



新型生物色谱固定相制备及分析方法学研究进展

柴心怡, 顾妍秋, 陈啸飞, 柴逸峰

Advances in methodologies for preparation and analysis of new biochromatic stationary phase

CHAI Xinyi, GU Yanqiu, CHEN Xiaofei, CHAI Yifeng

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202112087>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

药物分子与靶蛋白相互作用的研究进展

Research advance on the interaction of pharmaceutical molecules with target proteins

药学实践杂志. 2019, 37(1): 1-4,31 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.001

去甲斑蝥素新型制剂研究进展

Research progress in new formulations of norcantharidin

药学实践杂志. 2021, 39(1): 1-3, 8 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202004038

生物技术药物药代动力学研究进展

Progress on pharmacokinetics of biotechnology drugs

药学实践杂志. 2019, 37(5): 394-399 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.003

抗肿瘤药物纳米粒载体的制备材料、包载药物及修饰方法

Preparation materials, drug loading and modification of nanoparticles as anticancer drug carrier

药学实践杂志. 2018, 36(4): 307-312,350 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.005

聚乙二醇衍生物及其蛋白药物修饰研究进展

Advances in the development of PEG derivatives and pegylated protein drugs

药学实践杂志. 2018, 36(4): 301-306,328 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.004

核-壳结构的脂质-聚合物杂化纳米粒的研究进展

Advances in the studies of core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles

药学实践杂志. 2018, 36(1): 13-17 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.003



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 综述 ·

新型生物色谱固定相制备及分析方法学研究进展

柴心怡¹, 顾妍秋², 陈啸飞¹, 柴逸峰¹ (1. 海军军医大学药学院, 上海 200433; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 201999)

[摘要] 生物色谱法是一种极具发展潜力的新兴色谱技术, 已广泛用于药物筛选及生物分子间相互作用分析。其技术核心是生物分子的色谱固定相, 现今主要发展了细胞膜色谱, 人工仿生膜色谱以及通过开发多种固定化策略将蛋白等直接固定于固定相载体。本文对新型生物色谱固定相方法学研究进展及基于新型固定相的生物色谱分析应用研究现状进行综述, 并展望了基于整体柱的生物色谱固定相及微型生物色谱分析系统的应用前景。

[关键词] 生物色谱; 固定化方法; 药物筛选; 整体柱

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2022)03-0193-06

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202112087

Advances in methodologies for preparation and analysis of new biochromatic stationary phase

CHAI Xinyi¹, GU Yanqiu², CHEN Xiaofei¹, CHAI Yifeng¹ (1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201999, China)

[Abstract] Biochromatography is a new chromatographic technology with great development potential. It has been widely used in drug screening and biomolecular interaction analysis. The core of this technology is the chromatographic stationary phase of biomolecules. Nowadays, it mainly develops cell membrane chromatography, artificial biomimetic membrane chromatography and the various immobilization strategies to directly immobilizes proteins on the stationary phase carrier. This paper reviews the research progress of new biochromatographic stationary phase and the application of biochromatographic analysis based on new stationary phase. And, the applications of biochromatographic stationary phase and micro biochromatographic analysis system based on monolithic column are prospected.

[Key words] biochromatography; immobilization method; drug screening; monolithic column

生物色谱法 (bio-chromatography) 于 20 世纪 80 年代中后期出现^[1], 是由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。随着色谱柱制备技术和在线联用技术的深入发展, 各种具有生物活性的材料, 如蛋白质、细胞膜、仿生物膜、活细胞、细胞壁等纷纷被作为固定相成功投入研究。对于生物色谱技术来说, 搭载生物材料的色谱固定相是技术的核心所在。对于适宜生物材料的选取、构建以及对于生物材料固定方

法学的开发, 使得固定相在最大程度上模拟体内的生理过程, 是生物色谱技术最重要的研究方向^[2-5]。

1 新型生物色谱固定相方法学研究进展

1.1 细胞膜色谱固定相

针对膜受体的活性分子筛选所提出的细胞膜色谱技术发展成为近年来的代表性生物色谱技术, 西安交通大学贺浪冲、王嗣岑团队^[6-8]开拓了该领域并进行了大量的理论和应用研究工作。该技术原理是直接提取细胞膜并固定于硅胶载体制备液相色谱固定相, 通过结合受体动力学与液相色谱分析, 在色谱柱内动态模拟药物在体内与受体相互作用的过程, 并通过色谱参数来评价化合物的亲和活性。细胞膜色谱固定相^[9-10]很好地保住了膜受体的结构和活性, 且适用于与各类色谱质谱系统的联用。Ding 等^[11-12]在细胞膜色谱固定相方法学方面开展了大量工作, 对细胞用量、破碎条件、固定相

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82073814、81973291、82122066、82003909); 上海市青年科技启明星计划项目 (19QA1411500)

[作者简介] 柴心怡, 硕士研究生, 研究方向: 药物分析, Email: chaixinyi1997@163.com

[通信作者] 陈啸飞, 博士, 副教授, 研究方向: 药物靶标相互作用分析, Email: xfchen2010@163.com; 柴逸峰, 博士, 教授, 研究方向: 药物活性分析, Email: yfchai@smmu.edu.cn

合成及填装流程进行了全面的方法学优化,对色谱柱质量标准具有较为精准的把控。此外,通过采用外源转染携带特定蛋白基因的质粒构建高表达细胞系,可实现针对特定靶受体的活性化合物筛选。但这种直接提取细胞膜并固定于载体所制备的生物色谱固定相不可避免地带来专属性和灵敏度两方面的局限性^[13],主要源于细胞膜上其他膜受体的干扰和膜蛋白自身的低丰度、含量不可控等特性,不适用于靶向目标膜受体活性成分的高通量精准分析。

1.2 仿生膜色谱固定相

利用蛋白脂质体重构技术(protoliposome reconstitution)^[14-15]制备人工仿生膜镶嵌膜受体,包裹于硅胶基质表面,作为色谱固定相,是一种新近发展的体外模拟膜受体生物构象和微环境的新方法。其原理是将二油酰基磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰甘油、棕榈油酰磷脂酰胆碱、胆固醇等细胞膜含有的磷脂类成分与纯化或重组的膜受体按一定比例混合,采用不同的水化超声条件,制备成单层脂质囊泡、双层膜微泡、碟状胶束、平面磷脂膜等形式,实现膜受体-脂质体镶嵌模型重构^[16-17]。膜受体脂质体是体外膜受体的理想存在形式,Mathiasen等^[14]发展了两种膜受体-脂质体镶嵌模型,实现蛋白数量和融合度稳定可控,并将其用于纳米尺度的高含量分析,其研究结果发表在2014年的《Nature Methods》上。相比较于细胞膜色谱固定相,膜受体脂质体具有蛋白种类和含量可控,磷脂和蛋白易于标记修饰等优势^[18-19]。然而,此项技术仍然存在着蛋白在重构过程中发生结构改变而失活的风险。

1.3 分子生物色谱

分子生物色谱(MBC)是基于生物大分子特异性识别原理,属于扩展的亲和色谱^[20]。广泛用于研究药物与血浆蛋白、糖蛋白、受体、DNA等大分子的相互作用关系,揭示了药物的血浆结合率等重要药理特性,而受体生物色谱^[21-22]不仅能判定药物在体内的作用靶点,还可以研究药物与受体的作用强度以及与其他药物的竞争作用。对于生物色谱固定相,无论是应用于药物筛选,还是对蛋白-蛋白或蛋白-药物相互作用的研究,如何能够将大量功能完整的蛋白固定到载体表面都是技术关键。目前,色谱固定相上的蛋白固定化策略主要分为物理吸附、化学键合、亲和标签偶联^[23]。

1.3.1 物理吸附

物理吸附即通过蛋白质与表面之间的弱相互作用(即氢键、静电相互作用、疏水相互作用和范德华力)来实现蛋白质固定化。利用吸附原理进行

偶联主要有两点好处,一是不需要对蛋白进行修饰,二是不需要额外的偶联剂^[23-24]。在细胞膜色谱固定相及仿生膜生物色谱固定相发展初期,生物材料与硅胶基质的融合依赖于磷脂膜上氨基与硅胶表面硅羟基的氢键和静电吸附作用力。这种固定方式在实际应用中存在着很明显的缺陷^[25],主要在于吸附作用力较弱,吸附过程可逆,且取向随机。随着时间推移,蛋白易从硅胶上脱落失活,导致色谱柱寿命短,稳定性不够^[26]。

1.3.2 化学键合

鉴于物理吸附的不足,化学修饰策略成为探索热潮。化学修饰策略主要可分为两种途径:①对生物分子进行化学修饰;②对固定相载体进行化学修饰。根据蛋白结构特征,可以对其天然存在的官能团进行共价修饰从而与固定相形成共价结合,以获得更加稳定的附着^[24-25]。考虑到蛋白活性位点和固定相的空间相互作用,主要对蛋白质暴露的氨基酸的N端和C端进行修饰,用于修饰的基团包括氨基、羧基以及巯基等^[24,27]。蛋白质与固定相载体的共价键结合又可分为非特异性结合与定点结合。绝大部分使用传统非特异性结合方法的生物大分子都存在结合取向随机的问题^[28],此外,当随机固定化蛋白与表面之间的相互作用太强时,也存在变性的可能性。为了使蛋白质能够在固定相表现均匀的定向排列,开发定点结合的方法显得具有重要意义。

对固定相载体进行化学修饰,很好地避免因蛋白修饰可能影响蛋白生物活性的问题。本课题组利用固定相载体化学修饰技术,先后发展了3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)、3-巯丙基三甲氧基硅烷(MPTS)修饰的硅胶(图1),使硅胶表面游离醛基、酯基等活性基团,与磷脂膜或蛋白上的氨基共价键合^[12]。通过考察发现这种修饰方式有效提升了生物色谱柱的使用寿命和稳定性,并由此使得生物色谱在原代细胞、干细胞、纯蛋白等生物材料上的适用性更强。在固定相共价修饰的基础上,纯蛋白色谱固定相也易实现,此技术可广泛应用于各类胞膜及胞质蛋白的亲合活性成分的筛选与相互作用分析。

1.3.3 亲和标签偶联

亲和标签偶联法则可以在更温和的条件下,使蛋白质定向均匀地连接到固定相上。不仅降低了蛋白质降解的风险,而且可以解离蛋白质,重复使用固定相^[24,27]。生物素-亲和素系统稳定性很高,两者结合亲和常数可为抗原-抗体反应的百万倍,形

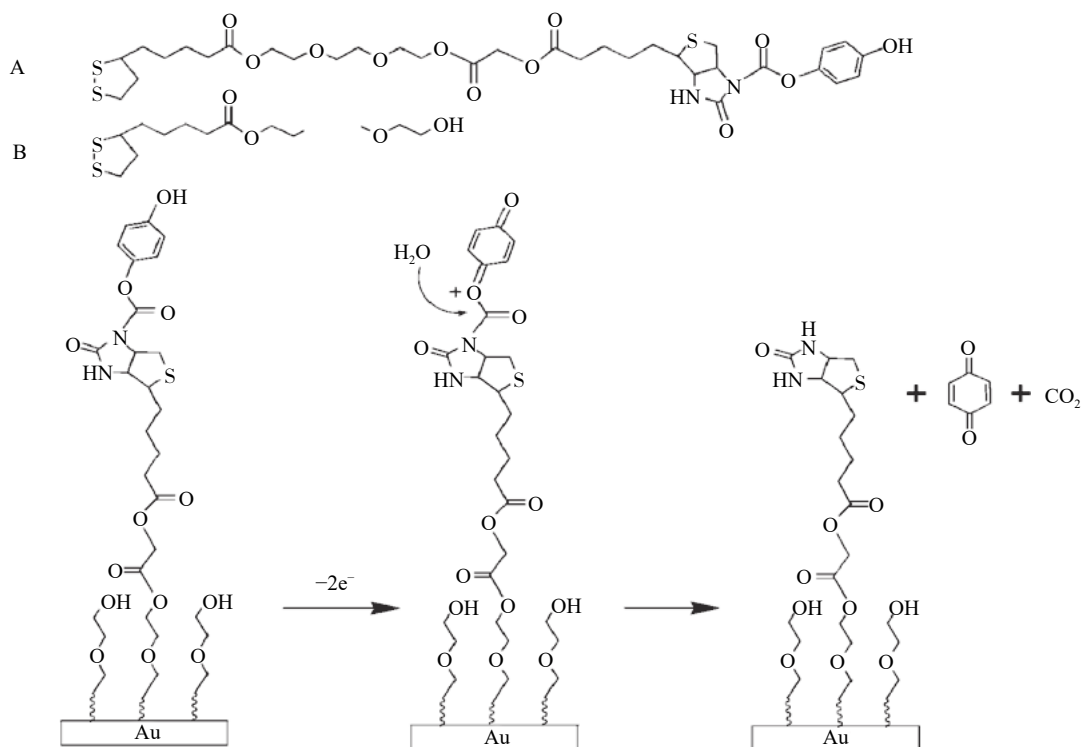


图2 在氢醌笼状生物素修饰金表面生成生物素的电化学氧化反应原理图

A. HQ-笼型生物素的化学结构; B. 硫代酸的三(乙二醇)酯(作为稀释剂)

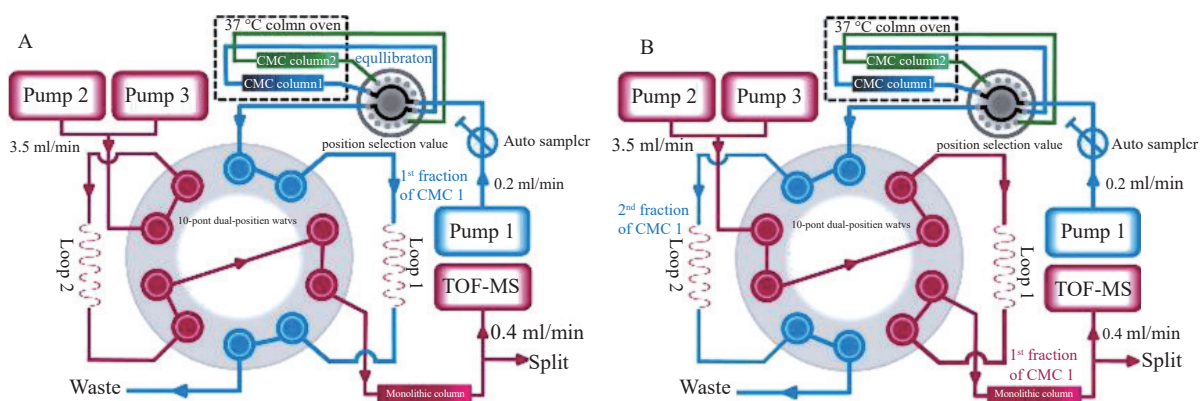


图3 全二维细胞膜色谱分析系统示意图

A. 十通阀位于1号位置; B. 十通阀位于2号位置

术,对蛋白关键作用位点的探测和构效关系研究,通过相互作用能力分析进行多肽及抗体类药物开发等前沿应用正处于快速发展阶段^[39-40]。

3 总结与展望

生物色谱作为一种体外分析手段,在发展进程中始终围绕着两个核心:①开发更好地模拟生物环境、适用性更佳、特异性更高的新型生物色谱固定相;②建立低生物用量、高灵敏度、功能化更全面的生物色谱分析系统。两者相互推进发展,最终建立起令人满意的分析策略。以下列举两点生物色谱分析方法学的新思路:

3.1 发展基于整体柱的生物色谱固定相

填充生物色谱柱的最大困难依然在于固定相制备困难,色谱柱性能不够稳定^[41]。整体柱是一种利用有机或无机聚合方法在色谱柱内进行原位合成,形成连续床固定相的色谱柱。与填充柱相比,其优越的多孔性能、良好的重现性和机械强度使其具有更稳定的色谱行为和更高效的分离性能,因有望克服传统色谱分离介质的局限性而备受关注^[42-44]。Svec教授认为^[45],新型功能化整体柱的开发是当下整体柱发展的主流。随着多肽、蛋白质、DNA等各种生物大分子成功发展成为整体柱固定相材料,基于整体柱的生物色谱系统已广泛应用于复杂样

品的分离纯化、小分子及抗体药物的筛选、蛋白与配体间的相互作用以及糖蛋白/磷酸化蛋白组学分析等多个生物领域^[46]。近年来,暨南大学江正瑾课题组发展了仿生磷脂膜整体柱以及类磷脂膜整体柱^[47],即通过在柱内键合脂质膜或柱后衍生化使得固定相表面暴露磷脂链来模拟细胞膜微环境,用于药物研发以及药物与细胞膜之间的相互作用研究^[47]。总之,整体柱固定相制备过程简单,且因其优越的固定相性能,整体柱的通量与分析速度相比传统填充色谱有了很大提高,有望克服传统生物色谱固定相制备和应用中的不足,成为近年来新药研发和色谱研究领域的热点之一^[43,48]。

3.2 发展微型液相生物色谱分析系统

新药研发、蛋白质组学分析、中药复杂成分分析等前沿领域的快速发展,对分析检测方法的灵敏度、样品通量等都提出了更高的要求。而且,对于生物色谱而言,生物材料往往获取不易,十分珍贵,常规色谱系统在生物领域的适用性上面临着很大挑战。Nano液相色谱分析系统是现阶段实现低生物用量、高灵敏度分析的重要手段^[49-50],为新型生物色谱固定相的开发提供了有利条件。本课题组曾在 nano 色谱柱中装填细胞膜及仿生膜色谱固定相,实现了 nano 液相色谱串联三重飞行时间质谱用于中药活性成分的筛选分析。此外, nano 液相能够更方便地与各种质谱联用,降低了对样品量的限制,将为多肽药物的筛选、生物大分子之间相互作用分析、蛋白组学分析等提供广阔的应用前景。

【参考文献】

[1] CLONIS Y D. Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1101(1-2): 1-24.
[2] LI Z, RODRIGUEZ E, AZARIA S, et al. Affinity monolith chromatography: a review of general principles and applications[J]. *Electrophoresis*, 2017, 38(22-23): 2837-2850.
[3] BATISTA-VIERA F, JANSON J C, CARLSSON J. Affinity chromatography[J]. *Methods Biochem Anal*, 2011, 54: 221-258.
[4] MUHAMMAD S, HAN S L, XIE X Y, et al. Overview of on-line two-dimensional liquid chromatography based on cell membrane chromatography for screening target components from traditional Chinese medicines[J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(1): 299-313.
[5] ZHANG H, WU Z Y, YANG Y Y, et al. Recent applications of immobilized biomaterials in herbal analysis[J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1603: 216-230.
[6] 贺浪冲, 耿信笃. 细胞膜受体色谱法—研究药物与受体作用

的新方法[J]. *生物医药色谱新进展*. 1996, 3: 8-9.
[7] HE L C, WANG S C, YANG G D, et al. Progress in cell membrane chromatography[J]. *Drug Discov Ther*, 2007, 1(2): 104-107.
[8] 贺浪冲, 杨广德, 耿信笃. 固定在硅胶表面细胞膜的酶活性及其色谱特性[J]. *科学通报*, 1999, 44(6): 632-637.
[9] HOU X F, WANG S C, ZHANG T, et al. Recent advances in cell membrane chromatography for traditional Chinese medicines analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 101: 141-150.
[10] LI M, HOU X F, ZHANG J, et al. Applications of HPLC/MS in the analysis of traditional Chinese medicines[J]. *J Pharm Anal*, 2011, 1(2): 81-91.
[11] DING X, CHEN X F, CAO Y, et al. Quality improvements of cell membrane chromatographic column[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1359: 330-335.
[12] DING X, CAO Y, YUAN Y F, et al. Development of APTES-decorated HepG2 cancer stem cell membrane chromatography for screening active components from *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Anal Chem*, 2016, 88(24): 12081-12089.
[13] 张月华, 蒋才武. 抗肿瘤中药药效物质筛选与辨识的研究方法进展[J]. *中南药学*, 2020, 18(9): 1517-1522.
[14] MATHIASSEN S, CHRISTENSEN S M, FUNG J J, et al. Nano-scale high-content analysis using compositional heterogeneities of single proteoliposomes[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(9): 931-934.
[15] SEREBRYANY E, ZHU G A, YAN E C Y. Artificial membrane-like environments for in vitro studies of purified G-protein coupled receptors[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(2): 225-233.
[16] GARNI M, THAMBOO S, SCHOENENBERGER C A, et al. Biopores/membrane proteins in synthetic polymer membranes [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2017, 1859(4): 619-638.
[17] JØRGENSEN I L, KEMMER G C, POMORSKI T G. Membrane protein reconstitution into giant unilamellar vesicles: a review on current techniques[J]. *Eur Biophys J*, 2017, 46(2): 103-119.
[18] LIU G Y, HOU S L, TONG P H, et al. Liposomes: preparation, characteristics, and application strategies in analytical chemistry[J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2020: 1-21.
[19] SFORZI J, PALAGI L, AIME S. Liposome-based bioassays[J]. *Biology (Basel)*, 2020, 9(8): E202.
[20] 郭明, 由业诚, 孔亮, 等. 分子生物色谱及其在药物筛选中的应用[J]. *大连大学学报*, 2003, 24(2): 38-41.
[21] CHEN X F, WU Y L, CHEN C, et al. Identifying potential anti-COVID-19 pharmacological components of traditional Chinese medicine Lianhuaqingwen capsule based on human exposure and ACE2 biochromatography screening[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(1): 222-236.
[22] QV X Y, JIANG J G, PIAO J H. Pharmacodynamic studies of Chinese medicine at levels of whole animal, cell and molecular models[J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(36): 4521-4537.
[23] STEEN REDEKER E, TA D T, CORTENS D, et al. Protein en-

- gineering for directed immobilization[J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24(11): 1761-1777.
- [24] RUSMINI F, ZHONG Z Y, FEIJEN J. Protein immobilization strategies for protein biochips[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(6): 1775-1789.
- [25] WONG L S, KHAN F, MICKLEFIELD J. Selective covalent protein immobilization: strategies and applications[J]. *Chem Rev*, 2009, 109(9): 4025-4053.
- [26] 王晓宇, 陈啸飞, 顾妍秋, 等. 细胞膜色谱研究进展及其在中药活性成分筛选中的应用[J]. *分析化学*, 2018, 46(11): 1695-1702.
- [27] SANGHVI M, MOADDEL R, WAINER I W. The development and characterization of protein-based stationary phases for studying drug-protein and protein-protein interactions[J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(49): 8791-8798.
- [28] CHA T, GUO A, ZHU X Y. Enzymatic activity on a chip: the critical role of protein orientation[J]. *PROTEOMICS*, 2005, 5(2): 416-419.
- [29] 刘石锋, 陈倩, 洪广成, 等. 生物素-亲和素系统的应用研究进展[J]. *生物技术*, 2018, 28(5): 503-507.
- [30] WILCHEK M, BAYER E A. The avidin-biotin complex in immunology[J]. *Immunol Today*, 1984, 5(2): 39-43.
- [31] KIM K, YANG H, JON S, et al. Protein patterning based on electrochemical activation of bioinactive surfaces with hydroquinone-caged biotin[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(47): 15368-15369.
- [32] PINA A S, BATALHA Í L, DIAS A M G C, et al. Affinity tags in protein purification and peptide enrichment: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2178: 107-132.
- [33] 周思维, 邱瑞琪, 高彩芳, 等. 生物色谱用于中药活性成分筛选[J]. *中国医药工业杂志*, 2017, 48(12): 1692-1697.
- [34] HOU X F, ZHOU M Z, JIANG Q, 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(42): 7081-7087.
- [35] FU J, LV Y N, JIA Q Q, et al. Dual-mixed/CMC model for screening target components from traditional Chinese medicines simultaneously acting on EGFR & FGFR4 receptors[J]. *Talanta*, 2019, 192: 248-254.
- [36] CHEN X F, CAO Y, LV D Y, et al. Comprehensive two-dimensional HepG2/cell membrane chromatography/monolithic column/time-of-flight mass spectrometry system for screening anti-tumor components from herbal medicines[J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1242: 67-74.
- [37] CHEN C, YANG F Q, ZUO H L, et al. Applications of biochromatography in the screening of bioactive natural products[J]. *J Chromatogr Sci*, 2013, 51(8): 780-790.
- [38] KASAI K. Frontal affinity chromatography: an excellent method of analyzing weak biomolecular interactions based on a unique principle[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2021, 1865(1): 129761.
- [39] LINGG N, ÖHLKNECHT C, FISCHER A, et al. Proteomics analysis of host cell proteins after immobilized metal affinity chromatography: influence of ligand and metal ions[J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1633: 461649.
- [40] ZHANG Y Y, FONSLow B R, SHAN B, et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics[J]. *Chem Rev*, 2013, 113(4): 2343-2394.
- [41] UNGER K K, SKUDAS R, SCHULTE M M. Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1184(1-2): 393-415.
- [42] BUNCH D R, WANG S H. Applications of monolithic columns in liquid chromatography-based clinical chemistry assays[J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(16-17): 2003-2012.
- [43] STANIAK M, WÓJCIAK M, SOWA I, et al. Silica-based monolithic columns as a tool in HPLC-an overview of application in analysis of active compounds in biological samples[J]. *Molecules*, 2020, 25(14): E3149.
- [44] GUO J L, LIN H, WANG J C, et al. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 165: 182-197.
- [45] SVEC F, LV Y Q. Advances and recent trends in the field of monolithic columns for chromatography[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(1): 250-273.
- [46] CHEN M L, LI L M, YUAN B F, et al. Preparation and characterization of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1230: 54-60.
- [47] ZHAO X L, CHEN W J, ZHOU Z Y, et al. Preparation of a biomimetic polyphosphorylcholine monolithic column for immobilized artificial membrane chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1407: 176-183.
- [48] 彭坤, 吴慧慧, 李林, 等. 功能化聚合物基质整体色谱柱的研究进展[J]. *分析测试学报*, 2018, 37(10): 1158-1165.
- [49] MEJÍA-CARMONA K, MACIEL E V S, LANÇAS F M. Miniaturized liquid chromatography applied to the analysis of residues and contaminants in food: a review[J]. *Electrophoresis*, 2020, 41(20): 1680-1693.
- [50] HARA T, IZUMI Y, HATA K, et al. Performance of small-domain monolithic silica columns in nano-liquid chromatography and comparison with commercial packed bed columns with 2 μm particles[J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1616: 460804.

[收稿日期] 2021-12-30 [修回日期] 2022-02-08

[本文编辑] 陈盛新