Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza
Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza

Bc. Jiří Vojta

Vývoj a testování kapilárních kolon na bázi iontoměniče

Development and testing of capillary columns based on ion exchanger

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne……

…….
podpis

Poděkování

Úvodem bych rád poděkoval svému školiteli panu Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za jeho ochotu vést mě při vypracovávání této práce a za jeho cenné rady. Dále bych rád poděkoval Mgr. Adéle Svobodové za celkové uvedení do široké problematiky monolitů a poradenství při vypracovávání této práce a Mgr. Anně Kubíčkové za všestrannou a dlouhodobou pomoc v oblasti chromatografie.

Práce na tomto projektu byla finančně podporována projektem GAUK 710 Grantové Agentury Univerzity Karlovy v Praze a výzkumným záměrem MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Předmětová hesla: analytická chemie, separační metody

Klíčová slova: kapilární kapalinová chromatografie, monolit, kyselina methakrylová, styren, divinylbenzen

Abstrakt

V rámci této práce byly připraveny kapilární monolitické kolony na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové radikálovou polymerizací v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 320 μm. Kolony byly připraveny jednoduchým postupem z polymerizačních směsí s proměnným obsahem kyseliny methakrylové. Byl prokázán vliv elektrostatických interakcí mezi kyselinou methakrylovou, jako slabým měničem kationtů, a analyty na jejich retenci. Na základě chromatografických měření byl diskutován vliv obsahu kyseliny methakrylové v polymerizačních směsích na morfologii výsledných monolitů a na retenci malých organických aminů a benzenu.

Abstract

In this work, capillary monolithic columns based on styrene, divinylbenzene and methacrylic acid were prepared by free radical polymerization inside fused sillica capillaries of 320 μm inner diameter. The columns were prepared by very simple process from polymerization mixtures with variable amount of methacrylic acid. Effect of electrostatic interactions between methacrylic acid, as weak cation-exchanger, and analytes on their retention was showed. Based on chromatographic measurements, effect of amount of methacrylic acid in polymerization mixtures on the morphological properties of monoliths and on the retention of small organic amines and benzene was discussed.

Obsah

Seznam zkratek a symbolů 7
1. Teoretický úvod 9
1.1 Mikrokapalinová chromatografie 9
1.2 Monolitické stacionární fáze 10
1.2.1 Úvod a historie 10
1.2.2 Příprava monolitů v kapilárních kolonách 12
1.2.3 Vlastnosti monolitických stacionárních fází 19
1.2.4 Iontová chromatografie na monolitických stacionárních fázích 22
1.3 Cíl práce 24
2. Experimentální část 25
2.1 Použité chemikálie a materiály 25
2.2 Použité přístroje 26
2.3 Postup přípravy vzorků a mobilních fází 27
2.4 Postup přípravy monolitických kolon 28
2.5 Postup testování monolitických kolon 31
2.6 Měřené veličiny 32
3. Výsledky a diskuze 34
3.1 Testování přípravy monolitických kolon 34
3.2 Testování elektrostatických interakcí 36
3.3 Testování kolon skupiny I 41
3.4 Testování kolon skupiny II 49
4. Závěr 55
Literární zdroje 57

Seznam zkratek a symbolů

ACN ..... acetonitril

AIBN ..... α,α´-azobis(isobutyronitril)

AMPS ..... 2-akrylamido-2-methylpropan-1-sulfonová kyselina

BET ..... Brauner, Emmet, Teller

DVB ..... divinylbenzen

ISO ..... isooktan

MAA ..... kyselina methakrylová

ST ..... styren

T ..... toluen

γ-MAPS ..... 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylát

cm ..... centimetr, jednotka délky

°C ..... stupeň Celsia, jednotka teploty

i.d. ..... vnitřní průměr kapiláry

$f_{5\,\%}$ ..... šířka vzestupné části píku v 5 % jeho výšky

h ..... hodina, jednotka času

k ..... retenční faktor

l ..... délka kolony

m ..... metr, jednotka délky

mAu ..... jednotka odezvy detektoru

mg ..... miligram, jednotka hmotnosti

mg/ml ..... miligram/mililitr, jednotka koncentrace

min ..... minuta, jednotka času

ml ..... mililitr, jednotka objemu

ml/h ..... mililitr/hodina, jednotka průtoku

ml/min ..... mililitr/minuta, jednotka průtoku

mm ..... milimetr, jednotka délky

mol/l ..... mol/litr, jednotka koncentrace

mmol/l ..... milimol/litr, jednotka koncentrace

mV ..... milivolt, jednotka elektrického napětí

n ..... počet teoretických pater

n/m ..... počet teoretických pater na metr kolony

nm ..... nanometr, jednotka délky

p ..... tlak

pH ..... fyzikálně-chemická veličina

pKa ..... záporný dekadický logaritmus disociační konstanty

$R_{1,2}$ ..... rozlišení sousedních píků

S8 ..... testovací směs

t ..... čas

T_f ..... tailing faktor

t_M ..... mrtvý retenční čas

t_R ..... retenční čas

$t_{5\,\%}$ ..... šířka sestupné části píku v 5 % jeho výšky

U ..... elektrické napětí

UV ..... oblast ultrafialového záření

w ..... šířka píku při základně

$w_{1/2}$ ..... šířka píku v polovině jeho výšky

λ ..... vlnová délka

µl ..... mikrolitr, jednotka objemu

µl/min ..... mikrolitr/minuta, jednotka průtoku

µl/ml ..... mikrolitr/mililitr, jednotka koncentrace

µm ..... mikrometr, jednotka délky

% (hm.) ..... hmotnostní zlomek vyjádřený v procentech

%, % (obj.) ..... objemový zlomek vyjádřený v procentech

1. Teoretický úvod

1.1 Mikrokapalinová chromatografie

Širší využití kapilárních kolon v plynové chromatografii začátkem 60. let dvacátého století [1] vedlo k jejich postupnému zavedení i do chromatografie kapalinové. První experimentální práce se skleněnými kolonami o vnitřním průměru 1 mm v kapalinové chromatografii byly publikovány Horváthem a kol. v letech 1967 a 1969 [2,3]. Tyto kolony byly naplněny skleněnými částicemi pokrytými iontoměničovým polymerem a použity pro separaci ribonukleosidů. Byl použit polymer na bázi styrenu a divinylbenzenu, tedy na stejném základu na jakém se dnes připravují monolitické stacionární fáze. Významný pokrok nastal ve druhé polovině 70. let, kdy Ishii a kol. publikoval sérii pěti prací na téma mikro-vysokoúčinné kapalinové chromatografie [4-8]. V roce 1978 publikovali své práce rovněž Tsuda a Novotný, kteří se zabývali vlivem například lineární průtokové rychlosti a vnitřního průměru kapiláry na účinnost náplňových kolon o vnitřním průměru do 200 μm [9,10]. Problematice otevřených kapilár s reverzní stacionární fází se pak věnuje publikace od autorů Tsudy a Hibiho rovněž z roku 1978 [11]. Moderní kapiláry z taveného křemene začaly do kapalinové chromatografie pronikat o další tři roky později [12].

Zmenšení průměru separačních kolon s sebou do kapalinové chromatografie přineslo řadu výhod. Na mikrokolonách bylo dosaženo vysokých separačních účinností. Například Scott a Kučera provedli separaci alkylbenzenů na koloně o délce 14 m s účinností 650 000 teoretických pater [13]. Aplikace vyšších tlaků na mikrokolonách vede ke kratší analýze než na klasických analytických kolonách. Mikrokapalinovým systémem také protéká mnohem méně mobilní fáze, čímž nejen dochází k úspoře drahých chemikálií, ale i k menšímu naředění vzorku. Pro analýzu na mikrokapalinovém chromatografu postačuje nástřik vzorku v desítkách nanolitrů, zatímco u klasické chromatografie je potřeba dávkovat vzorek o objemu jednotek až desítek mikrolitrů. Z těchto důvodů je pak velmi výhodné spojení mikrokapalinového chromatografu s hmotnostním spektrometrem jako detektorem. Miniaturizace kapalinové chromatografie s sebou přinesla i vyšší technické nároky na čerpadla mobilní fáze, injektory vzorku a detektory. Tyto technické otázky jsou dnes již vyřešeny a na trhu jsou dostupné vysoce sofistikované přístroje.

Přesto je však třeba především u, v laboratoři připravovaných či upravovaných kolon, důsledně minimalizovat mrtvé objemy v systému. V mikrokapalinové chromatografii se totiž mrtvé objemy promítají do celkového rozmytí zóny analytu mnohem více než u neminiaturizovaných systémů [14]. Technický pokrok samozřejmě zasáhl i do kapalinové chromatografie s klasickým rozměrem analytických kolon (i.d. 4,6 mm) a ta tak i nadále plně uspokojuje požadavky rutinních komerčních analýz z enviromentálního a farmaceutického segmentu trhu. Mikrokolonová kapalinová chromatografie tak zatím zůstává zejména na půdě univerzit a výzkumných ústavů, kde je využívána například pro analýzu peptidů [15], a stále více se miniaturizuje až do podoby čipové kapalinové chromatografie [16].

1.2 Monolitické stacionární fáze

1.2.1 Úvod a historie

Monolitické stacionární fáze jsou často nazývány stacionárními fázemi čtvrté generace pro separaci proteinů [17]. Jak vyplývá z jejich označení „monolitické“, jsou tyto stacionární fáze vytvořeny jedním kusem materiálu, na rozdíl od klasických separačních kolon, které jsou naplněny mnoha sférickými částicemi o průměru v řádu jednotek mikrometrů. Samotné slovo monolit pochází z řeckého μονολιτησ, které je složeninou dvou slov μονο (jednotný) a λιτησ (kámen) [18]. Jeho vznik souvisí pravděpodobně jak s kamenictvím tak s přírodním výskytem monolitů. Patrně největší monolit na světě je australský Uluru s výškou 346 m a obvodem 9,4 km [19]. Výraz monolitický tedy dnes chápeme jako „vytvořený z jednoho kusu, jednolitý, pevně spojený“ [20]. Separační kolony označované jako monolitické jsou tedy zcela vyplněny jedním kusem pórovitého materiálu, který plní funkci stacionární fáze a díky kterému mají tyto kolony oproti klasickým náplňovým kolonám unikátní vlastnosti, o kterých bude pojednáno dále.

První kolony, které by dnes byly označeny za monolitické, vznikly na konci 60. let minulého století na půdě dnešního Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze. Pracovní skupina M. Kubína připravila skleněnou kolonu vyplněnou polymerem 2--hydroxyethylmethakrylátu zesíťovaného ethylendimethakrylátem a využila ji pro gelovou filtraci. Nedosáhli však příliš vysoké účinnosti díky velmi nízkému průtoku mobilní fáze (4 ml/h), který tento gel dovoloval [21].

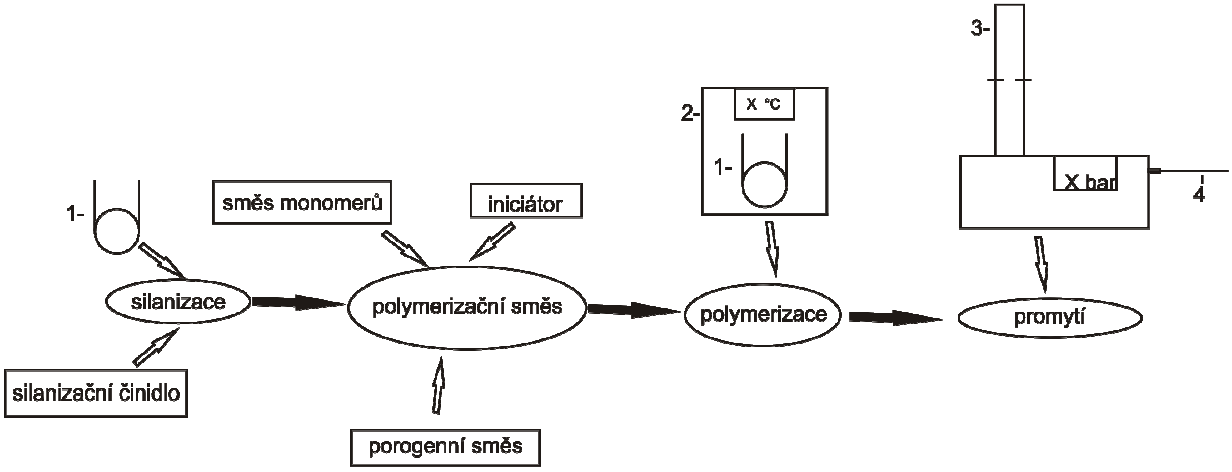
O několik let později se pak objevily další práce od dvou nezávisle pracujících skupin z USA a Německa založené na pevné polyuretanové pěně připravené přímo v koloně (*in situ*). Aplikací těchto stacionárních fází v plynové i kapalinové chromatografii bylo dosaženo separací s účinností srovnatelnou s tehdejšími náplňovými kolonami. Přesto se ani tyto kolony nestaly příliš rozšířenými, pravděpodobně kvůli náročnější přípravě, nižší tepelné stabilitě a nevhodnosti jejich povrchu pro chemickou modifikaci [22]. Výzkum monolitů se pak prakticky zastavil až do konce let osmdesátých.

V roce 1989 publikoval svoji práci S. Hjertén a kol., ve které se zabýval přípravou stacionární fáze zkomprimováním gelu [23]. Hjertén připravil gel polymerizací N´N-methylenbisakrylamidu a kyseliny akrylové. Vzniklý gel následně komprimoval hydrostatickým tlakem a vyplnil jím separační kolonu o délce 3 cm a průměru 0,6 cm. Takto připravená stacionární fáze vykazovala překvapivě vysokou průchodnost pro mobilní fázi, při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min byl zpětný tlak 14,5 baru. Hjertén na ní dosáhl účinné separace pěti proteinů s dobou analýzy 15 minut. Práce vzbudila zaslouženou pozornost a Hjertén je díky ní a dalším pracím považován za jednoho ze zakladatelů monolitických stacionárních fází v chromatografii. Přípravu těchto iontoměničových kolon převzala firma Bio-Rad Laboratories (Richmod, Kalifornie, USA) a dnes je dodává pod obchodním názvem UNO®.

Rovněž na konci 80. let a opět na půdě dnešního Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze připravili T. Tennikova a F. Švec monolitické disky polymerizací glycidylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu a provedli na nich separaci čtyř proteinů během tří minut. Jejich práce byla ovšem vlivem recenzního řízení [22] zveřejněna až v roce 1990. Dnes polymerní monolitické disky pro všechny druhy kapalinové chromatografie dodává firma Bia Separations (Ljubljana, Slovinsko) pod názvem CIM® disk. Výraz „monolitické“ se pro stacionární fáze z jednoho kusu materiálu vytvořené polymerizací poprvé objevil v roce 1996 [24] a díky své výstižnosti a jednoduchosti se brzy stal široce užívaným. V témže roce modifikoval Tanaka anorganické monolity na bázi silikagelu a provedl na nich separace v reverzním módu. Porovnáním s měřením na náplňových kolonách zjistil, že hlavním přínosem těchto monolitů je využití pro separace makromolekul [25]. Příprava silikagelových monolitů je experimentálně poměrně náročná, a proto se značná část výzkumu soustředí na úpravy komerčně dodávaných kolon Chromolith® od firmy Merck (Darmstadt, Německo) a jejich následné aplikace v analytické chemii [26-28].

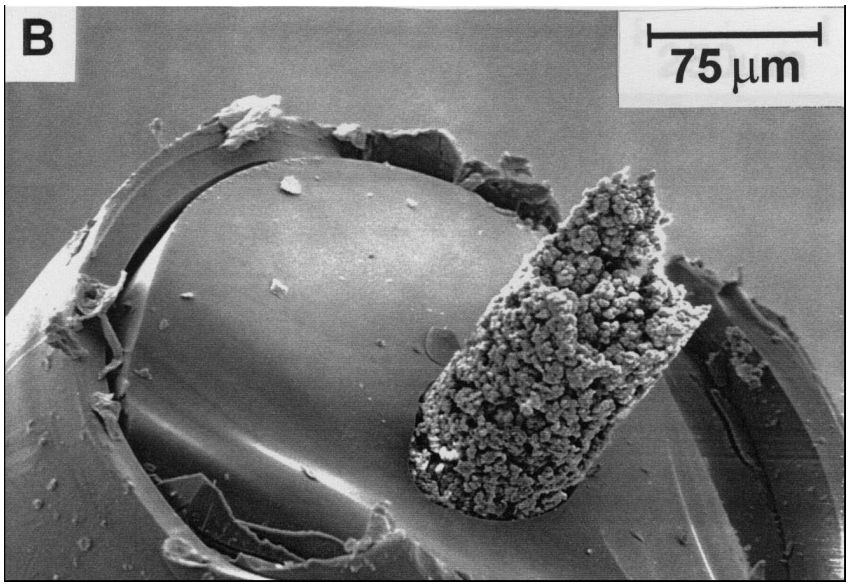
1.2.2 Příprava monolitů v kapilárních kolonách

Monolitické stacionární fáze (kolony) na bázi organického polymeru se připravují polymerizací monomerů za přítomnosti porogenní směsi přímo v kapiláře. Polymerizace je radikálová a lze ji iniciovat různými způsoby například tepelně či UV zářením. Kapilární kolony nalézají uplatnění v elektrochromatografii [29] a mikro-HPLC [30]. Kolon klasických rozměrů pro HPLC se v současné době využívá zejména ve spojení se silikagelovými monolity modifikovanými pro reverzní chromatografii [31]. Na obrázku 1 je znázorněno schéma obecné přípravy organických monolitických stacionárních fází v kapilárních kolonách. O jednotlivých krocích je dále pojednáno podrobněji.



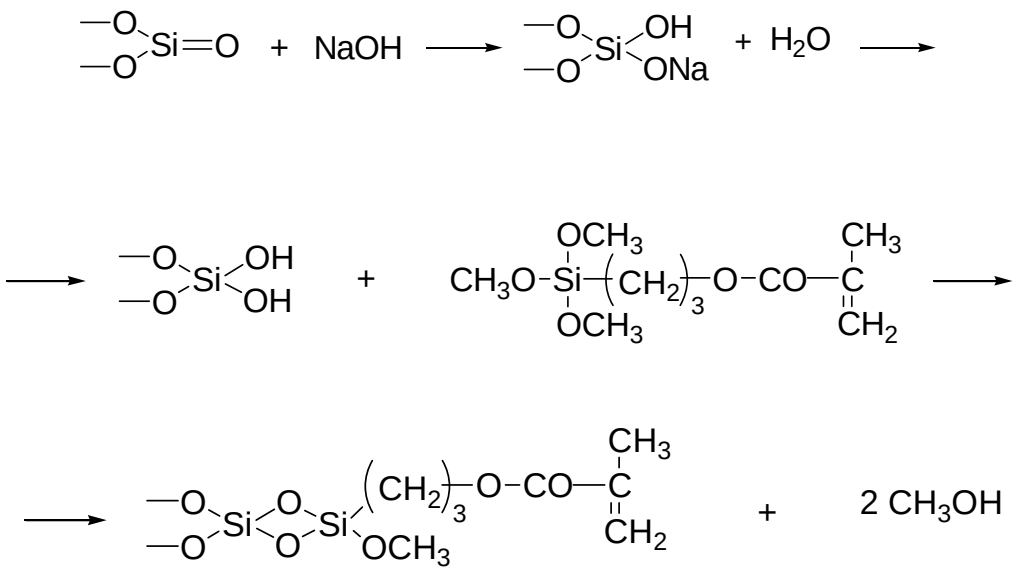
Obr. 1 *Schéma přípravy kapilární kolony s organickou monolitickou stacionární fází polymerizací iniciovanou teplem. 1 - kapilára, 2 - termostat, 3 - HPLC pumpa, 4 - kapilární kolona s monolitickou stacionární fází.*

Pro účely kapilární HPLC je nezbytné pevné uchycení monolitu na stěnu kapiláry, aby vlivem tlaku kapaliny nedošlo k jeho vytlačení z kapiláry. Na obrázku 2 je zobrazen snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu zachycující právě takovéto vytlačení monolitu. Pro klasické analytické kolony toto není nutné, jelikož u nich tomuto jevu brání zúžení na konci kolony.



Obr. 2 *Snímek zachycující vytlačení monolitu z nenasilanizované křemenné kapiláry, převzato z* [32].

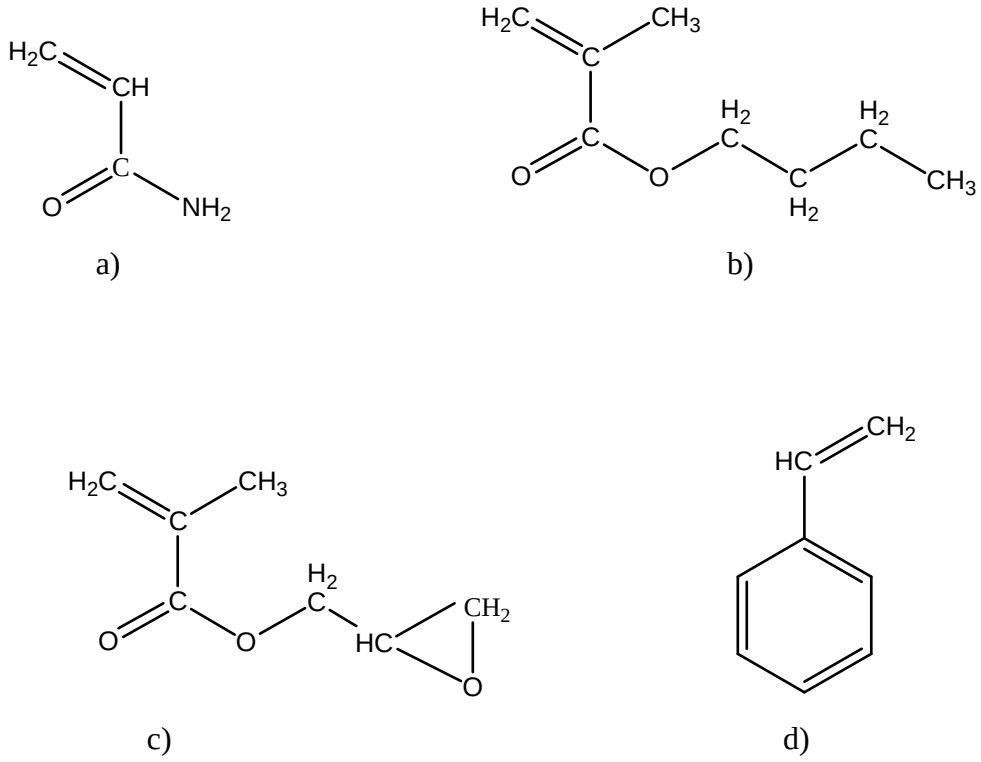
Pevné spojení monolitu se stěnou křemenné kapiláry se realizuje procesem silanizace, kterým se na stěnu kapiláry chemicky naváže sloučenina s dvojnou vazbou. Tato dvojná vazba se pak přímo účastní polymerizace monolitu, a ten je tak navázán ke stěně kapiláry na mnoha místech kovalentní vazbou. V současné době se silanizace nejčastěji provádí pomocí 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylátu (dále jen γ-MAPS). Chemický mechanizmus silanizace křemenné kapiláry γ-MAPSem je znázorněn na obrázku 3.



Obr. 3 *Mechanizmus silanizace křemenné kapiláry γ-MAPSem, převzato z* [33].

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, času i teplotě. Základní schéma však zůstává stejné a jednotlivé pracovní skupiny si jej upravují podle konkrétních podmínek své laboratoře a druhu připravovaného monolitu [34-36].

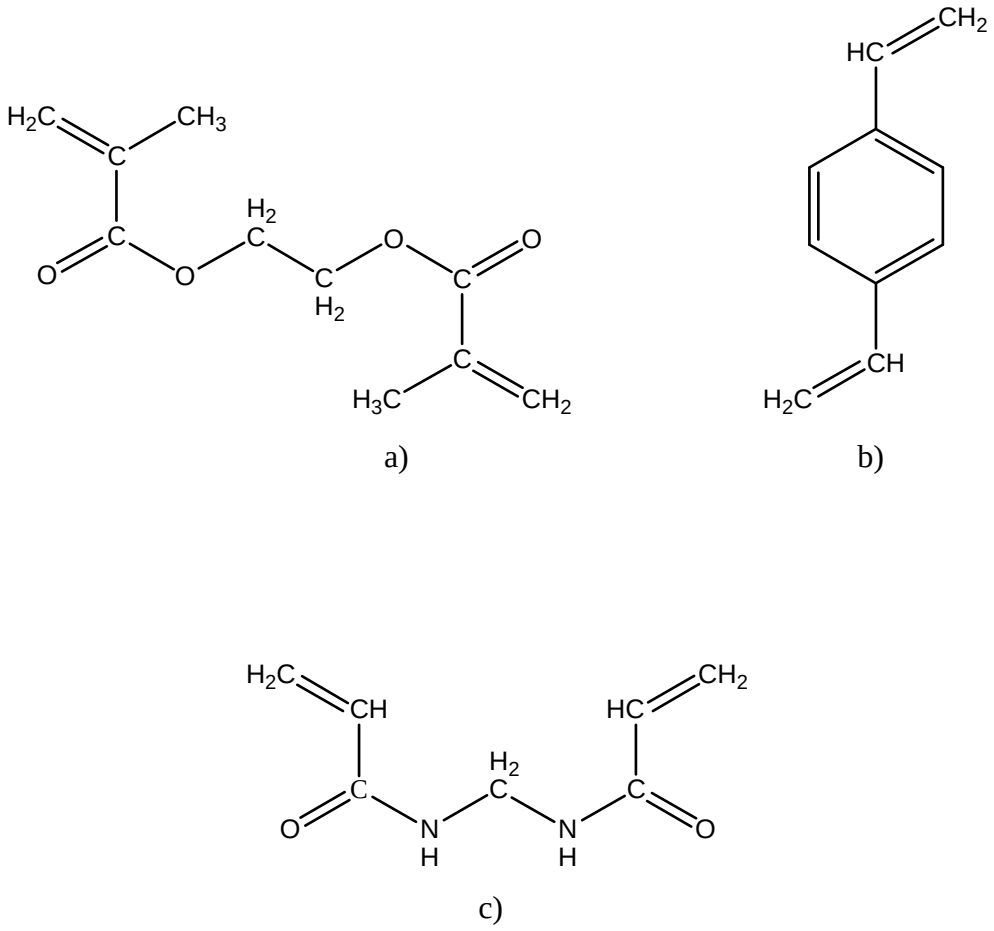
Polymerizační směs pro přípravu monolitů se obvykle skládá ze základního monomeru, síťovacího činidla, iniciátoru polymerizace a porogenní směsi. Základní monomery jsou malé organické molekuly obsahující jednu dvojnou vazbu, nejčastěji se jedná o deriváty akrylamidu, kyseliny methakrylové nebo styrenu. Přehled nejpoužívanějších základních monomerů je uveden na obrázku 4.



Obr. 4 *Základní monomery pro přípravu organických monolitů*
a) akrylamid, b) butylmethakrylát, c) glycidylmethakrylát, d) styren.

Síťovací činidlo se volí podobné základnímu monomeru, ovšem jedná se o sloučeninu se dvěma dvojnými vazbami. Směs základního monomeru a síťovacího činidla se nazývá směsí monomerů. Přehled nejpoužívanějších síťovacích činidel je uveden na obrázku 5.

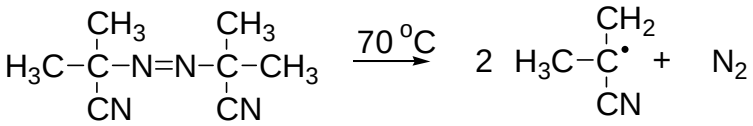
.



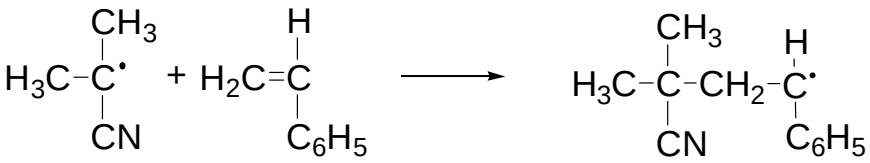
Obr. 5 *Síťovací činidla pro přípravu organických monolitů*
a) ethylendimethakrylát, b) divinylbenzen, c) N,N´-methylenbisakrylamid.

Ethylendimethakrylát se používá pro polymerizaci s methakrylátovými základními monomery [37]. Divinylbenzen je typickým síťovacím činidlem pro monolity na bázi styrenu a jeho derivátů jako základních monomerů [38] a N,N´-methylenbisakrylamid pro akrylamidovou rodinu monolitů [39]. Poměr základního monomeru a síťovacího činidla výrazně ovlivňuje velikost pórů monolitu, a tím i jeho další vlastnosti.

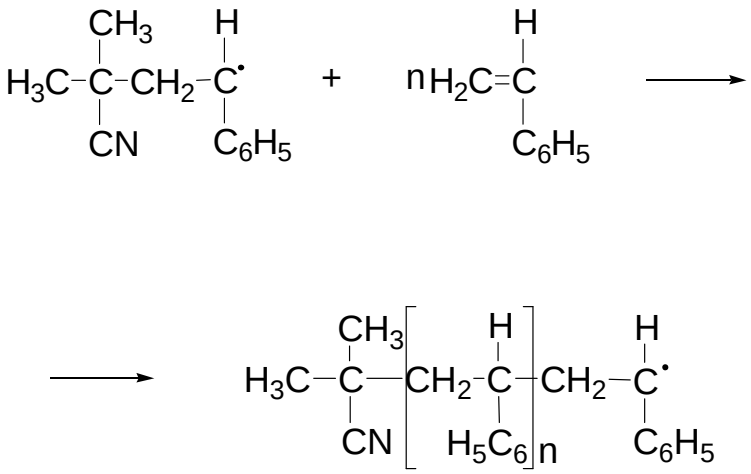
Polymerizaci lze iniciovat několika způsoby, podle druhu připravovaného monolitu a použitého iniciátoru. Nejpoužívanější je tepelná iniciace nebo iniciace UV zářením. Pro tepelnou iniciaci se jako iniciátor používá α,α´-azobis(isobutyronitril) (dále jen AIBN) [40] a pro UV iniciaci například 2,2-dimethoxy-2-fenyl-acetofenon [41]. Další možností je přímá chemická iniciace, například peroxodisíranem amonným [42]. Způsob iniciace rovněž ovlivňuje porozitu výsledného monolitu, a tím i jeho celkové vlastnosti [43, 44]. Poslední součástí polymerizační směsi je porogenní směs. Jedná se obvykle o binární směs látek, které se polymerizace přímo neúčastní, a slouží k tomu, aby výsledný monolit měl požadovanou pórovitost. Složení a obsah porogenní směsi tedy významně ovlivňuje pórovitost monolitu. Nejčastěji se využívá směsí alkoholů například propanolu s buta-1,4-diolem pro monolity na bázi methakrylátu [37], dodekanolu s dimethylsulfoxidem pro akrylamidové monolity [39] a pro monolity na bázi styrenu pak směsi dodekanolu s toluenem [40]. Při polymerizaci iniciované teplem se kapilára naplněná polymerizační směsí umístí do vodní lázně vyhřáté na zvolenou teplotu a směs se nechá polymerovat po určitou dobu. Teplota i doba polymerizace jsou rovněž ve vztahu ke konečné velikosti pórů monolitu. Na obrázcích 6a až 6e jsou schematicky znázorněny rovnice polymerizace monolitu na bázi styrenu (základní monomer) a divinylbenzenu (síťovací činidlo), při použití AIBN jako iniciátoru a na obrázku 6f je znázorněna výsledná struktura kopolymeru styrenu a divinylbenzenu.



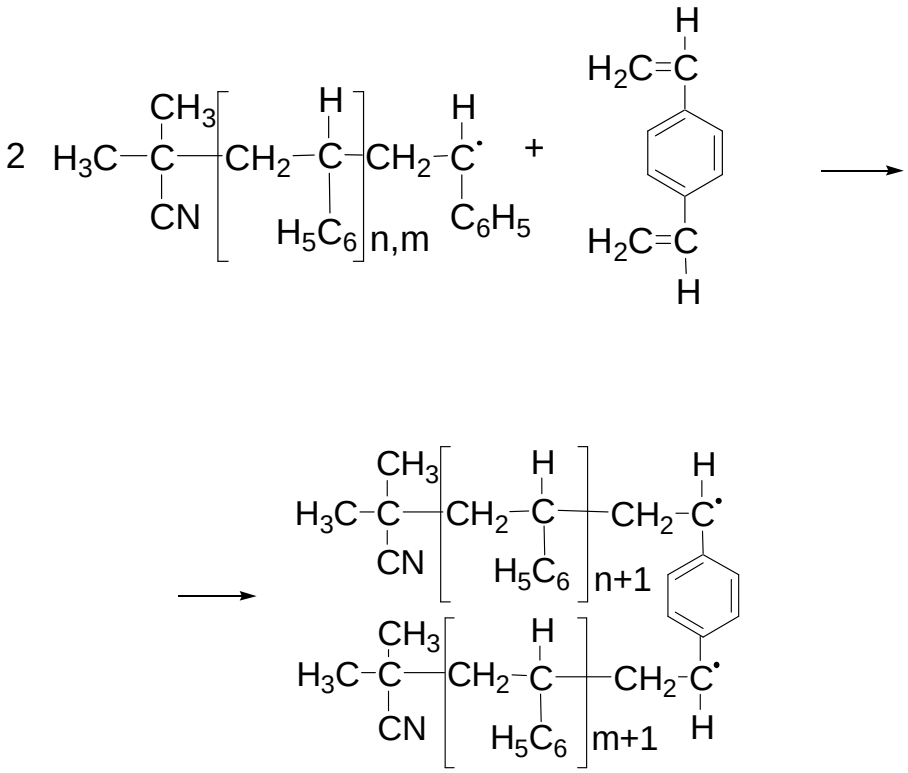
Obr. 6a *Iniciace polymerizace, rozpad AIBN na radikály, převzato z* [33].



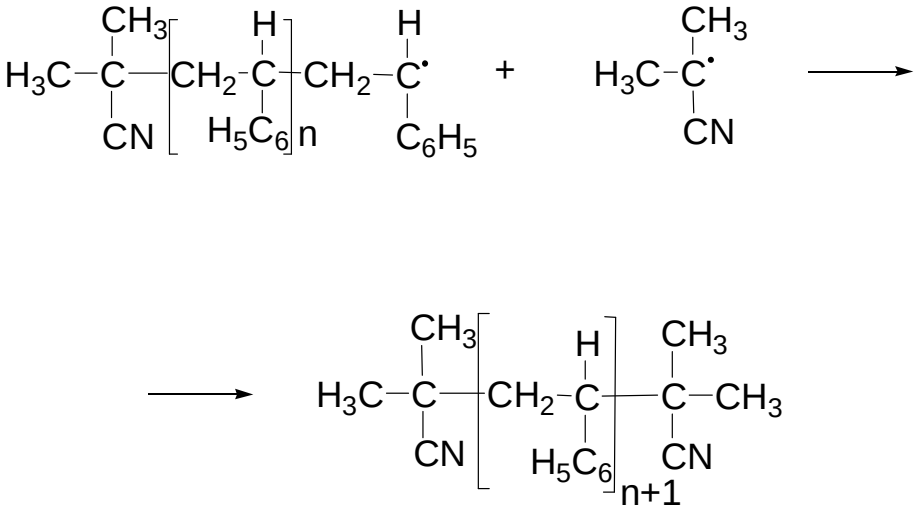
Obr. 6b *Iniciace polymerizace při přípravě kopolymeru styrenu a divinylbenzenu, převzato z* [33].



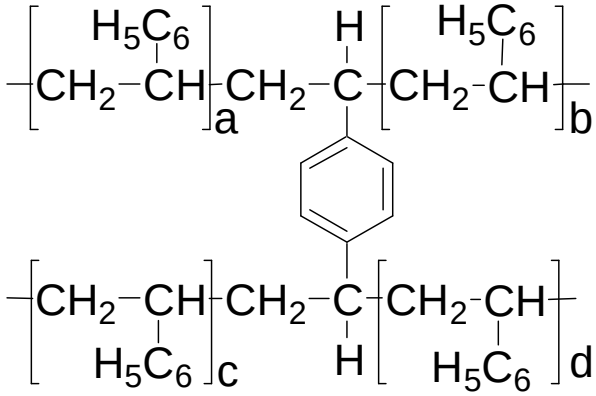
Obr. 6c *Propagace polymerizace při přípravě kopolymeru styrenu a divinylbenzenu, převzato z* [33].



Obr. 6d *Síťování při přípravě kopolymeru styrenu a divinylbenzenu, převzato z* [33].



Obr. 6e *Terminace polymerizace při přípravě kopolymeru styrenu a divinylbenzenu, převzato z* [33].

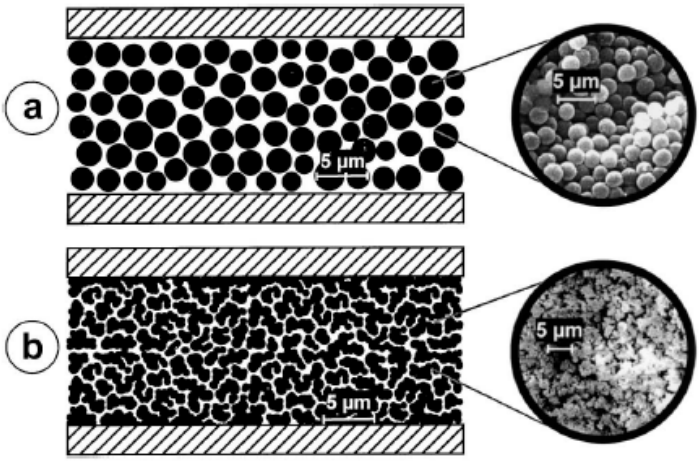


Obr. 6f *Struktura kopolymeru styrenu a divinylbenzenu, převzato z* [33].

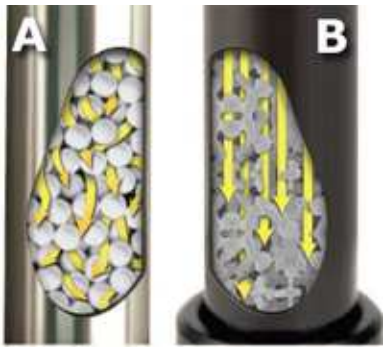
Při polymerizaci se vznikající monolit stává nerozpustným v polymerizační směsi a vytvoří pevnou fázi. Nejprve se polymerizací a síťováním vytvoří malé nerozpustné jádro (*nucleus*) gelové konzistence, které se následně zvětšuje. Pro vznikající polymer je termodynamicky lepším solvatačním činidlem směs monomerů než porogenů, proto nerozpustné jádro nabývá o další monomery, které jsou přítomny v okolní kapalině, až se setká s dalším narůstajícím jádrem, se kterým se spojí a postupně vytváří klastry a následně kompletní monolitickou stacionární fázi [45]. Během polymerizace dochází ke smršťování a pevný monolit oproti kapalné polymerizační směsi nevyplňuje kapiláru beze zbytku, ale na koncích se vytvoří mrtvý objem. Po proběhnutí polymerizace se odřízne mrtvý objem kapiláry a monolit se promyje pomocí tlakové pumpy methanolem nebo jiným rozpouštědlem, aby se vymyly nezreagované monomery, iniciátor a porogenní směs.

1.2.3 Vlastnosti monolitických stacionárních fází

Jak již bylo popsáno v úvodní kapitole, monolity v kapalinové chromatografii představují stacionární fáze vytvořené z jednoho kusu porézního materiálu. Monolity se svou strukturou tedy zásadně odlišují od náplňových kolon, což je znázorněno na obrázcích 7 a 8.



Obr. 7 *Struktura stacionární fáze (a) v náplňové a (b) v monolitické koloně, převzato z* [46].



Obr. 8 *Průtok mobilní fáze skrz A) náplňovou a B) monolitickou kolonu, převzato z* [47].

Nejdůležitějšími charakteristikami každého monolitu jsou jeho základní chemická struktura, neboli z jakých monomerů byl vytvořen, a jeho pórovitost. Chemická struktura monolitu určuje převažující druh interakcí s analytem, a tedy i druh chromatografie, pro který bude používán. Rozsáhlá škála monomerů umožňuje komplexní využití monolitických kolon v kapalinové chromatografii od nepolárních styren--divinylbenzenových monolitů pro reverzní chromatografii [40] až k chirálním separacím [48] a bioafinitní chromatografii [49].

Distribuce pórů v monolitu je v přímém vztahu k jeho specifickému povrchu, a tedy i k množství a dostupnosti aktivních center pro interakci s analytem. Pórovitost monolitu tak ovlivňuje účinnost separační kolony a má podobný význam jako velikost částic u náplňových kolon. U monolitů rozlišujeme tři druhy pórů: mikropóry, mesopóry a makropóry. Mikropóry mají velikost do 2 nm a představují největší příspěvek k celkovému povrchu monolitu. Mesopóry s velikostí od 2 do 50 nm mají také významný příspěvek k celkovému povrchu monolitu a tedy i k interakci s analytem. Naproti tomu makropóry s průměrem nad 50 nm již mají zanedbatelný vliv na celkový povrch monolitu a slouží zejména k průtoku mobilní fáze [45]. Makropóry umožňují vysoký objemový průtok mobilní fáze monolitem při nízkém zpětném tlaku. Z tohoto důvodu lze na monolitech dosáhnout rychlejších a účinnějších separací než na náplňových kolonách [38]. Průtok mobilní fáze monolitem (viz Obr. 8) způsobuje, že analyty se do pórů a k povrchu monolitu dostávají konvektivním tokem, a ne pomalejší difúzí jako u náplňových kolon. Dochází tak i k rychlé interakci mezi analytem a stacionární fází a celkově rychlejší separaci zejména v případě velmi pomalu difundujících makromolekul [50]. Matematický popis přenosu hmoty monolitem byl teoreticky odvozen Liapisem v roce 1999 [51].

Vhodným výběrem monomerů ovlivňujeme nejen chemickou podstatu monolitu, ale i jeho porozitu. Monolity na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu mají menší póry, než pokud je v polymerizační směsi se stejným obsahem síťovacího činidla a stejným složením porogenní směsi použit jako základní monomer styren nebo glycidylmethakrylát [45]. Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, prakticky všechny kroky přípravy monolitu mají vliv na jeho porozitu. Vzájemný poměr základního monomeru a síťovacího činidla ve směsi monomerů je první variabilní možností a bylo potvrzeno, že čím je větší zastoupení síťovacího činidla, tím menší póry monolit obsahuje a má větší specifický povrch [52]. Porogenní směs ovlivňuje velikost pórů monolitu solvatací vznikajícího polymerovaného jádra. Použijeme-li porogenní směs, ve které je větší zastoupení porogenu dobře solvatujícího jádro, výsledný monolit má menší póry. V počáteční fázi polymerizace porogen soutěží s monomery o solvataci jádra. S rostoucí schopností porogenu solvatovat jádro klesá zastoupení monomerů v jeho okolí a z polymerizační směsi precipituje jádro menší velikosti. Následné spojování menších jader způsobuje i menší mezery (póry) mezi nimi. Toluen je dobře solvatujícím činidlem pro styren-divinylbenzenové monolity, naopak dodekanol je slabé solvatační činidlo, kterým lze zvětšit póry styrenových i methakrylátových monolitů [24].

Teplota a doba polymerizace jsou při přípravě monolitu dalšími alternativami, jak ovlivnit jeho porozitu. S rostoucí teplotou se polymerizace rychleji iniciuje, například poločas rozpadu AIBN při 55 °C je 37 hodin, zatímco při 70 °C je to pouze 6 hodin. Ve směsi vzniká více jader a polymerizace probíhá rychleji. Ze směsi tak precipituje jádro dříve a je menší. Důsledkem toho má výsledný monolit menší póry, než pokud by byl připraven při nižší teplotě [53]. Pokud prodloužíme dobu polymerizace, zreaguje více monomerů a opět dostaneme monolit o menší velikosti pórů. Počet pórů se však s časem nezvyšuje, a proto s dobou polymerizace klesá objem pórů a specifický povrch monolitu [54,55]. Větší počet menších pórů vede nejen k většímu specifickému povrchu monolitu, ale i k jeho menší průchodnosti pro mobilní fázi, čímž ztrácí hlavní výhodu proti náplňovým kolonám pro rychlou separaci makromolekul. Monolity s mikropóry a menšími mesopóry jsou tedy používané spíše pro separace malých molekul, zatímco pro makromolekuly je výhodnější použití monolitů s vysokým zastoupením větších mesopórů.

Na separační vlastnosti monolitu má vliv i průměr kolony, ve které je monolit připravován. Například pro analýzu proteinů na poly(styren-divinylbenzenovém) monolitu lze dosáhnout výrazně účinnějších separací při použití kapilární kolony o vnitřním průměru 100 μm než při separaci na kapilární koloně o vnitřním průměru 320 μm [56]. Přestože každý vzniklý monolit je svým způsobem originál, na základě chromatografických měření byla prokázána vysoká reprodukovatelnost jejich přípravy [57]. Z výše uvedeného vyplývá, že optimalizace přípravy monolitu pro účinnou separaci vybraných analytů je experimentálně rozsáhlá činnost, a proto se často některé parametry, jako například teplota či složení porogenní směsi, volí na základě rešerše.

1.2.4 Iontová chromatografie na monolitických stacionárních fázích

Iontová chromatografie je založena na elektrostatické interakci mezi analytem a stacionární fází. Analyt a stacionární fáze musí tedy obsahovat opačně nabité skupiny, pomocí kterých následně dochází k retenci analytu na koloně. V případě monolitických stacionárních fází existují dva základní přístupy, jak dosáhnout přítomnosti nabité skupiny na jejich povrchu. V prvním případě modifikujeme povrch již zpolymerovaného monolitu bez nabitých skupin vhodnou sloučeninou, která požadovanou skupinu obsahuje a která se na povrch monolitu naváže kovalentní vazbou. Druhý přístup spočívá v použití základního monomeru již obsahujícího nabitou skupinu pro polymerizaci monolitu.

Při prvním přístupu je pravděpodobně nejčastější modifikace monolitu na bázi glycidylmethakrylátu, jehož volné epoxidové skupiny (viz Obr. 4, str. 14) jsou reakcím snadno přístupné. Modifikací tohoto monolitu diethylaminem byly připraveny stacionární fáze pro separace proteinů [58] a oligonukleotidů [59]. Silný měnič aniontů byl připraven dvoustupňovou modifikací glycidylmethakrylátového monolitu nejprve diethylaminem a následně diethylsulfátem a použit pro separaci nukleotidů ve formách mono-, di- a tri--fosfátů s účinností 59 000 teoretických pater na metr kolony [60]. Modifikací volných epoxidových skupin roztokem siřičitanu sodného byl připraven silný měnič kationtů, což bylo demonstrováno separací vybraných anorganických kationtů alkalických kovů a kovů alkalických zemin [61]. Slabého měniče kationtů lze z glycidylmethakrylátového monolitu dosáhnout opět dvoustupňovou modifikací nejprve diethylaminem a v druhém kroku kyselinou monochloroctovou [62].

Experimentálně náročnější modifikací povrchu monolitů je technika roubovaní (*grafting*), při které na povrch monolitu radikálovou polymerizací navazujeme řetězce funkčních monomerů. Na hydrolyzované epoxidové skupiny glycidylmethakrylátového monolitu lze například navázat polymerní řetězce 2-akrylamido-2-methylpropan-1--sulfonové kyseliny (dále jen AMPS) pomocí iniciace ceričitými ionty. Na takto modifikovaném monolitu, který má vlastnosti silného měniče kationtů, byla provedena separace tří proteinů během tří minut [63]. Technika *graftingu* umožňuje efektivní využití drahých či v laboratoři připravených monomerů, jelikož jsou zastoupeny na povrchu monolitu ve vysoké míře.

Výhodou modifikace pouze dostupného povrchu monolitu je, že se nemění strukturní vlastnosti základního skeletu již optimalizované přípravou. Výběr nejvhodnějšího modifikátoru s nabitou skupinou je tedy problematikou posledního modifikačního kroku a ne celé přípravy nosného monolitu. I přesto, je přímé zapolymerování monomeru obsahujícího nabitou skupinu mnohem méně experimentálně náročnou technikou z hlediska celkového procesu přípravy. Příprava takového monolitu je jednoduchá, jelikož nevyžaduje žádné další kroky, a účinná, přestože je základní monomer s nabitou skupinou přítomen nejen na povrchu monolitu, ale i v jeho vnitřní struktuře.

Pro přímé zapolymerování nabitého monomeru existuje rozsáhlá řada možností realizace vzhledem k počtu potencionálních monomerů. Jedním z nejpoužívanějších monomerů je již zmíněný AMPS. Kopolymerací AMPS s poly(ethylenglycol)diakrylátem v kapiláře o vnitřním průměru 75 μm byl připraven monolit, jehož iontoměničové vlastnosti byly demonstrovány separací čtyř syntetických a následně i devíti přírodních peptidů. Částečně hydrofobní charakter AMPS musel být však potlačen přídavkem acetonitrilu do mobilní fáze [64] a separace proteinů byla také oproti monolitu modifikovaného *graftingem* AMPS [63] výrazně delší. Další možností, jak dosáhnout vysoce účinných separací peptidů a proteinů mechanizmem iontové výměny je přímé zapolymerování monomeru s fosfátovou skupinou [65]. V kapilární elektrochromatografii přítomnost AMPS v monolitu zajišťuje jak stabilní elektroosmotický tok v širokém rozsahu pH, tak i iontoměničový charakter stacionární fáze [66]. Kombinace iontoměničového a hydrofilního mechanizmu separace bylo dosaženo při kopolymerizaci 3-sulfopropylmethakrylátu s hydrofilním pentaerythritoltriakrylátem. Kombinovaný mechanizmus byl prokázán sledováním vlivu změn pH a obsahu acetonitrilu v mobilních fázích při separaci čtyř nukleotid monofosfátů [67]. Výrazného snížení hydrofobních interakcí analytů s monolitem bylo dosaženo při polymerizaci vinylsulfonové kyseliny namísto AMPS s poly(ethylenglycol)diakrylátem, zatímco při použití 2--sulfoethylmethakrylátu byla hydrofobicita monolitu srovnatelná jako při polymerizaci s AMPS [68]. Vinylsulfonová kyselina byla použita i jako monomer pro přípravu stacionární fáze pro kapilární elektrochromatografii kyselých látek, kde zajišťovala elektroosmotický tok při nízkých hodnotách pH [69]. Analogicky a s vyšší účinností separace byla použita vinylbenzensulfonová kyselina [70].

Separační kolony vyvinuté pro kapilární elektrochromatografii vždy obsahují nabitou skupinu pro generovaní elektroosmotického toku. Této skupiny lze teoreticky využít pro elektrostatické interakce v iontové kapalinové chromatografii. Vinylbenzensulfonová kyselina je tedy rovněž potencionálně využitelná jako monomer pro přípravu stacionární fáze s iontoměničovým mechanizmem pro kapalinovou chromatografii. Tato její aplikace však nebyla v literatuře dosud popsána. Elektrostatických interakcí kyseliny methakrylové je v separačních metodách využíváno zejména v mikroextrakčních kolonkách pro prekoncentraci vzorku [71] a pro specifické separace ve speciálně připravených vtištěných monolitech [72]. Kopolymer kyseliny methakrylové a ethylenglycoldimethakrylátu, který je využíván pro již zmíněnou mikroextrakci, byl připraven i v klasické separační koloně o vnitřním průměru 3,9 mm a elektrostatickými interakcemi bylo vysvětleno rozdílné retenční chování kofeinu a theofylinu [73]. Pro elektrochromatografii aromatických derivátů byl připraven monolit kopolymerací styrenu, kyseliny methakrylové a divinylbenzenu [74, 75]. Bylo prokázáno, že tentýž monolit lze aplikovat i v reverzní kapilární kapalinové chromatografii [76], avšak jeho elektrostatické interakce v kapalinové chromatografii studovány dosud nebyly.

1.3 Cíl práce

Cílem této práce byla příprava kapilárních monolitických kolon na bázi styrenu, kyseliny methakrylové a divinylbenzenu s proměnlivým složením polymerizační směsi. Druhým cílem práce bylo studium vlivu obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi na výsledný monolit metodou vysokoúčinné mikrokapalinové chromatografie se zaměřením na možné elektrostatické interakce mezi analyty a kyselinou methakrylovou.

2. Experimentální část

2.1 Použité chemikálie a materiály

Pro přípravu kolon byla použita křemenná kapilára o i.d. 320 μm od firmy Supelco (Bellefonte, USA). K silanizaci kapiláry byl použit hydroxid sodný (p.a.) a aceton (p.a) obojí od společnosti Lachema (Neratovice, Česká republika), voda upravená přístrojem Milli-Q water purufication system (Millipore, USA), 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylát (99%) od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko) a toluen (99%) od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Pro přípravu monolitů byl použit styren (99,5%) od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko), divinylbenzen (pro syntézu), kyselina methakrylová (pro syntézu) a toluen (99%) od firmy Merck (Darmstadt, Německo) a dále α,α´-azobis(isobutyronitril) (98%) od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) a isooktan (p.a.) od společnosti Lach-Ner (Neratovice, Česká republika). K vysoušení kapilár a odvzdušnění polymerizační směsi byl použit plynný dusík (99,999%) od společnosti Linde (Praha, Česká republika). Kolony byly promyty methanolem (99,8%) od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Mobilní fáze byly připravovány z deionizované vody, acetonitrilu (99,9%), kyseliny octové (99,7%) obojí od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) a dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu (čistý) od firmy Lachema (Brno, Česká republika). Pro měření byly jako analyty použity thiomočovina (99%), benzen (99%), fenol (99%), anilin (98%), toluen (99%), propylbenzen (99%), butylbenzen (99%), tyramin hydrochlorid (98%) a isopropylamin (99,5%) vše od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Dále byly použity ethylbenzen (p.a.), propylamin (99%) a diethylamin (99,5) od společnosti Fluka (Buchs, Švýcarsko) a L-asparagová kyselina (99,9%) a L-leucin (99,9%) od firmy Merck (Darmstadt, Německo) a L-histidin (98%) od společnosti Ferring Léčiva (Jesenice u Prahy, Česká republika)

2.2 Použité přístroje

Pro přípravu polymerizační směsi byl iniciátor AIBN odvažován na analytických vahách Precisa 262 SMA-FR od firmy Precisa Instrument (Dietikon, Švýcarsko) a monomery byly kontrolně odvažovány na analytických vahách XE Series Model 100A od společnosti Denver Instrumentation Company (Bohemia, USA). Na těchto vahách byly odvažovány i chemikálie pro přípravu zásobních roztoků vzorků a mobilních fází. K přípravě vodní lázně na polymerizaci kolon byla použita sušárna UE 200 od firmy Mermmert (Schwabach, Německo). Testování kolon bylo prováděno na mikrokapalinovém chromatografu Agilent Technologies 1200 Series (Santa Clara, USA), který se skládal z vakuového degasseru, gradientového čerpadla mobilní fáze, automatického dávkovače vzorku a detektoru s diodovým polem a detekční celou o optické délce 1 cm. Ovládání mikrokapalinového chromatografu, sběr a vyhodnocení dat bylo prováděno přes počítačovou stanici pomocí softwaru ChemStation verze B.04.01. SP1 [647] od společnosti Agilent Technologies (Santa Clara, USA).

Měření testovací směsi S8 (viz str. 34) bylo provedeno na mikrokapalinovém chromatografu, který se skládal z lineárního čerpadla mobilní fáze Model 100DM od společnosti Isco (Lincoln, USA), dávkovacího ventilu se smyčkou o objemu 100 nl od firmy Valco International (Schenkon, Švýcarsko) a spektrofotometrického detektoru UVIS-205 od firmy Linear (San José, USA) s detekční kapilárou o vnitřním průměru 100 μm. Data z tohoto měření byla vyhodnocena v softwaru Clarity verze 2.4.4.105 od firmy DataApex (Praha, Česká republika). Odplynění mobilní fáze pro toto měření bylo provedeno v ultrazvukové lázni Elmasonic S15H zakoupené od firmy P-Lab (Praha, Česká republika). Pro přípravu mobilních fází byl použit pH-metr Orion Model 370 od společnosti Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) s kombinovanou skleněnou elektrodou model 6.0224.100 od firmy Metrohm (Herisau, Švýcarsko).

2.3 Postup přípravy vzorků a mobilních fází

Příprava testovací směsi malých organických molekul, vzorků benzenu a thiomočoviny

Testovací směs malých organických látek (dále jen směs S8) byla připravena odvážením 50 mg thiomočoviny, benzenu, fenolu, anilinu, toluenu, ethylbenzenu, propylbenzenu a butylbenzenu do 100 ml odměrné baňky a doplněna 65% acetonitrilem po rysku. Zásobní roztok thiomočoviny o objemu 15 ml a koncentraci 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním vypočteného a odváženého množství thiomočoviny v 15 ml vody. Vzorek thiomočoviny o koncentraci 1 mmol/l byl připraven ředěním 100 μl zásobního roztoku vodou na objem 1 ml. Vzorek benzenu o objemu 1 ml a koncentraci 10 μl/ml byl připraven ředěním 10 μl čisté chemikálie vodou na objem 1 ml.

Příprava vzorků kyseliny asparagové, leucinu, histidinu a jejich směsi s thiomočovinou

Zásobní roztoky kyseliny asparagové, leucinu a histidinu o koncentracích 10 mmol/l byly připraveny rozpuštěním vypočtených a odvážených množství těchto aminokyselin v 15 ml vody. Vzorky těchto aminokyselin o koncentraci 1 mmol/l byly připraveny ředěním 100 μl zásobních roztoků vodou na objem 1 ml. Směs aminokyselin s thiomočovinou byla připravena ze zásobních roztoků pipetováním 100 μl kyseliny asparagové, 300 μl leucinu, 50 μl histidinu, 50 μl thiomočoviny pipetované ze vzorku o koncentraci 1 mmol/l a 500 μl vody.

Příprava vzorků isopropylaminu, propylaminu, diethylaminu a tyraminu

Vzorky isopropylaminu, propylaminu a diethylaminu o koncentracích 1 % (obj.) a 10 % (obj.) byly připraveny ředěním 10 μl respektive 100 μl zásobních chemikálií vodou na objem 1 ml. Zásobní roztok tyraminu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním navážky 5 mg tyraminu v 5 ml vody. Vzorky tyraminu o koncentracích 0,5 mg/ml a 0,1 mg/ml byly připraveny ředěním 500 μl respektive 100 μl zásobního roztoku vodou na objem 1 ml.

Příprava mobilních fází

Pro přípravu mobilní fáze „voda“ byla použita čistá chemikálie. Mobilní fáze „fosforečnanový pufr“ o pH 7,0 a koncentraci 20 mmol/l byla připravena rozpuštěním vypočteného a odváženého množství NaH_2PO_4 ve 250 ml vody a následnou úpravou pH na hodnotu 7,0 roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l. Mobilní fáze „65% acetonitril ve vodě“ byla připravena z čistých chemikálií gradientovým čerpadlem mikrokapalinového chromatografu. Mobilní fáze o pH 4,6; 4,3; 3,8 a 3,5 byly připraveny přidáváním kyseliny octové do 250 ml vody až do dosažení požadované hodnoty pH, která byla během přípravy měřena pH-metrem.

2.4 Postup přípravy monolitických kolon

Úprava vnitřního povrchu kapiláry - silanizace

Křemenná kapilára potažená polyimidem o vnitřním průměru 320 μm a délce 25 cm byla naplněna roztokem NaOH o koncentraci 1 mol/l. Kapilára byla na koncích utěsněna gumovými septy a ponechána reakci při laboratorní teplotě po dobu dvou hodin. Následně byla kapilára promyta vodou do neutrální hodnoty pH (měřeno univerzálním indikátorovým papírkem pH) a acetonem po dobu pěti minut. Kapilára byla vysoušena proudem dusíku po dobu pěti minut. Poté byla vysušená kapilára naplněna 10% roztokem γ-MAPSu v toluenu, na koncích utěsněna gumovými septy a ponechána silanizační reakci při laboratorní teplotě po dobu tří hodin. Silanizační činidlo bylo následně vymyto toluenem po dobu pěti minut a kapilára byla opět vysoušena proudem dusíku po dobu pěti minut. Takto upravená kapilára byla připravena pro naplnění polymerizační směsí. Plnění a promývání kapiláry během silanizace bylo realizováno pouze gravitační silou.

Příprava polymerizační směsi

Nejprve byl do vialek navážen iniciátor α,α´-azobis(isobutyronitril) (AIBN). K iniciátoru byly přidány automatickou pipetou monomery: styren, divinylbenzen a kyselina methakrylová, jejichž množství bylo kontrolováno váhově. Po protřepání a rozpuštění iniciátoru ve směsi monomerů byl přidán toluen a isooktan, jakožto složky porogenní směsi. Kompletní polymerizační směs byla protřepána a odvzdušněna probubláním dusíkem po dobu pěti minut.

Bylo připraveno devět verzí polymerizační směsi s různým zastoupením jednotlivých monomerů podle zvoleného množství kyseliny methakrylové. Úpravy zastoupení monomerů vycházely ze základní polymerizační směsi známé již z předchozího výzkumu [75, 76]. Tato základní směs obsahovala 1,9 mg AIBN, 50 µl styrenu, 50 µl kyseliny methakrylové, 100 µl divinylbenzenu, 300 µl toluenu a 300 µl isooktanu. První skupina upravených směsí obsahovala kyselinu methakrylovou v množství od 25 µl do 125 µl při zachování konstantního složení zbytku základní polymerizační směsi s výjimkou množství iniciátoru, které bylo vždy vypočteno jako 1 % (hm.) z celkové hmotnosti monomerů.

Druhá skupina upravených směsí obsahovala kyselinu methakrylovou rovněž v množství od 25 µl do 125 µl, ovšem měněn byl i obsah styrenu a divinylbenzenu, tak aby zůstal zachován objemový poměr 1:1 mezi základními monomery a síťovacím činidlem. Množství iniciátoru bylo opět vypočteno jako 1 % (hm.) z celkové hmotnosti monomerů. Celkový přehled zastoupení všech složek v jednotlivých polymerizačních směsích je uveden v tabulce 1a pro směsi skupiny I a v tabulce 1b pro směsi skupiny II.

Tab. 1a *Zastoupení kyseliny methakrylové (MAA), styrenu (ST), divinylbenzenu (DVB), α,α'-azobis(isobutyronitrilu) (AIBN), toluenu (T) a isooktanu (ISO) v polymerizačních směsích ze skupiny I.*

Označení směsi	MAA (µl)	ST (µl)	DVB (µl)	AIBN (mg)	T (µl)	ISO (µl)
MAA-A	25	50	100	1,6	300	300
MAA-B	50	50	100	1,9	300	300
MAA-C	75	50	100	2,1	300	300
MAA-D	100	50	100	2,4	300	300
MAA-E	125	50	100	2,6	300	300

Tab. 1b *Zastoupení kyseliny methakrylové (MAA), styrenu (ST), divinylbenzenu (DVB), α,α´-azobis(isobutyronitrilu) (AIBN), toluenu (T) a isooktanu (ISO) v polymerizačních směsích ze skupiny II.*

Označení směsi	MAA (μl)	ST (μl)	DVB (μl)	AIBN (mg)	T (μl)	ISO (μl)
MAA-F	25	75	100	1,9	300	300
MAA-B	50	50	100	1,9	300	300
MAA-G	75	25	100	1,9	300	300
MAA-H	100	0	100	1,9	300	300
MAA-I	125	0	125	2,4	300	300

Polymerizace monolitu

Kapilára upravená silanizací byla naplněna polymerizační směsí a na koncích utěsněna gumovými septy. Naplněná kapilára byla vložena do vodní lázně o teplotě 70 °C. Vodní lázeň byla vložena do sušárny s nastavenou teplotou 80 °C pro udržení konstantní teploty vodní lázně 70 °C po celou dobu polymerizace. Polymerizace monolitu probíhala po dobu 3, 6 a 19 hodin. Polymerizace byla ukončena vyjmutím kapiláry z vodní lázně. Monolitická kolona byla zkrácena o mrtvý objem na délku přibližně 17 cm a promyta na mikrokapalinovém chromatografu methanolem po dobu jedné hodiny při průtoku 4 μl/min. Promytá kolona byla následně zkrácena na délku 15 cm a použita k dalšímu měření.

2.5 Postup testování monolitických kolon

Nejprve byla pro ověření techniky přípravy monolitických kolon a jejich vhodnosti pro analýzu malých organických molekul měřením směsi S8 (viz kap 2.3) testována monolitická kolona MAA-B (50 μl MAA) s dobou polymerizace 3 hodiny. Jako mobilní fáze byl použit 65% acetonitril při průtoku 4 μl/min a detekční vlnová délka byla 214 nm. Měření bylo provedeno na mikrokapalinovém chromatografu (viz kap. 2.2). Byla měřena pouze směs S8. Standardy jednotlivých složek této směsi měřeny nebyly, jelikož retenční pořadí analytů je známé z literatury [76].

Monolitická kolona MAA-B s dobou polymerizace 6 hodin byla použita pro testování elektrostatických interakcí mezi analyty a kyselinou methakrylovou měřením směsi aminokyselin a thiomočoviny. Jako mobilní fáze byla nejprve použita voda a následně kyselina octová o pH 3,8 a fosforečnanový pufr o pH 7,0. Poté byla kolona promyta vodou po dobu tří hodin při průtoku 4 μl/min a měření bylo provedeno opět při použití vody jako mobilní fáze. Následně byla kolona promyta kyselinou octovou o pH 3,8 po dobu tří hodin při průtoku 4 μl/min a měření bylo provedeno znovu při použití vody jako mobilní fáze. Při měření byl nastaven průtok mobilní fáze 4 μl/min a detekční vlnová délka byla 200 nm. Měřena byla směs aminokyselin kyseliny asparagové, leucinu a histidinu s thiomočovinou a standardy jednotlivých složek této směsi o koncentracích 1 mmol/l. Na koloně MAA-B s dobou polymerizace 19 hodin bylo provedeno měření vzorku 1% diethylaminu. Měření bylo provedeno v mobilní fázi 65% acetonitril při průtoku 4 μl/min a detekční vlnová délka byla 200 nm. Měření byla provedena na mikrokapalinovém chromatografu Agilent 1200 Series (viz kap. 2.2) a dávkovaný objem byl vždy 100 nl vzorku.

Testování vlivu obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi na výslednou monolitickou kolonu s dobou polymerizace 19 hodin bylo provedeno sérií měření na každé koloně. Nejprve byly měřeny vzorky 1% isopropylamin, 1% propylamin a tyramin o koncentraci 0,1 mg/ml při použití vody jako mobilní fáze a detekční vlnové délce 214 nm. Následně byly měřeny vzorky 10% isopropylamin, 10% propylamin a tyramin o koncentraci 0,5 mg/ml v mobilních fázích kyseliny octové o pH 4,6; 4,3 a 3,5 a detekční vlnové délce 200 nm. Jako poslední mobilní fáze byl použit 65% acetonitril, ve kterém byl měřen benzen o koncentraci 10 μl/ml při detekční vlnové délce 214 nm. Ve všech mobilních fázích byla měřena i voda jako slepý pokus a marker mrtvého času kolony. Měření byla provedena na mikrokapalinovém chromatografu Agilent 1200 Series (viz kap. 2.2) vždy při průtoku mobilní fáze 4 μl/min a s dávkovaným objemem vzorku 100 nl.

2.6 Měřené veličiny

Při chromatografických měřeních byly měřeny nebo vypočteny následující veličiny:

Tlak v chromatografickém systému – *p* [bar]

Z hodnoty zpětného tlaku při konstatním průtoku mobilní fáze lze usuzovat na míru průchodnosti monolitu.

Retenční čas analytu – t_R [min]

Retenční čas analytu je čas, který uplyne od nadávkování vzorku do průchodu analytu detektorem. Delší retenční čas znamená silnější interakce mezi analytem a stacionární fází v daném systému.

Mrtvý retenční čas – t_M [min]

Mrtvý retenční čas je retenční čas analytu, který se nezadržuje v separační koloně.

Retenční faktor – *k*

Retenční faktor je mírou retence analytu v separační koloně. Vypočítá se podle vzorce:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

kde t_R je retenční čas analytu a t_M mrtvý retenční čas systému. Retenční faktor se používá v kvalitativní analýze a pro porovnání retenčních vlastností různých chromatografických systémů.

Šířka píku v polovině jeho výšky – $w_{1/2}$ [min]

Šířka píku v polovině jeho výšky je mírou rozmytí analytu na koloně.

Rozlišení – $R_{1,2}$

Hodnota rozlišení dvou píků v chromatogramu charakterizuje míru separace dvou analytů, kterým tyto píky přísluší. Rozlišení se vypočítá podle vzorce:

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1})}{w_1 + w_2}$$

kde $t_{R,1}$ a $t_{R,2}$ jsou retenční časy příslušných analytů a w_1 a w_2 jsou šířky píků těchto analytů při základně.

Počet teoretických pater – *n* a počet teoretických pater na metr kolny – *n/m*

Počet teoretických pater je mírou účinnosti kolony. Čím větší je počet teoretických pater analytu, tím vyšší separační účinnost má kolona pro tento analyt. Počet teoretických pater se vypočítá podle vzorce:

$$n = 5{,}545 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

kde t_R je retenční čas daného analytu a $w_{1/2}$ šířka píku analytu v polovině jeho výšky.

Počet teoretických pater na metr kolony je veličina vhodná pro porovnání různých kolon**.** Vypočítá se podle vzorce:

$$n / m = \frac{n}{l}$$

kde n je počet teoretických pater a l délka kolony vyjádřená v metrech.

Tailing faktor – T_f

Hodnota tailing faktoru poskytuje informaci o symetrii píku. Vypočítá se podle vzorce:

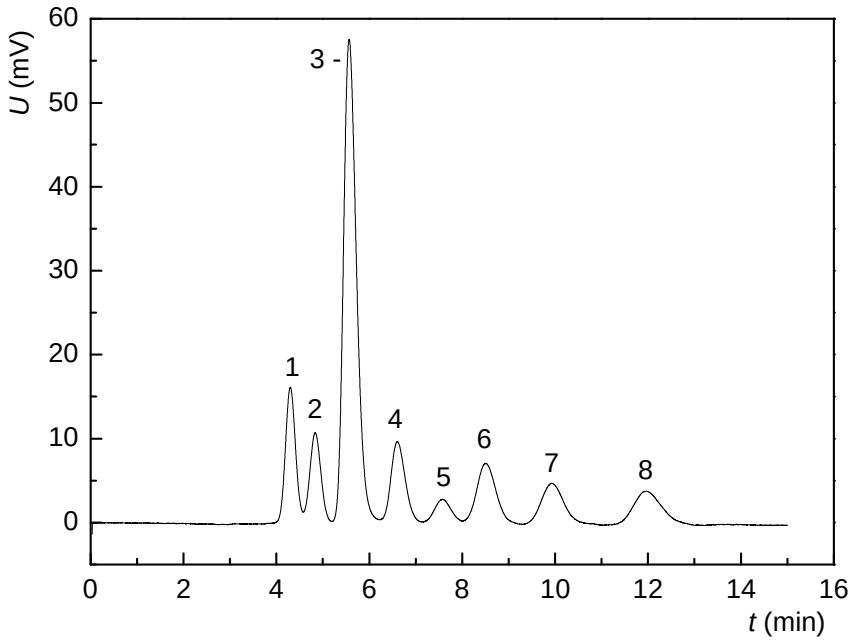
$$T_f = \frac{f_{5\,\%} + t_{5\,\%}}{2 \cdot f_{5\,\%}}$$

kde $f_{5\,\%}$ je šířka vzestupné části píku v 5 % jeho výšky a $t_{5\,\%}$ je šířka sestupné části píku v 5 % jeho výšky. Pokud je hodnota T_f menší než jedna je pík rozmytý ve vzestupné části. Pokud je hodnota T_f vetší než jedna je pík rozmytý v sestupné části.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Testování přípravy monolitických kolon

Metodika přípravy monolitických kolon na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové a jejich vhodnost pro analýzu malých molekul byla testována měřením směsi organických látek (směs S8, viz kapitola 2.2). Měření bylo provedeno na koloně s obsahem 50 μl kyseliny methakrylové v polymerizační směsi (směs MAA-B) a dobou polymerizace tři hodiny. Kolona byla připravena podle postupu uvedeného v kapitole 2.4 a po polymerizaci monolit nevykazoval žádné pozorovatelné defekty. Při promývání kolony methanolem při průtoku 4 μl/min nebyl monolit z kapiláry vytlačen, což prokazuje pevné navázání monolitu na stěnu kapiláry a tedy i úspěšný proces silanizace. Výsledky měření směsi S8 jsou shrnuty na obrázku 9 a v tabulce 2.



Obr. 9 *Chromatogram analýzy testovací směsi S8. 1 – thiomočovina, 2 – fenol, 3 – anilin, 4 – benzen, 5 – toluen, 6 – ethylbenzen, 7 – propylbenzen, 8 – butylbenzen. Měřeno na koloně MAA-B (50 μl MAA, 3 h, l = 15 cm, 320 μm i.d.), 65% ACN jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 μl/min, detekční vlnová délka λ = 214 nm.*

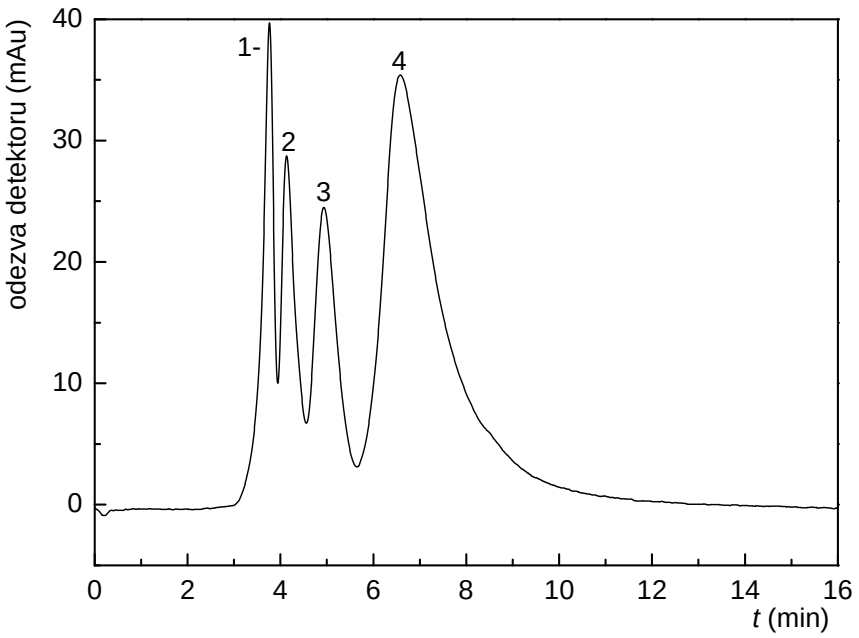
Tab. 2 *Tabulka hodnot retenčních časů (t_R), počtů teoretických pater na metr kolony (n/m) a rozlišení píků jednotlivých analytů ($R_{1,2}$) pro analýzu směsi S8. Měřeno na koloně MAA--B (50 μl MAA, 3 h, l = 15 cm, 320 μm i.d.), 65% ACN jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 μl/min, detekční vlnová délka λ = 214 nm.*

Analyt	t_R (min)	*n/m*	$R_{1,2}$
thiomočovina	4,30	12000	-
fenol	4,83	12000	1,24
anilin	5,57	12600	1,51
benzen	6,60	13300	1,89
toluen	7,58	12000	1,51
ethylbenzen	8,51	12600	1,26
propylbenzen	9,93	12600	1,68
butylbenzen	11,95	12000	1,98

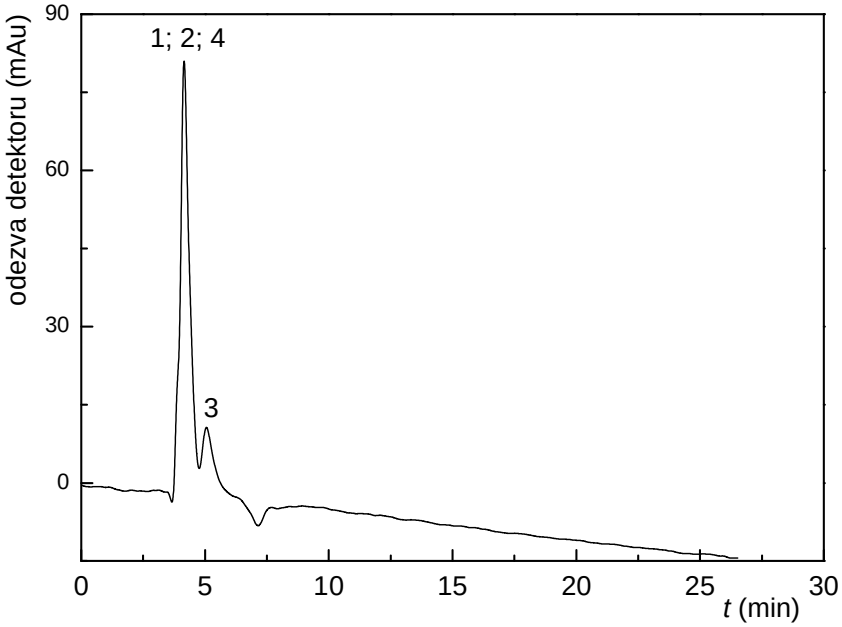
Z chromatogramu (Obr. 9) a z hodnot uvedených v tabulce 2 je patrné, že jednotlivé složky směsi S8 se od sebe navzájem oddělily. Analyty při použití 65% acetonitrilu jako mobilní fáze eluovaly v pořadí podle své polarity od nejpolárnější thiomočoviny po nejméně polární butylbenzen. Rozlišení píků bylo až na základní linii a účinnost separace byla minimálně 12000 teoretických pater na metr kolony. Rozdíly ve velikostech píků byly způsobeny vysokou těkavostí jednotlivých analytů. Složky směsi se oddělily na základě mechanizmu reverzní chromatografie, který vyplývá ze styren-divinylbenzenové struktury monolitu. Elektrostatické interakce mezi analyty a kyselinou methakrylovou pravděpodobně neměly výrazný vliv na retenci analytů. Přítomnost kyseliny methakrylové v polymerizační směsi je však nezbytná, jelikož má vliv na morfologii monolitu. Při použití čistě styren-divinylbenzenového monolitu k rozdělení směsi S8 nedochází a takovýto monolit není vhodný pro analýzy malých molekul [76]. Rozdělením směsi S8 na koloně MAA-B s dobou polymerizace tři hodiny byla prokázána správná metodika přípravy monolitických kolon včetně procesu silanizace. Rovněž bylo potvrzeno, že styren-divinylbenzenové monolitické kolony obsahující kyselinu methakrylovou jsou vhodné pro analýzu malých molekul.

3.2 Testování elektrostatických interakcí

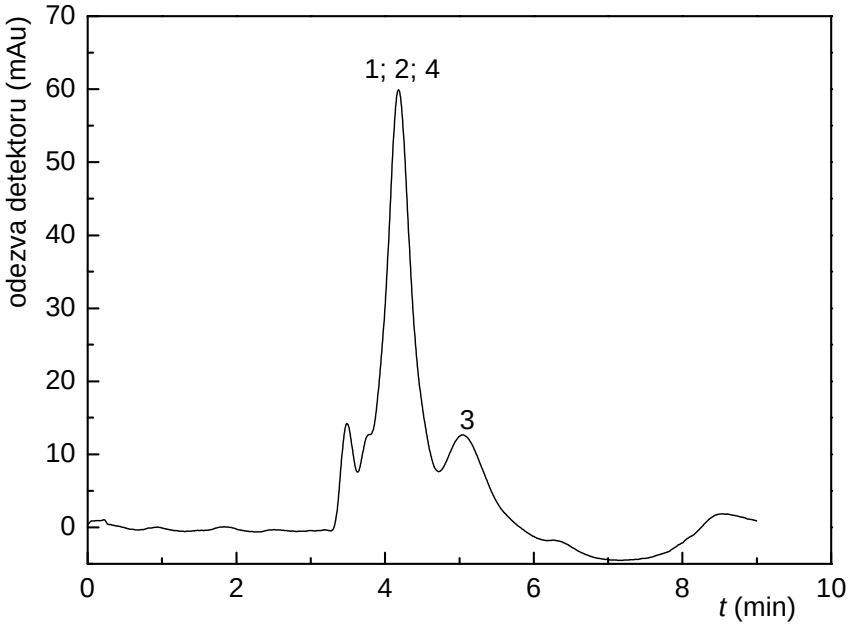
V této části práce bylo studováno, zda dochází k ovlivnění retence vybraných analytů elektrostatickými interakcemi s kyselinou methakrylovou. Na koloně s obsahem 50 μl kyseliny methakrylové v polymerizační směsi (kolona MAA-B) a dobou polymerizace šest hodin byla měřena směs kyseliny asparagové, leucinu a histidinu s thiomočovinou. Směs byla analyzována v mobilních fázích o různých hodnotách pH. Na obrázcích 10 až 12 jsou znázorněny chromatogramy analýz směsi při použití vody (Obr. 10), kyseliny octové o pH 3,8 (Obr. 11) a fosforečnanového pufru (NaH_2PO_4/NaOH) o pH 7,0 (Obr. 12) jako mobilních fází. Ve všech mobilních fázích byly měřeny i standardy složek směsi pro identifikaci jednotlivých píků.



Obr. 10 *Chromatogram analýzy směsi aminokyselin a thiomočoviny. 1 – kyselina asparagová, 2 – leucin, 3 – thiomočovina, 4 – histidin. Měřeno na koloně MAA-B (50 μl MAA, 6 h, l = 15 cm, 320 μm i.d.),* ***voda*** *jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 μl/min, detekční vlnová délka λ = 200 nm.*



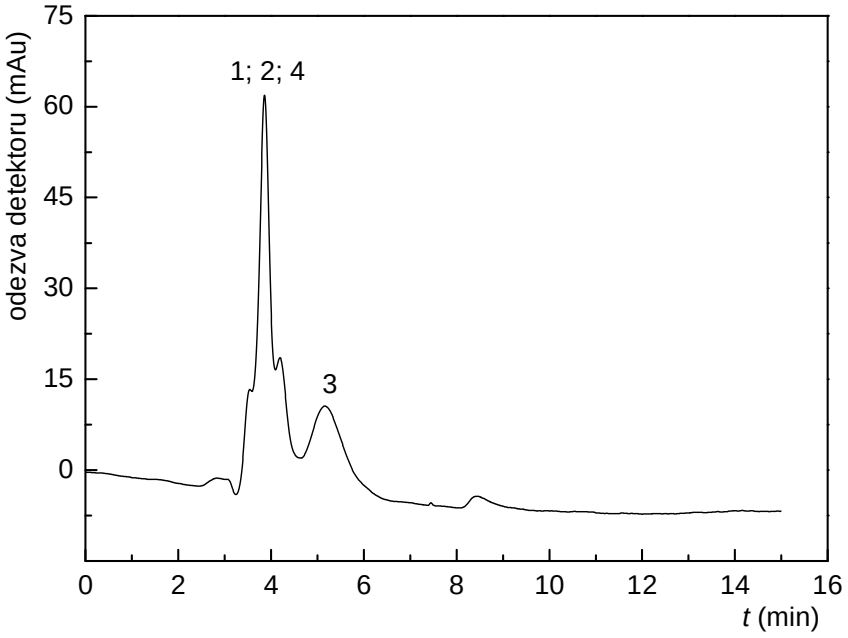
Obr. 11 *Chromatogram analýzy směsi aminokyselin a thiomočoviny. 1 – kyselina asparagová, 2 – leucin, 3 – thiomočovina, 4 – histidin. Měřeno na koloně MAA-B (50 μl MAA, 6 h, l = 15 cm, 320 μm i.d.),* ***CH_3COOH o pH 3,8*** *jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 μl/min, detekční vlnová délka λ = 200 nm.*



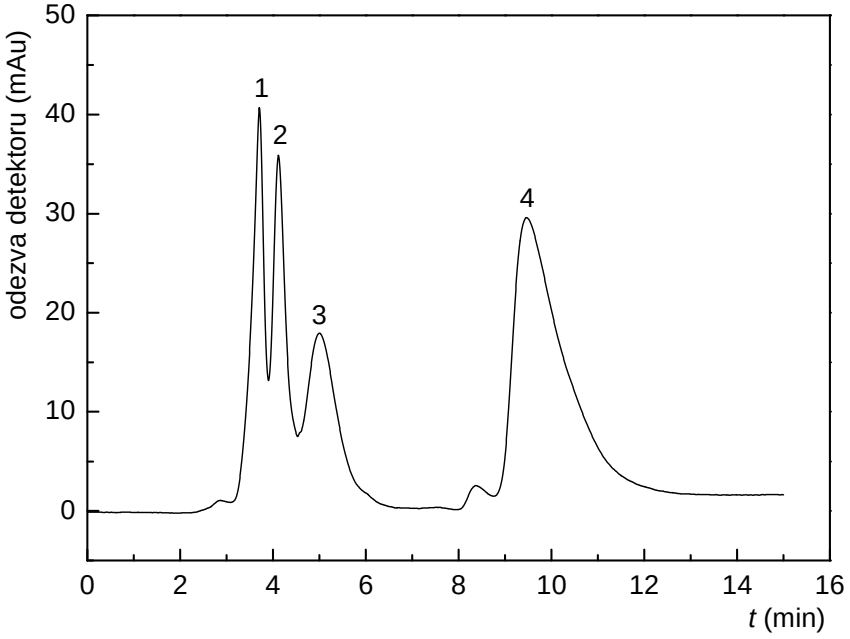
Obr. 12 *Chromatogram analýzy směsi aminokyselin a thiomočoviny. 1 – kyselina asparagová, 2 – leucin, 3 – thiomočovina, 4 – histidin. Měřeno na koloně MAA-B (50 μl MAA, 6 h, l = 15 cm, 320 μm i.d.),* ***20mmol/l NaH_2PO_4/NaOH o pH 7,0*** *jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 μl/min, detekční vlnová délka λ = 200 nm.*

Směs kyseliny asparagové, leucinu, thiomočoviny a histidinu se v tomto retenčním pořadí rozdělila pouze při použití vody jako mobilní fáze. Směs se rozdělila pravděpodobně mechanizmem reverzní chromatografie kombinovaným se slabými elektrostatickými interakcemi mezi protonizovanou aminoskupinou aminokyselin a disociovanou karboxylovou skupinou kyseliny methakrylové. Histidin, který obsahuje v postranním řetězci bazickou skupinu, měl nejdelší retenční čas a pravděpodobně tedy více interagoval s kyselinou methakrylovou, což potvrzuje i šířka a rozmytí jeho píku. Elektrostatické interakce však nebyly příliš silné, jelikož při použití kyseliny octové o pH 3,8 všechny aminokyseliny koeluovaly. Při tomto pH byly aminokyseliny protonizovány, což by mohlo zapříčinit silnější interakce s kyselinou methakrylovou. Kyselina methakrylová má však pKa 4,65 [77] a při pH 3,8 lze tedy předpokládat, že nebyla příliš disociována. Nabité aminokyseliny tak neměly na stacionární fázi proti-iont, se kterým by se mohly vázat, a koeluovaly. Při použití fosforečnanového pufru o pH 7,0 aminokyseliny rovněž koeluovaly. Fosforečnanový pufr obsahoval sodné ionty, které se navázaly na disociovanou kyselinu methakrylovou, a zabránily tak elektrostatickým interakcím mezi analyty a stacionární fází. Z těchto výsledků je patrné, že elektrostatické interakce měly při separaci směsi ve vodě nezanedbatelný vliv a to především u histidinu, jehož retenční čas při zablokování elektrostatických interakcí poklesl z hodnoty 6,5 minuty na přibližně 4 minuty. Rovněž se značně snížilo rozmytí píku histidinu.

Zpětné obnovení elektrostatických interakcí mezi aminokyselinami a kyselinou methakrylovou bylo nezbytné pro jejich definitivní potvrzení. Po provedení analýzy ve fosforečnanovém pufru byla kolona promyta vodou a následně byla provedena analýza směsi při použití vody jako mobilní fáze. Výsledky této analýzy jsou znázorněny na obrázku 13. Poté byla kolona promyta kyselinou octovou o pH 3,8 a znovu byla provedena analýza směsi při použití vody jako mobilní fáze. Výsledky této analýzy jsou znázorněny na obrázku 14.



Obr. 13 *Chromatogram analýzy směsi aminokyselin a thiomočoviny. 1 – kyselina asparagová, 2 – leucin, 3 – thiomočovina, 4 – histidin. Měřeno na koloně MAA-B (50 μl MAA, 6 h, l = 15 cm, 320 μm i.d.) promyté vodou,* ***voda*** *jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 μl/min, detekční vlnová délka λ = 200 nm.*



Obr. 14 *Chromatogram analýzy směsi aminokyselin a thiomočoviny. 1 – kyselina asparagová, 2 – leucin, 3 – thiomočovina, 4 – histidin. Měřeno na koloně MAA-B (50 μl MAA, 6 h, l = 15 cm, 320 μm i.d.) promyté CH_3COOH o pH 3,8,* ***voda*** *jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 μl/min, detekční vlnová délka λ = 200 nm.*

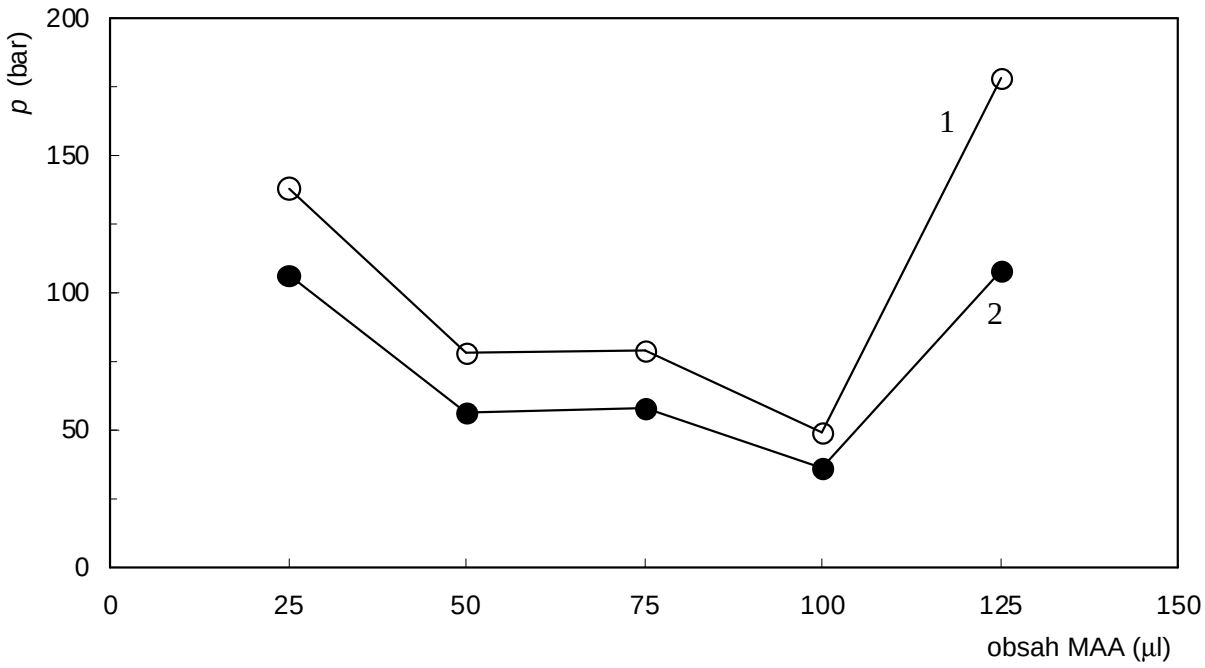
Z chromatogramu na obrázku 13 je patrné, že promytí vodou nebylo dostačující k vymytí sodných iontů z povrchu monolitu. Aminokyseliny při této analýze opět koeluovaly, jelikož nebyly obnoveny elektrostatické interakce. Z chromatogramu na obrázku 14 však vyplývá, že zde již elektrostatické interakce obnoveny byly, jelikož všechny složky směsi byly odděleny. Pro vymytí sodných iontů bylo tedy třeba promýt kolonu kyselinu octovou o pH 3,8. Porovnáme-li chromatogramy na obrázcích 10 a 14 pozorujeme výrazný nárůst retenčního času histidinu z 6,5 na 10 minut a rozmytí jeho píku. Tento nárůst byl způsoben silnějšími interakcemi mezi histidinem a kyselinou methakrylovou. Před analýzou znázorněnou na obrázku 10 nebyla kolona promývána kyselinou a pravděpodobně tedy nebyla zcela v „H^+ cyklu“ jako u analýzy znázorněné na obrázku 14.

Elektrostatické interakce mezi analytem a kyselinou methakrylovou byly potvrzeny i analýzou vzorku diethylaminu na koloně MAA-B s dobou polymerizace 19 hodin. Diethylamin byl analyzován při použití 65% acetonitrilu jako mobilní fáze, čímž byly potlačeny nepolární interakce mezi ethylovými skupinami analytu a styren--divinylbenzenovou strukturou monolitu. Retenční čas diethylaminu byl přibližně 25 minut a pík diethylaminu byl při základně široký 57 minut a rozmytý v sestupné části, hodnota tailing faktorku píku byla 2,0. Tyto charakteristiky píku lze vysvětlit pouze elektrostatickými interakcemi diethylaminu s kyselinou methakrylovou. Diethylamin je silně bazická látka a bez elektrostatických interakcí by jeho retence na nepolárním styren--divinylbenzenovém monolitu byla výrazně nižší.

Předchozími experimenty byly jednoznačně prokázány elektrostatické interakce mezi analyty a kyselinou methakrylovou přítomnou v monolitu. Kyselina methakrylová má tedy nejen vliv na polymerizaci monolitu a jeho výslednou porozitu, ale je přítomna i na povrchu monolitu, kde prostřednictvím své karboxylové skupiny ovlivňuje retenci bazických analytů.

3.3 Testování kolon skupiny I

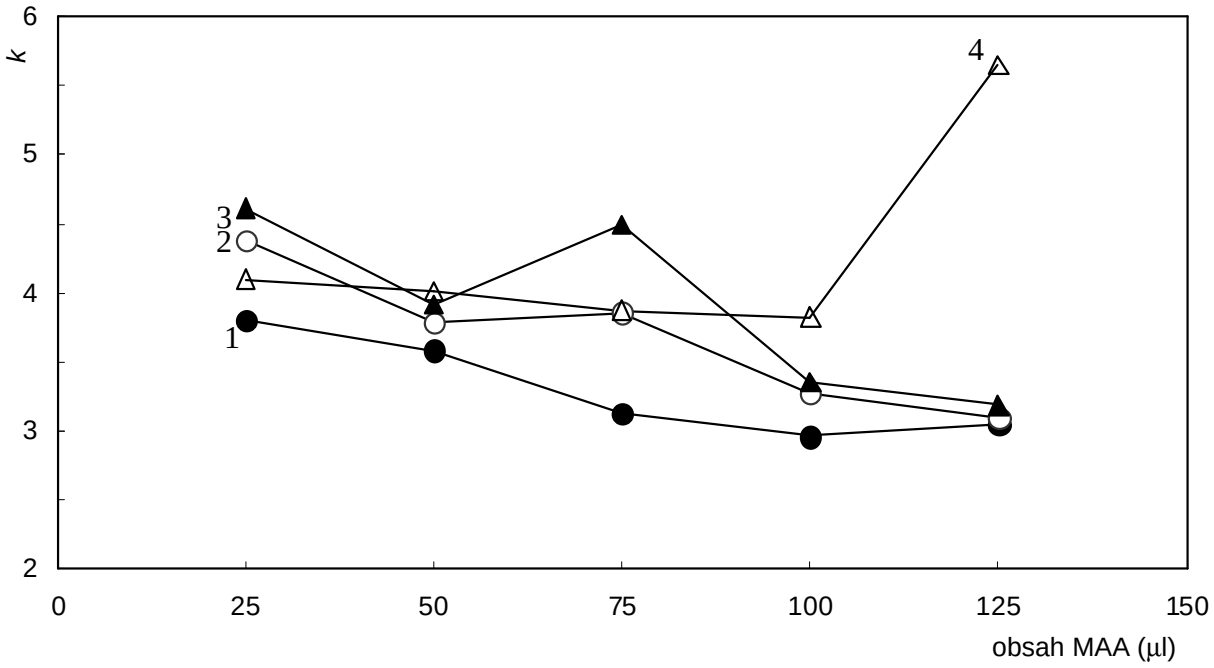
V této části práce byly testovány kolony, které byly připraveny z polymerizačních směsí obsahujících vždy 50 µl styrenu, 100 µl divinylbenzenu a proměnné množství kyseliny methakrylové od 25 µl do 125 µl. Souhrnné zastoupení složek v polymerizačních směsích je uvedeno v Tab. 1a (viz str. 29). Kolony byly připraveny postupem popsaným v kapitole 2.4 s dobou polymerizace 19 hodin. Monolitické kolony po polymerizaci nevykazovaly viditelné defekty a při promývání methanolem při průtoku 4 µl/min nebyly vytlačeny z kapiláry. Proměnný obsah kyseliny methakrylové tedy neměl vliv na homogenitu polymerizovaného monolitu ani na jeho kovalentní navázání k vnitřní stěně kapiláry. Na obrázku 15 jsou znázorněny závislosti zpětného tlaku na obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi pro 65% acetonitril a vodu jako mobilní fázi při průtoku 4 µl/min. Tato závislost odráží rozdíly ve vnitřních strukturách jednotlivých monolitických kolon.



Obr. 15 *Závislost zpětného tlaku (p) na obsahu kyseliny methakrylové pro kolony MAA-A až MAA-E (25 µl až 125 µl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 µm i.d.) pro 65% ACN (1) a vodu (2) jako mobilní fázi při průtoku 4 µl/min.*

Z grafu na obrázku 15 je patrné, že s rostoucím obsahem kyseliny methakrylové v polymerizační směsi klesá zpětný tlak výsledných monolitických kolon. Kolona MAA-A obsahující 25 μl kyseliny methakrylové měla oproti dalším kolonám vyšší zpětný tlak a pravděpodobně tedy menší póry. Přídavek kyseliny methakrylové na 50 μl způsobil výrazný pokles zpětného tlaku a tedy i zvětšení pórů monolitu. Další přídavek na 75 μl kyseliny methakrylové snížení tlaku nezapříčinil. Porozita kolon MAA-B a MAA-C byla tedy pravděpodobně srovnatelná a zvýšený obsah kyseliny methakrylové se projevil až při chromatografických měřeních. Kolona MAA-D s obsahem 100 μl kyseliny methakrylové měla opět výrazně nižší tlak a tedy větší póry než předchozí kolony. Přídavek kyseliny methakrylové na 125 μl způsobil oproti dosavadnímu trendu opětovné zvýšení tlaku. Při takto vysokém obsahu kyseliny methakrylové pravděpodobně došlo ke změně v solvatačních podmínkách během polymerizace monolitu. U monolitu MAA-E kyselina methakrylová pravděpodobně zapolymerovala více do vnitřní struktury monolitu a neměla tak významný vliv na zvětšení pórů monolitu. V této polymerizační směsi byl také nejvyšší nadbytek základních monomerů vůči síťovacímu činidlu a menší póry monolitu mohly být způsobeny i zapolymerováním veškerého divinylbenzenu a tedy i větším sesíťováním monolitu.

Křivka pro 65% acetonitril jako mobilní fázi je ve všech bodech výše než křivka pro vodu. Vyšší tlak při použití 65% acetonitrilu byl způsoben botnáním monolitů v organických rozpouštědlech. Botnání monolitu bylo nejvíce patrné u monolitu MAA-E, u kterého je rozdíl tlaků pro vodu a 65% acetonitril nejvyšší. U kolony MAA-E jako u jediné bylo botnání v 65% acetonitrilu nevratné. Při opětovném použití vody jako mobilní fáze se tlak u této kolony již nevrátil na svou původní hodnotu a ustálil se na 150 barech. Tedy mezi tlakem pro 65% acetonitril a tlakem pro vodu před použitím 65% acetonitrilu. Na obrázku 16 je znázorněna závislost retenčního faktoru isopropylaminu, při různých hodnotách pH mobilní fáze, na obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi.

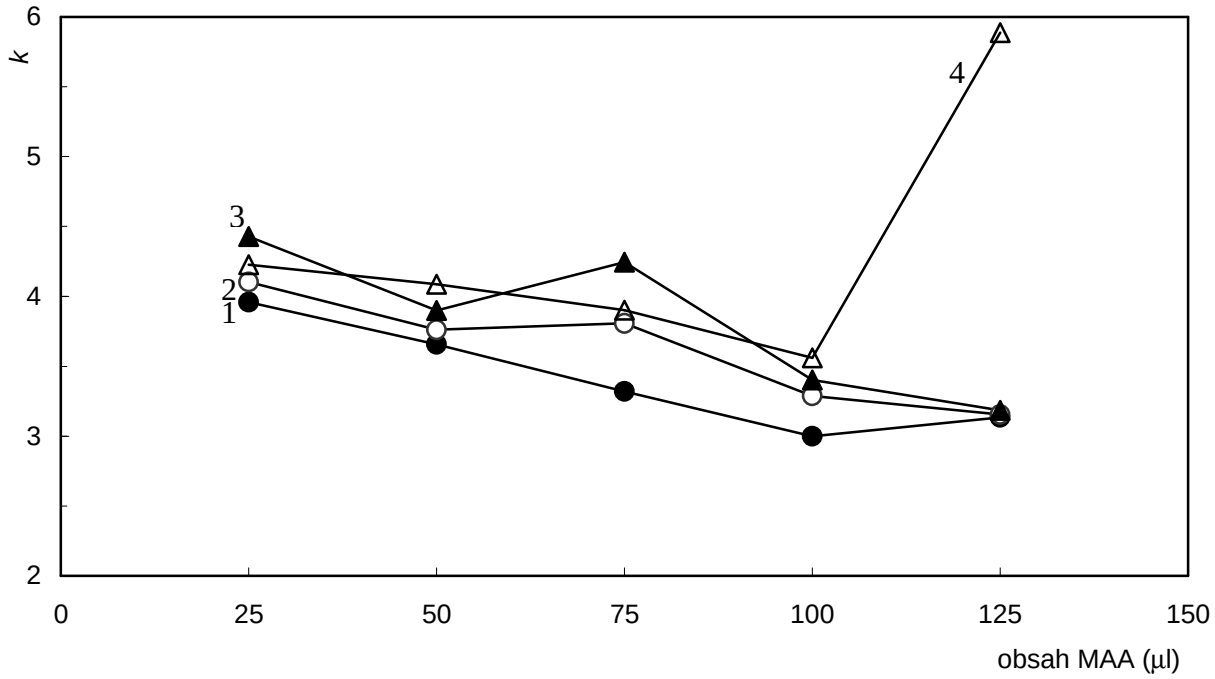


Obr. 16 *Závislost retenčního faktoru (k) isopropylaminu na obsahu kyseliny methakrylové pro kolony MAA-A až MAA-E (25 µl až 125 µl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 µm i.d.) pro mobilní fáze vodu (1) a CH_3COOH o pH 4,6 (2), 4,3 (3), 3,5 (4) při průtoku 4 µl/min.*

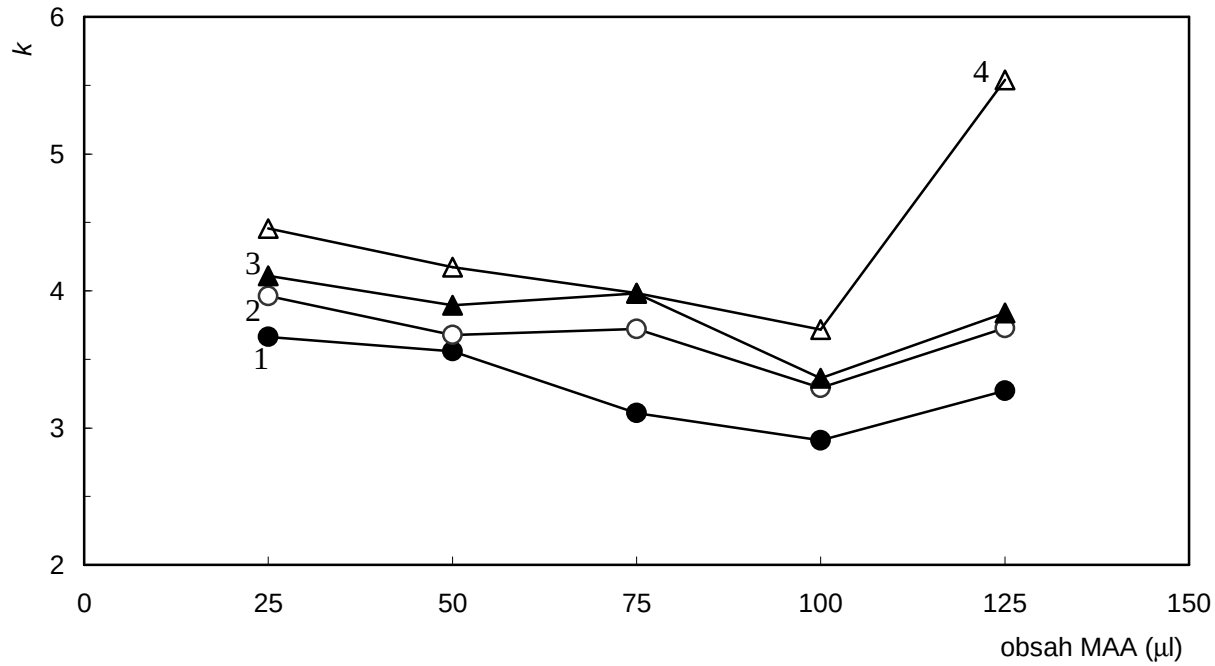
Z grafu na obrázku 16 vyplývají závislosti retenčního faktoru isopropylaminu na pH pro jednotlivé kolony. Při použití vody retenční faktor isopropylaminu klesal s rostoucím obsahem kyseliny methakrylové. Kolona MAA-A obsahovala nejmenší množství kyseliny methakrylové a důsledkem toho měla i nejmenší póry a největší specifický povrch, se kterým mohl isopropylamin interagovat. S rostoucím obsahem kyseliny methakrylové se póry monolitů zvětšovaly, klesal jejich specifický povrch a tedy i retenční faktor. Pokles retenčního faktoru mezi kolonami MAA-B a MAA-C, které měly podle hodnot zpětného tlaku podobnou porozitu, byl způsoben vyšším množstvím kyseliny methakrylové na povrchu kolony MAA-C. Záporně nabitá kyselina methakrylová odpuzovala ve vodě nenabitý isopropylamin a ten tak se stacionární fází interagoval méně než na koloně s nižším obsahem kyseliny methakrylové. Retenční faktor opět mírně vzrostl na koloně MAA-E, která měla malé póry i přes vysoký obsah kyseliny methakrylové v polymerizační směsi. Zvýšení retence isopropylaminu na této koloně je tedy v souladu se závěrem, že snížení velikosti pórů a zvýšení zpětného tlaku u tohoto monolitu bylo pravděpodobně způsobeno zapolymerováním kyseliny methakrylové do vnitřní struktury monolitu. Malé množství kyseliny methakrylové na povrchu tohoto monolitu způsobilo menší odpuzování nenabitého isopropylaminu a ten tak mohl více interagovat nepolárními interakcemi se stacionární fází.

Retence na této koloně byla však stále nižší než na koloně MAA-A, která měla srovnatelný zpětný tlak. Kolona MAA-E měla tedy menší specifický povrch než kolona MAA-A. Snížení specifického povrchu bylo způsobeno pravděpodobně menším počtem pórů o menší velikosti v koloně MAA-E než v koloně MAA-A. Z tohoto důvodu měly obě kolony podobný tlak, ale rozdílnou hodnotu specifického povrchu, což se projevilo nižší retencí na koloně MAA-E. Při použití mobilní fáze o pH 4,6 byla retence isopropylaminu vyšší než při použití vody, jelikož v kyselejším pH byl již isopropylamin částečně protonizován. Kladně nabitý isopropylamin nebyl již kyselinou methakrylovou odpuzován, ale naopak přitahován, což způsobilo nárůst retence na všech kolonách. S rostoucím obsahem kyseliny methakrylové retence isopropylaminu v této mobilní fázi rovněž klesala z důvodu snižujícího se specifického povrchu. Tento trend byl porušen pouze na koloně MAA-C, na které se retence oproti koloně předchozí zvýšila. Nárůst retence isopropylaminu na této koloně potvrzuje, že kolona MAA-C obsahovala na svém povrchu větší množství kyseliny methakrylové než kolona MAA-B. Křivka pro použití kyseliny octové o pH 4,3 má obdobný průběh jako závislost pro předchozí mobilní fázi o pH 4,6 a lze ji tedy obdobně interpretovat. Při pH 4,3 byl však isopropylamin ještě více protonizován, což způsobilo další nárůst retence na všech kolonách. Zvýšená retence na všech kolonách rovněž potvrzuje, že v tomto pH byla kyselina methakrylová stále dostatečně disociována pro elektrostatické interakce s analytem.

V mobilní fázi o pH 3,5 byly elektrostatické interakce zablokovány z důvodu nízké disociace kyseliny methakrylové. Zablokování těchto interakcí způsobilo pokles retence isopropylaminu na kolonách MAA-A a MAA-C oproti předchozímu pH. Při použití této mobilní fáze retence isopropylaminu s narůstajícím obsahem kyseliny methakrylové jen nepatrně klesala s výjimkou poslední kolony MAA-E, na které došlo k prudkému nárůstu. Pouze mírný pokles retence mezi kolonami MAA-A až MAA-D byl způsoben tím, že isopropylamin při tomto pH interagoval se stacionární fází nepolárními interakcemi a s rostoucím obsahem kyseliny methakrylové klesal specifický povrch monolitů potřebný pro tyto interakce. Nárůst retenčního faktoru na koloně MAA-E byl způsoben předávkováním objemu této kolony, kdy byl naměřen pík s plochým vrškem. Na všechny kolony byl dávkován objem vzorku 100 nl. Předávkování kolony MAA-E potvrzuje, že tento monolit měl oproti ostatním velmi malý specifický povrch, jelikož nedošlo k zakoncentrování zóny analytu na koloně. Na obrázcích 17 a 18 jsou znázorněny závislosti retenčních faktorů propylaminu (Obr. 17) a tyraminu (Obr. 18), při různých hodnotách pH mobilní fáze, na obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi.



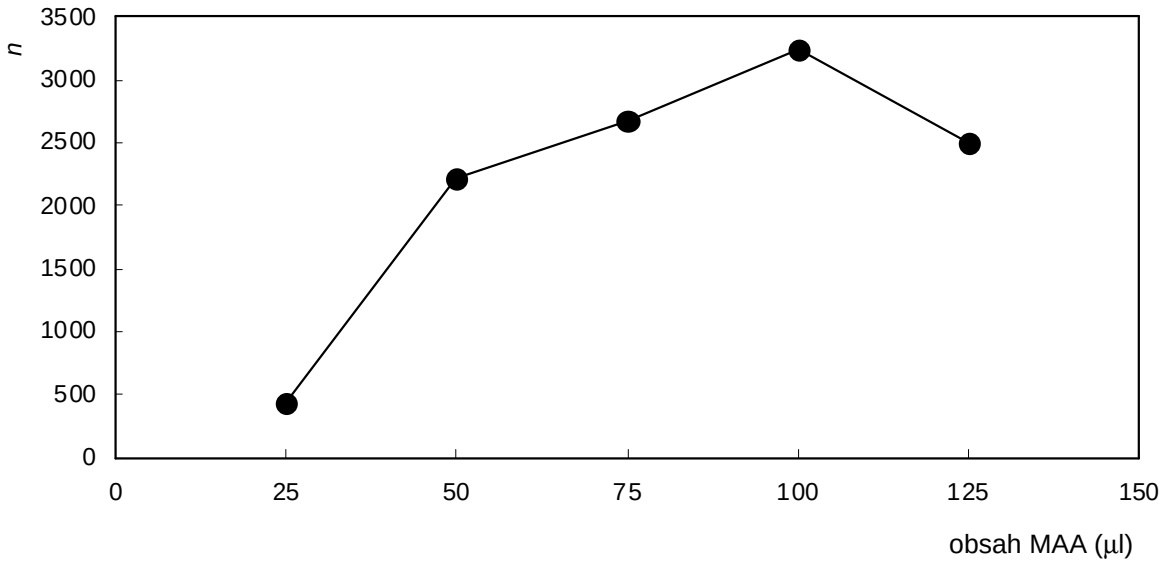
Obr. 17 *Závislost retenčního faktoru (k) propylaminu na obsahu kyseliny methakrylové pro kolony MAA-A až MAA-E (25 µl až 125 µl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 µm i.d.) pro mobilní fáze vodu (1) a CH_3COOH o pH 4,6 (2), 4,3 (3), 3,5 (4) při průtoku 4 µl/min.*



Obr. 18 *Závislost retenčního faktoru (k) tyraminu na obsahu kyseliny methakrylové pro kolony MAA-A až MAA-E (25 µl až 125 µl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 µm i.d.) pro mobilní fáze vodu (1) a CH_3COOH o pH 4,6 (2), 4,3 (3), 3,5 (4) při průtoku 4 µl/min.*

Závislosti pro propylamin (Obr. 17) mají obdobný charakter jako závislosti pro isopropylamin (Obr. 16), jelikož se tyto analyty liší pouze v poloze aminoskupiny, a lze je tedy i obdobně interpretovat. Propylamin interagoval se stacionární fází silnějšími nepolárními interakcemi než isopropylamin, což se projevilo strmějším poklesem křivky pro mobilní fázi o pH 3,5 mezi kolonami MAA-A až MAA-D a větším nárůstem retence na koloně MAA-E při použití vody jako mobilní fáze. Závislosti pro tyramin mají rovněž obdobný charakter jako závislosti pro isopropylamin a lze je tedy i obdobně interpretovat. Tyramin obsahuje benzenové jádro, a proto s monolity interagoval silnějšími nepolárními interakcemi než isopropylamin, Tyto interakce se projevily strmějším poklesem hodnot retenčního faktoru při pH 3,5 mezi kolonami MAA-A až MAA-D než u isopropylaminu a nárůstem retence na koloně MAA-E ve všech mobilních fázích. Mrtvý retenční čas monolitických kolon se pohyboval v rozmezí od 0,68 do 0,83 minuty. Takto nízké hodnoty potvrzují v souladu s teorií vysokou průchodnost monolitických kolon pro mobilní fázi.

V kapitole 3.1 byla popsána analýza směsi S8, při které se jednotlivé analyty oddělily na základě mechanizmu reverzní chromatografie. Interakce nepolárních analytů bez bazických skupin se styren-divinylbenzenovou strukturou monolitu závisí na porozitě a specifickém povrchu monolitu a tyto parametry ovlivňuje i obsah kyseliny methakrylové v polymerizační směsi, jak vyplývá z obrázku 15. Na obrázku 19 je znázorněn graf závislosti separační účinnosti benzenu na obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi.



Obr. 19 *Závislost počtu teoretických pater (n) benzenu (10 µl/ml) na obsahu kyseliny methakrylové pro kolony MAA-A až MAA-E (25 µl až 125 µl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 µm i.d.), 65% ACN jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 µl/min, detekční vlnová délka λ = 214 nm.*

Z grafu na obrázku 19 je patrné, že pro velmi nepolární benzen byla nejvyšší separační účinnost dosažena na koloně MAA-D s obsahem 100 µl kyseliny methakrylové. Tato kolona měla nízký zpětný tlak a tedy i větší póry a nižší specifický povrch v porovnání s předchozími kolonami. Menší specifický povrch pro benzen znamenal jeho nižší interakce se stacionární fází a tedy i menší rozmytí jeho zóny na koloně. Struktura monolitů MAA-B a MAA-C byla prakticky totožná, přesto došlo k navýšení separační účinnosti benzenu s přídavkem kyseliny methakrylové z 50 µl na 75 µl. Tento nárůst vyplývá z vyššího obsahu kyseliny methakrylové na povrchu kolony MAA-C, který však neměl vliv na zpětný tlak kolony a tedy na strukturu monolitu. Větší množství nabité kyseliny methakrylové se projevilo ve výraznějším odpuzování benzenu od povrchu monolitu. Benzen tedy na koloně MAA-C interagoval se stacionární fází méně než na koloně MAA-B, což se projevilo nižším retenčním faktorem, menším rozmytím zóny analytu a zvýšením separační účinnosti. Tyto závěry potvrzují data uvedená v tabulce 3, ze kterých je patrný pokles retenčního faktoru benzenu a pokles šířky v polovině výšky jeho píku s rostoucím obsahem kyseliny methakrylové.

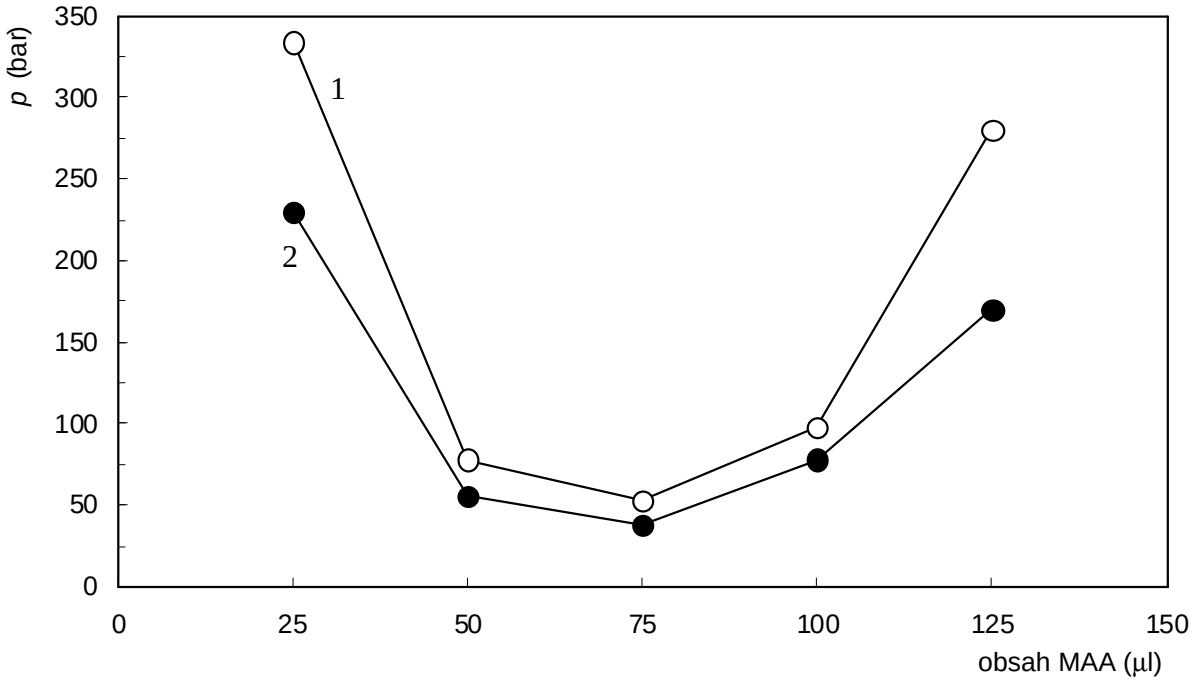
Tab. 3 *Hodnoty mrtvého retenčního času (t_M), retenčního času benzenu (t_R), retenčního faktoru benzenu (k) a šířky v polovině výšky píku benzenu ($w_{1/2}$). Měřeno na kolonách MAA-A až MAA-E (25 μl až 125 μl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 μm i.d.), 65% ACN jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 μl/min, detekční vlnová délka λ = 214 nm.*

Označení kolony	MAA (μl)	t_M (min)	t_R (min)	k	$w_{1/2}$ (min)
MAA-A	25	0,53	4,12	6,83	0,47
MAA-B	50	0,55	3,73	5,79	0,20
MAA-C	75	0,56	3,51	5,32	0,17
MAA-D	100	0,68	3,51	4,16	0,16
MAA-E	125	0,57	3,45	5,05	0,19

Na koloně MAA-E došlo k opětovnému zvýšení retenčního faktoru benzenu, zvýšení šířky v polovině výšky jeho píku (viz Tab. 3) a poklesu separační účinnosti (viz Obr. 19). Tato kolona má na svém povrchu menší množství kyseliny methakrylové než předchozí kolony. Benzen byl tedy méně odpuzován záporným nábojem a více interagoval se stacionární fází, přestože měl tento monolit menší specifický povrch než ostatní monolity, jak prokázaly předchozí experimenty. Na kolonách MAA-C a MAA-D bylo tedy dosaženo vyšší separační účinnosti pro benzen než na koloně MAA-B s dobou polymerizace kolon 19 hodin. V literatuře byla dosud použita pouze kolona MAA-B s dobou polymerizace šest hodin, která měla separační účinnost 4500 teoretických pater [76]. Příprava kolon MAA-C a MAA-D s dobou polymerizace šest hodin by tedy mohla přinést další zvýšení separační účinnosti tohoto druhu monolitů pro analýzu nepolárních organických molekul.

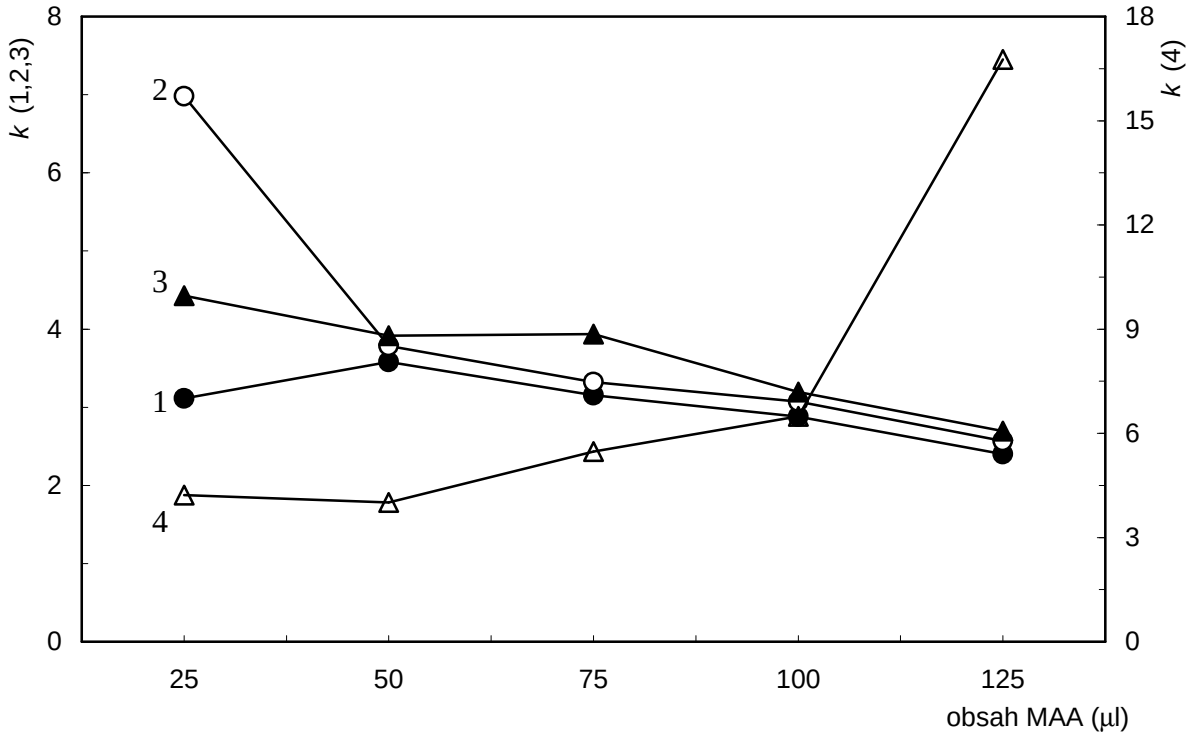
3.4 Testování kolon skupiny II

V této části práce byly testovány kolony připravené z polymerizačních směsí, které obsahovaly takové množství kyseliny methakrylové a styrenu, aby jejich objemový poměr s množstvím divinylbenzenu byl 1:1. Kyselina methakrylová byla zastoupena v rozmezí od 25 µl do 125 µl. Směsi MAA-F (25 µl MAA) až MAA-H (100 µl MAA) obsahovaly 100 µl divinylbenzenu a směs MAA-I (125 µl MAA) obsahovala 125 µl divinylbenzenu. Souhrnné zastoupení složek v polymerizačních směsích je uvedeno v Tab. 1b (viz str. 30). Kolony byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 2.4 s dobou polymerizace 19 hodin. Monolitické kolony po polymerizaci nevykazovaly viditelné defekty a při promývání methanolem při průtoku 4 µl/min nebyly vytlačeny z kapiláry. Proměnný obsah kyseliny methakrylové a styrenu tedy neměl vliv na homogenitu polymerizovaného monolitu ani na jeho kovalentní navázání k vnitřní stěně kapiláry. Na obrázku 20 jsou znázorněny závislosti zpětného tlaku na obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi pro 65% acetonitril a vodu jako mobilní fázi při průtoku 4 µl/min. Tato závislost odráží rozdíly ve vnitřních strukturách jednotlivých monolitických kolon.



Obr. 20 *Závislost zpětného tlaku (p) na obsahu kyseliny methakrylové pro kolony MAA-F až MAA-I (25 µl až 125 µl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 µm i.d.) pro 65% ACN (1) a vodu (2) jako mobilní fázi při průtoku 4 µl/min.*

Z grafu na obrázku 20 je patrný trend poklesu zpětného tlaku na rostoucím obsahu kyseliny methakrylové v polymerizačních směsích, které zároveň obsahovaly styren. Nárůst množství kyseliny methakrylové a zároveň snižování obsahu styrenu způsobilo zvětšování pórů těchto monolitů, což se projevilo snižováním zpětného tlaku. Monolity MAA-H a MAA-I byly kopolymery pouze kyseliny methakrylové a divinylbenzenu. Zpětný tlak těchto kolon se oproti dosavadnímu trendu opět zvýšil. Tyto kolony měly tedy menší póry pravděpodobně důsledkem zapolymerování kyseliny methakrylové spíše do vnitřní struktury monolitů než na jejich povrch, či přednostní tvorby pouze divinylbenzenového polymeru. Tlak při použití 65% acetonitrilu byl na všech kolonách vyšší než tlak při použití vody jako mobilní fáze. Toto navýšení bylo způsobeno stejně jako u kolon z první skupiny botnáním monolitů v mobilních fázích obsahujících organické rozpouštědlo. Na obrázku 21 je znázorněna závislost retenčního faktoru isopropylaminu, při různých hodnotách pH mobilní fáze, na obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi.

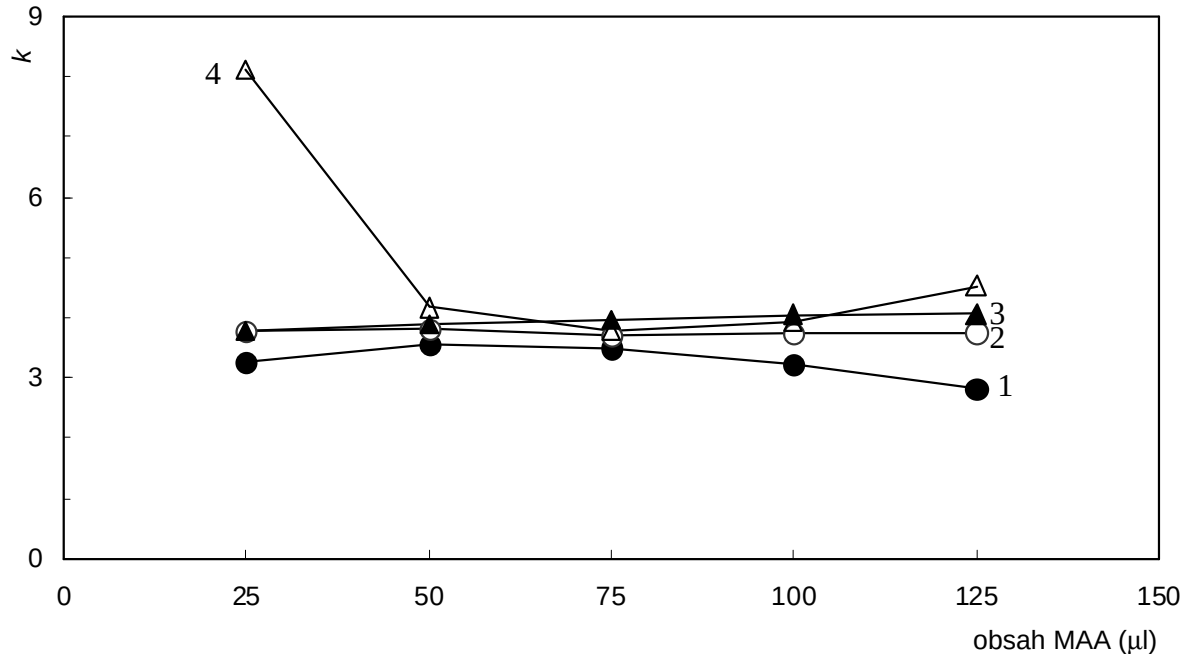


Obr. 21 *Závislost retenčního faktoru (k) isopropylaminu na obsahu kyseliny methakrylové pro kolony MAA-F až MAA-I (25 µl až 125 µl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 µm i.d.) pro mobilní fáze vodu (1) a CH_3COOH o pH 4,6 (2), 4,3 (3), 3,5 (4) při průtoku 4 µl/min.*

Z grafu na obrázku 21 vyplývají závislosti retenčního faktoru isopropylaminu na pH na jednotlivých kolonách. Při použití vody retenční faktor isopropylaminu klesal s rostoucím obsahem kyseliny methakrylové, jelikož se póry monolitů zvětšovaly a klesal jejich specifický povrch. Výjimkou byla první kolona MAA-F, na které byla retence isopropylaminu nízká, přestože měla tato kolona malé póry a pravděpodobně i vysoký specifický povrch. Nižší retence na této koloně byla způsobena záporně nabitou kyselinou methakrylovou, která odpuzovala nenabitý isopropylamin. Ačkoli kolona MAA-F byla připravena z polymerizační směsi obsahující nejméně kyseliny methakrylové a nejvíce styrenu, měla pravděpodobně díky své porozitě na povrchu dostupné v součtu vysoké množství kyseliny methakrylové. Kolony MAA-H a MAA-I měly sice menší póry než kolony MAA-B (50 µl MAA) a MAA-G (75 µl MAA), ovšem další pokles retence na těchto kolonách naznačuje, že měly i nižší četnost těchto pórů a celkově i nižší specifický povrch. Na svém povrchu tyto dvě kolony pravděpodobně obsahovaly určité množství kyseliny methakrylové, jinak by nedocházelo k odpuzování nenabitého isopropylaminu a retence by i přes nízký specifický povrch vzrostla podobně jako u kolony MAA-I (viz Obr. 16, str. 43).

Při použití mobilních fází o pH 4,6 a 4,3 bylo nejvyšší retence dosaženo na první koloně MAA-F, což potvrzuje předchozí závěr o celkově vysokém množství kyseliny methakrylové dostupném na povrchu tohoto monolitu. Při pH 4,6 byla na této koloně vyšší retence než při pH 4,3, z čehož vyplývá, že důležitějším faktorem pro retenci na této koloně byla disociace kyseliny methakrylové než protonizace isopropylaminu. Na koloně MAA-G byla situace opačná a důležitějším faktorem bylo množství protonizovaného analytu, pravděpodobně z důvodu nižšího množství kyseliny methakrylové, které bylo pro isopropylamin celkově dostupné. Tento monolit měl výrazně větší póry a pravděpodobně i výrazně nižší specifický povrch než monolit MAA-F. Snížení retence na kolonách MAA-H a MAA-I potvrzují, že tyto monolity měly nižší specifický povrch oproti předchozím kolonám. Zároveň bylo potvrzeno, že tyto kolony na svém povrchu obsahují určité množství kyseliny methakrylové, jelikož došlo k zakoncertování zón isopropylaminu na těchto kolonách a k vyšší retenci než při použití vody jako mobilní fáze.

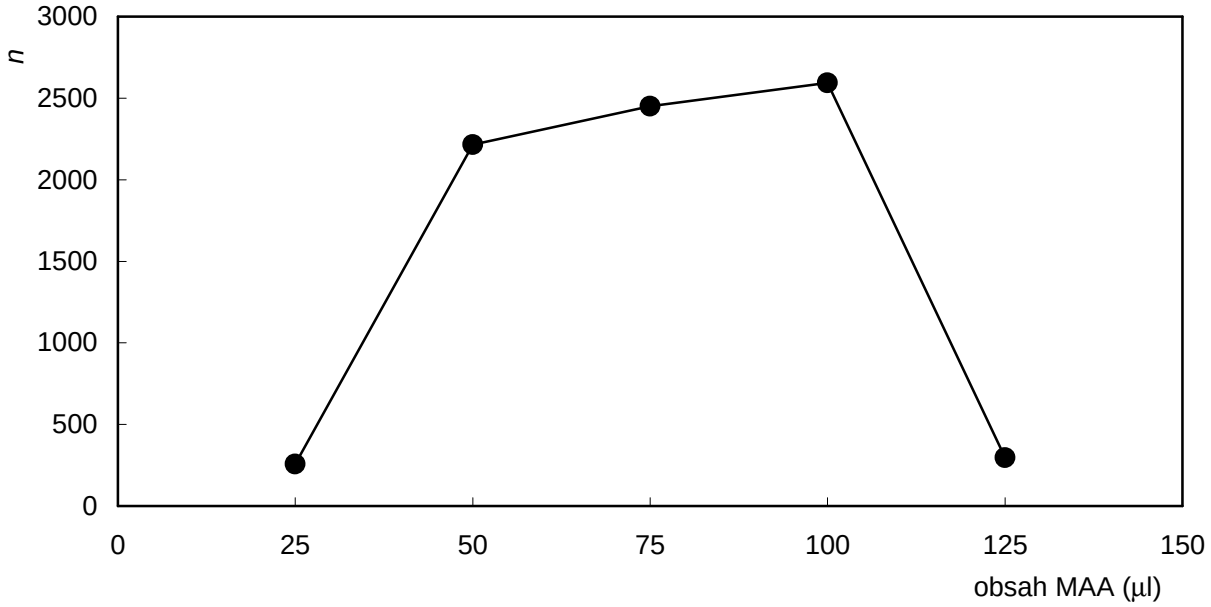
Při použití mobilní fáze o pH 3,5 byly elektrostatické interakce prakticky zablokovány z důvodu nízké disociace kyseliny methakrylové. Isopropylamin tedy interagoval se stacionární fází pouze nepolárními interakcemi, což se projevilo mírně vyšší retencí na koloně MAA-F než na koloně MAA-B. Postupný nárůst retence na kolonách MAA-G až MAA-I byl způsoben předávkováním těchto kolon, kdy byly naměřeny píky s plochým vrškem. Na všechny kolony bylo dávkováno stejné množství 100 nl 10% isopropylaminu a jejich postupné předávkování potvrzuje snižující se specifický povrch těchto monolitů. Závislosti pro propylamin jsou, stejně jako u kolon první skupiny, obdobné závislostem isopropylaminu. Lze je tedy interpretovat obdobně, a proto zde již nejsou znázorněny. Rozdíl mezi závislostmi pro oba analyty se projevil pouze v mírně vyšší strmosti všech částí jednotlivých křivek pro propylamin, jelikož propylamin poskytoval silnější nepolární i elektrostatické interakce než isopropylamin. Na obrázku 22 je znázorněna závislost retenčního faktoru tyraminu, při různých hodnotách pH mobilní fáze, na obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi.



Obr. 22 *Závislost retenčního faktoru (k) tyraminu na obsahu kyseliny methakrylové pro kolony MAA-F až MAA-I (25 µl až 125 µl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 µm i.d.) pro mobilní fáze vodu (1) a CH_3COOH o pH 4,6 (2), 4,3 (3), 3,5 (4) při průtoku 4 µl/min.*

Tyramin obsahuje ve své molekule benzenové jádro a jeho retenční chování tak bylo více ovlivněno nepolárními interakcemi se stacionární fází. Křivku pro vodu jako mobilní fázi lze interpretovat obdobně jako u isopropylaminu, hodnoty pro tyramin jsou pouze na všech kolonách vyšší právě z důvodu silnějších nepolárních interakcí. Při použití mobilních fází o pH 4,6 a 4,3 se retence na všech kolonách zvýšila oproti retenci při použití vody. V případě tyraminu bylo toto navýšení pravděpodobně způsobeno jednak jeho protonizací a elektrostatickými interakcemi a zároveň snížením odpuzování nepolární části molekuly vlivem snížení disociace kyseliny methakrylové. Tato kombinace elektrostatických a nepolárních interakcí se projevila mírně se zvyšující retencí tyraminu, i přes snižující se specifický povrch monolitů. Při použití mobilní fáze o pH 3,5 byly elektrostatické interakce zablokovány a retence tyraminu klesala se snižujícím se specifickým povrchem monolitu. Vzorek tyraminu o koncentraci 0,5 mg/ml byl dávkován v objemu 100 nl a mírné předávkování kolony se projevilo až u monolitu MAA-H narozdíl od isopropylaminu, ten však byl dávkován ve vyšší koncentraci. Předávkování kolon MAA-H a MAA-I potvrzuje menší specifický povrch těchto monolitů oproti ostatním kolonám.

V kapitole 3.1 byla popsána analýza směsi S8, při které se jednotlivé analyty oddělily na základě mechanizmu reverzní chromatografie. Interakce nepolárních analytů bez bazických skupin se styren-divinylbenzenovou strukturou monolitu závisí na porozitě a specifickém povrchu monolitu a tyto parametry ovlivňuje i obsah kyseliny methakrylové v polymerizační směsi, jak vyplývá z obrázku 15 (viz str. 41). Na obrázku 23 je znázorněn graf závislosti separační účinnosti benzenu na obsahu kyseliny methakrylové v polymerizační směsi pro kolony z druhé skupiny.



Obr. 23 *Závislost počtu teoretických pater (n) benzenu (10 µl/ml) na obsahu kyseliny methakrylové pro kolony MAA-F až MAA-I (25 µl až 125 µl MAA, 19 h, l = 15 cm, 320 µm i.d.), 65% ACN jako mobilní fáze, průtok mobilní fáze 4 µl/min, detekční vlnová délka λ = 214 nm.*

Z grafu na obrázku 23 je patrné, že nejvyšší účinnosti pro nepolární benzen bylo dosaženo na koloně MAA-G. Separační účinnost benzenu se zvyšovala se snižujícím se specifickým povrchem monolitu, se kterým mohl benzen interagovat. Menší interakce benzenu se stacionární fází znamenaly menší rozmytí jeho zóny na koloně a tak zvýšení účinnosti. Prudký pokles separační účinnosti na koloně MAA-I byl způsoben předávkováním této kolony, což opět potvrzuje závěry, že tento monolit měl výrazně menší specifický povrch než předchozí monolity.

4. Závěr

Cíle diplomové práce byly splněny. Byly připraveny monolitické kapilární kolony na bázi styrenu, kyseliny methakrylové a divinylbenzenu. Veškeré připravené monolity byly bez viditelných defektů a byly kovalentně navázány na vnitřní stěnu křemenné kapiláry. Analýzou směsi S8 bylo potvrzeno, že připravované monolity byly vhodné pro analýzu malých organických molekul. Elektrostatické interakce mezi analyty a kyselinou methakrylovou byly prokázány analýzou směsi aminokyselin s thiomočovinou a měřením vzorků isopropylaminu, propylaminu, tyraminu a diethylaminu. Z chromatografických měření byly vyvozeny závěry o struktuře jednotlivých monolitických kolon.

U kolon ze skupiny I, které byly připraveny z polymerizačních směsí obsahujících vždy 50 μl styrenu, 100 μl divinylbenzenu a proměnné množství kyseliny methakrylové od 25 μl do 125 μl, byly nejdůležitějšími tyto závěry: S rostoucím obsahem kyseliny methakrylové v polymerizačních směsích docházelo ke zvětšování pórů monolitů. Přídavek kyseliny methakrylové mezi kolonami MAA-B a MAA-C se projevil větším množstvím kyseliny methakrylové na povrchu monolitu MAA-C, při pravděpodobně obdobných morfologických vlastnostech obou kolon. Bylo dosaženo výrazně vyšší separační účinnosti při analýze benzenu na koloně MAA-D oproti koloně MAA-B, která byla dosud jako jediná publikována v literatuře, ovšem s rozdílnou dobou polymerizace. U kolony MAA-E zapolymerovala větší část kyseliny methakrylové do vnitřní struktury monolitu, což se projevilo vyšším tlakem a nižším specifickým povrchem této kolony oproti kolonám předchozím.

U kolon ze skupiny II, které byly připraveny z polymerizačních směsí obsahujících takové množství kyseliny methakrylové a styrenu, aby jejich objemový poměr s množstvím divinylbenzenu byl 1:1, byly nejdůležitějšími tyto závěry: S rostoucím obsahem kyseliny methakrylové v polymerizačních směsích docházelo ke zvětšování pórů monolitů. Na povrchu kolony MAA-F, která obsahovala nejmenší množství kyseliny methakrylové v polymerizační směsi, bylo dostupné pro analyt významné množství kyseliny methakrylové a to pravděpodobně vlivem vysokého specifického povrchu tohoto monolitu. U kolon MAA-H a MAA-I zapolymerovala větší část kyseliny methakrylové do vnitřní struktury monolitu, což se projevilo vyšším tlakem a nižším specifickým povrchem těchto kolon oproti kolonám předchozím. Vysoký tlak způsobený malými póry a nízký specifický povrch způsobený malým počtem těchto pórů se projevil nejvíce u kolony MAA-I.

Proměření porozity připravených monolitů pomocí rtuťového porozimetru a specifického povrchu měřením BET izoterem pomocí adsorbce dusíku bude předmětem dalšího výzkumu. Získaná morfologická data budou konfrontována s výše uvedenými závěry získanými na základě měření pomocí HPLC.

Literární zdroje

[1] Novotny, M.: Contemporary Capillary Gas Chromatography. *Analytical Chemistry* **50**, 16A-32A (1978).

[2] Horvath, C. G., Preiss, B. A., Lipsky, S. R.: Fast Liquid Chromatography: An Investigation of Operating Parameters and the Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers. *Analytical Chemistry* **39**, 1422-1428 (1967).

[3] Horvath, C., Lipsky, S. R.: Rapid Analysis of Ribonucleosides and Bases at the Picomole Level Using Pellicular Cation Exchange Resin in Narrow Bore Columns. *Analytical Chemistry* **41**, 1227-1234 (1969).

[4] Ishii, D., Asai, K., Hibi, K., Jonokuchi, T., Nagaya, M.: A Study of Micro-High--Performance Liquid Chromtography I. Development of Technique for Miniaturization of High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography* **144**, 157-168 (1977).

[5] Ishii, D., Hibi, K., Asai, K., Jonokuchi, T.: Studies of Micro-High-Performance Liquid Chromatography II. Application to Gel Permeation Chromatography of Techniques Developed for Micro High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatogrpahy* **151**, 147-154 (1978).

[6] Ishii, D., Hibi, K., Asai, K., Nagaya M.: Studies of Micro-High-Performance Liquid Chromatography III. Development of a „Micro-Pre-Column Method“ for Pretreatment of Samples. *Journal of Chromatography* **152**, 341-348 (1977).

[7] Ishii, D., Hibi, K., Asai, K., Nagaya M.: Studies of Micro-High-Performance Liquid Chromatography IV. Application of the Micro Pre-Column Method to the Analysis of Corticosteroids in Serum. *Journal of Chromatography* **156**, 173-180 (1978).

[8] Ishii, D., Hirose, A., Hibi, K., Iwasaki, Y.: Studies on Micro-High-Performance Liquid Chromatography V. Design of a Microscale Liquid Chromatograph and Its Application to Cation-Exchange Separation of Alkali Metals. *Journal of Chromatography* **157**, 43-50 (1978).

[9] Tsuda, T., Novotny, M.: Packed Capillary Columns in High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **50**, 271-275 (1978).

[10] Tsuda, T., Novotny, M.: Band-Broadening Phenoma in Microcapillary Tubes under the Conditions of Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **50**, 632--634 (1978).

[11] Tsuda, T., Hibi, K., Nakanishi, T., Takeuchi, T., Ishii, D.: Studies of Open Tubular Micro-Capillary Liquid Chromatography II. Chemically Bonded Octadecylsilane Stationary Phase. *Journal of Chromatography* **158**, 227-232 (1978).

[12] Takeuchi, T., Ishii, D.: High-performance Micro Packed Flexible Columns in Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **213**, 25-32 (1981).

[13] Scott, R. P. W., Kucera, P.: Mode of operation and performance characteristics of microbore columns for use in liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **169**, 51-72 (1979).

[14] Krejčí, M.: *Mikrokolonová a kapilární kapalinová chromatografie.* Praha, SNTL 1990, ISBN 80-03-00492-6.

[15] Sandra, K., Moshir, M., D´hondt, F., Verleysen, K., Kas, K., Sandra, P.: Highly efficient peptide separations in proteomics Part 1. Unidimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **866**, 48-63 (2008).

[16] Franc, M., Křížek, T., Coufal, P., Štulík, K.: Differentiation among various kinds of cheese by identification of casein using HPLC-chip/MS/MS. *Journal of Separation Science* **33**, 2515-2519 (2010).

[17] Iberer, G., Hahn, R., Jungbauer, A.: Monoliths as stationary phases for separating biopolymers - Fourth-generation chromatography sorbents. *LC GC North America* **17**, 998-1002 (1999).

[18] Svec, F.: My favorite materials: Porous polymer monoliths. *Journal of Separation Science* **32**, 3-9 (2009).

[19] *Visitor-Guide: Welcome to Aboriginal land Uluru-Kata Tjuta National Park*. Australian Government Director of National Parks 2009, ISBN 06-42-53787-4.

[20] http://slovnik-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/monoliticky. 30.12.2010, 21:17.

[21] Kubin, M., Spacek, P., Chromecek, R.: Gel Permeation Chromatography on Porous Poly(ethylene glycol methacrylate). *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* **32**, 3881-3887 (1967).

[22] Švec, F., Tennikova, T. B.: *Historical Review*. In: *Monolithic Materials Preparation, Properties and Applications*. Švec, F., Tennikova, T. B., Deyl, Z. (edits.). Amsterdam, Journal of Chromatography Library 67, Elsevier 2003, ISBN 0-444-50879-1. p. 1-15.

[23] Hjerten, S., Liao, J. L., Zhang, R.: High-performance Liquid-Chromatography on Continuous Polymer Beds. *Journal of Chromatography* **273**, 273-275 (1989).

[24] Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Irgum, K.: Monolithic, "Molded", Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid--Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization. *Chemistry of Materials* **8**, 744-750 (1996).

[25] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N.: Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **68**, 3498-3501 (1996).

[26] Lubda, D., Cabrera, K., Nakanishi, K., Lindner, W.: Monolithic Silica Columns with Chemically Bonded β-cyclodextrin as a Stationary Phase for Enantiomer Separations of Chiral Pharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **372**, 892-901 (2003).

[27] Glenn, K. M., Lucy, C. A., Haddad, P. R.: Ion Chromatography on a Latex--Coated Silica Monolith Column. *Journal of Chromatography A* **1155**, 8-14 (2007).

[28] Nogueira, R., Lubda, D., Leitner, A., Bicker, W., Maier, N. M., Lämmerhofer, M., Lindner, W.: Silica-based Monolithic Columns with Mixed-modereversed--phase/weak anion-exchange Selectivity Principle for High-performance Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science* **29**, 966-978 (2006).

[29] Svec, F., Peters, C. E., Sýkora, D., Fréchet, J. M. J.: Design of the Monolithic Polymers Used in Capillary Electrochromatography Columns. *Journal of Chrotaography A* **887**, 3-29 (2000).

[30] Lubbad, H. S., Buchmeiser, R. M.: Highly Cross-linked Polymeric Capillary Monoliths for the Separation of Low, Medium, and High Molecular Weight Analytes. *Journal of Separation Science* **32**, 2521-2529 (2009).

[31] Liazid, A., Barbero, F. G., Palma, M., Brigui, J., Barosso, G. C.: Rapid Determination of Simple Polyphenols in Grapes by LC Using Monolithic Column. *Chromatographia* **72**, 417-424 (2010).

[32] Gusev, I., Huang, X., Horváth, C.: Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **855**, 273-290 (1999).

[33] Svobodová, A.: Monolitické Kolony pro Kapilární Kapalinovou Chormatografii. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze (2007).

[34] Coufal, P., Čihák, M., Suchánková, J., Tesařová, E., Bosáková, Z., Štulík, K.: Methacrylate Monolithic Columns of 320 μm I.D. for Capillary Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography* A **946**, 99-106 (2002).

[35] Ericson, C., Liao, L. J., Nakazato, K., Hertén, S.: Preparation of Continuous Beds for Electrochromatography and Reversed-phase Liquid Chromatography of Low--molecular-mass Compounds. *Journal of Chromatography A* **767**, 33-41 (1997).

[36] Huang, X., Horváth, C.: Capillary Zone Electrophoresis With Fluid-impervious Polymer Tubing Inside a Fused-silica Capillary. *Journal of Chromatography A* **788**, 155-164 (1997).

[37] Nischang, I., Brüggemann, O.: On the Separation of Small Molecules by Means of Nano-liquid Chromatography with Methacrylate-based Macroporous Polymer Monoliths. *Journal of Chromatography A* **1217**, 5389-5397 (2010).

[38] Xie, S., Allington, W. R., Svec, F., Fréchet, J. M. J.: Rapid Reversed-phase Separation of Proteins and Peptides Using Optimized 'Moulded' Monolithic Poly(styrene–*co*-divinylbenzene) Columns. *Journal of Chromatography A* **865**, 169-174 (1999).

[39] Xiaoli, D., Ren´an, W., Jing, D., Minghuo, W., Yan, Z., Hanfa, Z.: Polyacrylamide-based Monolithic Capillary Column With Coating of Cellulose Tris(3,5-dimethylphenyl-carbamate) for Enantiomer Separation in Capillary Electrochromatography. *Electrophoresis* **29**, 919-927 (2008).

[40] Wang, Q. Ch., Švec, F., Fréchet, J. M. J.: Reversed-phase Chromatography of Small Molecules and Peptides on a Continuous Rod of Macroporous Poly(styrene-co-divinylbenzene). *Journal of Chromatography A* **669**, 230-235 (1994).

[41] Li, Y., Tolley, D. H., Lee, M. L.: Monoliths from Poly(ethylene glycol) Diacrylate and Dimethacrylate for Capillary Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins. *Journal of Chromatogrpahy A* **1217**, 4934-4945 (2010).

[42] Mirapeix, C. A., Martínez, H. M. J., Benavente, D., Fernadéz, M. C., Alfonso, S. F. E.: Peroxodisulfate as a Chemical Initiator for Methacrylate-ester Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography. *Electrophoresis* **29**, 910-918 (2008).

[43] Holdšvendová, P., Coufal, P., Suchánková, J., Tesařová, E., Bosáková, Z.: Methacrylate Monolithic Columns for Capillary Liquid Chromatography Polymerized Using Ammonium Peroxodisulfate as Initiator. *Journal of Separation Science* **26**, 1623-1628 (2003).

[44] Zafón, B. V., Cambra, B. M., Alfonso, S. F. E., Ramos, R. G., Manuel, J., Martínez, H.: Photo-polymerized Lauryl Methacrylate Monolithic Columns for CEC Using Lauroyl Peroxide as Initiator. *Electrophoresis* **30**, 3748-3756 (2009).

[45] Švec, F., Fréchet, J. M. J.: *Rigid Macroporous Organic Polymer Monoliths Prepared by Free Radical Polymerization*. In: *Monolithic Materials Preparation, Properties and Applications*. Švec, F., Tennikova, T. B., Deyl, Z. (edits.). Amsterdam, Journal of Chromatography Library 67, Elsevier 2003, ISBN 0-444--50879-1. p. 19-50.

[46] Oberacher, H., Huber, C. G.: Capillary Monoliths for the Analysis of Nucleic Acids by High-performance Liquid Chromatography–electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* **21**, 166–174 (2002).

[47] http://chromservis.cz/section/chromatography?lang=CZ, 21.2.2011, 15:04.

[48] Pittler, E., Schmid, G. M.: Enantioseparation of Dansyl Amino Acids by HPLC on a Monolithic Column Dynamically Coated with a Vancomycin Derivative. *Biomedical Chromatography* **24**, 1213-1219 (2010).

[49] Tetala, R. K. K., Beek, A. T.: Bioaffinity Chromatography on Monolithic Supports. *Journal of Separation Science* **33**, 422-438 (2010).

[50] Roper, K. D., Lightfood, N. E.: Separation of Biomolecules Using Adsorptive Membranes. *Journal of Chromatography A* **702**, 3-26 (1995).

[51] Meyers, J. J., Liapis, A. I.: Network Modeling of the Convective Flow and Diffusion of Molecules Adsorbing in Monoliths and in Porous Particles Packed in a Chromatographic Column. *Journal of Chromatography A* **852**, 3-23 (1999).

[52] Santora, B. P., Gagné, M. R.: Porogen and Cross-Linking Effects on the Surface Area, Pore Volume Distribution, and Morphology of Macroporous Polymers Obtained by Bulk Polymerization. *Macromolecules* **34**, 658-661 (2001).

[53] Svec, F., Fréchet, J. M. J.: Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers. *Macromolecules* **28**, 7580-7582 (1995).

[54] Svec, F., Fréchet, J. M. J.: Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of “Molded” Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis. *Chemistry of Materials* **7**, 707-715 (1995).

[55] Greiderer, A., Trojer, L., Huck, Ch. W., Bonn, B. K.: Influence of the Polymerisation Time on the Porous and Chromatographic Properties of Monolithic Poly(1,2-bis(p-vinylphenyl))ethane Capillary Columns. *Journal of Chromatography A* **1216**, 7747-7754 (2009).

[56] Gu, C., Lin, L., Chen, X., Jia, J., Ren, J., Fang, N.: Effects of Inner Diameter of Monolithic Column on Separation of Proteins in Capillary-liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1170**, 15-22 (2007).

[57] Geiser, L., Eeltink, S., Svec, F., Fréchet, J. M. J.: Stability and Repeatability of Capillary Columns Based on Porous Monoliths of Poly(butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate). *Journal of Chromatography A* **1140**, 140-146 (2007).

[58] Svec, F., Fréchet, J. M. J.: Modified Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) Continuous Rod Columns for Preparative-scale Ion-exchange Chromatography of Proteins. *Journal of Chromatography A* **702**, 89-95 (1995).

[59] Sýkora, D., Svec, F. Fréchet, J. M. J.: Separation of Oligonucleotides on Novel Monolithic Columns with Ion-exchange Functional Surfaces. *Journal of Chromatography A* **852**, 297-304 (1999).

[60] Wieder, W., Bisjak, C. P., Huck, C. W., Bakry, R., Bonn, G. K.: Monolithic Poly(glycidyl methacrylate-co-divinylbenzene) Capillary Columns Functionalized to Strong Anion Exchangers for Nucleotide and Oligonucleotide Separation. *Journal of Separation Science* **29**, 2478-2484 (2006).

[61] Ueki, Y., Umemura, T., Li, J., Odake, T., Tsunoda, K.: Preparation and Application of Methacrylate-Based Cation-Exchange Monolithic Columns for Capillary Ion Chromatography. *Analytical Chemistry* **76**, 7007-7012 (2004).

[62] Yang, G., Liu, H., Zhang, Y., Wang, S., Yin, J., Yin, B., Chen, Y.: On-line Simultaneous Removal of Human Serum Albumin and Enrichment of Doxazosin Using a Weak Cation-exchange Monolithic Column. *Journal of Chromatography A* **1129**, 231-235 (2006).

[63] Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J. M. J.: Fast Ion-Exchange HPLC of Proteins Using Porous Poly(glycidyl methacrylate-*co*-ethylene dimethacrylate) Monoliths Grafted with Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid). *Biotechnological Progress* **13**, 597-600 (1997).

[64] Gu, B., Chen, Z., Thulin, C. D., Milton, L. L.: Efficient Polymer Monolith for Strong Cation-Exchange Capillary Liquid Chromatography of Peptides. *Analytical Chemistry* **78**, 3509-3518 (2006).

[65] Chen, X., Tolley, D., Milton, L. L.: Polymeric Cation-exchange Monolithic Columns Containing Phosphoric Acid Functional Groups for Capillary Liquid Chromatography of Peptides and Proteins. *Journal of Chromatography A* **1217**, 3844-3854 (2010).

[66] Dong, J., Qu, J. J., Dong, X., Wu, R., Ye, M., Zou, H.: Preparation and Evaluation of Rigid Porous Polyacrylamide-based Strong Cation-exchange Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography. *Journal of Separaion Science* **30**, 2986-2992 (2007).

[67] Lin, J., Huang, G., Lin, X., Xie, Z.: Methacrylate-based Monolithic Column with Mixed-mode Hydrophilic Interaction/Strong Cation-exchange Stationary Phase for Capillary Liquid Chromatography and Pressure-assisted CEC. *Electrophoresis* **29**, 4055-4065 (2008).

[68] Gu, B., Lin, Y., Milton, L. L.: Polymer Monoliths with Low Hydrophobicity for Strong Cation-Exchange Capillary Liquid Chromatography of Peptides and Proteins. *Analytical Chemistry* **79**, 5848-5855 (2007).

[69] Huang, H. Y., Lin, H. Y., Lin, S. P.: CEC with Monolithic Poly(styrenedivinylbenzene-vinylsulfonic acid) as the Stationary Phase. *Electrophoresis* **27**, 4674-4681 (2006).

[70] Huang, H. Y., Liu, Y. CH., Cheng, Y. J.: Development of Capillary Electrochromatography with Poly(styrene-divinylbenzene-vinylbenzenesulfonic acid) Monolith as the Stationary Phase. *Journal of Chromatography A* **1190**, 263--270 (2008).

[71] Thabano, J. R. E., Breadmore, M. C., Hutchinson, J. P., Johns, C., Haddad, P. R.: Capillary Electrophoresis of Neurotransmitters Using In-line Solid-phase Extraction and Preconcentration Using a Methacrylate-based Weak Cation-exchange Monolithic Stationary Phase and a pH Step Gradient. *Journal of Chromatography A* **1175**, 117-126 (2007).

[72] Zhang, J., He, L., Fu, Q.: Chromatographic Features and Molecular Recognition Mechanism of a Strychnine Monolithic Molecularly Imprinted Polymer. *Chromatographia* **62**, 319-323 (2005).

[73] Yan, H., Row, K. H.: Preparation and Characterization of Monolithic Poly(methacrylic acid − ethylene − glycol dimethacrylate) Columns for High Performance Liquid Chromatography. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **27**, 71-76 (2006).

[74] Xiong, B., Zhang, L., Zhang, Y., Zou, H., Wang, J.: Capillary Electrochromatography with Monolithic Poly(styrene-*co*-divinylbenzene-*co*--methacrylic acid) as the Stationary Phase. *Journal of High Resolution Chromatography* **23**, 67-72 (2000).

[75] Jin, W., Fu, H., Huang, X., Xiao, H., Zou, H.: Optimized Preparation of Poly(styrene-co-divinylbenzene- co-methacrylic acid) Monolithic Capillary Column for Capillary Electrochromatography. *Electrophoresis* **24**, 3172-3180 (2003).

[76] Svobodová, A., Křížek, T., Širc, J., Šálek, P., Tesařová, E., Coufal, P., Štulík, K.: Monolithic Columns Based on a Poly(styrene-divinylbenzene-methacrylic acid) Copolymer for Capillary Liquid Chromatography of Small Organic Molecules. *Journal of Chromatography A* **1218**, 1544-1547 (2011).

[77] http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/, heslo: methacrylic acid, 17.5.2011, 18:00