

高效液相色谱整体柱技术的进展

鲍笑岭 许 旭*

(中国科学院上海有机化学研究所, 分析测试中心, 金属有机化学国家重点实验室, 上海 200032)

摘 要 高效液相色谱整体柱 (又名连续床) 具有制备相对简单、原料易得以及聚合组分在一定范围内可调节的优点, 是近年来得到迅速发展的新型色谱柱。本文综述了目前高效液相色谱 (HPLC) 制备整体柱的典型高聚物体系、制备各种整体柱时反应条件的影响, 并简要介绍了它的表征方法和应用。

关键词 整体柱, 聚合物, 高效液相色谱, 评述

1 引 言

近年来, 高效液相色谱整体柱作为一种新型色谱柱迅速发展起来。已有数家公司推出了商品化的整体柱, 例如无机硅骨架的整体柱 Silica RODTM[1]、Prep RODsTM[2] 和 ChromolithTM[3], 有机聚合物整体柱 CMTM[4,5]。有关这一新技术的综述也有多篇[6~15], 但其中讨论毛细管电色谱整体柱的较多。

整体柱 (monolithic column) 又称整体固定相 (monolithic stationary phase)、棒柱 (rod)、连续床 (continuous bed) 等[15], 是在柱管内原位聚合或固定化了的连续整体多孔结构, 可根据需要对整体材料的表面作相应的衍生化, 是一种新型的用于分离分析或作为反应器的多孔介质。通过控制聚合条件来得到具有理想孔径分布的整体柱。整体柱中的空间由聚合物颗粒中的孔和颗粒间的缝隙组成, 分离在样品流经孔结构时发生。可以减少路径的差异和纵向扩展[16]。虽然早在 1967 年 Kubin 等[17]尝试用聚 2 羟乙基甲基丙烯酸酯凝胶制备分离蛋白质的低压排阻色谱柱, 但实用性的整体柱是 1989 年 Hj  ten 首次报道的聚丙烯酰胺整体柱[18]。整体柱的优点包括[7,8]: 可以原位制备, 省去制备填料和装柱, 也可以同法制成聚合物颗粒后再装柱[19]; 聚合物易于制备, 柱子的长度和直径在一定程度上不受限制; 聚合反应混合物中的单体可以灵活选择以得到合适的基质和性质; 易于在柱衍生化, 以得到具有合适性质的色谱柱; 通过控制聚合反应的条件可以优化孔的性状。目前制备的整体柱分为无机和有机两大类: 前者主要是将硅氧化物直接烧结在柱内或者用溶胶-凝胶法在柱中反应得到, 后者则是有机聚合单体在柱管内原位聚合得到的。用作整体柱分离介质的多孔高聚物必须考虑其表面的化学性质、对溶剂和溶质的保留、孔隙率、孔径分布和硬度这几方面的要求。整体柱可以用作高效液相色谱柱和毛细管电色谱柱, 本文主要讨论高效液相色谱整体柱的制备。而制备方法差异比较大的分子印迹整体柱详见文献[9]。

2 整体柱材料

2.1 无机整体柱

液相色谱中传统的填充柱常用硅胶作为填充基体材料, 锆、钛、铝的氧化物目前还不太常用[20]。近十几年发展起来的无机整体柱通常利用有机硅, 如四甲氧基硅烷和四乙氧基硅烷, 在醋酸水溶液中水解, 随后在制孔剂 (如聚乙二醇) 存在下制得具有孔洞结构的整体硅胶柱。它比传统的填充柱有更大的孔和更好的渗透性, 可以在较高的流速下保持较低的压力。

Minakuchi 等[21]首先将溶胶-凝胶法应用于硅胶整体柱的制备, 其步骤是: 四甲氧基硅烷的水解 (有酸水解和碱水解两种); 水解的硅四面体结合, 形成 Si-O-Si 键; 高温老化 (一般不小于 600 °C), 使聚合反应完全、骨架坚硬。利用溶胶-凝胶法制备硅整体柱的难点是整体材料在聚合过程中会收缩[10]。因此, 在模具中先制得的整体硅胶柱要截成适当长度装到聚四氟乙烯的柱管中。为了保证柱子准直, 通常内径小于 10 mm, 柱长不超过 15 cm。聚四氟乙烯包裹的柱子可以耐受高达 120 kg/cm² 的压力。整

2004-10-05 收稿; 2005-02-12 接受

体材料在模具中聚合时,因为同时存在整个网状结构收缩,得到流通孔径/骨架尺寸比为 1.2~1.5,而填充柱中该值为 0.25~0.4。

整体硅胶材料和有机整体材料一样,可通过化学修饰或改变原料(使用不同性质的聚合单体)获得不同用途的整体柱。整体硅胶基质表面的硅羟基是化学修饰的靶点。Minakuchi等^[21]用十八烷基二甲基-(*N,N*-二乙基胺基)硅烷与硅羟基反应得到用于反相高效液相的 C_{18} 整体硅柱。McCalley^[22]比较了传统的填充柱与 Merck 公司反相整体硅胶柱分离中性和碱性化合物的情况。实验显示,高流速分离中性样品时,整体柱的理论塔板高度小于 $5\text{ }\mu\text{m}$ 填料填充的色谱柱;酸性条件室温下高流速分离弱碱性和强碱性样品时,板高仍低于填充柱,但拖尾明显;整体柱在流动相 pH 为 7 时,分离强碱性样品的峰形更差。柱温升高会提高溶质在流动相中的扩散系数(D_m)而提高柱效。Massolin等^[23]采用 Merck 公司的整体硅胶氨基柱,以 *N,N*-二琥珀酰亚胺碳酸酯为连接臂,制备了青霉素 G 酰基转移酶的酶反应器,并用它研究了 2 芳氧基脂肪酸甲酯及其类似物的在线酶催化不对称反应和分离。

2.2 有机聚合物整体柱

2.2.1 丙烯酰胺类的整体材料 聚丙烯酰胺体系是典型的水相聚合体系,也有在有机相聚合的报道^[24,25]。其特点是^[7]:单体易溶于水;有良好的生物兼容性,适合分离生物大分子;柱中的凝胶颗粒上没有孔来增加传质,但其直径小,表面粗糙,所以表面积大,结合位点多;凝胶颗粒间靠共价键结合,流动阻力小;可通过压紧柱子降低孔体积来提高分离效果;分离效果往往随流速的提高而提高,表明因 Eddy 扩散造成的区带展宽减小了。Hjert 等最先利用这一体系^[26,27]制备整体柱。制备聚丙烯酰胺整体柱时,交联剂的比例较高,还要加入硫酸铵以促使相分离,产生供流动相流过的流通孔。1994 年, Hjert 等^[28]对交联聚丙烯酰胺整体柱中流通孔的性质如何受聚合反应条件的影响进行了研究。以甲基丙烯酰胺为单体,哌嗪二丙烯酰胺为交联剂($T=15\%$, $C=55.9\%$),以硫酸铵作为致孔剂在磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中聚合。聚合引发剂为过硫酸铵(APS),加速剂为 *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺(TEMED)。实验显示:温度、缓冲液种类、引发剂和加速剂的浓度,以及致孔剂的浓度都会影响孔径的分布。研究发现,单体总浓度(T)高于 35% (m/V)时连续床(整体柱)就开始丧失其机械强度,并导致极高的流动阻力^[29]。通过降低引发剂和加速剂(如 APS 和 TEMED)的浓度来增加聚合物的链长,可以部分克服这个不足。增加硫酸铵的浓度可以进一步降低流动阻力,它在单体混合物中的作用是通过增加生成的聚合物链之间的疏水相互作用而在凝胶基质中形成流通孔。水相聚合的聚丙烯酰胺质地软,且孔径分布范围较大。高流速的冲洗可以将柱子压紧(柱的最终长度大约只有原来的 $1/10\sim 1/15$ ^[25]),部分提高机械强度,并减小孔径分布从而提高柱效。聚合物溶液中加入丙烯酸可以得到阳离子交换色谱柱^[18];加入 *N*-烯丙基二甲基胺可以得到阴离子交换柱,35 mm 长的阴离子交换柱可以在 10 min 内分离 5 种蛋白质,并且分离效果不受流速的影响。细内径阴离子交换柱(70 mm $\times$ 0.3 mm)在 30 min 内能完全分离肌红蛋白、核糖核酸酶 A、卵白蛋白、 α -糜蛋白酶原 A、R 藻红蛋白 5 种蛋白质;加入丙烯酸丁酯则可得到疏水相互作用色谱(HIC)柱^[30]。Fréchet 等^[24,25]将单体(丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺)溶解于二甲亚砜和醇的混合物中,无须压柱即可一步制得坚硬的整体材料。当然,水溶性的 APS 必须以油溶性的自由基引发剂偶氮二异丁腈(ABN)代替。作者将丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺(Bis)于 50 溶于 DMSO 与醇的混合物中。除氧后加入 ABN。在 60 水浴中反应 24 h,聚合产物干燥后利用压汞法测定孔径。实验证明孔径在 1000 nm 左右可以得到合适的流速,同时柱压较低。控制合适的聚合条件,如交联剂及致孔剂的比例、致孔剂的组成、反应速度(由反应温度和引发剂的浓度决定),可以得到理想的孔径。实验中选用对丙烯酰胺和 Bis 都有良好溶解能力的二甲亚砜作为致孔剂之一。致孔剂的另一个组分则要求有长烷基链来促进相分离。致孔剂的组成和各成分的比例决定了单体可能的浓度和相分离的时间。致孔剂中,用聚丙三醇时得到大于 1200 nm 的孔,其中 Bis 的比例为 30% 时得到最大的孔径。Xie 等^[30]用甲基丙烯酸丁酯部分代替丙烯酰胺制得 HIC 柱。改变甲基丙烯酸丁酯在聚合混合物比例(为 5%~15%)的实验显示,只增加甲基丙烯酸丁酯的含量会使孔径降低。例如,当十二醇为二元致孔剂组分之一,丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺整体材料的平均孔径为 550 nm,用甲基丙烯酸丁酯完全取代丙烯酰胺后,平均孔径只有 48 nm。因此,要用更长链的脂肪醇替代十二醇,方可得到合适的流通孔。一旦改变单体

的组成或比例,就要对致孔剂做出相应的调整。作者用含 10 %甲基丙烯酸丁酯柱子分离了 5 种蛋白质。

2.2.2 甲基丙烯酸酯类的整体材料 聚甲基丙烯酸酯类整体柱的特点因酯部分的变化而不相同。若酯部分是烷基,疏水程度可由甲基丙烯酸酯的比例和烷基链的长度来调整。酯部分含有环氧基团的整体柱易于衍生化^[31]。例如,以甲基丙烯酸缩水甘油酯为单体的聚合物可容易地引入离子基团而制备离子交换色谱柱,并且衍生化试剂的选择范围也可大大扩展。目前,有关这一体系的报道主要涉及利用氨基化合物(如乙二胺^[32,33]、肽^[34],甚至是蛋白质^[35])与环氧基团反应,以及酸性条件下环氧开环成为二醇^[33]等。聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯-亚乙基二甲基丙烯酸酯)体系研究最早是 Svec 等^[32]报道的,该体系的典型制备方法是:单体(甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)-亚甲基二甲基丙烯酸酯(EDMA) = 60/40 (V/V))与致孔剂(环己醇-十二醇 = 90/10 (V/V))以 40/60 (V/V)混合后,加入引发剂 ABN,通氮除氧后注入不锈钢柱,在 55 °C 聚合 12 h。反应完成后,将柱子接到 HPLC 泵上,在 45 °C 用 THF 将聚合物中的残余试剂洗出。利用聚合物中的环氧基团,采用两种衍生化方式:(1)泵入 0.5 mol/mL H₂SO₄,水浴 60 °C 反应 3 h,这样得到含二醇官能团的多孔聚合物;(2)注入 2 mL 二乙胺,加热反应,得到含 1-(N,N-二乙基胺)-2-羟基丙基官能团的离子交换色谱柱可分离蛋白。在胺化制备的 3 根柱中,柱 1 于 55 °C 下反应 3 h,聚合物的氮含量最高(1.26 mmol/g);柱 2 于 55 °C 下反应 1 h,氮含量是 0.67 mmol/g;柱 3 在 20 °C 下反应 5.5 h 氮含量只有 0.27 mmol/g。柱官能团含量高,保留时间长,要用更强的离子强度的流动相才能分开;柱 3 上的官能团过少,分离不好;柱 2 用离子强度相对较小的流动相就可以分离。

整体材料如果发生溶胀,不会影响材料的外观尺寸但会降低孔径,使柱压升高。Svec 等^[32]通过测定苯和聚苯乙烯的保留时间分别为 0.63 和 0.60 min 且峰形很锐,说明柱子中没有明显的分子排阻现象并且几乎不含小孔。利用所得的弱阴离子交换色谱柱可以分蛋白质^[33]、聚脱氧腺苷酸(12~18 个重复单位)和聚胸腺嘧啶核苷酸(12~24 个重复单位)^[36]。Hahn 等^[34]先用十肽与 GMA 反应,再将产物作为单体之一与甲基丙烯酸缩水甘油酯和亚乙基二甲基丙烯酸共聚,制得亲和色谱整体柱。

罗权舟等^[35]将蛋白质 A 用两种方式连到聚合物上:(1)将制好的基质分别与己二胺、戊二醛反应,再与蛋白质 A 反应得到含有 11 个碳原子臂的蛋白 A 高效亲和色谱柱;(2)将制好的基质直接水解,再用新配的高碘酸钠氧化,最后与蛋白 A 作用制得不含臂的蛋白 A 高效亲和色谱柱。实验证明聚合物基质的疏水作用很弱,无臂柱子的非特异性吸附很低。连接臂有一定的非特异性吸附,在流动相中加入 15% 的乙醇后可以消除疏水作用的影响。合成的蛋白 A 高效亲和色谱柱的稳定性良好,使用半年后性能基本未发生改变。卫引茂等^[37]提高了 GMA/EDMA 的比值(75/25),用乙二胺打开环氧基团后再接上氯乙酸,得到弱阳离子交换柱。

2.2.3 聚苯乙烯类的整体材料 聚苯乙烯体系用于离子交换树脂的制备已经发展得相当成熟,优点是硬度高且性质稳定。聚(苯乙烯-二乙烯基苯)整体柱多用于分离蛋白质或核酸(单链和双链)^[38~40]。Fréchet 等^[41~43]用所制的聚苯乙烯整体柱还发展了在柱的沉淀-再溶色谱(“On-Column” Precipitation-Redissolution Chromatography),并分离了苯乙烯的寡聚物和高聚物。

制备聚苯乙烯整体柱的方法是^[43]:单体(苯乙烯-二乙烯基苯 = 50/50)致孔剂(癸醇) = 40/60, ABN (1%)加入到混合物中,通氮气除氧后,将混合物注入不锈钢柱子,聚合反应在 70 °C 下反应 24 h。然后,除去塞子,将柱子接到 HPLC 泵上,多孔聚合物中的制孔剂和可溶性物质被 THF 洗出。他们使用了苯乙烯基乙酸酐(styrene acetic anhydride)替代苯乙烯:将二乙烯基苯、苯乙烯基乙酸酐、新型引发剂 2,2,5-trimethyl-3-(1-phenylethoxy)-4-phenyl-3-azahexane、致孔剂(高级脂肪醇和甲苯的混合物)混合均匀并脱气,灌入柱后油浴下聚合。反应结束后立即用冰水浴冷却,用 THF 冲 24 h 后于 60 °C 真空干燥。他们还讨论了反应动力学、孔性状和制孔剂的影响^[45]。Fréchet 等^[42,46]通过实验比较了聚苯乙烯整体柱与聚苯乙烯填充柱。在分离结果相当的情况下,整体柱的柱压低,流速-柱压的线性范围约为填充柱的 10 倍;提高流速,整体柱的分离效果不会变差。

与无机整体材料相比,有机整体材料可以一步制得,但聚合过程中整体材料存在纵向收缩,即在柱头或柱尾产生空隙。这个问题可以通过向聚合混合物中加入已聚合好的微粒,或进行二次聚合来解决^[47,48]。在使用过程中,有机整体材料可能会随着流动相的改换而发生可逆的溶胀和收缩,从而改变

柱压;聚合温度提高、反应时间延长以及减少制孔剂的用量都可以提高聚合物的机械强度。使用短而粗的柱子也可以减少压力的负面影响;无机材料整体柱的制备较为烦琐,周期较长。聚合过程中整体材料是横向收缩,通常在模具里制成后再装到管套中。与有机相整体柱相比,整体硅胶柱的物理、化学性质稳定,在使用过程中流动相的选择范围广,硅骨架的硬度高,不会出现使用过程中柱子被压缩的现象。

3 整体材料的性质评价及性状控制

3.1 评价整体柱的参数

评价整体材料的参数主要包括^[8]:孔径分布、比表面积和孔隙率。多孔整体材料中孔径分布可以用压汞法测定,或由扫描电镜观察到。尽管这两种方法是在材料干燥后测定的,与柱子实际运行的状态不同,但是柱子“干”时和“湿”时的孔径存在着严格的对应关系^[8]。通过逆体积排阻色谱(ISEC)可以测定整体柱于溶胀状态下的孔径分布^[49]。但是,ISEC的有效应用范围受制于标准样品的尺寸,因为即使是数百万分子量的样品也无法测定 100 nm 以上的孔。比表面积可以用氮气吸附-解吸法来测定^[8],也是测定柱子“干”时的状态。化学结构可用红外光谱法测定,尤其是在合成好的基质上接上衍生化基团后,可以方便地观察到特征峰的变化^[46, 47]。可以用元素分析来测定衍生化基团的含量^[33, 34]。如果采用先将单体衍生化再进行聚合反应的方法,可用 NMR 来分析官能团的变化。

3.2 孔径的控制

Fréchet等^[48]认为多孔聚合物的形成过程与致孔剂、单体和生成的聚合物三者的极性有关:致孔剂与单体的极性接近,才能作为单体的良溶剂。致孔剂极性与聚合物极性的差异越大,相分离越早出现,则聚合物孔径越小。但相分离出现得过早,孔径也小。孔径的大小由聚合反应混合物中交联剂和致孔剂的比例、组成以及由反应温度和引发剂种类和浓度决定的反应速度等聚合反应的条件决定。由于改变混合物中交联剂的比例会改变聚合物的化学组成,增加致孔剂的比例会增加孔体积并降低硬度,结果只有致孔剂的组成和反应速度(受温度、引发剂种类和浓度的影响)常被用来调整孔径。使用致孔剂通常要遵循以下的原则^[48]:(1)致孔剂体系要能在低于或等于聚合反应温度下完全溶解单体混合物;(2)致孔剂对于单体和柱子而言是惰性的,并易除去;(3)致孔剂的比例应使聚合反应产生合适的相分离。

3.3 整体柱的骨架结构对其色谱行为的影响

在不影响骨架的前提下,整体柱中孔径的大小可以控制,这使整体柱的流动阻力和 Eddy 扩散比填充柱小很多。对于传统的填充柱,表观压力降与填料的孔结构可以用 Kozeny-Caman 方程式表示^[50]: $u_{sf} = (1/K_v a^2) (\Delta p / \eta L) \varepsilon$,其中 u_{sf} 为表观流速, K_v 为填料的形状因子, a 为填料的比表面积)联系起来。该等式在空隙度 (porosity) ε 为 0.4 左右 (填充柱的通常值) 与实际情况符合较好,而整体柱的 ε 可达 0.85,这时该方程就不能直接使用了。Liapis等^[51~53]根据整体柱的微观细节建立相应的网状模型,但未考虑到对表观流动阻力贡献显著的垂直于骨架的前沿流。Vervoot^[50]和 Gzil等^[54]利用相关软件提出四面体骨架模型,从而建立了表观的压力降与整体硅胶柱特定孔结构之间的关系。

3.4 整体材料表面的衍生化

液相色谱整体材料的衍生化主要为聚合后衍生,即单体先聚合成基质再接上特定的官能团。如聚丙烯酸缩水甘油酯类聚合物因为含有环氧基团就可以方便地用于衍生化^[34]。使用聚合后衍生方式,基质的化学结构不变,聚合反应条件不用重新摸索,但在柱衍生化条件不能过于剧烈。

4 整体柱的应用

Zou等^[9]在综述中详细讨论了整体柱的应用。生物大分子或聚合物的分离多见于有机聚合物骨架的 HPLC 整体柱,而小分子的分离一般见于硅骨架的 HPLC 整体柱和有机聚合物骨架的 CEC 整体柱。其原因可能是原位聚合得到的整体柱总会存在一定的孔径分布,以 HPLC 方式分离小分子时,扩散严重,柱效差。而用于 HPLC 的硅整体柱分离小分子的优势,原因可能与骨架硬度高和流速高有关。

(1) 离子交换色谱柱 聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯-亚乙基二甲基丙烯酸酯)整体柱用乙二胺衍生化得到阴离子交换色谱柱^[32, 33],分离溶菌酶、大豆胰蛋白酶抑制剂 (Soybean Trypsin Inhibitor) 和伴白蛋白

(Conalbumin)等蛋白质^[33],也可以分离聚脱氧腺苷酸(12~18个重复单位)和聚胸腺嘧啶核苷酸(12~24个重复单位)^[36]。卫引茂等^[37]将氯乙酸接到胺化好的柱子上得到弱阳离子交换柱,可用于分离5种标准蛋白。(2)亲和色谱柱 罗权舟等^[35]将蛋白质A连到聚合物上得到蛋白A高效亲和色谱柱分别分析了人IgG和BSA。Hahn等^[34]用一个十肽先与甲基丙烯酸缩水甘油酯反应,再与甲基丙烯酸缩水甘油酯和亚乙基二甲基丙烯酸共聚,制得亲和色谱整体柱用于溶菌酶的分析。(3)疏水相互作用色谱柱 Xie等^[30]用甲基丙烯酸丁酯部分代替丙烯酰胺制得的HC柱分离了5种蛋白质。(4)体积排阻色谱柱 聚丙烯酰胺整体柱多用做体积排阻色谱柱^[26,27],在30 min内能完全分离肌红蛋白、核糖核酸酶A、卵白蛋白、 α -糜蛋白酶原A、藻红蛋白五种蛋白质^[26],还可以分离多肽和DNA。(5)生物反应器 将酶固定在整体柱上,可以得到生物反应器。Massolin等^[23]利用Merck公司的整体硅胶氨基柱制备了青霉素G酰基转移酶的酶反应器,并利用它研究了一些2-芳基脂肪酸甲酯及其类似物的在线酶催化不对称反应和分离。(6)反相色谱柱 将 C_{18} ^[1]等疏水基团引入整体柱中,得到反相色谱柱。

5 结论及展望

整体柱原位聚合不仅省时省力,还意味着柱子不必受装柱技术和填料的限制。相对于填充柱,整体柱的空隙率较高,柱压低,使快速的分离分析和制备成为可能。HPLC有机相整体柱存在因流动相变化会发生溶胀或收缩、机械强度差、比表面积小、柱容量差以及聚合过程中产生的微孔不利于小分子样品的分析等问题,现有报道大都用于生物大分子的分离。HPLC硅骨架整体柱也存在必须预先聚合好再装入套管中,制备繁琐,比表面积较小的问题。对这些问题的研究将使整体柱得到新的发展。

References

- 1 Bidlingmaier B, Unger K K, Doehren N. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 832: 11~16
- 2 Schulte M, Lubda D, Delp A, Dingenen J. *J. High Resol. Chromatogr.*, **2000**, 23: 100~105
- 3 Spoof L, Meriluoto J. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 947: 237~245
- 4 Merhar M, Podgornik A, Banut M, Jaksa S, Strancar A. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **2001**, 24: 2429~2443
- 5 Pflegerl K, Podgornik A, Berger E, Jungbauer A. *Bioeng.*, **2002**, 79, 7: 733~740
- 6 Svec F, Fréchet J M J. *Science*, **1996**, 273: 205~211
- 7 Hjerten S, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1999**, 38: 1205~1214
- 8 Svec F. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 887: 3~29
- 9 Zou H F, Huang X D, Ye M L, Luo Q Z. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 954: 5~32
- 10 Tanaka N, Kobayashi H, Ishizuka N, Minakuchi T, Nakanishi K, Ikegami T. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 965: 35~49
- 11 Siouff A M. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000: 801~818
- 12 Zhang Minlian (张敏莲), Sun Yan (孙彦). *Ion Exchange and Adsorption (离子交换与吸附)*, **2000**, 16: 188~192
- 13 Ping Guichen (平贵臣), Yuan Xianglin (袁湘林), Zhang Weibing (张维冰), Zhang Yukui (张玉奎). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2001**, 29(12): 1464~1469
- 14 Ma Xiaodong (马小东), Yang Gengliang (杨更亮), Song Xiurong (宋秀荣), Sun Sufang (孙素芳), Liu Haiyan (刘海燕), Li Haiying (李海鹰). *Journal Hebei University (Natural Science Edition) (河北大学学报(自然科学版))*, **2002**, 22: 261~263
- 15 Yang Gengliang (杨更亮), Gao Wenhui (高文惠), Yang Jing (杨静). *Chinese Journal of Chromatography (色谱)*, **2003**, 21: 332~335
- 16 Svec F, Fréchet J M J. *Anal. Chem.*, **1992**, 64: 820~822
- 17 Kubin M, Spacek P, Chromacek R. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1967**, 32: 3881
- 18 Hjerten S, Liao J L, Zhang R. *J. Chromatogr.*, **1989**, 473: 273~275
- 19 Xu M, Peterson D S, Rohr T, Svec F, Fréchet J M J. *Anal. Chem.*, **2003**, 75: 1011~1021
- 20 Buchemeiser M R. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 918: 233~266
- 21 Minakuchi H, Nakanishi K, Soga N, Ishizuka N, Tanaka N. *Anal. Chem.*, **1996**, 68: 3498~3501
- 22 McCalley D V. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 965: 51~64

- 23 Massolini G, Calleri E, Lavecchia A, Loidice F, Lubda D, Temporini C, Fracchiolla G, Tortorella P, Novellino E, Caccialanza G *Anal Chem.*, **2003**, 75: 535 ~ 542
- 24 Xie S F, Svec F, Fréchet J M J. *J. Chromatogr A*, **1997**, 775: 65 ~ 72
- 25 Xie S F, Svec F, Fréchet J M J. *J. Polym. Sci A*, **1997**, 35: 1013 ~ 1021
- 26 Liao J L, Zhang R, Hjertén S. *J. Chromatogr.*, **1991**, 586: 21 ~ 26
- 27 Zeng C M, Liao J L, Nakazato K, Hjertén S. *J. Chromatogr A*, **1996**, 753: 227 ~ 234
- 28 Nakazato K, Mohammade J, Hjertén S. *Chromatographia*, **1994**, 39: 655 ~ 662
- 29 Ericson C, Liao J L, Nakazato K, Hjertén S. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 767: 33 ~ 41
- 30 Xie S F, Svec F, Fréchet J M J. *J. Chromatogr A*, **1997**, 775: 65 ~ 72
- 31 Erden I in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol 1A Katritzky A R, Rees C W, Scriven E F V. Ed Oxford (UK): Pergamon, **1996**: 105 ~ 117
- 32 Svec F, Fréchet J M J. *Anal Chem.*, **1992**, 64: 820 ~ 822
- 33 Svec F, Fréchet J M J. *J. Chromatogr A*, **1995**, 702: 89 ~ 93
- 34 Hahn R, Podgornik A, Merhar M, Schallaun E, Jungbauer A. *Anal Chem.*, **2001**, 73: 5126 ~ 5132
- 35 Luo Quanzhou (罗权舟), Zou Hanfa (邹汉法), Wang Hailin (汪海林), Mao Xiqin (毛希琴), Kong Liang (孔亮), Ni Jianyi (倪坚毅). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2001**, 29: 497 ~ 501
- 36 Sykora D, Svec F, Fréchet J M J. *J. Chromatogr A*, **1999**, 852: 297 ~ 304
- 37 Wei Yimao (卫引茂), Huang Xiaodong (黄晓东), Chen Qiang (陈强), Geng Xindu (耿信笃). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2000**, 28(10): 1194 ~ 1198
- 38 Oberacher H, Parson W, Muhlmann R. *Anal Chem.*, **2001**, 73: 5109 ~ 115
- 39 Premstaller A, Oberacher H, Huber C G. *Anal Chem.*, **2000**, 72: 4386 ~ 4393
- 40 Moore R E, Licklider L, Schumann D. *Anal Chem.*, **1998**, 70: 4879 ~ 4884
- 41 Petro M, Svec F, Gitsov I, Fréchet J M J. *Anal Chem.*, **1996**, 68(2): 315 ~ 321
- 42 Petro M, Svec F, Fréchet J M J. *J. Chromatogr A*, **1996**, 752: 59 ~ 66
- 43 Wang Q C, Svec F, Fréchet J M J. *Anal Chem.*, **1993**, 65: 2243 ~ 2248
- 44 Meyer U, Svec F, Fréchet J M J, Hawker C J, Irgum K. *Macromolecules*, **2000**, 33: 7769 ~ 7775
- 45 Viklund C, Nordström A, Irgum K, Svec F, Fréchet J M J. *Macromolecules*, **2001**, 34: 4361 ~ 4369
- 46 Xie S F, Allington R W, Svec F, Fréchet J M J. *J. Chromatogr A*, **1999**, 865: 169 ~ 174
- 47 Fréchet J M J, Svec F. *U. S. Patent*, 5334310, **1994**
- 48 Fréchet J, Svec F. *U. S. Patent*, 5728457, **1998**
- 49 Knox J H, Scott H P. *J. Chromatogr.*, **1984**, 316: 311 ~ 332
- 50 Vervoort N, Gzil P, Baron G V, Desmet G. *Anal Chem.*, **2003**, 75: 843 ~ 850
- 51 Meyers J J, Liapis A I. *J. Chromatogr A*, **1998**, 827: 197 ~ 213
- 52 Liapis A I, Meyers J J, Crosser O K. *J. Chromatogr A*, **1999**, 865: 13 ~ 25
- 53 Meyers J J, Liapis A I. *J. Chromatogr A*, **1999**, 852: 3 ~ 23
- 54 Gzil P, Baron G V, Desmet G. *J. Chromatogr A*, **2003**, 991: 169 ~ 188

Monolithic Columns for High Performance Liquid Chromatography

Bao Xiaoling, Xu Xu*

(Laboratory of Analytical Chemistry, State Key Laboratory of Organometallic Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract The monolithic stationary phase (continuous bed) has been developed quickly in high performance liquid chromatography (HPLC) and attracted considerable attention due to its simple preparation procedure, unique properties and excellent flexible. This review summarizes the main kinds of monoliths' preparation methods, experiment condition affects, their characteristics and applications.

Keywords Monolithic column, polymer, high performance liquid chromatography, review

(Received 5 October 2004; accepted 12 February 2005)