

引用格式:吴慈,梁玉,梁振,等. 整体材料的研制及其在蛋白质组色谱分离中的应用[J]. 轻 工学报,2016,31(4):1-14. **中图分类号:**0657.7 **文献标识码:**A **DOI**:10.3969/j.issn.2096-1553.2016.4.001 文章编号:2096-1553(2016)04-0001-14

整体材料的研制及其在蛋白质组 色谱分离中的应用

Preparation of monolithic materials and applications in proteomic chromatographic separation

吴慈,梁玉,梁振,张丽华,张玉奎 WU Ci,LIANG Yu,LIANG Zhen,ZHANG Li-hua,ZHANG Yu-kui

中国科学院分离分析化学重点实验室,国家色谱研究分析中心, 中国科学院大连化学物理研究所,辽宁 大连 116023 Key Laborary of Separation Sciences for Analytical Chemistry of Chinese Academy of Sciences, National Chromatographic Research and Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics of Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

关键词:

整体材料;制备方法; 色谱分离;蛋白质 组学

Key words: monolithic materials; preparation method; chromatographic separation; proteomics 摘要:整体材料由于具有制备简单、传质速度快、低背压、表面易于修饰等优势, 在色谱分离领域中应用非常广泛.为使业界了解国内外对整体材料研制的现 状,对有机聚合物整体材料、硅胶整体材料、有机 - 无机杂化整体材料三种整体 材料的制备方法及其在蛋白质组学中蛋白质和肽段色谱分离中的应用进行了 综述,指出:与填充柱相比,整体柱的分离柱效仍有待进一步提高,可以从整体 材料的性能,如比表面积、孔径分布、稳定性、亲水性等方面进行改进.利用整体 材料低背压的优势,可制备超长、超细内径毛细管整体柱,有利于微量蛋白质组 学样品的高效分离分析.随着对整体材料制备技术的不断深入研究,整体材料 也将在食品安全、生命科学、环境问题等众多领域发挥更重要的作用.

收稿日期:2016-04-13

基金项目:国家自然科学基金项目(21575139,21235005,21190043)

作者简介:吴慈(1988—),女,江西省萍乡市人,中国科学院大连化学物理研究所博士研究生,主要研究方向为整体材料 的制备及其在蛋白质组学中的应用.

张玉奎(1942—),男,河北省保定市人,中国科学院院士,中国科学院大连化学物理研究所研究员,博士生导师.蛋白质研 究重大科学研究计划专家组成员,国家自然科学基金委化学部咨询专家,中国分析测试协会副理事长,中国化学会色谱专业 委员会主任.主要从事色谱基本理论和新技术、新方法的研究,近几年主要开展蛋白质的高效分离与高灵敏检测,重点集中在 发展多维液相分离体系,包括多维液相色谱、多维毛细管电泳及其与质谱的联用,提出了构建蛋白质分离 - 在线酶解 - 多肽 分离 - 质谱鉴定的蛋白质分离鉴定平台的思路,发展了多种蛋白质原位微酶反应器,还发展了基于整体材料的固载金属亲和 色谱介质和基于毛细管电泳、电色谱技术的蛋白质选择性和通用性富集技术.

通信作者:张丽华(1973—),女,辽宁省大连市人,中国科学院大连化学物理研究所研究员,博士研究生导师,主要研究方 向为液相分离新材料和技术、高灵敏度检测和鉴定新方法、集成化高通量分析新平台及蛋白质组定性定量分析新方法. Abstract: With the advantages of facile preparation, fast mass transfer, low backpressure and easy modification, monolithic materials have been widely used in chromatographic separation. In order to familiarize professionals of home and abroad with the present situation of monolithic materials, this review mainly summarizes the preparation methods of different kinds of monolithic materials (including organic polymer monoliths, silicabased monoliths, organic-inorganic hybrid silica monoliths) and their applications in the separation of proteins or peptides in proteomics. It was pointed out that compared with packed column, monolithic packed column efficiency was to be further improved from the performance of monolithic materials, such as specific surface area, pore size distribution, stablity and hydrophilicity. Taking advantage of the low backpressure of monolithic materials, the capillary monolithic column with superlong and superfine inner diameter was prepared in order to make high efficient separation analysis of macro proteomics samples. With the further study of monolithic materials preparation technology, monolithic materials will play more important role in the fields of food safety, life science and environment.

0 引言

整体材料作为材料科学中的一个新概念, 由 S. Hjerten 等^[1]于 1989 年首先提出,指的是 一种具有双连续结构和双孔径分布的多孔材 料.整体材料具有传质速度快、反压小、易于功 能化修饰且原位合成等优势,在高效液相色谱 等领域应用非常广泛^[2].与填充柱相比,整体材 料因其反压小而易于实现样品的快速分离,并 且可通过制备超长、超细内径的毛细管整体柱, 特别适用于复杂样品的高效、高灵敏度分析.根 据其基质性质的不同,整体材料主要分为有机聚 合物整体材料、纯硅胶整体材料和有机 – 无机杂 化整体材料三大类^[3-4].本文将针对这三类整体 材料制备方法的研究进展进行系统的介绍,并综 述其在蛋白质组学蛋白质和肽段的色谱分离中 的应用.

1 整体材料的制备方法

1.1 有机聚合物整体材料的制备

有机聚合物整体材料作为一种最早发展起 来的整体材料,具有 pH 耐受范围宽、易于修 饰、功能多样等优点,其制备过程非常简单,只 需将有机单体、交联剂、引发剂和致孔剂组成的 聚合液混合均匀、脱气,然后吸入预先处理过的 毛细管中,在光照、γ-射线或者加热等条件下 引发聚合而成^[5-7],其孔径和通透性可以通过 调节致孔剂的配比来调整.有机聚合物整体材 料的主要缺点是比表面积小、孔径分布不均匀 等.传统的聚合物整体柱主要采用自由基聚合 法^[8-10]制备,而普通的自由基聚合反应过程中 自由基难以控制,形成的聚合物链分子量分布 比较宽,得到的聚合物整体材料孔径分布不均 匀,使分离柱的功效受到影响.近年来发展了一 些新的聚合方法,如活性可控自由基聚合法和 点击化学法^[11]等.

通过活性可控自由基聚合反应可得到分子 量分布域极窄的聚合物及预定结构和序列的嵌 段共聚物和接枝共聚物,这为制备孔结构可控 的有机聚合物整体材料提供了一定的方法^[12] (见图1).目前在聚合物整体材料制备中应用 最广泛的活性可控自由基聚合反应有三种:原 子转移自由基聚合(ATRP)、可逆加成-断 裂-转移自由基聚合(RAFT)、开环易位聚合 (ROMP). Z. Chen 等^[13]采用十二烷基甲基丙烯 酸酯(LMA)作功能单体、EDMA 作交联剂、含 磺酸基团的化合物 AMPS 提供电渗流,加入自 制的 RAFT 试剂 TTC1,制备了 C12 聚合物整体 柱.采用 RAFT 方法制备的聚合物整体材料的 孔径,比未加 RAFT 试剂的普通自由基聚合法 的制备物的孔径更小,且孔径分布更窄.作者还 将该材料成功用于反相电色谱分离,对萘的最

低理论塔板高度为 7.39 μm, 优于传统自由基 聚合法制备的 C12 整体柱. S. H. Lubbad 等^[14] 采用降冰烯片类单体 5-norborn-2-enemethyl bromide (NBE-CH₂Br)和 tris (5-norborn-2-enemethoxy) methylsilane ((NBE-CH₂O)₃SiCH₃)作反应 单体,在第一代 Grubbs'催化剂[RuCl₂(PCy₃)₂ (CHPh)]作用下进行 ROMP 反应, 成功制备了 阴离子交换整体柱,并应用于双链 DNA 片段的 分离. 此外, 他们还采用这两种单体在 300 μm 内径柱管中制备了整体柱,并衍生上强阴离子 交换基团,在 9 min 内实现了 7种 5 – 磷酸寡脱 氧胸苷酸片段的快速分离^[15]. 虽然该方法扩展 了有机整体柱的制备途径, 但其进一步的发展 和应用受到了单体种类有限和引发剂昂贵因而 不易获取等因素的制约.

基于"巯基"的点击化学反应由于反应效 率高且无需重金属催化,逐渐被应用于制备有 机聚合物整体柱.Z.Liu等^[16]利用两端带炔基 的1,7-octadiyne (ODY)与含多巯基的化合物 (1,6-hexanedithiol,2SH 或 pentaerythriol tetrakis (3-mercaptopropionate),4SH),分别采用二甘醇 二乙醚 DEGDE/四氢呋喃 THF 和 DEGDE/PEG 200 作致孔剂,通过光引发的"巯基 – 炔"点击 聚合反应制备了两种有机聚合物整体柱.所制 备有机整体柱在 CLC 分离中展现出了良好的 色谱分离能力,其对苯系物的最高分离柱效可 达 100 000 N/m. H. Lin 等^[17]利用含多环氧基 的 tetraphenylolethane glycidyl ether (TPEGE)与 含多巯基的化合物(2SH 或 4SH),在 DMSO/ PEG200/H₂O 三元致孔剂体系中,通过碱催化 热引发的"巯基 – 环氧"点击化学反应,制备了 大孔径分布均匀的反相聚合物整体柱,其对苯 系物的最高柱效可达 132 000 N/m,对复杂的 环境样品 EPA 610 亦具有较好的分离能力.

目前聚合物整体材料的制备方法较多且各 具特色,它们却有个共同的缺点,即所制备的整 体柱介孔和微孔含量很少甚至不含,比表面积 很小,导致其样品负载量小,大部分材料对小分 子的分离柱效低,限制了聚合物整体材料在样 品预处理(如富集)和色谱领域的进一步应用. 为了解决这些难题,目前主要发展了以下几种 策略.

一种策略是对有机整体柱进行超交联(Hypercrosslinking)^[18-19]:采用氯化铁催化下的傅-克烷基化反应,在1,2-二氯乙烷溶剂中对聚(甲基苯乙烯-co-氯甲基苯乙烯-co-DVB)预聚整体柱进行超交联化处理,使其比表面积从原来的32m²增加到了600m²,大



图1 传统自由基聚合法与活性可控自由基聚合法制备整体材料的比较

Fig. 1 Comparative illustrations of a) conventional free radical polymerization in a solvent leading to heterogeneous cross-linking and b) living radical polymerization leading to homogeneous cross-linking

大改善了小分子及肽段的分离效果,测得苯系物的柱效大于 80 000 N/m,细胞色素 c 酶解产物也在该柱上得到了较好的分离(序列覆盖率可达 93%)^[20].此外,这种超交联化处理不仅可以提高有机整体柱的比表面积(柱容量)和分离柱效,而且还可以为整体柱提供更多的可修饰位点,显著提高其后续衍生的功能基团的负载量.

另一种策略是在有机聚合物整体柱中或其 表面添加纳米材料,利用后者比表面积大等特 殊的物理、化学性质来改善有机整体柱的分离 性能. Y. Xu 等^[21]为了增大整体材料的比表面 积,预先对含有环氧基的聚合物整体材料表面 进行巯基化,进一步固载上金纳米颗粒,用于选 择性富集和分离含半胱氨酸的肽段;进一步修 饰上功能基团,如C18 链或磺酸基团,可用于毛 细管电色谱分离和高效液相色谱分离. S. D. Chambers 等^[22]在制备 Poly(GMA-EDMA)整体 材料时,向聚合体系中加入含富勒烯 C60 的单 体,制备的 Poly(C60-GMA-EDMA) 毛细管整体 柱对小分子的柱效,比 Poly(GMA-co-EDMA)柱 高18倍,当线速度为0.46 mm/s时,柱效可达 8 600 N/m,保留因子 2.6(见图 2). 此外,羟基 磷灰石、纳米材料、硅胶杂化微球、石墨烯和金 属有机骨架材料 MOFs (Metal Organic Frameworks)^[23-27]等,都已被成功应用于制备有机聚 合物整体柱,不仅在一定程度上改善了整体柱 的分离效果,还赋予整体材料全新的分离功能.

M. Seo 等^[28]发展了一种模板剂牺牲法,制 备出比表面积大、介孔分布均匀且具有多级孔 结构的有机聚合物整体柱:首先向4-氯甲基 苯乙烯(VBzCl)和 DVB 的共聚体系中加入带 链转移功能的聚乳酸 PLA,经过 RAFT 聚合反 应形成 PLA-b-P(VBzCl-co-DVB)聚合物;利用 PLA 在碱性条件下容易降解的特性,将聚合物 中的 PLA 链段刻蚀掉,形成含有介孔的聚合 物;向聚合物中加入 FeCl,进行超交联反应,形



成含有微孔的聚合物,比表面积大于 600 m²/g; 通过调节 PLA 的相对分子量可对该材料的介 孔在 6~15 nm 之间进行精确控制.此方法最大 的不足之处是制备的聚合物不含大孔结构,无 法用于色谱分离.在此基础上,S.A. Saba 等^[29] 以 St 和 DVB 作单体,PEO 作致大孔模板剂兼 相分离诱发剂,加入 PLA-CTA 进行 RAFT 聚合 反应,形成 PLA-b-P(S-co-DVB)聚合物;将材料 中的 PEO 冲洗干净,再用碱刻蚀掉 PLA,成功 制备出既含介孔又含大孔的多级孔聚合物整体 材料.这种方法目前尚未有实际应用,但其为介 孔有机聚合物整体柱的发展提供了新的思路和 新的方向.

1.2 纯硅胶整体材料的制备

尽管有机聚合物整体材料合成方法多样, 但其合成物仍然存在机械强度低、易溶胀且孔 径难以控制等缺点.硅胶整体柱因其具有有机 整体柱无法取代的一些优势,如比表面积大、通 孔和介孔尺寸可以独立调控、机械强度高、柱效 高,也具有很广泛的应用.目前硅胶整体材料由 四甲(乙)氧基硅烷的溶胶 – 凝胶反应制备而 得,孔径调节主要有如下两种方法.

一种是扩孔法.这是最传统最经典的硅胶 整体柱制备方法,其基本流程为:采用聚乙二醇 和醋酸溶液分别作模板剂和催化剂,先将四烷 氧基硅烷在冰浴中下搅拌水解形成均一透明的 溶胶,进一步升温至40℃进行缩聚形成凝胶, 再加入氨水在一定温度下制备介孔,最后经干 燥、灼烧制成硅胶整体柱.在硅胶整体柱的制备 过程中,诸如反应温度、催化剂和表面活性剂等 因素都会对其形貌产生重要影响. 通过改变 PEG 和硅烷试剂的比例可以调节通孔及材料骨 架的尺寸,通过调节氨水的浓度、扩孔时间和温 度可控制介孔的大小. 1996年, H. Mairatuchi 等^[30]首次使用该法成功制备了棒状硅胶整体 柱,用十八烷基二甲基-(N,N-二乙基氨基) 硅烷进行化学修饰后,可用作反相高效液相色 谱固定相.目前这种硅胶整体柱已实现商品化, 如 Merck 公司的硅胶整体柱 Chromolith Performance RP-C18, SilicaROD 等. 采用扩孔法制 备硅胶整体材料很容易控制通孔和介孔尺寸, 但其操作步骤繁琐、重现性差.

随着材料科学的发展,一些研究者采用模板法"一步"合成硅胶整体材料.该方法主要是通过模板剂的自组装来驱动溶液相的四烷氧基硅烷,进行微相分离,之后水解聚合而成,一般所使用的模板剂包括离子型表面活性剂如十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)、十六烷基氯化铵(CTAC)等,以及非离子型表面活性剂如三嵌段聚醚(P123,F127,F108)、聚乙二醇(PEG)等.如表1所示,以TMOS或TEOS作硅源,采用不同的模板剂体系,在一定的酸催化中可以制备出具有连通大孔结构和有序介孔结构的硅

胶整体材料. J. Smått 等^[31]使用双模板法,采用 PEG和 CTAB 作为模板剂分别控制颗粒聚集和 内部结构,合成了具有三级孔结构的硅胶整体 材料. 控制整体材料形成过程中相分离和凝胶 动力学参数,可以得到连通大孔结构及颗粒间 隙造成的 10~20 nm 的骨架介孔;由于模板剂 的超分子模板作用,形成了 2~4 nm 的内部介 孔. H. Zhong等^[32]采用 P123 作为模板剂和相 分离诱导剂,无机酸(如醋酸、硝酸、盐酸和硫 酸等)溶液作为催化剂,加入少量无机盐 (NaCl,NaNO₃等)合成了具有连通大孔和有序 介孔的多级孔结构硅胶整体柱;系统地考察了 模板剂 P123、酸催化剂种类和浓度及无机盐添 加剂对整体材料的影响,并将制备的硅胶整体 柱经 C18 修饰后用于反相色谱固定相.

1.3 有机 – 无机杂化整体材料的制备

与有机聚合物整体材料和纯硅胶整体材料 相比,有机 – 无机杂化整体材料兼具两者的优 势,例如稳定性好、比表面积大等,而且在一定 程度上克服了两者的缺点,因此对其合成方式 及应用方面的研究是整体材料发展的一个重要 方向.经过多年的研究,目前已经发展出了多种 有机 – 无机杂化整体柱的制备方法,主要有溶 胶 – 凝胶法、"一锅法"及基于 POSS 单体和桥 联硅氧烷的制备方法等.

最常用的也是最传统的方法为"溶胶 - 凝 胶法",这种方法比较简单(见图 3). 其一般采 用四烷氧基硅烷(TMOS 或 TEOS)与端基含有 机官能团的三烷氧基硅烷 R'Si(OR)₃,在酸性

表1 模板法制备硅胶整体柱相关文献与结果

Table 1	Relevant	literature a	nd	results	of	template	method	of	nrenaring	via	പെ-അി	processing
Table 1	nerevant	merature a	nu	results	or	tempiate	memou	or	preparing	via	sor-ger	processing

文献	前驱体/溶剂/添加剂	模板剂	比表面积/ $(m^2 \cdot g^{-1})$	大孔/μm	介孔/nm
[33]	TMOS/HNO3/H2O	P123/TMB	656	0.6	6.20
[34]	TEOS/HNO3/H2O	PEO	211	15.0	28.00
[35]	TMOS/HAc/H ₂ O	P123	699	2.4	8.90
[36]	TMOS/FA	PEO/Ionic liquid (BMIM-TFSI)	682	0.5	14.00
[37]	TEOS/HCl/H2O/Ethanol	F127/Poly(fufuryl alcohol)	500 ~ 985		$3.00 \sim 15.00$
[38]	TMOS/HAc/H ₂ O	F127/PEG	631	_	6.40



- 图 3 端基含有机官能团的硅源与 TMOS/TEOS 共聚制备杂化整体材料
- Fig. 3 Co-condensation method (direct synthesis) employing TMOS/TEOS and a terminal trialkoxyorganosilane as mixed precursors for the organic modification of mesoporous silica phases

或者碱性催化的条件下经水解、缩聚而 成^[39-41].常见的带有功能基团的硅烷化试剂有 辛基 - 三乙氧基硅烷(C8-TES)、苯基三乙氧基 硅烷(PTES)、乙烯基三甲氧基硅烷(VTMS)、氨 丙基三乙氧基硅烷(APTES)、巯丙基三甲氧基 硅烷(MPTMS)等.不过,由于上述硅烷化试剂 性质上的差异,各自制备杂化整体柱的步骤也 会有所不同. H. Colón 等^[42]在传统硅胶整体柱 制备方法的基础上进行改进,采用端基含有双 键的三烷氧基硅烷和四甲氧基硅烷作为硅源, 在 PEG/0.01 mol 醋酸/尿素体系中进行一步水 解缩聚,制备出含烯丙基活性基团的杂化整体 柱基质. 然后分别通过自由基聚合反应和氢化 硅烷化反应对整体柱进行后修饰,成功制备出 的 C8 - 杂化整体柱和苯基杂化整体柱,在反相 保留能力和 pH 耐受性上均有显著提高. 也有 不少文献报道,在同样的体系下将 ATMS 替换 为乙烯基三甲氧基硅烷(VTMS)或者巯丙基三 甲氧基硅烷(MPTMS),可制备出带有乙烯基或

者巯基活性基团的杂化整体柱.然而,这种在水 溶液中弱酸条件下催化的"一步法",一般只适 用于所带有机官能团链比较短且单体水解后水 溶性较好的硅烷化试剂,如 ATMS, VTMS 和 MPTMS 等. 对于水溶性较差的单体如 C8-TES 和 PTES 等,则因其水解液难以形成均一、澄清 的溶液,无法得到形貌均匀的杂化整体柱.针对 这一问题,出现了基于有机体系的"一步法"和 "两步法"制备杂化整体柱. L. Yan 等^[43]采用 TEOS 与 3 - 氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)作 为前驱体,其中 APTES 既作为功能单体又作交 联剂,以表面活性剂 CTAB 为致孔剂、乙醇为溶 剂,进行"一步法"溶剂-凝胶共聚,合成了带 有氨丙基官能团的杂化硅胶整体柱,其中 CTAB 的加入可以有效提高整体材料结构的均 一性.利用材料整体柱表面丰富的氨基官能团, 一方面可为 CEC 提供离子交换作用位点并产 生反向电渗流,在弱阴离子交换(WAX)-CEC 模式下,可用于分离有机酸、核苷酸和灵芝提取 物等样品;另一方面利用氨基和戊二醛之间的 反应,可在其表面修饰上各种功能基团,如 J. Ma等^[44]修饰 Trypsin 制备了微型胰蛋白酶反 应器;C. Hou 等^[45]修饰氨甲基膦酸,进而又螯 合Ti⁴⁺制备了金属离子亲和色谱(IMAC)柱; N. Deng 等^[46]修饰核酸适配体(aptamer)用于选 择性富集 α - 凝血酶.

2009年, M. Wu等^[47]首次提出了一种名为 "一锅法"的制备有机 - 硅胶杂化整体柱的新 技术,该方法自出现后便得到了广泛的应用,其 过程如图4所示.该法采用 PEG 和尿素作模板 剂,醋酸溶液作催化剂,首先在冰浴条件下将硅 烷化试剂 TMOS 和 VTMS 搅拌至完全水解形成 透明溶液. 然后向水解液中加入一定量有机 (功能)单体和反应催化剂或引发剂(如 AIBN 等),经过两步升温处理,先在较低温度下水浴 进行缩聚,形成带有可修饰功能基团的硅胶整 体柱基质;然后在较高温度下将有机(功能)单



图4 "一锅法"制备杂化整体柱示意图

Fig. 4 Schematic incorporation of organic monomers with alkoxysilanes for the preparation of the organic-silica hybrid monolith

体键合到硅胶基质,形成杂化整体柱的有机表 面.该方法的显著优势是可以根据特定的分离 需求随意变换不同的有机(功能)单体来对杂 化整体柱进行个性化定制.针对不同性质的有 机单体,该研究组发展了不同的反应体系,进一 步拓展了"一锅法"制备杂化整体柱的适用 范围.

针对水溶性较好的有机功能单体,有研究 者发展了水溶液体系"一锅法".该体系由水、 PEG和尿素组成.Z.Zhang等^[48]将有机单体替 换为甲基丙烯酸-3-磺酸丙酯钾盐,制备了一 种具有强阳离子交换(SCX)功能的杂化整体 柱,柱容量比商品化的 SCX 填充柱提高了近 3倍,对磷酸化肽具有较强的富集能力.

针对一些中等疏水性单体,有研究者发展 了一种有机 - 水溶液体系"一锅法"制备杂化 整体柱的方法,该体系由水、甲醇、N,N-二甲 基甲酰胺(DMF)和 CTAB 组成,克服了之前水 溶液体系对疏水单体溶解能力不足的缺点.采 用该新制备体系, Z. Zhang 等^[49]将 TMOS, VTMS,甲醇,DMF,水,CTAB,氨水,AIBN 和手 性有机功能单体单(6A-N-烯丙基胺-6A-去氧)-全苯基甲酸酯- β -环糊精(Ph- β -CD) 混合均匀,再进一步升温加热,制备了 Ph-β-CD --手性杂化整体柱,并成功地对13种手性对映体 进行了拆分.此外,他们还分别以甲基丙烯酸正 丁酯 (BuMA)^[50] 和甲基丙烯酸苄基酯 (BeMA)^[51]为有机单体,成功制备了 C4 - 和苯 基-杂化整体柱,并用于蛋白质组学的分离 分析.

针对疏水性较强的有机单体,有研究者发展了一种无水体系"一锅法"制备杂化整体柱的方法,该体系由乙腈和甲酸或醋酸及致孔剂如十二醇组成.Z.Zhang等^[52]采用这种新型的无水体系"一锅法",以甲基丙烯酸十二烷基酯(LMA)和甲基丙烯酸十八烷基酯(SMA)为有机单体分别制备 C12 - 和C18 - 杂化整体柱,并用于分离苯系物、苯酚类、苯甲酸类、苯胺类、PAHs、蛋白混合物和蛋白酶解液,两种整体柱均表现出较高的分离柱效和较强的分离能力.

此外,多面体寡聚倍半硅烷, POSS (Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes)是一类内部核 由硅和氧组成,外部为有机官能团的新型笼状 化合物. POSS 分子尺寸在1~3 nm 之间,其经 验结构式为 $R_n(SiO_{1,5})_n$,其中 R 代表其分子外 部的一系列有机官能团, n 则是大于或等于4 的偶数^[53-54]. POSS 分子由于具有 pH 稳定性 好、耐高温、抗氧化、化学修饰性强等特性,目前 已被视为硅烷化试剂的一种理想的替代试剂, 被应用于杂化整体柱的制备. H. Lin 等^[55]将带 8个环氧基团的 POSS 试剂(POSS-epoxy)分别 与3种多巯基化合物进行巯基-环氧点击聚合 反应,成功制备了3种POSS-杂化整体柱,其 具有非常均一、规整的三维网状骨架结构,对多 种小分子化合物和复杂样品均可实现高效色谱 分离,最高柱效分别达182 700 N/m. 此外,他 们以含有8个甲基丙烯酸酯基团的 POSS 试剂 (POSS-MA)与多巯基化合物膦催化的巯基-甲基丙烯酸酯为原料,用点击聚合反应制备了 3种 POSS - 杂化整体柱,其对小分子化合物最

高分离桂效亦可达 195 000 N/m^[56]. H. Zhang 等^[57]基于 POSS-MA 试剂,采用"一锅法"制备 了 C18 反相整体柱,其在 0.33 mm/s 的线速度 下对苯系物的分离柱效在 60 000 ~73 500 N/m 之间. Z. Liu 等^[58]则采用带环氧基团的 POSS 试剂(POSS-epoxy)与含两个氨基的胱胺二盐酸 盐作反应单体,利用开环聚合反应制备出POSS – 杂化整体柱,再将双硫键还原成自由巯基,进一步利用点击聚合反应分别修饰 C18,苯基和两 性离子后用于毛细管色谱分离.以上体系制备 的 POSS – 杂化整体材料虽然柱效较高,但材料 均无介孔结构且比表面积很小(<10 m²/g),导 致柱容量较低,不利于复杂样品的高效分析.

近年来,发展起来一种桥键型有机 – 无机 介孔材料 PMOs(Periodic Mesoporous Organosilicas)^[59],其制备流程如图 5 所示.



图 5 PMOs 介孔材料的制备流程图 Fig. 5 General synthetic pathway to PMOs

PMOs 是以带有桥键型有机基团的有机硅 化合物(RO)₃Si—R'—Si(OR)₃(R'为有机基 团)为硅源、十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)或 三嵌段聚醚(P123 或 F127)等作为模板剂,经 过共水解缩聚合成的一种新型多孔材料.将有 机官能团以桥联形式键入杂化材料骨架中,可 以使材料具有一些独特的性质,如功能基团含

量高目分布均匀,还可以很方便地通过改变功 能团调节材料的理化性质.此外,PMOs 材料比 表面积大、孔径分布均匀,其每个硅原子与有机 基团直接相连,相对介孔硅胶材料而言,其表面 存在的Si-OH更少,可减少对样品的非特异性 吸附,在色谱固定相中有很大的应用前 景^[60-61]. PMOs 桥键型杂化材料的出现为有机 -无机杂化整本材料的研究注入了新的活力并带 来新的契机. K. Nakanishi 等^[62]基于相分离和 溶胶-凝胶过程机理,制备了乙基桥键型杂化 硅胶整体材料.该材料具有连通的大孔结构和 高度有序的介孔结构;向模板体系 P123 中添加 一定量的三甲苯(TMB)有助于材料形成长程 有序的介孔结构. O. Brandhuber 等^[63]采用乙二 醇预先对苯基桥联的硅烷(1.4-双(二甲基硅 烷基)苯,BTEB)进行改性作为硅烷前驱体,以 P123 为模板剂,在中等酸性的溶液中合成了苯 环桥键的杂化整体材料. 该材料比表面积为 500 m²/g,具有连通的大孔、高度有序的介孔和 微孔的三级孔结构,并且孔壁中的苯环基团是 分子有序的. H. Zhong 等^[64]将 TEOS 和 BTEB 进行溶胶 - 凝胶共缩聚,以 P123/TMB 为模板 体系,制备了孔径分布均匀、骨架中部分含桥联 苯基结构的杂化整体材料.然而,由于制备方法 复杂,目前这几种 PMOs 杂化整体柱均尚未用 于色谱分离.

2 整体材料在蛋白质组分析中的应用

目前,蛋白质组学研究主要包括 Top-down 和 Bottom-up 两大策略. Top-down 策略首先要 求样品在蛋白质水平进行分离,再采用质谱对 蛋白质直接进行分析鉴定. 而Bottom-up策略则 是先将样品中的蛋白质进行酶解形成肽段,再 对所得的肽段进行分离,最后采用质谱进行分 析鉴定. 因此,对于复杂样品中蛋白质组的分 析,蛋白质和肽段的分离至关重要. 近年来,整 体材料由于其独特的双连续结构和双孔分布结 构而深受蛋白质组学研究者们的喜爱,广泛用 于蛋白质和肽段的分离.

2.1 在蛋白质分离中的应用

有机聚合物整体柱比表面积很小(只有几 m²/g),具有比较简单的孔结构(一般只含有 μm 级的通孔)和优良的渗透性及传质速率,生 物相容性好且非特异性吸附小,常被用于蛋白 质的快速分离. T. J. Causon 等^[65] 对商品化的 C18 反相硅胶整体柱和 poly(St-co-DVB)有机 聚合物整体柱的色谱分离效果进行比较发现, 硅胶整体柱用于小分子苯系物的快速分离更有 优势,而孔结构简单比表面积小的有机聚合物 整体柱则更有利于蛋白质的快速分离. L. Bai 等[66]采用原子转移自由基聚合法,以甲基丙烯 酸甲酯为单体,乙烯基酯树脂为交联剂,十二 醇/离子液体(1-丁基-3-甲基咪唑氯盐)为 致孔剂, CCl₄ 为引发剂, FeCl₂ 为催化剂, 制备 了大孔结构均匀的有机聚合物整体柱,用于鸡 蛋清中溶菌酶高分辨率的快速分离.

利用有机聚合物整体材料不易收缩的优势, J. C. Masini 等^[67] 采用自由基聚合法在 2.1 mm 内径的柱管中合成了 Poly (GMA-co-EDMA)有机整体柱,并在其表面修饰功能基团 亚氨基二乙酸(IDA),然后将该柱用于阳离子 交换顺序注射色谱中,5 μL·s⁻¹流速下成功地 对4种蛋白质(肌红蛋白、核糖核苷酶 A、细胞 色素 c 和溶菌酶)进行了分离,且分离重现性 很好.

P. Simone 等^[68] 采用 γ - 射线引发法制备 了反相聚甲基丙烯酸酯类整体柱 Poly(LMA-co-HDDMA),得益于该整体柱优异的通透性,制备 了 55 cm 的长柱(i. d. 250 μm)并用于完整蛋白 质的分离,其峰容量超过 1 000,并成功用于毛 细管液相色谱 - 高分辨质谱(cLC-HRMS)分 析,对9 个标准蛋白混合物及复杂样品小鼠肠 道菌裂解液都获得了很好的分离效果. 除了有机聚合物整体柱,也有研究者发展 了硅胶杂化整体柱用于蛋白质的分离. Z. Liu 等^[69]将3种POSS - 杂化硅胶整体柱(C4,C18 及C12)分别用于完整蛋白质的分离,得到较好 的分离效果及重现性,利用整体柱的高渗透性, 其在2.5 min 内实现了7种蛋白质的快速 分离.

蛋白质的毛细管液相色谱分离效果不仅与 分离材料基质性质有关,色谱柱内径也有较大 的影响. I. Nischang 等^[70]在不同内径毛细管 (10 μm,25 μm 和 50 μm)中合成了 C4 – 聚合 物整体柱(Poly(BuMA-co-EDMA)),发现在相 同的线速度和流动相梯度条件下,蛋白质在不 同内径毛细管整体柱中的保留时间相同,但内 径越小、蛋白质峰越窄、灵敏度越高.

2.2 在肽段分离中的应用

整体材料作为非常重要的一类色谱固定 相,具有制备简单、反压小且传质速度快等优 势,不仅可以实现样品的快速分析,还可通过增 加柱长,提高分离柱效,通过减小毛细管柱内 径,增加分析灵敏度,这对于蛋白质组学中肽段 的分离具有很大的意义. X. Jiang 等^[71]利用长 20 cm, 内径 100 µm 的 Poly(LMA-co-EDMA) 整 体柱实现了 nano-RPLC-MS/MS 自动化平台的 构建,并对酵母蛋白酶解产物和鼠肝蛋白酶解 产物进行了高通量分离. M. H. V. D. Meent 等^[72]将 nano-HPLC-ESI-MS/MS 系统用于肽段 的分离鉴定,并通过考察毛细管整体柱的长度 和色谱分离梯度的影响,发现色谱柱越长,分离 梯度越长,所得峰容量、肽段鉴定数目和蛋白质 序列覆盖率越高. S. Eeltink 等^[73]分别以5 cm, 25 cm 和1 m(内径为 200 µm)长的 Poly(St-co-DVB) 整体柱对大肠杆菌样品进行分析,结果发 现5 cm 长的整体柱最高峰容量为400, 而 25 cm 长的整体柱最高峰容量为485,当整体柱 延长至1m长时,其在10h分离梯度下峰容量

最高可达1038,这充分证明延长柱长可有效增加峰容量、提高色谱分离能力.

整体材料除了作为反相色谱固定相应用于 肽段分离以外,还可以作为亲水相互作用色谱、 离子交换色谱等固定相. K. Horie 等^[74]在其前 期工作中,基于纯硅胶整体柱制备了 C18 超长 反相硅胶整体柱,并成功用于肽段的分离鉴定, 近期他们制备了4m长的超长亲水硅胶整体 柱,最高柱效可达3×10⁵ N/m,并成功用于 HeLa 细胞酶解产物的 nano-HPLC-ESI-MS/MS 分离分析,所得的蛋白质和肽段鉴定数目与超 长反相整体柱相当. X. Chen 等^[75]以二[2-(甲 基丙烯酰氧基)乙基]磷酸(BMEP)作交联剂和 功能单体,采用光引发自由基聚合法制备了磷 酸功能基团含量很高的阳离子交换整体柱,其 对溶菌酶的富集容量高达73 mg/mL,对肽段的 分离柱效可达 52 900 N/m,且在 30 min 分离梯 度内峰容量为28.

3 展望

尽管有越来越多的文献报道用不同方法制 备多种多样的整体材料,但与填充柱相比,整体 柱的分离柱效仍有待进一步提高,可以从整体 材料的性能,如比表面积、孔径分布、稳定性、亲 水性等方面进行改进.此外,利用整体材料低背 压的优势,可制备超长、超细内径毛细管整体 柱,有利于微量蛋白质组学样品的高效分离分 析.随着对整体材料制备技术的不断深入研究, 整体材料也将在食品安全、生命科学、环境保护 等众多领域中扮演重要的角色.

参考文献:

- [1] HJERTEN S, LIAO J L, ZHANG R. Highperformance liquid chromatography on continuous polymer beds[J]. Journal of Chromatography A, 1989, 473:273.
- [2] TANAKA N, MCCALLEY D V. Core-shell,

ultrasmall particles, monoliths, and other support materials in high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88 (1):279.

- [3] WU R A, HU L, WANG F, et al. Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation[J]. Journal of Chromatography A,2008, 1184(1):369.
- [4] SVEC F, LV Y. Advances and recent trends in the field of monolithic columns for chromatography[J]. Analytical Chemistry, 2014, 87 (1): 250.
- [5] PETERS E C, SVEC F, FRECHET J M. Rigid macroporous polymer monoliths [J]. Advanced Materials, 1999, 11 (14):1169.
- [6] ARRUA R D, TALEBI M, CAUSON T J, et al. Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 738:1.
- [7] NISCHANG I. Porous polymer monoliths: morphology, porous properties, polymer nanoscale gel structure and their impact on chromatographic performance[J]. Journal of Chromatography A,2013,1287:39.
- [8] YU S, NG F L, MA K C C, et al. Effect of porogenic solvent on the porous properties of polymer monoliths [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2013, 127(4):2641.
- [9] SVEC F, FRECHET J M J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media [J]. Analytical Chemistry, 1992,64(7):820.
- [10] PETERS E C, PETRO M, SVEC F, et al. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 2. Effect of chromatographic conditions on the separation [J]. Analytical Chemistry, 1998, 70 (11): 2296.
- [11] LE T P, MOAD G, RIZZARDO E, et al. Poly-

merization with living characteristics: US 7250479[P]. 2007 - 07 - 31.

- [12] IDE N, FUKUDA T. Nitroxide-controlled freeradical copolymerization of vinyl and divinyl monomers. 2. Gelation [J]. Macromolecules, 1999,32(1):95.
- [13] CHEN Z, YE Q. Doping a novel controlled/"living" radical for the polymerization of a lauryl methacrylate monolithic column for improving column efficiency [J]. Analytical Methods, 2014,6(10):3235.
- [14] LUBBAD S H, BUCHMEISER M R. Ring-opening metathesis polymerization-derived monolithic anion exchangers for the fast separation of double-stranded DNA fragments [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218 (17):2362.
- [15] LUBBAD S H, BANDARI R, BUCHMEISER M R. Ring-opening metathesis polymerizationderived monolithic strong anion exchangers for the separation of 5'-phosphorylated oligodeoxythymidylic acids fragments [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(49):8897.
- [16] LIU Z, OU J, LIN H, et al. Preparation of monolithic polymer columns with homogeneous structure via photoinitiated thiol-yne click polymerization and their application in separation of small molecules [J]. Analytical Chemistry, 2014,86(24):12334.
- [17] LIN H, OU J, LIU Z, et al. Thiol-epoxy click polymerization for preparation of polymeric monoliths with well-defined 3D framework for capillary liquid chromatography [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(6):3476.
- [18] LV Y, LIN Z, SVEC F. Hypercrosslinked large surface area porous polymer monoliths for hydrophilic interaction liquid chromatography of small molecules featuring zwitterionic functionalities attached to gold nanoparticles held in layered structure [J]. Analytical Chemistry, 2012,84(20):8457.
- [19] URBAN J, SVEC F, FRECHET J M J. Efficient

separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary column [J]. Analytical Chemistry,2010,82(5):1621.

- [20] URBAN J, SVEC F, FRECHET J M J. Hypercrosslinking: new approach to porous polymer monolithic capillary columns with large surface area for the highly efficient separation of small molecules [J]. Journal of Chromatography A, 2010,1217(52):8212.
- [21] XU Y, CAO Q, SVEC F, et al. Porous polymer monolithic column with surface-bound gold nanoparticles for the capture and separation of cysteine- containing peptides [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(8):3352.
- [22] CHAMBERS S D, HOLCOMBE T W, SVEC F, et al. Porous polymer monoliths functionalized through copolymerization of a C60 fullerenecontaining methacrylate monomer for highly efficient separations of small molecules [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(24):9478.
- [23] KRENKOVA J, LACHER N A, SVEC F. Control of selectivity via nanochemistry: monolithic capillary column containing hydroxyapatite nanoparticles for separation of proteins and enrichment of phosphopeptides [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(19):8335.
- [24] TONG S, LIU S, WANG H, et al. Recent advances of polymer monolithic columns functionalized with micro/nanomaterials: synthesis and application [J]. Chromatographia, 2014, 77 (1/2):5.
- [25] JANDERA P, URBAN J, ŠKEŘKOV V, et al. Polymethacrylate monolithic and hybrid particle-monolithic columns for reversed-phase and hydrophilic interaction capillary liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2010,1217(1):22.
- [26] WANG M M, YAN X P. Fabrication of graphene oxide nanosheets incorporated monolithic column via one-step room temperature polymer-

ization for capillary electrochromatography [J]. Analytical Chemistry,2011,84(1):39.

- [27] FU Y Y, YANG C X, YAN X P. Incorporation of metal-organic framework UiO-66 into porous polymer monoliths to enhance the liquid chromatographic separation of small molecules [J]. Chemical Communications, 2013, 49 (64): 7162.
- [28] SEO M, KIM S, OH J, et al. Hierarchically porous polymers from hyper-cross-linked block polymer precursors [J]. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137(2):600.
- [29] SABA S A, MOUSAVI M P, BÜHLMANN P, et al. Hierarchically porous polymer monoliths by combining controlled macro-and microphase separation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137(28):8896.
- [30] MINAKUCHI H, NAKANISHI K, SOGA N, et al. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography [J]. Analytical Chemistry, 1996, 68 (19):3498.
- [31] SMÅTT J, SCHUNK S, LINDEN M. Versatile double-templating synthesis route to silica monoliths exhibiting a multimodal hierarchical porosity [J]. Chemistry of Materials, 2003, 15 (12):2354.
- [32] ZHONG H, LIU J, WANG P, et al. Inorganic salt aided synthesis of monolithic silica with meso/ macro hierarchical structure [J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2009, 123(1):63.
- [33] AMATANI T, NAKANISHI K, HIRAO K, et al. Monolithic periodic mesoporous silica with welldefined macropores [J]. Chemistry of Materials,2005,17(8):2114.
- [34] BABIN J, IAPICHELLA J, LEFEVRE B, et al. MCM-41 silica monoliths with independent control of meso-and macroporosity[J]. New Journal of Chemistry, 2007, 31(11):1907.
- [**35**] ZHONG H, ZHU G, WANG P, et al. Direct synthesis of hierarchical monolithic silica for high

performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A,2008,1190(1):232.

- [36] BIDEAU J L, MIAH M Y, VIOUX A, et al. Bimodal porous silica monoliths obtained by phase separation in non-aqueous media [J]. Journal of Materials Chemistry, 2010, 20(5): 964.
- [37] DRISKO G L, ZELCER A, CARUSO R A, et al. One-pot synthesis of silica monoliths with hierarchically porous structure [J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2012, 148(1):137.
- [38] GUO J, LU Y, ZHANG S. Preparation of a high specific surface area monolithic silica reversed phase chromatography column using a template induced method[J]. New Journal of Chemistry, 2014,38(9):4190.
- [39] WANG K, CHEN Y, YANG H, et al. Modification of VTMS hybrid monolith via thiol-ene click chemistry for capillary electrochromatography[J]. Talanta, 2012, 91:52.
- [40] FENG R, TIAN Y, CHEN H, et al. Terminalvinyl liquid crystal crown ether-modified, vinylfunctionalized hybrid silica monolith for capillary electrochromatography [J]. Electrophoresis,2010,31(12):1975.
- [41] XU L, LEE H K. Preparation, characterization and analytical application of a hybrid organicinorganic silica-based monolith [J]. Journal of Chromatography A,2008,1195(1):78.
- [42] COL N H, ZHANG X, MURPHY J K, et al. Allyl-functionalized hybrid silica monoliths[J]. Chemical Communications, 2005(22):2826.
- [43] YAN L, ZHANG Q, ZHANG J, et al. Hybrid organic- inorganic monolithic stationary phase for acidic compounds separation by capillary electrochromatography [J]. Journal of Chromatography A,2004,1046(1):255.
- [44] MA J, LIANG Z, QIAO X, et al. Organic-inorganic hybrid silica monolith based immobilized trypsin reactor with high enzymatic activity [J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(8):2949.

- [45] HOU C, MA J, TAO D, et al. Organic-inorganic hybrid silica monolith based immobilized titanium ion affinity chromatography column for analysis of mitochondrial phosphoproteome [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9 (8): 4093.
- [46] DENG N, LIANG Z, LIANG Y, et al. Aptamer modified organic-inorganic hybrid silica monolithic capillary columns for highly selective recognition of thrombin [J]. Analytical Cemistry, 2012,84(23):10186.
- [47] WU M, WU RA, WANG F, et al. "One-pot" process for fabrication of organic-silica hybrid monolithic capillary columns using organic monomer and alkoxysilane [J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(9):3529.
- [48] ZHANG Z, WANG F, XU B, et al. Preparation of capillary hybrid monolithic column with sulfonate strong cation exchanger for proteome analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1256:136.
- [49] ZHANG Z, WU M, WU RA, et al. Preparation of perphenylcarbamoylated β-cyclodextrin-silica hybrid monolithic column with "one-pot" approach for enantioseparation by capillary liquid chromatography [J]. Analytical Chemistry, 2011,83(9):3616.
- [50] ZHANG Z, WANG F, OU J, et al. Preparation of a butyl-silica hybrid monolithic column with a "one-pot" process for bioseparation by capillary liquid chromatography [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(7):2265.
- [51] ZHANG Z, LIN H, OU J, et al. Preparation of phenyl-silica hybrid monolithic column with "one-pot" process for capillary liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2012,1228:263.
- [52] ZHANG Z, WANG F, DONG J, et al. A "one step" approach for preparation of an octadecylsilica hybrid monolithic column via a nonhydrolytic sol-gel (NHSG) method [J]. RSC

Advances, 2013, 3:8.

- [53] MARK J E. Some interesting things about polysiloxanes [J]. Accounts of Chemical Research, 2004, 37(12):946.
- [54] TANAKA K, CHUJO Y. Advanced functional materials based on polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) [J]. Journal of Materials Chemistry, 2012, 22(5):1733.
- [55] LIN H, CHEN L, OU J, et al. Preparation of well-controlled three-dimensional skeletal hybrid monoliths via thiol-epoxy click polymerization for highly efficient separation of small molecules in capillary liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A,2015,1416: 74.
- [56] LIN H, OU J, LIU Z, WANG H, et al. Facile construction of macroporous hybrid monoliths via thiol-methacrylate Michael addition click reaction for capillary liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A,2015,1379: 34.
- [57] ZHANG H, OU J, LIU Z, et al. Preparation of hybrid monolithic columns via "one-pot" photoinitiated thiol-acrylate polymerization for retention-independent performance in capillary liquid chromatography [J]. Analytical Chemistry, 2015,87(17):8789.
- [58] LIU Z, OU J, LIN H, et al. Preparation of polyhedral oligomeric silsesquioxane-based hybrid monolith by ring-opening polymerization and post-functionalization via thiol-ene click reaction [J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1342:70.
- [59] INAGAKI S, GUAN S, FUKUSHIMA Y, et al. Novel mesoporous materials with a uniform distribution of organic groups and inorganic oxide in their frameworks [J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121(41):9611.
- [60] SALESCH T, BACHMANN S, BRUGGER S, et al. New inorganic-organic hybrid materials for HPLC separation obtained by direct synthesis in

the presence of a surfactant [J]. Advanced Functional Materials, 2002, 12(2):134.

- [61] REBBIN V, SCHMIDT R, FROBA M. Spherical particles of phenylene-bridged periodic mesoporous organosilica for high-performance liquid chromatography [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45(31):5210.
- [62] NAKANISHI K, KOBAYASHI Y, AMATANI T, et al. Spontaneous formation of hierarchical macro-mesoporous ethane-silica monolith [J]. Chemistry of Materials, 2004, 16(19):3652.
- [63] BRANDHUBER D, PETERLIK H, HUESING N. Facile self-assembly processes to phenylenebridged silica monoliths with four levels of hierarchy[J]. Small,2006,2(4):503.
- [64] ZHONG H, ZHU G, YANG J, et al. Periodic mesoporous hybrid monolith with hierarchical macro-mesopores [J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2007, 100(1):259.
- [65] CAUSON T J, NISCHANG I. Critical differences in chromatographic properties of silica-and polymer-based monoliths [J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1358:165.
- [66] BAI L, WANG J, ZHANG H, et al. Ionic liquid as porogen in the preparation of a polymerbased monolith for the separation of protein by high performance liquid chromatography [J]. Analytical Methods, 2015, 7(2):607.
- [67] MASINI J C. Separation of proteins by cationexchange sequential injection chromatography using a polymeric monolithic column [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(5):1445.
- [68] SIMONE P, PIERRI G, FOGLIA P, et al. Separation of intact proteins on γ-ray-induced polymethacrylate monolithic columns: a highly permeable stationary phase with high peak capacity for capillary high-performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science,

2015,39(2):1.

- [69] LIU Z, OU J, LIU Z, et al. Separation of intact proteins by using polyhedral oligomeric silsesquioxane based hybrid monolithic capillary columns [J]. Journal of Chromatography A, 2013,1317:138.
- [70] NISCHANG I, SVEC F, FRECHET J M. Downscaling limits and confinement effects in the miniaturization of porous polymer monoliths in narrow bore capillaries [J]. Analytical Chemistry, 2009,81(17):7390.
- [71] JIANG X, DONG J, WANG F, et al. Automation of nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for proteome and peptide profiling analysis by using a monolithic analytical capillary column [J]. Electrophoresis, 2008, 29 (8):1612.
- [72] MEENT M H M V D, EELTINK S, JONG G D J. Potential of poly (styrene-co-divinylbenzene) monolithic columns for the LC-MS analysis of protein digests[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399(5):1845.
- [73] EELTINK S, DOLMAN S, DETOBEL F, et al. High-efficiency liquid chromatography-mass spectrometry separations with 50 mm, 250 mm, and 1 m long polymer-based monolithic capillary columns for the characterization of complex proteolytic digests [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(43):6610.
- [74] HORIE K, KAMAKURA T, IKEGAMI T, et al. Hydrophilic interaction chromatography using a meter-scale monolithic silica capillary column for proteomics LC-MS [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(8):3817.
- [75] CHEN X, TOLLEY H D, LEE M L. Monolithic capillary columns synthesized from a single phosphate-containing dimethacrylate monomer for cation-exchange chromatography of peptides and proteins[J]. Journal of Chromatography A, 2011,1218(28):4322.