

## PŘÍPRAVA A APLIKACE MONOLITICKÝCH KOLON JAKO MODERNÍCH SEPARAČNÍCH MÉDIÍ

JIŘÍ VOJTA, ADÉLA MUSILOVÁ-  
SVOBODOVÁ, MARTIN FRANČ, PAVEL  
COUFAL a ZUZANA BOSÁKOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
jiri.vojta@natur.cuni.cz

Věnováno památce pana prof. Ing. Karla Štulíka, DrSc.

Došlo 5.3.13, přijato 10.6.13.

Klíčová slova: monolitické kolony, organické polymery, silika, příprava, aplikace

### Obsah

1. Úvod
2. Monolity na bázi organického polymeru a jejich příprava
  - 2.1. Modifikace povrchu organických monolitů
3. Monolity na bázi oxidu křemičitého
  - 3.1. Příprava a charakteristika silikových monolitů
4. Aplikace monolitických kolon
5. Závěr

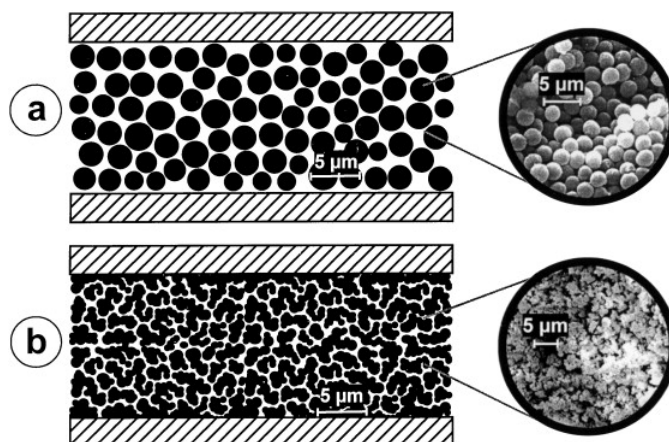
### 1. Úvod

Úvodem tohoto referátu bychom rádi předeslali, že následující text je určen především pro čtenáře, kteří

s monolity začínají a hledají základní obecné informace o monolitických kolonách a jejich přípravě. Text je více orientován na organické monolitické fáze, jejichž příprava v laboratoři je jednodušší a rozšířenější.

Monolitické stacionární fáze jsou unikátní separační média, která jsou vytvořena z jednoho kusu pórovitého materiálu, nejčastěji na bázi organického polymeru nebo oxidu křemičitého. Historie monolitických kolon započala ve druhé polovině 20. století a v českém článku ji přehledně zpracoval František Švec<sup>1</sup>. V dnešní době se monolitických stacionárních fází využívá zejména v kapilární kapalinové chromatografii (CLC), kapilární elektrochromatografii (CEC) a v klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) ve formě kolon či monolitických disků. Morfologický rozdíl mezi monolitickou a klasickou náplňovou kolonou je schematicky znázorněn na obr. 1.

Monolity mají bimodální charakter pórů, obsahují velké póry umožňující průtok mobilní fáze (makropóry > 50 nm, nejčastěji cca 1  $\mu\text{m}$ ) a malé póry, které zajišťují dostatečný specifický povrch pro interakci s analytem (mezopóry 2–50 nm, mikropóry < 2 nm). Tato distribuce pórů je typická pro monolity na bázi oxidu křemičitého. Naproti tomu organické monolity v sobě mezopóry mohou<sup>3</sup>, ale i nemusí obsahovat<sup>4</sup>. Monolitická fáze vyplňuje celý vnitřní prostor kolony, mobilní fáze tak protéká přímo stacionární fází a analyty se k aktivním centřům dostávají konvektivním tokem, čímž se urychluje jejich transport kolonou a interakce se stacionární fází. Matematický popis přenosu hmoty v monolitech byl teoreticky odvozen Liapisev v roce 1999 (cit.<sup>5</sup>). Makropóry také umožňují kratší analýzy, jelikož lze použít vyšší průtok mobilní fáze bez výrazné ztráty účinnosti a překročení tlakového limitu chromatografického systému. Monolitická média vytvořená z organických polymerů jsou také stabilní v široké škále hodnot pH, lze je přechovávat i v nespočteném stavu



Obr. 1. Struktura stacionární fáze (a) v náplňové a (b) v monolitické koloně; cit.<sup>2</sup>

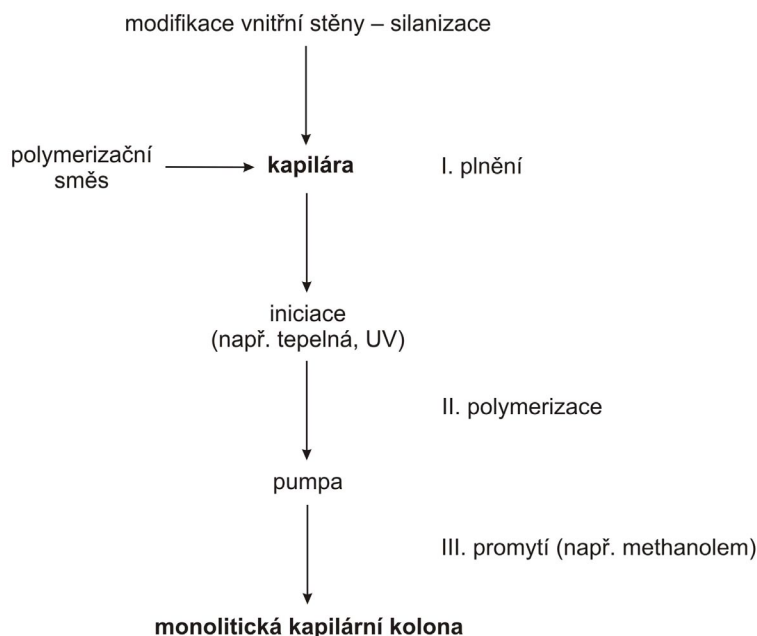
a působením tlaku postupně nesedají jako kolony náplňové.

## 2. Monolity na bázi organického polymeru a jejich příprava

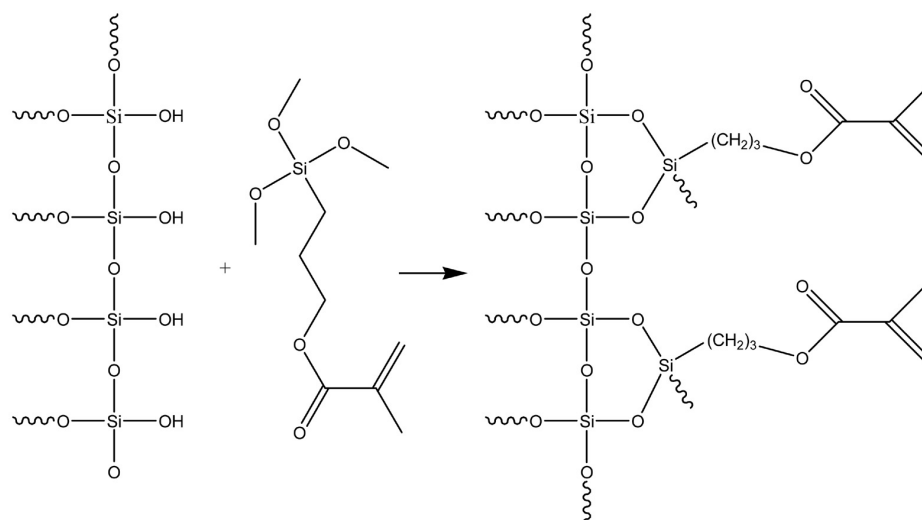
Polymerizační směs pro přípravu organických monolitů se skládá z monomeru, síťovacího činidla (zpravidla molekula obdobná monomeru, avšak obsahující dvě dvojně vazby), iniciátoru a porogenní směsi. Složky porogenní směsi nejsou zabudovány do polymerní struktury monolitu, pouze vznikající monolit solvatují a jejich objem tak udává jeho konečnou porozitu. Nejpoužívanějšími monomery jsou deriváty methakrylátu, akrylamidu a styrenu. Nejběžnějšími síťovacími činidly pak jsou ethylen-dimethakrylát a divinylbenzen. Monolity se nejčastěji připravují radikálovou kopolymerizací, při které je polymerizační směs uzavřena v těle budoucí separační kolony (*in situ*). V prvním kroku se iniciátor (např.  $\alpha,\alpha'$ -azobisisobutyronitril) rozpadá na radikály, které iniciují vlastní polymerizační reakci. Vzniká polymerizační řetězec, který s časem nabývá na hmotnosti a postupně se více síťuje, až se stává v polymerizační směsi nerozpustným a precipituje jako takzvané polymerizační jádro. Pro vzniklé jádro jsou termodynamicky výhodnějšími solventy monomery než složky porogenní směsi a polymerizace tak dále pokračuje uvnitř jádra i v okolní kapalině. Polymerizace uvnitř jádra je však kineticky preferována, jelikož koncentrace monomerů v jádře je vyšší. Řetězce polymeru vzniklé v kapalině jsou brzy zachyceny jádrem, které s časem dále narůstá. Když jádro doroste do určité velikos-

ti, síťováním se spojí se sousedními jádry a vytvoří shluk. V pozdější fázi polymerizace se narůstající shluky spojují a vytvářejí strukturu s průtočnými póry, která dále zesiluje vnitřním síťováním a narůstá o nové řetězce vytvořené polymerizací v roztoku až do konečné podoby tuhého monolitu, který uvnitř pórů obsahuje pouze nereaktivní porogenní směs. Naproti tomu sférické částice organických polymerů používané v náplňových kolonách se vytvářejí procesem suspenzní polymerizace a morfologie těchto částic je ovlivněna dalšími vlivy, jako jsou dynamika míchání polymerizační směsi a mezifázové napětí mezi vodnou a organickou fází. Sférické částice a monolity připravené z totožné polymerizační směsi mají pak odlišnou vnitřní strukturu<sup>6</sup>. Jedním z hlavních směrů využití monolitických kolon ve výzkumu jsou kapilární separační metody (CLC, CEC). Křemenné kapiláry vyplněné organickou monolitickou stacionární fází však zatím nejsou komerčně dostupné a příprava těchto kolon se tedy musí uskutečňovat přímo v laboratoři. Na obr. 2 je znázorněno schéma přípravy kapilární monolitické kolony na bázi organického polymeru.

Pro účely CLC je nezbytné pevné uchycení monolitické stacionární fáze k vnitřní stěně kapiláry, aby vlivem tlaku kapaliny nedošlo k jejímu vytlačení. Pevné spojení monolitu se stěnou křemenné kapiláry se realizuje procesem silanizace, kterým se na stěnu kapiláry chemicky naváže sloučenina s dvojnou vazbou. Tato dvojná vazba se pak přímo účastní polymerizace monolitu, a ten je tak navázán ke stěně kapiláry na mnoha místech kovalentní vazbou. Schéma silanizace křemenné kapiláry 3-(trimethoxysilyl)-propyl-methakrylátem (dále jen  $\gamma$ -MAPS) je znázorněno na obr. 3.

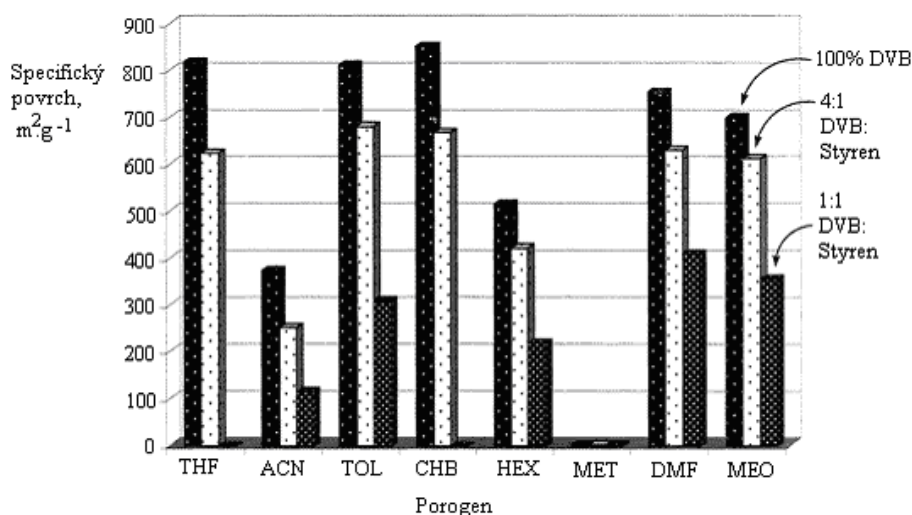


Obr. 2. Schéma přípravy kapilární kolony s organickou monolitickou stacionární fází; cit.<sup>7</sup>

Obr. 3. Schéma silanizace křemenné kapiláry  $\gamma$ -MAPS; cit.<sup>8</sup>

V prvním kroku je nutné povrch kapiláry aktivovat hydroxidem sodným a vodou, čímž se siloxanové skupiny převedou na silanolové. Silanolové skupiny jsou pak přístupné pro vlastní reakci se silanizačním činidlem. Podmínky, při kterých se jednotlivé kroky silanizace provádějí, se často liší v použitém rozpouštědle, koncentraci silanizačního činidla a hydroxidu, čase i teplotě. Způsob silanizace ovlivňuje charakteristiky vnitřní stěny kapiláry, jako jsou kontaktní úhel, smáčivost a adheze<sup>8</sup>, a nepřímo tak i vlastnosti budoucí monolitické stacionární fáze.

Vhodným výběrem monomerů ovlivňujeme nejen chemickou podstatu monolitu, ale i jeho morfologii<sup>9</sup>. Různé monomery mají totiž rozdílné sférické a další fyzikálně-chemické vlastnosti, odlišně interagují se složkami porogenní směsi a mají jinou reakční kinetiku. Na morfologii výsledného monolitu má významný vliv i množství síťovacího činidla. Na obr. 4 je sloupcovými grafy znázorněn nárůst specifického povrchu poly(styren-*co*-divinylbenzenového) monolitu s rostoucím zastoupením divinyl-



Obr. 4. Závislost specifického povrchu poly(styren-*co*-divinylbenzenového) monolitu na obsahu síťovacího činidla a použitého porogenu. DVB – divinylbenzen, THF – tetrahydrofuran, ACN – acetonitril, TOL – toluen, CHB – chlorbenzen, HEX – *n*-hexan, MET – methanol, DMF – *N,N*-dimethylformamid, MEO – methyl-*tert*-butyl ether. Převzato se souhlasem z cit.<sup>10</sup>. Copyright (2001) American Chemical Society

benzenu v polymerizační směsi při použití různých porogenu. Při vyšším obsahu síťovacího činidla je polymer vznikající v počáteční fázi polymerizace více zesíťován a ze směsi precipituje jádro menší velikosti. Spojování menších jader vede i k menšímu objemu mezi nimi, a tedy i k menším pórům monolitu a jeho rostoucímu specifickému povrchu.

Zvýšením obsahu síťovacího činidla tedy dosáhneme vyššího specifického povrchu monolitu, avšak snížíme množství základního monomeru na jeho povrchu. Změny morfologických vlastností monolitu při zachování chemického složení pak dosáhneme v první řadě optimalizací porogenní směsi. Porogenní směs ovlivňuje velikost pórů monolitu solvatací vznikajícího polymerovaného jádra. S rostoucí schopností porogenu solvatovat jádro klesá zastoupení monomerů v jeho okolí a z polymerizační směsi precipituje jádro menší velikosti, což vede k menším pórům a vyššímu specifickému povrchu monolitu. Z obr. 4 vyplývá, že např. toluen je dobrým solvatačním činidlem pro poly(styren-*co*-divinylbenzenové) monolity, zatímco polární methanol nikoli. Velmi často se v porogenních směsích používá dodekan-1-ol, který je slabým solvatačním činidlem a kterým lze zvětšit póry styrenových i methakrylátových monolitů. Morfologii a částečně i chemické složení monolitu je možné ovlivnit časem polymerizace. Například monolit na bázi poly(butyl-methakrylát-*co*-ethylen-dimethakrylátu) je v počáteční fázi polymerizace tvořen malými globulemi, které obsahují více síťovacího činidla než základního monomeru. S postupem času se globule spojují a tvoří shluky, čímž se ztrácí zastoupení mezopórů ze struktury monolitu. S narůstajícím časem tak klesá porozita a specifický povrch monolitu<sup>11</sup>.

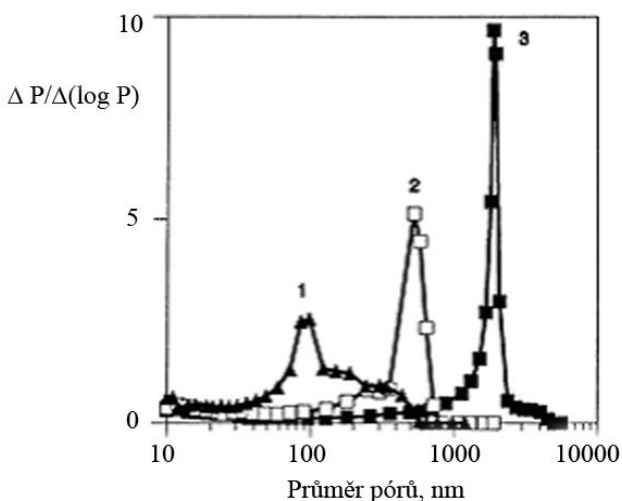
Pravděpodobně nejpoužívanějším způsobem iniciace polymerizace je iniciace termická. Jako iniciátoru se obvykle

používá  $\alpha,\alpha'$ -azobisisobutyronitrilu (dále jako AIBN). Na obr. 5 je znázorněn vliv teploty na distribuci pórů poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylen-dimethakrylátového) monolitu. V souladu s mechanismem vzniku vede vyšší teplota ke zmenšení pórů. Při vyšší teplotě se rychleji rozpadá iniciátor a vzniká více jader a více shluků. Jelikož je množství monomerů konstantní, musí mít při větším počtu jednotlivé shluky menší velikost a jejich spojováním vzniká monolit s menšími póry a vyšším specifickým povrchem. V oblasti nižších teplot (55–70 °C) toto pravidlo však není zcela univerzální. Efekt zvýšení rozpustnosti vznikajícího polymeru ve směsi s rostoucí teplotou a následná precipitace jádra o větší velikosti se u polymerizace monolitů neprojeví<sup>12</sup>.

Druhým nejčastějším způsobem iniciace polymerizace je působení UV záření. Jako iniciátor lze opět použít AIBN, ale častější je použití 2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenonu (DMPAP). Výhodou iniciace UV zářením je především rychlost. Polymerizace iniciovaná tímto způsobem trvá několik málo minut, zatímco termicky iniciovaná polymerizace probíhá v řádu hodin. Iniciace UV zářením za laboratorní teploty také umožňuje použití složek porogenní směsi s nižším bodem varu, které by se při teplem iniciované polymerizaci odpařily. Nevýhodou tohoto způsobu iniciace je nutnost použití těla kolony vytvořeného z materiálu dobře prostupného pro UV záření. V případě kapilárních kolon to znamená použití křemenných kapilár potažených tetrafluorem, které jsou mnohonásobně dražší než běžné kapiláry potahované polyimidem. Iniciace UV zářením také prakticky znemožňuje použití monomerů na bázi styrenu, které v této oblasti spektra výrazně absorbují. Radikálovou polymerizaci lze iniciovat i dalšími způsoby, jako je např. mikrovlnné či  $\gamma$ -záření. Monolitické kolony se také nepřipravují pouze polymerizací s volnými radikály, ale i dalšími způsoby, které jsou přehledně popsány v článku<sup>14</sup> z roku 2010.

## 2.1. Modifikace povrchu organických monolitů

Různé druhy interakcí v chromatografii vyžadují od stacionárních fází přítomnost funkčních skupin a u monolitických kolon existují dva základní přístupy, jak dosáhnout přítomnosti těchto klíčových skupin na povrchu monolitu. Principiálně nejjednodušší je použití základního monomeru, který požadovanou funkční skupinu obsahuje. Takto lze připravit monolity, které obsahují např. skupinu hydroxylovou, amidovou, sulfonovou, fosfátovou a karboxylovou<sup>15</sup>. Výhodou tohoto přístupu je jednoduchá příprava, na druhou stranu značná část použitého monomeru je obsažena i ve vnitřní struktuře monolitu a naopak na povrchu je přítomné i síťovací činidlo. Požadovaná funkční skupina monomeru také může být příčinou jeho omezené rozpustnosti v polymerizační směsi, což může limitovat jeho obsah, nebo i znemožnit jeho použití. Druhý přístup zahrnuje metody chemické modifikace povrchu již vytvořeného monolitu. Postup je tedy víceokrový, což může vést ke snížení reprodukovatelnosti výsledných kolon a ke zvýšení časové, materiálové i energetické náročnosti přípravy.



Obr. 5. Distribuce pórů poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylmethakrylátového) monolitu při různých teplotách polymerizace (1) 80 °C, (2) 70 °C, (3) 55 °C. Měřeno rtuťovým porozimetrem. Převzato se souhlasem z cit.<sup>13</sup>. Copyright (1996) American Chemical Society

Existuje mnoho způsobů chemické modifikace povrchu monolitů. Základním přístupem je chemická reakce funkční skupiny přítomné na povrchu monolitu s funkční skupinou derivatizačního činidla, které obsahuje i skupinu potřebnou pro provedení požadovaného druhu chromatografie. K tomuto účelu se jako základního monomeru s výhodou užívá glycidyl-methakrylát, který obsahuje reaktivní epoxidovou skupinu. Použitím vhodných derivatizačních činidel lze pak připravit např. širokou škálu iontově výměnných kolon<sup>16–20</sup>. Tímto způsobem se odstraní komplikace s rozpustností molekuly obsahující funkční skupinu. Navíc základní monolit, u kterého byla optimalizována příprava pro získání požadovaných morfologických vlastností, lze použít pro modifikaci s různými činidly a získat tak morfologicky obdobné kolony, které při separaci poskytují odlišné interakce. Experimentálně náročnější modifikací povrchu monolitů je technika roubování (grafting), při které se na povrch monolitu radikálovou polymerizací navazují řetězce funkčních monomerů. Na hydrolyzované epoxidové skupiny poly(glycidyl-methakrylát-co-ethylen-dimethakrylátového) monolitu byly například navázány polymerní řetězce 2-akrylamido-2-methylpropan-1-sulfonové kyseliny pomocí iniciace ceričitými ionty<sup>21</sup>. Na obr. 6 je pak znázorněno schéma dvoukrokového roubování vybraného monomeru iniciovaného UV zářením.

V prvním kroku se pomocí záření bisfenon radikálově naváže na povrch monolitu. Váže se namísto atomu vodíku, tudíž není třeba žádného speciálního reakčního monomeru. Ve druhém kroku molekuly bisfenonu navázané na monolit pracují jako iniciátor a „vyrůstají“ na nich polymerní řetězce z funkčního monomeru. Výhodou dvoukrokového postupu je eliminace problému s rozpustností nepolárního iniciátoru v polárnějším monomeru. Dále také nedochází k tvorbě polymerních řetězců v roztoku, které by nebyly navázány na monolit. Výhodou techniky roubování oproti chemické derivatizaci monolitu je vyšší zastoupení funkčních skupin na povrchu a lepší využití některých vzácných monomerů, které by mohly být v základní polymerizační směsi nerozpustné. Zajímavou technikou úpravy povrchu poly(styren-co-chlormethylstyren-co-divinylbenzenového) monolitu je tzv. hypercrosslinking, kterým nezavádíme funkční skupinu do monolitu, ale ovlivňujeme jeho morfologické vlastnosti. Vlivem reakční kinetiky zreauje veškerý divinylbenzen rychleji a na povrchu mo-

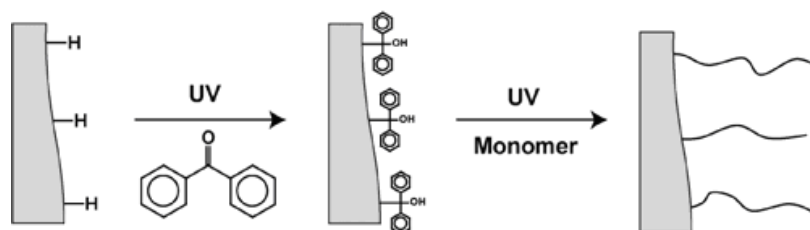
nolitu tak zbývají velmi málo zesíťované řetězce. Tyto řetězce lze 1,2-dichlorethanem rozvolnit a vzájemnou Friedel-Craftsovou alkyací fixovat jejich strukturu ve formě vysoce zesíťované vrstvičky polymeru. Tzv. hypercrosslinkovaný monolit má až čtyřikrát vyšší specifický povrch a díky své komplexní morfologii je vhodný pro analýzy malých i velkých molekul<sup>23</sup>.

### 3. Monolity na bázi oxidu křemičitého

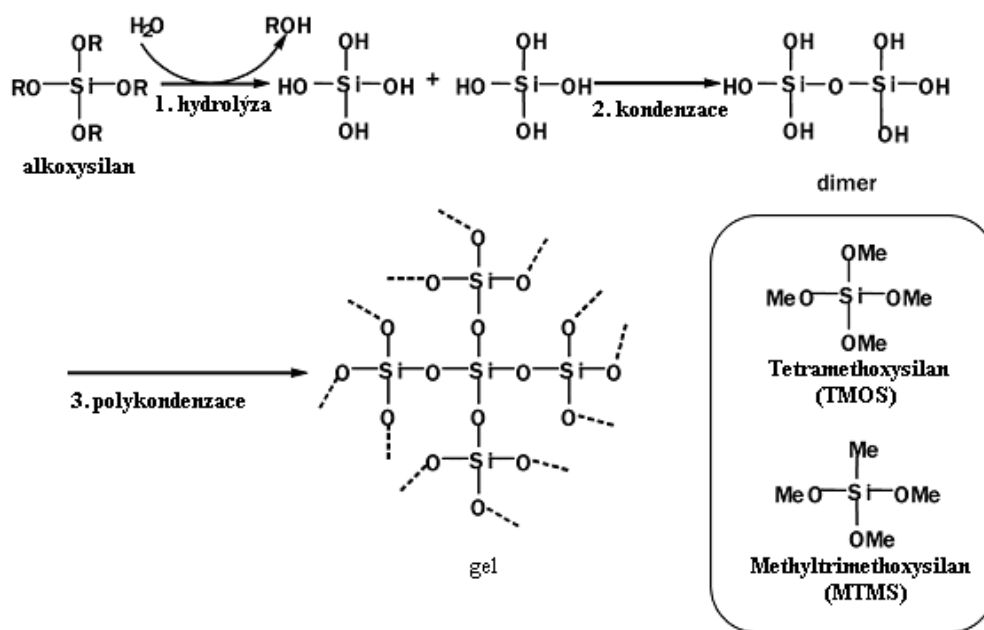
Náplňové kolony tvořené částicemi silikagelu si stále zachovávají dominantní postavení v oblasti kapalinové chromatografie, nicméně jejich možnou a zároveň výhodnou alternativou jsou anorganické monolity. Začátkem 90. let Nakanashi a Soga představili postup přípravy spojitého porézního materiálu (novou technologií sol-gel) z oxidu křemičitého s bimodální distribucí pórů<sup>24</sup>. První HPLC aplikace na porézní tyčince z oxidu křemičitého modifikované oktadecylovými řetězci je připisována Tanakovi a spol.<sup>25</sup>, který demonstroval použití tohoto separačního média v reverzním módu jak pro separace malých, tak velkých molekul. O dva roky později byla popsána *in situ* příprava silikových monolitů v kapiláře o vnitřním průměru 100  $\mu\text{m}$  (cit.<sup>26</sup>). V současnosti jsou komerčně dostupné monolitické kolony na bázi siliky různých rozměrů pod názvem Chromolith<sup>TM</sup> od firmy Merck (Německo) a Onyx<sup>TM</sup> od firmy Phenomenex (USA).

#### 3.1. Příprava a charakteristika silikových monolitů

Monolity na bázi siliky se nejčastěji připravují takzvaným sol-gel procesem. Příprava je založena na hydrolytické iniciované polykondenzaci tetraalkoxysilanů, např. tetramethoxysilanu (TMOS), tetraethoxysilanu (TEOS) nebo methyltrimethoxysilanu (MTMS), doprovázené oddělením fázi v přítomnosti ve vodě rozpustného organického polymeru (porogenu), např. poly(ethylenoxidu) (PEO), nebo polyakrylové kyseliny. Schéma typického sol-gel procesu znázorňuje obr. 7. Jednou z preferovaných metod přípravy silikových tyčinek je hydrolyza TMOS vodním roztokem 0,01 M octové kyseliny obsahujícím PEO (cit.<sup>27</sup>). Octová kyselina zde plní funkci katalyzátoru. Po důkladném promíchání je homogenní směs naplněna do formy a ponechána reagovat při zvýšené teplotě.



Obr. 6. Ilustrační schéma dvoukrokového „photograftingu“ s použitím bisfenonu jako iniciátoru. Převzato se souhlasem z cit.<sup>22</sup>. Copyright (2006) American Chemical Society

Obr. 7. Typická reakce sol-gel a příslušné monomery; cit.<sup>28</sup>

K vytvoření gelu dochází již po dvou hodinách a následuje zrání gelu, které trvá i několik dnů. Tyčinka je poté promyta destilovanou vodou a následně vystavena působení hydroxidu amonného za zvýšené teploty, čímž dochází k vytvoření sítě mezopórů. Následuje fáze vysušení vzniklého gelu a vytvoření kolony vložení tyčinky do formy z vhodného materiálu. Silikový monolit umístěný v koloně je možné dále modifikovat navázáním různých funkčních skupin, nejčastěji se jedná o oktadecylaci.

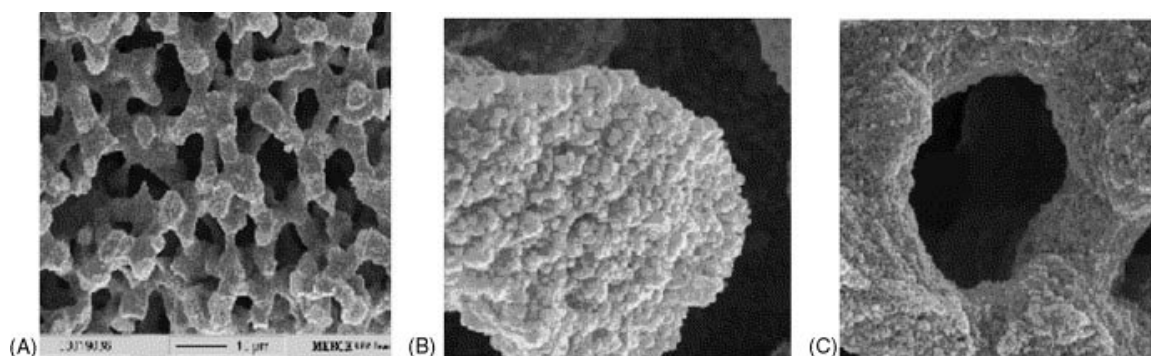
Na výslednou strukturu a chemické složení monolitu má vliv celá řada faktorů. Rozhodující jsou hodnoty pH reakční směsi<sup>29</sup>, použité rozpouštědlo, koncentrace reaktantů, množství vody v systému, volba katalyzátoru hydrolyzy a kondenzace, v neposlední řadě pak teplota a reakční čas. Obecně platí, že s rostoucím pH směsi vzrůstá porozita gelu a klesá specifický povrch a se zvyšující se koncentrací TMOS roste mechanická stabilita monolitu. Na rozdíl od organických monolitů dochází u silikových monolitů během přípravy ke značnému smrštění stacionární fáze. Toto zmenšení objemu nedovoluje přípravu *in situ*, a vyžaduje dvoukrokovou přípravu. V prvním kroku je monolit připraven ve vhodné formě a poté vpraven do pouzdra ze smrtivého materiálu PEEK (poly(ether-ether-ke-ton)), který plní funkci těla kolony. Chceme-li připravit tyčinku konvenčních rozměrů o průměru 4,6 mm, je nutné vycházet z formy o vnitřním průměru 6 mm. U chromatografických kolon běžných rozměrů může po sušení docházet k praskání, což monolit činí nepoužitelným pro chromatografické separace. Objemové změny s sebou přinášejí také omezení z hlediska délky kolon, proto je obtížné připravit

tyčinky delší než 15 cm, aniž by nedocházelo k jejich ohybu. Výhodou přípravy kapilárních kolon je pak stejně jako u organických monolitů kovalentní navázání monolitu na vnitřní stěnu křemenné kapiláry<sup>30</sup>. Jak je patrné z předchozího textu, je příprava silikových monolitů v laboratorních podmínkách relativně obtížná, proto se běžně pro separace využívají komerčně dostupné kolony, které se velmi často v laboratoři dále modifikují. Na trhu dostupné silikové monolity obsahují makropóry o velikosti kolem 2  $\mu\text{m}$  a mezopóry o velikosti 13 nm a dosahují specifického povrchu kolem 300  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  (cit.<sup>31</sup>). Obr. 8 demonstruje typickou porézni strukturu silikového monolitu.

#### 4. Aplikace monolitických kolon

Aplikace monolitických kolon zahrnují separace nízko- i vysokomolekulárních látek, v HPLC i CEC (cit.<sup>32</sup>). Povaha a velikost pórů umožňují velmi dobrou propustnost pro větší molekuly, a proto jsou organické monolity vhodným materiálem pro separace proteinů, oligo- a polynukleotidů, štěpů DNA, a dokonce i živých mikroorganismů. Přehledný článek<sup>33</sup> z roku 2012 však poukazuje na skutečnost, že dnes již můžeme s porézni polymerními materiály na bázi organického polymeru dosáhnout velmi účinných separací malých molekul za izokratických podmínek. Díky rozmanitosti monolitických stacionárních fází se můžeme s monolity setkat jak v chromatografii na reverzní fázi (RPC), tak při hydrofobní interakční chromatografii (HIC), v iontové výměnné (IEC) a afinitní chromatografii





Obr. 8. SEM obrázky typické porézní struktury monolitu na bázi oxidu křemičitého (A), struktura mezopórů (B) a průtočných pórů (C); cit.<sup>31</sup>

(AC) nebo v chromatografii na molekulových sítích (SEC). Pro reverzní chromatografii je možné využít jak anorganických, tak organických monolitů. Separační média založená na kopolymerech styrenu a divinylbenzenu i monolity na bázi oxidu křemičitého byly úspěšně použity pro separace proteinů, peptidů a alkylbenzenů v reverzním módu<sup>32</sup>. Vhodnou alternativou k reverzní chromatografii je hydrofobní interakční chromatografie, která využívá vodných mobilních fází s přísadkou solí. Tato metoda je zvláště vhodná pro separace proteinů, u kterých díky absenci organického modifikátoru zůstává zachována jejich biologická aktivita. Jako separační média pro hydrofobní interakční chromatografii proteinů byly úspěšně použity monolitické kolony založené na kopolymerech polyakrylamidu a butylmethakrylátu<sup>34</sup>. Monolitické kolony na bázi siliky se zapolymerovanou akrylovou kyselinou nebo akrylamidem je možné využít ve spojení s hydrofilní interakční chromatografií (HILIC)<sup>35</sup>, která je vhodnou volbou v případě separací velmi polárních látek. O odlišných přístupech ke vzniku monolitických iontoměničů organického typu pojednává odstavce 2.1. V případě silikových monolitů se pro zavedení nabitých skupin v naprosté většině případů využívá technika postpolymerizační modifikace, kdy je možné postupnými kroky získat stacionární fáze tvořené anexem i katexem zároveň<sup>36</sup>. U afinitní chromatografie jsou na povrchu monolitu imobilizovány ligandy, které dokážou specificky interagovat s jednotlivými složkami vzorku. Jako ligandy mohou vystupovat barviva, bílkoviny, enzymy (i jejich substráty, koenzymy či inhibitory), protilátky nebo antigeny, polysacharidy atd. Využití monolitů v oblasti afinitní chromatografie podrobně popisuje souhrnný článek<sup>37</sup> z roku 2011. Další skupinu tvoří vtištěné polymery, tzv. „MIPs – molecularly imprinted polymers“<sup>44</sup>. V tomto případě nedochází k imobilizaci ligandu jako u afinitní chromatografie, ale ke vtištění templátu do matrice. Templát je následně z monolitu vhodným činidlem uvolněn. Vývoj a možné použití vtištěných organických i anorganických monolitů v HPLC a CEC mapuje ucelený článek<sup>38</sup> z roku 2011. Vhodnou chemickou modifikací monolitů a zabudováním chirálního selektoru vznikají chirální stacionární fáze, které se velmi dobře uplatňují při

farmaceutických analýzách v elektrochromatografickém módu<sup>39</sup>. Monolitické materiály však nemusí sloužit pouze jako separační média v chromatografických metodách, ale lze jich s výhodou využít i při prekoncentračních krocích a extrakci na pevné fázi (SPE) nebo jako nosiče pro imobilizaci enzymů. Slibné je především jejich využití v miniaturizovaných systémech, jakými jsou čipy, kde je dosti obtížné homogenně naplnit malý prostor částicemi. O pokročilých aplikacích monolitů pojednává souhrnný článek<sup>40</sup> z roku 2010.

## 5. Závěr

Pravděpodobně největší výhodou monolitických stacionárních fází je možnost měnit vnitřní strukturu (objem a distribuci pórů), a tím ovlivňovat výsledné separační vlastnosti chromatografických kolon. Ve srovnání s klasickými náplňovými kolonami jsou monolity výjimečné díky svým hydrodynamickým vlastnostem. Nezanedbatelnou výhodou je také absence frit, kterou lze ocenit především v elektrochromatografickém módu. Ačkoliv mají monolitické kolony řadu unikátních vlastností oproti běžným stacionárním fázím, ani jim se určitá omezení nevyhnu. U monolitů na bázi organického polymeru můžeme jmenovat botnání v organických rozpouštědlech, které může ovlivnit celkovou porozitu stacionární fáze a tedy i separační účinnost. U anorganických monolitů je to především rozpustnost oxidu křemičitého v alkalickém prostředí a celkově obtížnější příprava v laboratorních podmínkách. V každém případě je monolitům v současnosti věnována velká pozornost, ať už vědeckými týmy či firmami, zabývajícími se vývojem nových separačních médií. Za vše mluví jak vysoký počet časopiseckých publikací a dvě rozsáhlé monografie<sup>41,42</sup>, tak skutečnost, že jsou tomuto tématu věnovány samostatné sekce na chromatografických konferencích.

*Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSMT 0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, dále za podpory projektu SVV Univerzity Karlovy*

v Praze a projektu GAUK 349511 Grantové Agentury Univerzity Karlovy v Praze.

## LITERATURA

- Švec F.: Chem. Listy 98, 232 (2004).
- Oberacher H., Huber C. G.: Trends Anal. Chem. 21, 166 (2002).
- Wang Q. C., Svec F., Fréchet J. M. J.: Anal. Chem. 65, 2243 (1993).
- Lee D., Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 1051, 53 (2004).
- Meyers J. J., Liapis A. I.: J. Chromatogr., A 852, 3 (1999).
- Svec F., Fréchet J. M. J.: Chem. Mater. 7, 707 (1995).
- Urban J., Jandera P.: J. Sep. Sci. 31, 2521 (2008).
- Courtois J., Szumski M., Byström E., Iwasiewicz A., Shchukarev A., Irgum K.: J. Sep. Sci. 29, 14 (2006).
- Svec F., Fréchet J. M. J., v knize: *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications* (Svec F., Tennikova T. B., Deyl Z., ed.), kap. 2. Elsevier, Amsterdam 2003.
- Santora B. P., Gagné M. R.: Macromolecules 34, 658 (2001).
- Nischang I., Brüggemann O.: J. Chromatogr., A 1217, 5389 (2010).
- Svec F., Fréchet J. M. J.: Macromolecules 28, 7580 (1995).
- Viklund C., Svec F., Fréchet J. M. J.: Chem. Mater. 8, 744 (1996).
- Svec F.: J. Chromatogr., A 1217, 902 (2010).
- Nordborg A., Hilder E. F.: Anal. Bioanal. Chem. 394, 71 (2009).
- Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 702, 89 (1995).
- Sýkora D., Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 852, 297 (1999).
- Wieder W., Bisjak C. P., Huck C. W., Bakry R., Bonn G. K.: J. Sep. Sci. 29, 297 (2006).
- Ueki Y., Umemura T., Li J., Odake T., Tsunoda K.: Anal. Chem. 76, 7007 (2004).
- Yang G., Liu H., Zhang Y., Wang S., Yin B., Chen Y.: J. Chromatogr., A 1129, 231 (2006).
- Viklund C., Svec F., Fréchet J. M. J.: Biotechnol. Prog. 13, 597 (1997).
- Stachowiak T. B., Svec F., Fréchet J. M. J.: Chem. Mater. 18, 5950 (2006).
- Urban J., Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 1217, 8212 (2010).
- Nakanishi K., Soga N.: J. Am. Ceram. Soc. 74, 2518 (1991).
- Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N.: Anal. Chem. 68, 3498 (1996).
- Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N.: J. High Resol. Chromatogr. 21, 477 (1998).
- Nakanishi K., Minakuchi H., Soga N., Tanaka N.: J. Sol-Gel Sci. Technol. 8, 547 (1997).
- Kato M., Sakai-Kato K., Toyo'oka T.: J. Sep. Sci. 28, 1893 (2005).
- Brus J., Kotlík P.: Chem. Listy 92, 302 (1998).
- Ishizuka N., Kobayashi H., Minakuchi H., Nakanishi K., Hirao K., Hosoya K., Ikegami T., Tanaka N.: J. Chromatogr., A 960, 85 (2002).
- Cabrera K.: J. Sep. Sci. 27, 843 (2004).
- Zou H., Huang X., Ye M., Luo Q.: J. Chromatogr., A 954, 5 (2002).
- Svec F.: J. Chromatogr., A 1228, 250 (2012).
- Xie S. F., Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 775, 65 (1997).
- Horie K., Ikegami T., Hosoya K., Saad N., Fiehn O., Tanaka N.: J. Chromatogr., A 1164, 198 (2007).
- Ikegami T., Ichimaru I., Kajiwara W., Nagasawa N., Hosoya K., Tanaka N.: Anal. Sci. 23, 109 (2007).
- Arrua R. D., Igarzabal C. I. A.: J. Sep. Sci. 34, 1974 (2011).
- Zheng Ch., Huang Y.-P., Liu Z.-S.: J. Sep. Sci. 34, 1988 (2011).
- Mangelings D., Heyden Y. V.: Electrophoresis 32, 2583 (2011).
- Vázquez M., Paull B.: Anal. Chim. Acta 668, 100 (2010).
- Svec F., Tennikova T. B., Deyl Z. (ed.): *Monolithic Materials: Preparation, Properties, and Applications*. Elsevier, Amsterdam 2003.
- Wang P.G. (ed.): *Monolithic Chromatography and its Modern Application*, ILM Publications, St Albans 2010.

**J. Vojta, A. Musilová-Svobodová, M. Franc, P. Coufal, and Z. Bosáková** (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague): **Preparation and Application of Monolithic Columns as Modern Separation Media**

This article provides basic information on monolithic columns for separation purposes. General characteristics of monolithic columns and their difference from common packed columns are described. Preparation of monolithic columns, various effects on their morphological properties and possible applications are discussed, for both organic and silica monoliths.