

聚合物整体柱在生物大分子分离中的应用

白立改, 牛文敬, 杨更亮*

(河北大学药学院 河北省药物质量控制重点实验室, 河北 保定 071000)

摘要: 近年来, 高效液相色谱有机聚合物整体柱以其独有的优势在分离大分子物质中得到了广泛的应用和发展。本文结合本实验室的研究工作, 并参考有一定影响力的相关文献, 综述了近几年来有机聚合物整体柱的特征及其在生物大分子分离应用中的新进展。

关键词: 聚合物; 整体柱; 生物大分子; 高效液相色谱; 综述

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2013)04-0303-07

Applications of polymeric monoliths in separation of bio-macromolecules

BAI Ligai, NIU Wenjing, YANG Gengliang*

(College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University; Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, Baoding 071000, China)

Abstract: In recent years, the applications of high performance liquid chromatographic polymeric monoliths in the separation of macromolecules have been developed. In the review, the characters and new developments of bio-macromolecules separation by using the polymeric monoliths, combining with the works in our laboratory are summarized. Moreover, related influential reports are referred.

Key words: polymer; monolith; bio-macromolecules; high performance liquid chromatography (HPLC); review

用于 HPLC 的整体柱产生于 20 世纪 90 年代^[1-2], 在至今 20 多年的时间里, 整体柱以其独有的优势得到了迅速发展和广泛应用。按照基质组成, 整体柱一般可分为 3 类: 无机硅胶整体柱、有机聚合物整体柱以及有机-无机复合材料杂化整体柱。

目前无机硅胶整体柱用作反相固定相较多^[3-6]。虽然硅胶整体柱具有较为理想的孔结构, 对分离目标能实现高效快速分离, 但是也存在以下一些弊端: 制作周期长且过程复杂, 适用 pH 范围窄 (pH 2~8), 对蛋白质等大分子分离效果不好, 易产生不可逆吸附等。

有机聚合物整体柱具有单体多元化且易得、制备方法简单、易被修饰为不同模式色谱柱、通透性好、不受流动相 pH 值的影响等优点, 因此其在整体柱的制备和应用中备受青睐^[7-11]。由于聚合物整体柱通透性好、容易被修饰、生物相容性好等特点,

目前已经在生物大分子分离中得到了广泛应用^[12-19]。结合 Arrua 等^[20]在这一方面的综述, 本文综述了近几年聚合物整体柱的制备方法及其在分离大分子物质中的应用, 并指出不同聚合物整体柱制备方法的优势和局限性, 对聚合物整体柱的制备及其对大分子物质分离的新进展做一评述。

1 聚合物整体柱

聚合物整体柱一般以单体、交联剂、引发剂、致孔剂等在不锈钢色谱柱管中通过热或光引发制备而得^[7-11, 21]。聚合物整体柱具有大的通孔, 背压较低, 适宜流动相以高流速通过, 因此易实现快速分离。

1.1 单体

常用的聚合物整体柱单体有以下几种类型: 甲基丙烯酸酯类、丙烯酰胺类、苯乙烯类、乙烯基树脂类^[7-11]。这几种单体易得, 且容易被修饰为其他功

* 通讯联系人. Tel: (0312) 5971108, E-mail: ygl@hbu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(21175031); 科技部“重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划第二批课题(2012ZX09103-101-057); 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(11966411D)。

收稿日期: 2013-01-25

能化基团,从而实现色谱分离,因此在聚合物整体柱中较为常用。

1.2 聚合机理

根据不同的聚合机理,可以选择不同类型的单体。聚合物整体柱的制备多以热或光引发的原位自由基聚合方式为主,这种聚合方式聚合速度快,聚合物机械性能好。在液相色谱中用于原位自由基聚合方式的单体主要有甲基丙烯酸酯类、苯乙烯类、丙烯酰胺类和乙烯基树脂类。

由于原位自由基聚合的特点是慢引发、快增长,容易产生链转移和链终止,因此,活性可控自由基聚合方式在近几年被逐渐应用到整体柱的制备中来。活性可控自由基聚合方式主要有:阴离子活性聚合、阳离子活性聚合、自由基活性聚合及其他活性聚合体系。目前用于液相色谱整体柱制备的活性可控聚合方式主要是自由基活性聚合^[7-9, 21, 22],如原子转移自由基聚合(atom transfer radical polymerization, ATRP)、可逆-加成断裂链转移聚合(reversible addi-

tional fragment chain transfer, RAFT) 和反相原子转移自由基聚合(reverse atom transfer radical polymerization, R-ATRP) 等。

张荣月等^[23]通过 ATRP 方式,在室温下制备了聚(乙二醇二甲基丙烯酸酯)(poly(EDMA))整体柱。该聚合过程以 CuBr 为催化剂,以五甲基二烯三胺为引发剂,聚合得到了具有三维骨架结构的整体柱,并考察了致孔剂的类型以及聚合温度等对三维骨架结构形成的影响。又通过电子转移聚合(AGET ATRP)方式,在整体柱的表面接枝了甲基丙烯酸正丁酯,并对核糖核酸酶、细胞色素 c、肌红蛋白、卵白蛋白等 4 种标准蛋白质的混合物进行了成功分离。

1.3 结构特征

图 1 给出了聚合物整体柱的几种结构形态图。其中 a~d 为颗粒堆积结构的整体柱扫描电镜图,其孔径均在 1 μm 左右,适宜大分子通过,因此这些整体柱用来分离大分子蛋白质,并取得了理想的分离

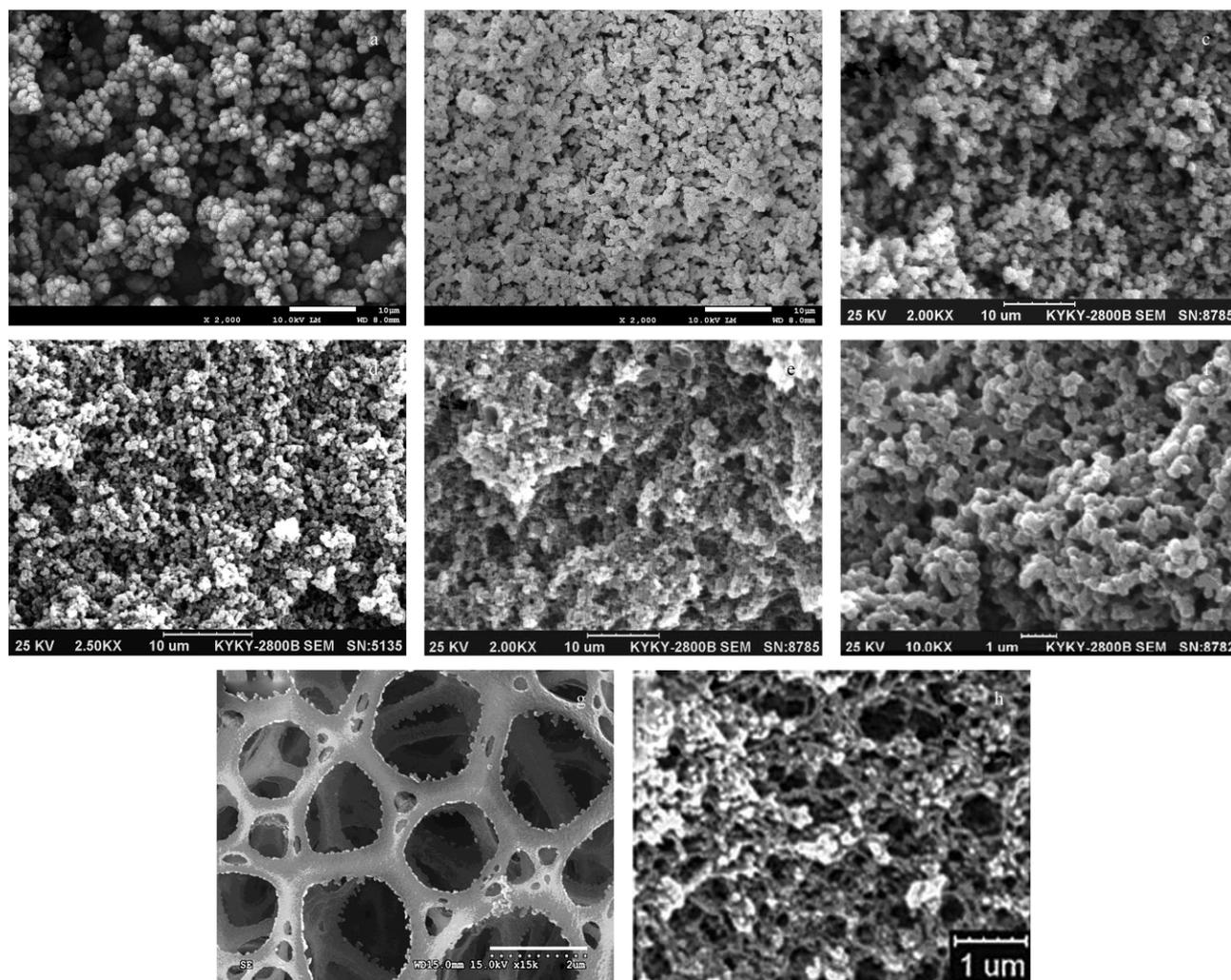


图 1 不同结构的聚合物整体柱的扫描电镜图^[7, 8, 11, 22, 24-26]

Fig. 1 Scanning electron microscopy images of polymeric monoliths with different structure^[7, 8, 11, 22, 24-26]

结果^[7, 8, 22, 24]。图 1e、f^[8, 11] 则为网络骨架结构的整体柱扫描电镜图, 其中图 1e 的孔径在 1 μm 左右。而图 1f 则具有较小的孔径(0.46 μm), 由于图 1f 中所示的孔径较小, 因此该整体柱也被成功用于小分子物质的分离。

图 1g^[25] 为完整的三维骨架结构, 骨架结构上的介孔清晰可见, 孔径在 100 ~ 1000 nm 范围内, 孔隙率高达 81.0%。该整体柱的比表面积高达 610 m^2/g , 而且具有良好的渗透率($6.1 \times 10^{-13} \text{m}^2$), 因此可以实现高通量快速分离。图 1h^[26] 是以金属-有机(Fe^{III}-BTC) 溶胶为模板的聚(GMA-co-EDMA) 整体柱的网络骨架结构。其孔径在 200 ~ 450 nm 范围内, 比表面积为 128 m^2/g , 因此, 较高的比表面积和适中的孔径容易实现蛋白质等大分子的高通量、快速分离。

由此可知, 聚合物整体柱的结构如孔径、比表面积、孔隙率等对于大分子物质的分离起着关键性的作用。孔径、孔隙率、比表面积这些参数一般采用压汞法和氮吸附法来表征^[18-25]。

1.4 修饰

为了进一步扩大聚合物整体柱的应用范围, 张荣月等^[21] 通过 ATRP 方法制备了 poly(EDMA) 整体柱, 并利用 ATRP 反应后整体柱表面的卤基接枝了甲基丙烯酸丁酯, 不仅对氢化可的松等 3 种小分子物质进行了分离, 还成功分离了核糖核酸酶 A、细胞色素 c、肌红蛋白、卵清蛋白等 4 种标准蛋白的混合物。

杨更亮等^[7] 制备了聚(乙烯基酯树脂-乙二醇二甲基丙烯酸酯) (poly(VC-co-EDMA)) 整体柱, 并在该整体柱上接枝了 γ -缩水甘油丙基三甲氧基硅烷偶联剂(KH560), 然后在亚硫酸氢钠的酸性水溶液中使硅烷偶联剂 KH560 所带的环氧基团水解, 同时将磺酸基团键合到整体柱表面。该整体柱对人血浆中的免疫球蛋白 G 和鸡卵清中的溶菌酶进行了成功分离, 此外, 还对木瓜酶、蜗牛酶和免疫球蛋白 G 的混合物进行了分离。

为了得到高柱效、高分辨率的整体柱, Lv 等^[27] 以热引发的原位自由基聚合方法制备了聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯-乙二醇二甲基丙烯酸酯) (poly(GMA-co-EDMA))。然后将整体柱表面的环氧基团水解, 以功能化金纳米粒子修饰, 从而增加聚合物的比表面积, 并将其作为反相色谱固定相对核糖核酸酶 A、细胞色素 c、肌红蛋白、卵清蛋白等 4 种蛋白质进行了成功分离。

Wu 等^[28] 通过热引发在毛细管柱中以 *N*-(2-

(甲基丙烯酰氧)乙基)二甲基十八烷基溴化铵为单体、以甲基丙烯酸取代的多面体低聚倍半硅氧烷 (polyhedral oligomeric silsesquioxane-methacryl substituted, POSS-MA) 为交联剂制备了毛细管柱。该柱分别用于毛细管电泳和微高效液相色谱系统对 5 种氨基酸的混合物和 7 种标准蛋白质的混合物进行了成功分离。此外, 还利用微高效液相色谱系统与质谱联用对牛血清白蛋白的胰蛋白酶水解液进行分离得到了 59 种特征氨基酸, 有望进一步对蛋白质组进行分离分析。

为了实现生物大分子的高通量、快速分析, 姚春荷等^[25] 以乳液聚合的方式通过嵌段聚合的方法制备了 poly(GMA-co-EDMA) 整体柱。通过调节表面活性剂 F127 的比例, 得到了完整的三维骨架结构, 对蛋白质混合物进行了成功的快速高通量分离。

Svec 小组^[29] 制备了 poly(GMA-co-EDMA) 整体柱, 并通过在其表面修饰具有可交换基团的金纳米粒子, 从而可以轻易地变化色谱模式, 对不同性质的物质进行成功分离。如将 poly(GMA-co-EDMA) 整体柱与巯乙胺溶液在一定条件下反应得到含有巯基的整体柱, 然后再将该巯基整体柱先后与含有金纳米粒子的 3-巯基丙酸、巯基乙醇和巯乙胺反应, 并先后得到含有羧基、羟基和氨基的整体柱。该整体柱在毛细管电泳模式下对肌红蛋白、核糖核酸 A 和细胞色素 c 的混合物进行了成功分离。金纳米粒子修饰的 poly(GMA-co-EDMA) 柱还可以再通过 2-巯基乙磺酸钠修饰, 以离子交换的色谱模式对肌红蛋白、核糖核酸 A 和细胞色素 c 的混合物进行成功分离。

2 应用

2.1 反相色谱模式

反相液相色谱柱是液相色谱中应用最广泛的一种, 这是因为其分离机理明确, 分离能力较强, 因此, 其在生物大分子的分离中也有一定的应用^[21, 30]。

Levkin 等^[31] 通过热引发的原位自由基聚合方法制备了聚(苯乙烯-二乙烯基苯) (poly(Sty-co-DVB)) 和聚(甲基丙烯酸十二烷基酯-乙二醇二甲基丙烯酸酯) (poly(LMA-co-EDMA)) 两种整体柱, 并分别用它们对核糖核酸酶 A、肌红蛋白、细胞色素 c、卵清蛋白等的混合物进行了分离, 均在短时间内达到了基线分离。

Eeltink 等^[32] 通过将商品液相毛细管整体柱 (poly(Sty-co-DVB)) 与飞行时间质谱联用, 在流动相中加入离子对试剂甲酸, 在 120 min 内分离了 48

种完整的混合标准蛋白质。

此外,反相色谱模式的聚合物整体柱在毛细管电泳中对蛋白质的分离也得到了一定的发展和应用^[33-35]。由于聚合物整体柱具有较好的通透性,因此毛细管柱的内径可低至 20 μm,具有更高的灵敏度和更低的进样量,从而利于毛细管电泳与质谱方法联用对蛋白质组中微量蛋白质进行分离分析。

2.2 离子交换色谱模式

生物大分子在不同 pH 值的环境中表现出不同的电荷特性:当 pH 值小于蛋白等电点 pI 时,蛋白质带正电荷,反之带负电荷。由于不同蛋白质具有不同等电点,所以离子交换模式的聚合物整体柱对蛋白质具有很好的选择性;此外,离子交换模式色谱的流动相较温和,不会破坏蛋白质的结构,因此离子交换聚合物整体柱在生物大分子分离中的应用较为广泛^[7-9,36-40]。

杨更亮等^[7,8,25,41]利用不同方法制备了多种类型的聚合物离子交换整体柱,并将其用作 HPLC 的固定相,对生物样品中的蛋白质进行了成功分离。图 2 为杨更亮等通过几种不同方法制备的强阳离子交换整体柱对蛋白质等大分子物质的色谱分离图。

图 2a~c 均为聚(乙烯基酯树脂)整体柱对实际样品的色谱分离图,虽然 3 种整体柱利用了相同

的单体乙烯基酯树脂,但通过不同方法制备得到的整体柱得到了不同的色谱分离能力,如:分离度和柱效均不尽相同。这是因为不同方法制备得到的整体柱具有不同的结构,而后修饰法还具有了特定的功能化基团。因此,制备方法的适用性对于生物大分子的分离也是一个较为关键的影响因素。图 2d 为通过乳液聚合方法得到的 poly(GMA-co-EDMA)嵌段聚合物整体柱对 4 种蛋白质(溶菌酶、卵白蛋白、牛血清白蛋白、胃蛋白酶)混合物的色谱分离图。由于该整体柱具有较高的比表面积和较高的孔隙率,因此易于实现高通量和快速分离。

此外,Chen 等^[42]以二[2-(甲基丙烯酰基氧基)乙基]磷酸为单体通过光引发原位自由基聚合制备了含有磷酸基团的毛细管整体柱,并以离子交换色谱模式对氨基酸和蛋白质进行了成功分离。等度洗脱条件下柱效分别达到 52 900 塔板/m(氨基酸)和 71 000 塔板/m(蛋白质)。

2.3 疏水色谱模式

疏水相互作用色谱法是利用样品中各组分与色谱填料上功能基团相互作用力的差异,在洗脱时移动速度的不同而达到分离的目的。功能基团通常是一些疏水性基团,如丁基、苯基等。疏水色谱在生物

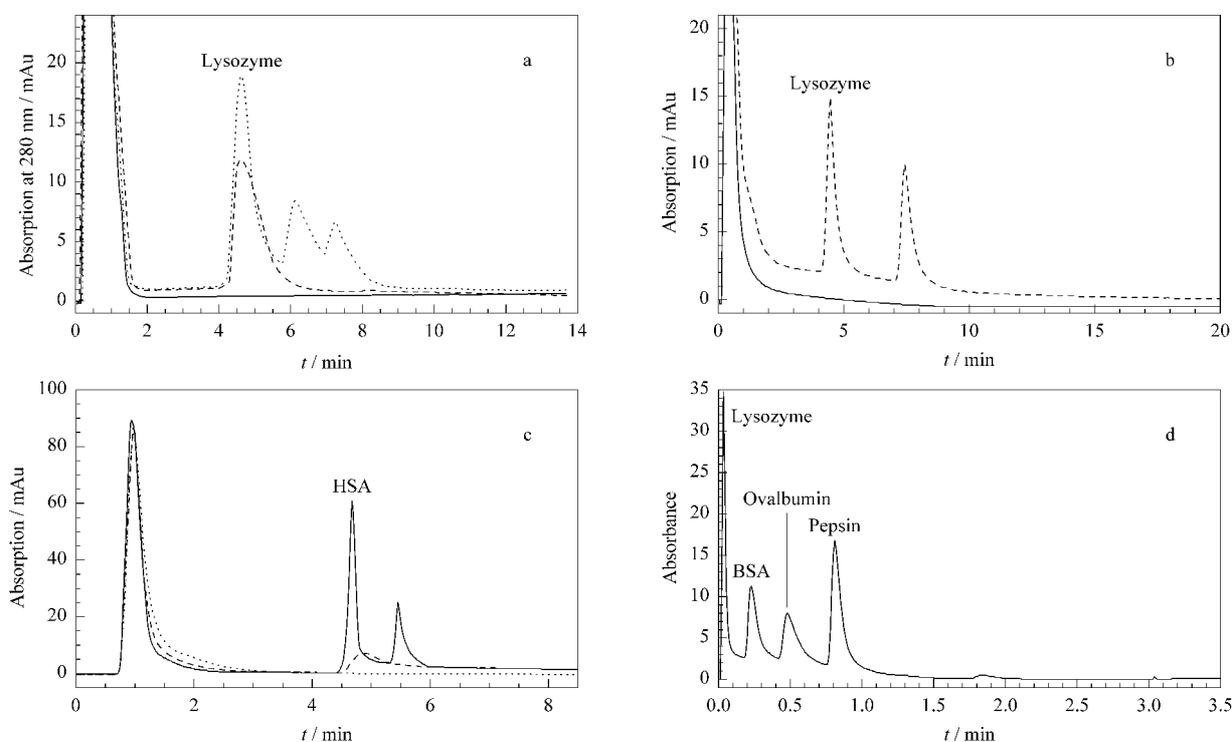


图 2 离子交换整体柱对生物样品的色谱分离图

Fig. 2 Chromatograms of samples by using the ion-exchange monoliths

a. separation of lysozyme from egg white by using the post-modified monolith^[7]; b. separation of lysozyme from egg white by using the monolith that prepared by the ATRP method^[8]; c. separation of human serum albumin (HSA) from human plasma by using the monolith that prepared by the “one-pot” in-situ radical polymerization^[41]; d. separation of the protein mixture of lysozyme, ovalbumin, BSA, and pepsin^[25].

大分子的分离分析中有着广泛的应用^[43, 44]。

Xin 等^[44]以 E-51 环氧树脂为基质, 通过表面原子转移自由基聚合方法将聚氮异丙基丙烯酰胺接枝于该环氧树脂上, 于 100 mm × 4.6 mm 的不锈钢柱管中制备得到了具有三维骨架结构的聚合物整体柱。并利用疏水作用, 在梯度洗脱条件下成功分离了 6 种蛋白质。

Li 等^[45]分别以乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)和聚乙二醇二甲基丙烯酸酯(PEGDMA)为单体通过紫外照射引发制备了具有不同链长的二醇基毛细管聚合物整体柱, 并分别将其用作液相色谱的固定相, 在梯度洗脱条件下以疏水色谱模式对细胞色素 *c*、肌红蛋白、核糖核酸酶 A、溶菌酶、糜蛋白酶、 α -糜蛋白酶原 A 等 6 种混合物进行了成功分离。且结果表明, 聚(PEGDA)柱比聚(PEGDMA)柱具有更高的柱容量和分辨率, 以及更好的峰形。

Sun 等^[46]通过一步原位“点击”修饰法, 制备了具有 C8 疏水基团的聚合物整体柱, 并通过该整体柱对 5 种混合蛋白质(核糖核酸酶 A、大豆胰蛋白酶抑制剂、细胞色素 *c*、牛血红蛋白、牛血清白蛋白)的分离表征了该聚合物整体柱的色谱性能。结果表明, 该 5 种混合蛋白质得到了成功分离。

Yin 等^[26]以金属-有机溶胶为模板, 制备了 poly(GMA-co-EDMA) 柱。金属-有机溶胶是通过将摩尔比为 2:3 的 1,3,5-苯三酸(H_3BTC)和 $M(NO)_3 \cdot xH_2O$ ($M = Fe^{III}, Co^{III}, x = 9, 6$) 在三乙胺为溶剂的条件下反应得到的。该整体柱的制备是通过将苯三酸金属($M-BTC$)溶胶、GMA、EDMA 以一定比例混合, 通过热引发聚合而得。制备完成后, 再通在线冲洗将 $M-BTC$ 模板除去。该整体柱的孔径约为 400 nm, 其渗透率为 $1.1 \times 10^{-13} m^2$ 。此外, 该整体柱上的环氧基团被转变为二醇基, 并以疏水作用色谱模式对牛血清白蛋白、细胞色素 *c*、核糖核酸酶、溶菌酶、 α -淀粉酶、胰岛素等几种蛋白质的混合物在 4 min 内进行了成功分离(见图 3)。

2.4 亲和色谱模式

生物分子能够区分结构和性质非常接近的其他分子, 选择性地与其中某一种分子相结合, 生物分子间的这种特异性相互作用称为亲和作用。亲和配基是对生物分子具有专一性识别或特定的相互作用的物质。亲和色谱正是利用这一特性对生物分子进行分离分析的。

亲和色谱是对生物样品进行分离的最重要手段, 而随着聚合物整体柱的发展, 其在亲和色谱模式下对生物大分子的分离分析也随之出现^[47]。

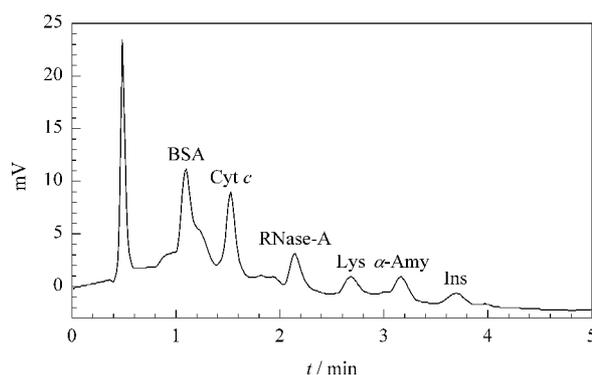


图 3 聚(GMA-co-EDMA)整体柱对 6 种混合蛋白质的色谱分离图^[26]

Fig. 3 Chromatogram of the separation of a mixture of six proteins by using poly(GMA-co-EDMA) monolith^[26]

Arrua 等^[48]利用不同致孔剂制备了聚(*N*-丙烯酰基三(羟甲基)氨基甲烷-甲基丙烯酸缩水甘油基酯-*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺)整体柱(poly(NAT-GMA-BIS))。结果表明以 PEG 6000 为致孔剂所得整体柱的通透性最好。将该整体柱与茶碱-乙烯双胺和环己二胺反应, 将氨基作为配基接入整体柱, 结果表明其对肝磷脂有很好的保留。

张玉奎课题组^[49]制备了硼亲和色谱柱。该实验过程是以 3-丙酰氨基苯硼酸(AAPBA)为单体, EDMA 为交联剂, 以金属-有机溶胶为致孔模板, 通过原位聚合制备得到了 poly(AAPBA-co-EDMA) 整体柱。该整体柱对含有顺式二元醇的生物分子具有特异捕获能力。并以阿糖腺苷为测试分析物, 以与阿糖腺苷结构类似的 2-去氧腺苷为对照物进行了分析测试。结果表明 2-去氧腺苷被很快洗脱, 而阿糖腺苷则由于硼的选择性捕获被整体柱所保留。

2.5 亲水色谱模式

亲水色谱模式的固定相是具有强亲水性的极性固定相, 极性聚合物整体柱可作为液相色谱的亲水性固定相^[50-52]。

刘海燕等^[51]以乙烯基酯树脂为单体, EDMA 为交联剂, 偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂, 十二醇为致孔剂, 经原位聚合法制备了 poly(VC-co-EDMA) 整体柱。用 γ -缩水甘油基氧丙基三甲氧基硅烷对整体柱进行衍生化处理, 整体柱上的环氧基团经 0.25 mol/L H_2SO_4 水解制成具有亲水性的二醇柱, 并分别对血浆和鸡卵黄中的免疫球蛋白进行了成功分离。

Chen 等^[52]通过原位自由基聚合方法制备了聚(甲基丙烯酸-乙二醇二甲基丙烯酸酯)(poly(MAA-co-EDMA))毛细管整体柱, 以亲水色谱模式与飞行

时间质谱技术联用,从牛血清白蛋白胰蛋白酶的消化液中分离得到了 49 个肽段,这个结果优于商品化的颗粒填充反相色谱柱。

2.6 分子印迹模式

分子印迹,是指制备对特定分子具有特异选择性的聚合物的过程。分子印迹技术真正发展起来源于 20 世纪 70 年代, Wulf 等^[53]制成分子印迹聚合物(molecule imprinting polymer, MIP)。聚合物整体柱在分子印迹色谱模式下除了在对小分子物质分离中有应用之外^[54]在蛋白质等大分子的分离分析中也有一定应用^[55-58]。

冯钰琦课题组^[56]制备了聚(二乙二醇二甲基丙烯酸酯-甲基丙烯酸)-培氟沙星安替比林甲胺甲烷分子印迹整体柱。该整体柱用来富集牛奶中的培氟沙星安替比林甲胺甲烷,由于其对培氟沙星安替比林甲胺甲烷具有独特的选择性,因此可以对牛奶中的培氟沙星安替比林甲胺甲烷进行更为简单准确的定量分析。

3 结语

生物样品具有复杂性,而且对操作环境和分析方法要求较高。不同色谱模式的液相色谱方法不仅对特定的生物大分子具有较好的选择性,且制备方法简单易得,结构可控。此外,聚合物单体的种类繁多,且其上面的官能团可以有多种修饰方法从而对不同的生物大分子具有不同的作用。因此,随着液相色谱固定相的发展,聚合物整体柱以其独有的优势也会在生物大分子的分离与分析中得到越来越广泛的应用。

参考文献:

[1] Hjerten S, Li M, Mohammed J, et al. *Nature*, 1992, 356: 810
 [2] Hjerten S, Liao J L, Zhang R. *J Chromatogr*, 1989, 473: 273
 [3] Cabrera K, Wleland G, Lubda D. *Trend Anal Chem*, 1998, 17: 50
 [4] Bidlingmaier B, Unger K K, Doehren N V. *J Chromatogr A*, 1999, 832: 11
 [5] Yang J J, Wang H, Zuo Y M. *Chemical Journal of Chinese Universities* (杨俊佼, 王晖, 左育民. 高等学校化学学报), 2002, 23: 835
 [6] Wang L J, Yang G L, Li X, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (王利娟, 杨更亮, 李煦, 等. 色谱), 2005, 23: 504
 [7] Yang G L, Bai L G, Yan C H, et al. *Talanta*, 2011, 85: 2666
 [8] Bai L G, Liu H Y, Liu Y K, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 100
 [9] Bai L G, Yang G L, Lei H, et al. *Anal Methods*, 2012, 4: 2948
 [10] Liu M Q, Liu H Y, Bai L G, et al. *J Mater Sci*, 2011, 46: 4820
 [11] Liu M Q, Liu H Y, Liu Y K, et al. *J Chromatogr A*, 2011,

1218: 286
 [12] Josic D, Buchacher A, Jungbauer A. *J Chromatogr B*, 2001, 752: 191
 [13] Ding M Y, Zheng R, Peng H. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37: 395
 [14] Sun X L, He X W, Chen L X. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399: 3407
 [15] Krajnc N L, Smrekar F, Strancar A, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 2413
 [16] Li Y, Gu B, Tolley H D, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 5525
 [17] Liu H Y, Li S H, Yang G L, et al. *Int J Polym Anal Ch*, 2010, 15: 129
 [18] Yang J, Yang G L, Liu H Y, et al. *J Appl Polym Sci*, 2011, 119: 412
 [19] Yang G L, Liu H Y, Bai L G, et al. *Micropor Mesopor Mat*, 2008, 112: 351
 [20] Arrua R D, Talebi M, Causon T J, et al. *Anal Chim Acta*, 2012, 738: 1
 [21] Zhang R Y, Yang G L, Xin P Y, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 2404
 [22] Bai L G, Yang G L, Lei H, et al. *Chinese Science Bulletin* (白立改, 杨更亮, 雷环, 等. 科学通报), 2012, 57: 2942
 [23] Zhang R Y, Qi L, Xin P Y, et al. *Polymer*, 2010, 51: 1703
 [24] Bai L G, Yang G L, Gu Y Z, et al. *Anal Lett*, 2012, 46: 87
 [25] Yao C H, Qi L, Jia H Y, et al. *J Mater Chem*, 2009, 19: 767
 [26] Yin J F, Yang G L, Wang H L, et al. *Chem Comm*, 2007, 43: 4614
 [27] Lv Y Q, Alejandro F M, Fréchet J M J, et al. *J Chromatogr A*, 2012, 1261: 121
 [28] Wu M H, Wu R A, Li R B, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 5447
 [29] Cao Q, Xu Y, Liu F, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 7416
 [30] Geiser L, Eelink S, Svec F, et al. *J Chromatogr A*, 2007, 1140: 140
 [31] Levkin P A, Eelink S, Stratton T R, et al. *J Chromatogr A*, 2008, 1200: 55
 [32] Eelink S, Wouters B, Desmet G, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 5504
 [33] Luo Q, Yue G, Valaskovic G A, et al. *Anal Chem*, 2007, 79: 6174
 [34] Yue G, Luo Q, Zhang J, et al. *Anal Chem*, 2007, 79: 938
 [35] Rogeberg M, Wilson S R, Greibrokk T, et al. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 2782
 [36] Krenkova J, Gargano A, Lacher N A, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 6824
 [37] Yang G L, Bai L G, Liu H Y, et al. *Chin J Chem*, 2008, 26: 2063
 [38] Gu B, Chen Z, Thulin C D, et al. *Anal Chem*, 2006, 78: 3509
 [39] Gu B, Li Y, Lee M L, et al. *Anal Chem*, 2007, 79: 5848
 [40] Chen X, Tolley H D, Lee M L. *J Sep Sci*, 2011, 34: 2063
 [41] Yang G L, Yan C H, Bai L G, et al. *Anal Methods*, 2012, 4: 1098
 [42] Chen X, Tolley H D, Lee M L. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 4322
 [43] Bechtle M, Butté A, Storti G, et al. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 4675
 [44] Xin P Y, Shen Y, Qi L, et al. *Talanta*, 2011, 85: 1180
 [45] Li Y Y, Tolley H D, Li M L. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 4934

- [46] Sun X L , Lin D , He X W , et al. *Talanta* , 2010 , 82: 404
- [47] Tetala K K R , van Beek T A. *J Sep Sci* , 2010 , 33: 422
- [48] Arrua R D , Moya C , Bernardi E , et al. *Europ Polym J* , 2010 , 46: 663
- [49] Yang F , Lin Z A , He X W , et al. *J Chromatogr A* , 2011 , 1218: 9194
- [50] Krenkova J , Lacher N A , Svec F , et al. *J Chromatogr A* , 2009 , 1216: 3252
- [51] Liu H Y , Yang G L , Bai L G , et al. *Chin J Anal Chem* , 2009 , 37: 325
- [52] Chen M L , Li L M , Yuan B F , et al. *J Chromatogr A* , 2012 , 1230: 54
- [53] Wulf G , Sarhan A , Zabrocki K. *Tetra Lett* , 1973 , 44: 4329
- [54] Yin J F , Cui Y , Yang G L , et al. *Chem Comm* , 2010 , 46: 7688
- [55] Zhang W P , Chen Z L. *Talanta* , 2013 , 103: 103
- [56] Zheng M M , Gong R , Zhao X , et al. *J Chromatogr A* , 2010 , 1217: 2075
- [57] Kryscio D R , Peppas N A. *Acta Biomater* , 2012 , 8: 461
- [58] Lu Y , Yan C L , Gao S Y. *Appl Surf Sci* , 2009 , 255: 6061