

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Morfologická charakteristika monolitických kolon

Dizertační práce

Jakub Širc

Praha 2009

Tato dizertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2003 – 2009.

Prohlášení

Prohlašuji, že tuto dizertační práci jsem vypracoval samostatně, pod vedením školitelky Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc. a konzultantů Prof. RNDr. Věry Pacákové, CSc.; Ing. Jiřího Michálka, CSc. a Ing. Martina Přádného, CSc. Tuto práci ani její podstatnou část jsem nepředložil k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Veškerou použitou literaturu jsem řádně citoval.

V Praze dne

podpis:

Poděkování

Úvodem bych chtěl poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a konzultantům Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc.; Ing. Jiřímu Michálkovi, CSc. a Ing. Martinovi Přádnému, CSc. za odborné vedení při řešení této dizertační práce, za jejich cenné rady a připomínky. Osobní poděkování patří kolegům z Oddělení hydrogelů pro lékařskou a technickou praxi ÚMCH AV ČR v.v.i. za vytvoření příjemné a přátelské pracovní atmosféry.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	3
3. TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1. Metody studia morfologie monolitických kolon	4
3.1.1. Zobrazovací metody	4
3.1.1.1. Světelná mikroskopie	5
3.1.1.2. Skenovací elektronová mikroskopie	7
3.1.1.3. Mikroskopie atomárních sil	9
3.1.2. Rtuťová porozimetrie	11
3.1.3. Stanovení specifického povrchu	14
3.2. Faktory ovlivňující morfologii monolitických kolon.	16
3.2.1. Podmínky polymerizace	16
3.2.2. Porogenní složka polymerizační směsi	19
3.2.3. Monomer, síťovadlo	20
3.3. Vliv morfologie monolitických kolon na chromatografický děj	22
3.4. Aplikace monolitických kolon	24
3.5. Vtištěné polymery v analytických separačních metodách	24
3.5.1. Kovalentní imprinting	26
3.5.2. Nekovalentní imprinting	27
3.5.3. Templáty	27
3.5.4. Síťovadla	29
3.5.5. Funkční monomery	30
3.5.6. Porogenní směsi	31
3.5.7. Podmínky polymerizace	32
3.5.8. Aplikace vtištěných polymerů	33
4. VLASTNÍ EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE	34
4.1. Příprava a morfologická charakteristika monolitických kolon na principu vtištěných polymerů	34
4.2. Morfologická charakteristika butylmethakrylátových kolon pro kapilární chromatografii	42

5. LITERATURA	47
6. SEZNAM ZKRATEK	54
7. SEZNAM VÝSTUPŮ	55
8. PUBLIKACE KTERÉ JSOU PŘEDMĚTEM DIZERTAČNÍ PRÁCE ..	59
8.1. Širc J., Bosáková Z., Coufal P., Michálek J., Příkladný M., Hobzová R., Hradil J.: <i>Morphological and chromatographic characterization of molecularly imprinted monolithic columns.</i> E-Polymers 117 (2007) 1 - 15	60
8.2. Širc J., Bosáková Z., Coufal P., Michálek J., Guryča V.: <i>Investigation of chromatographic behavior and porous properties of butyl methacrylate monolithic columns.</i> Mater. Manuf. Process. 23 (2008) 591 - 596	75
8.3. Příkladný M., Michálek J., Širc J.: Kapitola „ <i>Porous hydrogels</i> “ do knihy „ <i>Porous Media: Heat and Mass Transfer, Transport and Mechanics.</i> “, Nova Publishers	81
8.4. Coufal P., Bosáková Z., Širc J., Pacáková V., Štulík K.: Kapitola „ <i>Organic-polymer-based monolithic capillary columns for separations of small organic molecules.</i> “ do knihy „ <i>Monolithic columns in its modern applications.</i> “, ILM Publications	101

1. ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současné době jednou z nejrozšířenějších analytických separačních technik. Vzhledem k její schopnosti dělit široké spektrum strukturně značně odlišných nízko- i vysokomolekulárních látek polárního i nepolárního charakteru našla uplatnění v analytických laboratořích v oblasti lékařství, farmacie, biologie, průmyslu a životního prostředí.

Přestože se v převážné většině chromatografických aplikací používají klasické náplňové kolony, mají stacionární fáze v podobě částic své limity a nevýhody. Kvalita náplňových kolon je ovlivňována řadou parametrů, mezi něž patří poměrně komplikovaný proces plnění [1]. Rozdílné velikosti částic a nepravidelnosti v jejich tvaru mají negativní vliv na chromatografický děj. Častým problémem klasických kolon je rozdílná distribuce různě velkých částic v různých místech kolony či postupné sesedání stacionární fáze a následný vznik mrtvých prostorů. Do určité míry byly nevýhody náplňových kolon řešeny použitím vysoce uniformních sférických částic připravovaných např. suspenzní polymerizací, nicméně některé nevýhody, vyplývající již ze samotného principu plnění chromatografických kolon částicemi, odstranit nelze.

Slibnou alternativou náplňových chromatografických kolon jsou kolony monolitické. Na rozdíl od náplňových stacionárních fází tvořených mnoha částicemi, jsou monolity tvořeny jedním blokem porézního materiálu. Struktura monolitických kolon je charakteristická komunikujícími makropóry, které nahrazují mezičásticové prostory náplňových kolon a umožňují průtok mobilní fáze unášející molekuly analytu, a dále malými mesopóry umožňujícími přístup k aktivním místům stacionární fáze. Charakter porézní struktury monolitu, jeho specifický povrch, množství, velikost a tvar pórů zásadním způsobem ovlivňují vlastnosti monolitických kolon.

Monolitické stacionární fáze bývají zpravidla připravovány *in situ* polymerizací uvnitř kolon či kapilár. Proces polymerizace je komplexní děj při kterém ovlivňuje strukturu výsledného monolitu řada faktorů. Polymerizační směs je zpravidla tvořena pěti složkami, přičemž jak množství, tak chemická struktura každé z nich více či méně významně ovlivňuje výslednou strukturu monolitu. Způsob iniciace polymerizace a teplota, při které k ní dochází, jsou další faktory mající vliv na strukturu polymeru.

Důkladná charakterizace struktury připravovaných monolitických kolon je nezbytná pro pochopení chromatografických dějů, které v nich probíhají. Stejně tak je důležité pochopení procesu polymerizace a jednotlivých faktorů, které následnou strukturu ovlivňují. Předpokladem pro systematický vývoj nových monolitických materiálů je vyvození souvislostí mezi přípravou monolitických stacionárních fází, jejich strukturou a následnými chromatografickými vlastnostmi. Proto také vznikla tato dizertační práce, která, jednak jako celek, jednak ve svých částech, respektive publikovaných pracích, vztahy mezi přípravou, strukturou a výslednými chromatografickými vlastnostmi monolitických kolon popisuje.

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

- Metodické zvládnutí přípravy monolitických stacionárních fází klasických rozměrů pro HPLC.
- Aplikace získaných zkušeností na přípravu monolitických kolon na principu vtištěných polymerů.
- Morfologická charakteristika připravených monolitických kolon fyzikálními metodami.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Metody studia morfologie monolitických kolon

Jak již bylo zmíněno v úvodu, struktura monolitických stacionárních fází hraje velmi důležitou roli v separačním procesu. Existuje řada experimentálních metod, které mohou poskytnout informace o struktuře monolitických materiálů. Do skupiny zobrazovacích metod patří světelná mikroskopie, založená na interakci viditelného spektra se studovaným materiálem a dále skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM). Pro měření celkové porozity a distribuce velikostí pórů bývá používána rtuťová intruzní porozimetrie. Specifický povrch monolitických stacionárních fází lze velmi přesně určit pomocí dusíkových adsorpčních-desorpčních izotherm (metoda BET).

3.1.1. Zobrazovací metody

Zobrazovací techniky jsou nejrozšířenějšími metodami studia morfologie monolitických stacionárních fází. Nahlédnutí do struktury materiálu, zobrazení tvarů a velikostí vzájemně propojených polymerních globulí a okolních pórů umožňuje objasnit procesy při jejich vzniku a předpovědět vlastnosti při jejich použití v separačním procesu.

Ačkoli ostatní metody přinášejí výstupy v podobě přesných číselných hodnot umožňujících exaktnější srovnání jednotlivých vzorků, mikroskopické techniky dovolují nahlédnout a porovnat struktury v různých místech monolitu. Nedochází tak ke „zprůměrování“ hodnot v rámci jednoho vzorku a lze tak například porovnat strukturu polymeru na okraji či ve středu monolitu připraveného uvnitř kapiláry o průměru několik desítek mikrometrů. Mikroskopické metody vhodně doplňují ostatní způsoby charakterizace morfologie a vylučují případy, ve kterých tyto metody mohou selhávat. Například snímky pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem odhalily uvnitř monolitu přítomnost lahvicových pórů o velikosti jednotek mikrometrů [2]. Tyto póry byly přístupné pouze komunikujícími póry o

velikosti desítek nanometrů, tedy o dva řády menšími. Při rtuťové porozimetrii pronikla rtuť do velkých pórů až při vysokých tlacích odpovídajících malým pórům a na distribučních křivkách byl veškerý volný objem připsán pórům malým. Velké póry mající podstatný vliv na chromatografické vlastnosti monolitů tak byly odhaleny až zobrazovací metodou.

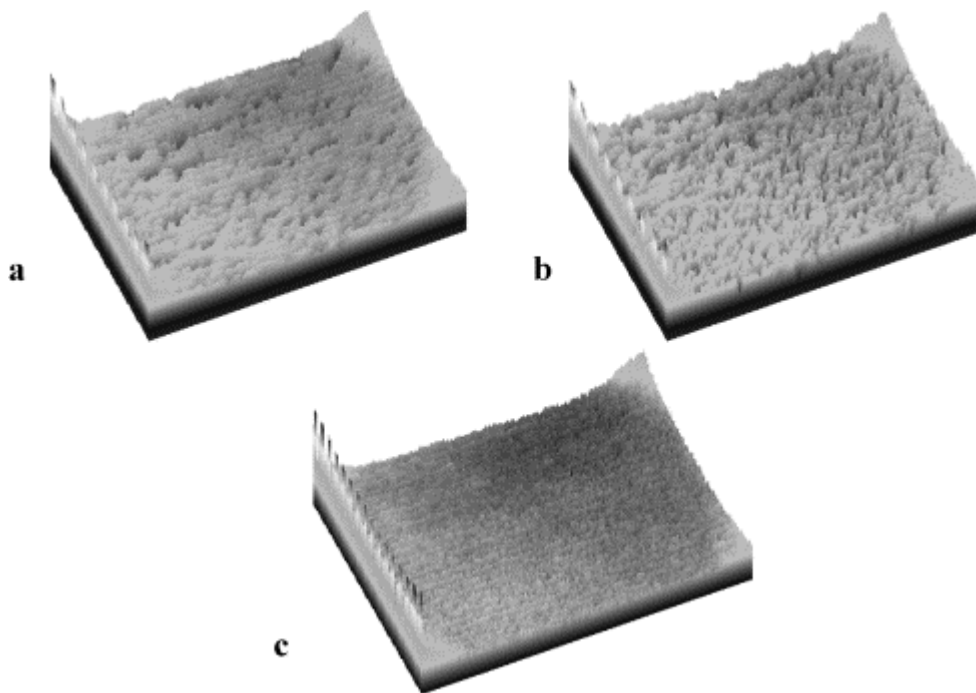
Podle druhu záření interagujícího se zkoumaným objektem rozlišujeme techniky světelné a elektronové mikroskopie. Dále se mikroskopie dělí podle módu snímání na transmisní (prozařovací), kdy jsou sledovány tenké řezy studovaného vzorku, a odrazové, kdy je pozorován povrch vzorku. Pro studium monolitických stacionárních fází používaných v chromatografii bývá používána především světelná mikroskopie a skenovací elektronová mikroskopie (SEM, scanning electron microscopy) v odrazovém módu, méně často také mikroskopie atomárních sil (AFM, atomic force microscopy).

3.1.1.1. Světelná mikroskopie

Světelná mikroskopie má ve srovnání s elektronovou mikroskopií řadu výhod, od podstatně nižších nároků na instrumentaci, až po jednoduchou přípravu vzorku. Vzhledem k tomu, že lze dosáhnout hodnoty rozlišení v řádu mikrometrů, neumožňuje tato technika detailní studium morfologie monolitických kolon, nicméně může být užitečným doplňkem k ostatním charakterizačním metodám.

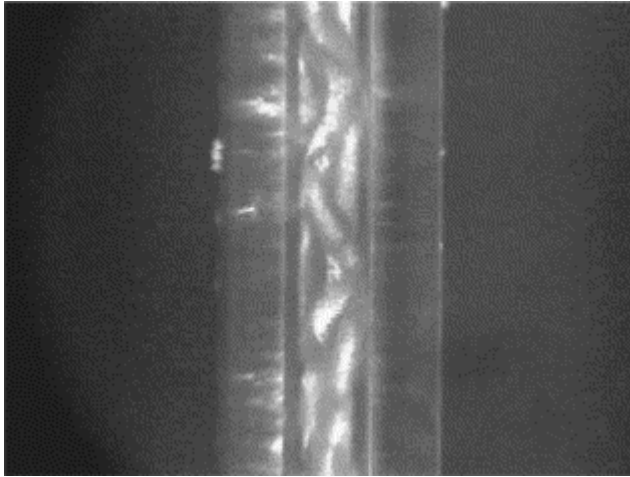
Vzorky mohou být snímány v běžném prostředí za atmosférického tlaku, nemusí být vysoušeny a je tak možné sledovat např. stacionární fázi přímo ve zbotnalém stavu mobilní fázi. Nedochozí tak ke změnám mechanicky, tepelně či chemicky málo stabilních struktur.

Pomocí techniky HROM (high-resolution optical microscopy) se zpracováním obrazu do digitální podoby a s přesnou lokalizací snímané plochy lze pozorovat změny struktury vzorku během bobtnání různými rozpouštědly či během jeho vysoušení (obr. 1) [3]. Kromě nepoměrně komplikovanější mikroskopie atomárních sil je to jediný způsob, jak částečně odhalit sekundární změny struktury polymerních vzorků, ke kterým dochází během jejich přípravy pro elektronovou mikroskopii.



Obr. 1. Třírozměrné snímky, pořízené optickým mikroskopem, dokumentují změny povrchu monolitické stacionární fáze (a) mokrý vzorek, (b) vzorek po 5 min sušení, (c) snímek po 10 min sušení. Velikost snímků: $360 \times 220 \mu\text{m}$. [3].

Optická mikroskopie je nejčastěji používaná metoda při odhalování defektů, jako je odtržení monolitu od stěny kolony, vznik mrtvých prostorů vlivem uvolňování plynného dusíku při iniciaci polymerizace nebo díky objemovým kontrakcím polymerizační směsi (obr. 2). U kapilárních monolitických kolon lze i při malém zvětšení velmi jednoduše odhalit nedostatečné naplnění kapiláry polymerizační směsí ještě před *in situ* polymerizací.



Obr. 2. Snímek pořízený optickým mikroskopem zobrazující nehomogenní monolitickou stacionární fázi uvnitř kapiláry [3].

3.1.1.2 Skenovací elektronová mikroskopie

Zobrazení předmětu elektronovým mikroskopem je výsledkem jeho interakce s elektronovým svazkem a je závislé na řadě parametrů, např. na urychlovacím napětí a na energii elektronového svazku, na hustotě vzorku, na atomovém čísle prvků a samozřejmě na povrchové topografii vzorku. Při dopadu elektronového svazku na povrch vzorku dochází k průniku elektronů do materiálu vzorku. Pružnými a nepružnými interakcemi elektronů s atomy vzorku se mění dráha primárních elektronů, generují se sekundární elektrony, vzniká spojité a charakteristické záření X a jimi způsobená fluorescence. Kromě sledování topografie vzorku lze pozorovat materiálový kontrast (pozorování odražených elektronů) nebo provádět prvkovou analýzy (spektroskopie charakteristického záření X). Pro vytvoření topografického obrazu se nejčastěji využívá signál detekovaných sekundárních elektronů.

K získání informací o morfologii monolitu je nutné odhalit jeho vnitřní strukturu vytvořením nového povrchu, který ji reprezentuje. Účelem správné preparační techniky je ukázat strukturu preparátu v jeho skutečné podobě a zamezit případným sekundárním změnám způsobených přípravou a manipulací s preparátem. Pro správný výběr techniky přípravy vzorku je třeba brát v úvahu, jaká je odezva materiálu na dělení vzorku. K přípravě vzorku v podobě monolitické kolony za

účelem pozorování jeho struktury přichází v úvahu v podstatě pouze preparační technika lomu. Chceme-li se při preparaci vyhnout vysokým deformacím vzorku, musíme volit podmínky tak, abychom zajistili, že se polymer nachází ve skelném stavu. Ten je charakteristický vysokým modulem pružnosti. Při lomu dochází k lokálnímu zvýšení teploty v místě šířícího se lomu, které může posunout podmínky experimentu nad teplotu skelného přechodu. Výsledný pohled potom neodpovídá skutečné struktuře polymeru. Z toho důvodu jsou vzorky během preparace před lomem chlazeny, zpravidla kapalným dusíkem.

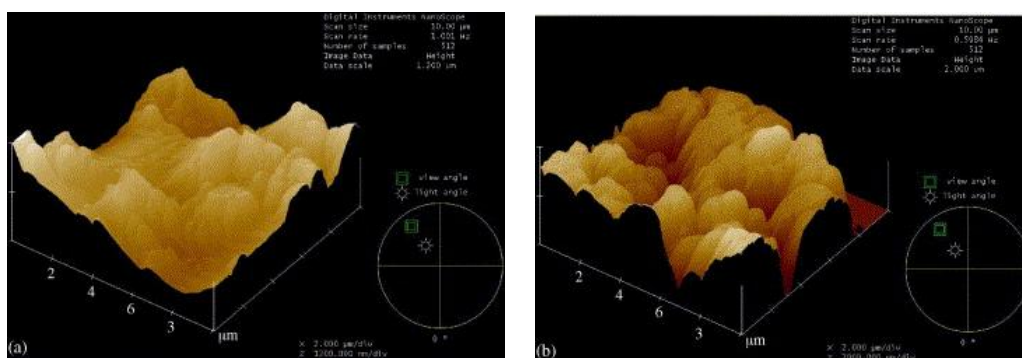
Při dopadu elektronového svazku na vzorek dochází k jeho lokálnímu nabíjení. Aby následkem toho nedocházelo k odpudivé interakci záporně nabitého vzorku s dopadajícími elektrony, je nutné vzniklý náboj odvádět. Nevodivé vzorky je proto nutné pokrývat vodivou vrstvou, která musí být tak tenká, aby nezakrývala topografické detaily. Zpravidla se používá pokrytí zlatem nebo platinou. Ušlechtilý kov se nanáší za nízkých tlaků (přibližně 1 Pa) metodou napařování, nebo napařování (tlak kolem 0,01 Pa). Výhodou napařování je, že na rozdíl od napařování nemá směrový charakter.

Vzhledem k velké hloubce ostrosti skenovací elektronové mikroskopie není možné přímo změřit velikost pórů pouhým převedením trojrozměrného uspořádání do dvourozměrného zobrazení. Vzdálenost objektů od roviny snímání není ze zobrazení patrná a vzdálenost mezi globulemi polymeru na obrázku nemusí odpovídat jejich skutečné vzdálenosti v trojrozměrném prostoru. K přesnějšímu odhadu velikosti pórů pomocí elektronové mikroskopie je nutné využít některou ze speciálních technik. Nejjednodušším způsobem je tzv. obrazová analýza, ve které je z černobílého snímku počítačově vyfiltrován pouze jeden odstín šedi. S určitou pravděpodobností je tato hladina v konstantní vzdálenosti od detektoru a je tedy možné přímo určovat rozměry globulí či pórů. Dalším způsobem je instrumentálně poměrně náročná technika, kdy je vzorek nasycen kapalinou a ochlazen pod bod jejího tání. Po provedení řezu je sublimací odstraněna velice tenká konstantní vrstva kapaliny, čímž vznikne reliéf tvořený rovinou zmražené kapaliny, ze které vyčnívají seříznuté polymerní globule. Z trojrozměrného uspořádání je tak vymezena tenká dvourozměrná vrstva umožňující stanovení vzdáleností.

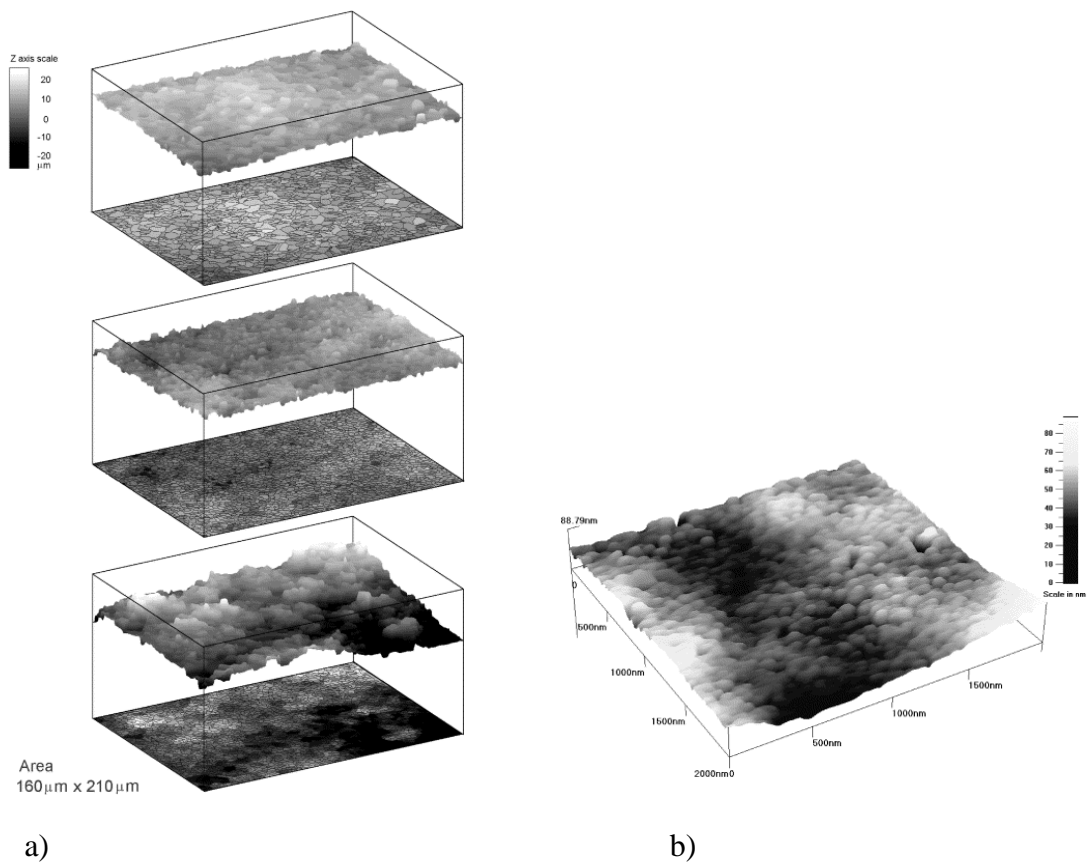
3.1.1.3. Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Při mikroskopii atomárních sil je povrch vzorku detekován pomocí hrotu, pohybujícího se v těsné blízkosti nad preparátem. Obraz povrchu preparátu je sestaven počítačovou rekonstrukcí z třírozměrných souřadnic jednotlivých poloh hrotu. Charakteristické je vysoké rozlišení, které v některých aplikacích může zobrazit i atomární strukturu v krystalech. Při studiu monolitických kolon lze sledovat mesopóry o velikostech 25 nm [4].

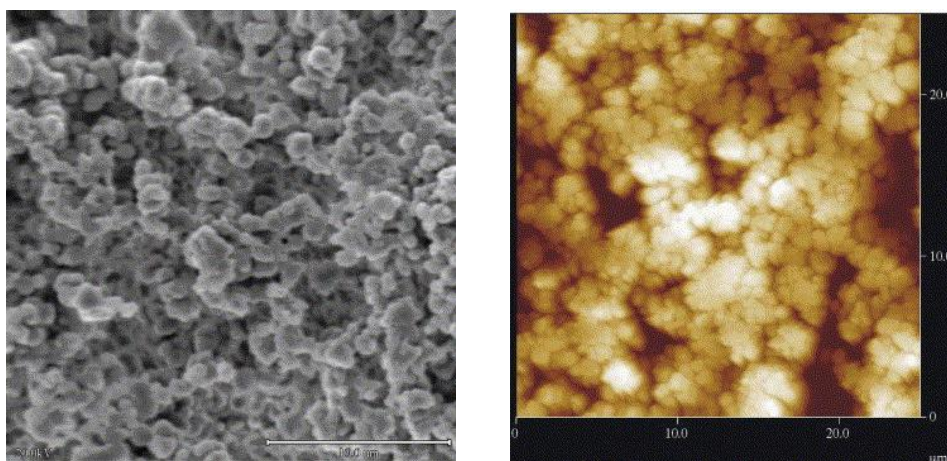
Pro studium morfologie chromatografických monolitických kolon nebyla mikroskopie atomárních sil běžně používána, přestože by mohla přinést užitečné informace. Velkou výhodou této metody založené na interakci snímacího hrotu a vzorku díky atomárním silám je, že nemusí probíhat ve vysokém vakuu a není nutné vzorky vysoušet. Lze tak porovnávat struktury monolitických fází zbotnalých vodou, acetonitrilem apod., jak je patrné z obr. 3 - 5. Existuje tak potenciální možnost sledování monolitů za stejných podmínek jako při chromatografickém ději. Další velkou výhodou se jeví možnost stanovení funkčních skupin na povrchu monolitu [5].



Obr. 3. Povrch monolitické stacionární fáze snímaný pomocí AFM ve vodě (a) a ve vzduchu (b) [4].



Obr. 4. Třírozměrné snímky pořízené optickou mikroskopií (a) a pomocí AFM (b), dokumentující změny povrchu stacionární fáze pro CEC (komonomer akrylamid/cyklodextrin) způsobené různou iontovou silou mobilní fáze [6].



Obr. 5. Snímky topografie butylakrylátové monolitické stacionární fáze pořízené pomocí SEM ve vakuu (a) a pomocí AFM na vzduchu za atmosférického tlaku (b) [4].

3.1.2 Rtuťová porozimetrie

Metoda, která byla vyvinuta v roce 1945 Ritterem a Drakem, spočívá ve vlastnosti rtuti nesmáčet povrch pevných látek. Díky tomu vniká rtuť do otevřených pórů pevné látky pouze účinkem stoupajícího tlaku. Měřením objemu rtuti, vniklé do pórů za vzrůstajícího tlaku, se získávají experimentální údaje, z nichž lze vypočítat distribuční křivky zobrazující četnost pórů jako funkci jejich poloměru.

Pro měření je nutné brát v úvahu tyto předpoklady:

- rtuť je nestlačitelná kapalina
- pevná látka se účinkem tlaku nedeformuje
- povrchové napětí rtuti a tedy její kontaktní úhel vůči povrchu vzorku je během měření konstantní
- systém je v rovnováze.

Při zjednodušení, že všechny póry jsou válcovitého tvaru, lze z úvahy o tlaku, nutného k proniknutí rtuti do kapiláry o určitém poloměru, odvodit tzv.

Washburnovu rovnici (1):

$$p r = -2 \gamma \cos (\theta) \quad (1)$$

kde p je použitý tlak (Pa), r je poloměr póru (m), γ povrchové napětí (Nm^{-1}) a θ kontaktní úhel.

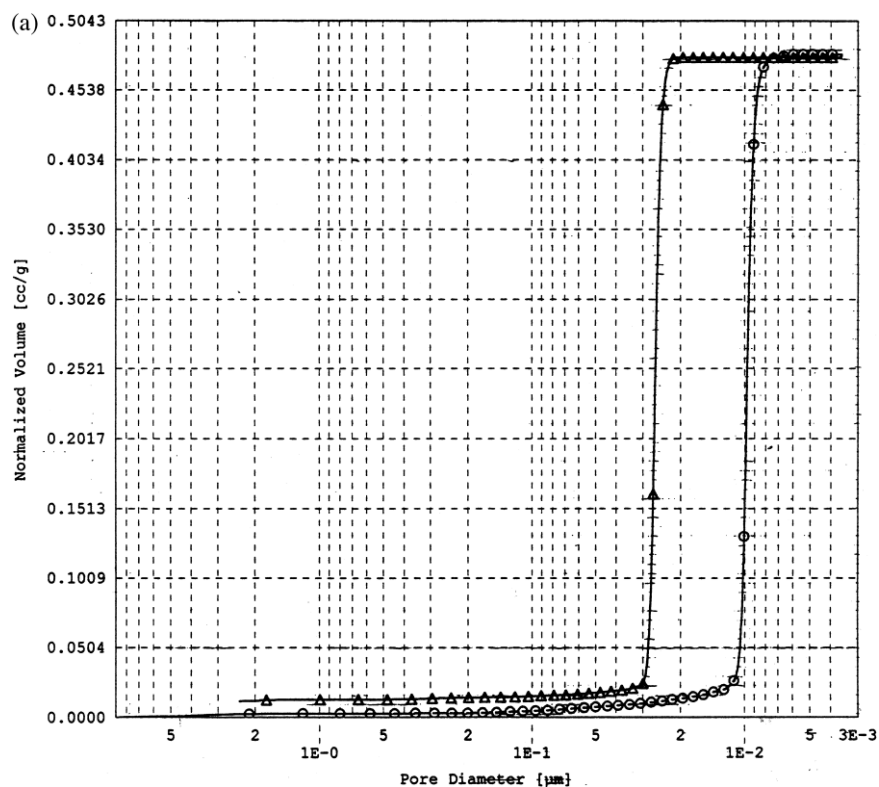
Při povrchovém napětí rtuti 480 mNm^{-1} a kontaktním úhlu $141,3^\circ$ lze vztah zjednodušit na:

$$r = 7500/p \quad (2)$$

kde r je poloměr póru vyjádřený v nm a p je použitý tlak vyjádřený v kg/cm^2

Výše uvedený vztah (2) je však pouze velice zjednodušeným teoretickým základem, reálné určení velikosti pórů je podstatně komplikovanější děj. Vzorek se umístí do uzavřené cely. Ta se nejprve evakuuje a následně zaplní kapalnou rtutí. Postupně se zvyšuje tlak a měří se úbytek rtuti, resp. objem rtuti vniklé do pórů

vzorku. Intruze rtuti do měřeného vzorku je kinetický jev, který je ovlivněný jednak tvarem a velikostí pórů a jednak celkovou velikostí měřeného vzorku. Při měření je důležitá zvolená rychlost zvyšování tlaku a podstatnou informací je také doba dosažení rovnovážného stavu. Výstupem měření je hysterézní křivka zobrazující závislost množství intrudované rtuti na tlaku (zpravidla bývá zobrazován v logaritmickém měřítku, obr. 6). První část, tzv. intruzní křivka, zobrazuje postupné zvyšování tlaku. V určitém bodě dochází k intruzi rtuti do největších pórů vzorku, se vzrůstajícím tlakem se postupně zaplňují póry o menším průměru. Při limitním tlaku blízcím se 1000 MPa dochází k intruzi rtuti do pórů o velikosti 2 nm, tedy na rozhraní mezopórů a mikropórů. Další část, tzv. extruzní křivka, zobrazuje množství rtuti extrudující z pórů vzorku za postupného snižování tlaku v detekční cele. Množství rtuti, které zůstane v pórech vzorku, také vypovídá o jeho charakteru.



Obr. 6. Intruzní (značeno kroužky) a extruzní (značeno trojúhelníky) část hysterézní křivky, získané rtuťovou porozimetrií [7].

Dle průběhu intruzní křivky lze rozlišit několik základních tvarů pórů:

Válcovité póry jsou charakteristické velmi strmou intruzní křivkou. Podobný průběh má následně i křivka zobrazující extruzi rtuti při snižování tlaku. V pórech vzorku se zadržuje jen malé množství původně vniklé rtuti.

Kuželovité póry - intruzní křivka má plochý nárůst způsobený postupně se zmenšujícím průměrem pórů, extruzní křivka má podobný tvar. Kuželovité póry jsou nejčastěji zastoupeny v přírodních materiálech.

Štěrbínové póry mají tvar prostoru mezi dvěma rovnoběžnými destičkami, jsou charakteristické strmým nárůstem objemu intrudované rtuti při vyšších tlacích. Velký podíl rtuti zůstává po snížení tlaku v pórech vzorku.

Lahvicovité póry jsou charakteristické užšími vstupními otvory než jsou jejich vnitřní rozměry. Po měření zůstává téměř veškerý obsah rtuti uvnitř pórů vzorku.

Z experimentálních dat naměřených rtuťovou porozimetrií lze zjistit následující veličiny :

Celková porozita vzorku je počítána z hmotnosti rtuti intrudované do pórů při maximálním použitém tlaku. Rtuť tak zaujme veškerý volný prostor pórů větších než je minimální měřitelný průměr, zpravidla 2 nm. Měření předchází vážení vzorku a objem pórů se udává v cm^3/g . Odečtením objemu pórů od celkového objemu vzorku lze spočítat objem samotné hmoty vzorku a následně „zdánlivou“ hustotu (apparent-density), tzn. hustotu samotné hmoty vzorku (pokud nebereme v úvahu objem mikropórů, tzn. pórů menších než 2 nm).

„Celková hustota“ vzorku (někdy také sypaná hustota, hustota sypaného či zrnitého materiálu, „bulk density“) je důležitá charakteristika pevných i sypkých materiálů stanovovaná rtuť jako pyknometrickou tekutinou [8]. Vzorek se po zvážení umístí do měřicí cely a volný okolní prostor se evakuuje a poté zaplní rtuť. Z hmotnosti rtuti obklopující vzorek (bez její intruze způsobené zvýšeným tlakem) se spočítá celkový objem vzorku a následně jeho celková hustota.

Další charakteristikou zjistitelnou z rtuťové porozimetrie je měrný vnitřní povrch pórů, který lze spočítat z celkového objemu pórů a z jejich velikostí. Důležitou roli při tom hraje tvar pórů. Pro póry např. kulovitého tvaru je povrch jiný než pro póry stejného objemu, ale štěrbinového tvaru. Je tedy nutné použít

matematický aparát, který je specifický pro každý model tvaru pórů. Pro sledovaný vzorek je nutné zvolit výpočet odpovídající převládajícímu tvaru pórů a je tedy nutná určitá aproximace.

Patrně nejčastěji prezentovaným výstupem rtuťové porozimetrie je rozdělení pórů podle jejich velikosti. Naměřené hodnoty bývají interpretovány jako semilogaritmická závislost, kde poloměr pórů se uvádí na vodorovné logaritmické ose a kumulativní hodnota objemu pórů na svislé ose s lineárním průběhem. Výsledky je také možné názorněji interpretovat jako závislost četnosti pórů na jejich velikosti. Maximum této křivky odpovídá nejfrekventovanější velikosti pórů.

3.1.3. Stanovení specifického povrchu metodou BET

Pro měření specifického povrchu monolitických stacionárních fází bývá nejčastěji používána metoda BET, založená na fyzikální adsorpci plynu na povrch měřeného vzorku [9]. Množství plynu vázaného na pevnou fázi lze vyjádřit Langmuirovou izotermou, vycházející z předpokladu že povrch adsorbentu je stejnorodý, molekuly adsorbujícího se plynu se navzájem neovlivňují a vytvářejí na povrchu adsorbentu pouze jedinou monomolekulární vrstvu molekul:

$$a = q \frac{K p}{(1 + K p)} \quad (3)$$

kde a (mol/g) je látkové množství adsorbovaného plynu připadající na 1g vzorku, q (mol/g) celkové látkové množství aktivních center připadajících na 1 g vzorku, p (Pa) parciální tlak nad vzorkem a K rovnovážný koeficient adsorpce.

Za předpokladu, že molekuly plynu mohou být na povrchu pevné fáze zachycovány ve více vrstvách, odvodili Brunauer, Emmett a Teller matematický vztah pro tzv. BET izotermu:

$$\frac{p}{a(p^0 - p)} = \frac{1}{a_m C} + \frac{C - 1}{a_m C} \frac{p}{p^0} \quad (4)$$

kde p (Pa) je parciální tlak plynu nad vzorkem, p^0 (Pa) tenze nasycených par plynu při dané teplotě, a (mol/g) látkové množství adsorbovaného plynu připadající na 1g vzorku, a_m (mol/g) látkové množství plynu připadajícího na 1g adsorbentu, pokrývající jeho povrch v monomolekulární vrstvě a C (J) konstanta zahrnující adsorpční a kondenzační teplo.

Adsorpční izoterma graficky znázorňuje závislost adsorbovaného množství plynu na jejím tlaku u povrchu adsorbentu za konstantní teploty. Ze změřené izotermy se určí množství plynu, které vytvoří na povrchu monomolekulární vrstvu a_m . Jestliže známe plochu, kterou zaujímá jedna molekula adsorbujícího se plynu na povrchu pevné látky, je specifický povrch dán vztahem:

$$A_{SP} = N_A \cdot a_m \cdot \sigma \quad (5)$$

kde A_{SP} (m²/g) je specifický povrch vzorku, N_A Avogadrova konstanta, a_m (mol/g) látkové množství plynu připadajícího na 1g adsorbentu, pokrývající jeho povrch v monomolekulární vrstvě a σ (m²) plocha vzorku, kterou zaujímá jedna molekula adsorbující se látky.

Plochu σ je možné odhadnout z hustoty adsorbující se látky v kapalném či pevném stavu, nebo na základě struktury a rozměrů molekulárních vrstev v krystalickém stavu. Naměřené hodnoty specifického povrchu se mohou lišit podle použitého plynu. Mikropóry mohou být nepřístupné pro větší molekuly, tudíž čím menší jsou molekuly adsorbátu, tím větší je naměřený povrch. Nejčastěji se používá adsorpce dusíku či argonu při nízkých teplotách. Jako srovnávací měření lze provést stanovení specifického povrchu pomocí adsorpce z kapalných roztoků, kdy se na vzorek adsorbují organická rozpouštědla (úbytek koncentrace z roztoku se měří kalorimetricky) nebo izotopově značené látky. Molekuly takových látek jsou však zpravidla velké, nedostanou se do jemných pórů a naměřené povrchy jsou nižší.

Výstupy výše uvedených metod jsou výsledkem přesných fyzikálních měření zpracovaných matematickými aparáty pracujícími s určitými aproximacemi. Každá metoda tak přináší velmi důležité informace, nicméně pro hlubší pochopení struktury monolitu je užitečná kombinace více metod. Stejně tak důležité je znát podstatu jednotlivých metod a jejich možnosti a nevýhody. Například, jak bylo zmíněno výše, pomocí rtuťové porozimetre lze přímo získat údaje o velikosti a celkovém objemu

pórů. S použitím různých aproximací tvaru pórů (válcovité, kuželovité, lahvicovité atd.) lze spočítat různé hodnoty specifického povrchu vzorku. Z porovnání těchto hodnot s výsledky přímého měření specifického povrchu metodou BET lze odvodit převládající tvar pórů ve vzorku.

Přestože by se studium morfologie bez výše uvedených metod v žádném případě neobešlo, je nutné brát v úvahu jejich omezení. Většinou pracují za velmi nízkých tlaků a vzorek pro měření musí být v suchém stavu, když se zpravidla uvádí, že botnání vysoce zesíťovaných polymerních stacionárních fází je maximálně v řádu procent a jeho vliv se velmi často zanedbává, rozdíl mezi suchým vzorkem (při charakterizaci morfologie) a vzorkem zbotnalým mobilní fází (při chromatografickém procesu) nemusí být zanedbatelný. Jednoduché zjištění objemu pórů monolitu při chromatografii z hodnoty mrtvého chromatografického času, nebo z hmotnosti smočeného a nesmočeného vzorku může být důležitým doplňujícím údajem.

3.2. Faktory ovlivňující morfologii monolitických kolon

Jak již bylo zmíněno v úvodu, proces radikálové polymerizace je komplexní děj, během kterého má na strukturu konečného monolitu vliv řada faktorů. Jednak je to složení polymerizační směsi – chemická struktura a množství síťovadla a monomeru (složek následně tvořících hmotu monolitu), jednak množství a chemická struktura porogenní směsi, která ovlivňuje chování jednotlivých fází během polymerizace, vyplňuje póry a po polymerizaci je vymyta. Struktura monolitu je rovněž ovlivněna podmínkami polymerizace, především způsobem iniciace, druhem a množstvím iniciátoru a teplotou polymerizace.

3.2.1. Podmínky polymerizace

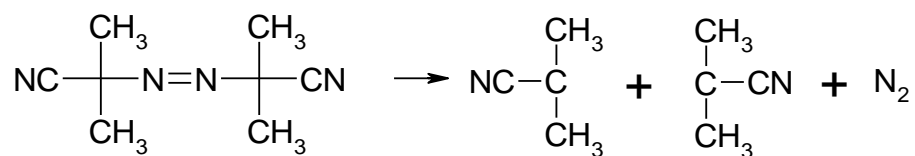
Polymerní monolitické stacionární fáze se připravují nejčastěji radikálovou polymerizací. Polymerizační směs obsahuje vzájemně rozpuštěné molekuly monomeru, síťovadla, iniciátoru a zpravidla dvousložkové porogenní směsi. Rozpadem iniciátoru dochází ke vzniku radikálů s následnou iniciací polymerizace.

Řetězovou reakcí molekul monomeru respektive síťovala se v aktivních centrech polymerizace prodlužují vznikající polymerní řetězce. Rostoucí makromolekuly se stávají méně rozpustné v porogenní složce a jsou solvatovány především nezreagovanými molekulami monomeru a síťovadla. Lokální koncentrace monomeru a síťovadla je v okolí rostoucích polymerních částic vyšší než v okolní polymerizační směsi a polymerizace probíhá přednostně na povrchu těchto částic (globulí). V určité fázi dochází k propojení globulí stále pokračující řetězovou reakcí. Vzniká vzájemně propojená globulární struktura monolitu s volnými prostory zaplněnými porogenní složkou.

Vedle molárních množství a fyzikálně-chemických vlastností monomeru, síťovadla a porogenní směsi má na výslednou strukturu polymeru vliv především množství radikálů iniciujících polymerizaci. Větší koncentrace radikálů v polymerizační směsi dává vzniknout většímu množství aktivních center a následně vznikajících polymerních globulí, na které se váží další monomerní jednotky z okolí. Více polymerních globulí menších rozměrů je doprovázeno menší velikostí pórů mezi těmito globulemi.

Iniciace radikálové polymerizace probíhá ve dvou stupních – rozpadem iniciátoru a adicí první monomerní molekuly na vzniklý radikál. Obecně má na koncentraci radikálů vliv několik parametrů – molární množství iniciátoru v polymerizační směsi, množství radikálů vznikajících rozpadem iniciátoru, rychlost rozpadu iniciátoru a stabilita radikálů. Při přípravě monolitických stacionárních fází pro chromatografii by tyto faktory měly být brány v úvahu, nicméně pro cílené ovlivňování morfologie vznikajících monolitických kolon nejsou příliš důležité.

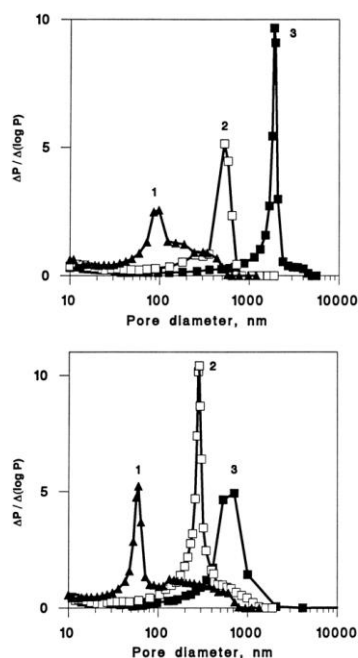
Vedle poměrně málo běžné iniciace polymerizace gama zářením [10] a iniciace chemickou reakcí za laboratorní teploty [11] jsou používány iniciátory rozpadající se vlivem UV záření a především vlivem zvýšené teploty. Vůbec nejpoužívanějším iniciátorem při přípravě monolitických stacionárních fází je azobisisobutyronitril (AIBN), rozpadající se na dva radikály při teplotách nad 50 °C. V polymerizační směsi bývá zpravidla zastoupen v koncentraci 0,6 hm. % (1 hm. % v monomerní složce).



Obr. 7. Iniclace radikálů pomocí azobisisobutyronitrilu.

Při vyšších teplotách resp. intenzitách UV záření roste rychlost rozpadu iniciátoru a vzniku radikálů iniciujících polymerizaci. Vzniká tak více polymerizačních center a následně polymerních globulí, na které se váží další volné monomery z okolí. Obdobně jako v případě vyšší koncentrace iniciátoru, větší počet polymerních globulí znamená jejich menší rozměry a také menší velikosti pórů. S rostoucí teplotou polymerizace se tedy zmenšuje velikost pórů [12]. Tento efekt je patrný z obr. 8, na kterém jsou zobrazeny distribuční křivky velikosti pórů, naměřené u polymerů připravených při různých teplotách. Maximum distribuční křivky (znázorňující nejfrekventovanější velikost pórů) se s klesající teplotou polymerizace posouvá na ose x k vyšším hodnotám.

Teplota polymerizace hraje velmi důležitou roli a ovlivňuje nejen množství vznikajících radikálů ale také separaci fází během polymerizace [3]. Například u glycidylmethakrylátových monolitických fází síťovaných ethylendimethakrylátem s porogení směsí tvořenou cyklohexanolem a dodekanolem je při nižších teplotách polymerizace zcela potlačen vliv změny složení porogenu [13].



Obr. 8. Distribuční křivky velikostí pórů naměřených u monolitických kolon připravených při různých teplotách. a) glycidylmethakrylát 24%, etylendimethakrylát 16%, cyklohexanol 54%, dodekanol 6%, teplota 80 (1), 70 (2), a 55 °C (3); b) styren 20%, divinylbenzen 20%, dodekanol 40%, toluen 20%, teplota 80 (1), 70 (2), a 60 °C (3) [13].

3.2.2. Porogenní složka polymerizační směsi

Porogenní složka je zpravidla tvořena směsí rozpouštědel. Je to nejčastěji používaný nástroj pro řízení struktury monolitických kolon, bez toho, aniž by se zasahovalo do jejich chemických vlastností. V průběhu radikálové polymerizace dochází k separaci fází. Polymerní fáze se separuje od porogenní složky jednak vlivem omezené rozpustnosti vznikajícího polymeru v porogenu a jednak vlivem řetězové reakce a síťování. Vznikající polymerní částice, jejich množství a velikost jsou základem pro konečnou makroporézní strukturu.

Při přípravě monolitických kolon se nejčastěji používá dvousložkový porogenní systém tvořený kombinací dvou látek s rozdílnou polaritou - srážedla a rozpouštědla. Vhodným poměrem těchto dvou složek lze ovlivnit moment separace fází a tím výslednou strukturu polymeru. Volbou porogenu s lepšími rozpouštěcími vlastnostmi dochází k separaci fází později, což má za následek vznik pórů menších rozměrů

[13 - 15]. Naopak volbou porogenní směsi s horšími rozpouštěcími vlastnostmi pro vznikající polymer dochází k separaci fází dříve. Volné molekuly monomeru a síťovadla jsou pro vznikající polymerní globule lepším rozpouštědlem než okolní molekuly porogenu, solvatují je, a k polymerizaci dochází přednostně na povrchu rostoucích globulí. Po jejich vzájemném propojení vzniká globulární struktura s póry větších rozměrů. Velikost polymerních globulí a pórů úzce souvisí se specifickým povrchem monolitu – menší globule a póry mají za následek vyšší specifický povrch. Z porogenní směsi vykazující dobré rozpouštěcí vlastnosti pro monomer a síťovadlo tedy vzniká monolit s vyšším specifickým povrchem a naopak.

Jelikož jsou monolitické stacionární fáze připravovány z mnoha různých monomerů a síťovadel s velmi odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, nelze předem přesně předpovědět chování polymerizační směsi o konkrétním složení, takže je nutné vycházet z experimentálních údajů. Například při přípravě monolitických stacionárních fází z glycidylmethakrylátu s porogenní směsí tvořenou dodekanolem a cyklohexanolem má nepatrné zvýšení koncentrace méně polárního dodekanolu za následek strmý růst velikosti pórů [16]. Naopak při přípravě monolitů na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu se stejnou porogenní složkou je tento nárůst podstatně méně patrný [17] a při požadavku pórů větších rozměrů je nutné použít jiný porogenní systém. Chování porogenní směsi tvořené dodekanolem a cyklohexanolem bylo komplexně sledováno při kopolymerizaci ethyldimethakrylátu s devíti různými monomery [18]. Mezi další dvojice organických rozpouštědel používaných jako porogenní směsi při přípravě monolitických kolon patří např. toluen s propanolem [19], tetrahydrofuranem [20] nebo isooktanem [21], cyklohexanol a dimethylacetamid [22], methanol a diethyl éter [23] nebo acetonitril a chloroform [24]. Příkladem tříložkové porogenní směsi je např. cyklohexanol, dodekanol a hexan [23], nebo polární porogenní směsi tvořené propanolem, butandiolem a vodou [25, 26], cyklohexanolem, ethylenglykolem a vodou [27] nebo ethanolem, dichlormethanem a fosfátovým pufrem [28].

3.2.3. Monomer, síťovadlo

Spolu s výše uvedenými způsoby ovlivňování struktury monolitů má na její utváření vliv i složení a množství monomeru a síťovadla, tedy složek, které tvoří

hmotu výsledného monolitu. Rigidní monolitické stacionární fáze připravované radikálovou polymerizací jsou relativně hustě zesíťované polymery s velmi nízkou bobtnavostí (na rozdíl od např. akrylamidových monolitických kolon). Množství a druh síťovadla hraje významnou roli v jejich mechanické odolnosti, nedostatečné množství síťovadla v polymerizační směsi způsobuje ztrátu mechanické odolnosti monolitu a jeho destrukci vlivem tlakového spádu během chromatografického procesu. Dále nízký stupeň zesíťování může způsobit vysokou bobtnavost polymeru a velmi nízkou permeabilitu pro mobilní fázi. Množství síťovadla v jednotkách hmotnostních procent již způsobuje vznik gelovitého polymeru prakticky bez komunikujících pórů umožňujících průtok mobilní fáze. Naopak je technicky možné syntetizovat monolitické stacionární fáze ze samotného síťovadla [15, 29].

Množství síťovadla v polymerizační směsi ovlivňuje separaci fází a tvorbu polymerních globulí, z nichž se dále formuje typická globulární struktura. Při vyšší koncentraci síťovadla dochází k dřívějšímu formování vysoce zesíťovaných globulí a k jejich pozdějšímu vzájemnému propojení. To má za následek menší velikost pórů a také větší specifický povrch monolitu. Monomer přináší do monolitu specifické funkční skupiny účastnící se separačního procesu, na morfologii monolitu má vliv především svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, čímž ovlivňuje separaci fází během polymerizace [18].

Při polymerizaci monolitických kolon (na rozdíl od např. suspenzní polymerizace), je možné kombinovat monomery a síťovadla s relativně rozdílnými polaritami [14], příklady složení polymerizačních směsí byly popsány v řadě souhrnných publikací [30-34]. Zdaleka nejpoužívanějším síťovadlem při přípravě monolitických kolon je ethyldimethakrylát, často kopolymerizující např. s butylmethakrylátem, glycidylmethakrylátem nebo hydroxyethylmethakrylátem [35-38]. Dalšími alternativními síťovadly jsou diethylenglykoldimethakrylát a triethylenglykoldimethakrylát [39]. Při přípravě vtištěných polymerů se někdy používá trimethylolpropantrimethakrylát [40, 41], a dále 1,4-butandioldimethakrylát [42] a glyceroldimethakrylát [42, 43]. V některých pracích byly použity také směsi několika síťovadel [41, 44].

Jako monomer při přípravě hydrofobních monolitických kolon byl polymerizován např. butylmethakrylát [14, 26, 36, 45 - 46]. Vliv butyl-, lauryl-, stearyl- a oktadecylmethakrylátu na strukturu monolitů byl sledován u monolitů zesíťovaných ethyldimethakrylátem, připravených se směsí dodekanolu a

cyklohexanolu jako porogenu. Separační vlastnosti takto připravených kolon byly testovány na dělení směsi proteinů [48]. Obdobným způsobem byly připraveny také monolitické kolony s oktylmethakrylátem [49] hexylmethakrylátem [50] a laurylmethakrylátem [51]. Se síťovadlem divinylbenzenem byly připraveny monolitické kolony na bázi polystyrenu [52 - 54]. Účinnost butylakrylátových monolitických kolon při separaci proteinů v CEC dosahovala 33000 teoretických pater/kolonu (18,5 cm) [55].

Pro přípravu monolitických kolon určených pro další modifikaci povrchu bývá často používán glycidylmethakrylát, obsahující reaktivní epoxy- skupinu schopnou interagovat s řadou funkčních skupin [56, 57]. Na polymerizaci glycidylmethakrylátu s ethylendimethakrylátem byla detailně sledována kinetika procesu přípravy monolitických kolon [58] a jeho vliv na strukturu monolitu [18].

Pro přípravu chromatografických a elektrochromatografických monolitických kolon hydrofilního charakteru jsou používány například monomery na bázi akrylamidů [59]. Byly studovány různé koncentrace monomerů v polymerizační směsi a jejich vliv na strukturu monolitů a jejich hydrofobicitu, navzájem byly porovnány monolity připravené z methakrylamidu, dimethakrylamidu, butylakrylátu a hexylakrylátu [59]. Obdobná studie byla navíc rozšířena na dimethylakrylamid, hydroxyethylmethakrylát, 2-hydroxyethylakrylát, hydroxymethylakrylamid aj. [60]. Jako porogenní složka při polymerizaci akrylamidů byla kromě organických rozpouštědel použita také voda [59, 61]. Separační vlastnosti akrylamidových monolitických kolon byly sledovány jak v RP-HPLC, tak v chromatografii s hydrofilními interakcemi (HILIC) [62, 63].

3.3. Vliv morfologie monolitických kolon na chromatografický děj

Pohyb molekul separovaných látek v heterogenním systému chromatografické kolony je velice komplikovaný děj, ovlivněný velkým množstvím veličin. Pomocí matematického aparátu lze do určité míry simulovat chování analytu unášeného mobilní fází v porézních materiálech a zohlednit vliv konvekce a difúze, velikosti a tvaru pórů, jejich orientaci, přístupnost, velikost separovaných molekul a aktivních míst na stacionární fází atd. [64 - 66]. Řada studií byla také zaměřena na teoretickém [67] i experimentálním [52] porovnání chromatografického procesu

uvnitř náplňových kolon s různou strukturou částic (sférické částice neporézní, porézní v celém objemu či s porézním obalem) a monolitických kolon.

Výhodou monolitických kolon, vyplývající ze struktury vzájemně propojených makropórů, je efektivnější využití prostoru kolony stacionární fází [68]. Jestliže u kolon plněných sférickými částicemi je minimální teoretická porozita 27 % celkového objemu kolony, v praxi to bývá v nejlepších případech mezi 35 – 45 %. Pomocí globulární struktury monolitu s komunikujícími póry lze připravit permeabilní stacionární fáze s výrazně nižší porozitou [69].

Na rozdíl od náplňových stacionárních fází, kde je průtok mobilní fáze umožněn mezičásticovými prostory, u monolitických kolon je průtok zajištěn komunikujícími póry. U pórů o velikosti 500 - 1000 nm převažuje transport hmoty konvekcí mobilní fáze způsobená rozdílem tlaků na začátku a na konci kolony [34, 70]. Tyto póry však nemají významný vliv na specifický povrch monolitické stacionární fáze a na množství aktivních míst účastnících se separačního děje. Z tohoto důvodu jsou žádoucí malé póry o velikostech v řádu desítek nanometrů, poskytující dostatečný povrch pro interakci analytu s aktivními místy. Tyto póry jsou vyplněny stagnující mobilní fází a převládá v nich přenos hmoty difúzí.

Obdobně jako je u náplňových kolon použitím částic menších rozměrů dosahováno vyšší účinnosti, také roste účinnost monolitických kolon s menšími polymerními globulemi a menšími okolními póry kolony. Menší globule a póry mají za následek zvýšení specifického povrchu stacionární fáze, navíc se snižuje vliv vířivé difúze a snižuje se odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi [48]. Snižující se velikost globulí a pórů má však negativní vliv na permeabilitu kolon, která je často při jejich použití v chromatografickém procesu limitující. Z hydrodynamického hlediska je tedy ideální tzv. bimodální distribuce velikosti pórů, kdy je požadovaná průchodnost kolony zajištěna póry o velikosti přibližně 800 nm a dostatečná kapacita stacionární fáze menšími póry v oblasti desítek nanometrů [34].

Nezanedbatelný vliv na morfologii monolitických stacionárních fází může mít proces botnání mobilní fází. Studie založené na mikroskopii atomárních sil odhalily zajímavé trendy ve změnách velikostí polymerních globulí a okolních pórů [4]. Expozice monolitu některým rozpouštědlům může vést ke značnému zvětšení polymerních globulí a následně ke zmenšení objemu makropórů. Úbytek makropórů je vysvětlován stejnoměrným zvětšením globulí do všech směrů na úkor okolního prostoru. Současně je však zvětšení globulí doprovázeno zvětšením mikro- a

mesopórů v nich obsažených. Botnání tedy může vést ke změně distribuce velikostí pórů.

3.4. Aplikace monolitických kolon

Vzhledem ke svým výhodám oproti klasickým náplňovým kolonám a kvůli širokému spektru rozdílných chemických vlastností se monolitické kolony začínají šířeji používat v separacích mnoha rozdílných analytů. Souhrnný článek [71] je zaměřený na monolitické kolony pro separace malých organických molekul. Příkladem monolitických kolon určených pro separace anorganických látek [72] jsou kopolymery glycidylmethakrylátu a ethyldimethakrylátu určené pro separace kationtů [73], nebo funkcionalizované monolity na bázi butylmethakrylátu pro separace anorganických aniontů [74]. Většina aplikací monolitických stacionárních fází je určena pro separace vysokomolekulárních látek, v porovnání s klasickými komerčními náplňovými kolonami jsou schopné rychleji separovat peptidy a bílkoviny, navíc s nižšími limity detekce a s vyšším rozlišením [75]. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií lze během několikaminutové analýzy identifikovat stovky peptidů [76, 77] a lze dosáhnout limitů detekce v řádu desítek fmol [78]. Aplikace monolitických kolon pro separace biologických vzorků byly shrnuty v několika souhrnných člancích [79 - 81].

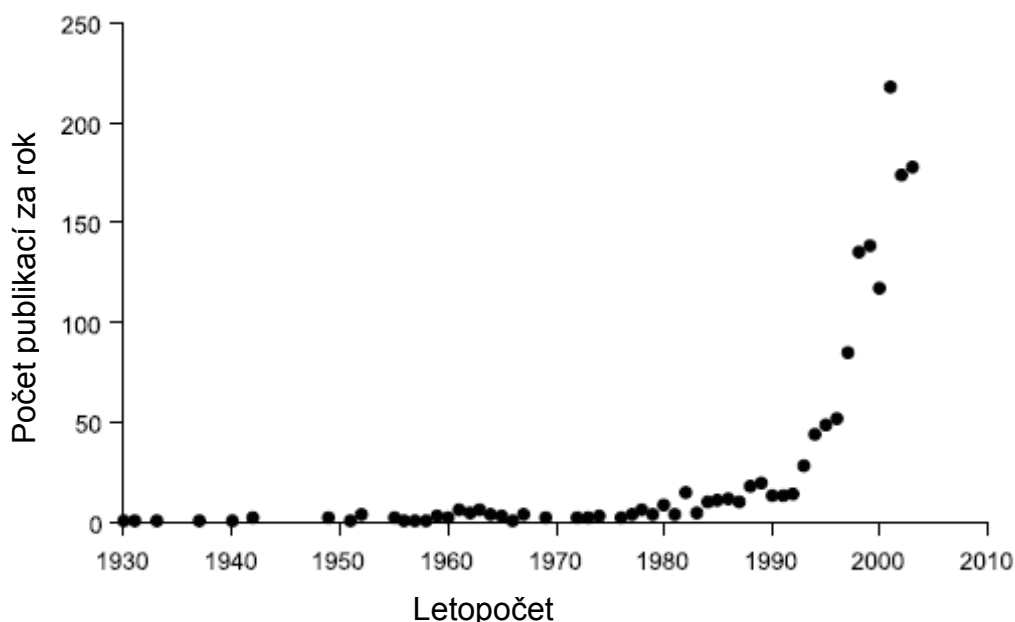
3.5. Vtištěné polymery v analytických separačních metodách

Vtištěné polymery jsou stacionární fáze fungující na principu tzv. molekulárního imprintingu. Vznikají přidáním templátu, tzn. molekul se stejnou strukturou jako mají molekuly následně analyzované látky, do polymerizační směsi. Molekula templátu je solvatována molekulami funkčního monomeru, tento komplex je radikálově polymerizován s velkým přebytkem síťovadla a okolo templátu se vytváří rigidní porézní struktura. Následným vymytím templátu vzniká kavita, tvarem a rozmístěním funkčních skupin odpovídající struktuře imprintované molekuly. Proces komplexace molekul templátu je významně ovlivněn všemi složkami polymerizační směsi. Porogenní složka nemá v přípravě vtištěných

polymerů vliv pouze na tvorbu struktury monolitu, ale výrazně ovlivňuje i účinnost imprintingu.

Princip vtištěných polymerů, tzv. “molecularly imprinted polymers“ (MIP), byl poprvé popsán v separačních metodách již v sedmdesátých letech. Publikace Wulffa a Sharhana [82, 83] se zmiňují o vysoké selektivitě takto připravených stacionárních fází. Další přednosti této metody byly v osmdesátých letech popsány kolektivem Mosbacha [84, 85] v publikacích zaměřených na separace optických isomerů aminokyselin a jejich derivátů.

Od počátku vývoje vtištěných polymerů se jejich využití rozšířilo jak v počtu různých imprintovaných látek, tak v šíři různých použití. Počet vědeckých publikací týkajících se „obtiskávání“ molekul rok od roku roste, jak je patrné z obr. 9, převzatého z rozsáhlého souhrnného článku mapujícího více než 1450 vědeckých publikací [86]. Současné požadavky analytické chemie po vysoce selektivních materiálech, schopných separovat chemické individuum ze složitých směsí nebo maticí, by mohly splnit právě vtištěné polymery.



Obr. 9. Graf znázorňující roční počet publikací týkajících se „obtisknutí“ molekul do pevných látek, převzatý ze souhrnné publikace [86].

Molekulární imprinting se dá rozdělit na dvě základní skupiny podle druhu interakcí templát-monomer, resp. templát-polymer [87 - 89]. V prvním případě dochází ke vzniku kovalentních vazeb mezi imprintovanou látkou a monomerem, v druhém případě templát s monomerem interaguje nekovalentně, tzn. pomocí vodíkových můstků, iontových interakcí, hydrofobních interakcí aj.

3.5.1. Kovalentní imprinting

V případě imprintingu na základě kovalentních vazeb (poprvé popsáno začátkem 80. let [90 - 92]) je „obtisknutí“ templátu do polymeru v porovnání s nekovalentními imprinty podstatně účinnější. Vysoká energie kovalentních vazeb zajišťuje těsnější obklopení templátu monomerem a přesnější rozmístění komplementárních funkčních skupin okolo imprintované molekuly. Během fixace molekul monomeru v průběhu polymerizace dojde k vytvoření přesně orientovaných vazeb, tvar následně vzniklé kavity a rozmístění funkčních skupin na jejím povrchu věrně odpovídají struktuře molekuly templátu. Je žádoucí, aby kovalentní vazby byly hydrolyticky štěpitelné a aby byl velký podíl imprintovaných molekul zpětně vymyt a vytvořil tak dostatečné množství specifických kavit, resp. dostatečnou kapacitu polymeru.

Použití takových polymerů jako stacionárních fází v analytické chemii je však značně limitováno nutnou přítomností vhodných funkčních skupin schopných rychlé reverzibilní interakce, zajišťující dostatečnou účinnost během separačního děje. Jako konkrétní příklad kovalentního imprintingu lze uvést např. imprintování derivátů monosacharidů [93, 94]. V dalších pracích byly použity kovalentně vtištěné polymery na principu esterů [95], ketalů [96, 97] a Schiffových bází [98].

Dalším možným způsobem kovalentního imprintingu je použití metalokomplexů, kdy dochází ke tvorbě koordinačních vazeb mezi molekulami templátu s kationty některých kovů, např. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , aj. [87, 89]. Úspěšné bylo jejich použití především v podobě katalyzátorů při syntézách v organické chemii (např. enantiosektivní hydrogenace, hydrolýza, alkylace atd.) [88, 89, 99, 100].

3.5.2. Nevalentní imprinting

Pro použití vtištěných polymerů jako stacionárních fází v separačních metodách je patrně vhodnější princip nevalentního imprintingu, poprvé popsany Arshadym a Mosbachem [101]. Templát s monomerem interaguje pomocí vodíkových můstků, iontových, dipólových či hydrofobních interakcí nebo van der Waalsovských sil aj. Jednotlivé interakce mezi konkrétními funkčními skupinami monomerů a templátů byly shrnuty a popsány v několika přehledných člácích [87, 102, 103].

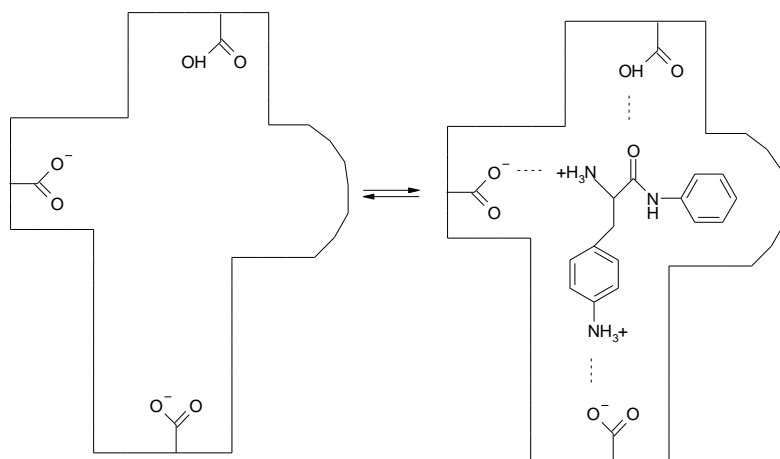
Ve srovnání s kovalentními interakcemi jsou při nevalentním imprintingu komplexy templát-monomer relativně méně přesně definované. Při separačním procesu však dochází k velice rychlému ustavení rovnovážného stavu, což zpravidla umožňuje dosažení vyšších účinností separace oproti imprintingu kovalentními vazbami. V případě nevalentních interakcí může navzájem reagovat celá řada funkčních skupin, použití není omezeno jen na úzkou řadu několika párů funkčních skupin schopných reverzibilní interakce, tak jako u kovalentních interakcí. Také vymývání templátu z polymeru probíhá podstatně snadněji.

Vzhledem k výrazně nižší energii vazby templát-monomer však dochází ke kompetici v solvataci templátu monomerem či porogenem. Při solvataci molekulami porogenu pochopitelně nemůže dojít k tvorbě specifických vazeb, k zakomponování templátu do polymeru a ke tvorbě specifické kavity. Rovnovážný stav je ovlivněn řadou faktorů, především polaritou jednotlivých složek polymerizační směsi [104 - 106] a její teplotou [107 - 109]. Z tohoto důvodu je také nutný vysoký poměr interagujících funkčních skupin monomer/templát [108]. Termodynamika těchto stavů byla po teoretické stránce detailně zpracována několika autory [110 - 114].

3.5.3. Templáty

Účinnost nevalentního imprintingu úzce souvisí s množstvím, druhem a rozmístěním jednotlivých funkčních skupin na molekule templátu. Byla vypracována řada studií, pracujících se strukturně podobnými deriváty obsahujícími různé funkční skupiny [93, 115 - 119]. Byly připraveny polymery s různým množstvím a druhem jednotlivých složek polymerizační směsi. Například pro aminokyseliny a jejich

deriváty byla nejčastěji použita kyselina methakrylová či vinylpyridin jako monomer. Acidické funkční skupiny monomerů reagovaly iontově s amino- a amidoskupinami aminokyselin a pomocí vodíkových můstků s polárními skupinami, jakými jsou např. karboxyly, estery karboxylů či karbamáty (obr. 10.). Separční vlastnosti stacionárních fází byly nejčastěji sledovány na dělení optických izomerů imprintovaných látek. Např. u L a D forem derivátů fenylalaninu bylo nejvyšší separace ($\alpha = 8,38$) dosaženo s p-aminofenylalaninanilidem, jehož molekula obsahuje tři funkční skupiny schopné interakce. U ostatních derivátů schopných pouze dvou interakcí bylo dosaženo maximálního separačního faktoru $\alpha = 2,22$ [120].



Obr. 10. Schematické zobrazení tří interakcí imprintovaného p-aminofenylalaninanilidu s funkčními skupinami okolního polymeru [120].

Funkce vtištěných polymerů není dána jen rozmístěním interagujících částí kavity s imprintovanou molekulou, ale také tvarem částí, které nevytvářejí přímé chemické interakce [93, 98]. Na separacích různých ketalů [121] bylo ukázáno, že molekuly o stejném prostorovém uspořádání interagujících funkčních skupin, ale s jiným tvarem neinteragujících částí, nebyly v imprintovaném polymeru zadržovány. Na imprinting mohou mít výrazný vliv také intramolekulární interakce templátu. Za stejných podmínek byly syntetizovány polymery s imprintovanými hydroxyderiváty kyseliny benzoové [122], přičemž bylo zjištěno, že intramolekulární vodíkové můstky mezi karboxylovou a amidovou skupinou mají vliv na stabilitu komplexu monomer-templát a následně na selektivitu výsledných polymerů.

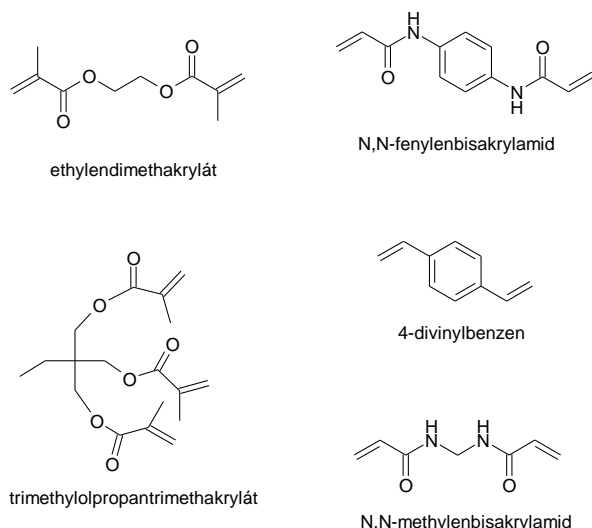
3.5.4. Síťovadla

Vysoký stupeň zesíťování zajišťuje požadované mechanické vlastnosti vtištěných polymerů jak z makroskopického, tak z mikroskopického hlediska. Síťovadlo zpravidla tvoří 70 – 90 hm. % monomerní složky, pro minimální procentuální zastoupení síťovadla v polymerizační směsi byla stanovena hodnota 80 hm. % [105, 123] a při 70 % síťovadla polymer nevykazoval téměř žádnou separační účinnost. Molární poměr síťovadla ku monomeru je dán množstvím jeho funkčních skupin interagujících s monomerem, resp. s počtem polymerních řetězců, které molekula síťovadla spojuje. Zpravidla se pohybuje v molárním poměru 1/4 – 1/5 u bifunkčních síťovadel a 1/1 u trifunkčních síťovadel. Daný poměr je však nutné optimalizovat pro konkrétní polymerizační směs, vzhledem ke struktuře molekuly templátu.

Struktura síťovadla (obr. 11) výrazně ovlivňuje mechanické vlastnosti polymeru v mikroskopickém měřítku a následně interakce molekul analytu s polymerem. Je nutné nalézt vhodný kompromis mezi rigiditou polymeru, zajišťující stabilizaci tvaru kavit a funkčních skupin na jejich povrchu, a na druhé straně dostatečnou flexibilitou polymerních řetězců, umožňujících přístup molekul analytu do těchto kavit.

Např. divinylbenzen patrně velmi výrazně zvyšuje rigiditu polymeru, což má za následek horší přístupnost kavit pro separované molekuly. Svědčí o tom menší množství templátu vymytého po polymerizaci [124]. Naopak polymer síťovaný tetramethyldimethakrylátem pravděpodobně není dostatečně stabilní, kavity jsou příliš flexibilní na to, aby si udržely specifický tvar a rozmístění funkčních skupin, a výrazně roste množství nespecifických interakcí. Z tohoto hlediska se zdá být vhodným kompromisním řešením využití ethyldimethakrylátu, o čemž svědčí i množství prací, ve kterých byl použit.

V některých publikacích je poukazováno na vliv funkčních skupin molekul síťovadla, jež se mohou účastnit interakce s templátem a tím zvýšit účinnost takových polymerů. Při imprintování derivátů aminokyselin s použitím síťovadla pentaerythritoltriakrylátu [123] bylo pozorováno zvýšení selektivity a kapacity polymeru. Pravděpodobným vysvětlením je vznik vodíkových můstků mezi imprintovanou molekulou a volnou hydroxylovou skupinou síťovadla.

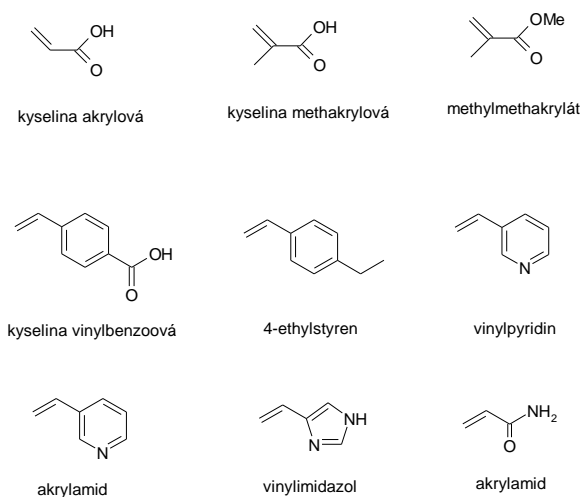


Obr. 11. Struktury některých nejčastěji používaných síťovadel.

3.5.5. Funkční monomery

Molekuly funkčního monomeru zajišťují interakce mezi templátem a následně vzniklým polymerem. Část molekuly obsahující vhodnou funkční skupinu interaguje s komplementární skupinou na molekule templátu a druhá část molekuly kopolymerizuje se síťovadlem a vytváří polymer. Druh funkčního monomeru je nutné volit dle druhu funkčních skupin na molekule templátu, jeho ideální množství v polymerizační směsi závisí na počtu skupin na molekule templátu a na druhu síťovadla.

Nejčastěji bývá používána kyselina methakrylová a její deriváty. Pro některé polymerizační směsi se osvědčila kyselina trifluoromethakrylová vzhledem ke své vyšší polaritě [125, 126], v jiných případech byly vhodnější monomery s funkčními skupinami obsahující dusík, iontově interagující s templátem [105, 117, 127]. Struktury nejčastěji používaných funkčních monomerů jsou zobrazeny na obr. 12.



Obr. 12. Struktury některých nejčastěji používaných funkčních monomerů.

3.5.6. Porogenní směsi

Porogenní složka polymerizační směsi plní několik funkcí, ze kterých vyplývají značně protichůdné požadavky na její fyzikálně-chemické vlastnosti, resp. na její složení. Vedle mísitelnosti a rozpustnosti jednotlivých složek polymerizační směsi musí zajistit požadovanou porozitu výsledného polymeru. Těmto požadavkům zpravidla vyhovují relativně polární rozpouštědla. Vyšší selektivita a účinnost vtištěných polymerů však byla dosažena s méně polárními porogeny (toluen, chloroform, dichlormethan aj.). Je to způsobeno tím, že pro vznik kavit o specifickém tvaru a rozmístění funkčních skupin hrají zásadní roli interakce mezi molekulami jednotlivých složek polymerizační směsi před vlastní polymerizací. Polární porogen solvatuje molekuly templátu na úkor solvatace molekulami monomeru. Templát není těsně obklopen molekulami monomeru a při stabilizaci molekul během následné polymerizace nemůže dojít ke vzniku specifických kavit. Tento jev má na funkci vtištěných polymerů zcela zásadní vliv. Sellergren a kol. sledoval souvislosti mezi druhem porogenu, morfologií polymeru a separačními vlastnostmi L a D forem derivátů aminokyselin [128]. Jak je patrné z tab. 1, nebyly nalezeny bližší souvislosti mezi porozitou, specifickým povrchem a separačními vlastnostmi, zato se potvrdil vliv polaritý porogenu na proces imprintingu a následně na separační vlastnosti polymeru.

Tab. 1. Parametry vtištěných polymerů, připravených z ethylendimethakrylátu (20 mmol), kyseliny methakrylové (4 mmol), L-fenylalaninanilidu (1 mmol) a 5,6 ml různých porogenů, určených pro separace L a D formy fenylalaninanilidu [128].

porogenní směs	porozita (ml/g)	spec. povrch (m ² /g)	separační faktor (k_L/k_D)
MeCN	0,60	256	5,8
CHCl ₃	0,01	4	4,5
C ₆ H ₆	0,43	216	6,8
CH ₂ Cl ₂	0,01	4	8,2
DMF	0,17	127	2,0
THF	0,24	194	4,1
Propan-2-OL	0,86	49	3,5
HOAc	0,52	267	1,9
MeCN	0,89	317	3,1
THF	0,73	382	1,6
MeCN	0,65	266	3,7

3.5.7. Podmínky polymerizace

Stejně jako u ostatních monolitických kolon určených pro chromatografii, se pro tepelnou iniciaci polymerizace nejčastěji používá iniciátor azobisisobutyronitril. Studie zaměřené na průběh polymerizace [129, 130] prokázaly, že při 60 °C byla termicky iniciovaná polymerizace ukončena již po dvou hodinách [105]. Výsledky separací provedených na těchto polymerech však byly málo reprodukovatelné. Vyšší teplota polymerizace pravděpodobně negativně ovlivnila stabilitu komplexu templát-monomer v polymerizační směsi a polymery následně vykazují horší separační vlastnosti. Lepších výsledků bylo dosaženo při iniciační teplotě 45 °C. Polymerizace byla ukončena po 10 hod a vysoce reprodukovatelných výsledků bylo dosaženo u monolitů polymerizovaných po dobu 12 hod. Další prodlužování doby polymerizace monolitů již nemělo vliv na reprodukovatelnost jejich přípravy a nebyly shledány žádné rozdíly v chování monolitů připravených termicky po dobu 12 a 18 hod.

V polymerizační směsi roste se snižující se teplotou stabilita nekovalentních interakcí v komplexu templát-monomer a tudíž je podporován vznik specifických interakcí templát-polymer během polymerizace [109, 131]. Tomuto trendu

odpovídají jak výsledky s použitím termické iniciace polymerizace při různých teplotách, tak při časově méně náročné iniciaci UV zářením [104, 109, 132, 133].

3.5.8. Aplikace vtištěných polymerů

Různé druhy imprintovaných a následně analyzovaných látek byly popsány v souhrnných člancích zaměřených na jednotlivé separační metody, např. na extrakci na pevné fázi [134 - 137], kapilární elektrochromatografii [138 - 141] a kapalinovou chromatografii [142]. Další souhrnné články byly zaměřeny např. na separaci různých optických isomerů [140, 143, 144] nebo polutantů z přírodních matric [145]. Častými templáty jsou aminokyseliny a jejich deriváty [120, 123] nebo farmaka jako např. enantiomery ibuprofenu [146] a β -blokátorů [147]. Firma Sigma-Aldrich představila pod názvem SupelMIP-SPE sérii devíti komerčních imprintovaných stacionárních fází pro extrakci různých farmak z biologických vzorků (z krevní plazmy, moči, mléka a medu).

Výše probírané metody studia morfologie polymerních materiálů a faktory, které morfologii během přípravy ovlivňují, byly součástí dvou vědeckých publikací: „*Porous hydrogels.*” kapitola do knihy „*Porous Media: Heat and Mass Transfer, Transport and Mechanics.*”, nakladatelství Nova Publishers, autoři Přádný M., Michálek J., Širc J.

a

„*Monolithic capillary columns designed for small organic molecules.*“ kapitola do knihy „*Monolithic columns in its modern applications.*“, nakladatelství ILM Publications, autoři Coufal P., Bosáková Z., Širc J., Pacáková V., Štulík K.

4. VLASTNÍ EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

4.1. Příprava a morfologická charakteristika monolitických kolon na principu vtištěných polymerů

Přestože byly publikovány stovky odborných článků týkajících se přípravy imprintovaných stacionárních fází pro analytické separační metody [86], zpravidla se jednalo o náplňové kolony plněné polymerními částicemi. Monolitické imprintované stacionární fáze pro chromatografii byly připravovány téměř výhradně v kapilárních technikách. Vzhledem k malému průměru kapilár nedochází ke vzniku mrtvých prostor vlivem objemové kontrakce během polymerizace a také je menší riziko vzniku rozdílné struktury polymeru uprostřed monolitu a na jeho okraji. Velice málo vědeckých studií bylo zaměřeno na přípravu vtištěných polymerních monolitů klasických rozměrů, navíc se jednalo o ocelové kolony umožňující výhradně termickou iniciaci polymerizace [106, 125, 126, 131].

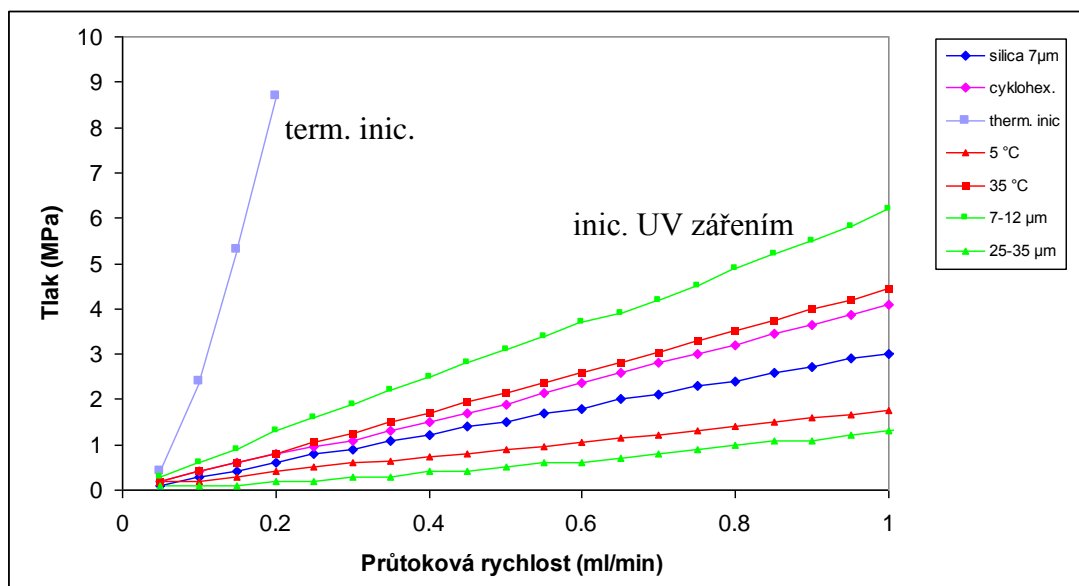
První část experimentální práce navázala na předchozí pokusy s přípravou imprintovaných monolitických kolon uvnitř skleněných trubic o vnitřním průměru 3,3 mm [148]. Skleněné stěny kolony umožňují jednak jednoduchou vizuální kontrolu kvality připravených monolitů, především ale dovolují vedle termické iniciace polymerizace použít také iniciaci UV zářením. Tento způsob iniciace je podstatně rychlejší (řádově desítky minut oproti několika hodinám termické iniciace), jeho hlavní předností je však možnost polymerizace při různých teplotách. Termická iniciace zpravidla probíhá při teplotách polymerizační směsi 45 – 70 °C kdežto nejnižší teplota při iniciaci UV zářením je omezena jen teplotou tání jednotlivých složek polymerizační směsi, případně separací jednotlivých fází. Teplotou polymerizace lze do určité míry optimalizovat morfologii polymeru a také podpořit proces molekulárního imprintingu (viz 3.4.7. Podmínky polymerizace).

Jako první byla optimalizována konstrukce skleněných trubic a jejich připojení k HPLC aparatuře tak, aby nedocházelo ke vzniku artefaktů a mrtvých prostor negativně ovlivňujících chromatografický proces. *In situ* polymerizace probíhala uvnitř samotných skleněných trubic, jejichž konce byly následně zbroušeny tak, aby monolit tvořil s čelem trubice dokonalou rovinu. Po připevnění

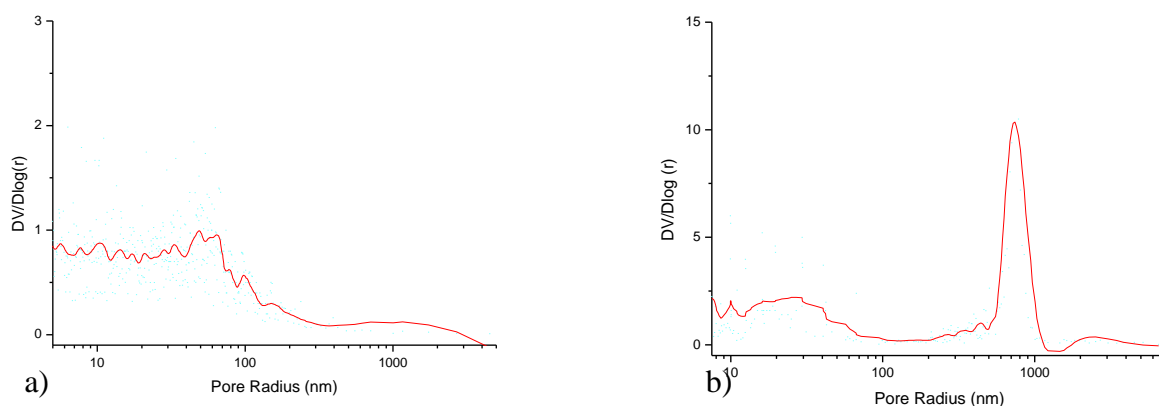
ocelových objímk a teflonových těsnění bylo možné kolony připojit k přívodním kapilárám chromatografické aparatury.

Pro přípravu monolitů byly použity polymerizační směsi o složení ethylendimethakrylát/kyselina methakrylová/tosyl-L-fenylalanin v molárním poměru 20/5/1 s dvěma porogenními směsmi o složení dodekanol/cyklohexanol 1/3 (w/w) a dodekanol/toluen 4/1 (w/w). Vedle termické iniciace polymerizace byla testována i polymerizace UV zářením při různých teplotách. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie, rtuťové porozimetrie a BET metody byla sledována morfologie připravených kolon, separační vlastnosti připravených monolitických kolon byly testovány na dělení směsi hydrofobních standardů a na separaci L a D formy tosylfenylalaninu. Byly sledovány souvislosti mezi složením polymerizační směsi a podmínkami polymerizace, morfologií připravených monolitických kolon a jejich chromatografickými vlastnostmi [149].

Ze získaných výsledků bylo zřejmé že monolitické kolony připravené z obou polymerizačních směsí termickou iniciací měly podstatně menší velikost polymerních globulí a pórů, a také výrazně nižší porozitu ve srovnání s polymery iniciovanými pomocí UV záření. Tento fakt měl za následek jejich nízkou permeabilitu, viz obr. 13. Z něj je patrné, že i krátké (30 mm) kolony, termicky iniciované, vykazovaly jednoznačně nejnižší permeabilitu ze všech testovaných kolon. Podařilo se zprůchodnit pouze kolony o délkách 30 mm, jejichž separační vlastnosti však nebyly dostatečné. Proto bylo v dalších experimentech od termicky iniciovaných monolitů ustoupeno. Kolony, u nichž byla polymerizace iniciovaná UV zářením, vykazovaly permeabilitu srovnatelnou s komerčně dostupnou kolonou plněnou 7 μm částicemi.



Obr. 13. Závislost zpětného tlaku na průtokové rychlosti. Vnitřní průměr kolon byl 3,3 mm, monolit iniciovaný termicky (-■-) byl dlouhý 30 mm, ostatní kolony 150 mm. Monolity iniciované UV zářením byly připravené z porogenní směsi dodekanol/toluen 4/1 (w/w) při teplotě 5 °C (-▲-) a 35 °C (-■-), s použitím směsi dodekanol/cyklohexanol 1/3 (w/w) nebyl pozorován vliv teploty na permeabilitu (15 °C, -◆-). Pro srovnání jsou uvedeny zpětné tlaky naměřené na kolonách plněných polymerními částicemi o velikosti 7 – 12 µm (-■-) a 25 – 35 µm (-▲-), a komerčně dostupné koloně o rozměrech 3,3 x 150 mm, naplněné sférickými částicemi o průměru 7 µm (-◆-).

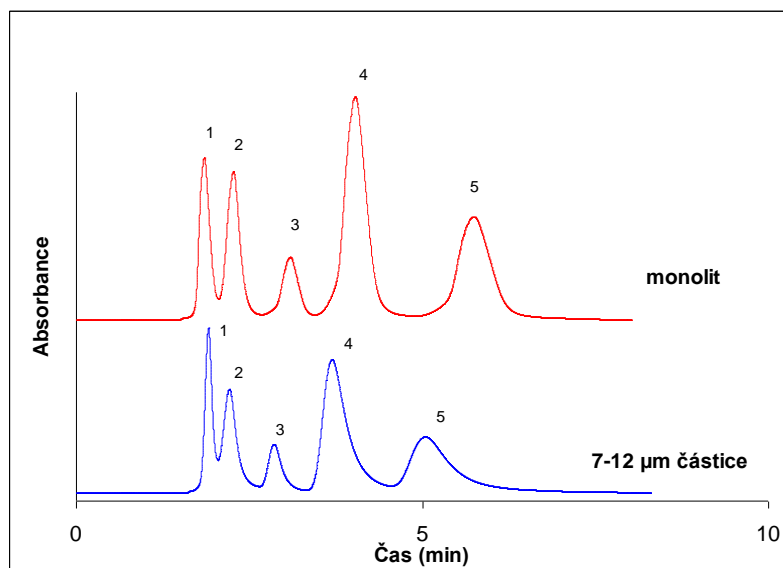


Obr. 14. Distribuční křivky velikostí pórů, a) porogenní směs dodekanol/cyklohexanol 1/3 (w/w), b) porogenní směs dodekanol/toluen 4/1 (w/w)

U polymerů připravených iniciací UV zářením měla použitá porogenní směs a teplota iniciace zřejmý vliv na jejich morfologii. Jak je patrné z obr. 14. a), velikost pórů naměřených u monolitů připravených z porogenní směsi dodekanol/cyklohexanol nabývala hodnoty přibližně 0 - 80 nm. Hodnota nejfrekventovanější velikosti pórů ležela v této oblasti, přičemž nebyla patrná její závislost na teplotě přípravy (byly testovány polymerizace při teplotách v rozmezí 5 – 35 °C). V případě porogenní směsi dodekanol/toluen vykazovaly připravené polymery bimodální porozitu – vedle maxima ležícího ve stejné oblasti se na distribuční křivce objevil ještě jeden pík v oblasti kolem 600 - 850 nm (obr. 14. b). Jeho konkrétní hodnota na ose x (hodnota nejfrekventovanější velikosti pórů) klesala s rostoucí teplotou polymerizace, což mělo zřejmý vliv na permeabilitu monolitu (obr. 13). Monolity připravené při vyšší teplotě měly tedy nižší nejfrekventovanější velikost pórů a byly méně permeabilní pro mobilní fázi.

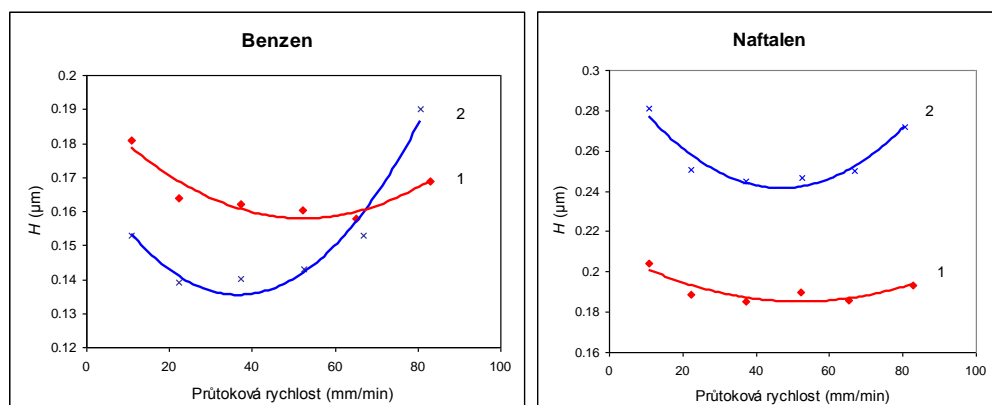
Připravené monolitické kolony byly chromatograficky testovány. Nejlepších separačních vlastností bylo dosaženo u 150 mm UV zářením iniciovaných kolon připravených se směsí dodekanol/cyklohexanol jako porogenem. Při použití směsi acetonitril/voda (65/35, v/v) jako mobilní fáze bylo dosaženo separace směsi uracilu, L-tosylfenylalaninu, benzenu, naftalenu a antracenu až na základní linii (obr. 15).

Pro porovnání separačních vlastností nově připravených monolitických kolon s náplňovými kolonami byly připraveny dvě kolony stejných rozměrů (150 x 3,3 mm), naplněné polymerní drtí (UV zářením iniciovaný polymer, porogenní směs dodekanol a cyklohexanol) o velikosti částic 7 - 12 μm a 25 - 35 μm . Příprava těchto kolon se ukázala podstatně náročnější a zdouhavější než příprava monolitů. Polymer byl nejprve vysušen, rozdrcen a přesát. Jednotlivé frakce byly dále děleny sedimentací a nakonec jimi byly mokrou cestou plněny skleněné trubice. Vzájemné porovnání permeabilit připravených náplňových a monolitických kolon je uvedeno na obr. 13, pro srovnání je uvedena propustnost komerční kolony stejných rozměrů, plněné vysoce uniformními sférickými částicemi o průměru 7 μm .



Obr. 15. Porovnání chromatogramů získaných při separaci směsi uracilu (1), L-tosylfenylalaninu (2), benzenu (3), naftalenu (4) a antracenu (5) na 150 mm monolitické koloně a koloně plněné 7-12 µm částicemi stejného polymeru, připraveného z porogenní směsi dodekanol/cyklohexanol. Mobilní fáze acetonitril/voda, průtoková rychlost 0,55 ml/min.

Separační vlastnosti kolony připravené plněním částic a vyšší zrnitosti (25 - 35 µm) byly velice špatné, chromatogramy pořízené při separaci hydrofobních standardů na koloně s částicemi o velikosti 7-12 µm byly podobné chromatogramům získaných na monolitech připravených s porogenní směsí dodekanol/cyklohexanol. Z chromatogramů je patrné že monolit poskytoval lepší separaci a podstatně symetričtější píky než kolona plněná částicemi (značná nesymetrie této kolony samozřejmě souvisela s poměrně širokou distribucí velikostí částic). Přestože u náplňové kolony počet teoretických pater na 1m kolony počítaný z retence uracilu výrazně převyšoval hodnotu zjištěnou u monolitu (přibližně 10 000 oproti 4 500), s rostoucí retencí jednotlivých látek výrazně klesal. U látek s delším retenčním časem (naftalen) již výrazně převažovala účinnost monolitických kolon, jak je patrné z Van Deemterových křivek zobrazených na obr. 16. Počet teoretických pater u později eluujících látek byl u monolitů přibližně dvojnásobný ve srovnání s náplňovou kolonou.



Obr. 16. Van Deemterovy křivky znázorňující závislost výšky teoretického patra (H) na průtokové rychlosti, počítané z retenčních časů benzenu a naftalenu. Křivky č. 1 náleží monolitické stacionární fázi, křivky č. 2 koloně plněné 7-12 μm částicemi. Polymerizace byla iniciována UV zářením, jako porogen byla použita směs dodekanol/cyklohexanol 1/3 (w/w).

Přestože separační vlastnosti monolitických kolon připravených s použitím dodekanolu a toluenu jako porogenní směsi byly poměrně špatné, pouze v jejich případě byl zaznamenán rozdíl v retenci L a D formy tosylfenylalaninu. Ačkoli kolony nebyly schopné rozdělit racemickou směs, z chromatogramů a retenčních dat byly patrné rozdíly v eluci imprintované L-formy a jejího optického izomeru. Pravděpodobně byl tento fakt způsoben použitím méně polární porogenní směsi. Solvatace molekul templátu molekulami porogenu pak byla slabší, nebránila tak nekovalentním interakcím templát - kyselina methakrylová a následnému vzniku specifických kavit.

Dále byla sledována opakovatelnost a reprodukovatelnost přípravy monolitických kolon. Byla vyrobena sada čtyř monolitů z jedné navážky polymerizační směsi (dodecanol/cyklohexanol, iniciace polymerizace UV zářením) a dále další sada čtyř kolon za stejných podmínek z druhé navážky. Opakovatelnost a reprodukovatelnost jsou uvedeny v tabulce 2 jako relativní směrodatná odchylka (RSD) vybraných chromatografických parametrů změřených pro stejnou směs analytů, jaká byla použita při předešlém testování. V případě opakovatelnosti měření (RSD počítaná z deseti po sobě jdoucích měření na jedné koloně) byla pro všechny testované chromatografické parametry hodnota RSD nižší než 6 %. Opakovatelnost

přípravy kolon, vyjádřená jako hodnota RSD parametrů naměřených na čtyřech kolonách z první sady, nepřesahovala 17 %, z druhé sady nepřesahovala 16 %. Reprodukovatelnost osmi kolon připravených ze dvou polymerizačních směsí stejného složení byla do 5 % vzhledem k retenčním časům, kolem 10 % vzhledem k asymetrickým faktorům, 15 % vzhledem k rozlišení a 17 % vzhledem k počtu teoretických pater.

Tab. 2. Opakovatelnost a reprodukovatelnost přípravy monolitických kolon vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka naměřených chromatografických parametrů.

parametr	opakovatelnost		reprodukovatelnost	
	měření	přípravy kolon		2 polym. sady
		1. sada (n=4)	2. sada (n=4)	(n=8)
t_R (min)	3.3	4.5	3.6	4.1
k	2.9	3.8	3.4	3.7
N	4.8	17.0	15.4	16.5
$R_{i/j}$	2.2	16.6	14.1	14.9
$b/a_{10\%}$	6.1	14.4	8.9	10.1

t_R - retenční čas, k – retenční faktor, N – počet teoretických pater, $R_{i/j}$ – rozlišení, $b/a_{10\%}$ - asymetrický faktor

Závěr

V první části disertační práce byly připraveny monolitické kolony uvnitř skleněných trubic o vnitřním průměru 3,3 mm z polymerizační směsi o složení ethylenedimethakrylát/kys. methakrylová/tosyl-L-fenylalanin v molárním poměru 20/5/1 s dvěma porogenními směsmi dodekanol/cyklohexanol 1/3 (w/w) a dodekanol/toluen 4/1 (w/w). Monolity připravené s použitím tepelné iniciace polymerizace byly charakteristické malou porozitou a velmi malými póry. Vzhledem k jejich nízké permeabilitě nebyly vhodné jako stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii. U monolitů připravených pomocí UV záření iniciované polymerizace byl sledován značný vliv použitého porogenu a teploty polymerizace na jejich morfologii. Při použití směsi dodekanol/toluen byla nejfrekventovanější velikost pórů a následně permeabilita pro mobilní fázi nepřímo úměrná teplotě

polymerizace. U těchto monolitů byl také zaznamenán rozdíl v retenci L- (imprintované) a D- formy tosylfenylalaninu, svědčící o vyšším zadržování imprintované L-formy. S použitím porogenní směsi dodekanol/cyklohexanol byly připraveny monolity s nejlepšími separačními vlastnostmi, tyto monolity byly schopné rozdělit testovací směs pěti organických látek až na základní linii.

V porovnání se separačními vlastnostmi kolony plněné 7-12 μm částicemi stejného polymeru byly monolitické kolony účinnější, počet teoretických pater počítaný z retencí později eluujících látek byl téměř dvojnásobný.

Po vyřešení počátečních problémů byla příprava monolitických kolon výrazně jednodušší a časově méně náročná ve srovnání s kolonami náplňovými. Výsledky ukázaly, že je možné připravit monolitické kolony o stejném chemickém složení, ale s rozdílnou morfologií, která odpovídá požadavkům kladeným na jejich použití. Volbou porogenní složky nebo dokonce jen teploty polymerizace je možné ovlivnit morfologii monolitu tak, aby byl například více permeabilní (např. pro použití pro extrakci na pevné fázi), nebo naopak optimalizovat porozitu a zvýšit specifický povrch tak, aby odpovídal požadavkům pro kapalinovou chromatografii.

Tato část disertační práce byla financována ze samostatného grantového projektu FRVŠ 908/2005/G6 „Morfologická charakteristika nově připravených monolitických kolon na bázi vtištěných polymerů“. Výsledky byly prezentovány ve článku „*Morphological and chromatographic characterization of molecularly imprinted monolithic columns.*“ který vyšel v časopise E-Polymers 117 (2007) 1-15.

4.2. Morfologická charakteristika butylmethakrylátových kolon pro kapilární chromatografii

Charakteristika butylmethakrylátových monolitických stacionárních fází navázala na předchozí studie zabývající se přípravou kapilárních kolon [150]. Data získaná elektronovou mikroskopií, rtuťovou porozimetrií a měřením specifického povrchu metodou BET odhalila souvislosti mezi složením polymerizační směsi a chromatografickými vlastnostmi připravených kolon.

Směs butylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu byla polymerizována s porogenní složkou tvořenou propanolem, butandiolem a vodou (kolony A1 - A4) nebo propanolem a butandiolem (kolony B1 - B8, Tab. 3.).

Tab. 3. Složení polymerizačních směsí použitých při přípravě butylmethakrylátových monolitických kolon.

Kolona	monomerní složka			porogenní složka			polymerizační směs	
	BMA	EDMA	AIBN	1,4-butandiol	1-propanol	voda	monomerní složka	porogenní složka
A1	59.5	39.5	1	30	60	10	40	60
A2	59.5	39.5	1	30	60	10	50	50
A3	49.5	49.5	1	30	60	10	40	60
A4	44.5	54.5	1	30	60	10	40	60
B1	44.5	54.5	1	25	75	-	40	60
B2	44.5	54.5	1	30	70	-	40	60
B3	44.5	54.5	1	35	65	-	40	60
B4	44.5	54.5	1	40	60	-	40	60
B5	44.5	54.5	1	50	50	-	40	60
B6	44.5	54.5	1	60	40	-	40	60
B7	44.5	54.5	1	70	30	-	40	60
B8	44.5	54.5	1	80	20	-	40	60

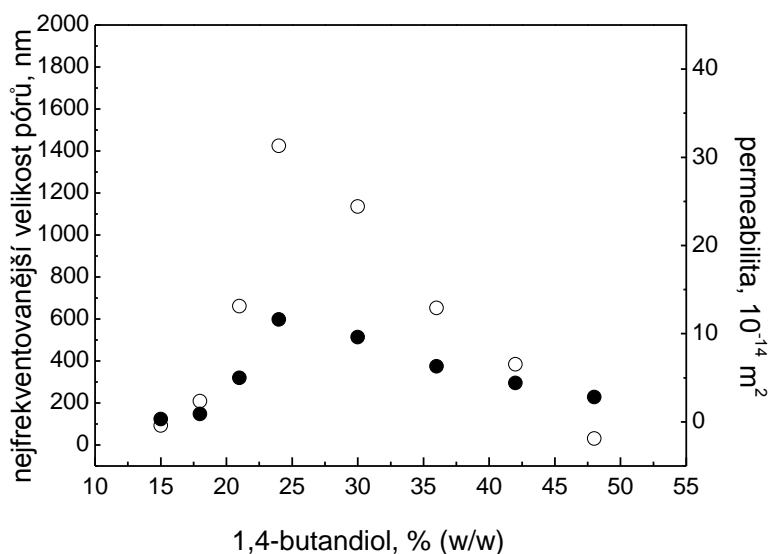
Tab. 4. Výsledky morfologické charakterizace butylmethakrylátových monolitických kolon získané pomocí rtuťové porozimetrie, měření specifického povrchu metodou BET a chromatografických testování.

Kolona	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
celková porozita	0.73	0.70	0.66	0.6	0.6	0.7	0.6	0.65	0.66	0.6	0.6	0.7
počítaná z t_M				1	8	1	0			2	0	5
celková porozita naměřená rtuťovou porozimetrií	0.64	0.58	0.64	0.6	0.4	0.6	0.4	0.60	0.52	0.5	0.6	0.5
				4	7	3	9			1	6	2
objem pórů (cm^3/g)	1.39	1.38	1.39	1.0	1.0	1.5	1.1	1.32	1.01	1.0	1.3	1.0
				7	2	7	0			9	6	1
specifický povrch (m^2/g)	1.2	1.4	15.3	13.	40.	24.	4.5	3.5	1.8	4.5	8.3	-
				8	8	1						
střední velikost pórů (nm)	229	195		156	50	130	494	757	114	486	327	10
	8	7	182						6			
střední velikost globulí (nm)	247	212		218	73	125	671	860	169	668	361	15
	9	8	196						5			
nejfrekv. velikost pórů (nm)	184	183	157	297	93	208	660	142	113	653	384	30
	5	9	0					4	6			
permeabilita (10^{-14} m^2)	6.2	4.7	2	1.4	0.3	0.9	5	11.6	9.6	6.3	4.4	2.8

První připravené kolony (A1) byly charakteristické velmi vysokou permeabilitou pro mobilní fázi, ale špatnými chromatografickými vlastnostmi, nízkou účinností a malým rozlišením. Tyto vlastnosti byly způsobeny velkým průměrem pórů a následně malým specifickým povrchem (viz tab. 4). Nižší zastoupení monomerní složky v polymerizační směsi u dalších připravených kolon mělo za následek pouze mírné snížení celkové porozity, nicméně nemělo vliv na velikosti polymerních globulí a pórů (kolona A2). Až zvýšení množství síťovadla (ethylendimethakrylátu) vůči monomeru (butylmethakrylátu) u kolon A3 - A4 ovlivnilo proces polymerizace, strukturu polymeru a následně také separační vlastnosti monolitu. Hodnoty střední i nejfrekventovanější velikosti pórů výrazně klesly a zvýšil se specifický povrch monolitů. Zvýšením množství síťovadla oproti monomeru o 15 % (kolona A4) se výrazně zlepšily morfologické vlastnosti monolitu, čemuž odpovídají hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra v oblasti kolem 50 μm .

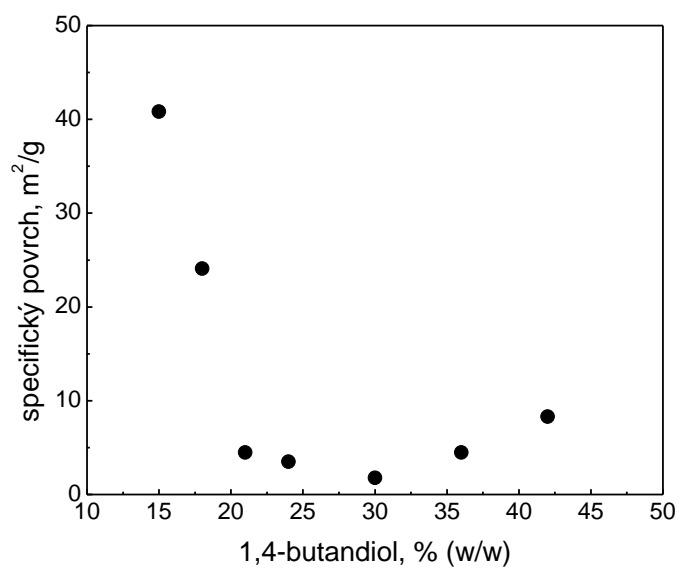
V druhé skupině kolon B1-B8 byla použita dvousložková porogenní směs tvořená butandiolem a propanolem v různých poměrech (tab. 3). Složení porogenní

směsi mělo zřejmý vliv na morfologii monolitů. S rostoucím množstvím butandiolu (klesajícím množstvím propanolu) v porogenní směsi se zvyšovala velikost polymerních globulí i pórů s maximem u kolon B4 a B5, poté velikosti opět klesaly (tab. 4). Tomuto trendu odpovídaly také permeability kolon pro mobilní fázi. Ukázala se přímá souvislost mezi složením polymerizační směsi, velikostí pórů a permeabilitou, jak je patrné z obr.17. Na druhou stranu nebyl zjištěn vliv porozity a celkového objemu pórů (zjištěné hodnoty kolísaly o desítky procent) na permeabilitu kolon.

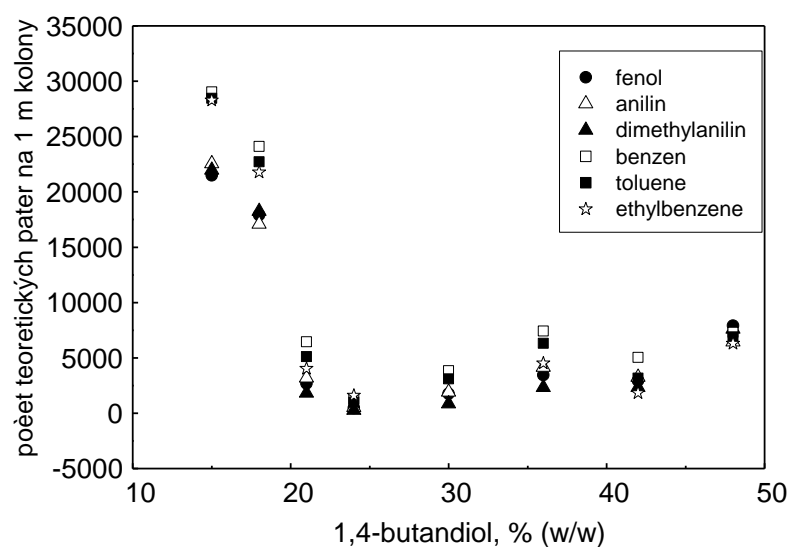


Obr. 17. Závislosti nejfrekventovanější velikosti pórů (○) a permeability (●) kolon B1 – B8 na obsahu butandiolu v polymerizační směsi.

Opačný trend byl pozorován u naměřených specifických povrchů monolitů, který s rostoucím množstvím butandiolu klesal, minima dosahoval u kolony B5 a poté opět rostl. Větší specifický povrch a tím i větší prostor pro interakci separovaných látek se stacionární fází měl za následek lepší separační vlastnosti, jak je patrné z obr. 18 a 19.



Obr. 18. Závislost specifického povrchu monolitických kolon B1 – B8 na obsahu 1,4-butandiolu v polymerizační směsi.



Obr. 19. Závislost počtu teoretických pater na 1 m kolony na obsahu 1,4-butandiolu v polymerizační směsi. Mobilní fáze acetonitril/voda (65/35, v/v); průtoková rychlost 2 μ l/min; UV detekce při 214 nm. Měřeno ve spolupráci s Mgr. Janem Grafnetterem na PřF UK.

Nejvyšší počet teoretických pater byl zjištěn u kolon B1 a B2, u kterých byly také naměřeny nejvyšší specifické povrchy, naopak nejnižší hodnoty obou veličin byly v případě kolony B5. Vhodných parametrů pro kapalinovou chromatografii, kombinujících dobré separační vlastnosti a dostačující permeabilitu pro mobilní fázi, bylo dosaženo u kolony B2 připravené z porogenní směsi obsahující 30 % butandiolu a 70 % propanolu. Na základě zjištěných trendů by bylo možné připravit různé monolity se stejným chemickým složením a zároveň s požadovanou morfologií.

Závěr

Morfologická charakteristika butylmethakrylátových monolitických kolon ukázala přímou souvislost mezi složením polymerizační směsi, morfologií monolitů a jejich chromatografickými vlastnostmi. Zvýšení množství síťovadla v polymerizační směsi (54,5/44,5 % (w/w) ethylendimethakrylát/butylmethakrylát) v první sérii kolon mělo za následek zmenšení velikosti pórů, zvýšení specifického povrchu, a následně také zlepšení separačních vlastností kolon.

V navazující druhé sérii bylo připraveno 8 kolon s různým poměrem 1,4-butandiolu a 1-propanolu v porogenní složce. Závislosti nejfrekventovanější velikosti pórů a permeability na množství 1,4-butandiolu v porogenní směsi měly stejný průběh se stejným maximem (kolona B4, 40 % 1,4-butandiolu, a 60 % 1-propanolu). Téměř opačný průběh měla závislost specifického povrchu a počtu teoretických pater na množství 1,4-butandiolu. Nejlepších separačních vlastností a dostačující permeability bylo dosaženo u kolony B2 obsahující 30 % 1,4-butandiolu v porogenní směsi.

Výsledky této části dizertační práce byly publikovány ve článku „*Investigation of chromatographic behavior and porous properties of butyl methacrylate monolithic columns.*“ který vyšel v časopisu *Materials and Manufacturing Processes* 23 (2008) 591-596. Experimentální práce a prezentace výsledků byla financována z projektů MŠMT 1M0538 a MŠMT 0021620857.

5. LITERATURA

1. Kirkland J.J., DeStefano J.J., *J. Chromatogr. A* 2006, 1126, 50 - 57
2. Krajnc P., Leber N., Štefanec D., Kontrec S., Podgornik A., *J. Chromatogr. A* 2005, 1065, 69 - 73
3. Maruška A., Kornyšova J., *J. Biochem. Bioph. Methods* 2004, 59, 1 - 48
4. Cabral J.L., Bandilla D., Skinner C.D., *J. Chromatogr. A* 2006, 1108, 83 - 89
5. Rohr T., Hilder E.F., Donovan J.J., Švec F., Fréchet J.M.J., *Macromolecules* 2003, 36, 1677 - 1684
6. Kornyšova O., Šurna R., Snitka V., Pyrol U., Maruška A., *J. Chromatogr. A* 2002, 971, 225 - 235
7. Leon C.A., Leon Y., *Adv. Colloid and Interface Sci.* 1998, 341, 76 - 77
8. Rouquerol J. et al., *Pure & Appl. Chem.* 1994, 66, 1739 - 1758
9. Brunauer S., Emmett P.H., Teller E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, 60, 309 - 319
10. Safrany A., Beiler B., Laszlo K., Švec F., *Polymer* 2005, 46, 2862 - 2871
11. Holdšvendová P., Coufal P., Suchánková J., Tesařová E., Bosáková Z., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1623 - 1628
12. Švec F., Fréchet J.M.J., *Macromolecules* 1995, 28, 7580 - 7582
13. Viklund C., Švec F., Fréchet J.M.J., Irgum K., *Chem. Mater.* 1996, 8, 744 - 750
14. Peters E., Petro M., Švec F., Fréchet J.M., *J. Anal. Chem.* 1998, 70, 2288 - 2295
15. Steinke J.H.G., Dunkin I.R., Sherrington D.C., *Macromolecules* 1996, 29, 5826 - 5834
16. Hradil J., Jelínková M., Ilavský M., Švec F., *Angew. Macromol. Chem.* 1991, 185/186, 275 - 282
17. Lammerhofer M., Peters E.C., Yu C., Švec F., Fréchet J.M.J., Lindner W., *Anal. Chem.* 2000, 72, 4614 - 4622
18. Merhar M., Podgornik A., Barut M., Zigon M., Strancar A., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 322 - 330
19. Chuang S.C., Chang C.Y., Liu C.Y., *J. Chromatogr. A* 2004, 1044, 229 - 246
20. Yilmaz E., Mosbach K., Haupt K., *Anal. Commun.* 1999, 36, 167 - 170

21. Schweitz L., Andersson L.I., Nilsson S., *Analyst* 2002, 127, 22 - 28
22. Huang H.Y., Lin H.I., Lin S.P., *Electrophoresis* 2006, 27, 4674 - 4677
23. Gu B., Armenta J.M., Lee M.L., *J. Chromatogr. A* 2005, 1079, 382 - 391
24. Yu C., Mosbach K., *J. Organ. Chem.* 1997, 62, 4057 - 4064
25. Shu X., Chen L., Yang B., Guan Y., *J. Chromatogr. A* 2004, 1052, 205 - 209
26. Peters E.C., Petro M., Švec F., Fréchet J.M.J., *Anal. Chem.* 1997, 69, 3646 - 3649
27. Okanda F.M., El Rassi Z., *Electrophoresis* 2007, 28, 89 - 98
28. Sondergeld L.J., Bush M.E., Bellinger A., Bushey M.M., *J. Chromatogr. A* 2003, 1004, 155 - 165
29. Steinke J.H.G., Dunkin I.R., Sherrington D.C., *Macromolecules* 1996, 29, 407 - 415
30. Wu R., Hu L., Wang F., Ye M., Zou H., *J. Chromatogr. A*, 2008, 1184, 369 - 392
31. Vlach E.G., Tennikova T.B., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2801 - 2813
32. Smith N.W., Jiang Z., *J. Chromatogr. A*, 2008, 1184, 416 - 440
33. Lanza F., Sellergren B., *Anal. Chem.* 1999, 71, 2092 - 2096
34. Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z., *Monolithic Materials – Preparation, Properties and Applications*, *J. Chromatogr.* 67, 2003
35. Hradil J., Azanova A., Ilavský M., Švec F., *Angew. Makromol. Chem.* 1992, 205, 141 - 149
36. Coufal P., Čihák M., Suchánková J., Tesařová E., Bosáková Z., Štulík K., *J. Chromatogr. A* 2002, 946, 99 - 106
37. Hahn J., Podgornik A., Merhar M., Schallaun E., Jungbauer A., *Anal. Chem.* 2001, 73, 5126 - 5132
38. Yu C., Xu C., Švec F., Frechet J.M.J., *J. Polym. Sci. A: Polym.Chem.* 2002, 40, 755 - 769
39. Nordborg A., Švec F., Frechet J.M.J., Irgum K., *J.Sep.Sci.* 2005, 28, 2401 - 2406
40. Švec F., Peters E.C., Sykora D., Yu C., Frechet J.M.J., *J. High Resolut. Chromatogr.* 2000, 23, 3 - 18
41. Courtois J., Szumski M., Georgsson F., Irgum K., *Anal. Chem.* 2007, 79, 335 - 344

42. Hemstrom P., Nordborg A., Irgum K., Švec F., Fréchet J.M.J., *J. Sep.Sci.* 2006, 29, 25 - 32
43. Aoki H., Kubo T., Ikegami T., Tanaka N., Hosoya K., Tokuda D., Ishizuka N., *J. Chromatogr. A* 2006, 1119, 66 - 79
44. Courtois J., Bystrom E., Irgum K., *Polymer* 2006, 47, 2603 - 2611
45. Peters E.C., Petro M., Švec F., Fréchet J.M.J., *Anal. Chem.* 1998, 70, 2296 - 2302
46. Švec F., Peters E.C., Sýkora D., Fréchet J.M.J., *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 3 - 29
47. Jiang T., Jiskra J., Cleassens H.A., Cramers C.A., *J. Chromatogr. A* 2001, 923, 215 - 227
48. Eeltink S., Geiser L., Švec F., Fréchet J.M.J., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2814 - 2820
49. Huang X., Wang H., Yan H., Huang Y., Huang B., *J. Chromatogr. A* 2005, 1062, 183 - 188
50. Umemura T., Ueki Y., Tsunoda K., Katakai A., Tamada M., Haraguchi H., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 566 - 571
51. Dong J., Xie C., Tian R., Wu R., Hu J., Zou H., *Electrophoresis* 2005, 26, 3452 - 3459
52. Oberacher, H., Premstaller, A., Huber, C.G., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030, 201 - 208
53. Huang H.-Y., Lin H.Y., Lin S.-P., *Electrophoresis* 2006, 27, 4674 - 4681
54. Schley C., Altmeyer M.O., Swart R., Müller R., Huber C.G., *J. Proteome Res.* 2006, 5, 2760 - 2768
55. Bandilla D., Skinner C.D., *J. Chromatogr. A* 2003, 1004, 167 - 179
56. Tennikova, T.B., Bleha M., Švec F., Almazova T. V., Belenkii B.G., *J. Chromatogr.* 1991, 555, 97 - 107
57. Courtois J., Bystrom E., Irgum K., *Polymer* 2006, 47, 2603 - 2611
58. Mihelic I., Krajnc M., Koloni t., Podgornik A., *Ind. Eng. Chem. Res.* 2001, 40, 3495 - 3501
59. Hoegger D., Freitag R., *J. Chromatogr. A* 2001, 914, 211 - 222
60. Hoegger D., Freitag D., *Electrophoresis* 2003, 24, 2958 - 2972
61. Zeng C.M., Liao J.L., Nakazato K., Hjertén S., *J. Chromatogr. A* 1996, 753, 227 - 234

62. Tegeler T.J., Mechref Y., Boraas K., Reilly J.P., Novotny M.V., *Anal. Chem.* 2004, 76, 6698 - 6706
63. Freitag R., *J. Chromatogr. A* 2004, 1033, 267 - 273
64. Meyers J.J., Liapis A.I., *J. Chromatogr. A* 1998, 827, 197 - 213
65. Liapis, A.I., Meyers, J.J., Crosser, O.K., *J. Chromatogr. A* 1999, 865, 13 - 25
66. Meyers J.J., Liapis A.I., *J. Chromatogr. A* 827, 1999, 852, 3 - 23
67. Jungbauer A., Hahn R., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 767 - 778
68. K. Miyabe, G. Guichon, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 853 - 873
69. F. Švec, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 1419 - 1430
70. Moravcová D., Jandera P., Urban J., Planeta J., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1005 - 1016
71. Coufal P., Bosáková Z., Širc J., Pacáková V., Štulík K., kapitola „Organic-Polymer-Based Monolithic Capillary Columns for Separations of Small Molecules” do knihy „Monolithic chromatography and its modern applications”, ILM Publications 2009
72. Evenhuis C.J., Buchberger W., Hilder E.F., Flook K.J., Pohl C.A., Nesterenko P.N., Haddad P.R., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 2598 - 2604
73. Ueki Y., Umemura T., Li J., Odake T., Tsunoda K., *Anal. Chem.* 2004, 76, 7007 - 7012
74. Hutchinson J.P., Zakaria P., Bowie A.R., Macka M. Avdalovic N., Haddad P.R., *Anal. Chem.* 2005, 77, 407 - 416
75. Legido-Quigley C., Marlin N., Smith N.W., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030, 195 - 200
76. Batycka M., Inglis N.F., Cook K., Adam A., Fraser-Pitt D., Smith D.G.E., Main L., Lubben A., Kessler B.M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20, 2074 - 2080
77. Chen H., Rejtar T., Andreev V., Moskovets E., Karger B.L., *Anal. Chem.* 2005, 77, 2323 - 2331
78. Tholey A., Toll H., Huber C.G., *Anal. Chem.* 2005, 77, 4618 - 4625
79. Jungbauer A., Hahn R., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 62 - 79
80. Branovic K., Forcic D., Ivancic J., Strancar A., Barut M., Kosutic-Gulija T., Zgorelec R., Mazuran R., *J. of Virological Methods* 2003, 110, 163 - 171
81. Strancar A., Podgornik A., Barut M., Necina R., *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 2002, 76, 49 - 85

82. Wulff G., Sharhan A., Zabrocki K., *Tetrahedron Lett.* 1973, 14, 4329 - 4332
83. Wulff G., Sharhan A., Vesper W., *Makromol. Chem.* 1977, 178, 2799 - 2816
84. Sellergren B., Ekberg B., Mosbach K., *J. Chromatogr.* 1985, 347, 1578 - 1582
85. Andersson L., Sellergren B., Mosbach K., *Tetrahedron Lett.* 1984, 25, 5211 - 5214
86. Alexander C., Andersson H.S., Andersson L.I., Ansell R.J., Kirsch N., Nicholls I.A., O'Mahony J., Whitcombe M.J., *J. Mol. Recognit.* 2006, 19, 106 - 180
87. Wulff G., *Angew. Chem.* 1995, 34 (17), 1812 - 1832
88. Whitcombe M.J., Vulfson E.N., *Adv. Mater.* 2001, 13 (7), 467 - 476
89. Wulff G., *Chem. Rev.*, 2002, 102, 1 - 27
90. Shea K.J., Thompson E.A., Pandey S.D., Beauchamp P.S., *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102, 3149 - 3155
91. Damen J., Neckers D.C., *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102, 3265 - 3267
92. Wulff G., Gross T., Schönfeld R., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1997, 36, 1962 - 1964
93. Wulff G., Schauhoff S., *J. Ogr. Chem.* 1991, 56, 395 - 400
94. Wulff G., Haarer J., *Macromol. Chem. Phys.*, 1991, 192, 1329 - 1338
95. Whitcombe M.J., Rodriguez M.E., Villar P., Vulfson E.N., *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 117, 7105 - 7111
96. Shea K.J., Sasaki D.Y., *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 3442 - 3444
97. Shea K.J., Sasaki D.Y., *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4109 - 4120
98. Wulff G., Heide B., Helfmeier G., *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 1089 - 1091
99. Ramström O., Mosbach K., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999, 3, 759 - 764
100. Whitcombe M.J., Alexander C., Vulfson E.N., *Synlett* 2000, 6, 911 - 923
101. Arshady R., Mosbach K., *Makromol. Chem.* 1981, 182, 687 - 692
102. Takeuchi T., Haginaka J., *J. Chromatogr. B* 1999, 728, 1 - 20
103. Hennion M.C., Pichon V., *J. Chromatogr. A* 2003, 1000, 29 - 52
104. Andersson L. I., *Anal. Chem.* 1996, 68, 11 - 117
105. Huang X.D., Zou H.F., Chen X.M., Luo Q.Z., Kong L., *J. Chromatogr. A* 2003, 984, 273 - 282
106. Matsui J., Kato T., Takeuchi T., Suzuki M., *Anal. Chem.* 1993, 65, 2223 - 2224
107. D.J. O'Sannessy, *J. Chromatogr.*, 1989, 470, 391 - 399

108. Sellergren B., Lepisto M., Mosbach K., *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 5853 - 5860
109. Sellergren B., Shea K.J., *J. Chromatogr.* 1993, 635, 31 - 49
110. Whitcombe M.J., Martin L., Vulfson E.N., *Chromatographia* 1998, 47, 457 - 464
111. Yilmaz E., Mosbach K., Haupt K., *Anal. Commun.* 1999, 36, 167 - 170
112. Nicholls I.A., Ramström O., Mosbach K., *J. Chromatogr. A* 1995, 691, 349 - 353
113. Nicholls I.A., Adbo K., Andersson H.S., *Anal. Chim. Acta* 2001, 435, 9 - 18
114. Oral E., Peppas N.A., *Polymer* 2004, 45, 6163 - 6173
115. Kempe M., Mosbach K., *Analytical Letters* 1991, 24, 1137 - 1145
116. Andersson L. I., Mosbach K., *J. Chromatogr.* 1990, 516, 313 - 322
117. Haginaka J., Sanbe H., Takehira H., *J. Chromatogr. A* 1999, 857, 117 - 125
118. Kagan M.Z., *J. Chromatogr. A* 2001, 918, 293 - 302
119. Lanza F., Sellergren B., *Anal. Chem.* 1999, 71, 2092 - 2096
120. Moradian A., Mosbach K., *J. Mol. Recognit.* 1989, 2, 167 - 169
121. Shea K.J., Sasaki D.Y., *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 3442 - 3444
122. Zhang T., Liu F., Chen W., Wang J., Li N., Li K., *Anal. Chim. Acta* 2001, 450, 53 - 61
123. Kempe M., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1948 - 1953
124. Wulff G., Veitmeier J., Poll H.G., *Macromol. Chem.* 1987, 188, 731 - 740
125. Matsui J., Nicholls I.A., Takeuchi T., *Anal. Chim. Acta* 1998, 365, 89 - 93
126. Matsui J., Takeuchi T., *Anal. Commun.* 1997, 34, 199 - 200
127. Ramström O., Ye L., Gustavsson P.E., *Chromatographia* 1998, 48, 197 - 202
128. Sellergren B., Shea K.J., *J. Chromatogr. A* 1993, 635, 31 - 49
129. Piletsky S.A., Guerreiro A., Piletska E.V., Chianella I., Karim K., Turner A.P.F., *Macromolecules* 2004, 37, 5018 - 5022
130. Piletsky S.A., Mijangos I., Guerreiro A., Piletska E.V., Chianella I., Karim K., Turner A.P.F., *Macromolecules* 2005, 38, 1410 - 1414
131. McNiven S., Kato M., Levi R., Yano K., Karube I., *Anal. Chim. Acta* 1998, 365, 69 - 74
132. Sellergren B., Shea K.J., *J. Chromatogr. A* 1993, 654, 17 - 28
133. Ye L., Mosbach K., *React. Funct. Polym.* 2001, 48, 149 - 157

134. He C., Long Y., Pan J., Li K., Liu F. J., *Biochem. Biophys. Methods* 2007, 70, 133 - 150
135. Caro E., Marce R.M., Borrul F., Cormack P.A.G., Sherrington D.C., *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 143 - 154
136. Tamayo F.G., Turiel E., Martin-Esteban A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1152, 32 - 40
137. He C., Long Y., Pan J., Li K., Liu F. J., *Biochem. Biophys. Methods* 2007, 70, 263 - 273
138. Schweitz L., Petersson M., Johansson T., Nilsson S., *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 203 - 217
139. Preinerstorfer B., Lammerhofer M., *Electrophoresis* 2007, 28, 2527 - 2565
140. Quin F., Xie C., Yu Z., Kong L., Ye M., Zou H., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1332 - 1343
141. Turiel E., Martin-Esteban A., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 719 - 728
142. Li Z., Duan H., Huang Y., Liu Z., *Prog. Chem.* 2008, 20, 747 - 753
143. Ansell R.J., *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005, 57, 1809 - 1835
144. Maier N.M., Lindner W., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 377 - 397
145. Pichon V., Chapuis-Hugon F., *Anal. Chim. Acta* 2008, 622, 48 - 61
146. Deng Q.-L., Lun Z.-H., Gao R.-Y., Zhang L.-H, Zhang W.-B. Zhang Y.-K., *Electrophoresis* 2006, 27, 4351 - 4358
147. Martin P.D., Jones G.R., Stringer F., Wilson I.D., *Analyst* 2003, 128, 345 - 350
148. Širc J., Diplomová práce „Příprava a testování monolitických kolon na principu vtištěných polymerů“ PŘF UK v Praze, 2003
149. Širc J., Bosáková, Z., Coufal, P., Michálek J., Příkladný M., Hobzová R., Hradil J., *E-Polymers* 2007, 117, 1 - 15
150. Grafnetter J., Coufal, P., Tesařová E., Suchánková J., Bosáková Z., Ševčík J., *J. Chromatogr. A* 2004, 1049, 43 - 49

6. SEZNAM ZKRATEK

AFM	mikroskopie atomárních sil
AIBN	azobisisobutyronitril
BET	metoda měření specifického povrchu (podle autorů Brunauera, Emmetta a Teller)
BMA	butylmethakrylát
CEC	kapilární elektrochromatografie
EDMA	ethylendimethakrylát
H	výška teoretického patra
HILIC	chromatografie s hydrofilními interakcemi
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HROM	optická mikroskopie s vysokým rozlišením
MIP	vtištěné polymery
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
RSD	relativní směrodatná odchylka
SEM	skenovací elektronová mikroskopie

7. SEZNAM VÝSTUPŮ

Publikace:

1. Širc, J., Bosáková, Z., Coufal, P., Michálek, J., Příkladný, M., Hobzová, R., Hradil, J.: *Morphological and chromatographic characterization of molecularly imprinted monolithic columns.*
E-Polymers 117 (2007) 1-15
2. Čejka, Č., Pláteník, J., Guryča, V., Širc, J., Michálek, J., Brůnová, B., Čejková, J.: *Light absorption properties of the rabbit cornea repeatedly irradiated with UVB rays.*
Photochemistry and Photobiology 83 (2007) 652-657
3. Guryča, V., Hobzová, R., Příkladný, M., Širc, J., Michálek, J.: *Surface morphology of contact lenses probed with microscopy techniques.*
Contact Lens and Anterior Eye 30 (2007) 215-222
4. Širc J., Bosáková Z., Coufal P., Michálek J., Guryča V.: *Investigation of chromatographic behavior and porous properties of butyl methacrylate monolithic columns.*
Mater. Manuf. Process. 23 (2008) 591-596
5. Reiter J., Michálek J., Příkladný M., Chmelíková D., Širc J.: *Li⁺ a H⁺ vodivé polymerní elektrolyty s kovalentně vázanými anionty.*
Chem. Listy, přijato
6. Čejka Č., Pláteník J., Buchal R., Guryča V., Širc J., Vejražka M., Crkovská J., Ardan T., Michálek J., Brůnová B., Čejková J.: *Effect of two different UVA doses on the rabbit cornea and lens.*
Photochem. Photobiol., přijato

7. **Přádný M., Michálek J., Širc J.:** „*Porous hydrogels.*” Kapitola do knihy: „*Porous Media: Heat and Mass Transfer, Transport and Mechanics.*”, Nova Publishers, v tisku
 8. **Coufal P., Bosáková Z., Širc J., Pacáková V., Štulík K.:** „*Monolithic capillary columns designed for small organic molecules.*“ Kapitola do knihy „*Monolithic columns in its modern applications.*“, ILM Publications, v tisku
 9. **Hobzová R., Přádný M., Zhunusbekova N. M., Širc J., Guryča V., Michálek J.:** *Surface modification of hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate for immobilization of bioactive compounds,*
J. Bioact. Comp. Polym., zasláno
-

Publikace které jsou součástí dizertační práce jsou vtištěny tučně.

Přednášky:

Širc J., Bosáková Z., Michálek J., Guryča V.: „*Preparation and characterization of molecularly imprinted monolithic columns*“, 2nd International Student Conference ‘Modern Analytical Chemistry’, Praha, 26.9.-27.9.2005

Širc J.: „*Vtištěné polymery jako monolitické stacionární fáze pro HPLC*“, Ústavní přednáška na ÚMCH v.v.i., 22.11.2007

Postery:

1. Širc J., Bosáková Z., Pacáková V., Michálek J., Guryča V.: *Molecularly imprinted polymer rods prepared by in situ polymerization as chromatographic stationary phases.* International Symposium on Advances and Applications of Chromatography in Industry, Bratislava, Slovensko, 29.6.- 1.7.2004
2. Širc J., Bosáková Z., Přádný M., Michálek J., Guryča V.: *Příprava a charakterizace monolitických kolon na principu vtištěných polymerů.*
3. Slovensko-české dni o polymérech, Smolenice, Slovensko, 26.9.-29.9.2004

3. Čejka Č., Guryča V., Širc J., Michálek J., Pláteník J., Brůnová B., Čejková J.: *Changes of water content and proteins in the cornea protect the inner eye from light oxidative injury*. Výroční sjezd České kontaktologické společnosti, Nymburk, 11.11.-13.11.2005
4. Guryča V., Michálek J., Pacáková V., Novotný M. V., Širc J.: *Porous polyacrylamide monoliths as stationary phases for hydrophilic interaction electrochromatography*. 44th Microsymposium on Polymer Gels and Networks, Praha, 10.07.-14.7.2005
5. Guryča V., Michálek J., Příkladný M., Fridrichová-Vítková D., Širc J., Šlouf M.: *Surface structure of miscellaneous contact lenses probed with microscopy techniques*. European Contact Lens Society of Ophthalmologists Congress, Londýn, Anglie, 23.6.-26.6.2005
6. Širc J., Bosáková Z., Michálek J., Guryča V.: *Characterisation of molecularly imprinted monolithic columns*. 11. International Symposium on Separation Sciences, Pardubice, 12.9.-4.9.2005
7. Širc J., Bosáková Z., Michálek J.: *Characterization of molecularly imprinted monolithic columns*. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, Devět skal, 15.6.-18.6.2005
8. Širc J., Bosáková Z., Michálek J., Guryča V.: *Preparation and characterization of molecularly imprinted monolithic columns*. International Symposium on Separations in the BioSciences, Utrecht, Holandsko, 18.9.-21.9.2005
9. Širc J., Michálek J., Bosáková Z., Guryča V.: *Use of polymers networks as chiral stationary phases for HPLC*. 44th Microsymposium on Polymer Gels and Networks, Praha, 10.7. -14.7.2005
10. Hobzová R., Zhunusbekova N. M., Širc J., Michálek J.: *Surface modification and characterization of methacrylate polymer networks for tissue engineering*.

9th Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society, Herceg Novi, Černá Hora, 10.9.-14.9.2007

11. Širc J., Bosáková Z., Michálek J., Hobzová R.: *Chromatographic stationary phases for separation of bioactive compounds – correlation of morphology and separation properties*. 9th Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society, Herceg Novi, Černá Hora, 9.9.-14.9.2007
12. Čejka Č., Pláteník J., Guryča V., Širc J., Michálek J., Brůnová B.: *Vliv rozdílné vlnové délky UV světla na jeho pohlcování v rohovce*. Vědecká konference 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha, 25.4.-26.4.2007
13. Širc J., Bosáková Z., Coufal P., Michálek J., Hobzová R.: *Methacrylate-based monolithic stationary phases for liquid chromatography: Investigating of pore formation and hydrodynamic performance*. International Conference on Advances in Polymer Science and Technology, Dilí, Indie, 28.01.-31.01.2008
14. Hobzová R., Zhunusbekova N. M., Širc J., Dvořánková B., Smetana K., Přádný M., Michálek J.: *Methacrylate based hydrogels for tissue engineering*, International Conference on Advances in Polymer Science and Technology, Dilí, Indie, 28.01.-31.1.2008
15. Hobzová R., Chmelíková D., Širc J., Přádný M., Michálek J.: *Surface modification of hydrogels based on EOEMA and GMMA for avidin immobilization*, 10th Annual UNESCO/UIPAC Conference on Macromolecules and Materials, Mpumalanga, Jihoafrická republika, 7.9.-11.9.2008
16. Širc J., Hobzová R., Přádný M., Bosáková Z., Coufal P.: *Copolymers of butylmethacrylate and ethylene dimethacrylate as stationary phases for capillary liquid chromatography and electrochromatography*, 10th Annual UNESCO/UIPAC Conference on Macromolecules and Materials, Mpumalanga, Jihoafrická republika, 7.9.-11.9.2008

8. PUBLIKACE KTERÉ JSOU PŘEDMĚTEM DIZERTAČNÍ PRÁCE