

聚(4-乙烯基苯硼酸-季戊四醇三丙烯酸酯)亲和整体柱的制备与应用

王超然 王彦 高也 马丹丹 谷雪 阎超*

(上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘 要 以 4-乙烯基苯硼酸为单体, 季戊四醇三丙烯酸酯为交联剂, 偶氮二异丁腈为引发剂, 乙二醇和二甘醇为致孔剂, 经原位聚合制备了聚(4-乙烯基苯硼酸-季戊四醇三丙烯酸酯)毛细管整体柱。以单体、交联剂、致孔剂和引发剂的用量为 4 种因素, 最大吸附量、柱效和保留时间为 3 个考察标准, 利用实验设计软件 (DOE) 优化了其合成条件, 验证了正交实验最优结果, 得到了整体柱合成的最佳配比为单体 7.32 mg, 交联剂 6 mg, 致孔剂 100 μ L, 引发剂 1 mg。在最佳条件下合成整体柱, 并进行表征, 在微径液相色谱 (μ HPLC) 和加压毛细管电色谱 (pCEC) 实验中考察了分离特性。结果表明, 整体柱固定相表面的硼酸基团在碱性条件下能特异性吸附邻苯二酚、腺苷等含有邻二羟基结构的化合物, 具有亲和色谱的特性; 同时由于交联剂的性质使其具有反相分离机理, 在含有 20% 有机相的条件下能够将极性不同的苯系物分开。

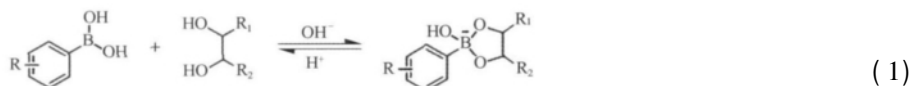
关键词 硼酸亲和色谱; 整体柱; 加压毛细管电色谱

1 引言

整体柱 (Monolithic column) 是由单体、交联剂、引发剂和致孔剂等混合, 通过原位制备而成的棒状整体。整体柱因具有渗透性好、制备简单、无需塞子制作等优点而备受关注^[1~3]。

硼酸亲和整体柱是利用硼酸基团的特异性反应进行分离分析的整体柱。自 1970 年 Weith 等^[4]利用硼酸亲和层析法成功分离了样品中的糖和核酸以来, 越来越多的研究针对硼酸与顺二羟基的特异性反应, 将其应用于分离核苷、核酸、糖类以及酶等物质^[5]。还有研究将硼酸亲和凝胶色谱与质谱等技术联用, 从而实现对糖蛋白等的有效分析^[6,7]。

2009 年 Ren 等^[8,9]首先报道了利用 4-乙烯基苯硼酸 (VPBA) 为单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯或 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂的两类整体柱。最近, 他们又采用另一种硼亲和整体毛细管柱^[10], 将单体改为 4-(3-丁烯基硼基) 苯硼酸 (BSPBA), 提高了整体柱的亲水性和中性条件下的结合能力, 并利用氢键作用初步实现同柱上的第二维分离。Lowe 等^[11]也报道过同柱上先进行反相色谱分析, 再进行硼酸亲和的二维分离研究。硼酸亲和色谱的主要工作机理是硼酸基团与邻二羟基的可逆结合反应如下式:



在水溶液中, 硼酸基团从原来的三键共面结构转变成带负电的四面体结构, 这种结构可以与两个共面的邻位羟基反应, 形成稳定的五元环络合物。在酸性条件下, 此酯化反应则会被还原, 使反应逆向进行, 酯化所形成的两个共价键被打破, 还原成硼酸基团和邻二羟基基团。另外, 该作用能够在有机溶剂中发生, 但是酯化率远小于在水溶液中反应^[12]。

本研究以 4-乙烯基苯硼酸 (VPBA) 为单体, 以季戊四醇三丙烯酸酯 (PETA) 为交联剂, 制备了新型聚 (VPBA-co-PETA) 亲和毛细管整体柱。通过实验设计软件 (DOE) 优化了其合成条件。并以微径液相色谱 (μ HPLC) 和加压毛细管电色谱 (pCEC) 为平台, 考察了其分离机理和保留行为, 发现此整体柱对含邻二羟基的化合物有特异性亲和作用, 同时具有反相的双重作用, 实现对腺苷和脱氧腺苷, 以及苯系物等样品的有效分离。

2011-11-16 收稿; 2012-02-13 接受

本文系国家自然科学基金项目 (Nos. 21175092, 21105064), 上海市科委科学仪器环境条件建设项目 (No. 09142200202), 国家重大科学仪器设备开发专项 (Nos. 2011YQ15007204, 2011YQ15007207, 2011YQ15007210) 资助

* E-mail: chaoyan@sjtu.edu.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

加压毛细管电色谱 TriSep™-2100 pCEC 系统(美国 Unimicro Technologies 公司),包括高压流动相输送系统、300 kV 双极式高压电源、紫外-可见可变波长检测器和数据采集分析系统;KQ2200B 型超声波清洗器(江苏昆山超声仪器有限公司);场发射电子扫描显微镜 FEI SIRION 200/INCA OXFORD 系统(美国 FEI 公司/英国 OXFORD 公司)。

甲醇和乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司); γ -甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅烷(γ -MAPS,纯度 97%)、4-乙烯基苯硼酸(VPBA,纯度 98%)、季戊四醇三丙烯酸酯(PETA)、腺苷(纯度 99%)和脱氧腺苷(纯度 99%)均购于英国 Alfa Aesa 公司;偶氮二异丁腈(AIBN)、乙二醇、二甘醇、对苯二酚(纯度 98%)、硫脲(纯度 99%)购于中国医药集团上海化学试剂有限公司;尿嘧啶(纯度 99%)和胸腺嘧啶(纯度 99%),购于美国 Sigma-Aldrich 有限公司;腺嘌呤(纯度为 98%,上海伯奥生物科技有限公司);邻苯二酚(纯度 99%)、 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 (纯度 99%) 购于中国医药集团化学试剂有限公司。

石英毛细管(100 μm i.d. 365 μm o.d. 河北永年锐沓色谱器件有限公司);0.22 μm 有机滤膜(上海半岛实业有限公司净化器材厂)。

2.2 硼酸亲和整体柱的制备

2.2.1 毛细管的预处理 毛细管依次用 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 冲洗 30 min,去离子水和甲醇各冲洗 10 min 氮气吹 4 h。将 γ -MAPS-甲醇(1:1, V/V) 混合溶液充入毛细管中,两端密封在 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中过夜,用甲醇冲洗,并用氮气吹 4 h。

2.2.2 硼酸亲和整体柱的制备 将一定比例的 PETA 和 VPBA 溶解于致孔剂中,致孔剂由二甘醇和乙二醇组成,再加入 1% 引发剂 AIBN,得到聚合反应混合液。将混合液超声 20 min,通氮气 10 min。将反应液注射到经过前处理的毛细管中,两端用橡胶密封,在 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 12 h。制好的整体柱用甲醇冲洗,除掉未反应试剂。在距毛细管柱进口端 25 cm 处烧出检测窗口,该整体柱有效柱长 25 cm,总长 45 cm。

2.3 样品溶液的制备

准确称取邻苯二酚、对苯二酚、硫脲、尿嘧啶、胸腺嘧啶和腺嘌呤各 0.1 g,用少量超纯水溶解并定容至 10 mL,经 0.22 μm 滤膜过滤,配制成为 10 g/L 的样品储备液。苯甲醇、苯、甲苯、乙苯和二甲苯,分别用甲醇稀释 1000 倍。所有样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存,实验前,用流动相稀释配制成所需浓度的溶液。

2.4 色谱分析条件

2.4.1 孔隙率的测定 所有实验均在室温下进行,以甲醇为流动相,死时间(t_0)由硫脲测得,孔隙率 ε_T 按公式(2)测定:

$$\varepsilon_T = (FT_R - V_{ex}) / \pi r^2 L \quad (2)$$

式中 F 为流速, t_R 为溶质的保留时间, V_{ex} 为柱外死体积, r 为毛细管半径, L 为毛细管长度。

2.4.2 亲和色谱分离条件 毛细管色谱柱长 45 cm(有效长度 25 cm)。上样流动相: ACN-0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(20:80, V/V, pH 8.5);洗脱流动相: ACN-0.1 mol/L 乙酸(20:80, V/V, pH 3.0)。泵流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$,分流比约为 500:1,分流前进样环体积为 5 μL ,实际进样量为 10 nL。分离邻苯二酚和对苯二酚时的检测波长为 214 nm,分离脱氧腺苷和腺苷的检测波长为 254 nm。

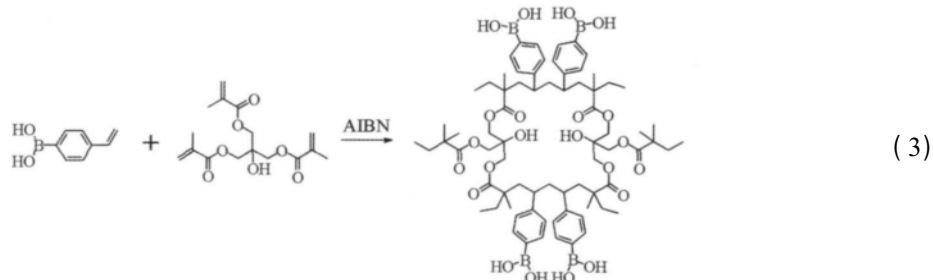
2.4.3 反相色谱分离条件 毛细管色谱柱长 45 cm(有效长度 25 cm)。泵流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$,分流比约为 500:1,分流前进样环体积为 5 μL ,实际进样量为 10 nL。运行电压 -5 kV,出口端(Outlet)连接负电极,进样端(Inlet)接地。样品采用硫脲作为电渗流标记物,流动相为 ACN-0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(20:80, V/V, pH 8.5)。尿嘧啶,胸腺嘧啶和腺嘌呤的检测波长为 214 nm;苯系物的检测波长为 254 nm。

3 结果与讨论

3.1 整体柱的制备

聚丙烯酸酯类整体柱常用的交联剂为乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA),本研究以季戊四醇三丙烯酸

酸酯(PETA)为交联剂,因为它的结构中含有3个乙烯基,能够增加整体柱的交联度。VPBA和PETA的聚合反应之前并无报道,其可能的聚合方程式如式(3)所示。在高温下,PETA上的乙烯基能与VPBA上的乙烯基发生加成反应,从而形成复杂的环状聚合物。这种环状聚合物的结构中含有暴露的硼酸基团,同时含有烷基和苯环,推测既具有亲和作用,又具有一定的疏水作用。



3.2 整体柱致孔剂的组成

考察了致孔剂中二甘醇和乙二醇的比例对整体柱结构的影响。由表1可见,适当比例的乙二醇有助于固定相成型;但随着乙二醇的体积比增大,整体柱性能逐渐降低,其大于50%会造成堵塞。这是由于乙二醇是反应物的不良溶剂,当其比例增大时,固体反应物的溶解性降低。二甘醇与乙二醇的体积比为8:2时,柱效和流速均较理想,且电渗流速较大,因此选为最佳致孔剂配比。

表1 致孔剂配比与整体柱柱效、流速及电渗流速的关系

Table 1 Effect of ratio of pore-foaming agent on the column efficiency, flow rate and electroosmosis flow (EOF)

V(二甘醇):V(乙二醇) V(Ethanediol): V(Diethylene glycol)	整体柱状态 Column status	柱效 Column efficiency (N/m)	孔隙率 Total porosity (ε_T)	流速 Flow rate (mm/s)	电渗流速 EOF rate (mm/s)
10:0	未成固定相 Stationary phase is not formed				
9:1	良好 Dissolved	40 584	0.8648	0.574	0.11
8:2	良好 Dissolved	23 031	0.8897	1.026	0.99
7:3	良好 Dissolved	15 412	0.5882	0.830	0.12
6:4	良好 Dissolved	16 864	0.7343	0.462	0.075
5:5	堵塞 Blocking				
4:6	堵塞 Blocking				
3:7	堵塞 Blocking				
2:8	堵塞 Blocking				
1:9	未溶解 Undissolved				
0:10	未溶解 Undissolved				

3.3 整体柱制备正交试验

3.3.1 正交试验设计及结果分析 本实验为了优化整体柱性能,运用实验设计软件(DOE)设计了正交试验,设置的4种因素分别为单体、交联剂、致孔剂和引发剂,并初步设定了其用量(表2)。根据设计量合成了8种整体柱,分别考察了这8种整体柱的柱效、保留时间以及最大吸附量。其中,最大吸附量用前沿色谱法测定:以乙腈(ACN)-10 mmol/L磷酸盐缓冲液(20:80, V/V, pH 8.5)为流动相,采用前沿色谱法^[13,14]测定邻苯二酚在合成整体柱上的穿透曲线(Breakthrough curve),并以此计算柱子的最大吸附量;柱效和保留时间的考察,以疏脉作为标准。每种柱子上测定得到的最大载量、柱效以及保留时间列于表2(序号1~8)。从表2可见,4种因素在一定范围内变化,会引起3个考察量不同程度的变化。

在合成的8种整体柱预实验结果的基础上,考虑到最大吸附量是亲和色谱中最重要的考察标准,将3个考察量的影响大小顺序依次设定为最大吸附量、柱效、保留时间。将表2中的数据输入软件后,自动分析计算各因素对考察值的影响。结果表明:(1)单体(A)对3个考察标准的影响均较为明显(第一列趋势线),随着单体(A)用量的增加,保留时间和柱效均减小,而最大吸附量增加。可能的原因是当单体用量增加,固定相上硼酸基团的数量增加,则整体柱的最大吸附量也随之明显增加。但随着单体比例

的增加,交联剂不足,可能导致聚合物交联度降低,即固定相结构较为松散,导致了柱效和保留时间的降低。(2)随着交联剂(B)用量增加,柱效和最大载量降低,保留时间基本不变。原因可能是随着交联剂比例增大,单体所占比例减小,硼酸基团数量减少从而使最大吸附量降低。致孔剂(C)对最大吸附量和柱效的影响不大,主要影响可从保留时间看出,随着致孔剂比例增加,固定相空隙增加,柱子通透性增加,从而保留时间变小。引发剂(D)对3个考察标准影响均不明显。(3)当同时考虑每个因素对3个标准的影响时,可得到综合趋势线。根据综合趋势,分析得出4种因素的最佳配比:单体(VPBA) 7.32 mg,交联剂(PETA) 6 mg,致孔剂(二甘醇-乙二醇,8:2,V/V) 100 μL ,引发剂(AIBN) 1 mg。

3.3.2 正交试验结果验证 根据上述得到的最优配比,制备整体柱9,见表2。与之前8组数据相比,柱9的柱效和最大吸附量都有明显提高,保留时间处于正常水平,通透性和重复性良好。因此,可以认为优化后的整体柱总体性能得到了较好的提升。

表2 正交试验设计及结果分析

Table 2 Design and Visual Analysis of the orthogonal experiments

序号 Test No.	因素 Factor				柱效 Column efficiency (N/m)	保留时间 Retention time (min)	最大吸附量 Break-through capacity (mol/m)
	A 单体 VPBA (mg)	B 交联剂 PETA (mg)	C 致孔剂 Porogenerator (μL)	D 引发剂 Trigger (mg)			
1	5.9	6	100	1	17870	4.399	2.22
2	5.9	6	150	3	1963	3.392	1.65
3	5.9	12	100	3	10018	4.14	2.41
4	5.9	12	150	1	2132	3.252	2.7
5	7.4	6	100	3	4556	3.048	3.32
6	7.4	6	150	1	9052	4.795	2.66
7	7.4	12	100	1	2756	2.545	1.88
8	7.4	12	150	3	2442	5.379	1.97
9*	7.3	6	100	1	18013	4.172	4.62

VPBA: 4-Vinylphenylboronic acid; PETA: Pentaerythritol triacrylate.

3.4 整体柱的表征

实验对最优配比下制备而成的整体柱进行了扫描电镜和红外光谱表征。IR 特征峰分布为: (KBr) 3385, 2931, 2878, 2361, 2329, 1735, 1610, 1437, 1414, 1341, 1218, 1127, 1060, 898, 821, 803 和 656 cm^{-1} , 其中硼酸的特征吸收为 1341 cm^{-1} , 证明固定相含有硼酸、苯环等官能团,符合推测的反应方程式。

图1所示为最优配比下制备而成的整体柱扫描电镜图。可见制备得到的聚(VPBA-co-PETA)整体柱固定相为具有一定刚性的高度交联的多孔结构,这种结构既保证了良好的通透性,又可以使溶质和固定相之间充分地相互作用。

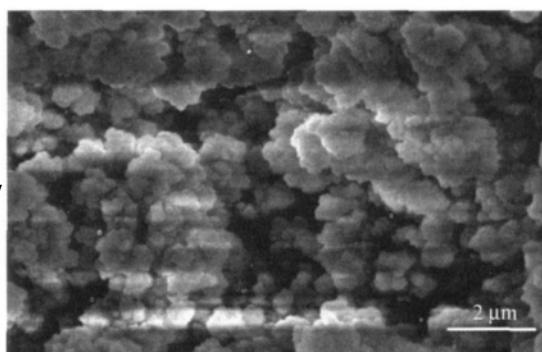


图1 整体柱内部结构扫描电镜图

Fig.1 Scanning electron micrographs of the inner part of a poly (VPBA-co-PETA) capillary monolithic column

3.5 整体柱分离机理的考察

3.5.1 亲和机理 在毛细管液相色谱实验中,选用邻苯二酚和对苯二酚为考察对象,证明本实验合成的整体柱具有亲和机理,如图2所示。在碱性条件($\text{pH}=8.5$)下,对苯二酚在柱内不保留而被冲出,邻苯二酚与硼酸基团酯化形成络合物,被吸附在固定相上;7 min时,更换酸性流动相($\text{pH}=3.0$),会出现一个尖锐的峰,为被还原洗脱的邻苯二酚。可见本方法对含有邻二羟基的化合物有特异性亲和作用。

3.5.2 反相机理 因为单体4-乙烯基苯硼酸具有苯环结构,聚合形成的固定相表面极性较弱,推测此整体柱具有反相分离机理。实验中为了考察整体柱的反相保留机理,选择了在流动相中都能够溶解的硫脲、胸腺嘧啶、腺嘌呤和茶碱作为分离对象,考察了有机相比例对其保留值的影响,死时间用硫脲标记。

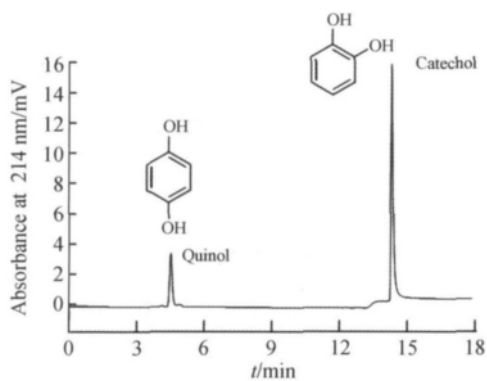


图 2 硼酸亲和整体柱分离对苯二酚和邻苯二酚

Fig. 2 Separation of quinol and catechol on the boronate affinity monolithic column

毛细管柱 (Capillary column): 100 μm i.d. 365 μm o.d., 长度 (Total length) 45 cm (有效长度 Effective length 25 cm); 流动相 (Mobile phase): ACN-0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) (20:80, V/V, pH 8.5); 7 min 后 (in 7 min), ACN-0.1 mol/L 乙酸 (HAc) (20:80, V/V, pH 3.0); 检测波长 (UV detection wavelength) 214 nm; 样品 (Samples): 0.1 g/L 对苯二酚 (Quinol), 0.1 g/L 邻苯二酚 (Catechol)。

由图 3 可见 随着乙腈浓度由 5% 递增至 20% ,各物质的容量因子 k' 均逐渐减小 ,容量因子对数值 ($\log k'$) 与流动相中乙腈浓度呈良好的线性关系 ($r>0.9922$)。因此 ,该整体柱表现出了典型的反相作用机理。

3.6 硼酸亲和整体柱的应用

3.6.1 应用反相 pCEC 分离苯系物 利用整体柱的反相分离机理 ,在 pCEC 上成功分离了多种苯系物 (图 4)。硫脲、苯甲醇、苯、甲苯、乙苯和二甲苯得到了较好的分离 ,且出峰顺序与极性大小成正比 ,即强极性的硫脲最先出峰 ,也证明合成的整体柱适用于反相分离模式。

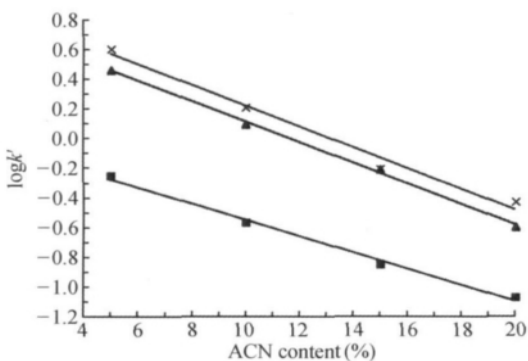


图 3 乙腈浓度与各物质容量因子对数值 $\log k'$ 的关系
Fig. 3 Plot of $\log k'$ of the analytes versus ACN concentration in the mobile phase

1. 硫脲 (Thiourea); 2. 胸腺嘧啶 (Thymine); 3. 腺嘌呤 (Adenine)。
其它条件同图 2 (The other conditions are the same as in Fig. 2)。

3.6.2 应用 μHPLC 分离腺苷类物质 图 5 是利用制备的聚 (VBPA-co-PETA) 整体柱分离生物分子的实例。腺苷 (Adenosine) 是一种核苷 ,其核糖部分含有邻二羟基结构 ,该结构脱氧之后即消失 ,所以脱氧腺苷 (Deoxyadenosine) 不含有邻二羟基结构。在碱性条件下 ,由于脱氧腺苷不能与硼酸发生特异性的结合 ,所以在 4 min 先出峰 ;而核苷由于具有邻二羟基结构 ,被合成的硼酸整体柱捕获 ;当流动相改为酸性时 ,核苷从柱子上洗脱下来。从图 5 可见 ,硼酸亲和整体柱能够有效分离这两种结构非常相近的生物分子 ,对腺苷有良好的特异性结合作用。

实验结果表明 ,合成的整体柱具有亲和与反相色谱双重分离机理 ,对含有顺二羟基的分子 ,如邻苯二酚、腺苷等有很好的亲和富集效果 ,并可利用其反相特性分离苯系物。

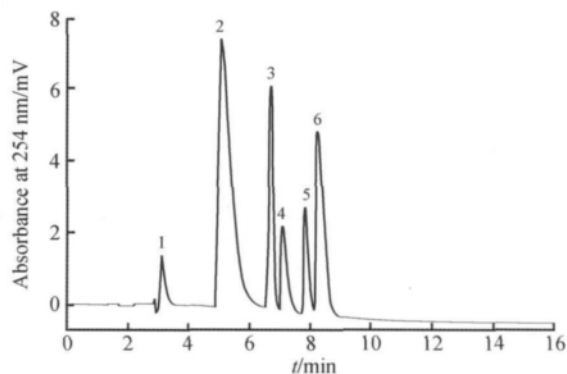


图 4 硼酸亲和整体柱分离烷基苯同系物

Fig. 4 Separation of alkyl benzenes homologous series on the boronate affinity monolithic column

实验条件同图 3 (The conditions are the same as in Fig. 3)。1. 硫脲 (Thiourea); 2. 苯甲醇 (Benzyl alcohol); 3. 苯 (Benzene); 4. 甲苯 (Toluene); 5. 乙苯 (Ethylbenzene); 6. 二甲苯 (Dimethylbenzene)。

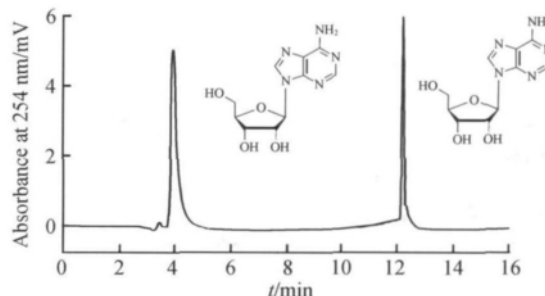


图 5 硼酸亲和整体柱分离脱氧腺苷与腺苷

Fig. 5 Separation of deoxyadenosine and adenosine on the boronate affinity monolithic column

实验条件同图 2 (The conditions are the same as in Fig. 3); 样品 (Samples): 0.1 g/L 脱氧腺苷 (Deoxyadenosine) 和 0.1 g/L 腺苷 (Adenosine)。

References

- 1 WANG Yuan-Chao, WU Qiong, JIN Ying-Zhi, LIU Jin-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(6): 828 ~ 832
王园朝, 吴琼, 金瑛芝, 刘金华. *分析化学*, **2010**, 38(6): 828 ~ 832
- 2 Lämmerhofer M, Peters E C, Yu C, Svec F, Fréchet J M J. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(19): 4614 ~ 4622
- 3 CHEN Na, ZHANG Yu-Ping, ZHANG YU-Jun, YE Xiong-Wen, QU Ling-Bo, YUAN Zhuo-Bin. *Chem. J. Chinese Universities*, **2008**, 29(10): 1969 ~ 1972
陈娜, 张裕平, 张毅军, 叶雄文, 屈凌波, 袁倬斌. *高等学校化学学报*, **2008**, 29(10): 1969 ~ 1972
- 4 Weith H L, Wiebers J L, Gilham P T. *Biochemistry*, **1970**, 9(22): 4396 ~ 4401
- 5 Ferrier R J. *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, **1978**, 35(31): 31 ~ 80
- 6 Zhang Q, Tang N, Schepmoes A A, Phillips L S, Smith R D, Metz T O. *J. Proteome Res.*, **2008**, 7(5): 2025 ~ 2032
- 7 Jmeian Y, Rassi Z E. *J. Proteome Res.*, **2007**, 6(3): 947 ~ 954
- 8 Ren L B, Liu Z, Dong M M. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(23): 4768 ~ 4774
- 9 Ren L B, Liu Y C, Dong M M, Liu Z. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(47): 8421 ~ 8425
- 10 Liu Y C, Ren L B, Liu Z. *Chem. Commun.*, **2011**, 47(17): 5067 ~ 5069
- 11 Lowe E A, Lu M, Wang A, Cortez H, Ellis D, Liu X C. *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29(7): 959 ~ 965
- 12 Ricardo A, Frye F, Carrigan M A, Tipton J D, Powell D H, Benner S A. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71(25): 9503 ~ 9505
- 13 Jacobson J M. *J. Chromatogr. A*, **1990**, 499(19): 5 ~ 19
- 14 BIAN Liu-Jiao, GENG Xin-Du. *Chinese Journal of Chromatography*, **1995**, 13(3): 174 ~ 177
边六交, 耿信笃. *色谱*, **1995**, 13(3): 174 ~ 177

Preparation, Characterization and Applications of Poly(4-vinylphenylboronic-co-pentaerythritol triacrylate) Affinity Monolithic Capillary Columns

WANG Chao-Ran, WANG Yan, GAO Ye, MA Dan-Dan, GU Xue, YAN Chao*
(Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract A boronate functionalized monolithic capillary column was synthesized, characterized and utilized in the mode of both affinity and reversed phase chromatography. The polymer was prepared using 4-vinylphenylboronic acid as the functional monomer, pentaerythritol triacrylate as crosslinker, azobisisobutyronitrile as trigger, ethanediol and diethylene glycol as porogenator. In order to optimize the properties, the orthogonal experiment was designed by the DOE software. The optimum preparation conditions were monomer (4-vinylphenyl-boronic acid (VPBA), 732 mg), cross-linking agent (pentaerythritol triacrylate (PETA), 6 mg), trigger (azobisisobutyronitrile (AIBN), 1 mg) and pore-foaming agent (diethylene glycol-ethanediol, 2:8, V/V). The column with the best proportion was characterized and applied in capillary high performance liquid chromatography (μ HPLC) and pressurized capillary electrochromatography (pCEC). The results suggested the column persisted affinity chromatography character because the boronate group located at the stationary phase could specifically absorb compounds containing cis-dihydroxy functionality at alkaline conditions; because of the properties of PETA, the column also persist RP separation mechanism and separate different benzene series in 20 percent organic phase.

Keywords Boronate affinity chromatography; Capillary monolithic column; Pressurized capillary electrochromatography

(Received 16 November 2011; accepted 13 February 2012)