

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Využití monolitických kolon
v kapilární kapalinové
chromatografii**

Disertační práce

Praha 2009

Petra Holdšvendová

Tato disertační práce byla vypracována na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2001-2009. Práce na tomto projektu byla finančně podporována výzkumným záměrem MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Prohlášení

Prohlašuji, že tuto disertační práci jsem vypracovala samostatně, pod vedením školitelů Doc. RNDr. Pavla Coufala, Ph.D. a RNDr. Jany Sobotníkové, Ph.D., a že veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala. Dále prohlašuji, že tato práce ani její součást nebyly použity pro získání jiného či stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

.....

Petra Holdšvendová

Poděkování

Na tomto místě bych především velmi ráda poděkovala svým školitelům panu Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. a paní RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc a podporu během mého experimentálního působení na katedře analytické chemie.

Dále bych chtěla poděkovat firmě Generi Biotech s.r.o., že mi poskytla příjemné prostředí a podmínky pro měření separace oligonukleotidů. Velké poděkování patří především Ing. Veronice Bačkovské, a Ing. Martinu Bunčekomu, Ph.D. za pomoc během mého působení v Hradci Králové ve firmě Generi Biotech s.r.o.

Také bych chtěla poděkovat skupině Prof. RNDr. Ivana Lukeše, CSc. a Doc. RNDr. Petra Hermanna, Ph.D. za dodané deriváty cyklenu DO3A a za zájem o tuto práci.

Velký dík také patří mým rodičům, za podporu, pochopení a trpělivost během mého studia na vysoké škole. Také bych chtěla poděkovat všem přátelům, kteří mě podporovali, věřili mi a chápali mne během sepisování disertační práce.

Obsah

ÚVOD	6
1. Kapilární kapalinová chromatografie	6
2. Monolitické kolony v kapalinové chromatografii	8
2.1. Historie monolitu v analytických separačních metodách	8
2.2. Monolitické kolony v současnosti	9
2.3. Příprava monolitických kolon.....	10
2.4. Methakrylátové monolitické kolony	12
2.5. Separace oligonukleotidů na monolitických kolonách	13
2.6. Experimentální záměr	14
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	15
1. Chromatografická část	15
2. Použité chemikálie	16
3. Zpracování výsledků	19
VÝSLEDKY A DISKUSE	21
1. Opakovatelnost přípravy butylmethakrylátových monolitů iniciovaných chemicky peroxidisíranem amonným	21
1.1. Složení polymerační směsi pro monolitické kolony	21
1.2. Optimalizace složení polymerační směsi pro butylmethakrylátové kolony	22
1.3. Příprava monolitických kolon.....	27
1.4. Sledování chromatografických vlastností kolon.....	29
1.5. Reprodukovatelnost přípravy kolon.....	30
1.6. Optimální butylmethakrylátová kolona	36
1.7. Opakovatelnost přípravy butylmethakrylátových kolon.....	36
1.8. Shrnutí výsledků	41
2. Příprava monolitických kolon pro separaci oligonukleotidů metodou kapilární kapalinové chromatografie	43

2.1. HILIC mod pro separaci polárních látek	43
2.2. Oligonukleotidy	43
2.3. Kolony na bázi methakrylátů pro separaci oligonukleotidů	45
2.4. Glycidylmethakrylátové kolony pro separaci oligonukleotidů.....	46
2.5. N-(hydroxymethyl)methakrylamidové (HMMAA) kolony pro separaci oligonukleotidů	48
2.6. Optimalizace separace studovaných oligonukleotidů na HMMAA kolonách	50
2.7. Reprodukovatelnost přípravy HMMAA monolitů.....	55
2.8. Shrnutí přípravy HMMAA monolitů.....	56
2.9. Kolony připravené s MAPDS, tedy [3-(methakryloylamino)propyl]-dimethyl(3-sulfopropyl)ammonium hydroxidem, pro separaci oligonukleotidů	57
2.10. Shrnutí přípravy HMMAA + MAPDS monolitů.....	61
3. Separace derivátů DO3A na monolitických kolonách a na komerčních RP-fázích.....	64
3.1. Struktura testovaných derivátů DO3A.....	64
3.2. Separace na komerčních kolonách v RP-HPLC modu	67
3.3. Separace derivátů cyklenu na monolitických kolonách.....	70
3.4. Shrnutí separace derivátů DO3A na monolitických kolonách.....	75
ZÁVĚR.....	76
SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	79
Seznam použité literatury.....	82
Životopis.....	91
Příloha	92

ÚVOD

1. Kapilární kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je široce používanou separační metodou v analytických laboratořích, především pro separaci nově vytvořených léčiv, pro monitoring procesů a kontroly kvality vyrobených látek v chemickém průmyslu, zejména ve farmacii a potravinářství. HPLC technika je nejpomalejší částí v používaných analytických metodách, což je především v analýzách jako je procesní monitoring, biologický screening či vývoj nových léků velmi limitující. Proto je především v posledních několika desetiletích snaha najít takovou separační techniku, která bude stejně jako tradiční HPLC metoda použitelná pro separaci široké škály látek. Jednou z možností urychlení separační metody je zmenšování kolon v kapalinové chromatografii.

Již v sedmdesátých letech 20. století, jako jedni z prvních, testovali Horváth a kol. [1, 2] kovovou kolonu o vnitřním průměru 0,3 mm a 1,0 mm naplněnou částicemi pro separaci ribonukleotidů. V dalším desetiletí Ishiiho kolektiv [3 - 5] separoval směs polyaromatických uhlovodíků pomocí teflonové kapiláry o vnitřním průměru 0,5 mm naplněné částicemi. Poté následoval velký průlom ve vývoji mikrokolon pro kapalinovou chromatografii [6 - 10], což vedlo ke vzniku samostatného odvětví kapalinové chromatografie, mikrokapalinová chromatografie [11, 12]. Dalším důkazem, že se o separační metody na kapilárách začalo zajímat více výzkumných skupin, je také založení samostatného časopisu. V roce 1989 byl založen časopis „*The Journal of Microcolumn Separation*“, který se od roku 2001 stal součástí časopisu „*Journal of Separation Science*“.

Miniaturizace kolon v kapalinové chromatografii má vedle kratší doby analýzy ještě několik výhod. Největším plusem v kapilární kapalinové chromatografii je velmi nízká spotřeba mobilní fáze. Porovnáme-li spotřebu mobilní fáze protékající klasickou HPLC kolonou o vnitřním průměru 4,6 mm s kapilární kolonou o vnitřním průměru 0,5 mm, sníží se při stejné lineární průtokové rychlosti její spotřeba 85krát. Proto je možné používat i dražší, případně toxická, organická rozpouštědla, neboť zatížení rozpočtu a zátěž na životní prostředí bude v porovnání s klasickou HPLC několikanásobně menší [13]. Díky menšímu průtoku mobilní fáze

nedochází k takovému naředění vzorku během separace a v kapilární kapalinové chromatografii dosáhneme větší citlivosti. Se snižujícím se vnitřním průměrem kapiláry roste citlivost analýzy [14]. Další výhodou je menší spotřeba vzorku, jelikož dávkovaný objem musí být oproti klasické HPLC snížen. Další a neposlední výhodou použití kapilárních kolon v separačních technikách je její snadné propojení s hmotnostním detektorem nebo NMR [15].

Ovšem použití kapilárních kolon s sebou nese i nevýhody. Tím, že se zmenší separační prvek, je nutné, aby se změnila veškerá použitá instrumentace. Je nutné zabránit vzniku mrtvých objemů, které způsobují rozmytí zóny vzorku, aby bylo dosaženo maximální účinnosti separace. Pro separaci na kapilárních kolonách je tedy zapotřebí zaměřit se na detekční celu, připojení kolony k dávkovači a detekční cele a změnit také dávkovací zařízení, aby bylo schopno dávkovat mnohem menší objemy [12]. Vývoj nové instrumentace vedl k úplné automatizaci chromatografu [11], o což se výrazně zasloužil např. Ishiiho kolektiv, který se vývoji kapilární kapalinové chromatografie a instrumentaci věnuje více jak 30 let [16].

Pokrok šel ještě dál a miniaturizace instrumentace se nezastavila u kapilár o vnitřním průměru 0,1 mm, ale v dnešní době existují metody využívající kapilár do 100 μm nebo mikročipů jako separačního media. Jelikož označení HPLC v dnešní době v sobě zahrnuje veškeré tyto techniky kapalinové chromatografie bez ohledu na velikost použité separační kolony, bylo navrženo rozdělení HPLC do několika skupin [16 - 18] dle průtokové rychlosti a použité kolony. V kapilární kapalinové chromatografii (CLC) se používají kolony o vnitřním průměru 100 – 500 μm a průtoková rychlost 1 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, zatímco v klasické HPLC metodě pracujeme s kolonami o vnitřním průměru 3 – 5 mm a průtokovou rychlostí 0,5 – 2,0 ml/min.

2. Monolitické kolony v kapalinové chromatografii

2.1. Historie monolitu v analytických separačních metodách

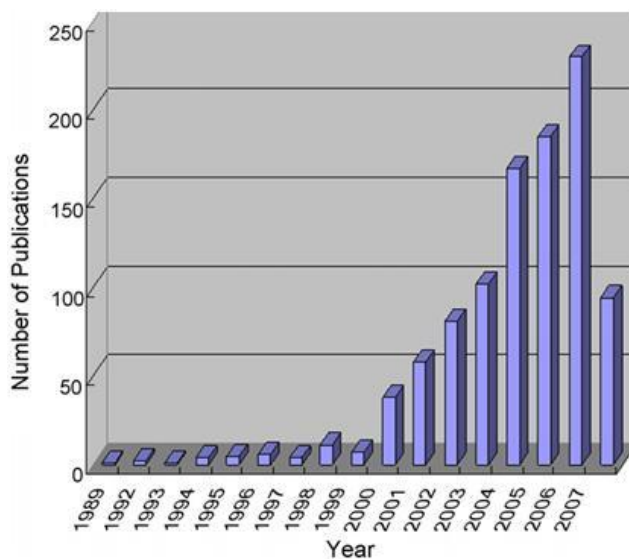
Slovo monolit pochází z řeckého *monolithos*, což je složenina dvou slov - *mono* (jeden) a *lithos* (kámen) a vykládá se jako geologický útvar, hora či balvan tvořený z jednoho kusu. V souvislosti s kapalinovou chromatografií bych si dovolila toto slovo přeložit jako jednolitá stacionární fáze. Poprvé byla monolitem označena stacionární fáze vytvořená polymerizací v uzavřené formě koncem devadesátých let 20. století [19]. Do této doby se v literatuře objevovalo mnoho jiných názvů pro monolit jako např. „*continuous polymer bed*“ [20], nebo „*macroporous polymer membranes*“ [21] či „*porous silica rods*“ [22].

Ovšem první použití podobné stacionární fáze se čásoje již do sedmdesátých let, kdy byla publikována práce Kubína a kol. [23], kteří připravili polymer na bázi methakrylátu pro separaci proteinů metodou vylučovací chromatografie. Díky nízké propustnosti a velké podélné difúzi vedoucí ke snížené separační účinnosti zapadl tento pokus do zapomnění. V sedmdesátých letech se objevují publikace [24, 25], ve kterých byly připraveny kolony naplněné polyuretanovou pěnou, která bohužel v použitých rozpouštědlech botnala nebo měkla, což zabránilo jejímu dalšímu použití. Průkopnická práce popisující přípravu monolitu je spojena s rokem 1989 a jménem S. Hjertén a kol. [20], kteří připravili monolitickou kolonu stlačením polyakrylamidového gelu („*continuous polymer bed*“). V následujících letech se objevují další články popisující přípravu monolitických kolon jako pevný makroporézní polymerní materiál na bázi methakrylátu [21]. Tyto monolity na bázi glycidylmethakrylátu a ethylenglykoldimethakrylátu se díky svým ojedinělým separačním vlastnostem postupně staly jedním z nejpoužívanějších druhů stacionární fáze [26]. Koncem devadesátých let byly popsány monolity na bázi anorganického křemene, který byl následně po polymerizaci derivatizován dimethyloktadecylchlorsilanem [22, 27]. Takto vzniklé stacionární fáze jsou po chemické stránce velmi podobné C18 náplňovým kolonám v HPLC.

2.2. Monolitické kolony v současnosti

V posledních letech výrazně vzrostl zájem o monolitické kolony, které se v dnešní době často označují jako stacionární fáze čtvrté generace [28]. Velmi jednoduchá příprava monolitických kolon je jednou z mnoha výhod tohoto typu stacionárních fází a je jedním z důvodů, proč je tento typ stacionární fáze v současnosti tak populární. Použitím monolitických kolon odpadají problémy s plněním klasických náplňových kolon. Další nespornou výhodou je nepřítomnost frit na separačním médiu, jelikož polymer je kovalentně vázán na vnitřní stěnu kapiláry [29, 30]. Při separacích na tradičních náplňových kolonách se pracuje při velmi vysokých tlacích, což je limitující pro přípravu ještě menších částic. Velkou výhodou monolitických kolon je právě její malý zpětný tlakem, který je až 3krát menší při zachování stejné účinnosti separace [13].

Nepochybnou výhodou monolitických kolon je možnost vytvořit širokou škálu různých stacionárních fází volbou vhodných chemických sloučenin s různými funkčními skupinami, a tím umožnit separovat velmi odlišné látky. Díky této komplexnosti během posledních deseti let výrazně vzrostl zájem o monolity jako separační medium. Jak je ukázáno na **obrázku 1**, od roku 1989, kdy se objevily první publikace o monolitech, do roku 2007 zájem o monolity v separačních technikách vzrostl exponenciálně [31].



Obrázek 1 Počet publikací v období 1989 až 2007 evidovaných v separačních vědách, převzato z práce [31].

Z pohledu chemického složení je možné monolity rozdělit do dvou velkých skupin. První tvoří monolity na bázi anorganických oxidů. Jedná se o monolity na bázi silikagelu [22, 27, 32, 33] a oxidů různých kovů jako je zirkonium, hliník nebo hafnium [34-36]. Druhou velkou skupinu tvoří monolity na bázi tuhých organických polymerů. Tato různorodá skupina se pak ještě dále dělí do tří velkých podskupin podle použitých monomerních jednotek, a to jsou polyakrylamidové monolity, dále pak methakrylátové a polystyrenové monolity. Popisy přípravy, vlastnosti a možnosti aplikací jednotlivých druhů monolitických kolon v kapalinové chromatografii a elektrochromatografii jsou uvedeny v některých souhrnných publikacích [13, 37-40].

V dnešní době se některé typy monolitických kolon vyrábějí komerčně. Mezi prvními reagovala na monolitické kolony firma Merck [41], která vyrábí monolitické kolony na bázi silikagelu jak pro klasickou HPLC s vnitřním průměrem 4,6 mm pod názvem Chromolith[®], tak i pro kapilární kapalinovou chromatografii s vnitřním průměrem 0,2 a 0,05 mm pod názvem Chromolith[®]CapRod. Firma Phenomenex vyrábí monolitické kolony na bázi silikagelu pod názvem Onyx[™] [42]. Firma Dionex [43] nabízí monolitické kolony polystyrenového a methakrylátového typu.

Monolitické kolony našly uplatnění i ve vysokoúčinné membránové chromatografii, která slouží především pro separaci vysokomolekulárních látek. Separační médium je pak nanejvýš několik mm dlouhé [44, 45]. Jedná se o monolity na bázi methakrylátu či polystyrenu s různými funkčními skupinami. Pod obchodní značkou CIM[®] (Convective Interaction Media) tyto monolitické kolony vyrábí firma BiaSeparations [46], jako Bio-Monolith je nabízí firma Agilent [47].

2.3. Příprava monolitických kolon

Silikagelové monolity se připravují z koloidního roztoku. Chemická přeměna alkoxysilanového roztoku na křemenný gel je obvykle dějem dvou druhů reakcí, hydrolýzou a polykondenzací [48]. Typická příprava spečených křemenných „fused silica“ kapilárních kolon spočívá v přípravě homogenního koloidního roztoku [48-51]. Jako vhodný alkoxysilan se nejčastěji používají tetramethoxysilan či tetraethoxysilan. Pro kontrolu velikosti a objemu makroporů v monolitu se přidává ve vodě rozpustný polymer polyethylenglykol, pro tvorbu mesoporů se přidává

močovina a kyselina octová. Tato směs je poté homogenizována při nízké teplotě a následně je vysušená kapilára naplněna tímto roztokem a ponechána reagovat při zvýšené teplotě. V dalším kroku je teplota zvýšena až na 120 °C pro vytvoření mesoporů díky tvorbě čpavku z močoviny [51]. Na to je monolit promyt vodou a methanolem a při 300 °C ponechán pro rozložení nezreagovaných složek. Poté je monolit modifikován tokem roztoku oktadecyldimethyl-N,N-diethylaminosilanu při zvýšené teplotě pro tvorbu C18 fáze. Ze zjednodušeného postupu přípravy je vidět, že příprava monolitů na bázi silikagelu je velmi jednoduchá, finančně nenáročná a kolony jsou připraveny během několika dní.

Pro přípravu monolitů na bázi organického polymeru je většinou nutné před naplněním kapiláry její vnitřní povrch silanizovat pro pevné uchycení vzniklého monolitu. Jedním z nejvíce rozšířených silanizačních činidel je 3-(trimethoxysilyl)-propylmethakrylát. Methoxy skupiny tohoto činidla vytvářejí se silanolovými skupinami na povrchu kapiláry kovalentní vazbu [52]. Přítomná dvojná vazba methakrylátu se pak účastní tvorby monolitu s monomerní složkou během polymeračního procesu.

Tvorba monolitu na bázi organického polymeru se řídí radikálovou polymerací. Polymerizační směs je složena z monovinylového monomeru, divinylového monomeru jinak také označovaného jako síťovadlo, porogenních rozpouštědel a iniciátoru polymerace. Pro tvorbu monolitů je možné využít monomer ze široké škály chemických sloučenin. Výběrem vhodného monomeru můžeme ovlivnit výsledné vlastnosti vzniklého monolitu. Je také možné použít takový monomer, který se po vzniku polymeru může vhodně modifikovat [53].

Porogenním rozpouštědlem jsou většinou látky, které dobře rozpouštějí složky polymerační směsi, ovšem nerozpouštějí vzniklý polymer. Jelikož vznikající polymer není rozpustný v porogenních solventech, je spíše solvatován monomerními jednotkami, a tím je podporován jeho růst [40]. Volbou vhodného porogenního rozpouštědla se mohou ovlivnit porézní vlastnosti vzniklého polymeru, ale bez efektu na chemické složení monolitu.

Množství síťovadla v polymerizační směsi má nejen vliv na velikost pórů, ale také vliv na chemické složení finálního monolitu. Čím více síťovadla obsahuje polymerizační směs, tím větší je specifický povrch monolitu a menší velikost vzniklých pórů [54].

Velký vliv na vlastnosti monolitických kolon má také způsob iniciace polymerace. Jednou z nejčastěji používaných metod je tepelně iniciovaná polymerace. Všeobecně platí, že s rostoucí teplotou iniciace roste rychlost vzniku polymeru. Nejčastěji používaným iniciátorem při termické iniciaci jsou benzoylperoxid nebo α,α' -azobisisobutyronitril (AIBN) [55-57]. Dalším možným způsobem polymerace je polymerizace za laboratorní teploty využívající chemické iniciace. Vhodným katalyzátorem obvykle bývá TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, který po reakci s peroxodisíranem vytváří volné radikály, a tím umožňuje růst monolitu [58, 59]. Tento způsob přípravy je spíše používán pro monolity na bázi akrylamidu, na rozdíl od methakrylátových kolon, kde se většinou aplikuje termická iniciace. Další možný způsob iniciace je fotopolymerace prováděná většinou za laboratorní teploty, a proto je možné použít i porogenní rozpouštědla s nižším bodem varu, která nemohou být použita při termické iniciaci. Ojedinelým způsobem iniciace pro přípravu methakrylátových kolon bývá iniciace γ -zářením [60].

2.4. Methakrylátové monolitické kolony

Od roku 1997, kdy Peters a kol. [30] poprvé publikovali práci o methakrylátových monolitech, stal se tento typ monolitu objektem zájmu mnoha výzkumných skupin. Tyto kolony našly uplatnění v mnoha modech kapalinové chromatografie – např. v reverzním modu [61], normálním modu [62], ale také v iontově-výměnné chromatografii [63, 64] nebo afinitní chromatografii [65, 66].

Díky možnosti širokého výběru monomerů je tato skupina monolitů schopna dělit rozsáhlou skupinu látek, přes nízkomolekulární látky [61] až po vysokomolekulární látky, jako jsou peptidy [66-68], oligonukleotidy [69] či chirální molekuly [70].

Nejrozšířenějším monomerem pro přípravu methakrylátových monolitů je glycidylmethakrylát (2,3-epoxypropylmethakrylát, GDM) obsahující reaktivní skupinu, kterou je možné různě derivatizovat [61, 63, 71]. Používají se i další estery, od jednoduchých velmi často používaný butylmethakrylát [72-74], ale po delší

řetězce jako jsou oktyl-, lauryl-, oktadecyl- či isobornylmethakrylát, jejichž příprava a testování byly popsány v pracích [75, 76].

Nejpoužívanějším síťovadlem v oblasti methakrylátových monolitů je ethylenglykoldimethakrylát (EDMA) [30,61,72], ale je možné použít i jiných chemických látek, např. trimethylolpropantrimethakrylátu (TRIM) [77, 78].

Methakrylátové monolitické kolony našly uplatnění nejdříve v kapilární elektrochromatografii (CEC) až poté se zájem přesunul na kapilární kapalinovou chromatografii, tudíž i jejich samotná příprava vychází z kolon použitých pro elektrochromatografii [30, 39]. V elektrochromatografii je elektroosmotický tok generován vloženým napětím, zatímco v kapilární kapalinové chromatografii je hydrodynamický tok způsoben použitým tlakem, a proto příprava stacionární fáze pro CLC byla upravena [72]. Polymerizační směs neobsahuje nabitý monomer, kterým bývá nejčastěji AMPS (2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonová) [30] a rovněž obsah síťovadla, EDMA, byl optimalizován. V případě butylmethakrylátových kolon je nejčastěji používaným porogenním solventem binární směs propan-1-olu a butan-1,4-diolu [72]. Nejčastějším druhem polymerizace butylmethakrylátových kolon je termická iniciace, kdy je do polymerizační směsi přidán AIBN a kolona je pak po dobu několika hodin termostatována.

2.5. Separace oligonukleotidů na monolitických kolonách

Oligonukleotidy díky své charakteristické struktuře, která se skládá z několika rozličných částí, mohou být separovány různými druhy chromatografie. Oligonukleotidy ve své molekule obsahují lipofilní nukleové base, jejichž struktura a sekvence má vliv na jejich chromatografické chování v reverzní chromatografii [79, 80]. A protože se jedná o polyanionty obsahující fosfáty, je jejich separace také možná iontově-výměnnou chromatografií [81, 82] či iontově párovou chromatografií [83, 84]. Jelikož se také mohou lišit ve své délce, lze je separovat vylučovací chromatografií [85]. Když se na molekulu oligonukleotidu podíváme, jedná se o velmi polární látky, které lze separovat v HILIC modu (Hydrophilic Interaction Chromatography) [86]. Oligonukleotidy se také velmi často díky své schopnosti nést

elektrický náboj separují pomocí kapilární elektroforézy [87, 88] či elektrochromatografie [89].

V poslední době kromě klasických kolon narůstá počet publikací využívající monolitické kolony pro separaci oligonukleotidů. Pro iontově výměnnou separaci byly použity např. kolony na bázi glycidylmethakrylátu modifikovaného diethylaminoethylem označené Biospher GMB 1000Q [90] anebo kopolymeru 3-diethylamino-2-hydroxypropylmethakrylátu s divinylbenzenem [91]. Také monolitické kolony na bázi zesíťovaného polynorbornonu byly použity k separaci oligonukleotidů metodou iontově-párové HPLC [92], stejně tak jako polystyrendivinylbenzenové monolity [93].

V současnosti se k velmi rychlé separaci oligonukleotidů a peptidů používá iontově výměnná chromatografie s diskovými monolity CIM[®] (Convective Interaction Media), které obsahují glycidylmethakrylát-ethylendimethakrylátový [44] či styren-divinylbenzenový [94] polymer.

2.6. Experimentální záměr

Cílem této disertační práce je snaha o přípravu butylmethakrylátových kolon iniciovaných chemickou reakcí za laboratorní teploty a získání dat pro opakovatelnost přípravy těchto kolon. Použití této iniciace nebylo doposud pro methakrylátové monolity popsáno, a proto je účelem porovnat jejich separační vlastnosti s kolonami termicky iniciovanými, které již v laboratoři připravené byly [72].

Dalším cílem této práce je příprava monolitických kolon pro separace různých molekul, ať už se jedná o jednoduché aromatické sloučeniny nebo vysokomolekulární látky jako jsou oligonukleotidy či polární deriváty cyklohexanu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Chromatografická část

Pro experimenty popsané v první a třetí části kapitoly Výsledky a diskuse byly použity následující přístroje a pomůcky. Kapilární monolitické kolony byly připraveny v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 320 μm a vnějším průměrem 450 μm pokrytých vrstvou polyamidu dodávané firmou Supelco (Bellefonte, USA). Termostatování kapilár během silanizace a polymerizace bylo prováděno v sušárně UL 400 (Memmer, Schwabach, Německo). Pumpa MHPP 20 (Laboratorní přístroje, Praha, Česká republika), Valco International dávkovací ventil s vnitřní dávkovací smyčkou 60 nl (Schenkon, Švýcarsko) a Philips PU 4225 UV absorpční detektor (Eindhoven, Nizozemsko) byly použity jako součásti používaného chromatografického systému. Monolitické kolony byly k dávkovači připojeny pomocí 50 mm dlouhé PEEKové trubičky (500 μm vnitřní průměr) se šroubem a ferulkou. Pomocí teflonové trubičky byl druhý konec monolitické separační kolony připojen ke křemenné kapiláře o vnitřním průměru 100 μm , na které bylo ve vzdálenosti 75 mm vytvořeno detekční okénko. Tato 100 μm ID kapilára s detekčním okénkem byla připojena k absorpčnímu detektoru, který pracoval při nastavených vlnových délkách 214 nm a 254 nm či 210 nm a 285 nm. Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu CSW 1.7 a softwaru DataApex (Praha, Česká republika). Připravené kolony byly testovány při průtokové rychlosti od 1 do 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ při laboratorní teplotě.

Pro přípravu a testování monolitických kolon pro separaci oligonukleotidů byly použity následující přístroje a pomůcky. Všechny experimenty byly prováděny na kapalinovém chromatografu SHIMADZU (Japonsko) vybaveném programovatelným UV/VIS detektorem SPD-10AVvp s 35 nl detekční Z-celou, který byl nastaven na vlnovou délku 260 nm; HPLC pumpou LC-10ADvp (vysokotlaký binární gradientový systém) a SCL-10Avp kontrolním systémem. Jako dávkovač byl použit dvou-poziční heliem aktivovaný dávkovač s vnitřní smyčkou o objemu 60 nl (Valco, Schenkon, Švýcarsko). PEEKové biokompatibilní směšovače Tee a SS Tee (oba Valco, Schenkon, Švýcarsko) byly použity pro míchání mobilní fáze a jako splitr redukující průtokovou rychlost z běžné HPLC na mikro-HPLC.

Splitovací poměr byl nastaven na 1:100. V laboratoři vyrobený termostat s Peltierovým článkem byl použit pro kontrolu teploty kolony. Kapilární monolitické kolony byly připraveny v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 320 μm a vnějším průměru 450 μm pokrytých polyimidem, které byly dodány firmou Supelco (Bellefonte, USA). Pomocí teflonové kapiláry byly monolitické kolony připojeny k 100 μm ID křemenné kapiláře, která byla spojena se Z-celou detektoru.

2. Použité chemikálie

propan-1-ol (99%) – *Fluka (Buchs, Švýcarsko)*

butan-1,4-diol (99%) – *Fluka (Buchs, Švýcarsko)*

acetic acid (99%) – *Fluka (Buchs, Švýcarsko)*

cyklohexan-1-ol (99%) – *Aldrich (Steinheim, Německo)*

dodekan-1-ol (99%) – *Aldrich (Steinheim, Německo)*

acetonitril (gradient grade) – *Merck (Darmstadt, Německo)*

peroxodisíran amonný (98%) – *Merck (Darmstadt, Německo)*

uracil (99%) – *Sigma (St. Louis, USA)*

anilin (99%) – *Sigma (St. Louis, USA)*

anthracen (99%) – *Sigma (St. Louis, USA)*

benzen (99%) – *Sigma (St. Louis, USA)*

etylbenzen (99%) – *Sigma (St. Louis, USA)*

fenol (99%) – *Sigma (St. Louis, USA)*

toluen (99,5%) – *Sigma (St. Louis, USA)*

hydroxid sodný (99%) – *Sigma (St. Louis, USA)*

Milli Q voda – *Millipore Corp.,(USA)*

triethylamin acetát (TEAA; koncentrace 2.0 M) – *Transgenomic Bioconsumables (Glasgow, Skotsko)*

nemodifikované fosfodiester oligonukleotidy – syntetizovány ve firmě *Generi Biotech s.r.o.* (Hradec Králové, ČR)

adenin (99%) – *Aldrich (Steinheim, Německo)*

cytosin (99%) – *Aldrich (Steinheim, Německo)*

thymin (99%) – *Aldrich (Steinheim, Německo)*

guanin (99%) – Aldrich (Steinheim, Německo)

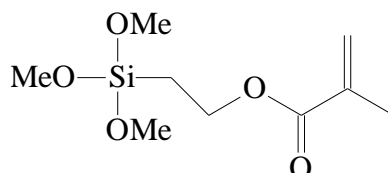
adenin deoxyribonukleosid monofosfát (99%) – Fluka (Buchs, Švýcarsko)

cytosin deoxyribonukleosid monofosfát (99%) – Fluka (Buchs, Švýcarsko)

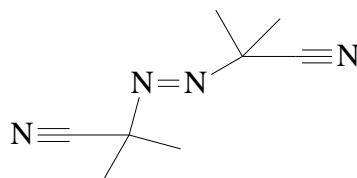
guanin deoxyribonukleosid monofosfát (99%) – Fluka (Buchs, Švýcarsko)

thymin deoxyribonukleosid monofosfát (99%) – Fluka (Buchs, Švýcarsko)

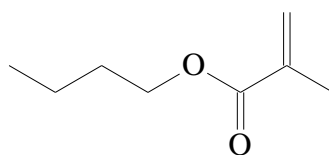
3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylát (γ -MAPS) (99%) – Fluka (Buchs, Švýcarsko)



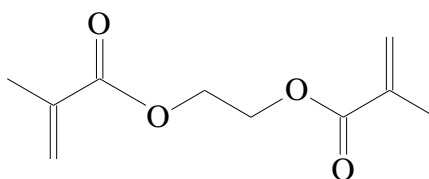
α,α' -azobisisobutyronitril (AIBN) (98%) – Merck (Darmstadt, Německo)



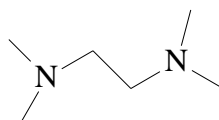
butylmethakrylát (BMA) (99%) – Merck (Darmstadt, Německo)



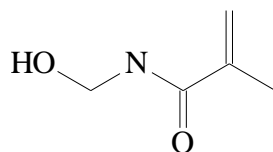
ethylenglykoldimethakrylát (EDMA) (98%) – Merck (Darmstadt, Německo)



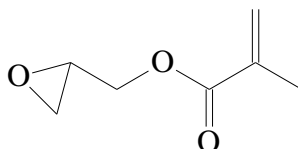
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) – Sigma (St. Louis, USA)



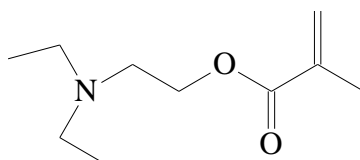
N-(hydroxymethyl)methakrylamid (HMMAA) (52-55% hm. ve vodě) – Aldrich (Steinheim, Německo)



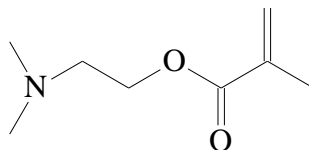
glycidylmethakrylát (2,3-epoxypropylmethakrylát, GDM) – Aldrich (Steinheim, Německo)



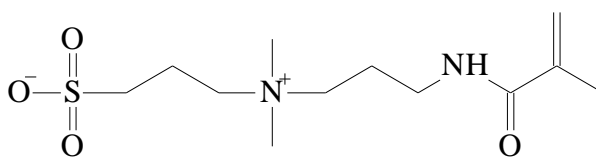
2-(diethyl)aminoethyl methakrylát (DEAEM) - Aldrich (Steinheim, Německo)



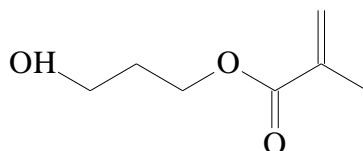
2-(dimethyl)aminoethyl methakrylát (DMAEM) - Aldrich (Steinheim, Německo)



[3-(methakryloylamino)propyl]-dimethyl(3-sulfopropyl)amonium hydroxid (MAPDS) (96%) – Aldrich (Steinheim, Německo)



(2-hydroxy)ethylmethakrylát (HEMA) (97%) – Merck (Darmstadt, Německo)



3. Zpracování výsledků

Pro vyhodnocení sledovaných parametrů vypočítaných softwarem CSW byly použity následující vztahy (1-4).

retenční faktor k_i ;

$$k_i = \frac{t_{r,i} - t_m}{t_m} \quad (1)$$

počet teoretických pater N ;

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_r}{w_{(0.5)}} \right)^2 \quad (2)$$

rozlišení dvou píků eluujících vedle sebe R_S ;

$$R_S = 2 \times \left(\frac{t_{r,i} - t_{r,i-1}}{w_i + w_{i-1}} \right) \quad (3)$$

asymetrický faktor A_S ;

$$A_S = \frac{b_i}{a_i} \quad (4)$$

kde t_r značí retenční čas analytu [min], t_m retenční čas nezadržované látky [min] (jako značkovač mrtvého času byl používán uracil), $w_{(0.5)}$ šířka píku v polovině jeho výšky [min], w_i šířka píku daná průsečíkem tangente se základní linií. Hodnota a_i představuje vzdálenost mezi kolmicí z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné desetině jeho výšky, b_i je vzdálenost mezi kolmicí z vrcholu píku a sestupnou částí píku v jedné desetině jeho výšky.

Další parametry, které byly vypočítány pomocí předchozích vztahů (5-7)

výškový ekvivalent teoretického patra HETP;

$$\text{HETP} = \frac{L}{N} \quad (5)$$

index hydrofobnosti HI;

$$\text{HI} = \frac{k_{anthracen}}{k_{benzen}} \quad (6)$$

celková porozita monolitické fáze ε ;

$$\varepsilon = \frac{F_m \times t_m}{V_k} \quad (7)$$

kde L je délka separační kolony [mm], F_m je objemový průtok [$\mu\text{l}/\text{min}$] a V_k je objem kapiláry [μl].

VÝSLEDKY A DISKUSE

1. Opakovatelnost přípravy butylmethakrylátových monolitů iniciovaných chemicky peroxidisíranem amonným

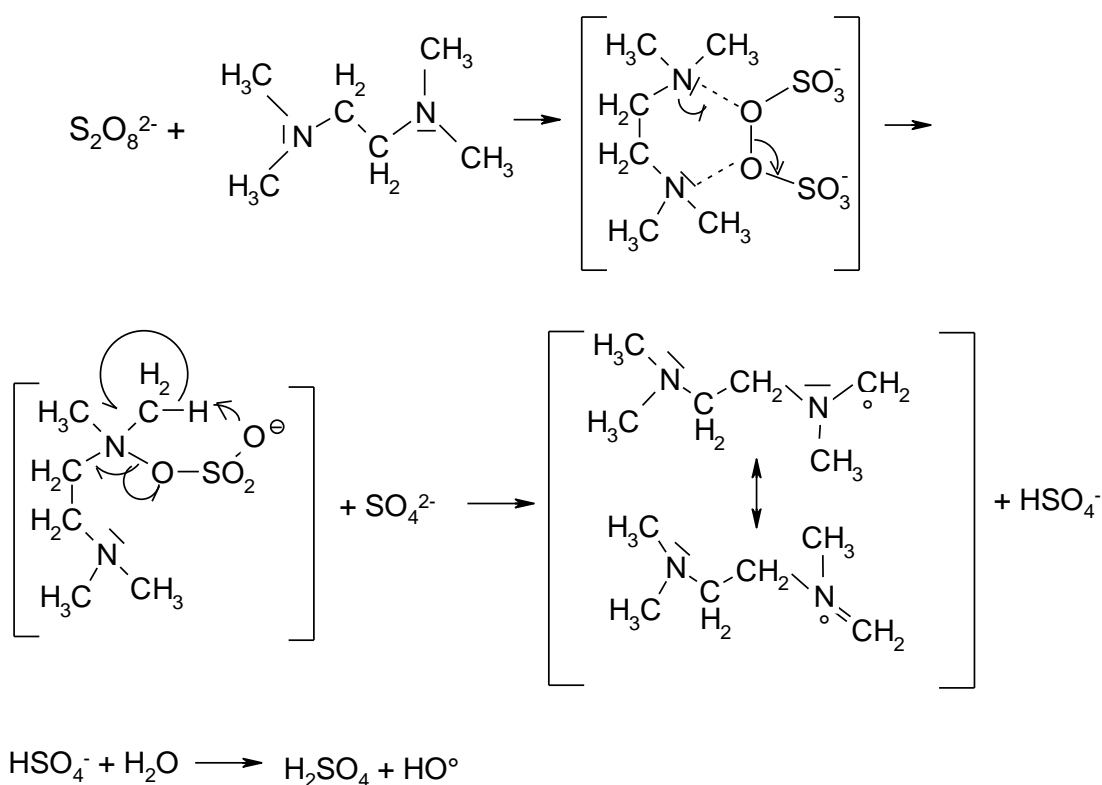
1.1. Složení polymerační směsi pro monolitické kolony

Pro přípravu monolitických kolon se používá polymerační směs, která sestává ze dvou částí – monomerní směs a porogenní směs. Jak samotné názvy napovídají, monomerní směs se skládá z monomeru, tedy látky, která je základní jednotkou monolitu, a poté ze síťovadla. Síťovadlo je látka, která je schopná propojit jednotlivé základní jednotky, aby vznikl zesíťovaný polymer. Nejčastěji používaným síťovadlem pro přípravu monolitů na bázi methakrylátů je ethylenglykoldimethakrylát (EDMA). Porogenní směs se skládá z porogenních solventů a iniciátoru polymerace. Jako porogenní solventy se používají alkoholy jako propanol, dodekanol, cyklohexanol či butan-1,4-diol, které slouží k vytváření pórů monolitu. Iniciátor je taková látka, která spouští polymerační proces. Volba iniciátoru je klíčová, reakce by měla probíhat rychle a stechiometricky, aby vznikl homogenní polymer s definovanými póry. Nejčastější iniciace je termická, kdy se do polymerační směsi přidává α, α' -azobisisobutyronitril (AIBN), který za zvýšené teploty tvoří radikály, centra, na kterých pak probíhá radikálová polymerizace.

Vhodnou volbou poměru porogenní a monomerní směsi vzniká monolit s danými vlastnostmi, především velikost mezopórů a mikropórů. V této části práce bylo cílem připravit monolitické kolony metodou chemické iniciace a porovnat je s monolity připravenými termicky. Počáteční složení porogenní a monomerní směsi bylo převzato z práce [72], ve které se pro přípravu monolitických kolon použila termická iniciace, aby si kolony připravené oběma způsoby byly co nejvíce podobné složením i vlastnostmi monolitu.

1.2. Optimalizace složení polymerační směsi pro butylmethakrylátové kolony

Ve většině publikovaných článků se k iniciaci polymerizace monolitických kolon využívá termické iniciace za přítomnosti AIBN (α,α' -azobisisobutyronitril), který je schopen za zvýšené teploty vytvářet radikály sloužící jako iniciační centra pro vznik polymeru. V případě chemicky iniciované polymerace se do polymerační směsi přidává takové množství iniciátoru, aby vznikl homogenní polymer. Tím může být peroxodisíran amonný (jako je tomu v této práci) reagující s N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminem (TEMED) za vzniku primárních radikálů, jež následně reagují s monomerem a síťovadlem. Vznik primárních radikálů probíhá jak je podrobně popsáno v **rovnici 1** [59].



Rovnice 1 Rovnice popisující iniciační mechanismus vzniku volných radikálů při polymerizačním procesu s peroxodisíranem amonným.

Pro zjištění optimálního složení polymerační směsi s chemickým iniciátorem bylo nutné zajistit, aby smíšením všech složek vznikla homogenní směs a tím byl

zaručen vznik homogenního polymeru. Nejdříve byl testován obsah peroxodisíranu amonného v porogenní směsi. Byl připraven 16,67% (% hm.) koncentrovaný roztok peroxodisíranu amonného ve vodě a byla sledována rozpustnost tohoto roztoku v porogenní směsi, aby nedocházelo k vysolování. Jak je patrné z **tabulky 1**, při použití nejméně 5% koncentrovaného roztoku soli vzniká sraženina do deseti minut, při přidavku nižšího obsahu soli nedochází ke vzniku sraženiny, při použití méně než 3% koncentrovaného roztoku sraženina ani náznak nevznikají ani po několika hodinách stání směsi při laboratorní teplotě.

Tabulka 1 Složení porogenní směsi v hmotnostních procentech (% hm.).

Porogenní směs	1	2	3	4	5	6
propan-1-ol	60	60	60	60	60	60
butan-1,4-diol	30	30	30	30	30	30
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	10	9	6	5	3	4
voda	0	1	4	5	7	6
výsledek	vysráženo	vysráženo	vysráženo	vysráženo	žádné krystalky	žádné krystalky, po 24 hod. krystalky

Všechny tyto porogenní směsi byly smíchány s monomerní směsí v poměru 60 : 40 (w/w) porogenní/monomerní směs, který byl převzat z práce [72], a bylo sledováno, zdali se vytvoří homogenní roztok; viz **tabulka 2**. Všechny tyto polymerní směsi byly dále podrobeny termické iniciaci (přídavek AIBN, 1 % (w/w) z monomerní směsi). Všechny připravené polymerační směsi kromě polymerační směsi označené I zpolymerovaly. Jak je z **tabulky 2** patrné, homogenní roztok vznikl pouze v případě polymerační směsi II. V případě vyššího obsahu soli došlo buď k jejímu vysolení v roztoku, nebo vzniku dvou nemísitelných fází. To je nejspíš důsledkem nemísitelnosti polárnějšího roztoku soli s méně polárními složkami polymerační směsi.

Tabulka 2 Vliv složení porogenní směsi v polymerační směsi* na homogenitu výsledné směsi.

	Porogenní směs				
Porogenní směs	I 60 % propanol 30 % butandiol 10 % ⊙ soli	II 60 % propanol 30 % butandiol 6 % voda 4 % ⊙ soli	III 40 % propanol 30 % butandiol 18 % voda 12 % ⊙ soli	IV 50 % propanol 30 % voda 20 % ⊙ soli	V 40 % propanol 20 % butandiol 24 % voda 16% ⊙ soli
Monomerní směs 44,95% BMA 55,05% EDMA	Poly 1 zakalení, ihned sraženina rozpustná ve vodě (nejspíše došlo k vysrážení soli)	Poly 2 čirý roztok, do hodiny sraženina, jejíž množství se během týdne nemění	Poly 3 2 fáze, během 48 hod vznik polymeru na rozhraní fází, množství se zvětšuje	Poly 4 2 fáze, během 48 hod vznik polymeru na rozhraní fází, množství roste pomalu	Poly 5 2 fáze, během 48 hod vznik polymeru na rozhraní fází, množství rychle roste

BMA – butylmethakrylát

EDMA – ethylendimethakrylát

⊙ soli – 16,67% roztok $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

*Polymerační směs vznikla smíšením dané porogenní směsi (60%) a monomerní směsi (40%).

Tabulka 3 Vliv množství TEMEDu na vznik polymeru, veškerá procenta jako hmotnostní (% hm.).

PS [%]	57,6	58,7	59,2	56,7	54,6
MS [%]	37,8	39,1	39,2	37,6	36,4
5% TEMED	4,6	2,2	1,55	5,7	9
PS/MS	1,52	1,50	1,51	1,51	1,50
polymer	2 fáze	polotuhý polymer	polymer ve vločkách	2 fáze	vše zpolymerovalo

PS – porogenní směs o složení:

60 % (% hm.) propan-1-ol

30 % (% hm.) butan-1,4-diol

4 % (% hm.) roztoku peroxidisíranu sodného 16,67% (% hm.)

6 % (% hm.) vody

MS – monomerní směs o složení:

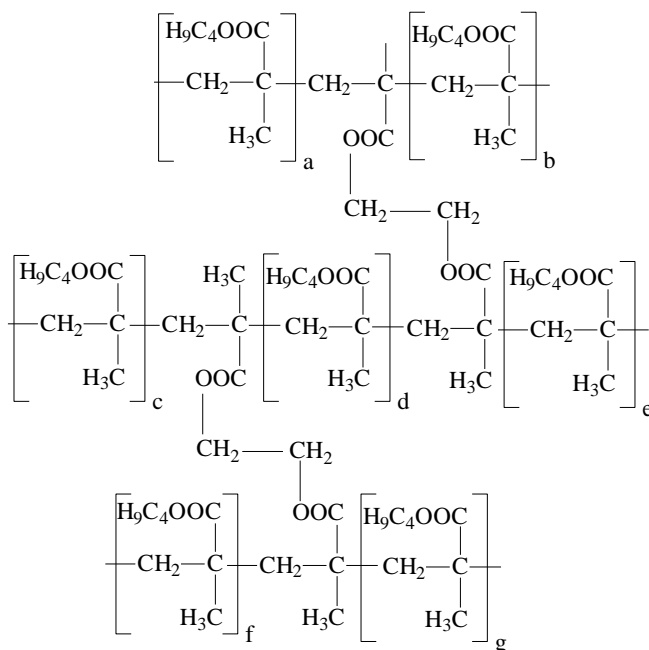
44,95 % (% hm.) butylmethakrylát

55,05 % (% hm.) EDMA

Protože pouze při použití porogenní směsi II vzniká homogenní polymerační směs, byla tato směs dále použita k zjištění optimálního množství TEMED v polymerační směsi. Protože reakce peroxodisíranu amonného a TEMED je velmi rychlá, do 30 sekund po přidání TEMED dochází ke vzniku sraženiny, byl TEMED přidáván až do výsledné polymerační směsi. Byl připraven 5% roztok TEMEDu a ten přidáván do polymerační směsi. Z **tabulky 3** je patrné, že do polymerační směsi je nutné přidat alespoň 9,0 % (w/w) roztoku TEMED, což je 53 μ l 5% roztoku na 1 g polymerační směsi, aby vznikl tuhý polymer. Polymerační roztok tuhne již v několika minutách při laboratorní teplotě, proto je zapotřebí kolony naplnit porogenní směsí velmi rychle.

Optimální složení polymerační směsi tedy bylo určeno jako 60 % porogenní směsi spolu s 40 % monomerní směsí, stejně jako je uvedeno v práci [72]. Porogenní směs obsahuje 60 % propan-1-olu, 30 % butan-1,4-diolu, 6 % vody a 4 % roztoku peroxodisíranu amonného (16,67%).

Monomerní směs je složená z 55,05 % ethylenglykoldimethakrylátu a 44,95 % butylmethakrylátu. Na jeden gram polymerační směsi je pak přidáno 55 μ l roztoku TEMED (5%). Veškerá procenta jsou uváděna jako hmotnostní. Touto směsí je pak naplněna kapilára a ponechána přes noc s oběma konci ponořenými v polymerační směsí. Na **obrázku 2** je zobrazena jednoduchá struktura vzniklého polymeru.

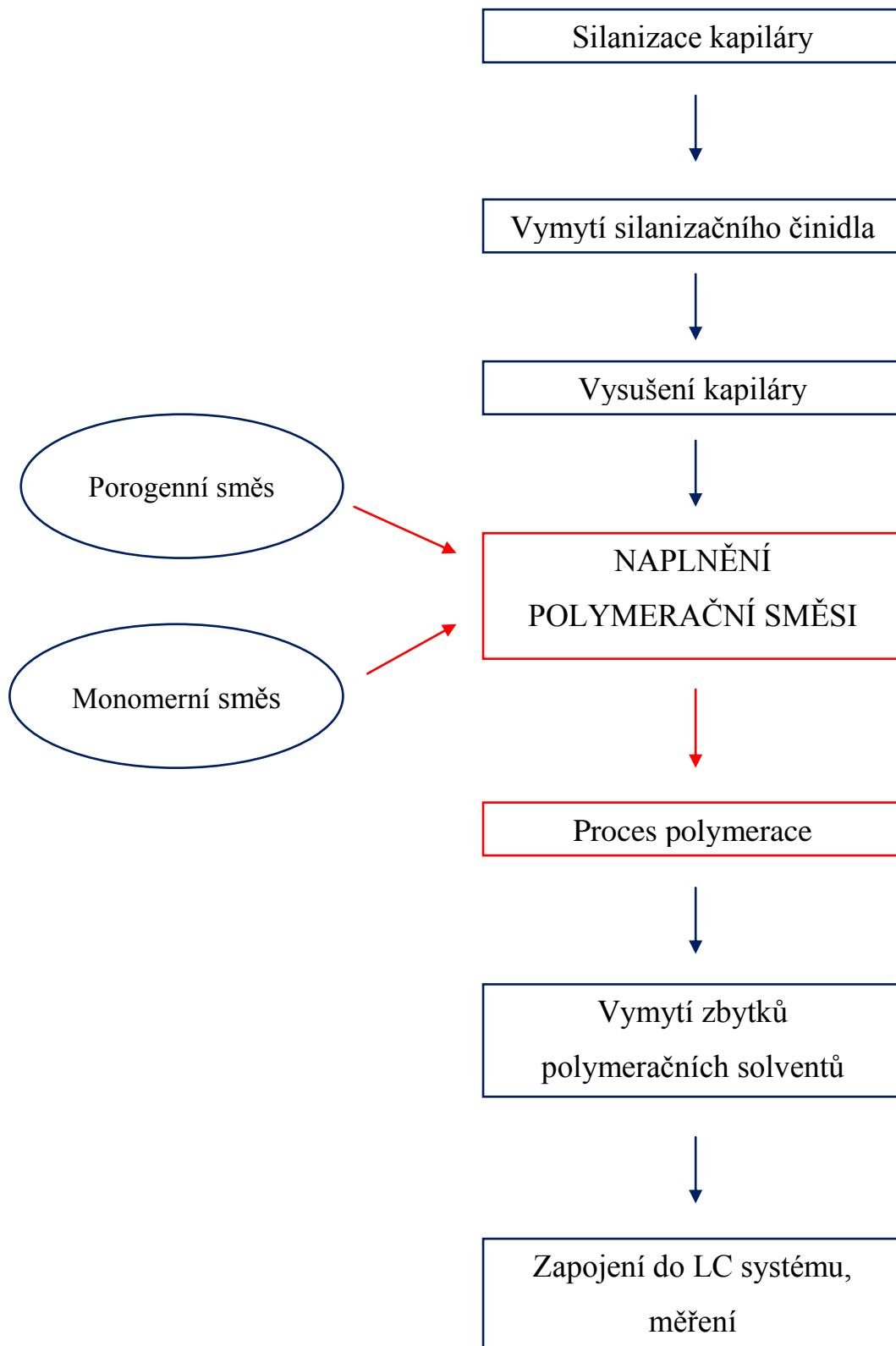


Obrázek 2 Základní chemická struktura butylmethakrylátového monolitu.

1.3. Příprava monolitických kolon

Před naplněním kapiláry polymerační směsí je nutno upravit vnitřní stěnu kapiláry tak, aby byl vzniklý polymer kovalentně navázán na stěny kapiláry. Je tedy nutné, aby na povrchu vzniklo co nejvíce reaktivních skupin; v tomto případě silanolů. Pro přeměnu neaktivních siloxanových skupin na aktivní silanolové se kapilára nejdříve promývá 1 M roztokem hydroxidu sodného po dobu 6 hodin a následně 1 hodinu deionizovanou vodou pro odstranění zbytků hydroxidu. Aby bylo možné na vnitřní stranu kapiláry kovalentně navázat polymer, je třeba vytvořit na povrchu dvojně vazby, které jsou při procesu polymerace jedním z aktivačních center. Pro zabudování dvojných vazeb na povrchu se používá (γ -methakryloyloxypropyl)trimethoxysilan (γ -MAPS) [52, 61]. Kapilára je naplněna silanizačním roztokem obsahujícím 40 μ l γ -MAPS v 10 ml 6 M kyseliny octové. Konce kapilár jsou ponechány ponořené do vialek s roztokem, a tak je kapilára termostatována při 60°C po dobu 20 hodin. Po silanizaci je kapilára promývána 1,5 hodiny deionizovanou vodou a poté vysušena proudem dusíku po dobu 5 minut.

V dalším kroku je kolona naplněna polymerační směsí a podle typu iniciace ponechána při laboratorní teplotě či při zvýšené teplotě polymerovat. Po skončení procesu polymerizace se oba konce kapiláry zaříznou, kolona je zapojena do chromatografického systému a po dobu alespoň 2 hodin promývána mobilní fází 65:35 (obj. %) acetonitril/voda, aby byly vymyty veškeré nezpolymerované složky, především porogenní solventy, voda a popřípadě sůl. Jednoduché schéma přípravy monolitických kolon je uvedeno na **obrázku 3**.



Obrázek 3 Jednoduché schéma přípravy monolitické kolony krok za krokem.

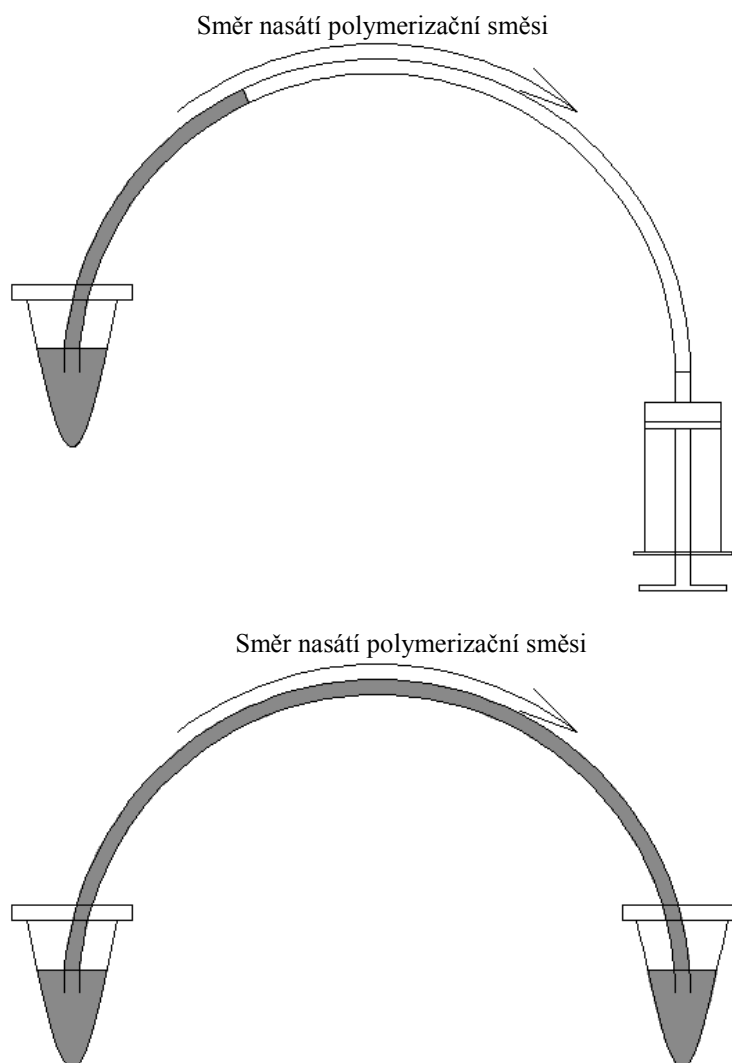
1.4. Sledování chromatografických vlastností kolon

Protože butylmethakrylátové kolony jsou svými separačními vlastnostmi podobné klasickým C18 kolonám, byly monolitické kolony podrobeny testu, který se používá pro klasifikaci klasických HPLC kolon. Pro porovnání reverzních stacionárních fází existuje několik testů. Tyto testy slouží k charakterizaci stacionárních fází, především pro zjištění indexu hydrofobnosti, aktivity silanolových skupin, sférické selektivity, případně specifitějších vlastností jako sledování iontové výměnných vlastností. Mezi nejpoužívanější testy patří nejznámější Tanaka test [95], dále pak Engelhardtův či Waltersův test [96, 97], v neposlední řadě také Galushkův test [98]. Pro testování připravených butylmethakrylátových kolon byl použit zjednodušený a upravený Waltersův test s ohledem na použití kapilárních kolon. Průtok mobilní fáze byl snížen na 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ a byla snížena i koncentrace testovaných látek.

Pro testování kolon se většinou vybírají specifické látky charakteristické svými vlastnostmi. Jako značkovač mrtvého retenčního času (resp. objemu) se nejčastěji používá uracil, který téměř neinteraguje s nepolární stacionární fází. Pro testování hydrofobicity se používá velmi nepolární látka, kterou je v případě Waltersova testu anthracen. Silanolová aktivita je počítána z retencí bazických látek schopných tvořit vodíkové můstky se stacionární fází (Walters nebo Tanaka) nebo je určována z asymetrie píku bazické komponenty (Engelhardt). Na monolitických kolonách silanolová aktivita měřena nebyla, jelikož se předpokládá, že veškeré silanolové skupiny na povrchu kapiláry zreagovaly během přípravy polymeru. Do testovací směsi byly oproti používaným látkám v originálním Waltersově testu ještě přidány anilin (bazická látka), u kterého byla sledována symetrie píku, poté ethylbenzen pro sledování schopnosti separace látek lišících se o jednotku délky alkylového řetězce (spolu s benzenem a toluenem). U všech testovaných látek byly stanoveny hodnoty symetrie píku, retenční faktory a výška teoretického patra.

1.5. Reprodukovatelnost přípravy kolon.

Bylo připraveno deset různých butylmethakrylátových kolon metodou chemické iniciace. Kapiláry byly po naplnění polymerační směsí v ní ponechány po dobu alespoň 12 hodin při laboratorní teplotě, aby byla zaručena homogenní polymerace v celé délce kapiláry. Tyto kolony byly připraveny v různé dny a naplněny čerstvě připravenou polymerační směsí. Byl sledován vliv délky kolony na separační vlastnosti a index hydrofobicity. Po polymerizaci byl také sledován vliv toku mobilní fáze v protisměru nebo po směru naplnění kapiláry polymerační směsí; viz **obrázek 4**. Pro každou kolonu byla vyhodnocena van Deemterova křivka, tedy závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na průtoku mobilní fáze.



Obrázek 4 Způsob plnění kapiláry polymerační směsí

V **tabulce 4** je uvedeno složení 10-ti testovaných kolon označených jako C1-C10. Hodnoty jsou uvedeny jako hmotnostní procenta, poměr porogenní a monomerní směsi byl 60 % porogenní směsi a 40 % monomerní směsi. Do každé polymerační směsi o hmotnosti přibližně 1 gram bylo přidáno 55 μ l roztoku TEMED a započata polymerace při laboratorní teplotě.

Tabulka 4 Složení polymeračních směsí v hmotnostních procentech a délka kolon C1 až C10.

Kolona	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
délka (cm)	16,5	16,0	17,3	16,3	18,9	29,2	17,0	29,8	17,0	21,4
BMA	18,10	18,15	17,98	17,90	17,99	17,96	17,93	17,94	17,94	17,94
EDMA	22,17	22,12	22,02	21,97	22,09	22,05	22,00	22,02	22,02	22,02
propanol	35,71	35,69	35,64	35,93	35,81	35,98	36,03	36,01	36,01	35,99
butandiol	18,04	18,00	17,88	18,21	18,14	18,00	18,02	18,02	18,02	17,95
voda	3,58	3,59	3,85	3,58	3,57	3,60	3,61	3,60	3,60	3,65
sůl	2,40	2,45	2,61	2,40	2,40	2,41	2,41	2,41	2,41	2,45

Pro kolonu C1 byla změřena pouze jedna průtoková rychlost, 4 μ l/min. Stacionární fáze C1 vykazovala velmi špatnou separaci methylové řady, tzn. benzen, toluen a ethylbenzen koeluovaly, a tvary píků všech testovaných látek byly velmi špatné.

Kolona C2 byla zapojena tak, aby mobilní fáze protékala ve směru, jakým byla nasátá polymerační směs do kapiláry. Hodnoty výšky teoretických pater testovaných látek byly vysoké, jejich hodnoty přesahovaly 100 μ m, pro anthracen dokonce až 200 μ m, separace methylové řady byla poněkud lepší, než pro kolonu C1, ovšem i tak nedostatečná.

Kolona C3 byla zapojena stejně jako předchozí kolona a měla podobné vlastnosti. Výška teoretického patra pro sledované látky se pohybovaly kolem

100 μm , pro anthracen dosahovaly hodnoty až 300 μm , separace methylové řady byla také nedostatečná.

Kolona C4 byla zapojena jako předešlé dvě kolony. Separace methylové řady nebyla dostatečná, všechny tři látky koeluovaly, výška teoretického patra pro studované látky byla vyšší než 100 μm , pro anthracen dosahovala hodnota až 250 μm .

Kolona C5 byla zapojena v protisměru nasátí polymerační směsi do kapiláry. Separace methylové řady byla vcelku dobrá, rozlišení komponent mělo hodnoty kolem 1,0 při průtoku mobilní fáze 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Výška teoretického patra pro testované látky se pohybovala kolem 100 μm , pro anthracen dosahovala hodnot kolem 250 μm .

Kolona C6 byla zapojena stejně jako kolona C5, tedy proti směru nasátí polymerační směsi, hodnoty rozlišení methylové řady a výšky teoretického patra měly shodné hodnoty jako u předešlé kolony.

Při polymeraci monolitu označeného jako C7 došlo k nasátí vzduchové bubliny, která se nacházela 7 cm od konce kapiláry. I přesto byla zkoušena separace na této koloně, ovšem mobilní fáze nebyla protlačena. Po odstranění části kolony s nehomogenní částí monolitu mobilní fáze již kolonou protékala. Vzniklá kolona byla kolem 10 cm dlouhá, tudíž by nebylo docíleno dostatečné separace testovaných látek.

Kolona C8 byla připravená v délce téměř 30 cm a zapojena stejně jako kolona C5 a C6. Separace methylové řady byla výtečná, rozlišení přesahovalo hodnoty 1,5 při průtoku mobilní fáze 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, tedy tyto látky byly rozdělené z více jak 99 %, ovšem druhou, nepříjemnou stránkou byla až dvojnásobně dlouhá separace spojená s délkou kolony. Výška teoretických pater pro testované látky se pohybovala kolem 100 μm , pro anthracen kolem 300 μm .

Kolona C9 je zkrácená kolona C8 na délku 17 cm, aby bylo možno porovnat její separační schopnosti s ostatními kolonami. Separace methylové řady byla stále dostatečná, hodnoty rozlišení se pohybovaly kolem 1,1 při průtoku mobilní fáze 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Výška teoretických pater byla totožná s nezkrácenou formou, kolonou C8.

Kolona C10 byla do chromatografického systému, stejně jako předchozí kolony, zapojena v protisměru polymerizace. Rozlišení methylové řady bylo dostačující, hodnoty se pohybovaly kolem 1,5. Výška teoretických pater pro

testované látky se pohybovala kolem 100 μm , pro anthracen dosahovala hodnoty až 300 μm .

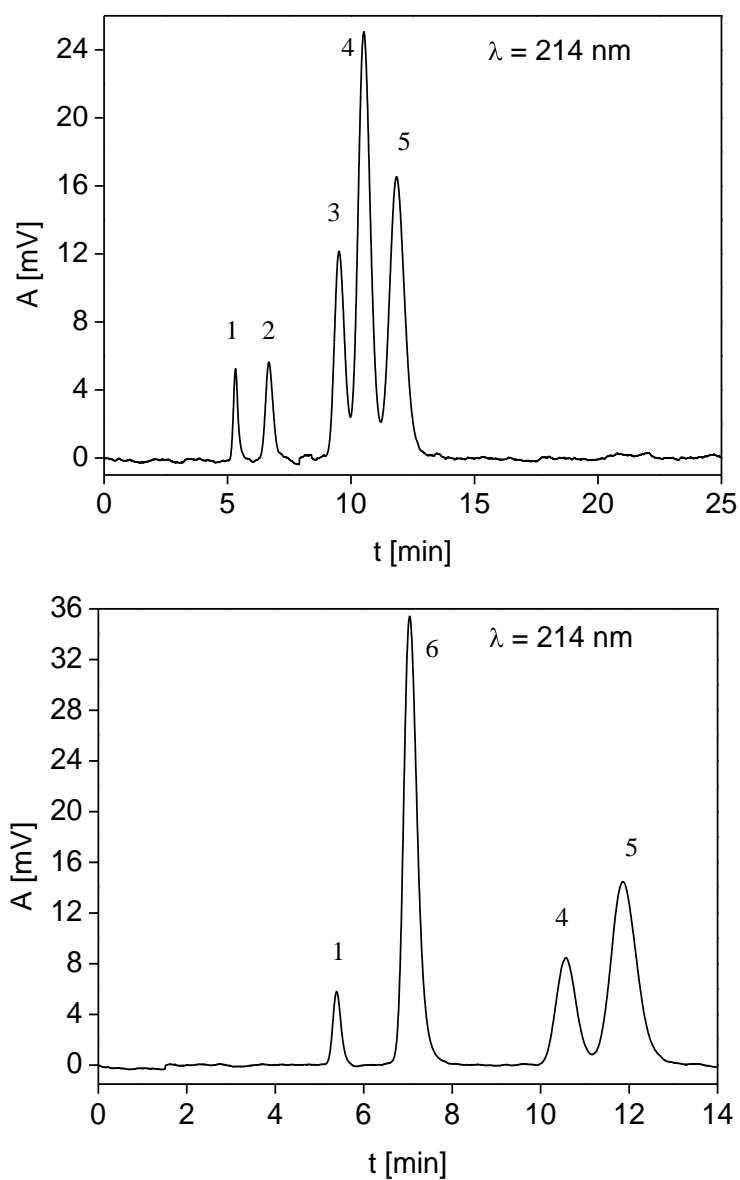
V **tabulce 5** jsou uvedeny hodnoty retenčních faktorů a výšky teoretického patra některých testovaných látek získaných pro kolony C2, C4, C5, C7 a C9. Jak je z výsledků patrné, kolony zapojené do systému proti směru naplnění kapiláry polymerační směsi vykazují lepší výsledky. Tyto kolony vykazují lepší separační schopnosti, tzn. rozlišení methylové řady dosahuje vyšších hodnot, testované látky mají nižší ekvivalenty výšky teoretického patra. Hodnoty retenčních faktorů jsou velmi podobné, nezávislé na směru průtoku mobilní fáze. Rozdíly v hodnotách retenčních faktorů a asymetrie píků mohou být způsobené zapojením kolony do chromatografického systému. Jestliže byla kolona špatně seříznuta, došlo k vytvoření mrtvého objemu, který rozmyl píky stanovovaných látek, a tím zkreslil výsledné hodnoty retenčních faktorů a případně symetrie píku.

Tabulka 5 Průměrné hodnoty retenčních faktorů (k) a výšky teoretického patra (HETP) při průtokové rychlosti 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ pro kolony C2, C4, C5, C7 a C9.

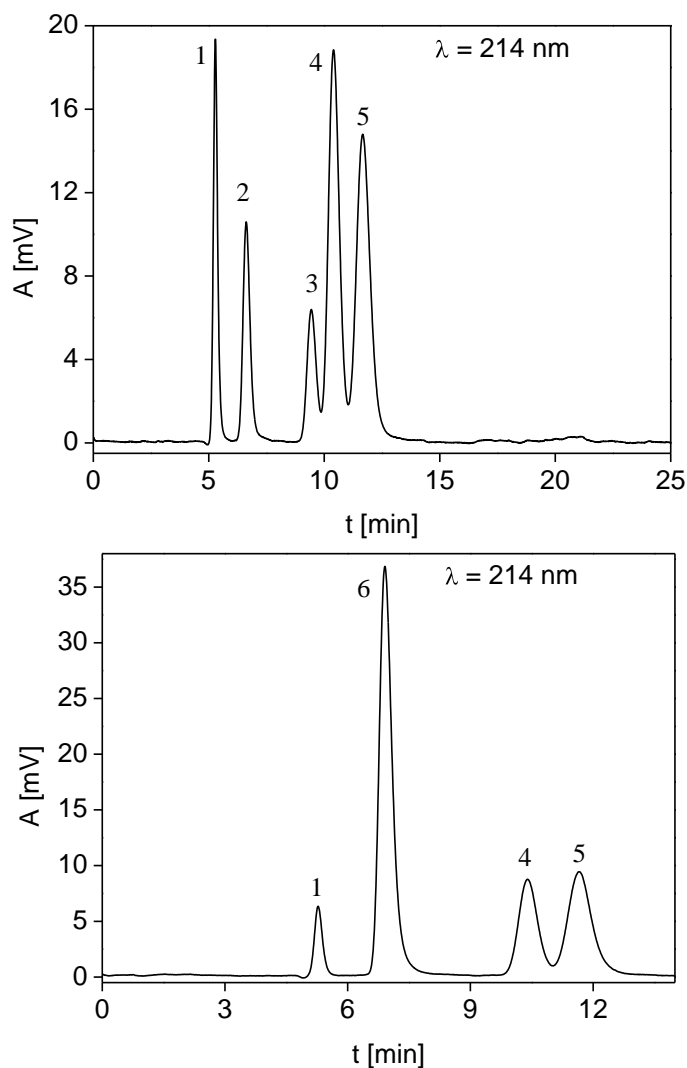
Látka	C2		C4		C5		C6		C9	
	k	HETP	k	HETP	k	HETP	k	HETP	k	HETP
		(μm)		(μm)		(μm)		(μm)		(μm)
uracil	-	177	-	101	-	51	-	66	-	74
fenol	0,22	138	0,16	111	0,24	85	0,18	82	0,25	123
anilin	0,26	140	0,22	104	0,31	78	0,22	76	0,31	138
benzen	0,64	129	0,50	102	0,79	88	0,53	84	0,79	99
toluen	0,77	204	0,63	110	0,98	93	0,67	88	0,98	88
anthracen	2,38	240	1,86	210	3,03	210	2,00	200	2,94	290

Z výsledků je také patrné, že délka kolony kolem 18 cm je plně dostačující k separaci všech testovaných látek. Chromatogramy separace testovaných látek získané na kolonách C5 a C9 jsou zobrazeny na **obrázcích 5 a 6**. Separace benzenu, toluenu a ethylbenzenu není úplná, ale je možné identifikovat jednotlivé komponenty

a vyhodnotit jejich asymetrii, HETP a retenční faktor. Separace na těchto dvou kolonách jsou téměř identické, čemuž odpovídají také vypočítané hodnoty retenčních faktorů uvedené v **tabulce 5**.



Obrázek 5 Chromatogramy separací uracilu (1), fenolu (2), benzenu (3), toluenu (4), ethylbenzenu (5) a anilinu (6) na koloně C5. Mobilní fáze acetonitril/voda (65:35, obj. %); průtoková rychlost 2 μ l/min, vlnová délka detekce $\lambda = 214$ nm.



Obrázek 6 Chromatogramy separací uracilu (1), fenolu (2), benzenu (3), toluenu (4), ethylbenzenu (5) a anilinu (6) na koloně C9. Mobilní fáze acetonitril/voda (65:35, obj. %); průtoková rychlost 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, vlnová délka detekce $\lambda = 214 \text{ nm}$.

Z naměřených hodnot retenčních faktorů benzenu a anthracenu byly vypočítány hodnoty indexu hydrofobnosti (HI) dle Walterse, který se vypočítá jako poměr retenčních faktorů anthracenu a benzenu. Z parametrů kolony a retenčního času uracilu, tedy značkovače mrtvého objemu, byly vypočteny hodnoty porozity připravených kolon. Tyto hodnoty pro kolony C5, C6, C8 (C9) a C10 jsou uvedené v **tabulce 6**. Jak je z hodnot patrné, index hydrofobicity je prakticky pro všechny uvedené kolony totožný, stejně jako hodnoty celkové porozity kolon. Rozdíly v celkové porozitě jsou způsobené i nepatrnými odlišnostmi ve složení polymerační směsi. I malé rozdíly ve složení monolitu mají za následek znatelné změny vlastností

monolitu, jako je velikost pórů či separační schopnosti [40]. Jiné hodnoty porozity mohou být také dány různou teplotou při procesu polymerace, jelikož tyto kolony byly připravovány v jiný den, v jiném ročním období a teplota v laboratoři nebyla kontrolována.

Tabulka 6 Indexy hydrofobicity (HI) a celková porozita kolon C5, C6, C8 (C9) a C10.

Kolona	HI	Celková porozita
C5	3,8 ± 0,1	0,774
C6	3,8 ± 0,1	0,810
C8 (C9)	3,7 ± 0,1	0,777
C10	3,9 ± 0,1	0,778

1.6. Optimální butylmethakrylátová kolona

Z výsledků reprodukovatelnosti přípravy a zapojení kolon do systému LC bylo zjištěno, že nejlepšímu složení monolitu odpovídá složení popsané v odstavci 1.2. Jako ideální délka kolony, kdy jsou sloučeniny methylové řady jako benzen, toluen, ethylbenzen ještě částečně rozděleny a retenční časy při průtoku 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ reálné, byla určena délka 18 cm. Z výsledků předchozí kapitoly je zřejmé, že ideální zapojení do chromatografického systému je proti směru toku polymerizační směsi, kdy kolony vykazovaly vyšší účinnost i lepší separaci zmíněné methylové řady.

1.7. Opakovatelnost přípravy butylmethakrylátových kolon

Pro zjištění opakovatelnosti přípravy monolitických kolon při laboratorní teplotě s peroxodisíranem amonným jako iniciátorem byla připravena jedna polymerační směs, jejíž složení je uvedeno v **tabulce 7**. Kolony A, B a C byly připravené v jednom dni, do měření byly ponechány v polymerační směsi bez vymytí zbytků polymeračních rozpouštědel.

Složení polymerační směsi pro kolonu D připravenou termicky iniciovanou polymerací je také uvedeno v **tabulce 7**. Kolona D byla po naplnění polymerační směsí polymerizována po dobu 20 hodin při teplotě 60°C. Kolona D byla připravena dle [72], abychom porovnali vlastnosti monolitů připravených těmito dvěma způsoby.

Tabulka 7 Složení polymeračních směsí kolon A, B, C a D.

Složky polymerační směsi		Kolona A, B a C	Kolona D
		% (w/w)	% (w/w)
monomer	BMA	18,0	17,8
síťovadlo	EDMA	22,0	21,8
porogenní rozpouštědla	propan-1-ol	36,0	36,0
	butan-1,4-diol	18,0	18,0
	voda	3,6	6,0
iniciátor	AIBN		0,4
	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	2,4	-
	TEMED	55 µl	-

1.7.1. Index hydrofobnosti a porozita kolon A, B, C a D

Pro porovnání chromatografických vlastností kolon připravených výše popsaným způsobem, byly připraveny tři identické kolony A, B a C chemicky iniciovanou polymerací při laboratorní teplotě a jedna kolona D termicky iniciovanou polymerací při 60°C podle [72]. Z hodnot retenčních faktorů anthracenu a benzenu byly vypočteny hodnoty indexu hydrofobicity dle Walterse, které jsou uvedeny v **tabulce 8**. Jak je z hodnot v tabulce patrné, tyto indexy jsou pro všechny čtyři kolony přibližně stejné, pouze kolona připravená termicky iniciovanou polymerací má nepatrně vyšší hodnotu než ostatní. Velikosti indexů odpovídají hodnotám charakteristickým pro komerční C18 stacionární fáze [72].

U všech 4 kolon byla také vypočítána celková porozita kolon, pomocí retenčního času uracilu, jako značkovače mrtvého času a vnitřních parametrů kolon. Z hodnot uvedených v **tabulce 8** vyplývá, že kolony připravené za laboratorní

teploty s chemickým iniciátorem vykazují vyšší porozitu, než kolona připravená termickou iniciací. Vyšší hodnoty jsou nejspíše způsobené tím, že polymerizace je chemický proces závislý na polymerizační teplotě, a jak je popsáno v článku [99], čím vyšší teplota polymerizace, tím menší je pozorována velikost pórů, a proto je celková porozita kolony D menší. Na druhé straně, obsah anorganické soli v polymerizační směsi kolon A, B a C, může vést ke zvyšování velikosti pórů díky vysolovacímu efektu [61, 100, 101].

Tabulka 8 Indexy hydrofobicity (HI) a celková porozita kolon A, B, C a D.

Kolona	HI	Celková porozita
A	$3,6 \pm 0,1$	0,790
B	$3,6 \pm 0,1$	0,777
C	$3,7 \pm 0,1$	0,818
D	$3,9 \pm 0,1$	0,679

1.7.2. Opakovatelnost přípravy monolitických methakrylátových kolon

Pro sledování opakovatelnosti přípravy methakrylátových kolon A, B a C byly vyhodnoceny retenční faktory, asymetrie a výška teoretického patra pro testované látky – uracil, fenol, benzen, ethylbenzen, toluen a anthracen. Průměrné hodnoty a relativní standardní odchylky jsou pro jednotlivé kolony uvedeny v **tabulce 9**. Jak je z hodnot patrné, retenční faktory studovaných látek jsou u kolon připravených chemicky iniciovanou polymerizací vyšší než u kolony D, připravené termickou iniciací. Kolona D se tedy jeví jako více hydrofobní, jak také vyplývá z hodnot indexů hydrofobnosti uvedených v **tabulce 8**. U všech testovaných kolon nejsou patrné velké rozdíly v hodnotách asymetrických faktorů jednotlivých látek a také hodnoty separační účinnosti se liší pouze nepatrně.

Z průměrných hodnot retenčních faktorů, asymetrických faktorů a výškových ekvivalentů teoretických pater pro kolony A až D vypočítaných v **tabulce 9** můžeme tvrdit, že kolony připravené chemicky iniciovanou polymerizací mají vzájemně podobný charakter, který je od kolony D rozdílný. Tento fakt také potvrzují hodnoty indexů hydrofobicity uvedené v **tabulce 8**.

Tabulka 9 Průměrné hodnoty a relativní standardní odchylky (RSD) retenčních faktorů (k), asymetrických faktorů (A_S) a výšky teoretického patra (HETP) při průtokové rychlosti 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ pro kolony A, B, C a D.

Parametry Kolony Látky	A_S		k		HETP	
	průměr	RSD %	průměr	RSD %	průměr	RSD %
<i>kolona A</i>						
uracil	1,24	3,9	-	-	30	1,6
fenol	1,27	3,7	0,13	3,8	35	5,6
anilin	1,34	1,0	0,17	4,8	37	2,5
benzen	1,48	4,2	0,38	1,3	31	5,2
toluen	1,34	3,7	0,48	1,5	35	5,5
ethylbenzen	1,58	6,5	0,58	1,9	42	7,9
anthracen	1,79	2,7	1,39	1,7	132	16,0
<i>kolona B</i>						
uracil	1,40	14,3	-	-	32	11,8
fenol	1,94	5,1	0,18	2,8	78	2,6
anilin	1,68	1,6	0,20	2,5	66	2,7
benzen	1,66	13,2	0,49	1,1	61	5,9
toluen	1,26	5,8	0,57	1,6	67	5,7
ethylbenzen	1,57	4,4	0,74	1,0	87	4,6
anthracen	1,50	21,1	1,89	1,0	310	20,6
<i>kolona C</i>						
uracil	1,33	4,9	-	-	50	6,4
fenol	1,38	16,1	0,15	0,0	61	1,3
anilin	1,57	1,8	0,18	0,0	54	0,9
benzen	1,69	5,2	0,44	2,6	68	7,4
toluen	1,51	3,3	0,54	3,6	68	5,6
ethylbenzen	1,48	4,8	0,68	4,0	63	2,7
anthracen	1,34	4,5	1,63	0,9	122	7,4
<i>kolona D</i>						
uracil	1,75	5,4	-	-	59	9,7
fenol	1,52	6,3	0,43	2,2	83	5,2
anilin	1,43	2,0	0,51	1,6	66	3,8
benzen	1,73	8,5	1,27	1,9	51	2,3
toluen	1,41	4,8	1,58	1,6	60	3,8
ethylbenzen	1,40	8,8	2,00	1,1	66	6,8
anthracen	1,25	2,0	5,18	1,0	70	14,3

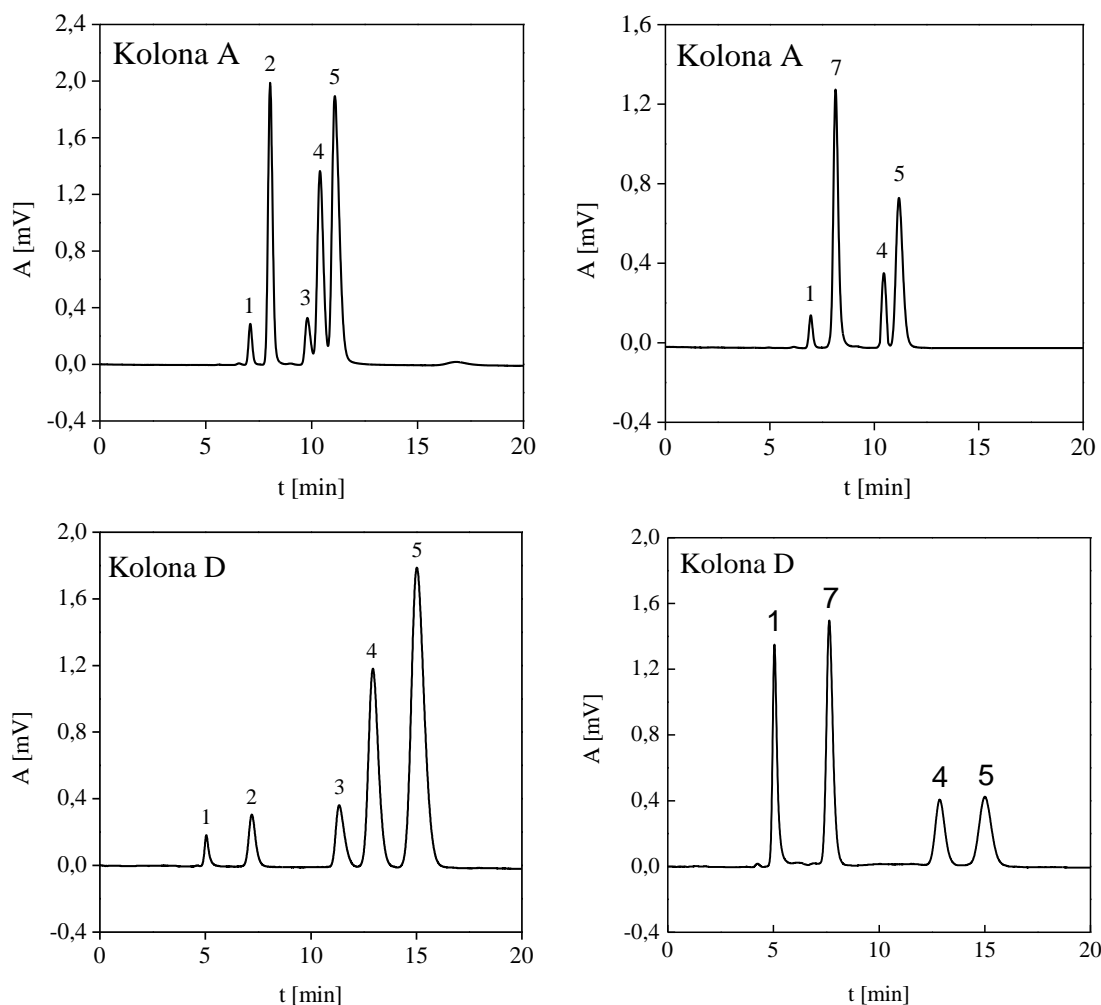
Výškový ekvivalent teoretického patra je pro všechny testované látky nižší u kolony A než u zbývajících kolon. Nejvyšší hodnoty HETP byly nalezeny pro anthracen, který je nejvíce hydrofobní. Při porovnání hodnot HETP je možné vypočítat, že čím vyšší retenční faktor testovaná látka má, tím nižší je chromatografická účinnost.

Pořadí eluce testovaných sloučenin je stejná jako je tomu u komerčních C18 kolon. Asymetrické faktory testovaných látek se pohybují v rozmezí 1,24 – 1,94, a to i pro silně polární látky jakými jsou fenol a anilin. Nízké hodnoty asymetrie píků jsou důsledkem reakce silanolových skupin při tvorbě stacionární fáze, a tím zabránění tvorbě vodíkových vazeb mezi monolitem a testovanou látkou. Toto je jedna z výhod monolitických kolon oproti komerčním reverzním kolonám.

Na **obrázku 7** jsou prezentovány chromatogramy dvou směsí testovaných látek. Poněkud horší rozlišení na koloně A oproti koloně D je na druhou stranu vykoupeno kratším časem analýzy. Při snížení průtokové rychlosti je možné dosáhnout lepšího rozlišení, ovšem doba analýzy se prodlouží.

Pro sledování účinnosti kolon byly sestrojeny van Deemterovy křivky. Na **obrázku 8** jsou jako příklad ukázány závislosti výšky teoretických pater na průtokové rychlosti pro kolony B a D. Hodnoty HETP pro průtokovou rychlost 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ nepřesahují velikost 60 μm pro testované kolony; hodnoty pro anthracen nejsou uvedeny. Kolona A se jeví jako nejúčinnější, hodnoty HETP nepřesahují 40 μm pro průtokovou rychlost 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pro určení je tato hodnota 29 μm , což odpovídá 35 000 pater/m. Tato hodnota je srovnatelná s hodnotami účinností běžných komerčních kolon.

Jak je z grafů zřejmé, závislost HETP na průtokové rychlosti je lineární, na rozdíl od van Deemterovy závislosti pro klasické plněné C18 kolony. Je tedy zřejmé, že pro sledované průtoky eluentu má hlavní podíl na účinnosti monolitických kolon odpor proti přenosu hmoty v mobilní a stacionární fázi, kdežto molekulární a turbulentní difúze nemají takový vliv.

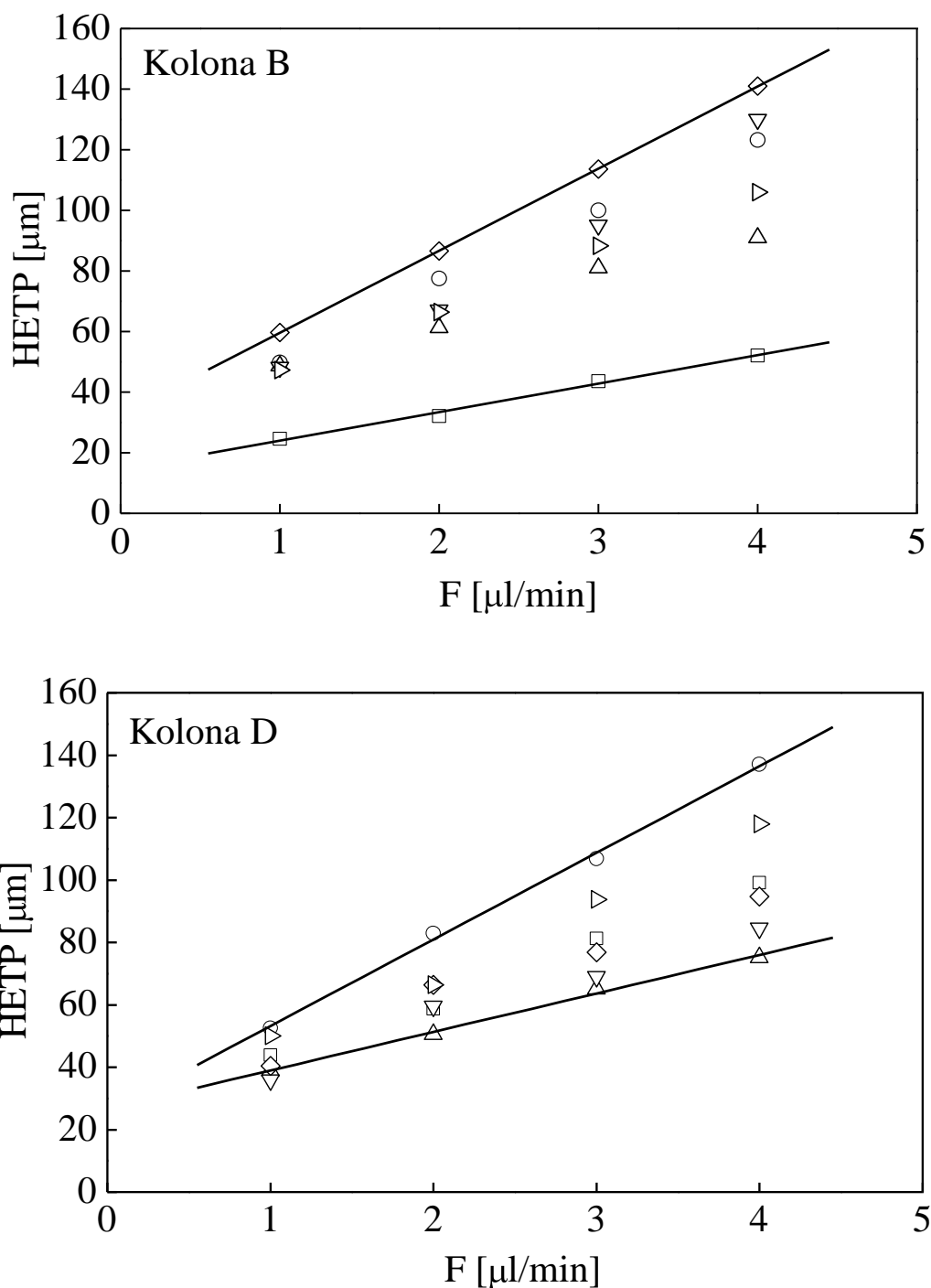


Obrázek 7 Chromatogramy separací uracilu (1), fenolu (2), benzenu (3), toluenu (4), ethylbenzenu (5) a anilinu (7) na kolonách A a D. Mobilní fáze acetonitril/voda (65:35, obj. %); průtoková rychlost 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, vlnová délka detekce $\lambda = 214 \text{ nm}$.

1.8. Shrnutí výsledků

Kolony připravené oběma způsoby polymeračního procesu vykazují velmi podobné vlastnosti, a to jak sledovanou celkovou porozitu, tak i indexy hydrofobnosti. Kolony připravené polymerizací iniciovanou chemickou reakcí vykazují nižší hodnoty HETP, které udávají lepší účinnost těchto kolon. Příprava monolitických kolon polymerizovaných za laboratorní teploty je obecně jednodušší, protože není zapotřebí termostatu, ale na druhou stranu reprodukovatelnost přípravy těchto kolon je podstatně horší než publikovaná reprodukovatelnost monolitů

iniciovaných termicky. To může být způsobeno vyšším počtem faktorů, které ovlivňují právě proces polymerizace přidáním chemického činidla za laboratorní teploty. Právě vliv laboratorní teploty a také iniciátor mohou ovlivnit velikost a distribuci vznikajících pórů.



Obrázek 8 Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na průtokové rychlosti mobilní fáze (acetonitril/voda, 65:35, obj. %) pro uracil (□), fenol (O), benzen (Δ), toluen (∇), ethylbenzen (◇) a anilin (▷) pro monolitické kolony B a D.

2. Příprava monolitických kolon pro separaci oligonukleotidů metodou kapilární kapalinové chromatografie

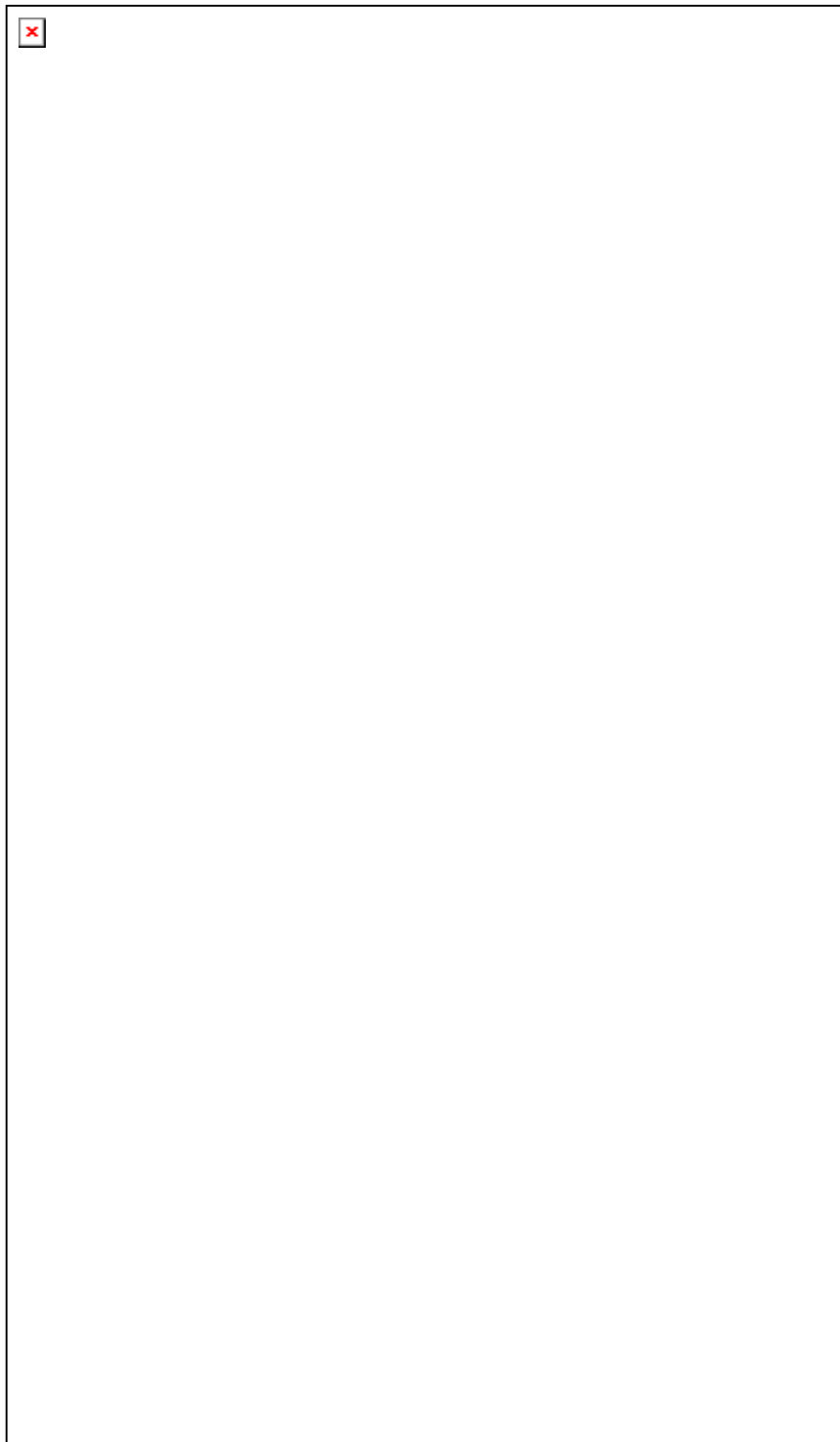
2.1. HILIC mód pro separaci polárních látek

Pro separaci polárních látek jako jsou např. oligonukleotidy, nukleové kyseliny, proteiny, cukry atd., je použití reverzního módu díky efektu hydrofobní stacionární fáze a normálního módu díky nepraktičnosti mobilní fáze nevhodné. Pro separaci vysoce polárních sloučenin se využívá tzv. hydrofilně-interakční chromatografický mód (HILIC) popsáný poprvé Alpertem [102]. Tento mód je variací chromatografie s normální fází. V obou metodách je použita hydrofilní stacionární fáze, ale hlavním smyslem HILIC módu je klesající gradient acetonitrilu či propan-1-olu ve vodném pufru. Separované látky v HILIC módu eluují v opačném pořadí než v chromatografii s obrácenými fázemi, jejíž princip je založen na hydrofobních interakcích [103]. Pro separaci v HILIC módu je důležité, aby nebyl vzorek rozpuštěn v polárním rozpouštědle, jako např. ve vodě či pufru, protože pak může tento vzorek eluovat s mrtvým časem. Pro HILIC mód je nezbytné, aby byl vzorek rozpuštěn nejlépe v mobilní fázi či v eluentu odpovídajícímu složení mobilní fáze při počátečních podmínkách použitého gradientu.

2.2. Oligonukleotidy

V posledních několika málo desetiletích se oligonukleotidy staly důležitou součástí molekulární biologie a významně přispěly k jejímu rozvoji. Nemodifikované oligonukleotidy jsou používány téměř při každé práci s DNA nebo RNA jakožto primery nebo sondy [104, 105]. Modifikované oligonukleotidy lze využít také jako terapeutické agens [106]. Pro studium a analýzu oligonukleotidů bylo třeba vytvořit speciální analytické metody, obzvláště pro případy, kdy jsou oligonukleotidy podávány při léčbě nemocí. Tehdy je nutné stanovit čistotu látky a farmakologické charakteristiky včetně sledování hladiny léků a metabolismu pacienta [107]. V současné době existují dva technologické postupy, jak účinně a dostatečně oddělit

požadované oligonukleotidy od znečišťujících látek, a těmi jsou elektroforéza a HPLC. Pro praktické využití v medicíně je výhodnější použít HPLC, kterou lze na rozdíl od elektroforézy využít také k velkokapacitním separacím [108].



Obrázek 9 Základní struktura oligonukleotidu.

2.3. Kolony na bázi methakrylátů pro separaci oligonukleotidů

Pro separaci oligonukleotidů, jejichž základní struktura je uvedena na **obrázku 9**, byly připraveny kolony s monomerem 2-(diethylamino)ethylmethakrylátem (DEAEM) či 2-(dimethylamino)ethylmethakrylátem (DMAEM) s ethylenglykoldimethakrylátem (EDMA) jako síťovadlem. Polymerizační směs byla připravena stejně jako pro butylmethakrylátové kolony popsané v přechozí kapitole. Byla zkoušena polymerace za zvýšené teploty s přídavkem AIBN jako iniciátorem a také chemická polymerace s TEMEDem a peroxodisíranem jako iniciátory. Ani jeden způsob přípravy nebyl vhodný, protože vzniklý polymer nebyl průchozí pro mobilní fáze. Pro přípravu kolony s těmito monomery byly vyzkoušeny různé poměry porogenní a monomerní směsi, různý obsah síťovadla i různý poměr obsahu propan-1-olu a butan-1,4-diolu. Ovšem všechny tyto pokusy byly neúspěšné, protože nebylo možné takto vzniklou kolonou protlačit mobilní fázi.

Byla tedy vyzkoušena příprava kopolymeru, tedy takového polymeru, který v sobě obsahuje dvě různé monomerní jednotky. Kopolymer byl připraven z butylmethakrylátu a 2-(diethylamino)ethyl methakrylátu (DEAEM) v různém poměru BMA/DEAEM, ostatní složení polymeru bylo jako u přípravy butylmethakrylátových kolon popsaných v kapitole 1.2. V **tabulce 10** je popsáno složení jednotlivých kolon. Na těchto kolonách bylo možné již provádět měření, ovšem píky sloučenin použitých pro Waltersův test nebyly dostatečně separované a při testování separace aminokyselin eluovaly všechny ve stejném retenčním čase. I přesto, že je možné v literatuře najít mnoho prací o použití diethylaminoethyl monolitických kolon pro separaci oligonukleotidů a jiných polárních látek [90], příprava monolitu za použití monomeru 2-(diethylamino)ethylmethakrylátu (DEAEM) či 2-(dimethylamino)ethyl-methakrylátu (DMAEM) není vhodná.

Tabulka 10 Složení kopolymerních monolitů použitých pro separaci jednoduchých sloučenin z Waltersova testu a jednoduchých aminokyselin v hmotnostních procentech (hm. %).

Složka/Kolona	Kolona 1	Kolona 2	Kolona 3	Kolona 4
BMA	16,12	13,99	12,68	10,91
DEAEM	1,86	5,43	6,09	7,14
EDMA	22,68	21,52	21,79	22,13
propanol	35,61	35,04	35,58	35,82
butandiol	17,71	17,95	17,76	17,89
sůl	6,01	6,07	6,10	6,11
TEMED	55 μ L	55 μ L	55 μ L	55 μ L

2.4. Glycidylmethakrylátové kolony pro separaci oligonukleotidů

V literatuře [63] je popsána příprava monolitu z glycidylmethakrylátu pro separaci oligonukleotidů a jiných polárních látek. Vzniklý polymer je modifikován solventem, který protéká skrze kolonu. Pro přípravu polymeru se používá cyklohexan-1-ol a dodekan-1-ol jako porogenní rozpouštědla, glycidylmethakrylát (GDM) jako monomer a ethylenglykoldimethakrylát (EDMA) jako síťovadlo. Kolony byly po polymeraci promyty nejdříve tetrahydrofuranem pro odstranění nezreagovaných zbytků polymerační směsi a následně ředěnou kyselinou sírovou při zvýšené teplotě 12 hodin. Tímto se do polymeru zavede sulfonylová a hydroxylová skupina.

Dle výše uvedeného postupu bylo připraveno několik různých monolitů s různým složením polymerační směsi, které se lišily v poměru porogenní a monomerní směsi, jak je uvedeno v **tabulce 11**. Všechny tyto kolony byly promyty tetrahydrofuranem a poté 0,05 M vodným roztokem kyseliny sírové.

Tabulka 11 Složení polymeračních směsí glycidylmethakrylátových kolon.

Směs	Kolona	GDM 1	GDM 2	GDM 3	GDM 4	GDM 5
Monomerní směs	GDM (59,01%)	35	38	40	42	45
	EDMA (40,01%)					
	AIBN (0,98%)					
Porogenní směs	cyklohexanol (90,35%)	65	62	60	58	55
	dodekanol (8,99%)					

Kolony GDM 4 a 5 vykazovaly vyšší odpor při promývání tetrahydrofuranem a nebylo možné na nich provádět měření. Ostatní kolony byly promyty a derivatizovány při průtoku 5 µl/min 12 hodin při 60 °C a před zapojením do chromatografického systému promyty vodou s acetonitrilem, aby byla vymyta nezreagovaná kyselina sírová. Bohužel ani na jedné koloně nebylo docíleno separace oligonukleotidů použitých pro tyto experimenty, jejichž popis je uveden v **tabulce 12**.

Nevýhoda těchto kolon byla v tom, že jejich příprava byla časově náročná a separace oligonukleotidů, uvedených v **tabulce 12** nebyla dostatečná. Největším problémem byla modifikace monolitu, aby proběhla účinně, rychle a v celém objemu monolitu.

Tabulka 12 Sekvence testovaných oligonukleotidů.

Název	Délka	Sekvence
15T	15-mer	5`- TTTTTTTTTTTTTTTT -3`
19	19-mer	5`- TATTTGCTGACGCCGAGAA -3`
20	20-mer	5`- CTATTTGCTGACGCCGAGAA -3`

Od těchto kolon bylo upuštěno, jelikož nebylo možné připravit kolonu, na které by se podařilo alespoň částečně separovat uvedené oligonukleotidy, ačkoliv kolony byly připraveny podle článku [63]. Bohužel se ani nepodařilo připravit dostatečně reprodukovatelně dvě kolony se stejnými separačními schopnostmi.

2.5. N-(hydroxymethyl)methakrylamidové (HMMAA) kolony pro separaci oligonukleotidů

Pro separaci polárních látek v HILIC modu je zapotřebí, aby stacionární fáze obsahovala funkční skupiny, které jsou schopny nést náboj. Z tohoto důvodu byl vyzkoušen monolit s N-(hydroxymethyl)methakrylamidovým (HMMAA) monomerem.

Příprava HMMAA monolitických kolon byla shodná s přípravou butylmethakrylátových kolon s malými změnami. První dva kroky popsané ve schématu na **obrázku 2** nebyly provedeny, jelikož polymer byl v kapiláře zakotven. Kovalentní vazba mezi monolitem a stěnou kapiláry byla vytvořena díky monomerní jednotce obsahující hydroxyskupinu. Další odlišností oproti citovanému článku bylo složení porogenní směsi. Porogenní směs byla zjednodušena, neobsahovala vodu, protože použitý monomer N-(hydroxymethyl)methakrylamid je dodáván jako 52% (hm. %) vodný roztok.

Příprava HMMAA monolitických kolon sestává z následujících kroků. Prázdna kapilára byla promývána 30 minut 1 M NaOH a poté deionizovanou vodou dalších 30 minut. Pak byla kapilára vysušena proudem vzduchu po dobu 5 minut a následně naplněna polymerizační směsí. Ta byla složena z ethylenglykoldimethakrylátu (EDMA) ve funkci síťovacího činidla, N-(hydroxymethyl)methakrylamidu (HMMAA) jako funkčního monomeru, porogenních rozpouštědel a iniciátoru polymerizace α,α' -azobisisobutyronitrilu (AIBN). Tato směs o celkové hmotnosti 1 g byla ultrazvukována 10 minut a poté probublána proudem helia po dobu 5 minut, aby směs byla zbavena vzduchu, a tím minimalizován vznik mikrobublin v polymeru. Připravená kolona byla poté touto směsí naplněna a oba konce kapiláry ponechány v mikrozkuvkách naplněných polymerizační směsí. Naplněná kapilára pak byla polymerizována po dobu 20 hodin při teplotě 60 °C. Po skončení procesu polymerizace byly oba konce kolony zařízuty tak, aby celková délka kolony byla 18 cm, a kolona zapojena do chromatografického systému. Po promytí 30 minut acetonitrilem byla kolona připravená pro separaci oligonukleotidů v HILIC modu.

Pro přípravu homogenního HMMAA monolitu byly vyzkoušeny dva páry porogenních rozpouštědel, a to směs butan-1,4-diol/propan-1-ol a dále pak směs

cyklohexan-1-ol/dodekan-1-ol. Při použití těchto solventů byl sledován jejich vliv na vznik homogenního polymeru. Monolity polymerizované za přítomnosti cyklohexan-1-ol/dodekan-1-ol nebyly homogenní, pouze část polymerizační směsi byla zpolymerovaná. Kdežto při použití druhého páru porogenních rozpouštědel butan-1,4-diol/propan-1-ol vznikl homogenní polymer z celé polymerizační směsi. Proto byl dále používán systém obsahující tuto binární směs porogenních rozpouštědel.

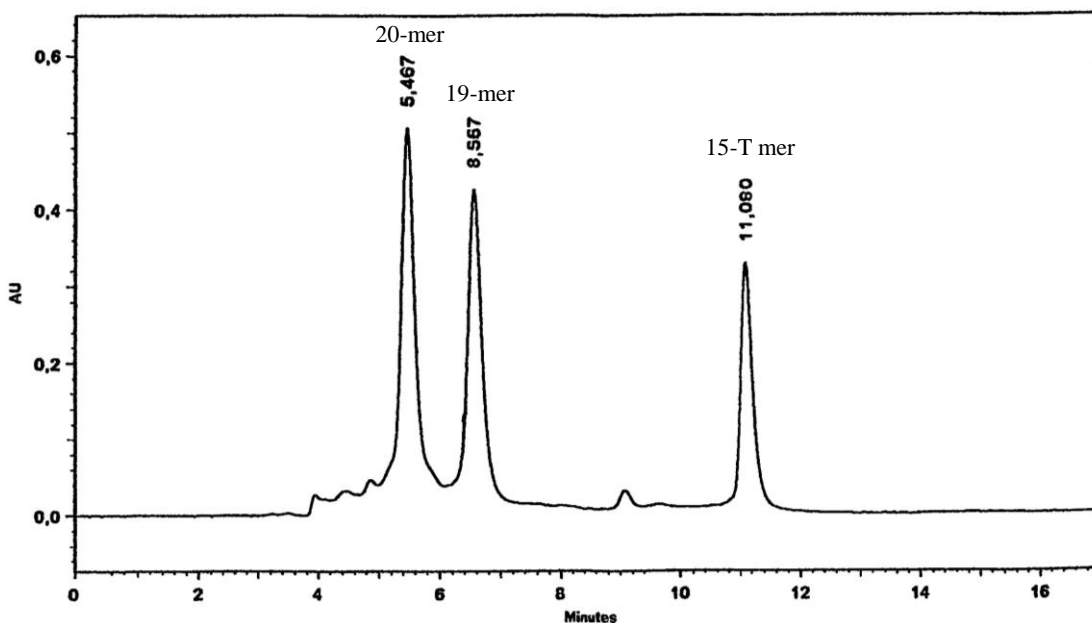
Byly připraveny různé polymerizační směsi s různým obsahem porogenních rozpouštědel pro přípravu HMMAA monolitických kolon. Složení těchto polymerizačních směsí je popsáno v **tabulce 13**. Kolony 1, 2 a 3 se lišily pouze ve složení porogenní složky, poměr EDMA a monomeru zůstal zachován. Kolony 4 a 5 se lišily od ostatních tím, že poměr porogenních solventů a monomerů byl 60 ku 40 hmotnostních procent, a obsah EDMA a HMMAA byl odlišný. Kolonou 4 a 5 ovšem nebyla protlačena mobilní fáze, ostatní Kolony 1, 2 a 3 mohly být použity pro měření a testovány jejich separační vlastnosti.

Tabulka 13 Složení polymerizačních směsí (% hm.) použitých pro přípravu HMMAA monolitických kolon; obsah AIBN byl 1 % (hm.) vzhledem k monomeru.

Složky/Kolona	Kolona 1	Kolona 2	Kolona 3	Kolona 4	Kolona 5
butan-1,4-diol	24,0	35,8	7,1	25,5	20,6
propan-1-ol	47,6	35,8	64,4	35,2	41,3
EDMA	12,4	12,4	12,4	15,1	17,0
HMMAA	16,0	16,0	16,0	25,2	21,1

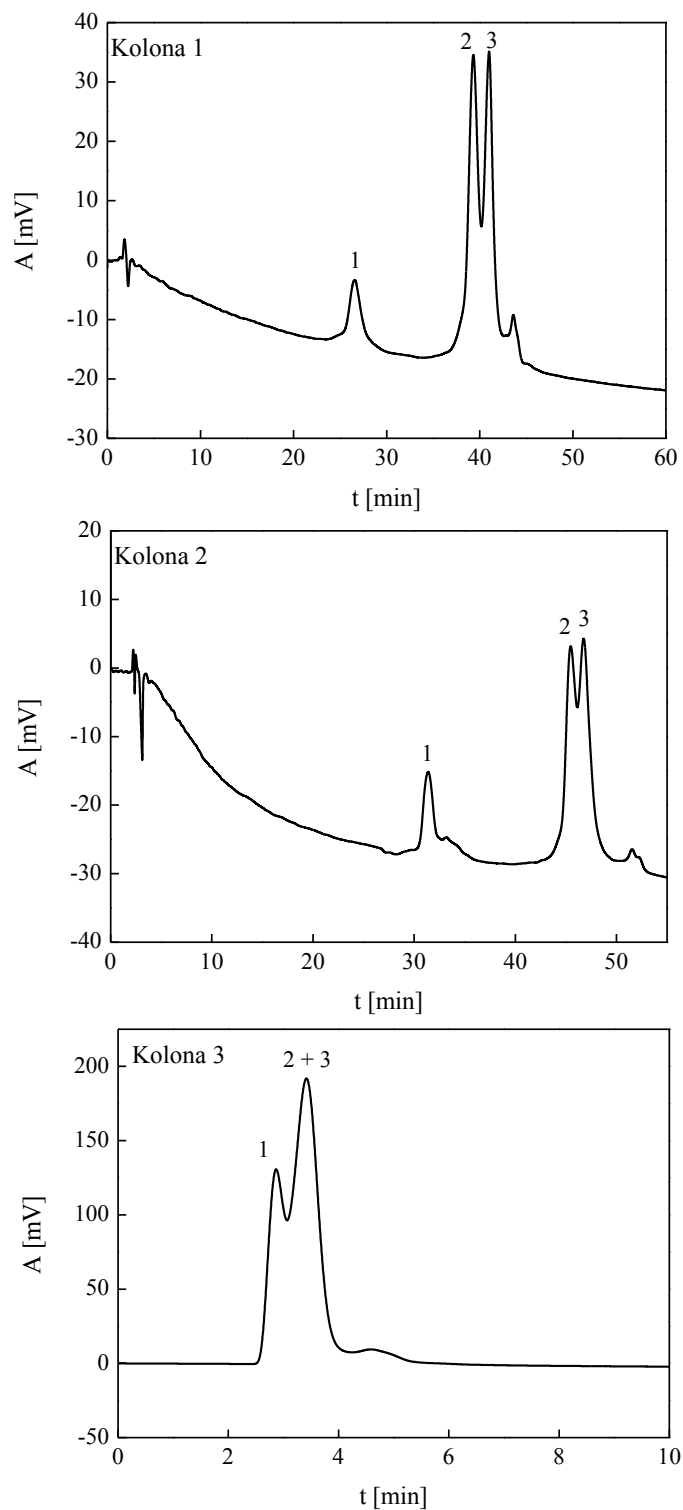
2.6. Optimalizace separace studovaných oligonukleotidů na HMMAA kolonách

Pro sledování separačních vlastností připravených Kolon 3, 4 a 5 byla použita směs oligonukleotidů popsaných v **tabulce 12** díky své komplexnosti a také díky velké podobnosti v jejich struktuře; především 19-mer a 20-mer, které se liší pouze v jedné bázi. Jako mobilní fáze A byl použit 100 mM triethylaminoacetátový pufr (TEAA) ve vodě a jako mobilní fáze B 100 mM TEAA v acetonitrilu. Tyto mobilní fáze se běžně používají při měření směsí oligonukleotidů na komerčních kolonách. Pro separaci oligonukleotidů se doposud v laboratoři používá klasická náplňová kolona Zorbax Extend C18, 150 x 4,6 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$ při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a teplotě kolony 60 °C. Separace studovaných oligonukleotidů prováděná na komerční koloně je ukázána na **obrázku 10**. Rozlišení 19- a 20-meru má v tomto případě hodnotu 1,53 a spočítaná hodnota výšky teoretického patra je pro 19-mer 35 μm a pro 20-mer je to 23 μm .



Obrázek 10 Chromatogram směsi tří oligonukleotidů popsaných v **tabulce 12** na koloně Zorbax Extend C18, 5 μm , 150 x 4,6 mm, mobilní fáze A: 100 mM TEAA, pH = 6,43, mobilní fáze B: acetonitril/mobilní fáze A 8:2 (obj. %), gradient 13-20 % MF B ve 30 min, průtok 0,5 ml/min, teplota kolony 60 °C, vlnová délka detekce 260 nm.

Při separaci látek v HILIC modu je doporučeno rozpustit testované látky v počátečních podmínkách gradientu, protože při použití odlišného solventu by separované látky eluovaly s mrtvým retenčním časem. Směs oligonukleotidů popsaných v **tabulce 12** byla rozpuštěna v mobilní fázi B na koncentraci přibližně 0,05 mmol/l. Jako výchozí krok byl použit lineární gradient od 90 % do 60 % mobilní fáze B během 60 minut při teplotě kolonového termostatu 30 °C, abychom mohli určit přibližnou retenci studovaných oligonukleotidů. Chromatogramy těchto separací jsou zobrazeny na **obrázku 11**. Jak je z těchto chromatogramů patrné, na Kolonách 1 a 2 elují studované oligonukleotidy s větší retencí a tomu také odpovídá lepší rozlišení separovaných oligonukleotidů na rozdíl od Kolony 3. Protože eluce na Koloně 3 je velmi rychlá, nemohlo v tak krátkém čase dojít k separaci oligonukleotidů.



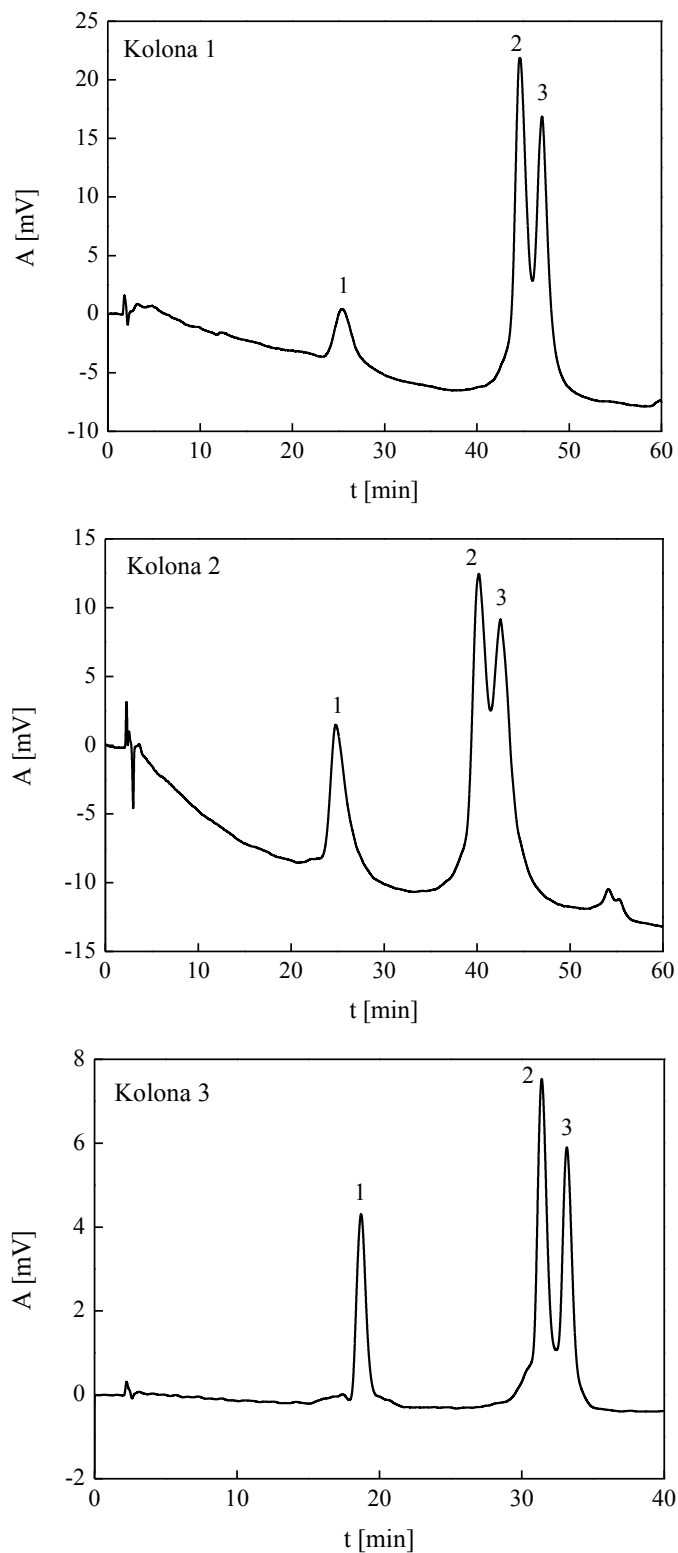
Obrázek 11 Separace 15-T-meru (1), 19-meru (2) a 20-meru (3) na HMAA monolitických Kolonách 1, 2 a 3. Mobilní fáze A 100 mM TEAA ve vodě, mobilní fáze B 100 mM TEAA v acetonitrilu, gradient 90 % – 60 % mobilní fáze B v 60 minutách, průtoková rychlost 6,0 $\mu\text{l}/\text{min}$, vlnová délka detekce 260 nm, teplota kolony 30 °C.

Dále byl upravován gradient tak, aby se zkrátila doba analýzy a zlepšilo se rozlišení mezi 19-merem a 20-merem, které se liší ve své struktuře pouze v jedné bázi. Optimalizované gradienty pro všechny tři kolony jsou uvedeny v **tabulce 14**, kde je udána průtoková rychlost, program gradientu a vypočítané hodnoty rozlišení 19- a 20-merů a selektivního faktoru této dvojice. Jak je z hodnot patrné, nejlepšího rozlišení je dosaženo na Koloně 3. Při stávajících podmínkách na Koloně 1 a 2 bylo dosaženo podstatně menšího rozlišení. Při použití méně strmého gradientu by bylo dosaženo lepšího rozlišení, ale doba analýzy by se podstatně prodloužila. Pro separaci oligonukleotidů na Koloně 3 je zapotřebí použít vyššího obsahu mobilní fáze B (TEAA v acetonitrilu), aby se dosáhlo pozdější retence oligonukleotidů, než je tomu u Kolon 1 a 2.

Tabulka 14 Gradient o délce 60-ti minut aplikovaný na připravené monolitické kolony. Vypočítané hodnoty rozlišení 19- a 20-merů a selektivní faktor pro 19- a 20-mer.

Parametry/Kolona	Kolona 1	Kolona 2	Kolona 3
gradient	85-70% B	85-65% B	94-87% B
průtoková rychlost	6,0 µl/min	6,0 µl/min	6,0 µl/min
rozlišení 19/20-mer	0,98	0,64	1,35
faktor selektivity	1,06	1,06	1,06

Chromatogramy popsané v **tabulce 14** jsou zobrazeny na **obrázku 12**. Jak je z uvedených chromatogramů patrné, na Koloně 3 dochází k separaci dvojice 19- a 20-meru téměř na základní linii v čase kolem 35 minut, s výbornou symetrií píků a na rozdíl od separací na Kolonách 1 a 2, je základní linie vysoce stabilní. Stabilita základní linie je dána strmostí použitého gradientu, v případě Kolon 1 a 2 byla změna 15% resp 20 % během 60 minut, kdežto pro Kolonu 3 to bylo pouze 7 % během 60 minut. Gradient 94 % – 87 % mobilní fáze B během 60 minut byl zvolen jako optimální pro separaci studovaných oligonukleotidů na dalších připravených kolonách.

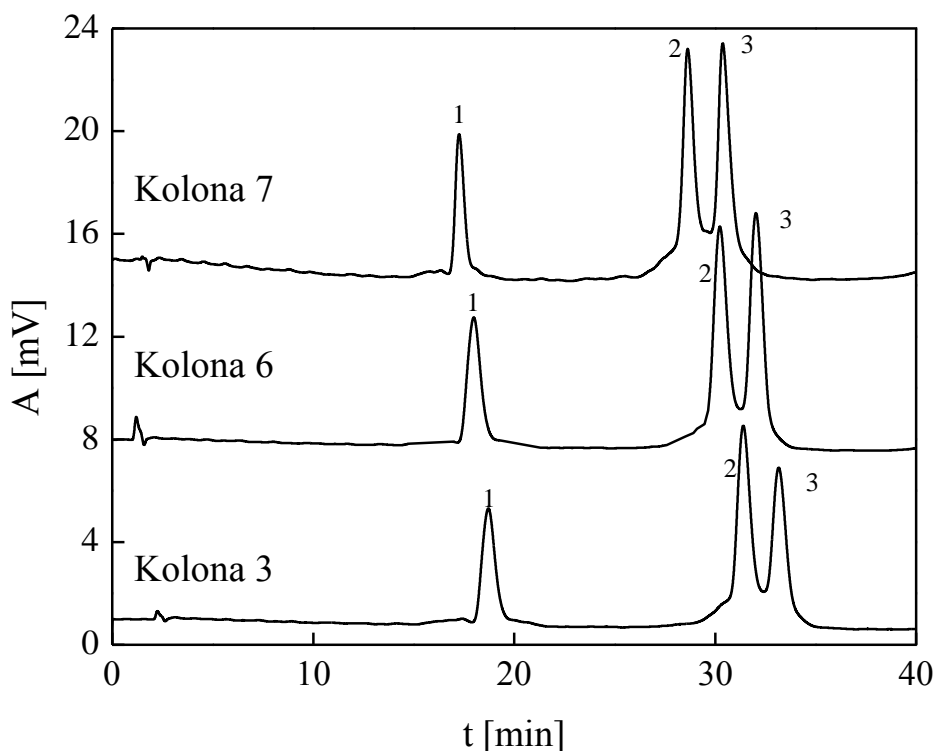


Obrázek 12 Separace 15-T-meru (1), 19-meru (2) a 20-meru (3) na HMMAA monolitických Kolonách 1, 2 a 3 za optimalizovaných podmínek. Mobilní fáze A 100 mM TEAA ve vodě, mobilní fáze B 100 mM TEAA v acetonitrilu, gradient 85 % – 70 % mobilní fáze B v 60 minutách (Kolona 1), 85 % – 65 % mobilní fáze B v 60 minutách (Kolona 2), 94 % – 87 % mobilní fáze B v 60 minutách (Kolona 3), vlnová délka detekce 260 nm, průtoková rychlost 6,0 $\mu\text{l}/\text{min}$, teplota kolony 30 $^{\circ}\text{C}$.

2.7. Reprodukovatelnost přípravy HMMAA monolitů

Byly připraveny další dvě kolony, Kolona 6 a 7, o identickém složení polymerační směsi jako Kolona 3, jejíž složení je popsáno v **tabulce 12**, aby byla studována reprodukovatelnost přípravy kolon na bázi HMMAA pro separaci oligonukleotidů. Kolona 3 byla vybrána jako nejvhodnější pro separaci, protože rozlišení mezi kritickým párem oligonukleotidů, 19- a 20-merem, bylo během celkové doby analýzy 40 minut dostačující.

Kolony 6 a 7 byly naplněny totožnou polymerační směsí a polymerizovány po dobu 20 hodin při teplotě 60 °C, zaříznující na celkovou délku 18 cm a promyty 65:35 (obj. %) acetonitril/voda. Poté byl použit stejný gradientový program (94 % - 87 % mobilní fáze B v 60 minutách) pro separaci trojice oligonukleotidů uvedených v **tabulce 12** jako pro Kolonu 3, při průtokové rychlosti 6,0 $\mu\text{l}/\text{min}$. Na **obrázku 13** jsou uvedeny chromatogramy separace oligonukleotidů na Kolonách 3, 6 a 7 jako příklady ukázky reprodukovatelnosti přípravy kolon.



Obrázek 13 Separace 15-T-meru (1), 19-meru (2) a 20-meru (3) na HMMAA monolitických Kolonách 3, 6 a 7 za optimalizovaných podmínek. Mobilní fáze A 100 mM TEAA ve vodě, mobilní fáze B 100 mM TEAA v acetonitrilu, gradient 94 % – 87 % mobilní fáze B v 60 minutách, vlnová délka detekce 260 nm, průtoková rychlost 6,0 $\mu\text{l}/\text{min}$, teplota kolony 30 °C.

Pro lepší vyjádření reprodukovatelnosti přípravy HMMAA monolitických kolon byly vypočítány relativní směrodatné odchylky (RSD) retenčních časů, přibližné retenční faktory kritického páru 19- a 20-merů a selektivní faktor na Kolonách 3, 6 a 7. Tyto hodnoty jsou uvedeny v **tabulce 15**. Jak je z uvedených hodnot patrné, RSD retenčních časů a přibližných retenčních faktorů jsou o něco vyšší, než data publikovaná pro reprodukovatelnost přípravy monolitických kolon na bázi butylmethakrylátů [72], ale tyto hodnoty nepřesahují hodnotu 5 %. Data uvedená v **tabulce 15** poukazují na velmi dobrou reprodukovatelnost v přípravě HMMAA monolitických kolon.

Tabulka 15 Reprodukovatelnost přípravy HMMAA monolitických kolon vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka (RSD) retenčních časů, přibližných retenčních faktorů, selektivních faktorů a rozlišení 19- a 20 merů pro Kolony 3, 6 a 7; průtoková rychlost 6,0 $\mu\text{l}/\text{min}$, teplota kolony 30 $^{\circ}\text{C}$, vlnová délka detekce 260 nm, gradient 94 – 87 % mobilní fáze B během 60 min.

Parametr	$t_{19\text{-mer}}$ [min]	$t_{20\text{-mer}}$ [min]	$k_{19\text{-mer}}$	$k_{20\text{-mer}}$	α	R_S
Kolona 3	31,4	33,2	13,0	13,7	1,06	1,36
Kolona 6	30,2	32,0	12,7	13,5	1,06	1,39
Kolona 7	28,6	30,4	13,2	14,1	1,07	1,32
průměrná hodnota	30,2	31,8	12,9	13,8	1,06	1,36
RSD [%]	4,63	4,40	2,16	2,33	0,25	2,59

2.8. Shrnutí přípravy HMMAA monolitů

Z výsledků této kapitoly je patrné, že připravené HMMAA monolitické kolony jsou velmi vhodné pro separaci oligonukleotidů, které se liší v sekvenci a délce, jsou dokonce schopny separovat oligonukleotidy lišící se pouze v obsahu jedné báze. Také skvělá reprodukovatelnost v přípravě monolitických kolon, vyjádřená jako RSD přibližného retenčního faktoru a retenčního času jsou fantastické, menší než 5 %. Navíc, příprava kolon je velmi jednoduchá, není zapotřebí silanizace vnitřního povrchu stěn kapiláry a porogenní směs je

v **tabulce 16** označena jako MAPDS 1. Po zapojení kolony do chromatografického systému se monolit po 10 minutách promývání mobilní fází potrhala, přestože mobilní fáze skrz kolonu protékala bez obtíží. Proto byly připraveny polymerační směsi s různým složením monomerní směsi jak je uvedeno v **tabulce 16**.

Tabulka 16 Složení polymeračních směsí pro přípravu MAPDS monolitických kolon, hodnoty jsou udané v hmotnostních procentech.

Složka/Kolona	MAPDS 1	MAPDS 2	MAPDS 3	MAPDS 4	MAPDS 5
EDMA	11,70	11,90	12,30	12,73	12,75
MAPDS	14,38	14,10	19,87	7,72	10,68
voda	13,11	14,23	13,01	6,71	6,50
butan-1,4-diol	4,46	4,48	4,67	5,09	5,31
propan-1-ol	56,35	55,29	50,15	59,65	54,06
HEMA	-	-	-	8,10	10,70

Kolony MAPDS 1 a MAPDS 2 jsou totožné, kolona MAPDS 2 byla připravena proto, aby se zjistilo, zdali k potrhání monolitu u kolony MAPDS 1 nedošlo v důsledku nějaké chyby při manipulaci s kolonou. Na těchto kolonách byly zkoušeny separace směsi testovacích oligonukleotidů popsanych v **tabulce 12**. Separace na kolonách z **tabulky 16** nebyly dostatečné, píky nebylo možné ani při změně gradientu rozdělit a píky oligonukleotidů byly nesymetrické, jevíly se jako zbořené. Po několika analýzách se všechny připravené monolity potrhaly a nebylo možné na nich provádět další analýzy. Testované oligonukleotidy se na kolonách s MAPDS monomerem zadržovaly více než na kolonách obsahujících HMMAA jako monomer.

Jelikož na kolonách MAPDS 1 až 5 nebylo možné dosáhnout separace a monolity se trhaly, byly připraveny kolony obsahující MAPDS a HMMAA monomery. Protože monomer HMMAA se dodává ve formě vodného roztoku, složení polymeračních směsí se liší obsahem vody a je uvedeno v **tabulce 17**. Složení těchto polymeračních směsí je totožné jako pro Kolonu 3, která obsahovala pouze HMMAA jako monomer. MAPDS nahradil pouze 5% z monomeru HMMAA. Kolony uvedené v **tabulce 17** byly po termické polymerizaci zkrácené na délku 18 cm a promyté směsí acetonitril/voda 65:35 pro vymytí nezreagovaných rozpouštědel po polymerizaci a zapojeny do chromatografického systému.

Pro separaci testovacích oligonukleotidů popsaných v **tabulce 12** byla zvolena mobilní fáze jako v případě použití hydroxymethylmethakrylátových kolon se sestupným gradientem mobilní fáze B (100 mM TEAA v acetonitrilu) při teplotě kolonového termostatu 30 °C. Byla snaha o nalezení takových separačních podmínek, za kterých by se všechny tři testované oligonukleotidy dostatečně separovaly. Gradient 93 – 50 % mobilní fáze B během 30 minut byl zvolen jako optimální pro separaci studovaných oligonukleotidů na všech kolonách uvedených v **tabulce 17**, chromatogramy těchto separací jsou uvedeny na **obrázku 15**.

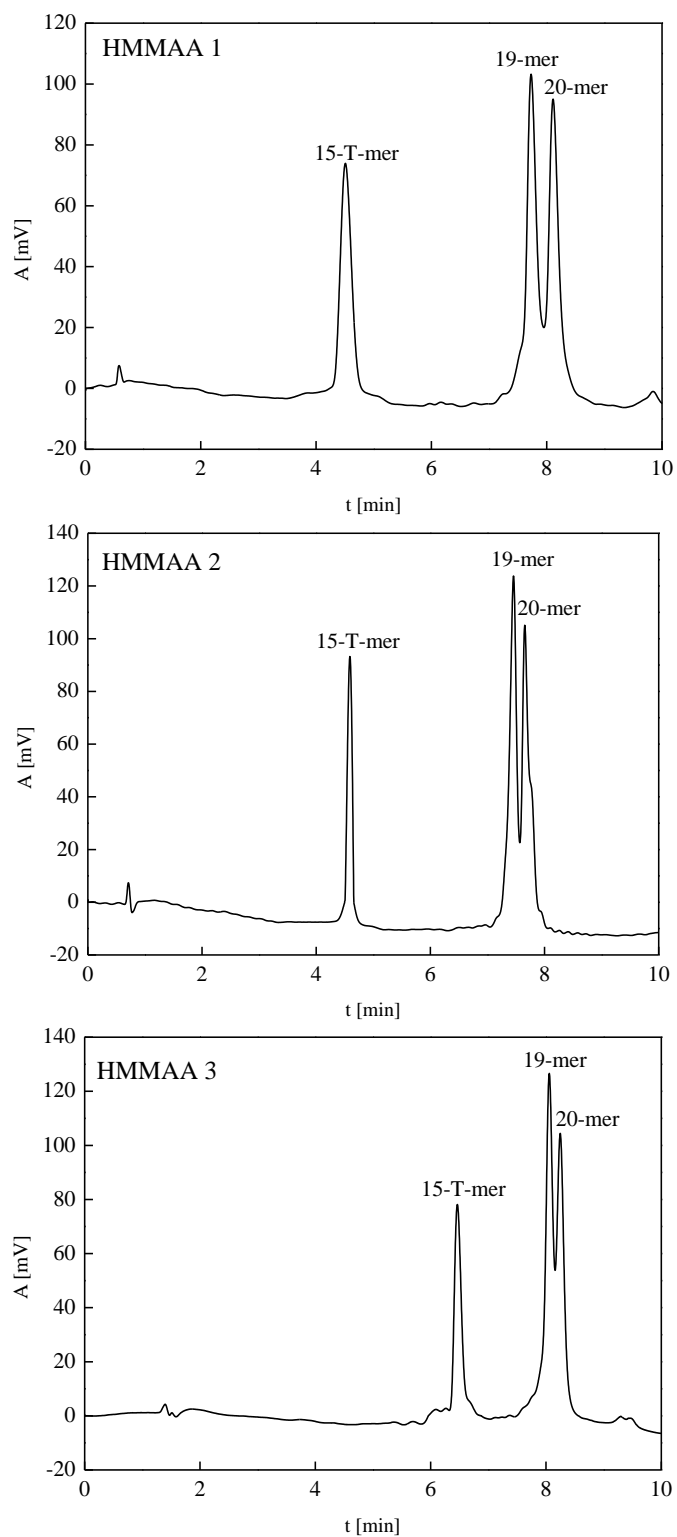
Tabulka 17 Složení polymeračních směsí pro výrobu MAPDS a HMMAA monolitických kolon, hodnoty jsou udané v hmotnostních procentech.

Složka/Kolona	HMMAA 1	HMMAA 2	HMMAA 3
EDMA	12,47	12,50	12,48
MAPDS	5,00	5,02	5,00
butan-1,4-diol	7,60	7,71	7,60
propan-1-ol	63,84	63,69	63,87
HMMAA	11,09	11,08	11,05

Jak je z chromatogramů patrné, při separaci oligonukleotidů za použití stejného gradientu na všech třech kolonách obsahující monomery HMMAA a MAPDS se jeví monolity velmi podobně a vykazují stejné separační vlastnosti. Při použití méně strmého gradientu by bylo možné dvojici 19- a 20-merů rozdělit lépe, ovšem za předpokladu, že by čas analýzy byl podstatně delší. Pro porovnání separace na těchto třech kolonách byly vypočteny zdánlivé retenční faktory a faktor selektivity, jejichž hodnoty jsou uvedeny v **tabulce 18**.

Tabulka 18 Retenční čas, přibližné retenční faktory a selektivní faktory kolon HMMAA 1, 2 a 3; průtoková rychlost 6,0 μ l/min, teplota kolony 30 °C, vlnová délka detekce 260 nm, gradient 93 – 50 % B během 60 min.

Kolona/Parametr	$t_{19\text{-mer}}$ [min]	$t_{20\text{-mer}}$ [min]	$k_{19\text{-mer}}$	$k_{20\text{-mer}}$	α
HMMAA 1	7,72	8,10	10,19	10,73	1,05
HMMAA 2	7,46	7,65	9,81	10,09	1,03
HMMAA 3	8,05	8,24	10,67	10,94	1,03



Obrázek 15 Separace 15-T-meru, 19-meru a 20-meru na HMMAA+MAPDS monolitických kolonách HMMAA 1, 2 a 3 za optimalizovaných podmínek. Mobilní fáze A 100 mM TEAA ve vodě, mobilní fáze B 100 mM TEAA v acetonitrilu, gradient 93 % – 50 % mobilní fáze B ve 30 minutách, vlnová délka detekce 260 nm, průtoková rychlost 6,0 $\mu\text{l}/\text{min}$, teplota kolony 30 $^{\circ}\text{C}$.

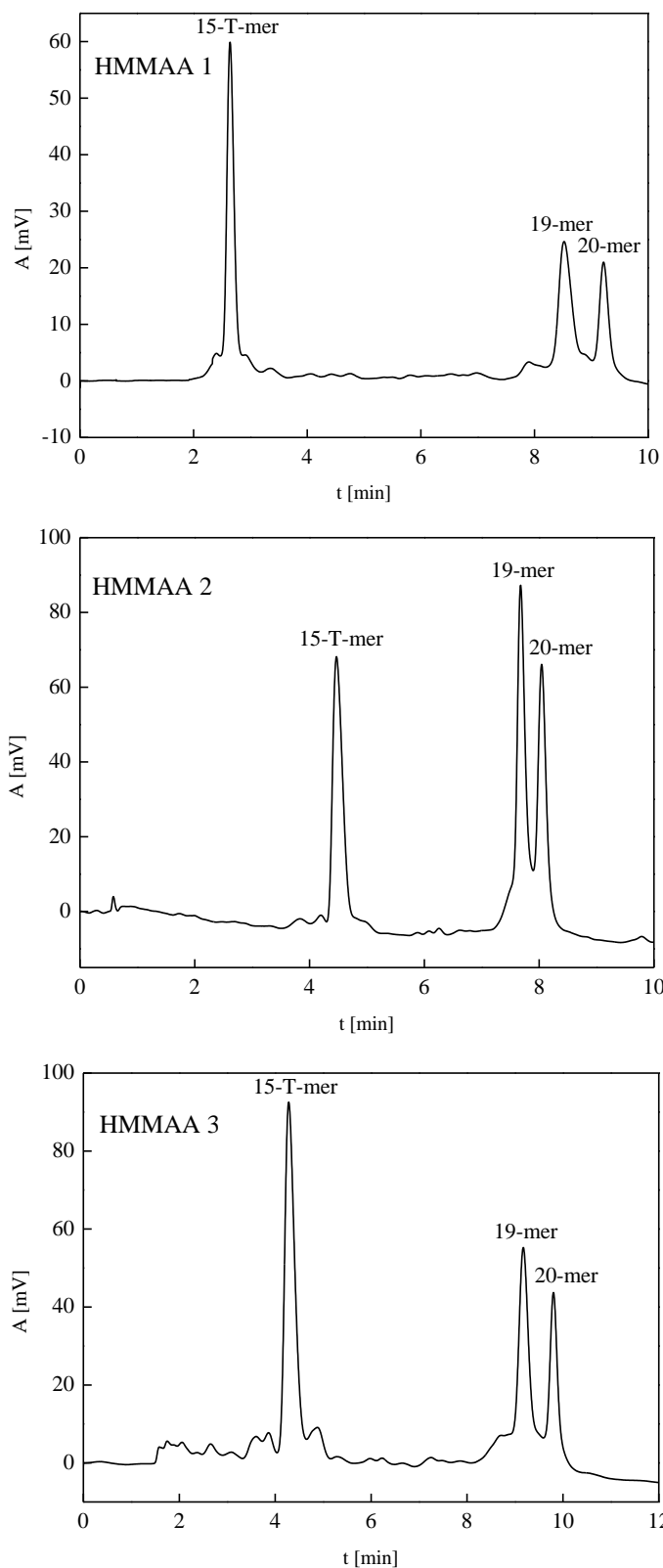
Jak je z hodnot uvedených v **tabulce 18** patrné, separace dvojice 19- a 20-meru není dostatečná, je horší než na kolonách obsahující pouze monomer HMMAA. Tento rozdíl je dán strmostí gradientu a rozdíly mezi jednotlivými kolonami jsou způsobeny tím, že pro přípravu kolon nebyla použita totožná polymerační směs.

Pro sledování separačních vlastností připravených kolon byly ještě provedeny separace při teplotě kolony 60 °C. Tato je kritická při použití tradičních silikagelových komerčních RP-HPLC kolon, kdy 60 °C je nejvyšší možná doporučená teplota od výrobců. Chromatogramy separací testovaných oligonukleotidů na kolonách označených HMMAA 1, 2 a 3 při vysoké separační teplotě jsou uvedeny na **obrázku 16**. Z chromatogramů je patrné, že separace je možná i při zvýšené teplotě za zlepšení separačních parametrů pro testované látky. Již pouhým okem je zřejmé, že rozlišení dvojice 19- a 20-merů je na všech kolonách lepší, téměř na základní linii. Po ukončení analýz na monolitických kolonách byly prohlédnuty a nebyl zjištěn žádný úbytek stacionární fáze či její potrhání. To je i patrné z tvaru píky, kdyby došlo k úbytku stacionární fáze např. rozpuštěním či stlačením, píky by byly rozmyté v důsledku zvětšení mrtvého objemu separačního systému.

2.10. Shrnutí přípravy HMMAA + MAPDS monolitů

Z výsledků této kapitoly je patrné, že připravené monolitické kolony s HMMAA a MAPDS monomery jsou velmi vhodné pro separaci oligonukleotidů, které se liší v sekvenci i délce. Tyto stacionární fáze jsou schopné separovat oligonukleotidy o velikost 20ti bazí do deseti minut, což je jedním z velkých kladů těchto kolon. Na těchto monolitech je možné separovat i oligonukleotidy lišící se v délce o jeden nukleotid. Kolony jsou schopné separovat i při vyšších teplotách, kritické teplotě 60 °C pro komerční kolony. Příprava kolon je snazší oproti přípravě butylmethakrylátových kolon, protože silanizace vnitřní stěny kapiláry není nutná, jelikož samotné monomery kovalentně reagují se silanolovými skupinami křemenné kapiláry, a tím je zajištěno zakotvení polymeru v kapiláře. Předností těchto kolon je jednoduchost jejich přípravy a schopnost separovat oligonukleotidy. Tato fakta

ukazují, že tyto monolitické kolony jsou vhodným separačním materiálem pro zavedení do analytických, klinických a farmaceutických laboratoří. Jedinou nevýhodou těchto kolon je, že jakákoliv malá změna obsahu složky v polymerační směsi vede k jiným separačním vlastnostem připravených kolon.



Obrázek 16 Separace 15-T-meru, 19-meru a 20-meru na HMMAA+MAPDS monolitických kolonách HMMAA 1, 2 a 3 za optimalizovaných podmínek. Mobilní fáze A 100 mM TEAA ve vodě, mobilní fáze B 100 mM TEAA v acetonitrilu, gradient 93 % – 50 % mobilní fáze B ve 30 minutách, vlnová délka detekce 260 nm, průtoková rychlost 6,0 $\mu\text{l}/\text{min}$, teplota kolony 60 $^{\circ}\text{C}$.

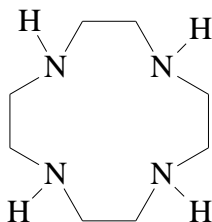
3. Separace derivátů DO3A na monolitických kolonách a na komerčních RP-fázích

3.1. Struktura testovaných derivátů DO3A

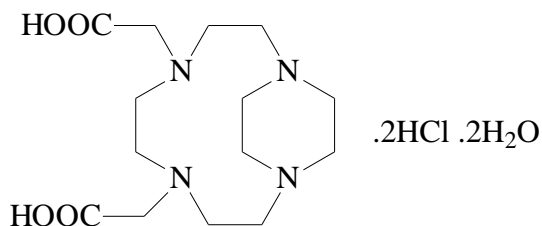
V této části práce byla snaha o separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu. Tyto látky byly syntetizovány na Katedře anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze skupinou Prof. RNDr. Ivana Lukeše, CSc. a Doc. RNDr. Petra Hermanna, Ph.D. Testované polykarboxylátové deriváty cyklenu studované v této práci jsou tzv. kyselé deriváty cyklenu. V posledních dvaceti letech byl zaznamenán velký zájem o tuto skupinu látek. Deriváty cyklenu je možné využít jako nosiče těžkých kovů a lanthanoidů, jež se používají jako kontrastní látky pro MRI (Magnetic Resonance Imaging), což je tomografická zobrazovací technika pro zobrazení nádoru v těle člověka. Stejně tak deriváty cyklenu našly využití v čištění vody od těžkých kovů a v biomedicině [110]. Jelikož je syntéza derivátů cyklenu velmi složitá a čištění meziproductů je obtížné kvůli podobným chemickým vlastnostem s vedlejšími produkty, je nutné nalézt metodu, která bude schopná určit čistotu vzniklého produktu. V literatuře ještě nebyla doposud popsána metoda pro separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu.

V této práci jsem se snažila o separaci následujících derivátů cyklenu.

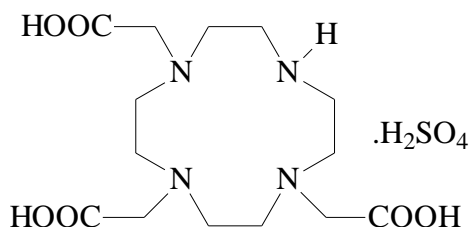
1,4,7,10-tetraazacyklododekan, cyklen



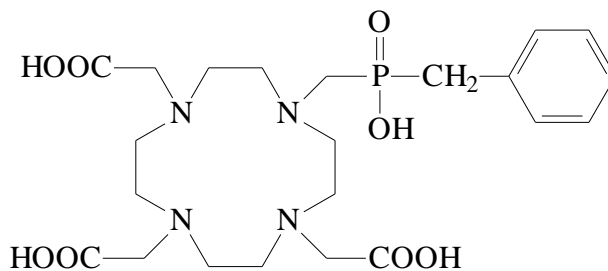
vnitřní laktam kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové, bishydrogenchlorid dihydrát, $H_3DO3A \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$, v této práci označovaný jako AN1



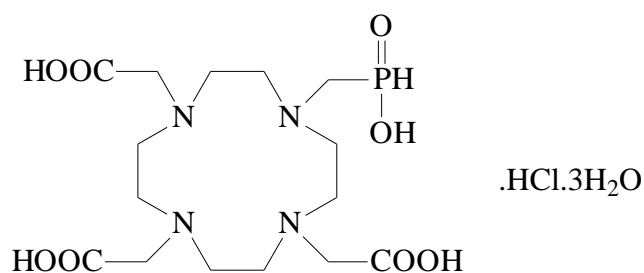
1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina, $H_3DO3A \cdot H_2SO_4$, v této práci označovaná jako AN2



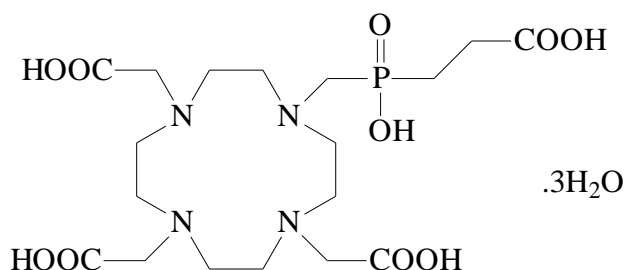
1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-[methyl[(benzyl)fosfinová] kyselina, H_4DO3AP^{Bn} , v této práci označovaná jako AN3



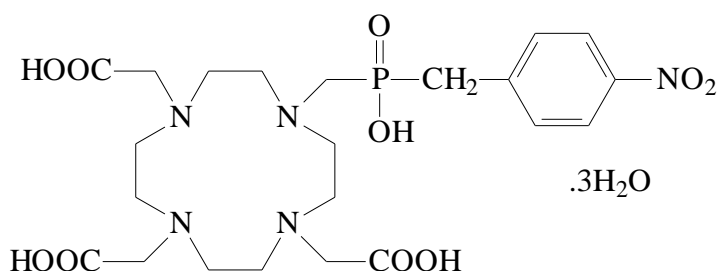
1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-methylfosfinová kyselina, hydrogenchlorid trihydrát, $H_4DO3AP^H \cdot HCl \cdot 3H_2O$, v této práci označovaná jako AN4



1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-[methyl(2-karboxyethyl)fosfinová] kyselina, trihydrát, $H_5DO3AP^{PrA} \cdot 3H_2O$, v této práci označovaná jako AN5



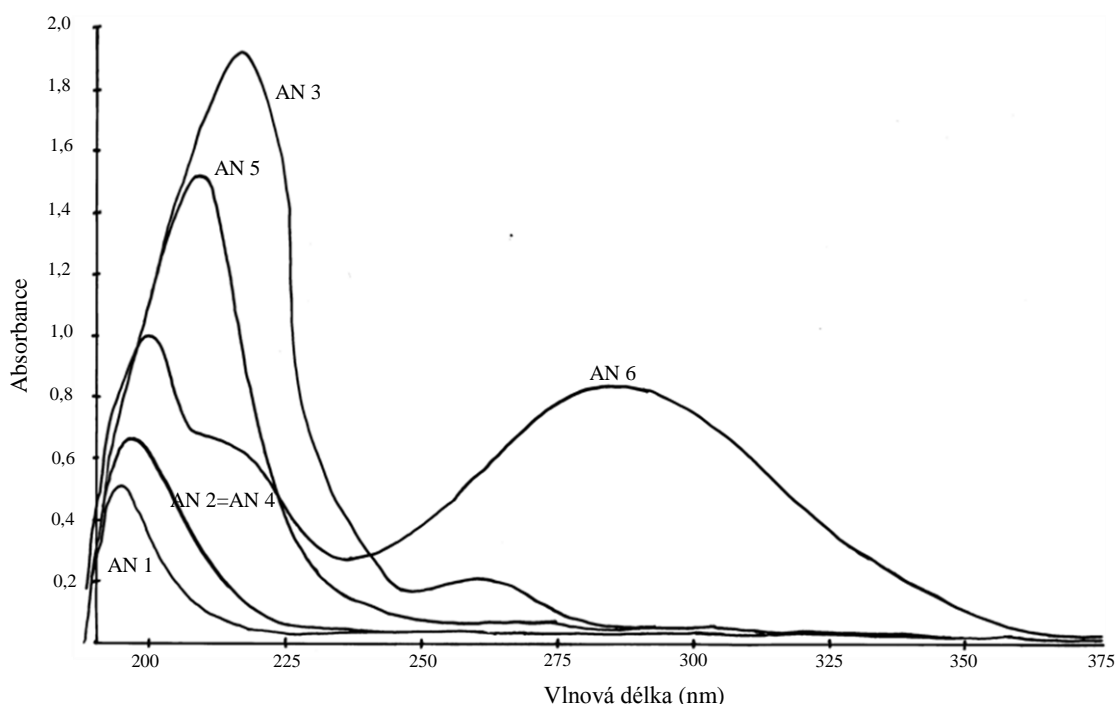
1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-{methyl[(4-nitrofenyl)methyl]fosfinová} kyselina, trihydrát, $H_4DO3AP^{NBn} \cdot 3H_2O$, v této práci označovaná jako AN6



Jak je patrné ze struktur jednotlivých analyzovaných látek, všechny obsahují kromě čistě nepolární části molekuly (cyklen) také vysoce polární funkční skupiny, pro separaci se tedy může využít jak hydrofilních, tak hydrofobních interakcí.

Byla proměřena spektra všech testovaných analytů, které byly rozpuštěny ve vodě. Absorpční maximum se pohybuje kolem 210 nm pro všechny analyty

s výjimkou AN6, který ještě obsahuje absorpční maximum při 285 nm (viz **obrázek 17**), což je způsobeno přítomností nitrobenzylu v molekule. Díky absorpčnímu maximu při 210 nm není možné pro separaci používat pufrы, které v této oblasti absorbují, protože by se velmi snížila odezva studovaných analytů a píky by mohly „zmizet“ v šumu základní linie. Také je lepší použít acetonitril jako organický modifikátor, protože jeho cut-off je kolem 190 nm, kdežto methanol má cut-off kolem 205 nm. Tím pádem bude identifikace látek s absorpčním maximem kolem 210 nm složitější v methanolu, protože se sníží citlivost UV detekce.



Obrázek 17 Absorpční spektra studovaných derivátů cyklenu, vzorky rozpuštěny v 50:50 (% obj.) acetonitril/voda.

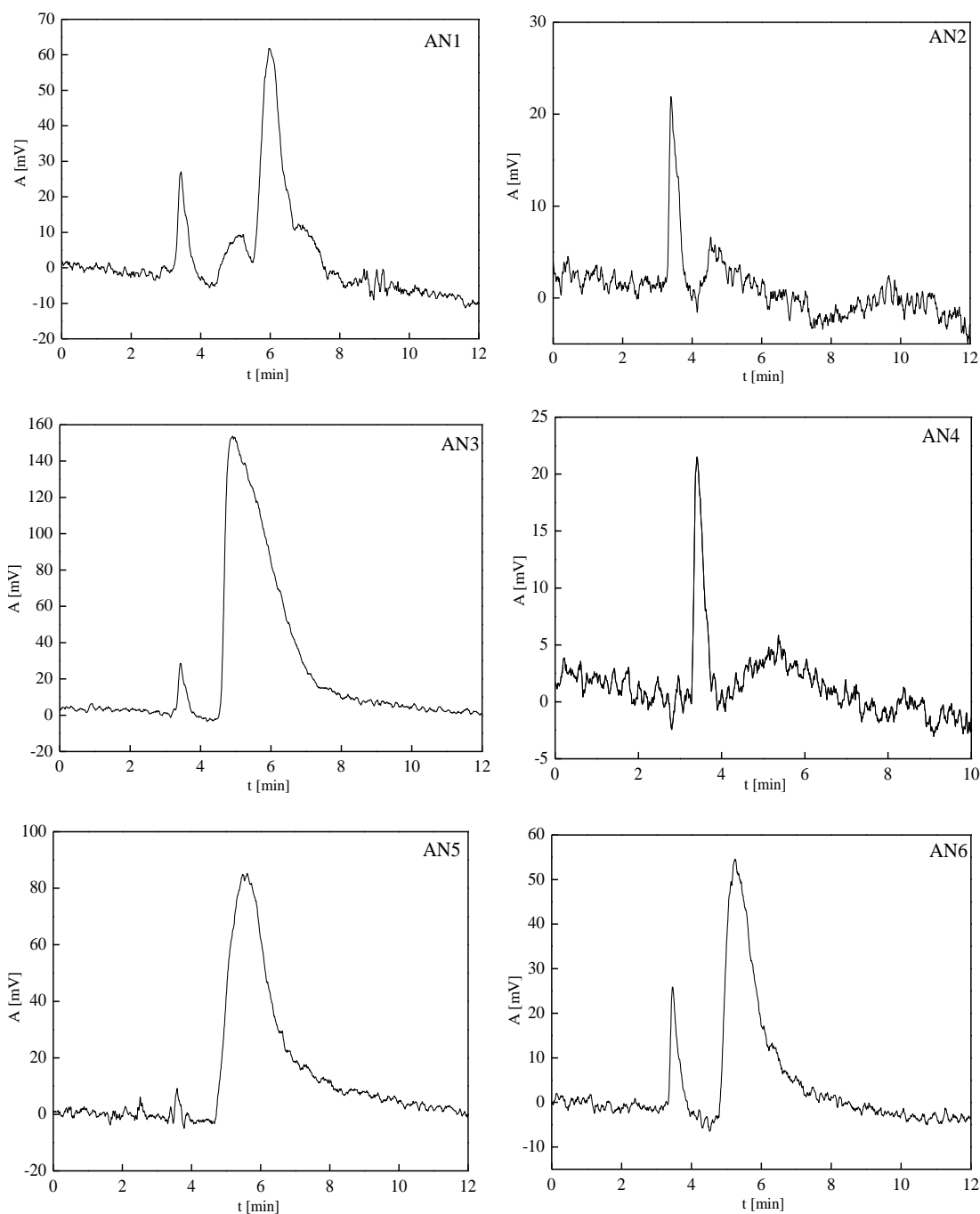
3.2. Separace na komerčních kolonách v RP-HPLC modu

Pro separaci studovaných látek byly vybrány dvě kolony, a to kolona s klasickou reverzní fází C18 Biospher PSI-200 C18 (150 x 4,6 mm, $d_p = 7 \mu\text{m}$) a dále kolona s aminopropylou stacionární fází Biospher PSI-200 NH (150 x 4,6 mm, $d_p = 7 \mu\text{m}$), obě dodané firmou (Labió, ČR). Kolona C18 je klasickou kolonou pro RP-HPLC, pro separace založené především na hydrofobních

interakcích, zatímco aminopropyllová kolona je jednou z nejpolarnějších reverzních fází pro separace založené na hydrofilních interakcích.

Nejdříve byla testována kolona Biospher PSI-200 C18 s acetonitrilem jako organickým solventem. Byly použity mobilní fáze v poměru 50:50, 30:70 a 20:80 (% obj.) acetonitril/voda. Bohužel, všechny testované analyty eluovaly s mrtvým retenčním časem. Při volbě methanolu jako organického modifikátoru studované látky také eluovaly těsně za mrtvým retenčním časem. Pro úpravu pH mobilní fáze byl připraven 20 mM fosforečnanový pufr o pH 4,0 s ohledem na disociační konstanty studovaných látek [111]. Při použití mobilní fáze obsahující methanol a fosforečnanový pufr v různých objemových poměrech nebylo docíleno separace studovaných analytů. Všechny látky opět eluovaly v mrtvém retenčním čase nebo těsně za mrtvým retenčním časem, jak je zobrazeno na **obrázku 18**.

Jak je z **obrázku 18** patrné, citlivost detekce je velmi nízká. Píky testovaných analytů jsou velmi malé v porovnání s velikostí šumu. To je nejspíš dáno obsahem methanolu v mobilní fázi, jehož cut-off je velmi blízký vlnové délce detekce.



Obrázek 18 Separace AN1 až AN6 na koloně Biospher PSI-200 C18 (150 x 4,6 mm). Mobilní fáze 20:80 (% obj.) methanol/voda, vlnová délka detekce 210 nm, průtoková rychlost 0,5 ml/min, teplota kolony 25 °C.

Na základě výše uvedených experimentů a jejich výsledků byla studována separace na koloně Biospher PSI-200 NH. Nejdříve byl použit acetonitril jako organický modifikátor, protože jeho cut-off je posunut k nižším vlnovým délkám než je tomu u methanolu. Ovšem separace s acetonitrilem nebyly úspěšné, testované

analyty eluovaly s mrtvým retenčním časem. Proto byl vyzkoušen methanol jako organický modifikátor v mobilní fázi. Analyzované látky ovšem stále eluovaly s mrtvým retenčním časem, ani použití fosfátového pufru nepomohlo k lepší separaci analytů.

Přestože k separaci kyselých derivátů cyklu byly použity dvě zcela rozdílné kolony, nebylo možné je ani na jedné částečně separovat. Separací těchto derivátů spolu s esterovými deriváty cyklu se dále zabývala Mgr. A. Hamplová ve své diplomové práci [112] a v článku [113], kde použila různé druhy stacionárních fází k separaci studovaných analytů.

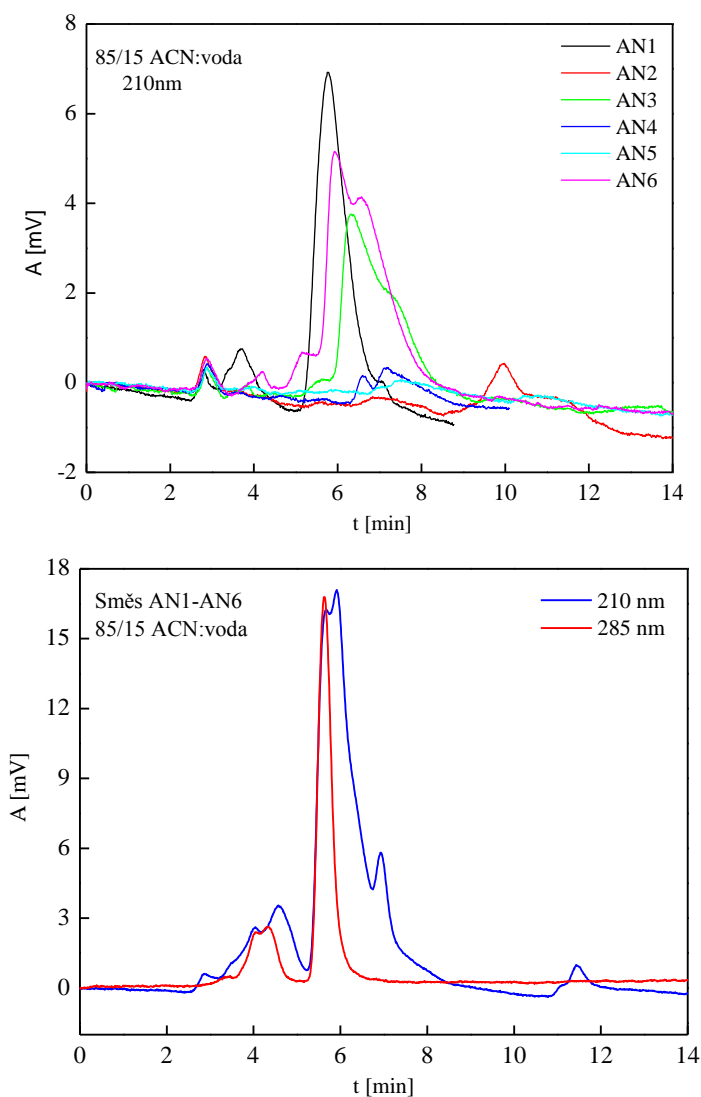
3.3. Separace derivátů cyklu na monolitických kolonách

Pro separaci kyselých derivátů cyklu byly připraveny monolitické kolony s hydroxymethylmetakrylamidovým (HMMAA) monomerem, které jsou vhodné pro separaci silně polárních látek v HILIC modu, jelikož je nebylo možné separovat na komerčních kolonách. Složení je stejné jako HMMAA kolony v *kapitole 2 Výsledky a diskuse*. Složení polymerizační směsi pro přípravu totožných monolitických kolon ANORG 1 až 3 je uvedeno v **tabulce 19**. Kapiláry dlouhé 20 cm byly naplněny polymerizační směsí a poté po dobu 20 hodin ponechány při 60 °C polymerizovat. Po ukončení procesu polymerace byly kolony zkráceny na délku 18 cm a promyty vodou s acetonitrilem v poměru 35:65 (% obj.).

Tabulka 19 Složení polymerizačních směsí (% hm.) použitých pro přípravu ANORG 1, 2 a 3 monolitických kolon; obsah AIBN byl 1 % (hm.) vzhledem k monomeru.

Složka/Kolona	ANORG 1, 2, 3
butan-1,4-diol	7,31
propan-1-ol	64,36
EDMA	12,86
HMMAA	15,47

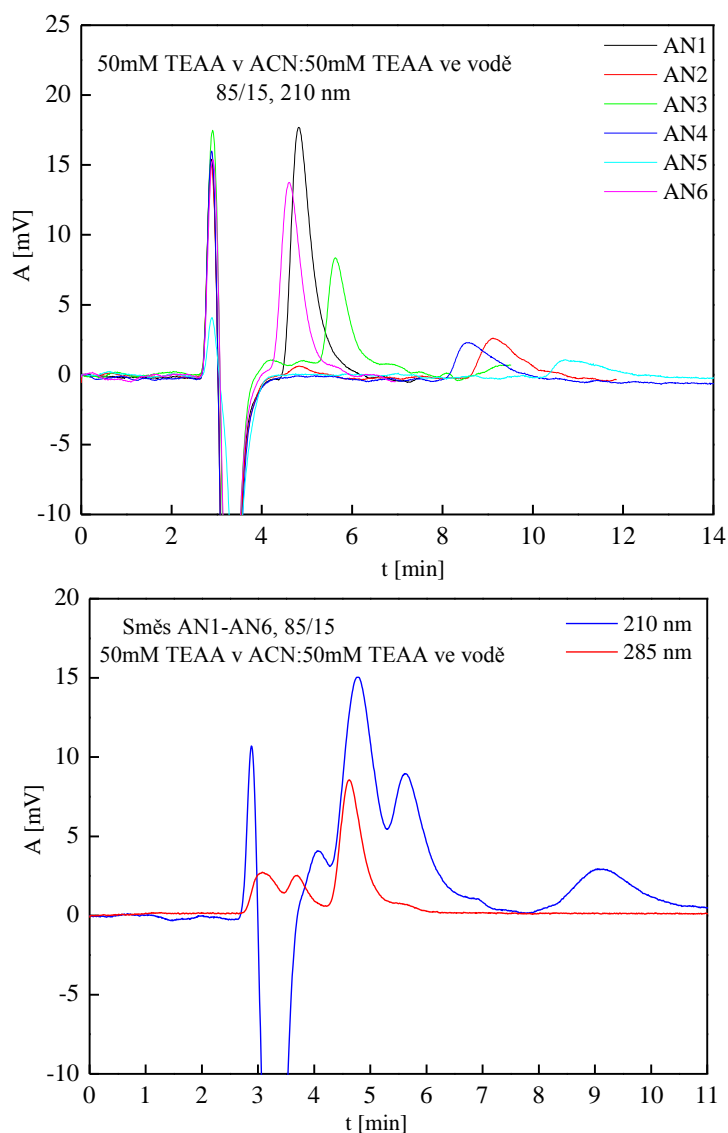
Nejdříve byla vyzkoušena separace s acetonitrilem a vodou 85:15 (% obj.) jako mobilní fází při průtoku 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Jak je z chromatogramů na **obrázku 19** vidět, píky analytů jsou nesymetrické a eluují těsně za mrtvým retenčním časem. Proto byla zvolena mobilní fáze použitá pro separaci v HILIC modu, která byla aplikována na separaci oligonukleotidů, tedy že mobilní fáze obsahovala 50 mM TEAA pro úpravu iontové síly mobilní fáze a také pro úpravu pH použité mobilní fáze.



Obrázek 19 Separace AN1 až AN6 na monolitické koloně ANORG 1. Mobilní fáze 15:85 (% obj.) voda/acetonitril, vlnová délka detekce 210 nm a 285 nm, průtoková rychlost 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, teplota kolony 25 $^{\circ}\text{C}$.

Při použití TEAA v mobilní fázi se tvar píků jednotlivých analytů výrazně zlepšil, jak je ostatně vidět na chromatogramech na **obrázku 20**, ale separace se o mnoho nezlepšila oproti předchozím případům. Jak je z chromatogramů patrné,

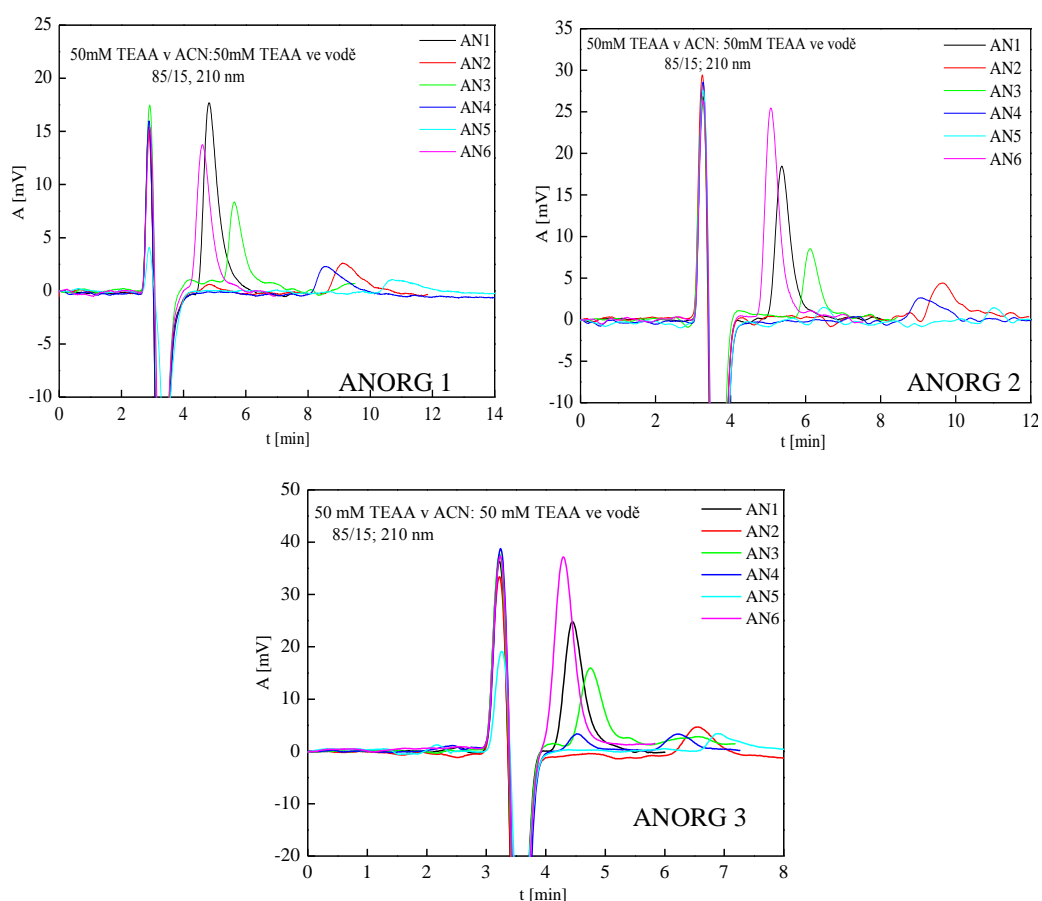
analyzované deriváty cykvenu se mohou podle separačních vlastností rozdělit do dvou skupin. A to jsou analyty AN1, AN3 a AN6, které při použitých mobilních fázích eluují těsně za mrtvým retenčním časem a druhou skupinu tvoří AN2, AN4 a AN5, které eluují kolem retenčního faktoru $k = 2,18$ pro kolonu ANORG 1. Tento fakt odpovídá strukturám látek, neboť AN2, AN4 a AN5 jsou více polární než druhá skupina látek AN1, AN3 a AN6. Čím více polární látka je, tím v HILIC modu eluuje v delším retenčním čase.



Obrázek 20 Separace AN1 až AN6 na monolitické koloně ANORG 1. Mobilní fáze 15:85 (% obj.) 50mM TEAA ve vodě/50mM TEAA v acetonitrilu, vlnová délka detekce 210 nm a 285 nm, průtoková rychlost 5 μ l/min, teplota kolony 25 $^{\circ}$ C.

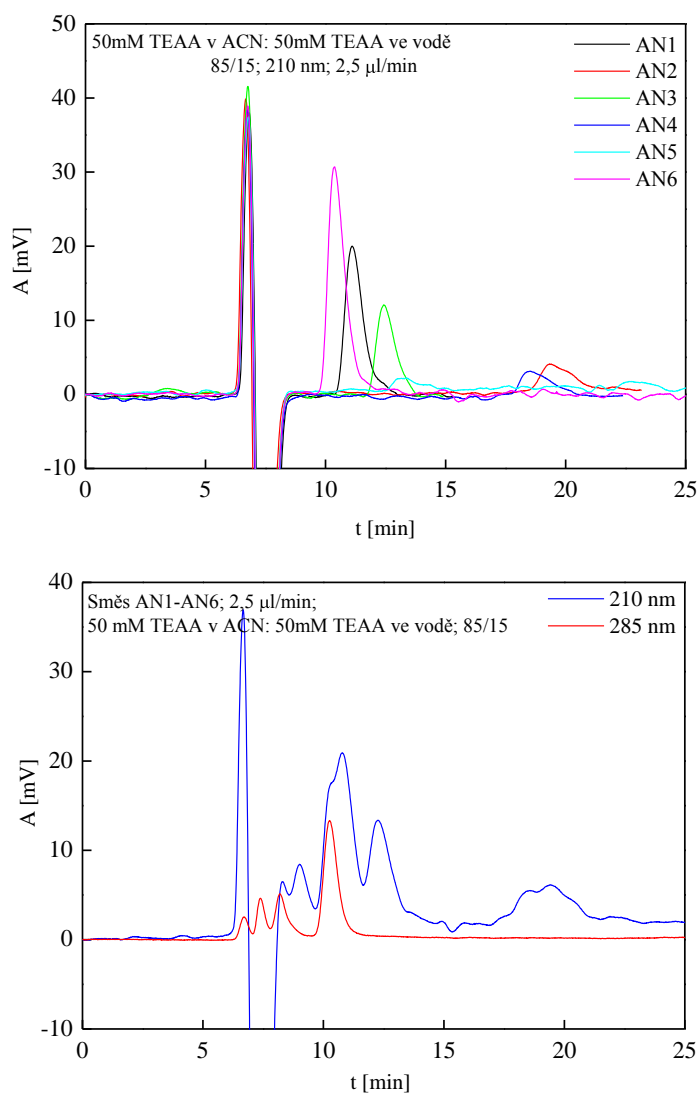
Protože analyty eluovaly těsně za mrtvým retenčním časem a nedošlo k dostatečnému rozdělení, byly vyzkoušeny ještě další mobilní fáze s přidavkem TEAA. Byly vyzkoušeny jiné poměry organického modifikátoru s 50 mM TEAA, ale při použití 10:90 (% obj.) 50 mM TEAA ve vodě/50 mM TEAA v acetonitrilu více polární analyty neeluovaly do 50 minut. Problém v tuto chvíli však tkvěl v tom, že nebylo možné použít gradientovou eluci, jelikož vybavení laboratoře to nedovolovalo. Při nahrazení acetonitrilu methanolem látky eluovaly s mrtvým retenčním časem, jelikož methanol je podstatně polárnější organický modifikátor než acetonitril.

Na všech připravených kolonách byly separovány analyty za použití mobilní fáze 15:85 (% obj.) 50 mM TEAA ve vodě/50 mM TEAA v acetonitrilu a průtoku mobilní fáze 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Na **obrázku 21** je názorně ukázáno, jak se separace liší na třech stejných kolonách ANORG 1, ANORG 2 a ANORG 3.



Obrázek 21 Separace AN1 až AN6 na monolitické koloně ANORG 1, ANORG 2 a ANORG 3. Mobilní fáze 15:85 (% obj.) 50 mM TEAA ve vodě/50 mM TEAA v CH_3CN , vlnová délka detekce 210 nm, průtoková rychlost 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, teplota kolony 25 $^\circ\text{C}$.

Jak je z chromatogramů na **obrázku 21** patrné, kolony ANORG 1 a ANORG 2 mají velmi podobné separační vlastnosti, kdežto kolona ANORG 3 vykazuje horší separaci všech analytů a také rychlejší eluci studovaných derivátů cykvenu – AN 2 na koloně ANORG 3 eluuje v čase přibližně 6,5 minut, kdežto na kolonách ANORG 1 a 2 eluuje kolem 10 minut. Tyto pozorované rozdíly mohou být způsobeny nehomogenitami v monolitu připravených monolitických kolon a také díky tomu, že testované kolony byly připraveny z různých polymeračních směsí.



Obrázek 22 Separace AN1 až AN6 na monolitické koloně ANORG 2. Mobilní fáze 15:85 (% obj.) 50 mM TEAA ve vodě/50 mM TEAA v CH₃CN, vlnová délka detekce 210 nm a 285 nm, průtoková rychlost 2,5 μl/min, teplota kolony 25 °C.

Pro lepší separaci byl použit nižší průtok mobilní fáze s již dříve použitou fází 15:85 (% obj.) 50 mM TEAA ve vodě/50 mM TEAA v acetonitrilu. Ani tato změna bohužel nepomohla k lepšímu rozdělení studovaných analytů, jak je vidět na **obrázku 22**, kde je zobrazena separace na koloně ANORG 2.

Jak je patrné z chromatogramů na **obrázku 22**, separace studovaných derivátů není vůbec dostatečná, je zde pouze nástin separace, kdy sledované látky koeluuji ve dvou směsných píkách, i když oddělení AN3 od méně polárních derivátů je znatelné.

3.4. Shrnutí separace derivátů DO3A na monolitických kolonách

Závěrem lze konstatovat, že na kolonách s HMMAA jako sorbentu nebylo docíleno dělení studovaných derivátů cyklenu především proto, že instrumentace v laboratoři neumožňovala použití gradientové eluce. Mód HILIC je velmi citlivý na změnu mobilní fáze. Při malé změně ve složení mobilní fáze při isokratické eluci dochází k výrazným změnám v eluci látek, ale bez zlepšení rozlišení testovaných analytů.

Pro separaci studovaných derivátů cyklenu by bylo možné použít buď gradientovou eluci na HMMAA kolonách, změnu pH mobilní fáze s ohledem na disociační konstanty derivátů cyklenu nebo použít jinou, více polární stacionární fázi. Avšak tyto výhledy do budoucnosti nejsou součástí a náplní této disertační práce.

ZÁVĚR

V dnešní době se v analytické chemii, stejně jako v jiných chemických i nechemických oborech, hledá cesta vedoucí ke snížení finančních nákladů při zachování dosavadní kvality služeb. V oblasti kapalinové chromatografie je to především snížení spotřeby rozpouštědel, což je v dnešní době velmi aktuální díky celosvětovému nedostatku acetonitrilu, a snížení spotřeby vzorku, což vede k miniaturizaci rozměrů separačního systému.

Jednou z cest může být v dnešní době stále více používaná UPLC (Ultra Pressure Liquid Chromatography), kdy se používají kolony o vnitřním průměru kolem 3 mm, a velikost částic se pohybuje kolem 1,8 μm . Průtok mobilní fáze je kolem 0,5 ml/min, doba analýzy je o polovinu kratší než v klasické HPLC a objem nástřiku vzorku je také alespoň poloviční. Ovšem i tak spotřeba mobilní fáze a vzorku není zanedbatelná, přestože za stejnou dobu jako na klasické HPLC je možné provést více analýz, spotřeba rozpouštědel je poloviční. Kromě toho, pro UPLC je zapotřebí pracovat s velmi čistými rozpouštědly a ty je nutné před použitím filtrovat, aby nedošlo k zanesení cest v chromatografu a také k zanesení frit na kolonách.

Další možnou cestou je právě použití kapilární kapalinové chromatografie (CLC), kdy se místo klasických kolon používá kapilár o vnitřním průměru 100 - 500 μm a průtoková rychlost mobilní fáze se pohybuje v rozmezí 1 až 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Také dávkovaný objem vzorku k analýze je kolem desítek až stovek nl. V tomto případě, i při zachování stejné délky analýzy jako je v klasické chromatografii, by spotřeba rozpouštědel byla 100krát menší stejně tak jako spotřeba vzorku.

Na druhou stranu, při měření v CLC je kladen větší důraz na instrumentaci. Především spojení chromatografické kolony s detekční celou je největším rizikem kapilární chromatografie, kdy nesprávnou volbou detekčního okénka může dojít k rozmývání píků. Nejčastějším zapojením, podobně jako tomu bylo v této práci, je tzv. „on-column“ zapojení, kdy byla použita externí kapilára s odstraněnou vrstvou polyamidu sloužící jako detekční okénko.

Přestože je příprava monolitických kolon na bázi organických polymerů velmi jednoduchá a levná, jejich použití v HPLC metodách ještě stále nenalezlo své uplatnění. Ve většině případů stále převládá použití tradičních kolon na bázi silikagelu, ačkoliv jsou tyto kolony často omezeny použitím vhodného pH mobilní fáze. Výhodou monolitických kolon je jejich užití v širokém rozsahu pH, od 1 až do 12, zatímco klasické kolony na bázi silikagelu je možné použít v rozmezí 2 až 8 jednotek pH. Mechanická odolnost a nepřítomnost frit na konci stacionární fáze jsou dalšími z četných výhod monolitických kolon. Jejich největší výhodou je, že je možné připravit bohatou škálu stacionárních fází s různými separačními vlastnostmi vhodnou volbou monomeru. Jak je vidět v této práci, pro přípravu různých kolon není zapotřebí žádná složitá instrumentace, stačí mít k dispozici širokou škálu chemikálií. Není velkým problémem připravit monolitické kolony podobné C18 kolonám stejně tak jako připravit kolony s odlišným charakterem, v tomto případě HMMAA kolony pro separaci vysoce polárních látek jako jsou např. oligonukleotidy. Tyto kolony obsahují funkční skupiny, které jsou schopny být v ionizovaném stavu.

Nevýhodou monolitických kolon je jejich špatná reprodukovatelnost. Při použití stejné polymerační směsi pro přípravu kolony je opakovatelnost srovnatelná s tradičními fázemi, ovšem jestliže dojde k jakékoliv malé změně ve složení polymerační směsi, výsledné monolity pak mají odlišné separační vlastnosti. Toto je možná jeden z největších nedostatků monolitických kolon, který zapříčiňuje jejich opomíjení v komerčním využití. Ve velkých provozech je nutné, aby při použití rozdílných šarží kolon, tedy kolon připravených v jiných dnech, byla daná separace shodná. Toto bohužel, jak je z výsledků v této práci zřejmé, monolitické kolony na bázi organických polymerů nespĺňují.

Tato práce se zabývala přípravami různých monolitických kolon s odlišnými separačními vlastnostmi. V první části byla snaha připravit methakrylátové monolitické kolony polymerací při laboratorní teplotě a sledovat jejich separační vlastnosti na směsi jednoduchých organických látek. Při porovnání s kolonami termicky připravenými byly vlastnosti kolon téměř shodné. V druhé části této práce byly připraveny kolony pro separaci oligonukleotidů. Nalezení vhodného monomeru, který by separoval studovanou směs tří oligonukleotidů, nebylo snadné, ale nakonec byly připraveny dva druhy monolitů, které velmi dobře separovaly oligonukleotidy

lišící se jen v jedné bázi. Pro separaci bylo ovšem zapotřebí gradientové eluce, která není tak snadno dostupná. K měření bylo zapotřebí v laboratoři vyrobit termostat pro kapilární kolonu a přestavět klasický HPLC přístroj pro měření při nižších průtocích a nízkém dávkovaném objemu vzorku. Ve třetí části byla snaha najít takovou stacionární fázi, která by od sebe dělila deriváty cyklenu. Tyto látky jsou velmi polární, a proto se vycházelo z kolon pro separaci oligonukleotidů. Ovšem v této laboratoři již nebylo možné použít gradientovou eluci, a tudíž nebylo dosaženo požadované separace.

Jak je z této práce vidět, není obtížné připravit různorodé monolitické kolony. Proto doufám, že zájem o monolitické kolony poroste a spolu s kapilární kapalinovou chromatografií se stanou běžnou součástí vybavení laboratoří.

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

- A..... adenin
- a_i vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné desetině jeho výšky
- AIBN..... α, α' -azobisisobutyronitril
- AMPS..... 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonová kyselina
- A_S faktor asymetrie
- b_i vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a sestupnou částí píku v jedné desetině jeho výšky
- BMA butylmethakrylát
- C..... cytosin
- CEC..... Capillary Electrochromatography, kapilární elektrochromatografie
- CLC..... Capillary Liquid Chromatography, kapilární kapalinová chromatografie
- CIM[®] Convective Interaction Media
- DEAEM 2-(diethyl)aminoethylmethakrylát
- DMAEM 2-(dimethyl)aminoethylmethakrylát
- EDMA..... ethylenglykoldimethakrylát
- F_m průtok mobilní fáze
- G..... guanin
- GDM glycidylmethakrylát
- HEMA..... (2-hydroxy)ethylmethakrylát

HETP..... Height Equivalent to a Theoretical Plate, výškový ekvivalent teoretického patra

HI Hydrophobic Index, Index hydrofobnosti

HILIC Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography, hydrofilně interakční kapalinová chromatografie

HMMAA..... N-(hydroxymethyl)methakrylát

NMR Nuclear Magnetic Resonance, nukleární magnetická rezonance

HPLC High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

k retenční faktor

L délka kolony

LC Liquid Chromatography, kapalinová chromatografie

MAPDS..... [3-(methakryloylamino)propyl]-dimethyl(3-sulfopropyl)amonium hydroxid

MRI..... Magnetic Resonance Imaging, zobrazování magnetickou resonancí

MS..... monomerní směs

N počet teoretických pater na metr délky kolony

PEEK..... polyetheretherketon

PS porogenní směs

RSD..... Relative Standard Deviation, relativní směrodatná odchylka

R_S rozlišení dvou píků elujících po sobě

T thymin

TEAA triethylaminoacetát

TEMED..... N,N,N',N' - tetramethylethyldiamin

t_m mrtvý retenční čas

t_r retenční čas
 V_k objem kolony
 w šířka píku při základně
 $w_{(0,5)}$ šířka píku v polovině jeho výšky
 ε celková porozita kolony
 γ -MAPS (γ -methakryloyloxypropyl)trimethoxysilan

Seznam použité literatury

- [1] C.G. Horváth, B.A. Preiss, S.R. Lipský, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1422.
- [2] C.G. Horváth, S.R. Lipský, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 1227.
- [3] D. Ishii, K. Asai, K. Hibi, T. Jonokuchi, M. Nagaya, *J. Chromatogr.*, 144 (1977) 157.
- [4] D. Ishii, K. Hibi, K. Asai, T. Jonokuchi, *J. Chromatogr.*, 151 (1978) 147.
- [5] D. Ishii, A. Hirose, K. Hibi, Y. Iwasaki, *J. Chromatogr.*, 157 (1978) 43.
- [6] T. Tsuda, M. Novotny, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 271.
- [7] R.P.W. Scott, P. Kuchera, M. Munroe, *J. Chromatogr.*, 186 (1979) 475.
- [8] F.J. Yang, *J. Chromatogr.*, 236 (1982) 265.
- [9] W.T. Kok, U.A.Th. Birkman, R.W. Frei, H.B. Hanekamp, F. Nooitgedach, H. Poppe, *J. Chromatogr.*, 237 (1982) 357.
- [10] C. Eckers, K.K. Cuddy, J.D. Henion, *J. Liq. Chromatogr.*, 6 (1983) 2383.
- [11] J.P.C. Vissers, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A*, 779 (1997) 1.
- [12] J.P.C. Vissers, *J. Chromatogr. A*, 856 (1999) 117.
- [13] C. Legido-Quigley, N.D. Marlin, V. Melin, A. Manz, N.W. Smith, *Electrophoresis*, 24 (2003) 917.
- [14] M. Novotny, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 502A.
- [15] A. Prüß, Ch. Kempter, J. Gysler, T. Jira, *J. Chromatogr. A*, 1016 (2003) 129.
- [16] T. Takeuchi, *Chromatography*, 26 (2005) 7.
- [17] J.P. Chervet, M. Ursem, J.P. Salzman, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1507.
- [18] Y. Saito, K. Jinno, T. Greibrokk, *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) 1379.
- [19] C. Viklund, F. Svec, J.M.J. Fréchet, K. Irgum, *Chem. Mater.*, 8 (1996) 744.

- [20] S. Hjertén, J.L. Liao, R. Zhang, *J. Chromatogr.*, 473 (1989) 273.
- [21] T.B. Tennikova, F. Svec, B.G. Belenkii, *J. Liquid Chromatogr.*, 13 (1990) 63.
- [22] H. Minakuchi, K. Nakanashi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3496.
- [23] M. Kubín, P. Špaček, R. Chromeček, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 32 (1967) 3881.
- [24] W.D. Ross, R.T. Jefferson, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 386.
- [25] F.D. Hileman, R.E. Sievers, G.G. Hess, W.D. Ross, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1126.
- [26] H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, *J. Chromatogr.*, A 954 (2002) 5.
- [27] S.M. Fields, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2709.
- [28] G. Iberer, R. Hahn, A. Jungbauer, *LC-GC* 17 (1999) 1001.
- [29] Ch. Fujimoto, Y. Fujise, E. Matsuzawa, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2753.
- [30] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3646.
- [31] R. Wu, L. Hu, F. Wang, M. Ye, H. Zou, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 369.
- [32] K. Cabrera, D. Lubda, H.-M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, *J. High Resol. Chromatogr.*, 23 (2000) 93.
- [33] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 420A.
- [34] Q. Tang, Y. Shen, N. Wu, M.L. Lee, *J. Microcolumn Separations*, 11 (1999) 415.
- [35] J. Randon, S. Huguet, A. Piram, G. Puy, C. Demesmay, J.-L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, 1109 (2006) 19.
- [36] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 1028 (2004) 1.

- [37] G. Guiochon, J. Chromatogr. A, 1168 (2007) 101.
- [38] F. Svec, E.C. Peters, D. Sýkora, J.M.J. Fréchet, J. Chromatogr. A, 887 (2000) 3.
- [39] F. Svec, E.C. Peters, D. Sýkora, C. Yu, J.M.J. Fréchet, J. High Resol. Chromatogr., 23 (2000) 3.
- [40] F. Švec, T.B. Tennikova, Z. Deyl (editors), *Monolithic materials – preparation, properties and applications*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2003, ISBN: 0-444-50879-1, first edition.
- [41] <http://www.merck.cz/> (29. 4. 2009)
- [42] <http://www.phenomenex.com/home.aspx> (29. 4. 2009)
- [43] <http://www.dionex.com> (29. 4. 2009)
- [44] A. Podgornik, M. Barut, J. Jančar, A. Štrancar, J. Chromatogr., A 848 (1999) 51.
- [45] T.B. Tennikova, F. Svec, B.G. Belenkii, J. Liq. Chromatogr., 13 (1990) 63.
- [46] <http://www.biaseparations.com/> (29. 4. 2009)
- [47] <http://www.home.agilent.com/> (29. 4. 2009)
- [48] O. Núñez, K. Nakanishi, N. Tanaka, J. Chromatogr. A, 1191 (2008) 231.
- [49] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Anal. Chem., 68 (1996) 3498.
- [50] K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, Journal of Sol-Gel Science and Technology, 8 (1997) 547.
- [51] K. Nakanishi, H. Shikata, N. Ishizuka, N. Koheiya, N. Soga, J. High Resol. Chromatogr., 23 (2000) 106.
- [52] I. Gusev, X. Huang, C. Horváth, J. Chromatogr. A, 855 (1999) 273.
- [53] F. Svec, J.M.J. Fréchet, J. Chromatogr. A, 702 (1995) 89.

- [54] A.S. Zalusky, R. Olayo-Valles, C.J. Taylor, M.A. Hillmyer, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 1519.
- [55] E.C. Peters, M. Petro. F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2288.
- [56] E.C. Peters, M. Petro. F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2296.
- [57] S. Xie, F. Švec, J.M.J. Fréchet, *J. Chromatogr. A*, 775 (1997) 65.
- [58] S. Caglio, P.G. Righetti, *Electrophoresis*, 14 (1993) 554.
- [59] X.D. Feng, X.Q. Guo, K.Y. Qiu, *Makromol. Chem.*, 189 (1988) 77
- [60] M. Grasselli, E. Smolko, P Hargittai, A. Safrany, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, 185 (2001) 254.
- [61] Ch. Ericson, J.-L. Liao, N. Nakazato, S. Hjertén, *J. Chromatogr. A*, 767 (1997) 33.
- [62] M. Petro. F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1331.
- [63] D. Sykora, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Chromatogr. A*, 852 (1999) 297.
- [64] M. Zhang, Y. Sun, *J. Chromatogr. A*, 912 (2001) 31.
- [65] Q. Luo, H. Zou, Q. Zhang, X. Xiao, Z. Guo, L. Kong, X. Mao, *J. Chromatogr. A*, 926 (2001) 255.
- [66] E. Vlakh, A. Novikov, G. Vlasov, T. Tennikova, *J. Pept. Sci.*, 10 (2004) 719.
- [67] P. Pruijm, M. Öhman, Y. Huo, P.J. Schoenmakers, W.T. Kok, *J. Chromatogr. A*, 1208 (2008) 109.
- [68] G.S. Chirica, V.T. Remcho, *J. Chromatogr. A*, 924 (2001) 223.
- [69] A. Podgornik, M. Barut, J. Jancar, A. Strancar, *J. Chromatogr. A*, 848 (1999) 51.
- [70] B. Preinerstorfer, W. Lindner, M. Lämmerhofer, *Electrophoresis*, 26 (2005) 2005.
- [71] Y. Li, J. Zhang, R. Xiang, Y. Yang, C. Horváth, *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) 1467.

- [72] P. Coufal, M. Čihák, J. Suchánková, E. Tesařová, Z. Bosáková, K. Štulík, *J. Chromatogr. A* 1049 (2002) 99.
- [73] R. Wu, H. Zou, M. Ye, Z. Lei, J. Ni, *Electrophoresis*, 22 (2001) 544.
- [74] T. Jiang, J. Jiskra, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A*, 923 (2001) 215.
- [75] B. Buszewski, M. Szumski, S. Suś, *LC-GC Eur.*, 15 (2002) 782.
- [76] O. Núñez, T. Ikegami, W. Kajiwara, K. Miyamoto, K. Hoire, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1156 (2007) 35.
- [77] T. Qi, A. Sonoda, Y. Makita, H. Kanoh, K. Ooi, T. Hirotsu, *J. Appl. Polym. Sci.*, 83 (2002) 2374.
- [78] D. Horak, J. Labsky, *React. Funct. Polym.*, 32 (1997) 277.
- [79] K. Deguchi, M. Ishikawa, T. Yokokura, I. Ogata, S. Ito, T. Mimura, Ch. Ostrander, *Rapid Commun. In Mass Spectrom.*, 16 (2002) 2133.
- [80] L.R. Zieske, *Biochromatography*, 3 (1988) 112.
- [81] Y.-F. Maa, S.-C. Lin, C. Horváth, U.-C. Yang, D.M. Crothers, *J. Chromatogr.*, 508 (1990) 61.
- [82] P.N. Nguyen, J.L. Bradely, P.M. McGuire, *J. Chromatogr.*, 236 (1982) 508.
- [83] H. Oberacher, A. Krajete, W. Parson, Ch. G. Huber, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 3.
- [84] M. Gilar, K.J. Fountain, Y. Budman, U.D. Neue, K.R. Yardley, P.D. Rainville, R.J. Russell II, J.C. Gebler, *J. Chromatogr. A*, 958 (2002) 167.
- [85] K. Suzuki, T. Doi, T. Imanishi, T. Kodama, T. Tanaka, *Eur. J. Biochem.*, 260 (1999) 855.
- [86] R.I. Hogfrede, M.V. Vaghefi, M.A.Reynolds, K.M. Younf, L. J. Arnold Jr., *Nucleic Acid Research*, 21 (1993) 2031.

- [87] G.B. Belenkii, G.E. Kassalainen, D.G. Nasledov, *J. Chromatogr. A*, 879 (2000) 189.
- [88] C. Gelfi, M. Perego, P.G. Righetti, *Electrophoresis*, 17 (1996) 1470.
- [89] I.S. Krull, A. Sebag, R. Stevenson, *J. Chromatogr. A*, 887 (2000) 137.
- [90] M. Bunčec, V. Bačková, Š. Holasová, H. Radilová, M. Šafářová, F. Kunc, *Chromatographia*, 62 (2005) 263.
- [91] C.P. Bisjak, R. Bakry, C.W. Huck, G.K. Bonn, *Chromatographia*, 62 (2005) S31.
- [92] B. Mayr, G. Holzl, K. Eder, C.G. Buchmeister, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 6080.
- [93] A. Premsteller, H. Oberacher, Ch. G. Huber, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4386.
- [94] M. Merhar, A. Podgornik, M. Barut, S. Jaksa, M. Zigon, A. Strancar, *J. Liq. Chromatogr.*, 24 (2001) 2429.
- [95] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.*, 27 (1989) 721.
- [96] H. Engelhardt, M. Jungheim, *Chromatographia*, 29 (1990) 59.
- [97] M.J. Walters, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (1978) 465.
- [98] S.V. Galushko, *Chromatographia* 36 (1993) 39.
- [99] D. Josic, A. Buchacher, A. Jungbauer, *J. Chromatogr. B* 752 (2001) 191.
- [100] J.-L. Liao, R. Zhang, S. Hjertén, *J. Chromatogr.*, 586 (1991) 21.
- [101] A. Palm, M.V. Novotny, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4499.
- [102] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.*, 499 (1990) 177.
- [103] B.-Y. Zhu, C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Chromatogr.*, 548 (1991) 13.
- [104] A.A. Padmapriya, J. Tang, S. Argawal, *Antisense Res. Dev.*, 4 (1994) 185.
- [105] F. Lesignoli, A. Gemini, R. Corradini, G. Galaverna, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Chromatogr. A*, 922 (2001) 177.

- [106] S.T Crooke, Antisense research and application, Berlin: Springer-Verlag, 1998.
- [107] M.P. Henry, editor: W.S. Hancock: High-Performance Liquid Chromatography in Biotechnology, New York: Willey, 1990.
- [108] M. Gilar, E.S.P. Bouvier, J. Chromatogr. A, 890 (2000) 167.
- [109] <http://www.sequant.com> (4.4.2009)
- [110] L. Percelay, P. Appriou, H. Handel et al, Anal. Chim. Acta, 209 (1988) 249.
- [111] M. Forsterova, I. Svobodova, P. Lubal, P. Táborský, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, Dalton Transactions 5 (2007) 535.
- [112] A. Hamplová, Diplomová práce: Separace polykarboxylátových derivátů cyklenu pomocí HPLC, 2007, Praha.
- [113] A. Hamplová, P. Coufal, Z. Bosáková, F. Opekar, V. Kubíček, Chem. Listy, 102 (2008) 194.

Seznam publikací a prezentací

Články:

P. Holdšvendová, P. Coufal, J. Suchánková, E. Tesařová, Z. Bosáková: Methacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography polymerized using ammonium peroxodisulfate as initiator, *Journal of Separation Science* 26 (2003), 1623-1628

P. Holdšvendová, J. Suchánková, M. Bunčeka, V. Bačkovská, P. Coufal: Hydroxymethyl methacrylate-based monolithic columns designed for separation of oligonucleotides in hydrophilic-interaction capillary liquid chromatography, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 23–29

Plakátová sdělení:

P. Holdšvendová, J. Suchánková, Z. Bosáková, E. Tesařová, P. Coufal: Methakrylátové monolity polymerizované peroxodisíranem amonným pro kapilární kapalinovou chromatografii, *Pokroky v moderních separačních technikách, Chiranal*, Olomouc, srpen 2002

J. Grafnetter, P. Holdšvendová, P. Coufal, J. Suchánková: Zjednodušení porogenní směsi pro přípravu methakrylátových monolitických kolon, *X. konferencia-Súčasný stav a perspektívy analytickej chemie v praxi*, Bratislava, Slovensko, září 2002

J. Grafnetter, P. Holdšvendová, P. Coufal, J. Suchánková: Butyl methacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography, *5th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods*, Siófok, Maďarsko, září 2003

P. Holdšvendová, M. Bunček, V. Bačkovská, J. Suchánková, P. Coufal: Monolithic Columns for Separation of Oligonucleotides in Capillary Liquid Chromatography, *5th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods*, Siófok, Maďarsko, září 2003

J. Nejmanová, P. Holdšvendová, Z. Bosáková, P. Coufal, J. Suchánková, I. Němcová: Utilizing of micellar electrokinetic chromatography for separation and quantification of newly synthesized hydrophobic drugs, *XII. konferencia-Súčasný stav a perspektívy analytickej chemie v praxi*, Bratislava, Slovensko, září 2004

Životopis

Jméno: Petra Holdšvendová
Datum narození: 27. červen, 1978
Adresa: Sokolovská 1644, 250 88 Čelákovice
Česká republika
Email: Polarka_2000@email.cz

Vzdělání:

2001 - 2009

postgraduální studium na Katedře analytické chemie, PřF UK v Praze

- disertační práce na téma „Využití monolitických kolon v kapilární kapalinové chromatografii“
- půlroční stáž v komerční laboratoři, firma Generi-Biotech s.r.o., Hradec Králové

1996 – 2001

magisterské studium na Katedře analytické chemie, PřF UK v Praze

- v roce 2001 obhájena Diplomová práce „Stanovení flavonoidů obsažených v historických textilích metodou HPLC“

Praxe:

2006 - současnost

HPLC analytik na R&D oddělení, Quinta-Analytica, s.r.o.

2004 - 2006

HPLC analytik na oddělení QC analýz, Quinta-Analytica, s.r.o.

Jazykové znalosti:

Angličtina (TOEFL)

Příloha

publikace:

P. Holdšvendová, P. Coufal, J. Suchánková, E. Tesařová, Z. Bosáková: *Methacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography polymerized using ammonium peroxodisulfate as initiator*, Journal of Separation Science 26 (2003), 1623-1628; IF = 2,108, citováno 29krát k 15.5.2009

P. Holdšvendová, J. Suchánková, M. Bunčeka, V. Bačkovská, P. Coufal: *Monolithic Hydroxymethyl methacrylate-based monolithic columns designed for separation of oligonucleotides in hydrophilic-interaction capillary liquid chromatography*, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 23–29; IF = 1,338, citováno 11krát k 15.5.2009