

水动力学色谱及其在微粒制剂评价中的应用进展

刘 薇^{1,2}, 李海燕², 郭 桢^{2,3}, 张继稳², 孙立新^{1*}

(1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203;
3. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310035)

摘要: 本文在介绍流体动力学色谱中应用最广泛的水动力色谱基本原理、装置和分析方法的基础上, 综述了水动力色谱在微粒制剂粒径测定及其分布估算方面的应用。该方法在快速测定纳米、微米尺度颗粒的粒径方面具有经济、便捷和无损伤等独特的优势, 在微粒制剂粒径分布特征检测上具有良好的应用前景。

关键词: 水动力色谱; 微粒制剂; 粒径; 粒径分布

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0631-06

Progress of the hydrokinetic chromatography and its application in the characterization of particulate drug delivery systems

LIU Wei^{1,2}, LI Hai-yan², GUO Zhen^{2,3}, ZHANG Ji-wen², SUN Li-xin^{1*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: In the present paper, the basic principles, the device and the analytical method of the hydrodynamic chromatography (HDC) were summarized, which is most widely used in hydrokinetic chromatography. The application of the hydrodynamic chromatography in the determination of the particle size and size distribution of the particulate drug delivery system was also reviewed. The method can determine the particle size of nano- and micron-scale particulate drug delivery systems rapidly. And this method also has the advantages of economic, convenient and no damage to the samples. In summary, there will be a good prospect for the application of HDC in the determination of particle size distribution features of particulate drug delivery systems.

Key words: hydrodynamic chromatography; particulate drug delivery system; particle size; particle size distribution

粒径及粒径分布特征是影响胶体分散体系、乳剂和混悬剂等非均相体系物理性质的重要因素。流体动力学色谱在分析粒径方面有显著的优势, 本文主要介绍在流体动力学中应用广泛、原理阐述清晰的水动力色谱 (HDC)。水动力色谱作为一种粒径分析手段在上世纪 70 年代初由 Small^[1, 2]提出, Mori 等^[3]和 Hoagland 等^[4]进一步发展和完善了 HDC 的理论和装置, 其他学者^[5-7]对其进行了探索和应用。

微粒给药系统 (microparticle drug delivery system, MDD) 包括脂质体 (liposomes)、纳米粒 (nanoparticle) 或纳米囊 (nanocapsule)、微球 (microsphere) 或微囊 (microcapsule) 和乳剂等药物载体系统。近来, 由于 MDD 可以控制药物的释放速度以达到缓释的目的、减少药物的刺激、降低药物的毒副作用、提高药物的稳定性、增强药物的靶向性^[8-10], 已成为一个重要的研究热点。

粒径及其分布特征的表征是微粒给药系统研究的重点。目前常用的粒径测量方法有透射电子显微镜法、扫描电子显微镜法、激光散射法、原子力显微

镜法等。透射电子显微镜法 (transmission electron microscope, TEM) 通常是利用电子成像的衍射对比, 得到明视野或暗视野影像, 并配合衍射图像来进行观察^[11, 12]。该法是对局部区域进行观测得到的结果, 对样品量少且分布不均匀的颗粒进行测定时, 具有一定的误差和偶然性。对大量样品进行统计时, 虽然测定结果可信, 但是测定过程复杂, 耗费大量的人力物力。扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 利用电子和物质的相互作用, 获取被测样品本身物理、化学性质的信息。在测定粒径方面, 与 TEM 具有相似的限制性。根据小粒子对激光的散射角大、大粒子对激光的散射角小的原理, 激光粒度仪通过对散射角大小的测量, 换算出粒子的大小^[13]。利用此法测定粒子粒径时受颗粒浓度、分散介质、分散剂类型等因素的影响较大^[14], 浓度过高时, 会出现多次散射的情况, 同时颗粒也会发生聚集, 直接影响测定结果的准确性; 分散介质的湿润能力、折光率、黏度等性能参数对颗粒的分散有重要的影响。当测定颗粒的尺寸及形状相差很大时测定结果的准确性就会大大降低。原子力显微镜法 (atomic force microscopy, AFM) 是利用检测样品表面与细微探针尖端的相互作用力 (原子力) 测定粒子表面的形貌特征, 其优点在于测量粒径的同时, 可以得到粒子的三维形貌, 但该法由于观察的范围有限, 得到的数据不具有统计性^[12], 测定结果受探头的影响很大。而 HDC 集分离、分析于一体, 可测定粒径及其分布并对分散的粒子进行分级纯化, 同时, HDC 克服了使用透射电子显微镜时干燥过程对粒子形态的影响, 避免光散射法因胶体粒子的膨胀对其光学性质的影响, 消除了许多外界因素 (如溶剂的种类、颗粒的分散性、操作者本身的局限性等) 对测定结果的影响。测定同一样品时, 其测量结果与电子显微镜法和光散射法基本相同^[15, 16]。

1 原理

HDC 适用于分离和测定几十纳米 (nm) 到几微米范围的粒子粒径。HDC 的洗脱顺序是粒径从大到小, 即大粒径的粒子保留时间短、小粒径的粒子保留时间长。当洗脱液带着粒子流经色谱柱时, 在水动力效应的作用下, 大粒径的粒子就会被排挤出靠近管壁的低流速区域进入高流速的中心区, 因此大粒径的粒子相对于小粒径的粒子就会更早流入检测器^[15], 这与传统的尺寸排阻色谱法 (size exclusion chromatography, SEC) 的洗脱顺序相似, 但在粒度分布的分析方面更优于 SEC。

粒子在 HDC 中的迁移速率主要取决于粒子尺寸

(粒子尺寸越大, 越先被洗脱出柱)、填料尺寸 (填料尺寸越小越均匀, 越有利于不同粒径粒子的分离与分析)、洗脱液离子强度 (降低离子强度, 粒子的相对迁移速率就会增加, 有利于不同粒径粒子的分离与分析), 与粒子自身的化学性质 (如极性、亲酯亲水性等)、形状^[17]、表面电荷以及表面活性剂的用量无关, 粒子的质量会影响粒子在填充柱 HDC 中的迁移速率。Small 等^[2]阐述了影响粒子迁移速率的 3 个重要因素: 水动力效应、离子效应以及范德华力。水动力效应的大小与粒子尺寸与填料尺寸的大小有关; 离子效应由洗脱液的离子强度决定, 它决定了前后两个粒子间的距离, 当离子强度很小时, 粒子就会脱离填料表面, 进入高流速区; 粒子自身的重量以及相邻两粒子间的距离会影响范德华力的大小。

准确性、稳定性和迁移速度是 HDC 最为重要的参数, 在测定粒子的相对大小以及区分粒径相差很小的粒子时, 测定的精密度更为重要。

2 HDC 分类

依据使用的色谱柱不同, 水动力色谱分为 3 种类型: 填充柱 HDC (packed column HDC)、毛细管 HDC (capillary HDC) 和微毛细管 HDC (microcapillary HDC)。填充柱 HDC 与另外两个类型的装置只在工作柱上有差异 (图 1)^[18]。

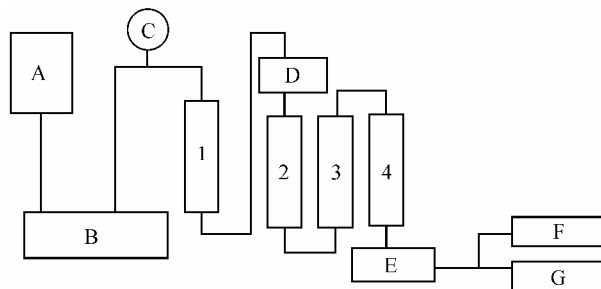


图 1 水动力色谱装置图。A: 淋洗液高位槽; B: 高压计量泵; C: 压力表; D: 进样器; E: 检测器; F, G: 记录仪和计算机; 1~4: 工作柱

2.1 填充柱 HDC 填料为玻璃微珠等不可渗透的无孔刚性球颗粒 (10~20 μm)。分离过程在填充床层的间隙中进行, 存在水动力效应和“tubular pinch” (管状收缩) 效应^[19, 20], 同时洗脱液与填料之间还存在静电作用以及胶体粒子和填料之间存在范德华力。由于作用力很多, 分离机制比较复杂, 因此尚无确定的公式来计算待测物的粒径, 需要绘制标准曲线。此标准曲线为通用型, 与待测物的化学组成无关但不可超出标准曲线的有效范围来推测粒子尺寸。

峰展宽是 HDC 色谱的常见现象, 在填充柱 HDC 中最明显。引起填充柱 HDC 峰展宽的主要因素有: ① 柱本身; ② 聚合物的多分散性; ③ 进样体积和检测体积; ④ 连接管。因此, 通常采用小体积吸收池的检测器并且连接管应尽量短, 使用分流进样器等方法来降低峰展宽。

粒子在柱中的迁移行为符合如下规律^[21]:

$$t = \frac{t_p}{t_m} = \frac{1}{1+2I-cl^2} \quad (1)$$

其中, τ 为 λ 的函数, 用来描述粒子在柱中的迁移情况。 t_p 为待测物迁移时间, t_m 为内标物迁移时间 (要求内标物粒径小于待测物), λ 为待测物有效半径 R_{eff} 与毛细管半径的比值, c 为常数 (1~5 之间)。

$$R_{\text{eff}} = \frac{\sqrt{p}}{2} R_g \quad (2)$$

$$R_g = aM_w^b \quad (3)$$

R_g 为回转半径 (在转动惯量不变的条件下, 设想构件的质量集中在某一点, 该点到转动轴线的距离), a 、 b 为常数, M_w 为待测物分子量。

在填充层中, 毛细管半径就相当于有效通道半径 R_c , 得如下关系:

$$R_c = \frac{d_p}{3} - \frac{e}{1-e} \quad (4)$$

ε 为孔孔隙率 (已装好柱的空隙体积与空柱体积比), d_p 为待测颗粒直径。

填充柱中塔板高度计算如下:

$$H = \frac{BD_m}{\langle v \rangle} + \frac{d}{\left(\frac{D_m}{\langle v \rangle d} + \frac{1}{1.4} \right)} \quad (5)$$

其中, 前一项为纵向扩散项, 后一项为对流混合项, 由于聚合物的扩散率低使得前一项小于后一项。在高流速时 $H \approx 1.4d$ 。其中, $\langle v \rangle$ 为线性溶剂速率, D_m 为分子扩散率, d 为填料直径, B 为常数 (1.2~1.4)。

2.2 毛细管 HDC 毛细管 HDC 的分离过程在内径大于 $10 \mu\text{m}$ 的毛细管中进行, 管径范围一般在 $14 \sim 500 \mu\text{m}$, 大于此范围也可行。分离是水动力效应和“管状收缩”效应^[22] (管状收缩效应指胶体溶液在管中流动时, 颗粒有离开管壁向中心运动的趋向) 联合作用的结果 (图 2)。可测定粒径小于 90 nm 的粒子, 但此时寻找合适的内标物比较困难。

在毛细管 HDC 中, 洗脱液的流速对洗脱能力的

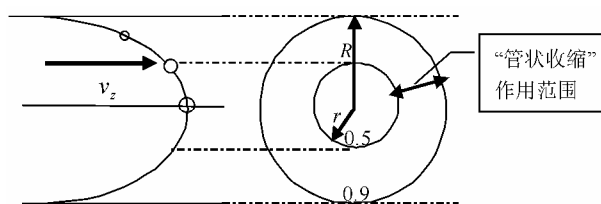


图 2 毛细管中“管状收缩”的作用范围

影响很大, 只有当流速达到一定值时才能为分离提供足够的动力, 否则难以进行分离。

粒子在上图中位置时的速率 (v_z) 与洗脱液速率相同, 这个速率可由下式得出:

$$v_z = \frac{(p_0 - p)R^2}{4hL} \left[1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right] \quad (6)$$

v_z 为洗脱液在图中位置时的速率, $(p_0 - p)$ 为柱的压力差, R 为毛细管半径, r 为径向距离, η 为洗脱液黏度, L 为柱长。

待测颗粒直径与其在毛细管中流速的关系如下:

$$\log d_p = 0.066 \ 9t + c = 0.066 \ 9 \frac{L}{v} + c \quad (7)$$

d_p 为待测颗粒直径, t 为洗脱时间。

结合上述 (6)、(7) 两式, 可以得出待测颗粒直径与径向所处位置的关系:

$$\frac{r}{R} = \left[1 - \frac{0.267hL^2}{(p_0 - p)R^2(9.64 - \log d_p)} \right]^{1/2} \quad (8)$$

由式 (8) 可推测, 小粒径的粒子处于 $0.6 \sim 0.7$ 毛细管半径的位置, 大粒径的粒子主要集中在靠近毛细管中轴的环中。

2.3 微毛细管 HDC 与毛细管 HDC 不同的是, 微毛细管 HDC 使用的毛细管内径小于 $10 \mu\text{m}$ 。因其内径小, 所以洗脱液经过微毛细管时为层流流动, 可确保只有水动力效应, 而使流型为典型的抛物面状。由于其分离原理简单, 可根据待测物的相对保留时间直接估算出颗粒直径^[18]:

$$t = (1+2I-cl^2)^{-1} \quad (9)$$

其中, c 为系数。刚性颗粒: $c = 4.89$, 大分子无规线团: $c = 2.69$ 。

3 应用

HDC 最早的填充柱为分离手段, 但由于填料的流动阻力大, 限制了具有非均匀流通式气孔的大分子填料的应用, 不利于提高分离效率。为解决这一问题, 对 HDC 的首次改造是用毛细管替换填充柱, 但由于毛细管的进样量有限, 对检测器的灵敏度要求高, 这就会提高检测成本。21 世纪初期, Blom 等设计

了熔融硅胶板的紫外检测芯片 HDC 系统, 消除了非均匀层流, 减小了检测器与分离管路中的死体积, 大大减小了峰展宽, 提高了分离效率^[23, 24]。各类型 HDC 具有不同的适用条件和不同的检测器 (检测原理与液相测定时相同), 如表 1 所示。

常用的光学检测器有: 紫外(UV)、蒸发光散射(ELSD)、示差折光检测器等。UV 是基于溶质分子吸收紫外光的原理设计的检测器, 符合朗伯-比尔定律, 只要有紫外吸收基团的化合物都可以在 UV 上产生响应, 与化合物状态 (颗粒或者分子) 关系不大; ELSD 的响应不依赖于样品的光学特性, 任何挥发性低于流动相的样品均能被检测, 不受其官能团的影响, 仅与通过检测器样品的质量有关; 示差折光检测器是根据不同物质具有不同折射率来进行组分检测的。凡是具有与流动相折射率不同的组分, 均可以使用这种检测器。综上所述, 光学检测器无论是测定分子还是颗粒时, 原理是相同的, 只是使用毛细管 HDC 和微毛细管 HDC 测定时, 经过检测器的样品量少, 就要使用高灵敏度的检测器。

3.1 填充柱 HDC 目前, 填充柱 HDC 主要用于分散颗粒的分离, 对较大粒径粒子的分离效果好。Molina 等^[25]和 Cebamanos 等^[5]利用改进的填充柱 HDC 对脂质体进行分离。Hoagland 等^[26]详细讨论了利用填充柱 HDC 对聚合物大分子在流动中所处状态及分离聚糖和分子量水溶性聚丙烯酰胺 (PAM) 聚合物的实验结果。

Williams 等^[27]在 Polymer Laboratories' Particle Size Distribution Analyser (PL-PSDA) 仪器中应用填充柱 HDC, 扩大了原有仪器的测定粒径范围, 缩短了测定时间。重复测定 6 次已知粒径的聚苯乙烯乳液, 测定结果与真实值相比, 显示出 HDC 的高准确度、精密度和良好的重现性 (测定数据的正负偏差为 0.1%)。与其他测定粒径的方法相同, 使用 HDC 测定时, 样品也要完全分散在溶液中, 但与其他测定粒径的方法相比, HDC 更适合于测定极性、粒度相差较大的颗粒。

Yegin 等^[15]使用以水为基础的流动相, 流速为

1.70 mL·min⁻¹, 对粒径在 20~100 nm 的脂质纳米囊进行分离分析。所得结果与光子相关光谱 (photon correlation spectroscopy, PCS)、AFM 进行比较, 其中 AFM 结果为非线性, 不适合粒子粒径的准确测定, PCS 与 HDC 结果相近, 但 HDC 可检测出在制备脂质纳米囊过程中产生的胶团, 而 PCS 不能测到。此实验进一步证实了 HDC 更适合分散性微粒的粒径测定这一观点。

Dias 等^[28]利用 5 μm 和 19 μm 混合填料 (0.3 : 0.7, v/v) 的填充柱, 以蔗糖为内标物, 实现了低温条件下 (3 °C) 直链和支链淀粉的分离与分析。与以单一粒径 (5 μm) 为填料柱子的测定结果相比, 不但缩短了测定时间, 还提高了分辨率, 减小了压力降, 加快了冷却流动相的速度。这种使用未键合的商品化玻璃微珠为填料的方法降低了试验成本, 也为快速检测淀粉中直链与支链淀粉的含量提供了一种经济可行的方法。另外, 在检测器方面, 使用较低灵敏度的示差折光检测器就表明混合填料柱在样品分离方面的优越性。

Thompson 等^[6]以丙酮为流动相进行微米到纳米级的无孔 BEH (Bridged Ethyl Hybrid) 填料的分级和纯化。可将分级后的填料粒子粒径差异控制在 1 μm 之内, 突破了使用筛分法难以对纳米到微米范围粒子粒径分离的瓶颈, 且能够为色谱柱提供小且均匀的填料, 有助于推动色谱分析的发展。

3.2 毛细管 HDC 主要应用于乳胶、花粉、细菌孢子等的分离, 随着理论研究的深入和技术的完善, 在 高分子聚合物的分离和表征上有很广阔的应用前景。

Elie 和 Renaud 曾成功地利用管径为 1.5 mm 的毛细管分离了纸纤维悬浮液中的纤维颗粒, 但因其淋洗量小, 使得毛细管 HDC 的应用受到限制, 并未显示出明显的优越性^[20]。Noel 等^[22]以甲醇为流动相 (在流动相中加入乙二醇缓解峰拖尾的现象, 同时减少表面吸附), 用电子显微镜对粒径进行监测, 使用 60.96 m × 0.96 mm 的毛细管柱对 1 μm 和 10 μm 的混合胶体粒子进行分离, 发现在分离 10 μm 粒子时增加流速使谱带扩散减弱, 在分离更小粒径的粒子时结果相反, 并且洗脱液黏度对小粒子的分离影响较大,

表 1 各种类型 HDC 的适用条件

HDC 类型	测定粒径范围	检测器	应用范围	实用性
填充柱	19 - 100 nm (超出此范围也可)	紫外检测器、示差折光检测器、蒸发光散射检测器等	分散颗粒、较大粒子粒径的分离	较为广泛
毛细管柱	14 - 500 μm (超出此范围也可)	灵敏度高的紫外检测器、电位法、激光光散射法等	乳胶、花粉、细菌孢子等分离	很少应用
微毛细管柱	1.4 - 2.7 μm (超出此范围也可)	倒置显微镜法等	聚合物、胶体颗粒的分级与分离	极少应用

对大粒子几乎无影响, 因此推测毛细管 HDC 在分离小粒子和大粒子时的原理不同, 此结果为毛细管 HDC 的后续研究提供了重要的理论指导。

3.3 微毛细管 HDC 最近, Beeck 等^[16]利用分离管道的微毛细管阵列柱 HDC (2.5 cm 长, 2 mm 宽, 12 μm 深) 分离并分析了 100、200 和 500 nm 的聚苯乙烯粒子, 实验得到的数据与前人的分析结果有高度的重合性, 并且大大降低了塔板高度 ($h = 0.3 \text{ mm}$)。尽管作者提出了此实验的不足 (与理论计算值相比柱子过短、流动相流速过低等), 但仍可看出微毛细管阵列柱在 HDC 上有很好的应用前景。

虽然微毛细管 HDC 的分离效果高于填充柱 HDC 和毛细管柱 HDC 两种方法, 但由于进样量过小或目前所拥有检测器的灵敏度难以达到要求等原因, 有关其应用的研究还不多见。

3.4 其他 Peyrin 等^[29]利用 HDC、以磷酸钠缓冲液 ($0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) -EDTA ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.8) -乙腈 (80 : 20) 为流动相及紫外检测器, 对 DNA 片段的迁移进行了研究。

随着检测手段的发展以及科研的不断深入, 人们已经不满足于仅仅准确知道待测样品的粒径和粒径分布, 因此, 采用多种检测器联用来描述微粒的特征, 可给出有关粒子的更多信息, 为进一步研究粒子的功能以及在质量控制方面提供依据, 也标志着在微粒特征表征方面进入了一个新阶段。Brewer 等^[7, 30]将 HDC 与准弹性光散射检测器 (QELS)、静态光多角度散射检测器 (MALS)、微分黏度检测器 (VISC) 和微分屈光检测器 (DRI) 等 4 种检测器联用, 来描述类球状纳米药泡的特征, 并给出了 InovaSphere™ 的粒子尺寸、形状、粒度分散, 同时还测定出黏度半径、水动力半径、回转半径以及粒子的摩尔质量。Agnès 等^[31]利用非对流场的流动分离技术, 与 MALLS、QELS 及示差折光检测器联用和 HDC-SEC (HPSEC) 与 MALLS、QELS 及 DRI 联用, 分别对天然淀粉进行分离及特征参数的测定。

4 展望

HDC 用于粒子粒径及其分布的测量时, 检测时间短, 并且可以给出准确的数据, 与不同的检测器在线联用还可给出粒子的形状、摩尔质量、黏度半径等其他表征方面的数值。微粒制剂以其专有的特点得到广泛关注, 制剂方法与技术不断革新, 微粒制剂得到很好的发展, 原有检测粒子粒径的方法已不能满足在生产过程中实时监控微粒粒径及其表征, 尤其是对小于 $1 \mu\text{m}$ 的粒子进行测定时, HDC 的优越性就变

得更加明显。HDC 从上世纪 70 年代发展至今, 无论是从理论还是软件分析上都得到了一定的完善, 从最初用 PeakSimple 2000 的记录仪和积分器等来记录洗脱下来粒子的保留时间和峰面积, 再将这两个参数代入公式计算粒径, 目前用 McGowan & Langhorst, Wyatt's ASTRA 软件, Wyatt's ASTRA 技术公司等软件可直接给出粒径及粒子的其他相关表征参数, 相信在不久的将来, HDC 会得到更多药剂学界的关注, 实现高通量、在线、准确、快速的药物微粒制剂粒径特征评价。

水动力色谱相对于其他测量颗粒粒径的方法来说操作更简单、测定速度更快、结果更准确, 但是 HDC 的分离机制尚不完善, 有待进一步研究。加强其定量性也是 HDC 的发展方向之一。另外, 在对于聚合物大分子由于其构型易改变, 分离过程中易吸附、断裂等原因应用尚不广泛。可以尝试与其他分析、分离方法联用以扩展 HDC 的应用范围, 加强 HDC 在制剂学中的应用。

References

- [1] Small H. Hydrodynamic chromatography: a technique for size analysis of colloidal particles [J]. *J Colloid Interface Sci*, 1974, 48: 147-161.
- [2] Small H, Saunders FL, Solc J. Hydrodynamic chromatography a new approach to particle size analysis [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 1976, 6: 237-266.
- [3] Mori S, Porter RS, Johnson JF. Gel permeation chromatography: on the mechanism of separation by flow [J]. *Anal Chem*, 1974, 46: 1599-1602.
- [4] Hoagland DA, Larson KA, Prud'homme RK, et al. *Modern Methods of Particle Size Analysis* [M]. New York: Wiley Press, 1984: 775.
- [5] Cebaemanos F, Vila AO, Dieguez P, et al. Modified hydrodynamic chromatography and its applications to liposomes [J]. *J High Resolut Chromatogr*, 1990, 13: 583-584.
- [6] Thompson JW, Lieberman RA, Jorgenson JW. Hydrodynamic chromatography for the size classification of micron and sub-micron sized packing materials [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 7732-7738.
- [7] Brewer AK, Striegel AM. Characterizing a spheroidal nanocage drug delivery vesicle using multi-detector hydrodynamic chromatography [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 399: 1507-1514.
- [8] Li WH, He Y. Research progress of microparticles as drug delivery system for traditional Chinese medicine [J]. *China J*

- Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 371–374.
- [9] Zhang HL. The research progress of Chinese medicine particles dosing system [J]. J Shangdong Educ Inst (山东教育学院学报), 2006, 21: 136–137.
- [10] Zhang CM, Li YL. The research progress of particles dosing system [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志), 2010, 19: 2463–2466.
- [11] Liu TG, Zhang F, Meng Z. Review on nanoparticle size distribution measurement methods and their recent developments [J]. Opt Tech (光学技术), 2005, 31: 96–100.
- [12] Gu CX, Li QZ, Li L, et al. Comparison study on several methods of measuring the diameter of nano-particles [J]. J Mach Des (机械设计), 2008, 25: 12–14.
- [13] Zou WB, Xu MZ, Wang C, et al. Measurement of particles size distribution of lactose by laser light scattering method [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27: 1420–1423.
- [14] Teng F, Ning GL, Tian ZJ, et al. Measurement of size distribution of ultrafine particles by laser light scattering method [J]. Chin J Light Scatt (光散射学报), 2004, 16: 172–176.
- [15] Yegin BA, Lemprecht A. Lipid nanocapsule size analysis by hydrodynamic chromatography and photon correlation spectroscopy [J]. Int J Pharm, 2006, 320: 165–170.
- [16] Op de Beeck J, De Malsche W, Vangelooven J, et al. Hydrodynamic chromatography of polystyrene microparticles in micropillar array columns [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217: 6077–6084.
- [17] Brewer AK, Striegel AM. Characterizing the size, shape, and compactness of a polydisperse prolate ellipsoidal particle via quadruple-detector hydrodynamic chromatography [J]. Analyst, 2011, 136: 515–519.
- [18] Liu DH, Cao TY. Hydrodynamic chromatography and its applications in polymer chemistry [J]. Polymer Bull (高分子通报), 1999, 2: 45–51.
- [19] Tijssen R, Bos J, Emile Van Kreveld M. Hydrodynamic chromatography of macromolecules in open microcapillary tubes [J]. Anal Chem, 1986, 58: 3036–3044.
- [20] Adlard ER. Chromatography in the Petroleum Industry [M]. New York: Elsevier Press, 1995: 95–126.
- [21] Venema E, Kraak JC, Poppe H, et al. Packed-column hydrodynamic chromatography using 1- μm non-porous silica particles [J]. J Chromatogr A, 1996, 740: 159–167.
- [22] Noel RJ, Gooding KM, Regnier FE. Capillary hydrodynamic chromatography [J]. J Chromatogr, 1978, 166: 373–382.
- [23] Blom MT, Chmela E, Gardeniers JGE, et al. Design and fabrication of a hydrodynamic chromatography chip [J]. Sens Actuators B, 2002, 82: 111–116.
- [24] Li JJ, Liu P, Geng XD. Hydrodynamic chromatography and slalom chromatography and their applications [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2009, 37: 1082–1087.
- [25] Molina Lucas FJ, Vila Buso AO, Dieguez Bosch P, et al. Hydrodynamic chromatography for characterization and purification of liposomes [J]. J High Resolut Chromatogr, 1989, 12: 560–561.
- [26] Hoagland DA, Prud'homme RK. Hydrodynamic chromatography as a probe of polymer dynamics during flow through porous media [J]. Macromolecules, 1989, 22: 775–781.
- [27] Williams A, Varela E, Meehan E, et al. Characterization of nanoparticulate systems by hydrodynamic chromatography [J]. Int J Pharm, 2002, 242: 295–299.
- [28] Dias RP, Fernandes CS, Mota M, et al. Starch analysis using hydrodynamic chromatography with a mixed-bed particle column carbohydrate polymers [J]. Carbohydr Polym, 2008, 74: 852–857.
- [29] Peyrin E, Caron C, Garrel C, et al. DNA migration regimes in hydrodynamic chromatography and slalom chromatography: evidence for a transition [J]. Talanta, 2001, 55: 291–296.
- [30] Brewer AK, Striegel AM. Hydrodynamic chromatography of latex blends [J]. J Sep Sci, 2010, 33: 1–9.
- [31] Agnès RS, Sophie G, Benoît J, et al. Molecular size and mass distributions of native starches using complementary separation methods: asymmetrical flow field flow fractionation (A4F) and hydrodynamic and size exclusion chromatography (HDC-SEC) [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 399: 1493–1505.