

MONOLITICKÉ STACIONÁRNÍ FÁZE PRO HPLC.

MÍSTO NAROZENÍ: PRAHA

FRANTIŠEK ŠVEC

Department of Chemistry, University of California, Berkeley, CA 94720-1460, USA
svec@uclink4.berkeley.edu

Došlo 25.3.03, přijato 20.5.2003.

Klíčová slova: HPLC, kolony, monolitické stacionární fáze, historie, porézní materiály, polymery, silika

Obsah

1. Prolog
2. Charakteristika monolitických materiálů
3. Makroporézní polymerní disky
4. Makroporézní polymerní kolony
5. Tubulární kolony s radiálním tokem
6. Komprimované gely
7. Monolitické kolony z anorganických materiálů
8. Reprodukovatelnost monolitických kolon
9. Epilog

1. Prolog

Když se na počátku šedesátých let minulého století tehdejší Ústav makromolekulární chemie ČSAV přestěhoval na Petřiny, zahájil širokou ofenzivu na poli výzkumu polymerů připravovaných z 2-hydroxyethyl-methakrylátu, tedy z monomeru, který byl nedávno předtím vyvinut profesorem Wichterlem. Jedním z nejznámějších produktů tohoto výzkumu jsou kontaktní čočky, o nichž již bylo napsáno mnoho. Málokdo ovšem ví, že zhruba ve stejnou dobu se v laboratoři M. Kubína zrodila i první monolitická separační média¹. Pracovníci této laboratoře hledali alternativní materiály, jež by mohly nahradit v té době velmi populární Sephadex při separacích využívajících mechanismus gelové filtrace. Protože 2-hydroxyethyl-methakrylátové gely byly připravovány v široké paletě porozit, nebylo od věci vyzkoušet jejich aplikaci i v této oblasti. Houbovitý elastický gel byl připraven radikálovou polymerací 22% vodného roztoku monomeru ve skleněné trubce, poté vyjmut, vyvařen ve vodě a zasunut do skleněné kolony, v níž byl i použit. Ačkoliv velmi malá průchodnost tohoto gelu (pouhé 4 ml.h⁻¹) a nízká účinnost nedovolily docílit očekávaných separací, první monolitická kolona byla na světě. O několik let později pak dvě nezávislé skupiny v Německu a v USA použily kolony obsahující polyurethanové pěny s otevřenými póry připravené napěněním *in situ*²⁻⁴. Tyto kolony již umožnily

dosáhnout účinnějších separací jak v plynové, tak i v kapalinové chromatografii, leč stále nedosahovaly kvalit v té době špičkových chromatografických médií, a tudíž se neprosadily. A tak se stalo, že monolitické kolony pak zapadly nadlouho v zapomnění. K jejich znovuzrození došlo zvláštní shodou okolností opět v Praze na konci osmdesátých let. Od tohoto okamžiku se také začíná odvíjet novodobá historie monolitů, která je popsána v následujících řádcích.

2. Charakteristika monolitických materiálů

Monolity jsou separační média, která lze přirovnat k jediné velké částici mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Proti typickým kolonám plněným drobnými částicemi, monolity neobsahují mezičásticové prostory, kterými se v klasických kolonách uskutečňuje valná část průtoku. Proto musí veškerá mobilní fáze nutně protékat póry monolitu. Během minulého desetiletí byla zveřejněna celá řada originálních přístupů zahrnujících jak přípravu systémů vyznačujících se pouze některými prvky charakteristickými pro monolity (jako je snížený objem mezičásticových prostorů), tak i technologie skutečně monolitické. Do první skupiny patří např. kazety naplněné vrstvenými listy modifikované celulosy či srolované tkaniny. Monolity druhého typu jsou reprezentovány stlačenými hydrofilními gely, polymerními makroporézními disky, kolonami a trubnicemi, jakož i monolity na bázi siliky, což je dnes již vžitý termín pro materiály na bázi oxidu křemičitého. Některé z těchto materiálů již doznaly i praktického uplatnění. Tabulka I shrnuje současné komerčně dostupné monolitické separační jednotky.

Výše zmíněný konvektivní tok póry významně zrychluje přenos hmoty v koloně⁵. Na rozdíl od difúze, která je hlavní hnací silou přenosu hmoty z kapaliny proudící podél částic v běžné koloně do jejich pórů, konvekce póry umožňuje značné zrychlení separací zejména velkých molekul, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny či syntetické polymery, jejichž difúze je pomalá. Detailní teoretický popis přenosu hmoty v monolitických materiálech byl nedávno odvozen Ljapisev⁶.

3. Makroporézní polymerní disky

Tato forma vyvinutá v Ústavu makromolekulární chemie ČSAV v Praze je jedním z prvních skutečně fungujících monolitických separačních médií, jež byly použity k velmi rychlým a účinným separacím bílkovin⁷. Původní impuls k jejich vývoji přišel z petrohradského Ústavu makromolekulárních látek, kde Belenkii studoval chromatografii bílkovin v módu gradientové eluce, při níž použil celou řadu

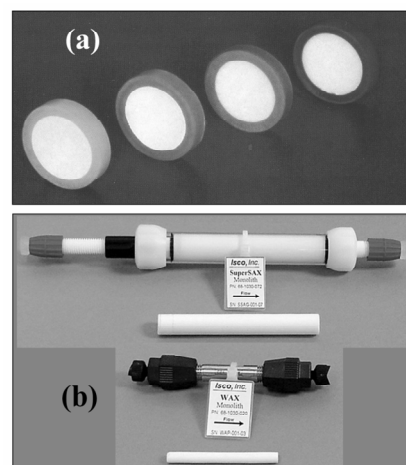
Tabulka I
Přehled současně vyráběných monolitických kolon pro HPLC

Produkt	Tvar	Výrobce	Web	Materiál	Separační módy
CIM Disk	disk	BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko	biaseparations.com	modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna, hydrofobní interakce, obrácená fáze, bioafinitní
CB Silica plate	disk	Conchrom, Bremen, Německo	conchrom.de	modifikovaná silika	obrácená a normální fáze
SepraSorb	disk	Sepragen, San Leandro, Kalifornie, USA	sepragen.com	modifikovaná celuloza	iontová výměna
CIM Tube	trubka	BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko	biaseparations.com	modifikované polymethakrylátové kopolymery	iontová výměna
UNO	kolona	BioRad, Richmond, Kalifornie, USA	bio-rad.com	kopolymery methakrylamidových monomerů	iontová výměna
Swift	kolona	ISCO, Lincoln, Nebraska, USA	isco.com	modifikované polymethakrylátové či polystyrenové kopolymery	iontová výměna, obrácené fáze
Chromolith	kolona	Merck, Darmstadt, Německo	chromolith.com	modifikovaná silika	obrácené fáze
Monoliths	kolona	LC Packings, Amsterdam, Holandsko	lcpackings.nl	polystyrenové kopolymery	obrácené fáze

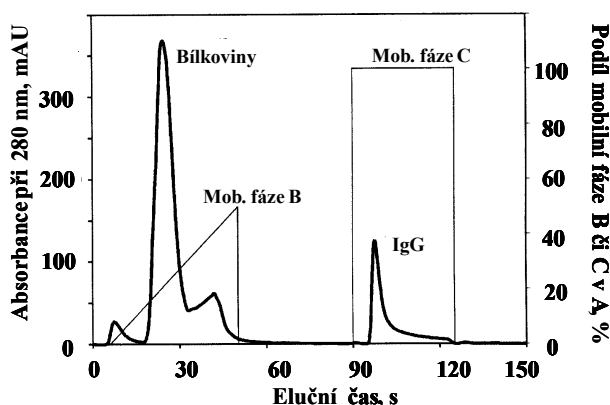
separačních médií i kolon lišících se geometrií. Zjistil přitom, že pouze jistá, většinou velmi slabá vrstva sorbentu v koloně, je postačující k dokonalé separaci, což vedlo k odvození teorie krátkých separačních loží⁸. Příprava krátkých kolon potřebných pro experimentální ověření této teorie s použitím drobných částic se však ukázala velice obtížnou, protože tyto vrstvy byly příliš neuspořádané a obsahovaly četné kanálky. Nezbylo tedy než se poohlédnout po separačních médiích nového typu, monolitických discích, jež byly pro tento účel vyvinuty v Praze a skutečně umožnily potvrdit teorii a docílit chromatografické separace s tehdy nevídanou rychlostí.

Příprava monolitů je jednoduchá. Získávají se radikálovou polymerací směsi, jež obsahuje monovinylový monomer s funkční či reaktivní skupinou jako je butyl- či glycidyl-methakrylát, síťovadlo, typický monomer se dvěma či více dvojnými vazbami např. divinylbenzen a ethylen-dimethakrylát, iniciátor, a porogenní rozpouštědlo. Tato směs se naplní do formy buď plochého nebo válcovitého tvaru, kde po zahřátí zpolymeruje. Po vyjmutí se pak z desky či roubíku vyrobí mechanickým obráběním disky⁹. Nelze-li získat disk s požadovanými funkčními skupinami přímou polymerací odpovídajícího monomeru, mohou se v následujícím stupni funkční skupiny vzniklého polymeru modifikovat^{10,11}. Většina diskových separačních médií se v současnosti připravuje z glycidyl-methakrylátu a ethylen-dimethakrylátu, přičemž první z těchto monomerů umožňuje jejich snadnou modifikaci a uplatnění v celé plejádě tech-

nik zahrnujících separace s obrácenými fázemi, s iontovou výměnou, s hydrofobními interakcemi a separace bioafinitní¹².



Obr. 1. (a) Fotografie CIM[®] disků o průměru 2 cm. Barva mezikruží je charakteristická pro monolit určený ke specifickému módu separace. (b) Fotografie monolitických kolon SWIFT[®] a odpovídajících monolitů z nich vyjmutých. Horní obrázek ukazuje skleněnou kolonu o rozměrech 100×10 mm, dolní nerezovou kolonu o rozměrech 50×4,6 mm. Fotografie byly získány laskavostí výrobců (BIA Separations, Ljubljana, Slovinsko a ISCO, Inc., Lincoln, Nebraska, USA)



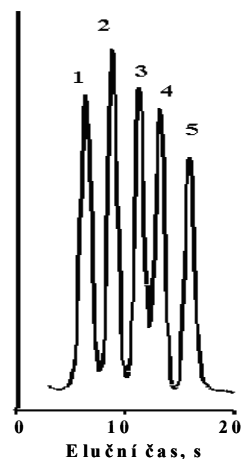
Obr. 2. Separace bílkovin z myších ascitů a izolace monoklonálního IgG s použitím dvou CIM® disků s různými funkčními skupinami umístěnými ve stejném pouzdře metodou kombinované kapalinové chromatografie (conjoint liquid chromatography, cit.¹⁴); Podmínky: Separací média: disky 12 mm průměr × 3 mm tloušťka, objem 0,34 ml; první disk CIM® QA, druhý disk CIM® Protein A; nástřik: 20 ml; mobilní fáze: A: 20 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,4; B: 1 mol.l⁻¹ NaCl v A; C: 0,1 mol.l⁻¹ kyselina octová; gradient: 0–50 % B v A za 50 s, 100 % A po dobu 40 s, 100 % C po dobu 30 s; průtok: 4 ml.min⁻¹; UV detekce 280 nm

Disky se vkládají do pouzdra vyvinutého pro tento účel a celá jednotka pak slouží k separacím. Slovinská firma BIA Separations, jež tyto disky i pouzdra vyrábí¹³, zlepšila původní technologii a umísťuje porézní disky do polyolefinového mezikruží dobře viditelného na obr. 1a, které tvoří nepropustnou boční stěnu. I když monolit je sám o sobě dostatečně mechanicky pevný a lze s ním snadno manipulovat, mezikruží ho dále zpevňuje a omezuje nebezpečí odlamování jeho hran. Kromě toho plochý povrch prstence umožňuje pevné stisknutí monolitu v pouzdře, aniž by monolit sám byl vystaven nežádoucímu mechanickému namáhání. V téměř pouzdře lze snadno vyměňovat disky a celý systém použít pro nejrůznější separace. Do této pouzdra je rovněž možno vložit současně i několik disků lišících se funkčními skupinami a docílit vícerozměrné separace. Obr. 2 zobrazuje separaci bílkovin a IgG s použitím tzv. conjoint liquid chromatography (kombinované kapalinové chromatografie) spojené v pouzdře obsahujícím dva disky, jeden nesoucí iontově-výměnné skupiny a druhý protein A (cit.¹⁴).

Od samého počátku disky umožňovaly velmi rychlé a vysoce účinné separace bílkovin a nukleových kyselin. Podrobné studium mechanismu těchto separací vedlo Tennikovou k vypracování teorie popisující separace v tenkých monolitických vrstvách, jež byla shledána zcela odlišnou od separací docilovaných v podlouhlých kolonách včetně monolitických^{15,16}.

4. Makroporézní polymerní kolony

Další forma, podlouhlé monolitické kolony, byla vyvinuta na počátku devadesátých let¹⁷. Na rozdíl od disků jsou tyto monolity připravovány přímo v trubce kolony či



Obr. 3. Rychlá separace bílkovin v módu s obrácenými fázemi s použitím vysoké průtokové rychlosti²¹; Podmínky: monolitická poly(styren-co-divinylbenzenová) kolona: 50×4,6 mm; gradient mobilní fáze: 42 % - 90 % acetonitrilu v 0,15% vodném roztoku trifluoroctové kyseliny během 0,35 min; průtok 10 ml.min⁻¹; UV detekce při 280 nm; píky: ribonukleasa A (1), cytochrom c (2), hovězí sérový albumin (3), carbonátanhydrasa (4), ovalbumin (5)

v kapiláře, které se naplní polymerační směsí, uzavrou a za tepla zpolymerují. Monolit v nich pak zůstává během všech operací i použití. Obr. 1b představuje dvě monolitické kolony s různou velikostí připravené polymerací ve skleněné a nerezové trubce. Při přímé výrobě v koloně odpadá manipulace, avšak pouhá výměna monolitu za jiný v téže trubici je prakticky nemožná. Polymerační směs používaná pro přípravu těchto monolitů je do značné míry obdobná té, která vede k diskům. Protože délka těchto kolon je ve srovnání s disky mnohem větší, vystupuje více do popředí jejich průchodnost, které musí být dosaženo při použití rozumných tlaků. Mimořádně nízký odpor vůči proudění kapalin póry je předpokladem vysokých průtokových rychlostí vhodných k velmi rychlým separacím. Typická velikost pórů v monolitech činí 1 μm a obvykle se řídí typem a složením porogenního rozpouštědla použitého při přípravě¹⁸.

Buchmeiser nedávno demonstroval mírně odlišný postup spočívající v tzv. „ring-opening metathesis polymerization“ (ROMP, polymerace metathesí za otevření kruhu, cit.¹⁹), která sice vyžaduje speciální monomery, ale rovněž vede k dobře definovaným monolitům. Paleta výrobních technik byla doplněna i polymerací iniciovanou UV světlem zvláště výhodnou pro přípravu monolitů v kapilárách a mikrofluidních zařízeních²⁰. Tato metoda ovšem vyžaduje, aby forma, v níž reakce probíhá, byla transparentní pro UV světlo, což je např. snadno splněno v komerčních silikových kapilárách potažených Teflonem.

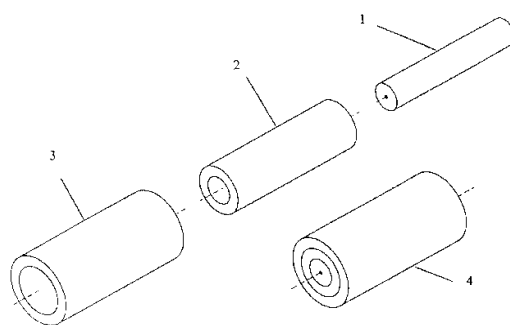
Funkční skupiny monolitických kolon připravených přímou polymerací jsou dány použitými monomery. Tento postup je např. velmi úspěšný pro přípravu monolitických kolon obsahujících poly(styren-co-divinylbenzen) vhodných pro mimořádně rychlé separace bílkovin demonstrováné na obr. 3 (cit.²¹). Huber použil kapilární kolonu obdobného složení k vynikajícímu dělení nukleových kyselin²². Další

možností kontroly funkčních skupin je příprava monolitu s reaktivními skupinami a modifikace vzniklého polymeru. Již téměř klasickým příkladem jsou monolity na bázi glycidylmethakrylátu. Celá plejáda funkcionalizovaných monolitických kolon, lišících se velikostí i separačními mechanismy pro které se hodí, je tak snadno dostupná.

Typické modifikační reakce vedou k nové skupině monolitů reakcí původní funkční skupiny. Chceme-li však umocnit počet různých funkčních skupin, je lépe použít roubování. Při něm z každé povrchové skupiny roste řetězec obsahující četné nové funkční skupiny, které mohou významně zvýšit vazebnou kapacitu. V ideálním případě pak postačuje optimalizovat přípravu generického monolitu a chemii na povrchu pórů upravovat roubováním. Monolity, jejichž povrch lze roubovat, byly např. připraveny s použitím stabilních volných radikálů, které v latentní formě zůstávají přítomny na povrchu pórů a teprve po jejich zaplnění novou polymerační směsí se aktivují zahřátím a iniciují další polymerační reakci^{23,24}. Podobně lze navázat na povrch azoiniciátor a použít ho k roubování např. *N*-isopropylakrylamidu. Takto upravený monolit mění polaritu v závislosti na teplotě a byl použit k dělení bílkovin v hydrofobně-interakčním modu bez použití gradientu mobilní fáze. Postupně eluce bylo dosaženo pouhou změnou teploty kolony²⁵. Nespornou výhodou tohoto separačního procesu je snadná možnost recyklování mobilní fáze a menší zatěžování životního prostředí. Rovněž působení UV světla umožňuje iniciovat roubování uvnitř pórů, a tedy i velmi účinnou a snadnou kontrolu chemických funkčních skupin nejenom co do kvality, ale i co do jejich rozmístění, neboť část monolitu, jež je podrobena ozáření, se snadno vymezí přiloženou maskou. Tak lze do jediného monolitu umístit několik různých typů skupin a vytvářet celé separační systémy²⁶.

5. Tubulární kolony s radiálním tokem

Rychlost separace, které je možné dosáhnout v monolitických kolonách, je přitažlivá pro jejich použití pro separace v biotechnologických výrobcích. K tomu je však potřeba připravit objemné monolity. Postup uvedený v předchozí sekci se pro tento účel příliš nehodí, neboť polymerace jsou vesměs exothermní reakce, jež produkují teplo. Zatímco v malých kolonách do průměru cca 10 mm je snadné toto teplo odvést stěnami do okolního prostředí, přesné řízení teploty uvnitř nemíchaného polymerizujícího obsahu velkých kolon, které je potřebné pro získání materiálů s požadovanými porézními vlastnostmi a bez radiálních gradientů vlastností, je velice obtížná²⁷. Elegantní řešení tohoto problému nabídl Podgornik²⁸. Namísto plného monolitického bloku připravil monolit ve tvaru trubice, jejíž stěny jsou tenčí a teplota při polymeraci je tedy snáze udržována v požadované toleranci. Kromě to lze snadno měnit jak průměr tak i tloušťku této monolitické trubky. Zvětšení průměru při zachování stejné tloušťky stěny vede ke kvadratickému růstu celkového objemu separačního média a tedy i ke zvýšení separační kapacity. Použití několika tubulárních



Obr. 4. Konstrukce monolitické jednotky o velkém objemu s radiálním průtokem pro preparativní separace²⁸

monolitů zasunutých do sebe teleskopickým způsobem ukázaným na obr. 4 umožňuje dosáhnout objemů stacionární fáze zcela nepředstavitelných při použití klasického výrobního postupu. Tok těmito kolonami je radiální, většinou z vnějšku do středu. Vynikající permeabilita těchto monolitů usnadňuje jejich použití i při vysokých průtokových rychlostech. Tak např. tubulární kolona o objemu 800 ml vyráběná firmou BIA snadno toleruje radiální průtokovou rychlost 2 l.min⁻¹ a byla úspěšně použita k rychlé separaci bílkovin v preparativním měřítku.

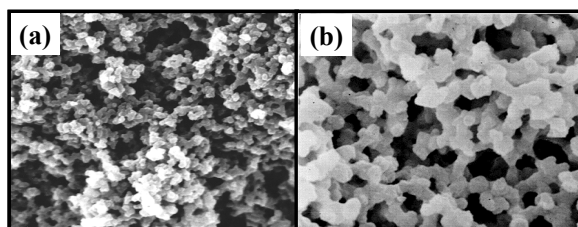
6. Komprimované gely

Současně s výzkumem disků probíhajícím v Praze, Hjertén v Uppsale experimentoval se silně zesíťovanými polyakrylamidovými gely. Neočekávaně přitom zjistil, že po stlačení sloupce gelu s použitím hydrostatického tlaku proudící kapaliny lze významně zvýšit jeho permeabilitu. Odtud pak byl již jenom krůček k přípravě gelu polymerizací vodného roztoku *N,N'*-metylenbis-akrylamidu a kyseliny akrylové v přítomnosti anorganické soli, nejčastěji síranu amonného, jeho stlačení na méně než 10 % původního objemu, a použití k separaci bílkovin v iontově-výměnném módu²⁹. Tato technologie byla posléze převzata firmou BioRad v Kalifornii, vylepšena použitím 1,4-diakrylpiperazinu jako síťovačla a použita k přípravě kolon známých pod značkou UNO. Interaktivní skupiny jsou zaváděny do těchto kolon kopolymerací. Protože příprava probíhá ve vodném roztoku a všechny komponenty musí tedy být rozpustné ve vodě, je počet způsobitelných monomerů, a tedy i separačních módů, značně omezen. Většina těchto monolitů nachází proto uplatnění v iontově-výměnných separacích. Výjimkou je monolit připravený z *N*-isopropylakrylamidu, který je použitelný pro hydrofobně-interakční separace bílkovin³⁰. Výroba monolitů pro separace s obrácenými fázemi touto technologií by však byla velmi obtížná, protože vhodné monomery nejsou rozpustné ve vodě. Podobně jako předešlé monolity, i tyto mají velice výhodný profil vanDeemterovy závislosti účinnosti na průtoku a umožňují použití velkých průtokových rychlostí aniž utrpí kvalita separací. Hydrofilní povaha vlastní tomuto typu monolitů je předurčuje

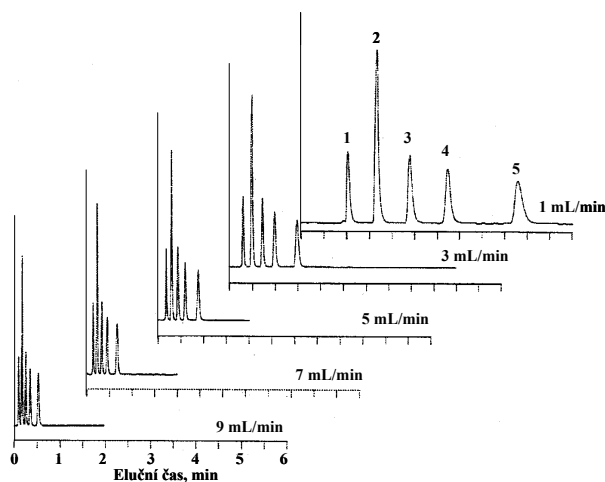
k separacím bílkovin, peptidů, nukleových kyselin i celých adenovirů³¹.

7. Monolitické kolony z anorganických materiálů

Anorganické látky jsou velmi populární jako náplně kolon v kapalinové chromatografii. Není proto divu, že tyto materiály byly použity i k přípravě monolitických kolon. Tanaka využil tyčinek z oxidu křemičitého s precizně kontrovanými porézními vlastnostmi vyvinutých Nakanishim a Sogou³² a docílil vysoce účinných separací malých molekul³³, které jsou velmi obtížně dosažitelné se všemi výše uvedenými organickými monolity. Na rozdíl od nich však silikové monolity nemohou být připravovány *in situ*, neboť ztuhnutí během hydrolytické iniciované polykondenzace tetraalkoxysilanů v přítomnosti poly(ethylenoxidu) jako porogenu je doprovázeno značným poklesem objemu. Např.



Obr. 5. SEM obrázky morfologie polymerního (a) a silikového (b) monolitu



Obr. 6. Separace β -blokátů s obrácenými fázemi při různých průtokových rychlostech s použitím monolitické kolony Chromolith³⁴; Podmínky: kolona: silikový monolit RP 18e, 50×4,6 mm i.d.; mobilní fáze: 20 : 80 acetonitril/0,1 % trifluoroctová kyselina ve vodě; průtok: 1–9 ml.min⁻¹, UV detekce při 254 nm, píky: atenolol (1), pindolol (2), methoprolol (3), celiprolol (4), bisoprolol (5)

tyčinka o průměru 4,6 mm se získá z formy o průměru 6 mm. Proto se tyčinky vyrábějí odděleně a poté uzavřou do smršťivé trubice z materiálu PEEK (poly(ether-ether-keton), která pak tvoří tělo kolony. Interaktivní skupiny, většinou C18, se navazují známými reakcemi na silikový monolit již umístěný v koloně. Díky značným objemovým změnám je možné připravit přímé tyčinky pouze do délky cca 15 cm, což do značné míry omezuje maximální délku kolon. Při větších délkách totiž dochází k ohýbání tyčinek. Merck (Darmstadt) vyrábí v současnosti tyto kolony ve dvou velikostech pro separace s obrácenými fázemi pod názvem Chromolith³⁴. Laboratorně byly již vyvinuty i kolony pro kapilární HPLC připravené přímo v kapilárách. Smršťivost je řízena kovalentním navázáním monolitu ke stěnám kapiláry³⁵.

Porézní struktura silikových monolitů je odlišná od organických monolitů. Zatímco struktura organických polymerů se skládá z pospojovaných skupin málo uspořádaných mikroglobulí s makropóry mezi nimi (obr. 5a), silikové monolity se skládají z dobře uspořádaných přibližně stejně velikých skeletů prostoupených téměř monodisperzními 1 μm velkými póry (obr. 5b). Skelety samy jsou též porézní a propůjčují těmto monolitům specifický povrch dosahující několika set $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, tedy vlastnost, jež je ceněna právě při separacích malých molekul. Obr. 6 zobrazuje velmi rychlé dělení léčiv. Nízký odpor k toku typický pro všechna monolitická média umožňuje použití kolony o vnitřním průměru 4,6 mm při průtokové rychlosti až 9 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, aniž by tlak přesáhl hodnotu 8 MPa, což jsou podmínky zcela nepředstavitelné pro stejnou kolonu naplněnou 5 μm částicemi³⁴.

Na rozdíl od organických monolitických kolon, které se mimořádně osvědčily při separacích velkých molekul, většina zatím popsáných separací používajících silikové monolity se týká malých molekul. To činí tyto kolony unikátními v celé rodině monolitů určených pro HPLC.

8. Reprodukovatelnost monolitických kolon

Spolu se zavedením monolitických kolon opět vystala ona věčná otázka chromatografistů týkající se reprodukovatelnosti. Typické sférické náplně chromatografických kolon s definovanými fyzikálními i chemickými vlastnostmi jsou vyráběny ve velkých množstvích a jednotlivé kolony plněny identickým materiálem. Toto plnění bývá kamenem úrazu a často je označováno za „černou magii“, protože reprodukovatelnost je právě nejvíce ovlivněna tímto výrobním stupněm a vědecká báze ke kontrole tohoto postupu chybí. Naproti tomu každá monolitická kolona, ať již získaná polymerizací *in situ* či připravená odděleně a poté uzavřená do kolony, je vlastně prototypem. Některé typy monolitických kolon dále vyžadují chemickou modifikaci, která se rovněž provádí v koloně. Pochopitelně, čím větší počet stupňů, tím větší rozptyl vlastností. Tak např. poly(styren-co-divinylbenzenové) monolitické kolony připravené v jediném stupni jsou velice dobře reprodukovatelné. Kupodivu však i silikové monolitické kolony,

jejichž mnohastupňová výroba patří k nejsložitějším, se vyznačují vcelku dobrou reprodukovatelností. Široká nezávislá studie prokázala, že reprodukovatelnost komerčních kolon Chromolith je plně srovnatelná s jejich plněnými protějšky. Např. variace v relativních retencích vykazovaly relativní směrodatnou odchylku 4 % pro většinu z dlouhé řady testovaných látek³⁶.

9. Epilog

Ačkoliv monolitické kolony, nazývané stacionárními fázemi čtvrté generace³⁷, jsou vcelku novou formou fází pro HPLC a mnoho ještě zbývá udělat, poznatky získané za předešlé období otvírají dveře k přípravě ještě účinnějších a rychlejších kolon s vlastnostmi šitými na míru požadované aplikaci. Guiochon nedávno napsal³⁸: „Vynález a vývoj monolitických kolon je významná změna v kolonové technologii, vpravdě první původní průlom, který se objevil v této oblasti od doby před sto lety, kdy Cvět vynalezl chromatografii.“ Velký objem experimentální práce nahromaděný do dnešních dnů, jakož i komerční dostupnost monolitických kolon, podporují úvahy o jejich značném potenciálu do budoucna. Jejich jedinečné vlastnosti odlišující je od všech ostatních kolon, zejména pak snadnost jejich přípravy, tolerance k velkým průtokovým rychlostem dosažitelným s použitím pouze mírných tlaků a velké rychlosti, s nimiž lze dosáhnout vynikajících separací, činí tyto kolony v jistých oblastech nezastupitelnými. Počet separací docílených s monolitickými kolonami i množství vyvinutých separačních metod zatím zdaleka nedosahuje počtů charakterizujících jejich mnohem starší protějšky plněné sférickými částicemi. Je však otázkou času, kdy toto již nebude pravdou, protože počet chromatografistů používajících monolitické kolony neustále roste a do jejich výzkumu jsou v současné době zapojeny pracoviště na všech kontinentech. I v České republice je několik skupin, které se angažují v této oblasti^{39–41}.

Rozsah tohoto sdělení umožnil pouze popis monolitických materiálů použitelných v HPLC. Řada dalších stejně slibných aplikací se však ukazuje i v dalších oblastech jako je elektrochromatografie⁴², mikrofluidní systémy, plynová chromatografie, heterogenní katalýza a kombinatoriální chemie. Zájemci o další informace je najdou v právě vydané objemné monografii⁴³.

Tato práce byla umožněna díky podpoře National Institute of General Medical Sciences, National Institutes of Health, grant GM-48364.

LITERATURA

- Kubín M., Špaček P., Chromeček R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **32**, 3881 (1967).
- Ross W. D., Jefferson R. T.: *J. Chrom. Sci.* **8**, 386 (1970).
- Hansen L. C., Sievers R. E.: *J. Chromatogr.* **99**, 123 (1974).
- Hileman F. D., Sievers R. E., Hess G. G., Ross W. D.: *Anal. Chem.* **45**, 1126 (1973).
- Roper D. K., Lightfoot E. N.: *J. Chromatogr., A* **702**, 3 (1995).
- Meyers J. J., Liapis A. I.: *J. Chromatogr., A* **852**, 3 (1999).
- Tennikova T. B., Švec F., Belenkii B. G.: *J. Liq. Chromatogr.* **13**, 63 (1990).
- Belenkii B. G., Podkladenko A. M., Kurenbin O. I., Mal'tsev V. G., Nasledov D. G., Trushin S. A.: *J. Chromatogr.* **645**, 1 (1993).
- Tennikova T. B., Bleha M., Švec F., Almazova T. V., Belenkii B. G.: *J. Chromatogr.* **555**, 97 (1991).
- Švec F., Jelinková M., Votavová E.: *Angew. Makromol. Chem.* **188**, 167 (1991).
- Hradil J., Jelinková M., Ilavský M., Švec F.: *Angew. Makromol. Chem.* **185/186**, 175 (1991).
- Tennikova T. B., Freitag R.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **23**, 27 (2000).
- Strancar A., Koselj P., Schwinn H., Josic D.: *Anal. Chem.* **68**, 3483 (1996).
- Strancar A., Podgornik A., Barut M., Necina R.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **76**, 49 (2002).
- Tennikov M. B., Gazdina N. V., Tennikova T. B., Švec F.: *J. Chromatogr., A* **798**, 55 (1998).
- Tennikova T. B., Freitag R., v knize: *Analytical and Preparative Separation Methods of Biomacromolecules* (H.Y. Aboul-Enein, ed.), kap. 8. M. Dekker, New York 1999.
- Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* **54**, 820 (1992).
- Viklund C., Švec F., Fréchet J. M. J., Irgum K.: *Chem. Mater.* **8**, 744 (1996).
- Buchmeiser M. R.: *Macromol. Rapid Commun.* **22**, 1082 (2001).
- Rohr T., Hilder E. F., Donovan J. J., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Macromolecules* **36**, 1677 (2003).
- Xie S., Allington R. W., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogr., A* **865**, 169 (1999).
- Premstaller A., Oberacher H., Huber C. G.: *Anal. Chem.* **72**, 4386 (2000).
- Peters E. C., Švec F., Fréchet J. M. J., Viklund C., Irgum K.: *Macromolecules* **32**, 6377 (1999).
- Viklund C., Irgum K., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Macromolecules* **34**, 4361 (2001).
- Peters E. C., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Adv. Mater.* **9**, 630 (1997).
- Peterson D. S., Rohr T., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Proteome Res.* **1**, 563 (2002).
- Peters E. C., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Chem. Mater.* **9**, 1898 (1997).
- Podgornik A., Barut M., Strancar A., Josic D., Koloini T.: *Anal. Chem.* **72**, 5693 (2000).
- Hjertén S., Liao J. L., Zhang R.: *J. Chromatogr.* **473**, 273 (1989).
- Hjertén S.: *Ind. Eng. Chem. Res.* **38**, 1205 (1999).
- Liao J. L.: *Adv. Chromatogr.* **40**, 467 (2000).
- Nakanishi K., Soga N.: *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 2518 (1991).

33. Tanaka N., Ishizuka N., Hosoya K., Kimata K., Minakuchi H., Nakanishi V., Soga N.: *Kuromatogurafī 14*, 50 (1993).
34. Cabrera K., Lubda D., Eggenweiler H. M., Minakuchi H., Nakanishi K.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 93 (2000).
35. Motokawa M., Kobayashi V., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Jinnai H., Hosoya K., Ikegami T., Tanaka N.: *J. Chromatogr., A* 961, 53 (2002).
36. Kele M., Guiochon G.: *J. Chromatogr., A* 960, 19 (2002).
37. Iberer G., Hahn R., Jungbauer A.: *LC-GC (North America)* 17, 998 (1999).
38. Al Bokari M., Cherrak D., Guiochon G.: *J. Chromatogr., A* 975, 275 (2002).
39. Coufal P., Čihák M., Suchánková J., Tesařová E.: *Chem. Listy* 95, 509 (2001).
40. Coufal P., Čihák M., Suchánková J., Tesařová E., Bosáková Z., Štulík K.: *J. Chromatogr., A* 946, 99 (2002).
41. Kvasničková L., Glatz Z., Štěrbová H., Kahle V., Slani-
na J., Musil P.: *J. Chromatogr.* 916, 265 (2001).
42. Kvasničková L., Glatz Z., Kahle V.: *Chem. Listy* 97, 86 (2003).
43. Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z. (ed.): *Monolithic*

Materials: Preparation, Properties, and Applications.
Elsevier, Amsterdam 2003.

F. Švec (*Department of Chemistry, University of California, Berkeley, USA*): **Monolithic Stationary Phases.**
Place of Birth: Prague

It is not generally known that monoliths, which are now the fastest growing segment of HPLC column technologies, were invented in Prague as early as the late 1960s. Although these early monoliths comprising a block of swollen hydrophilic gel did not perform flawlessly, the concept has been demonstrated. Unfortunately, after a few more approaches were unsuccessfully tested, this technology was almost forgotten until the late 1980s. At that time, two groups developed simultaneously synthetic polymer monoliths with an excellent performance in the separation of proteins. Interestingly enough, one of them was again in Prague. This new generation of monoliths triggered a broad interest in this technology and has led to development of a wide variety of formats and materials. This review also describes in some detail the current most successful monolithic formats such as discs and columns as well as a plethora of materials that were used for their preparation.