

MODIFIKACE MONOLITŮ POMOCÍ ALKYLOVÝCH DERIVÁTŮ

1.1 Důvody modifikace monolitu pomocí C₈ a C₁₈

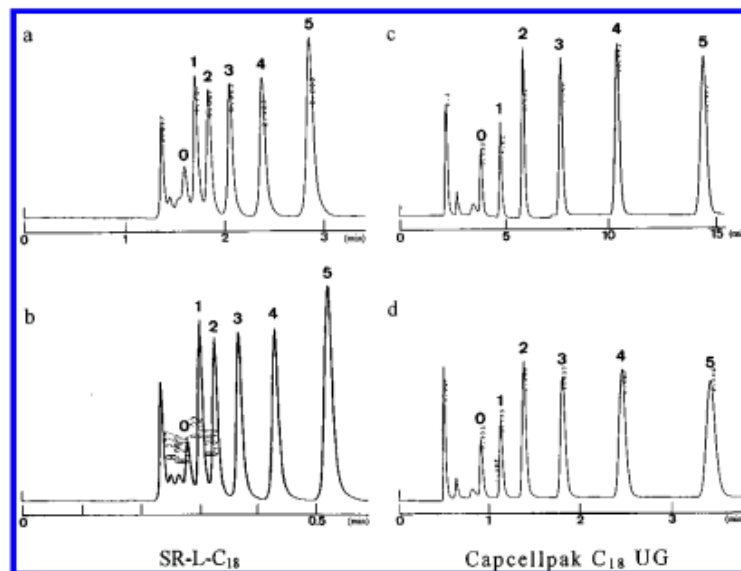
Separace a extrakce v kolonách probíhá ve dvou módech, v normálním a reverzním. Pro využití monolitů v reverzním módu je třeba jejich povrch upravit tak, aby byl nepolární.

Základními druhy monolitů jsou organické polymerní a anorganické silikové. Polymerní monolity na základě metakrylátů jsou jedny z nejrozšířenějších organických monolitů. Jelikož jsou již z podstaty nepolární, pro reverzní chromatografii není třeba dodatečných modifikací. Organické polymery se vyznačují schopností rychlé separace velkých molekul, jejich využití je proto nejčastěji u separací proteinů, peptidů, cytochromů.

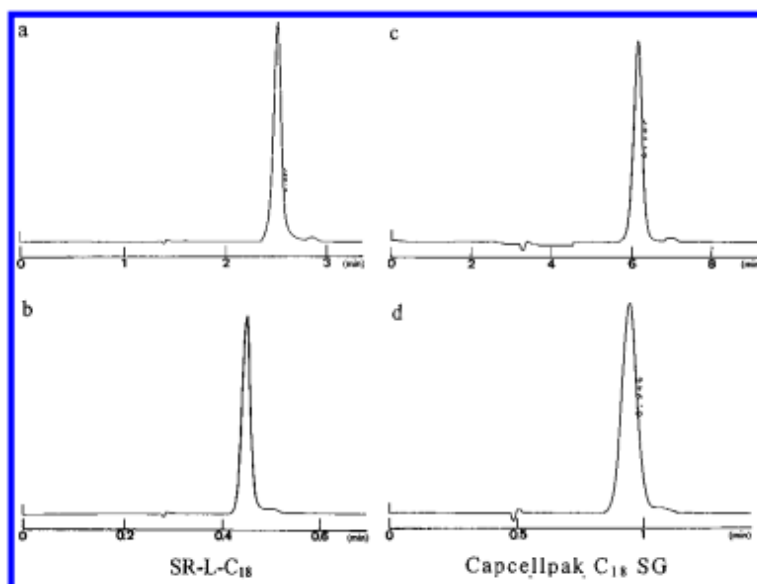
U monolitů na bázi silikové struktury tomu je však naopak. Tyto monolity mají na povrchu hydroxidové skupiny, které je potřeba zakrýt nepolární molekulou, aby mohly být použity jako stacionární fáze reverzní. K tomu lze využít derivatizaci povrchu pomocí alkylových řetězců. Nejčastěji jsou využívány uhlovodíkové řetězce o délce 8 a 18 uhlíků.

1.2 První modifikace monolitů pomocí alkylů

První pokus o vytvoření C₁₈ modifikovaného silikového monolitu byl publikován v roce 1996. Tým Minakuchi et al. připravil monolit z tetramethoxysilanu a polyethylen oxidu. Vzniklé silica monolity o průměru 7,0 mm a délce 8,3 cm byly uzavřeny v tetrafluorethylenové koloně. Derivatizace na C₁₈ proběhla pomocí oktadecyldimethyl –(N,N-diethylamino)silanu v roztoku toluenu. Pro srovnání efektivity tohoto monolitu bylo použito komerčně dostupných kolon s C₁₈ silikovými částicemi – Capcellpak C18 UG a Capcellpak C18 SG od společnosti Shiseido a kolony Deltabond ODS od společnosti Keystone Scientific [1].



Obrázek 1 – Eluce alkylbenzenů pomocí 80 % methanolu. Retenční čas v minutách. Grafy (a) (b) ukazují hodnoty vytvořeného C18 monolitu (délka kolony 8,3 cm). Grafy (c) (d) ukazují hodnoty Capcellpak C₁₈ UG (délka kolony 15 cm). Lineární rychlost mobilní fáze byla 0,99 (a), 4,99 (b), 1,13 (c) a 4,74 mm/s (d) [1].

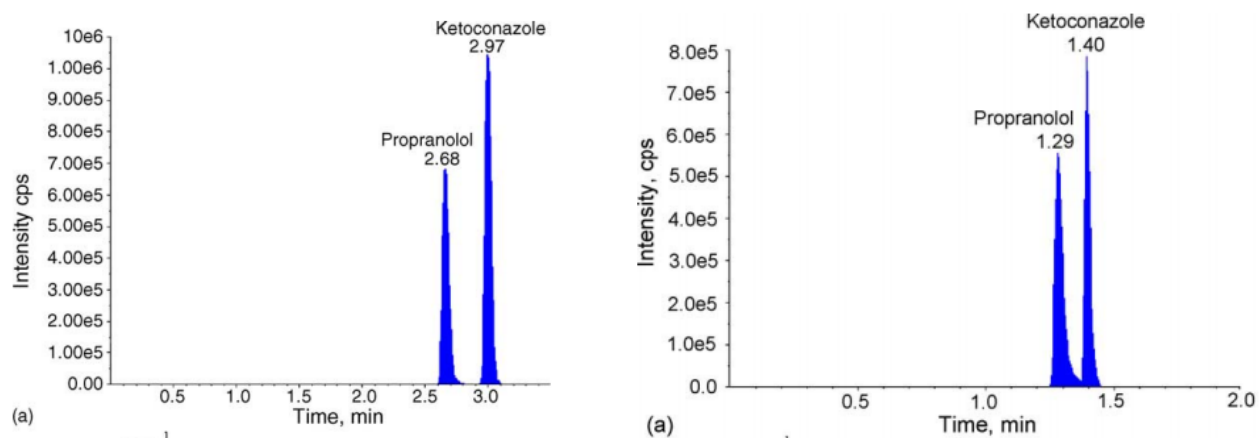


Obrázek 2 – Izokratická eluce insulinu ve směsi acetonitrilu a vody. Grafy (a) (b) ukazují hodnoty vytvořeného C18 monolitu s mobilní fází 30/70 ACN/Voda, grafy (c) (d) ukazují hodnoty Capcellpak C₁₈ SG s mobilní fází 32/68 ACN/Voda. Retenční čas je v minutách. Lineární rychlost mobilní fáze je 1,04 (a), 5,28 (b), 0,80 (c) a 5,34 mm/s (d) [1].

Tato studie prokázala hlavní výhodu monolitů - kratší retenční čas separovaných látek (Obrázek 1 a 2). Tato technologie přípravy monolitů byla později licencována německou společností Merck KGaA, která začala tyto silikové reverzní monolity prodávat pod komerčním názvem Chromolith™ např. s modifikacemi pomocí C₈, C₁₈ a NH₂. V současné době se s tímto typem reverzního monolitu můžeme setkat i u produktů firem Phenomenex a GL Sciences [1].

1.3 Srovnání částicové kolony a monolitické kolony při separaci látek v plazmě

Studie týmu Alnouti et al. porovnávala účinnost konvenční C₁₈ separační kolony a C₁₈ separační monolitické kolony v novém automatizovaném přístroji Symbiosis SPE-LC-MS/MS. Cílem této práce bylo zjistit účinnost on-line napojeného SPE-LC systému Symbiosis, a také popsat rozdíl při použití částicového sorbentu a monolitického sorbentu pro separaci. Analyzované látky byly ibuprofen, propranolol, ketokonazol a diclofenak v krysí krevní plazmě. Pro porovnání rozdílů mezi konvenční částicovou kolonou Luna™ C18 a monolitickou kolonou Chromolith™ C18 zde ukazují pouze grafy (Obrázek 3), na kterých lze přímo porovnat účinnost obou separačních kolon při separaci ketokonazolu a propranololu [2].



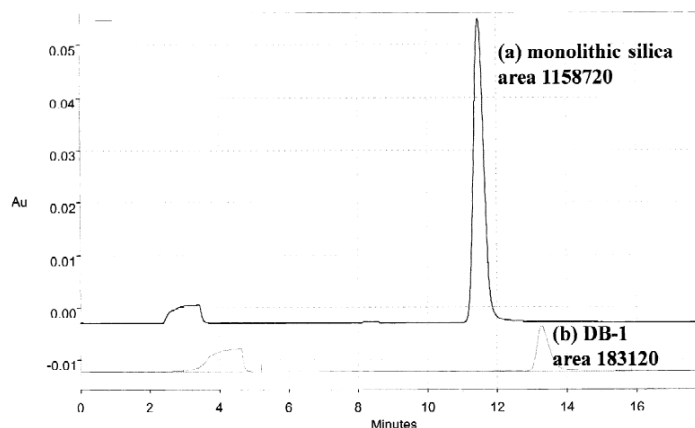
Obrázek 3 – Levý graf znázorňuje retenční čas a intenzitu při použití kolony Luna™ C₁₈, graf vpravo znázorňuje tyto hodnoty při separaci na monolitické koloně Chromolith™ C₁₈ [2].

Čas potřebný k extrakci a separaci látek z plazmy na tomto automatizovaném systému Symbiosis (Spark Holland), byl 4 minuty při použití C₁₈ částicové kolony a pouze 2 minuty při použití C₁₈ monolitu. Doba separace na reverzním monolitu byla tedy dvakrát kratší [2].

2. MODIFIKACE MONOLITŮ ALKYLY PRO EXTRAKCI

2.1 Využití C18 monolitické kolony pro in-tube extrakci na tuhé fázi

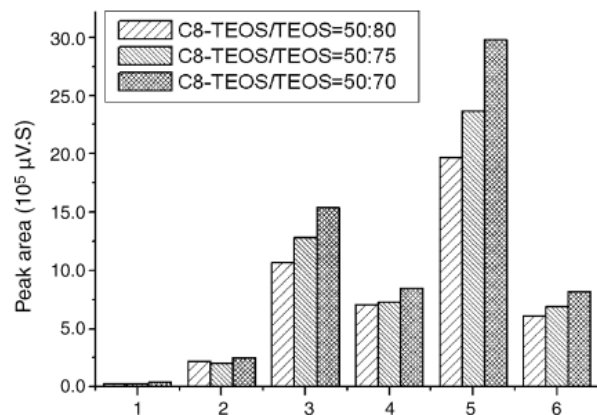
Shintani et al. vytvořili modifikovaný silikový monolit pro zefektivnění in-tube extrakce. Kolona byla vytvořena polykondenzací alkoxy silanu. Takto byly na povrchu monolitu ukotveny alkyly C₁₈. Pro srovnání efektivity byl použit částicový sorbent. Pro separaci byl použit on-line napojený systém HPLC. Výsledky jsou znázorněny v obrázku č.3. První pík ukazuje na retenční čas a plochu pod píkem u monolitické kolony, druhý na tyto hodnoty při použití částicové kolony DB-1. Použitím monolitické in-tube SPME s C₁₈ se docílilo až 50x větší citlivosti. Tato metoda prokázala úspěšnou prekoncentraci a následnou úspěšnou separaci a detekci na LC-UV systému [3].



Obrázek 4 – Znázornění výsledků studie. První pík (a) je při použití monolitické kolony, druhý pík (b) při použití částicové kolony [3].

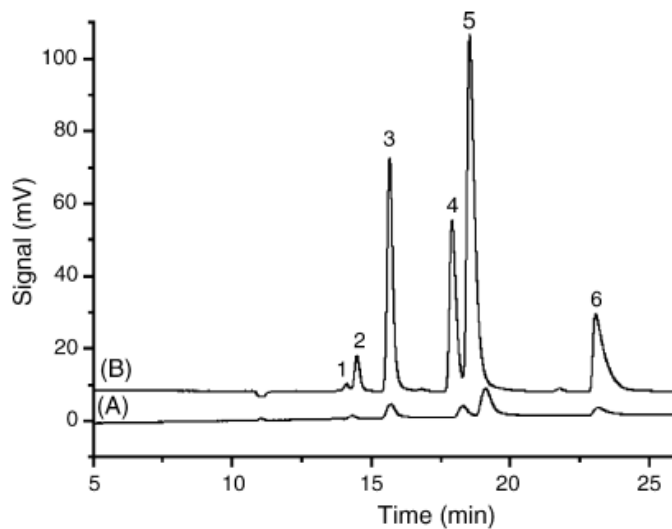
2.2 Využití C8 monolitické kolony pro in-tube extrakci na tuhé fázi

Zheng et al. vyvinul silikový monolit s oktylovými deriváty pro in-tube SPME napojenou na HPLC systém. Syntéza monolitu byla provedena z tetramethoxysilanu (TEOS) a n-oktylového triethoxy silanu (C8-TEOS). Extrahovány byly polycyklické aromatické uhlovodíky (toluen, naftalen, bifenyl, fluoren, fenantren a fluroanthen) z roztoku vody a metanolu. Na obrázku č. 5 lze porovnat účinnost monolitu podle poměrů složek C8-TEOS a TEOS [4].



Obrázek 5 – Graf srovnávající extrakční efektivitu monolitu při různých poměrech C8 TEOS a TEOS. Analyzované látky byly v koncentraci 2mg/l a jako mobilní fáze byl použit 20% metanol. Jednotlivé sloupce korespondují s analyzovanými látkami v tomto pořadí – toluen, naftalen, bifenyly, fluoren, fenantren a fluroanthen [4].

Pro znázornění důležitosti prekoncentrace v in-tube SPME byla provedena i přímá detekce bez přítomnosti extrakční kolony. Graf na obrázku č. 6 znázorňuje vylepšení citlivosti měření při použití in-tube SPME před samotnou separací a analýzou [4].



Obrázek 6 – Graf znázorňující záznam separace po přímém nástřiku vzorku (A) a záznam separace po prekoncentraci vzorku na extrakční koloně (B). V prvním případě byly vzorky o koncentraci 50mg/l ve 40% roztoku metanolu. V druhém případě byla koncentrace vzorků 2mg/l opět ve 40% roztoku metanolu. Jednotlivé píky náležejí analytům – (1) toluen, (2) naftalen, (3) bifenyly, (4) fluoren, (5) fenantren a (6) fluroanthen [4].

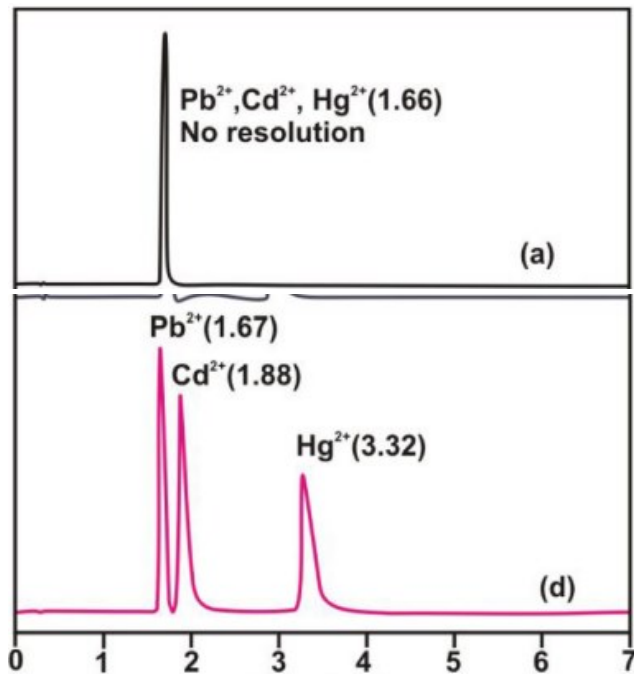
2.3 Nové metody s využitím monolitů s reverzní fází

2.3.1 Kvantifikace β -karotenu pomocí automatické výměny kolon

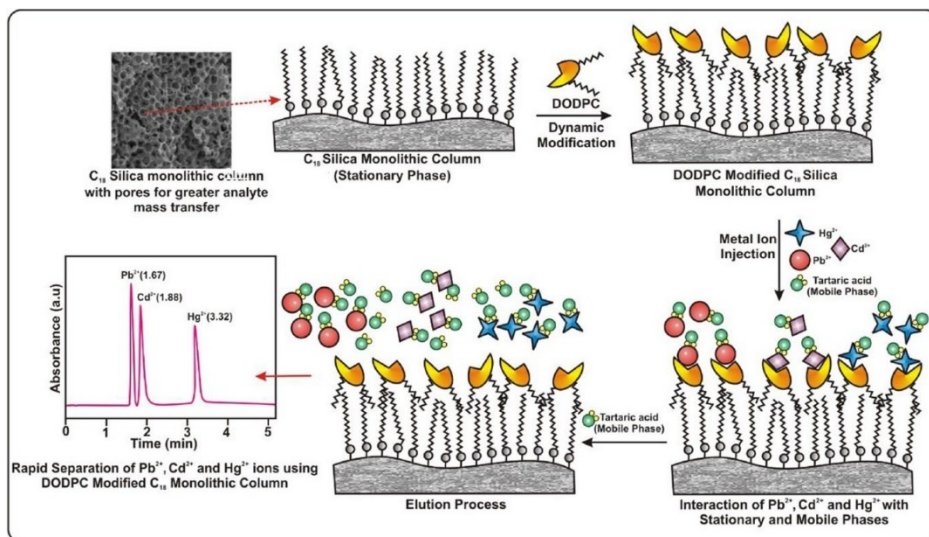
Tato metoda byla vyvinuta v roce 2013 pro kvantitativní analýzu β -karotenu v komerčně dostupných kapslích, tabletách a olejové suspenzi. Metoda využívala přepínání kolon, spočívající v automatické výměně chromatografických/extrakčních kolon. β -karoten byl rozpuštěn v roztoku chloroformu a nadávkován do HPLC systému. Pro vyčištění vzorku byla použita předkolona Chromolith Guard Cartige RP-18c, ta využívá monolitu s C18 modifikací. Poté byla tato kolona automaticky vyměněna za analytickou kolonu Ascentis Express C-18. Mobilní fází pro separaci byl čistý metanol. Nebyla pozorována žádná interference a analýza poskytovala vysokou přenost a správnost. Optimální extrakce byla dosažena díky metodě výměny kolon. Hodnoty výtěžku se pohybovaly od 95 do 105 % [5].

2.3.2 Modifikace C18 silikového monolitu pro separaci iontů olova, kadmia a rtuti

Monolit s reverzní fází lze i dále modifikovat pro účinnější separaci. Separace iontů těžkých kovů se standartně provádí na systémech ICP-MS. V kapalinové chromatografii existují například metody založené na principu iontové výměny nebo chelatace. Tato studie se pokusila modifikovat C18 silikový monolit pomocí amfifilního organického ligandu DODPC (1,5 – dioktanoyl – 1,5 – difenylkarbazid) pro separaci iontů olova, kadmia a rtuti. Tento DODPC ligand se chová jako iontově selektivní receptor a tím umožňuje separaci těchto iontů. Aby tyto ionty mohly být detekovány pomocí UV detektoru, byla provedena postkolonová derivatizace substituovaným resorcinolem. Monolit využitý pro modifikaci byl Chromolith RP-18e a jako mobilní fáze byla použita kyselina vinná v isokratickém módu. Na obrázku č. 7 je porovnání chromatografu s použitím této modifikace a bez ní. Na dalším obrázku (č.8) je souhrnné znázornění jak tato modifikace pomůže při separaci těchto iontů [6].



Obrázek 7 – V horním grafu je znázorněna retence bez provedené modifikace, ve spodním grafu je již jasně vidět, že se tyto ionty podařilo rozdělit [6]



Obrázek 8 – Schéma postupu modifikace C_{18} Monolitu. V prvním kroku se na C_{18} řetězce naváže DODPC. Ten je schopen selektivně navázat tyto ionty, každý s jinou afinitou. Tím si při separaci kyselinou vinnou rozdělují a na chromatografu poté vidíme tři rozdílné píky [6].

3. DISKUZE

Důvodů pro modifikaci monolitu je velké množství. Organické polymerní monolity prokazují výborné hydrodynamické vlastnosti, avšak neposkytují příliš velkou plochu pro interakce s analyty. Anorganické monolity naopak poskytují velké množství mesopórů díky nimž jsou schopny adsorbovat analyty. Jejich další vlastností je polarita povrchu způsobená hydroxylovými funkčním skupinami. Nejčastěji využívaný druh chromatografie je na reverzní fázi, pokud tedy chceme pro tento typ chromatografie využít silikových monolitů je třeba jejich povrch derivatizovat pomocí nepolárních látek. K tomu se nejčastěji používají řetězce C8 a C18. Tyto monolity jsou pak schopny jak separace tak extrakce. Jejich největší výhodou je jejich komerční dostupnost. Z důvodu širší využitelnosti těchto monolitů v separačních kolonách, oproti kolonám extrakčním, jsem v této kapitole zmínil i práce zabývající se separací na takto modifikovaných monolitech.

Modifikace silikového monolitu pomocí alkylových řetězců je jeden ze způsobů úpravy monolitů, nyní často využívaných v laboratořích po celém světě. Ve srovnání s ostatními typy modifikací zmíněných v této práci, silikové reverzní monolity jsou komerčně dostupné. Tím, že pro analýzu využijeme již prodávaného evaluovaného monolitu, vyhneme se mnoha překvapením a problémům, se kterými bychom se mohly setkat při použití ostatních typů modifikací. Cílem reverzní modifikace monolitu je změna polarita povrchu. Pro úpravu vlastností monolitu existuje však více důvodů, a proto existují i další typy modifikací, zmíněné v bakalářské práci. Například metalo-organické struktury se snaží o zvýšení počtu mesopórů v organických polymerních monolitech, iontové kapaliny zase cílí na zesílení interakcí mezi monolitem a analytem. Využití nanočástic se snaží spojit výhody jejich velikého povrchu, schopného specifických vazeb, a hydrodynamických vlastností polymerního monolitu. Modifikace pomocí aptamerů či imunosorbentů mají své nesporné výhody v selektivních vazbách, avšak ceny zůstávají stále vysoké.

4. ZÁVĚR

Pokud je potřeba spolehlivá monolitická kolona, ať už extrační či separační, jedním z mála komerčně dostupných typů jsou monolity reverzní fáze. Jejich využití je široké – v extrační koloně, kde slouží k prekoncentraci analytu; v separační koloně, kde slouží např. pro analýzu proteinů nebo vitamínů.

5. CITOVANÁ LITERATURA

- [1] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka a N. Tanaka, „Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography,“ *Analytical Chemistry*, sv. 68, č. 19, pp. 3498-3501, 1996.
- [2] Y. Alnouti, K. Srinivasan, D. Waddell, H. Bi, O. Kavetskaia a A. Gusev, „Development and application of a new on-line SPE system combined with LC–MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma,“ *Journal of Chromatography A*, sv. 1080, č. 2, pp. 99-106, 2005.
- [3] Y. Shintani, X. Zhou, M. Furuno, H. Minakuchi a K. Nakanashi, „Monolithic silica column for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography,“ *Journal of Chromatography A*, sv. 985, č. 1-2, pp. 351-357, 2003.
- [4] M.-M. Zheng, B. Lin a Y.-Q. Feng, „Hybrid organic–inorganic octyl monolithic column for in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary high-performance liquid chromatography,“ *Journal of Chromatography A*, sv. 1164, č. 1-2, pp. 48-55, 2007.
- [5] I. Brabcová, M. Hlaváčová, D. Šatínský a P. Solich, „A rapid HPLC column switching method for sample preparation and determination of b-carotene in food supplements,“ *Food Chemistry*, sv. 141, č. 2, pp. 1433-1437, 2013.
- [6] M. Thirumalai, S. N. Kumar, D. Prabhakaran, N. Sivaraman a M. A. Maheswari, „Dynamically modified C18 silica monolithic column for the rapid determinations of lead, cadmium and mercury ions by reversed-phase high-performance liquid chromatography,“ sv. 1569, č. 1, pp. 62-69, 2018.
- [7] K. Nakanishi a N. Soga, „Phase Separation in Gelling Silica-Organic Polymer Solution: Systems Containing Poly[sodium styrenesulfonate],“ *Journal of the American Ceramic Society*, sv. 74, č. 10, pp. 2518-2530, 1991.