 4 个平行色谱柱,这种自动化四柱系统在所考察的液相色谱条件下的使用覆盖率接近 100%,显著提高了质谱检测器的利用率。

另一种提高质谱检测通量的方法是使用多个喷雾针的离子化系统,该方法可以同时获得每支并行色谱柱的数据,从而实现在单次色谱运行时间内同时分析多个样品^[96](见图 7)。基于此分析策略,Yang 等^[97]在 HPLC 系统中并联 4 个分析柱,同时在三重四极杆质谱仪上连接四通道的多路电喷雾接口(MUX),同时在 4 种不同的生物基质中检测并测定氯雷他定及其代谢物,结果符合美国食品和药物管理局(FDA)验收标准的精度和准确度。后续的工作中,该小组^[98]还进一步构建了并联 8 柱液相色谱-蒸发光散射检测-质谱(LC-ELSD-MS)系统,由 LCT 飞行时间质谱仪和八通道多路电喷雾接口组成,可用于天然产物库的建立与表征,为制药工业和天然产物研究提供了高通量筛选的有力工具。并行

多柱策略可以显著提高分离分析和制备纯化的通量,多柱技术的发展和多通道质谱检测接口的创新都将大大扩展多柱色谱的应用领域。

策略和多泵驱动策略,往往占用较大空间,且不能满足稳定性的需求。实现稳定的多通道流动相输送是多柱色谱技术发展的主要挑战。

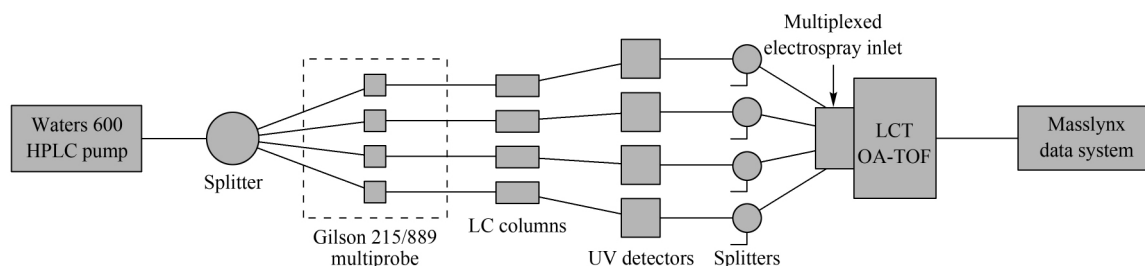


图 7 四通道 LC-MS 接口整体系统布局^[96]

Fig. 7 Overall system layout for the four-way multiplexed LC-MS interface^[96]

6 串联多柱色谱技术

通过多柱的串联耦合来调节固定相种类与组成是提高色谱分离度的相对简单的解决方案。该方法使用兼容的洗脱条件和常规仪器,可以在不同类型的色谱柱上实施^[99]。串联耦合柱(SCC)液相色谱系统仅需配备单个泵系统和单个检测器,且在柱与柱之间不需要任何装置来存储洗脱液,因而仪器结构简单、易于实现。同时,在等度洗脱模式下,不同选择性的色谱柱可以产生一定的梯度效应,能够显著缩短分析时间,这一优势在复杂混合物的分离分析中也得到了证实^[100-111]。

降低色谱柱直径是提高分析灵敏度的常用方法,但内径减小会限制上样量,进而会限制灵敏度的增加,串联耦合内径逐渐减小的色谱柱则可弥补这个不足。de Vries 等^[112]设计了一个四柱串联且内径逐渐减小(2.1、1.0、0.5、0.15 mm 逐级递减)的柱系统,注射 80 μ L 血浆,同时分析咪达唑仑和 1'-羟基咪达唑仑,以此对该装置进行评价,结果表明其具有稳健的分离性能;与经典的捕集-洗脱法相比,灵敏度提高了 10~50 倍;与直接 micro-UHPLC 方法相比,灵敏度提高了 250~500 倍。

7 结论与展望

作为一种新颖的分离分析策略,多柱色谱技术可以解决复杂基质分析、大批量样品分析和手性固定相筛选等分析难题。与传统的单通道色谱不同,多柱色谱系统通常需要一个稳定的多通道流动相输送系统,以控制每个色谱柱中流动相的参数,如速率、成分和温度。然而目前常见的两种方案,即分流

另一方面,多柱色谱中使用的色谱柱应具有良好的重现性,如稳定的背压和分离度。基于当前的色谱柱制造工艺,即便使用相同生产批次的色谱柱,也会存在柱间差异,而从大量色谱柱中挑选性能一致的色谱柱并非易事。因此,开发快速、成本低和性能稳定一致的制柱技术是重要且紧迫的任务。

尽管多通道光学探测器已经成熟,但它们的同步定性和定量能力弱于质谱检测器。目前,多通道质谱检测方法仍处于起步阶段。因此,发展新型多通道质谱检测器和检测策略,将显著支撑和推进多柱色谱技术的发展和應用。

参考文献:

- [1] Cunliffe J, Maloney T. *J Sep Sci*, 2007, 30 (18): 3104
- [2] Fekete S, Guillaume D. *J Chromatogr A*, 2013, 1308: 104
- [3] Heaton J, Mccalley D. *J Chromatogr A*, 2014, 1371 (1): 106
- [4] Krisp C, Yang H, Van S R, et al. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14 (6): 1708
- [5] Bishop D, Blanes L, Wilson A, et al. *J Chromatogr A*, 2017, 1497: 64
- [6] Wouters S, De V J, Dores-Sousa J L, et al. *J Chromatogr A*, 2017, 1523: 224
- [7] Zarabadi A S, Pawliszyn J, Hajialamdari M. *J Chromatogr A*, 2017, 1484: 93
- [8] Alvarez-Segura T, Ortiz-Bolsico C, Torres-Lapasió J R, et al. *J Chromatogr A*, 2015, 1390: 95
- [9] Liu C, Zhang X. *J Chromatogr A*, 2007, 1139 (2): 191
- [10] Capriotti A L, Cavaliere C, Cavazzini A, et al. *J Chromatogr A*, 2017, 1498: 176
- [11] Porter S E G, Stoll D R, Rutan S C, et al. *Anal Chem*, 2006, 78 (15): 5559
- [12] Tang M, Zhang J, Zhuang S, et al. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2012, 39: 180
- [13] Huft J, Haynes C A, Hansen C L. *Anal Chem*, 2013, 85 (3): 1797
- [14] Huft J, Haynes C A, Hansen C L. *Anal Chem*, 2013, 85

- (5) : 2999
- [15] Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2013, 50 : 78
- [16] Sharif K M, Kulsing C, daSilvaJunior A I, et al. *J Chromatogr A*, 2018, 1536 : 39
- [17] Phillips J B, Xu J. *J Chromatogr A*, 1995, 703 (1/2) : 327
- [18] Phillips J B, Beens J. *J Chromatogr A*, 1999, 856 (1/2) : 331
- [19] Geus H J D, Boer J D, Brinkman U A T. *TrAC-Trends Anal Chem*, 1996, 15 (5) : 168
- [20] Liu Z, Lee M L. *J Microcolumn Sep*, 2000, 12 (4) : 241
- [21] Bertsch W. *J Sep Sci*, 2015, 23 (3) : 167
- [22] Marriott P, Shellie R. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2002, 21 (9/10) : 573
- [23] Ong R C, Marriott P J. *J Chromatogr Sci*, 2002, 40 (5) : 276
- [24] Pursch M, Sun K, Winniford B, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2002, 373 (6) : 356
- [25] Mostafa A, Edwards M, Górecki T. *J Chromatogr A*, 2012, 1255 (17) : 38
- [26] Amer M W, Mitrevski B, Jackson W R, et al. *Talanta*, 2014, 120 (120) : 55
- [27] Marriott P J, Chin S T, Maikhunthod B, et al. *Adv Chromatogr*, 2012, 34 (2) : 1
- [28] Yan D D, Tedone L, Koutoulis A, et al. *J Chromatogr A*, 2017, 1524 : 202
- [29] Stoll D R, Carr P W. *Anal Chem*, 2017, 89 (1) : 519
- [30] Wang F, Min Y, Geng X. *J Sep Sci*, 2012, 35 (22) : 3033
- [31] Zhang X M, *Chinese Journal of Chromatography*, 2017, 35 (1) : 138
张祥民, *色谱*, 2017, 35 (1) : 138
- [32] Li Z, Chen K, Guo M Z, et al. *J Sep Sci*, 2016, 39 (1) : 21
- [33] Xie X M, Sun W Y, Huang J Y, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44 (7) : 1140
谢秀满, 孙万阳, 黄竟怡, 等. *分析化学*, 2016, 44 (7) : 1140
- [34] Shen B J, Qin K M, Liu Q D, et al. *Scientia Sinica Chimica*, 2013 (11) : 1480
沈保家, 秦昆明, 刘启迪, 等. *中国科学: 化学*, 2013 (11) : 1480
- [35] Baglai A, Blokland M H, Mol H G J, et al. *Anal Chim Acta*, 2018, 1013 : 87
- [36] Zhou D Y, Xu Q, Xue X Y, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49 (2) : 207
- [37] Cook D W, Rutan S C, Stoll D R, et al. *Anal Chim Acta*, 2015, 859 : 87
- [38] Ahmad I A H, Soliven A, Allen R C, et al. *J Chromatogr A*, 2015, 1386 : 31
- [39] Liu C, Zhang X. *J Chromatogr A*, 2007, 1139 (2) : 191
- [40] Zeng X H, Wang Z Y, Hui L I, et al. *Food Sci*, 2014, 32 (7) : 779
- [41] Schoenmakers P, Aarnoutse P. *Anal Chem*, 2014, 86 (13) : 6172
- [42] Manz A, Graber N, Widmer H M. *Sensors Actuat B-Chem*, 1990, 1 (1/6) : 244
- [43] De M A. *Lab Chip*, 2002, 2 (3) : 48N
- [44] Jacobson S C, Hergenroeder R, Koutny L B, et al. *Anal Chem*, 1994, 66 (14) : 2369
- [45] Kutter J P. *J Chromatogr A*, 2012, 1221 (2) : 72
- [46] Manz A, Miyahara Y, Miura J, et al. *Sensors Actuat B-Chem*, 1990, 1 (1) : 249
- [47] Kato M, Inaba M, Tsukahara T, et al. *Anal Chem*, 2010, 82 (2) : 543
- [48] He B, Tait N, Regnier F. *Anal Chem*, 1998, 70 (18) : 3790
- [49] Ericson C, Holm J, Ericson T, et al. *Anal Chem*, 2000, 72 (1) : 81
- [50] Hlushkou D, Bruns S, Höltzel A, et al. *Anal Chem*, 2010, 82 (17) : 7150
- [51] Nagy A, Gaspar A. *J Chromatogr A*, 2013, 1304 (16) : 251
- [52] Huang L, Zhai H, Liang G, et al. *J Chromatogr A*, 2016, 1474 : 14
- [53] Shintani Y, Hirako K, Motokawa M, et al. *J Chromatogr A*, 2005, 1073 (1/2) : 17
- [54] Huft J, Haynes C A, Hansen C L. *Anal Chem*, 2013, 85 (3) : 1797
- [55] Huft J, Haynes C A, Hansen C L. *Anal Chem*, 2013, 85 (5) : 2999
- [56] Nagy A, Tóth E L, Iván K, et al. *Microchem J*, 2015, 123 : 125
- [57] Kircher M, Kelso J. *Bioessays*, 2010, 32 (6) : 524
- [58] Zagursky R J, McCormick R M. *Biotechniques*, 1990, 9 (1) : 74
- [59] Huang X C, Quesada M A, Mathies R A. *Anal Chem*, 1992, 64 (18) : 2149
- [60] Kambara H, Takahashi S. *Nature*, 1993, 361 (6412) : 565
- [61] Ueno K, Yeung E S. *Anal Chem*, 1994, 66 (9) : 1424
- [62] Kim S, And H J Y, Hahn J H. *Anal Chem*, 1996, 68 (5) : 936
- [63] Britz-Mckibbin P, Nishioka T, Terabe S. *Anal Sci*, 2003, 19 (1) : 99
- [64] Cheng H, Liu J, Xu Z, et al. *J Chromatogr A*, 2016, 1461 : 198
- [65] Tang M, Zhang J, Zhuang S, et al. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2012, 39 : 180
- [66] Francotte E R, Huynh D. *Enantioselective Chromatography as a Key Technology in the Global Strategy for Investigating, Preparing, and Developing Chiral Drugs*. (2015-02-17). https://www.researchgate.net/publication/272418411_Enantioselective_chromatography_as_a_key_technology_in_the_global_strategy_for_investigating_preparing_and_developing_chiral_drugs
- [67] Patel D C, Breitbach Z S, Wahab M F, et al. *Anal Chem*, 2015, 87 (18) : 9137
- [68] Barhate C L, Wahab M F, Breitbach Z S, et al. *Anal Chim Acta*, 2015, 898 : 128
- [69] Welch C J, Gong X, Schafer W, et al. *Tetrahedron-Asymmetr*, 2010, 21 (13/14) : 1674
- [70] Zawatzky K, Biba M, Regalado E L, et al. *J Chromatogr A*, 2016, 1429 : 374
- [71] Patel D C, Wahab M F, Armstrong D W, et al. *J Chromatogr A*, 2016, 1467 : 2
- [72] Schafer W, Bu X, Gong X, et al. *Comprehensive Organic Synthesis*. 2nd ed. Amsterdam : Elsevier, 2014 : 28
- [73] Sajonz P, Schafer W, Gong X, et al. *J Chromatogr A*, 2007, 1145 (1) : 149

- [74] Cohen B L. *J Chromatogr Sci*, 1987, 25 (5) : 202
- [75] Letter W S. *LC-GC*, 1997, 15 (6) : 508
- [76] Beesley T E. *LC-GC Eur*, 2011, 24 (5) : 270
- [77] Zhang Y, Watts W, Nogle L, et al. *J Chromatogr A*, 2004, 1049 (1/2) : 75
- [78] Wang A X, Lee J T, Beesley T E. *LC GC N Am*, 2000, 18 (6) : 626
- [79] Alvin K, Ly J, Condon R, et al. *Am Pharm Rev*, 2013, 16 (4)
- [80] Gjoka X, Rogler K, Martino R A, et al. *J Chromatogr A*, 2015, 1416 : 38
- [81] Zeng L, Burton L, Yung K, et al. *J Chromatogr A*, 1998, 794 (1/2) : 3
- [82] Zeng L, Kassel D B. *Anal Chem*, 1998, 70 (20) : 4380
- [83] Welch C J, Sajonz P, Biba M, et al. *J Liq Chromatogr R T*, 2006, 29 (15) : 2185
- [84] Buckingham S. *Scientist*, 2004, 18 (20) : 44
- [85] Patel P, Herrera C. *Am Lab*, 2004, 36 (2) : 14
- [86] Gross G M, Prazen B J, Synovec R E. *Anal Chim Acta*, 2003, 490 (1) : 197
- [87] Alvarez-Segura T, Ortiz-Bolsico C, Torres-Lapasió J R, et al. *J Chromatogr A*, 2015, 1390 : 95
- [88] Guiochon G, Shirazi S G, Katti A M. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. New York : Academic Press, 1994
- [89] Masuda T, Sonobe T, Matsuda F, et al. *US Patent*, US5198120. 1993-03-30
- [90] Heikkilä H, Hyöky G, Kuisma J. *EP Patent*, US5127957A. 1992-07-07
- [91] Heinonen J, Kukkonen S, Sainio T. *J Chromatogr A*, 2014, 1358 : 181
- [92] Heinonen J, Sainio T. *Sep Purif Technol*, 2014, 129 : 137
- [93] Jemal M. *Biomed Chromatogr*, 2000, 14 (6) : 422
- [94] Wang H, Hanash S M. *J Proteome Res*, 2008, 7 (7) : 2743
- [95] Livesay E A, Tang K, Taylor B K, et al. *Anal Chem*, 2008, 80 (1) : 294
- [96] De B V, Haskins N, Organ A, et al. *Rapid Commun Mass Sp*, 1999, 13 (12) : 1165
- [97] Yang L, Mann T D, Little D, et al. *Anal Chem*, 2001, 73 (8) : 1740
- [98] Eldridge G R, Vervoort H C, Lee C M, et al. *Anal Chem*, 2002, 74 (16) : 3963
- [99] Alvarez-Segura T, Torres-Lapasió J R, Ortiz-Bolsico C, et al. *Anal Chim Acta*, 2016, 923 : 1
- [100] Alvarez-Segura T, Ortiz-Bolsico C, Torres-Lapasió J R, et al. *J Chromatogr A*, 2015, 1390 : 95
- [101] Nyiredy S, Szücs Z, Szepeszy L. *J Chromatogr A*, 2007, 1157 (1/2) : 122
- [102] Haggarty J, Oppermann M, Dalby M J, et al. *Metabolomics*, 2015, 11 (5) : 1465
- [103] Bonn G. *J Chromatogr A*, 1985, 322 (1) : 411
- [104] Mao Y, Carr P W. *Anal Chem*, 2000, 72 (13) : 2788
- [105] Oda T, Kitagawa S, Ohtani H. *J Chromatogr A*, 2006, 1105 (1) : 154
- [106] Sharef O A, Feely J, Kavanagh P V, et al. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21 (11) : 1201
- [107] Blahová E, Jandera P, Cacciola F, et al. *J Sep Sci*, 2006, 29 (4) : 555
- [108] Huidobro A L, Rupérez F J, Barbas C. *J Chromatogr A*, 2006, 1119 (1/2) : 238
- [109] Kuehnle M, Rehbein J, Holtin K, et al. *J Sep Sci*, 2008, 31 (10) : 1655
- [110] Zedda M, Tuerk J, Teutenberg T, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216 (51) : 8910
- [111] Ramontorres-Lapasio J, Ortiz-Bolsico C, Garcia-Alvarez-Coque M C, et al. *Curr Chromatogr*, 2015, 2 (2) : 110
- [112] de Vries R, Vereyken L, François I, et al. *Anal Chim Acta*, 2017, 989 : 104