

# 硅胶整体柱的研磨与表面修饰制备 新型高效液相色谱固定相

张璐, 王照地, 刘璐, 王世革, 黄明贤

(上海理工大学理学院, 上海 200093)

**摘要:** 研究以聚乙二醇 (PEG) 为致孔剂, 以四甲氧基硅烷 (TMOS) 为硅源, 在醋酸和尿素的催化作用下水解缩合成硅胶整体柱; 将此整体柱研磨、煅烧和浮选, 制备了不定型介孔硅胶颗粒。控制反应时间为 48 h、反应温度为先 40 °C 再 120 °C、研磨速度为 150 r/min、研磨时间为 1 h, 可得到孔径为 16 nm 左右、粒径范围在 4~6  $\mu\text{m}$  的支架型硅胶颗粒。在此基础上, 通过不同的表面修饰方法, 制备了表面键合的含双键 C8 反相色谱固定相, 通过巯基-烯点击反应和表面聚合反应进一步制备了 2 种新型反相色谱固定相, 以及通过巯基-环氧反应制备了限进介质色谱固定相。进行了针对塑化剂和牛血清中药物的色谱分离测试, 结果显示, 基于上述方法得到的高效液相色谱填料具有一定的实际应用潜力。

**关键词:** 硅胶整体柱; 巯基-烯点击反应; 限进介质色谱固定相

中图分类号: O 657.7<sup>+</sup>2

文献标志码: A

## Preparation of new stationary phases in high performance liquid chromatography with the surface modification on a ground silica monolith column

ZHANG Lu, WANG Zhaodi, LIU Lu, WANG Shige, HUANG Mingxian

(College of Science, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** A silica monolith column was prepared with polyethylene glycol (PEG) as a porogen, tetramethoxysilane (TMOS) as a silica precursor, as well as acetic acid and thermally decomposed urea as catalysts. The silica monolith column was then ground by a ball-mill, calcined and selected by floatation to obtain 4~6  $\mu\text{m}$  silica particles. For the preparation of monolithic silica, the process was: first, 48 h reaction at 40 °C reaction temperature, and then another 48 h reaction at 120 °C reaction temperature. For the preparation of silica particles, the grinding speed was 150 r/min, and the grinding time was 1 h. The silica particles with the pore size of about 16 nm and the particle size ranged in 4~6  $\mu\text{m}$

收稿日期: 2019-03-07

基金项目: 上海市科委项目 (14440502300); 上海理工大学沪江基金资助项目 (D15011)

第一作者: 张璐 (1992-), 女, 硕士研究生。研究方向: 色谱分析。E-mail: [zl1610784008@foxmail.com](mailto:zl1610784008@foxmail.com)

通信作者: 黄明贤 (1963-), 男, 教授。研究方向: 色谱分析、毛细管电泳、纳米生物材料应用和生物分析。

E-mail: [hmx@usst.edu.cn](mailto:hmx@usst.edu.cn)

were obtained. With different modification methods on the surface of the as-prepared silica particles, a series of new stationary phases were prepared, including the surface bonded vinyl group containing C8 reverse phase, thiol-ene click reaction and free radical polymerization produced new reverse phases, and thiol-epoxy reaction generated restricted access media stationary phase. The chromatographic separation for plasticizers and drugs in bovine serum albumin (BSA) was conducted, and the results show that the packing materials so prepared have potentials for practical applications in high performance liquid chromatography (HPLC).

**Keywords:** silica monolith column; thiol-ene click reaction; restricted access media stationary phase

高效液相色谱在食品、医药、生命及环境等领域具有广泛的应用。硅胶基质以其机械强度高、粒径分布均匀、孔构造和比表面积易于控制、表面易改性、有机溶剂中不溶胀等优势,成为最常用的高效液相色谱填料<sup>[1-5]</sup>。近年来,硅胶整体柱由于其高通透性和快速分析的特点,在色谱研究领域受到日益广泛重视<sup>[6-15]</sup>。

在近期的研究中,硅胶整体柱主要是在毛细管柱内形成,由于柱子内径小,所能承受的柱流量很小,不适用于一般色谱仪器和色谱分析。但硅胶整体柱的制备方法已有大量的研究和报道,有很多可以借鉴的地方。将硅胶整体柱进行研磨和筛分,可以用来制备适合于当今常用的高效液相色谱分析的色谱柱填料<sup>[16-18]</sup>,并且保存了微孔结构可调节和通透性高的优异特性。

本研究以聚乙二醇(PEG)为致孔剂,以四甲氧基硅烷(TMOS)为硅源,使其在醋酸和尿素的催化作用下水解缩合,从而形成硅胶整体柱;将此整体柱研磨后,再进行煅烧和浮选得到合适粒径的硅胶颗粒;最后通过表面修饰制备一系列新型色谱固定相。反相色谱是最常用的色谱模式,因此,本研究探索3种新型反相色谱固定相的制备方法。另外,限进型色谱固定相在血液中的药物分析方面发挥着巨大作用<sup>[19-24]</sup>,本研究也探讨了一种新型限进介质色谱固定相的制备方法。通过对所制备的新型色谱固定相进行色谱测试和应用评价,考察了基于硅胶整体柱的研磨与表面修饰方法制备高效液相色谱固定相的潜力。

## 1 实验

### 1.1 材料与设备

四甲氧基硅烷(TMOS,纯度大于99%)、聚乙

二醇(PEG,聚合度为10 000,分析纯)、硬脂酸乙烯酯(优级纯)、甲醇(HPLC级)、四氢呋喃(THF,优级纯)和正十八硫醇(97%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。过氧化苯甲酰(BPO,优级纯)购自北京百灵威科技公司。尿素、冰醋酸、二氧六环、无水甲苯、咪唑、乙酸乙酯、乙腈、乙醇、偶氮二异丁腈(AIBN)、 $\gamma$ -(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(KH-560)、三乙胺、乙酸酐、四丁基氟化铵(以上均为优级纯)和乙腈(HPLC级)购自国药集团化学试剂有限公司。7-辛烯基二甲基氯硅烷购自美国 Gelest 公司。mPEG1000-SH(聚合度为1 000)和 mPEG2000-SH(聚合度为2 000)购自上海梵硕生物科技有限公司。色谱应用测试样品如塑化剂、标准药物以及牛血清蛋白(BSA)等购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

使用的仪器设备包括:230II系列高效液相色谱仪和 EC2006 色谱数据处理工作站(大连依利特分析仪器有限公司),150 mm×4.6 mm 色谱柱管和液相色谱装柱机(深圳正大流体机电设备有限公司);Tristar II 3020 比表面与孔径分析仪(美国 Micromeritics 公司);VEGA3 扫描电子显微镜(SEM)(泰思肯贸易上海有限公司),SKL 箱式高温烧结炉(合肥晶科材料技术有限公司),KQ-300DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),电热鼓风干燥箱和真空干燥箱(上海—恒科学仪器有限公司),高速台式离心机(德国 NUAIRE 公司),行星式球型研磨机(长沙科德仪器设备有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 硅胶颗粒的合成

取 4.86 g 聚乙二醇(PEG,聚合度为10 000)和 4.95 g 尿素于聚四氟乙烯反应釜内衬中,用 45 ml 摩尔浓度为 0.01 mol/l 的乙酸溶液溶解并进行磁力搅拌。10 min 后,加入 5 ml 四甲氧基硅烷(TMOS),

再继续搅拌 40 min。将盛有混合透明溶液的内衬置于水热反应釜中,并在 40 ℃ 的烘箱中温育 48 h,之后再 将烘箱调至 120 ℃ 继续温育 48 h。反应完毕降至室温后,得到白色固体产物。将此产物依次用水浸泡 2 次,乙醇浸泡 1 次,去掉液体后,将整块固体在 80 ℃ 条件下干燥过夜,然后将此固体用研钵捣碎,再用球磨机研磨(转速为 150 r/min) 60 min,最后在 550 ℃ 煅烧 5 h。将煅烧后的硅胶颗粒在室温下分散于无水乙醇中,超声处理 30 min,然后使悬浮液自然沉降,3 h 后去掉未完全沉降的上层,剩下的固体烘干保存。

### 1.2.2 含烯键 C8 键合固定相

将煅烧和浮选好的硅胶颗粒置于 70 ℃ 的鼓风干燥箱干燥 48 h。取烘干后的硅胶颗粒 5.61 g,通过干燥洁净的漏斗加入到 250 ml 的三颈圆底烧瓶中,再加入 150 ml 无水甲苯,接上搅拌器,调转速 260 r/min,同时连接氮气,油浴升温至 110 ℃ 搅拌并甲苯回流 30 min 除水,之后加入 3.6 g 咪唑。取 3.6 ml 7-辛烯基二甲基氯硅烷加入上述混合溶液中,继续在通氮气环境下 110 ℃ 回流并搅拌 12 h。反应完毕后冷却至室温,过滤除去清液,用适量无水甲苯洗涤固体颗粒,再依次用甲醇、甲醇/水(50/50,体积比)混合溶剂、和甲醇离心洗涤。最后在鼓风干燥箱内 70 ℃ 干燥 6 h,得到含烯键的 C8 键合固定相。

### 1.2.3 巯基-烯点击反应制备反相色谱固定相

取 3.5 g 含烯键 C8 键合的硅胶颗粒,通过干燥的漏斗加入到三颈圆底烧瓶底部,加入 150 ml 二氧六环,之后通氮气,温度调至 70 ℃,加入 1.36 g 正十八硫醇和 0.068 g 偶氮二异丁腈(AIBN),继续在 70 ℃ 搅拌反应 8 h。然后依次用二氧六环、甲醇离心洗涤 2 次。所得产品置于 70 ℃ 烘箱中干燥 3 h,在 60 ℃ 下真空干燥 3 h。

### 1.2.4 硬脂酸乙烯酯表面聚合固定相

取适量碱性氧化铝分散在适量乙酸乙酯溶剂中,之后称量 3 g 硬脂酸乙烯酯(Vinyl Stearate)溶于其中。将上述键合的含烯键 C8 的硅胶放入 250 ml 三颈圆底烧瓶中,加入 150 ml 乙酸乙酯,置烧瓶于油浴加热锅,搅拌速度为 230 r/min,将上述硬脂酸乙烯酯单体溶液过滤到烧瓶中,随后用 N<sub>2</sub> 保护,加热油浴锅温度至 65 ℃。待温度稳定,加入 100 mg 引发剂 BPO(过氧化苯甲酰),继续加热搅拌反应 12 h。将得到的硬脂酸乙烯酯表面聚合固定相依次用乙酸乙酯和甲醇各洗 2 遍。70 ℃ 烘箱

中干燥 3 h 后在 60 ℃ 下真空干燥 3 h。

### 1.2.5 限进介质色谱固定相的制备

取 6 g 前期制备的硅胶颗粒加入到 250 ml 三颈圆底烧瓶中,以 200 ml 甲苯为溶剂,油浴锅加热至 70 ℃ 并进行搅拌(速度为 230 r/min),再加入 10 ml 的硅烷偶联剂  $\gamma$ -(2, 3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(KH560),70 ℃ 搅拌反应过夜。反应完成后,分别用甲苯、乙醇、乙醇/水和乙醇离心洗涤固体颗粒各 1 次,得到带有环氧基的硅胶基质,鼓风干燥箱 70 ℃ 烘干过夜备用。

取  $\gamma$ -(2, 3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷键合的硅胶颗粒 5 g,与 200 ml 四氢呋喃一起加入到 250 ml 三颈圆底烧瓶中,再加入 2 g mPEG1000-SH 和 1 g mPEG2000-SH,待固体全部溶解后,加入 5 ml 的四丁基氟化铵溶液(1 mol/l THF 作溶剂),反应液在 30 ℃ 搅拌 3 h 后,将反应物用离心机离心分离,用乙醇洗涤 3 次,在 70 ℃ 恒温鼓风干燥箱中干燥 6 h。

将上述反应产物分散于 50 ml THF 中,加入 3 ml 乙酸酐和 1 ml 三乙胺,在 30 ℃ 继续搅拌反应 3 h。分别用乙醇洗 2 次,乙醇/水洗 1 次,乙醇洗 1 次离心洗涤,70 ℃ 鼓风干燥箱干燥 9 h 得到一种限进介质色谱固定相。

### 1.2.6 装柱及测试

制备配比为 1:1 的异丙醇和三氯甲烷的混合液,以此为装柱匀浆液。取键合好的硅胶固定相 2 g,加入上述匀浆液 50 ml,超声 2 min,然后在 34.48 MPa 的压力下用甲醇通过装柱机将填料装入内径 4.6 mm、长 150 mm 的色谱柱中。

### 1.2.7 色谱测试

以尿嘧啶、苯乙酮、甲苯、乙苯、萘和茚等标准化合物为样品对装好的色谱柱进行反相色谱测试:流动相为甲醇和水;UV 检测波长为 254 nm。用塑化剂标准物质或将标准药品分散在牛血清蛋白(BSA)中作为应用测试样品,色谱条件列于相应的色谱图说明中。

## 2 结果与讨论

### 2.1 硅胶基质颗粒的制备

硅胶整体柱的制备可以借鉴很多毛细管内硅胶整体柱的制备方法<sup>[6-15]</sup>,其中,整体柱的制备条件决定了硅胶骨架的结构,从而决定了研磨后硅胶颗粒的大小和形貌。根据毛细管内硅胶整体柱

制备方面的文献和前期的实验摸索, 采用以聚乙二醇为致孔剂, 四甲氧基硅烷为硅源, 在醋酸和尿素的催化作用下水解缩合的方法来制备硅胶整体柱。将此整体柱研磨后, 再进行煅烧和浮选, 得到合适粒径的硅胶颗粒。研究发现, 在控制反应时间在 48 h、反应温度为先 40 ℃ 然后升温至 120 ℃、研磨速度为 150 r/min、研磨时间为 1 h 等

条件下, 可以得到如图 1 所示的硅胶颗粒。从图 1(a) 中可以看出, 硅胶颗粒保留了硅胶整体柱的骨架部分, 粒径在 4~6 μm 之间, 并且从图 1(b) 中可以清楚地观察到硅胶颗粒的粗糙多孔表面结构。这种硅胶颗粒基本满足了色谱用硅胶基质的均匀粒径(5 μm 左右)和多孔性结构的要求。

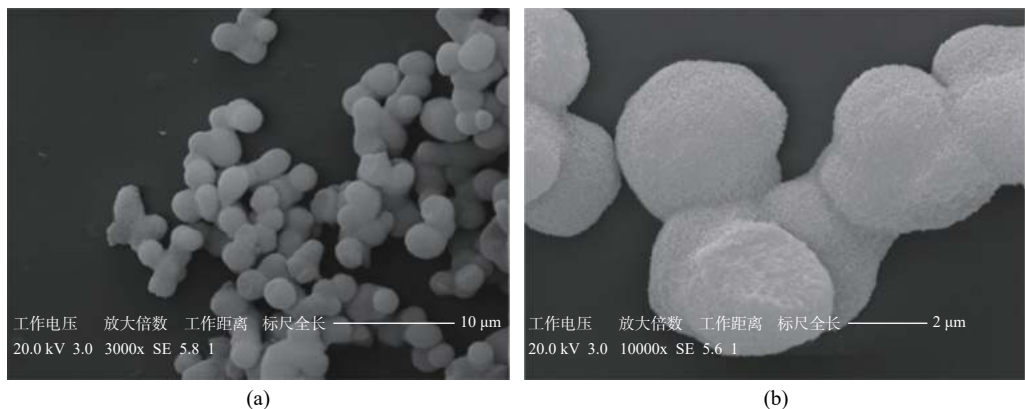


图 1 硅胶颗粒的扫描电子显微镜 (SEM) 图像  
Fig.1 Scanning electron microscope (SEM) images of silica particles

## 2.2 反相色谱固定相的制备

反相色谱是高效液相色谱中最常用的色谱模式, 一般以 C18 键合固定相为主, 本研究试图制备 3 种新型反相色谱固定相。首先, 以甲苯为反应分散剂, 咪唑为催化剂, 通过 7-辛烯基二甲基

氯硅烷与硅胶的表面硅羟基之间的键合反应制备含双键的 C8 键合固定相。咪唑是一种弱碱性化合物, 可以中和反应过程中生成的盐酸。7-辛烯基二甲基氟硅烷(C8)通过稳定的 Si—O—Si—C 键合到硅胶表面, 如图 2 所示。

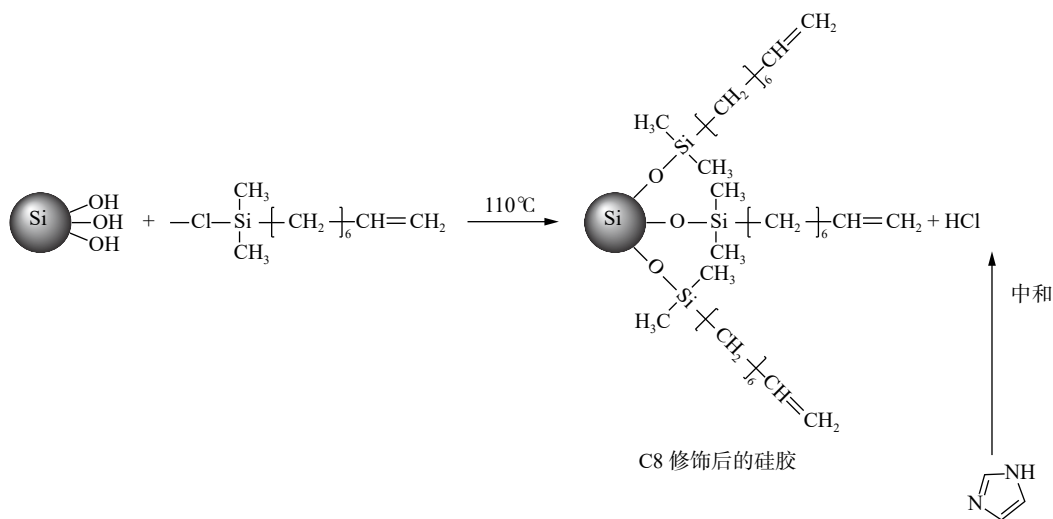


图 2 含双键 C8 固定相制备示意图  
Fig.2 Schematic diagram of the preparation of vinyl group containing C8 stationary phase

巯基-烯点击反应是常用的表面修饰和嫁接的方法<sup>[25-26]</sup>, 这种方法可以使材料表面改性, 也可用来制备色谱固定相。本研究中通过硫醇-烯点击反

应在上述制备的含双键的 C8 键合固定相上进一步链接正十八硫醇, 期望以此增加硅胶表面的疏水性, 反应示意图如图 3 所示。

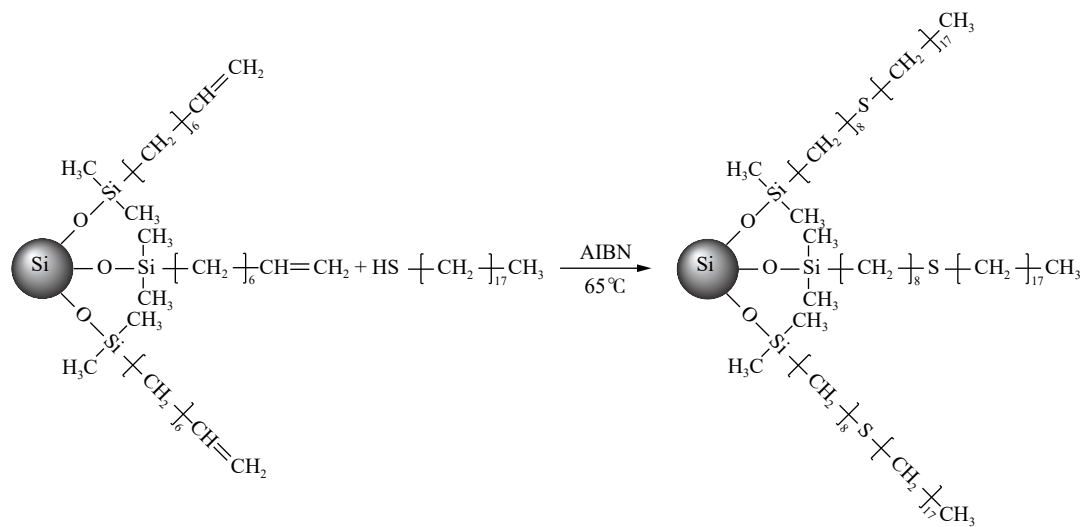


图 3 通过硫醇-烯点击反应制备反相色谱固定相示意图

Fig.3 Schematic diagram of the preparation of stationary phase via thiol-ene click reaction

另外，聚合物键合和涂覆的硅胶固定相也得到广泛的使用<sup>[27-28]</sup>，这种表面修饰方法可以进一步增加硅胶固定相的选择性。本研究中将硬脂酸

乙烯酯通过自由基共聚合反应接枝到前期制备的含双键 C8 键合的硅胶表面，反应过程如图 4 所示。

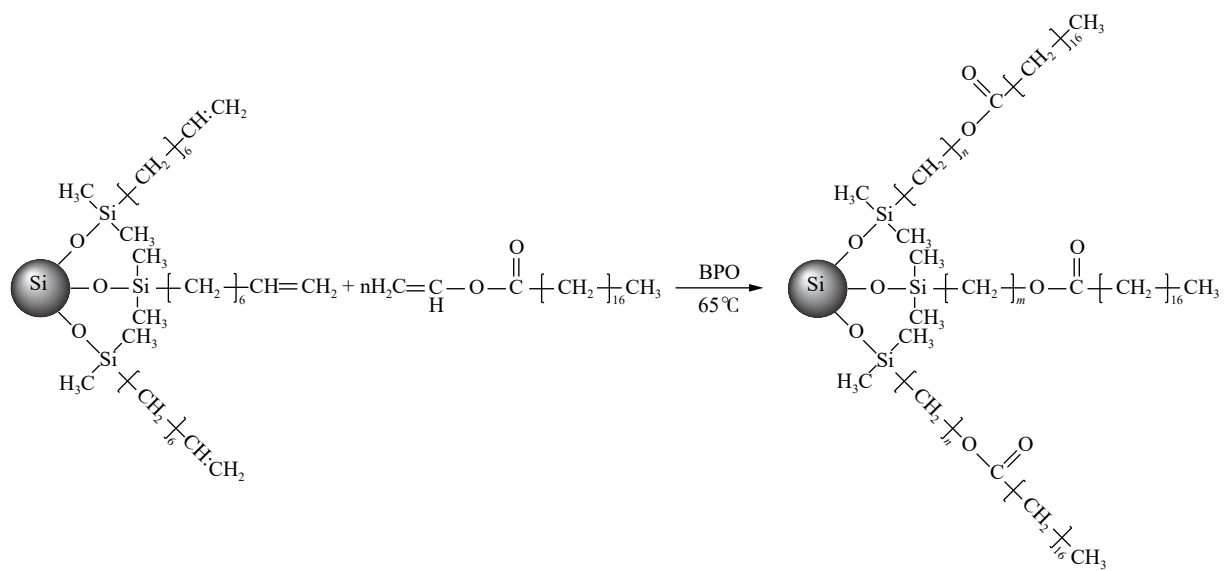


图 4 硬脂酸乙烯酯聚合固定相制备流程示意图

Fig.4 Schematic diagram of the preparation of vinyl stearate polymerization stationary phase

在图 4 的反应中，过氧化苯甲酰作为自由基聚合引发剂，硬脂酸乙烯酯作为聚合反应单体，与硅胶表面键合的 7-辛烯基中的双键发生自由共聚合反应，形成硬脂酸乙烯酯聚合物固定相。由于每一个表面双键都有可能嫁接上  $n(n>1)$  个硬脂酸乙烯酯单体，这种接枝聚合方法能进一步增加硅胶表面的疏水性能，从而增加其反相色谱保留和分离选择性。

2.3 反相色谱固定相的测试

将上述 3 种色谱固定相的反相色谱行为进行测试和对比。在相同的洗脱条件下，相比于 C8 键合固定相(图 5(a))，通过硫醇-烯点击反应链接的正十八硫醇固定相显示了增强的色谱保留(图 5(b))；而硬脂酸乙烯酯修饰的固定相对分析标准物质的保留时间更长且分离效果更好(图 5(c))。这些色谱分离结果间接证明了硅胶表面发生了本

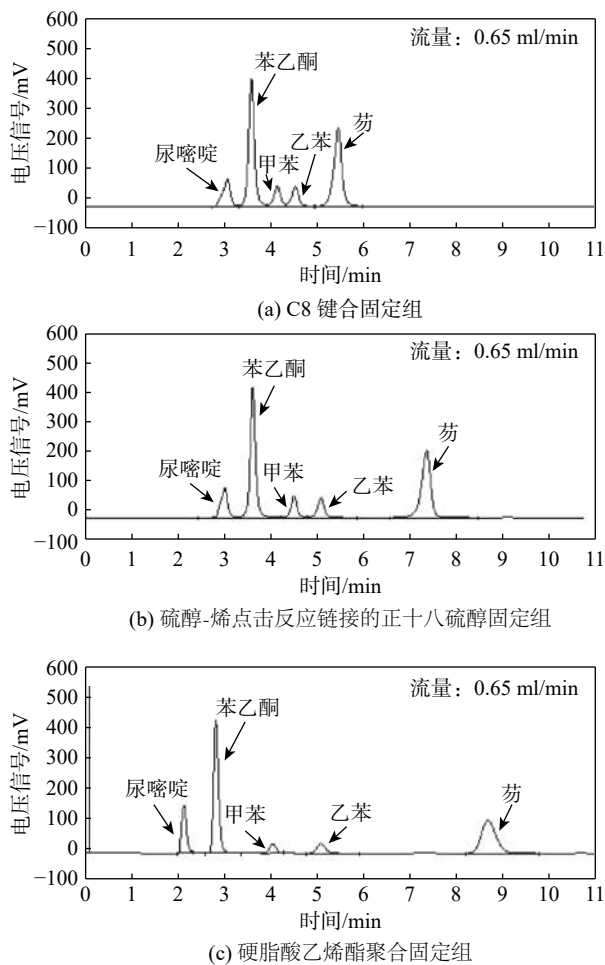


图 5 反相色谱测试比较

Fig. 5 Comparison of reversed phase chromatograms

文所设计的表面修饰化学反应。同时，这 3 种色谱柱的柱前压都比一般球型 5  $\mu\text{m}$  硅胶色谱柱的柱前压要小，证明了这种硅胶基质通透性好的优点。

考察了新制备的反相色谱固定相对标准塑化剂化合物的色谱分离效果，结果如图 6 所示。在梯度洗脱条件下，可以看出 3 种常见的塑化剂化合物都得到了非常高效的分离。塑化剂为一类对人体有害的化合物，在某些饮料和酒中曾发现了

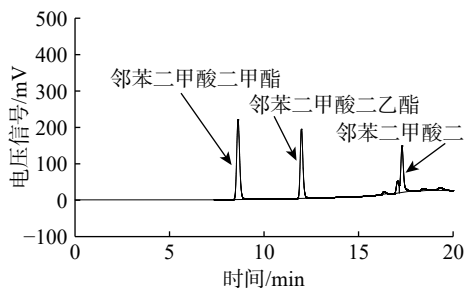


图 6 反相固定相用于塑化剂的应用测试

Fig. 6 Separation of common plasticizers with reverse stationary phase

少量塑化剂。本研究所制备的色谱填料可以为塑化剂的色谱分析提供帮助。

在色谱基质的性能测试中，范德姆特 (Van Deemter) 曲线可以很好地反映出硅胶颗粒的特征及性能。图 7 为测得的 Van Deemter 曲线，从图中可以看出，随着流速的增加，乙苯的塔板高度先减小后增加，最后趋于平缓，在 0.4 ml/min 时达到最小 (塔板高度越小，塔板数越大，柱效越好)。这种硅胶材料由于其特殊的形状，在高流速状态下，塔板高度变化不大，并没有明显增加的趋势，因此，可以进行快速的 HPLC (高效液相色谱) 分析，体现了此种硅胶颗粒之高通透性的优势。

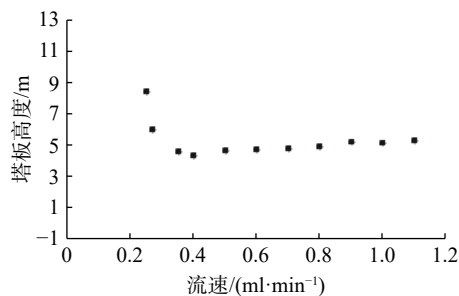


图 7 乙苯在 C8 反相色谱柱上的范德姆特曲线

Fig. 7 Van Deemter curve of ethylbenzene on C8 stationary phase

## 2.4 限进介质色谱固定相的制备和测试

将硅胶整体柱研磨、煅烧和浮选得到的硅胶颗粒，首先与 KH560 发生键合反应，再与含巯基的 PEG 分子通过巯基-环氧反应在硅胶表面链接 PEG<sup>[29-30]</sup>，最后，用乙酸酐与硅胶表面的羟基反应生成乙酸酯，从而得到一种新型限进介质色谱固定相。图 8 是反应流程示意图。

这种限进介质色谱固定相的特点是最外层的长链亲水 PEG 分子阻碍了蛋白质大分子与其内层疏水基团的作用，即达到蛋白质限进的作用，所以称为限进介质。但是，一般药物小分子可以渗透到内层，有一定的反相色谱保留。首先对新制备的限进介质固定相进行了反相测试，色谱测试条件中，流速为 0.8 ml/min，流动相为甲醇/水 (体积比为 40/60)，紫外检测波长为 254 nm。其中，色谱峰鉴定分别有：a. 尿嘧啶，b. 乙苯，c. 蔡。结果显示，这种色谱柱疏水性不强，只有当水在移动相的比例较高时，才有一定的色谱保留，结果如图 9 所示。对于限进性固定相，移动相一般含水量大，所以，新制备的限进介质固定相符合相应的色谱分析要求。

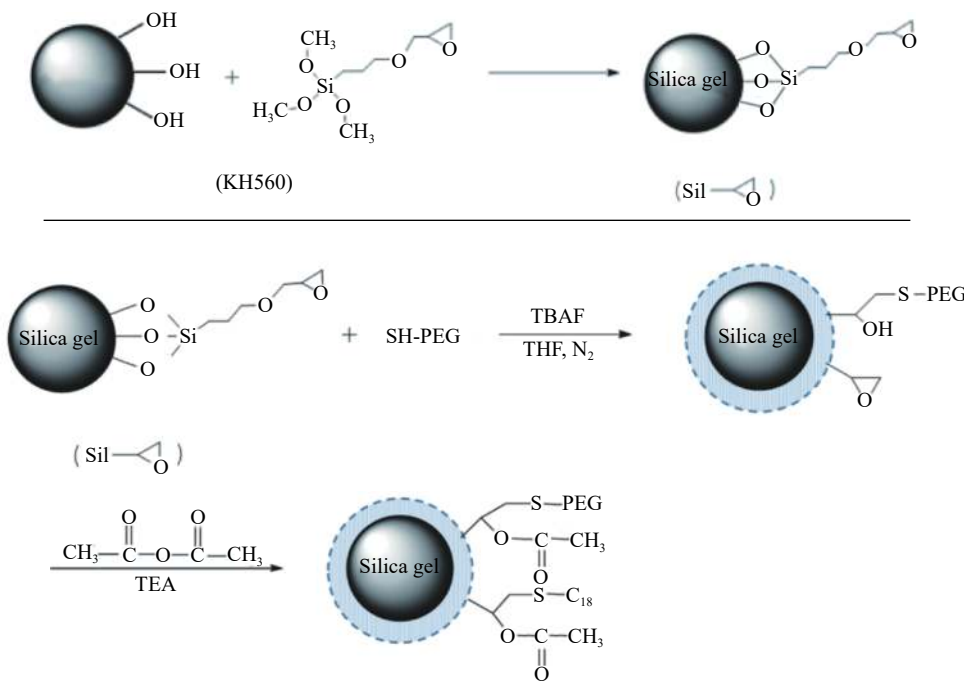


图 8 限进介质固定相制备流程示意图

Fig.8 Schematic diagram of the preparation of restricted access media stationary phase

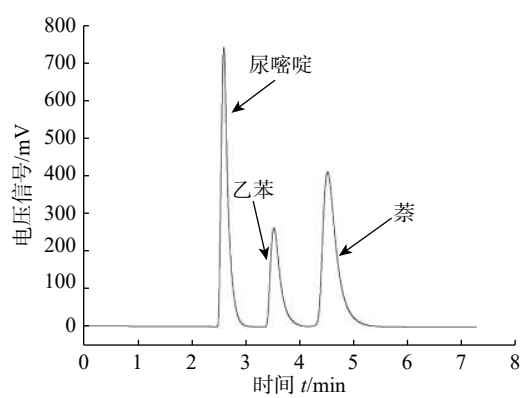


图 9 限进介质固定相的反相色谱测试

Fig. 9 Restricted access media stationary phase reverse phase test

限进介质色谱固定相在药物代谢分析中得到了广泛应用<sup>[19-24]</sup>。一般要求是将血液中的药物过滤后直接进入色谱柱进行色谱分析，血清中的大量蛋白一般以不保留的方式首先流出，被分析药物会渗透到固定相的内部，并在色谱柱上通过反相色谱作用进行分离。本研究所选的 2 种药物分别为酮洛芬和依托度酸，其分子结构如图 10 所示。

将上面 2 种药物分散在牛血清蛋白 BSA 中，直接进样分析，得到的色谱图如图 11 所示。可以看出，在所制备的限进介质色谱固定相上，以流动相为 PBS(pH 3.5)/ACN(80/20, 体积比)，流速为 0.8 ml/min，紫外波长 220 nm 的检测条件下。BSA 无保留地流出，而 2 种药物得到了较好的保

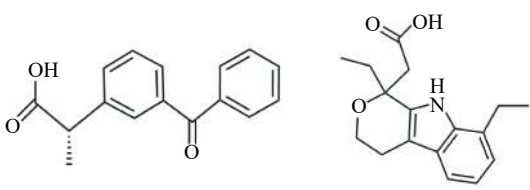


图 10 酮洛芬和依托度酸的分子结构

Fig. 10 Structures of ketoprofen and etodolac

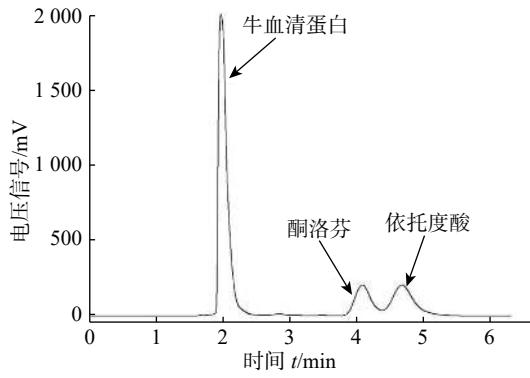


图 11 限进介质固定相 HPLC 分离 BSA 中的酮洛芬和依托度酸

Fig. 11 HPLC for the separation of ketoprofen and etodolac drugs in BSA on the restricted access media stationary phase.

留和分离，与前述的限进介质分离原理一致，可实现这些药物在血清中的定性定量分析。

作者还进一步测试了本研究所制备的硅胶键合前后的比表面积、孔体积和孔径的变化，结果列在表 1 中。由表 1 可以看出，键合前硅胶颗粒的孔径在 16 nm 左右，键合后比表面积和孔径都有

表 1 硅胶基质及 KH-560 键合硅胶的 BET 和 BJH 测试数据

Tab.1 BET and BJH measurement data of the as-prepared silica and KH-560 bonded silica

| 固定相    | 比表面积/(m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ) | 孔体积/(ml·g <sup>-1</sup> ) | 平均孔径/nm |
|--------|-----------------------------------------|---------------------------|---------|
| 硅胶     | 98.02                                   | 0.45                      | 16.36   |
| KH-560 | 86.15                                   | 0.41                      | 15.15   |

所减少,说明硅胶孔表面形成了一薄层键合物质。

### 3 结 论

通过整体柱制备、研磨、煅烧和浮选,得到不定型的介孔硅胶颗粒,颗粒大小在 4~6 μm,孔径约为 16 nm,适合用作当今一般高压液相色谱的填料。采用本文的方法制备硅胶基质,方法简便、成本低、性能好。另外,通过不同表面修饰方法,可以利用本研究得到的硅胶制备出一系列高效液相色谱固定相。这些新型固定相都显示出较好的色谱分离效果,并且在塑化剂的分析和血样中药物的分析方面显示出一定的应用潜力。

可以预计,本研究制备的不定型的介孔硅胶基质,通过其他不同化学键合手段或涂覆法表面修饰后,可满足不同的色谱分离分析的要求。随着色谱技术在生物、医药及环境等领域的广泛应用,新型色谱固定相的研究将发挥巨大作用。

#### 参考文献:

[1] KÖHLER J, KIRKLAND J J. Improved silica-based column packings for high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1987, 385: 125–150.

[2] 杨新立, 王俊德, 熊博晖. 高效液相色谱用硅质填料的进展[J]. *色谱*, 2000, 18(4): 308–312.

[3] 赵贝贝, 张艳, 唐涛, 等. 硅胶基质高效液相色谱填料研究进展[J]. *化学进展*, 2012, 24(1): 122–130.

[4] 牛梦娜, 马红彦, 胡飞, 等. 模板法制备大孔硅胶微球及其在高效液相色谱蛋白质分离中的应用[J]. *色谱*, 2017, 35(6): 565–571.

[5] HUANG M X, MA H Y, NIU M N, et al. Preparation of silica microspheres with a broad pore size distribution and their use as the support for a coated cellulose derivative chiral stationary phase[J]. *Journal of Separation Science*, 2018, 41(6): 1232–1239.

[6] SVEC F, PETERS E C, SÝKORA D, et al. Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 887(1/2): 3–29.

[7] TANAKA N, KOBAYASHI H, ISHIZUKA N, et al. Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 965(1/2): 35–49.

[8] 邹汉法, 吴明火, 王方军, 等. 整体柱制备技术的新进展及其在蛋白质组学中的应用[J]. *色谱*, 2009, 27(5): 526–536.

[9] 熊喜悦, 彭泽强, 舒彦, 等. 硫-烯点击反应在毛细管整体柱制备中的应用[J]. *化学进展*, 2014, 26(1): 152–157.

[10] WU M H, WU R A, LI R B, et al. Polyhedral oligomeric silsesquioxane as a cross-linker for preparation of inorganic-organic hybrid monolithic columns[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(13): 5447–5454.

[11] WANG K Y, CHEN Y Z, YANG H H, et al. Modification of VTMS hybrid monolith via thiol-ene click chemistry for capillary electrochromatography[J]. *Talanta*, 2012, 91: 52–59.

[12] VYVIURSKA O, LV Y Q, MANN B F, et al. Comparison of commercial organic polymer-based and silica-based monolithic columns using mixtures of analytes differing in size and chemistry[J]. *Journal of Separation Science*, 2018, 41(7): 1558–1566.

[13] LIU S J, PENG J X, LIU Z Y, et al. One-pot approach to prepare organo-silica hybrid capillary monolithic column with intact mesoporous silica nanoparticle as building block[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34718.

[14] QIAO J Q, LIANG C, ZHU Z Y, et al. Monolithic alkylsilane column: a promising separation medium for oligonucleotides by ion-pair reversed-phase liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1569: 168–177.

[15] 王照地, 张璐, 郭丙倩, 等. 杂化硅胶整体材料研磨法制备混合型高效液相色谱固定相[J]. *色谱*, 2019, 37(5): 484–490.

[16] KO J H, BAIK Y S, PARK S T, et al. Ground, sieved, and C18 modified monolithic silica particles for packing material of microcolumn high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1144(2): 269–274.

[17] ALI F, CHEONG W J, ALOTHMAN Z A, et al. Polystyrene bound stationary phase of excellent separation efficiency based on partially sub-2 μm silica monolith particles[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1303: 9–17.

[18] ALI F, KIM Y S, LEE J W, et al. Catalyst assisted synthesis of initiator attached silica monolith particles via isocyanate-hydroxyl reaction for production of polystyrene bound chromatographic stationary phase of excellent separation efficiency[J]. *Journal of Chromatography A*,

- 2014, 1324: 115–120.
- [19] SOUVERAIN S, RUDAZ S, VEUTHEY J L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis[J]. *Journal of Chromatography B*, 2004, 801(2): 141–156.
- [20] FAGUNDES V F, LEITE C P, PIANETTI G A, et al. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 947: 8–16.
- [21] XU W J, SU S F, JIANG P, et al. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(46): 7198–7207.
- [22] CASSIANO N M, LIMA V V, OLIVEIRA R V, et al. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 384(7/8): 1462–1469.
- [23] SANTOS-NETO A J, BERGQUIST J, LANÇAS F M, et al. Simultaneous analysis of five antidepressant drugs using direct injection of biofluids in a capillary restricted-access media-liquid chromatography-tandem mass spectrometry system[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1189(1/2): 514–522.
- [24] HUANG W, WANG P P, JIANG P, et al. Preparation and application of a restricted access material with hybrid poly(glycerol mono-methacrylate) and cross-linked bovine serum albumin as hydrophilic out layers for directly on-line high performance liquid chromatography analysis of enrofloxacin and gatifloxacin in milk samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1573: 59–65.
- [25] LIN Z A, TAN X Q, YU R F, et al. One-pot preparation of glutathione-silica hybrid monolith for mixed-mode capillary liquid chromatography based on “thiol-ene” click chemistry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1355: 228–237.
- [26] LIU Z S, LIU J, LIU Z Y, et al. Functionalization of hybrid monolithic columns via thiol-ene click reaction for proteomics analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1498: 29–36.
- [27] SU S F, ZHANG M, LI B L, et al. HPLC determination of sulfamethazine in milk using surface-imprinted silica synthesized with iniferter technique[J]. *Talanta*, 2008, 76(5): 1141–1146.
- [28] XU D, DOND X C, ZHANG H Y, et al. Preparation of bi-layer-polymer coated silica using atom transfer radical polymerization and its application as restricted access phase for HPLC separation of hydrophobic molecules in biological fluids[J]. *Journal of Separation Science*, 2012, 35(13): 1573–1581.
- [29] BINDER S, GADWAL I, BIELMANN A, et al. Thiol-Epoxy polymerization via an AB monomer: synthetic access to high molecular weight poly( $\beta$ -hydroxythioether)s[J]. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 2014, 52(14): 2040–2046.
- [30] GADWAL I, STUPARU M C, KHAN A. Homopolymer bifunctionalization through sequential thiol-epoxy and esterification reactions: an optimization, quantification, and structural elucidation study[J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(8): 1393–1404.

(编辑: 石 瑛)