

MODERNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE PRO RP-HPLC

DAVID SÝKORA^a, EVA TESAŘOVÁ^b, MAGDA VOSMANSKÁ^a a MONIKA ZVOLÁNKOVÁ^a

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^b Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2

David.Sykora@vscht.cz

Došlo 6.4.06, přijato 22.6.06.

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, reverzní fáze, monolity, hybridní sorbenty

Obsah

1. Úvod – Pittcon 2005
2. Současné trendy ve vývoji HPLC sorbentů
 - 2.1. Porézní sorbenty
 - 2.2. Neporézní a povrchově porézní sorbenty
 - 2.3. Perfuzní sorbenty
 - 2.4. Monolity
3. Vybrané moderní stacionární fáze pro RP-HPLC
 - 3.1. Reverzní fáze na bázi silikagelu – stručný vývoj a současný stav
 - 3.1.1. Zlepšení kvality výchozího silikagelu
 - 3.1.2. Zlepšení chemické odolnosti reverzních silikagelových fází
 - 3.1.3. Speciální sorbenty určené pro RP-HPLC v mobilních fázích s vysokým obsahem vody
 - 3.2. Hybridní anorganicko-organické sorbenty pro RP-HPLC
 - 3.3. Reverzní fáze založené na oxidech hliníku, zirkonia a titanu
 - 3.4. Monolitické stacionární fáze pro RP-HPLC
 - 3.4.1. Makroporézní monolitické disky
 - 3.4.2. Rigidní makroporézní polymerní monolitické kolony
 - 3.4.3. Tubulární monolitické kolony s radiálním tokem
 - 3.4.4. Silikagelové monolitické kolony
 - 3.4.5. Monolity – stacionární fáze budoucnosti
4. Závěr

1. Úvod – Pittcon 2005

Každoročně se v USA koná významná konference Pittcon, kde jsou představovány nejnovější výrobky a inovace v oblasti analytické chemie. Jedná se o největší výstavu svého druhu na světě. V rámci výstavy je věnován značný prostor také separačním technikám. Na základě poznatků z konference konané v roce 2005 lze stručně shrnout současné trendy v oblasti vysokoúčinné chromatografie do několika následujících bodů¹:

- zkracování kolon a zmenšování velikosti částic sorbentu,
- používání kolon s menším vnitřním průměrem, tj. mikro a kapilárních kolon,
- komplexní miniaturizace celých separačních systémů,
- důraz na automatizaci analýz,
- využití ultravysokých tlaků v chromatografii,
- stále rostoucí význam techniky LC-MS.

V posledních letech je patrná silná tendence ke zmenšování rozměrů zrn/částic sorbentů. Před deseti lety byly nejpoužívanější stacionární fáze 5 μm , dnes jsou nejrozšířenější fáze 3 μm . Stále běžněji jsou komerčně dostupné i sorbenty s velikostí částic pod 2 μm . Zmenšování sorbentu jde ruku v ruce se zkracováním chromatografických kolon. Výsledkem je podstatné zkrácení dob analýz bez ztráty účinnosti ve srovnání se separacemi provedenými na kolonách tradiční délky (25 cm) plněných 5 μm sorbentem. Doby analýz na krátkých kolonách (5 cm, 2 cm i menších) určených pro tzv. rychlou chromatografii bývají kolem 1 až 2 minut. Tyto kolony jsou s výhodou užívány zejména pro tzv. vysokoprostupné („high-throughput“) analýzy v oblastech, kde jsou denně zpracovávány stovky až tisíce vzorků. Jako příklad lze uvést chromatografickou analýzu kombinatoriálních knihoven. Krátké kolony se ale začínají prosazovat i v „běžných“ chromatografických aplikacích a celá řada firem poskytuje rostoucí sortiment kolon těchto nových formátů.

Vedle zkracování kolon dochází postupně také ke zmenšování jejich vnitřního průměru. Tradiční průměr analytických kolon 4,6 mm je postupně opouštěn a nahrazen dnes již běžnějšími průměry kolem 3–4 mm. S nástupem techniky LC-MS vzrostla popularita kolon o průměru 2 mm a menším. Tento trend souvisí nejen se snahou o zrychlení analýz, ale také s úsilím o zlepšení ekonomiky provozu chromatografických laboratoří a v neposlední řadě i s hledisky ekologickými. Spotřeba mobilních fází, obvykle obsahujících organická rozpouštědla, a množství vznikajících odpadů může být tímto způsobem řádově sníženo. Navíc nově se rozvíjející obory, např. proteomika, vyžadují provádění separací v kolonách kapilárních a menších, protože množství vzorků bývají velmi malá a nároky na mez detekce vysoké. Splnění těchto po-

žadavků klade velké nároky nejen na vývoj stále lepších sorbentů, ale i instrumentálních systémů. Čerpadla mobilní fáze musí generovat potřebné tlaky, mimokolonové objemy je třeba minimalizovat stejně jako rozměry detekčních cel, příslušné časové konstanty musí být sníženy apod. Podrobnější diskuse nových trendů v oblasti chromatografické instrumentace je ovšem mimo rámec tohoto příspěvku. Nicméně, v této souvislosti je vhodné alespoň upozornit na první komerční systém pro ultravysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UPLC) schopný generovat tlaky kolem 100 MPa (Waters), který byl představen na výstavě Pittcon 2005. Pozoruhodný je také první komerční HPLC-čip s LC-MS rozhraním (Agilent Technologies), který využívá mikrofluidní technologii a integruje na ploše menší než kreditní karta obohacovací kolonu, analytickou kolonu, šesticečný ventil, elektrosprejovou jehlu, elektrické kontakty a identifikační mikročip. Je zřejmé, že právě miniaturizace je v současnosti jedním z hlavních směrů v oblasti separačních technik, kde se otevírá obrovské pole působnosti nejen pro další rozvoj instrumentace, ale i vývoj nových stacionárních fází.

Pokud se jedná o separační mody HPLC, je možno konstatovat, že dělení na reverzních fázích (RP) je stále nejrozšířenější technikou, přitom dominantní postavení mají již tradičně partikulární vázané fáze na bázi silikagelu. Ze silikagelových RP jsou dlouhodobě nejpopulárnější C₁₈ modifikace s tím, že tyto fáze představovaly kolem 50 % všech RP kolon nově uváděných na trh v roce 2005. S velkým odstupem následují modifikace C₈ (13 %), fluorované fáze, alkylované fáze s řetězcí delšími než 18 uhlíků, fenylové fáze, fáze se zabudovanou polární funkční skupinou, C₄ modifikace a další. Vedle silikagelových partikulárních sorbentů se v moderní RP-HPLC stále více prosazují materiály nové, jako např. anorganicko-organické hybridy a modifikované oxidy kovů. Velmi perspektivní jsou také monolitické kolony.

2. Současné trendy ve vývoji HPLC sorbentů

Ačkoliv vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří ke „zralým“ analytickým technikám, tempo vývoje sorbentů rozhodně nepolevuje a na trh jsou uváděny stále pokročilejší materiály s lepšími vlastnostmi. Tyto inovace přinášejí nejen nové chemické modifikace na stávajících maticích, ale také využití modernějších matic a změny vlastního formátu separačního lože.

2.1. Porézní sorbenty

Porézní sorbenty si zachovávají dlouhodobě dominantní postavení v HPLC. Začátkem sedmdesátých let byl připraven mikropartikulární silikagel s velikostí zrn menší než 10 μm. Brzy poté byly připraveny jeho první chemicky modifikované formy, včetně reverzní fáze. Zpočátku byly částice silikagelu nepravidelného tvaru, ale postupně se podařilo zvládnout technologii výroby vedoucí ke sférickým částicím, a tak zlepšit separační účinnost, ale i další

vlastnosti výsledných sorbentů.

Jedním z cílů při vývoji nových chromatografických sorbentů vždy bylo dosažení vysoké separační účinnosti, která úzce souvisí s morfologií porézních částic. Většina povrchu typických porézních sorbentů je tvořena difuzivními póry. Zmenšení velikosti částic sorbentu zlepšuje inter- i intra-partikulární přenos hmoty. V porézní částici putuje solut z pohybující se mobilní fáze do stagnantní mobilní fáze, a pak do stacionární fáze uvnitř pórů, kde dochází k jeho interakci. Následně se analyt uvolní ze stacionární fáze a musí difundovat zpět do pohybující se mobilní fáze. Tímto mnohonásobně se opakujícím procesem analyt postupuje kolonou. V případě použití malých zrn sorbentu je difuzní proces rychlejší. Pomalý přenos hmoty ve stacionární fázi bývá hlavní příčinou malé separační účinnosti spojené s rozšiřováním píků a následně nedostačným chromatografickým rozlišením. Výroba sférických plně porézních částic řízené velikosti (a s úzkou distribucí) je v současnosti dobře zvládnuta. Jak bylo výše uvedeno, v oblasti porézních částic jsme v současnosti svědky pokračujícího trendu, který byl „nastartován“ již v 90. letech, tedy zmenšování velikosti sorbentu, zkracování, a také zmenšování průměru kolon.

2.2. Neporézní a povrchově porézní sorbenty

Snaha o urychlení přenosu hmoty ve stacionární fázi vedla k vývoji neporézních materiálů. Lze je rozdělit na neporézní silikagelové a neporézní polymerní částice. Neporézní sorbenty připomínají chromatografické náplně užívané v počátcích HPLC, liší se však velikostí. Současné neporézní částice mají rozměry kolem 2 μm (viz cit.²). Vlastní stacionární fáze je nanesena ve velice tenké vrstvě na povrchu neprostupné mikročástice. Přenos hmoty ve stacionární fázi je velmi rychlý a vysoké účinnosti jsou dosahovány i při velkých průtocích mobilní fáze nejen při dělení malých molekul, ale i syntetických polymerů a biomakromolekul³. Nevýhodou těchto materiálů je jejich malá sorpční kapacita v důsledku značně omezené velikosti povrchu stacionární fáze. Uvedené sorbenty lze snadno přetížit, a proto nejsou vhodné pro preparativní dělení. Navíc vzhledem k malým rozměrům částic sorbentu se na kolonách generuje vysoký tlak, podstatně vyšší než na mikropartikulárních plně porézních sorbentech s velikostí 5 μm.

Povrchově porézní sorbenty jsou podobné neporézním, ale neprostupné jádro bývá větší, kolem 5 μm, a vrstva stacionární fáze silnější. Tlaky na koloně plněné těmito materiály jsou tedy nižší než na kolonách s neporézními sorbenty, naopak sorpční kapacita je větší, a přitom dosažované účinnosti bývají lepší než na plně porézních materiálech.

2.3. Perfuzní sorbenty

Perfuzní sorbenty byly vyvinuty Afeyanem, Regnierem a spol.^{4,5} a komercializovány firmou Perseprive Biosys-

tems (Massachusetts, USA) koncem 80. let. Uvedené sorbenty jsou určeny především pro separace biomakromolekul. Na rozdíl od konvenčních porézních materiálů obsahují perfuzní sorbenty dva typy pórů: difuzivní a tzv. „through pores“. Difuzivní póry jsou analogické jako u běžných porézních sorbentů a zajišťují dostatečnou sorpční kapacitu materiálu, protože většina povrchu sorbentu je tvořena právě těmito póry. „Through pores“ jsou řádově větších rozměrů a díky nim část mobilní fáze prochází přímo zrny sorbentu. Tak se vytváří konvektivní proudění uvnitř částic a výrazně se zrychluje přenos hmoty ve stacionární fázi. Výsledkem je vysoká separační účinnost i při rychlých analýzách makromolekul.

Komerční perfuzní materiály jsou polymerní sorbenty poněkud větších rozměrů než v současnosti vyráběné porézní stacionární fáze, běžně nad 12 μm . Jejich velkou předností je nejen vysoká separační účinnost, ale i dobrá rigidita při značných průtokovým rychlostech mobilní fáze.

2.4. Monolity

Na rozdíl od partikulárních sorbentů, kdy je chromatografická kolona naplněna velkým množstvím jednotlivých zrn vhodného materiálu, monolitická kolona obsahuje pouze jeden blok zhotovený z porézní hmoty. Podobně jako u perfuzních sorbentů monolity obsahují dva typy pórů odlišných velikostí (viz 2.3.). Rozdíl ovšem spočívá v tom, že monolitem prochází všechna mobilní fáze, čímž je dosaženo ještě rychlejšího přenosu hmoty. Monolitické kolony se velmi rychle prosazují všude tam, kde je třeba provádět rychlé a ultra rychlé separace. Vzhledem k velké sorpční kapacitě jsou velmi dobře použitelné pro dělení v preparativním měřítku. Současně s tím mají také vynikající předpoklady pro aplikace v mikroměřítku. Mohou být zhotoveny v nejrůznějších geometriích. Jejich příprava, zvláště rigidních polymerních monolitů, je přitom mimořádně jednoduchá. V současné době se velmi rychle prosazují i komerčně. Vzhledem k převratnosti konceptu bude monolitům dále věnována samostatná kapitola.

3. Vybrané moderní stacionární fáze pro RP-HPLC

Vývoj nových materiálů pro chromatografii v obráceném módu není zdaleka ukončen a lze jej považovat za kontinuální proces. Kvalita sorbentů se stále zvyšuje díky vyšší čistotě vstupních surovin, detailnější kontrole výrobních procesů, využití nových poznatků atd. Řada zlepšení nemá charakter revolučních změn, častěji se jedná spíše o pozvolný plynulý proces. Přesto ale občas dochází i ke změnám zásadním, které otevírají nové možnosti a předurčují budoucí trendy. V následující části bude věnována pozornost vybraným aspektům, které podstatně ovlivnily rozvoj a současný stav stacionárních fází pro RP-HPLC.

3.1. Reverzní fáze na bázi silikagelu – stručný vývoj a současný stav

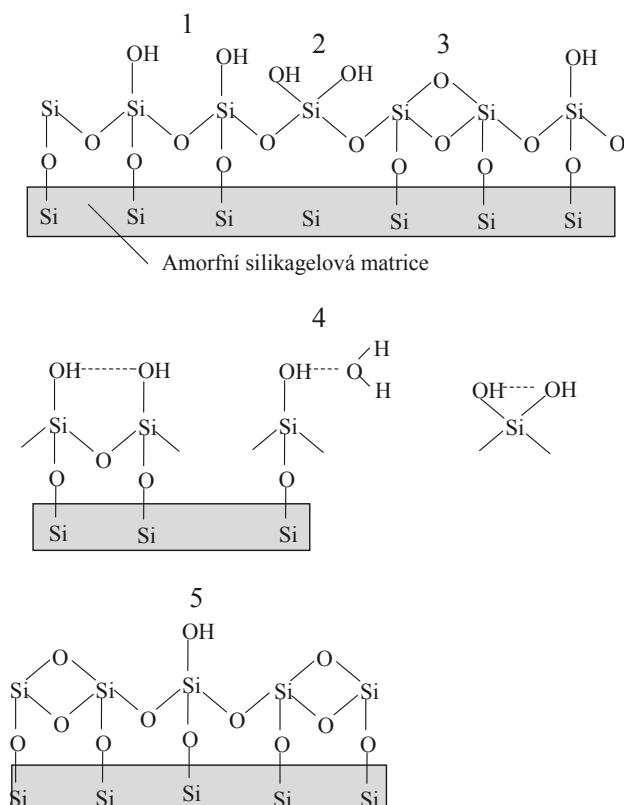
Reverzní fáze na bázi silikagelu, a zejména okta-decylová (C_{18}) modifikace, představují stále nejrozšířenější typ sorbentů v HPLC. Podle odhadů v odborné literatuře existuje na trhu více než 400 těchto vázaných fází⁶. Jejich vlastnosti se ovšem vzájemně podstatně liší v závislosti na mnoha faktorech. Atraktivita silikagelu, jako výchozí matrice pro následnou chemickou modifikaci vedoucí ke vzniku reverzní fáze, je dána řadou jeho vynikajících vlastností:

- možnost přípravy monodisperzních částic sorbentu,
- možnost „ladění“ velikosti a distribuce pórů,
- možnost přípravy sorbentu s velkým specifickým povrchem,
- snadná chemická modifikovatelnost povrchu, a tedy možnost přípravy celé řady modifikací včetně obrácených fází,
- vysoká mechanická stabilita.

Chemii silikagelu byly věnovány pěkné přehledné články a knihy, např.^{7–9}.

Silikagel pro kapalinovou chromatografii má nejčastěji porézní amorfní formu o složení $\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$. Voda je chemicky vázána v nestechiometrickém množství za vzniku silanolových skupin Si-OH. Pro HPLC v analytickém měřítku se v současné době nejčastěji užívá porézní silikagel o velikosti částic 3–5 μm , s povrchem v rozmezí od 50–500 m^2g^{-1} a velikostí pórů kolem 10 nm. Silanolové skupiny udělují povrchu silikagelu polární charakter a jsou pro svoji reaktivitu využívány k přípravě kovalentně vázaných fází. Koncentrace silanolů na plně hydroxylovaném silikagelu je obvykle kolem 9,0 $\mu\text{mol m}^{-2}$. Na obr. 1 jsou znázorněny různé typy silanolových skupin, které jsou v nestejně míře rozprostřeny na povrchu silikagelu a vykazují rozdílnou kyselost. Silanolové skupiny a jejich typ mají velký vliv na chromatografické chování silikagelu. Díky silanolovým skupinám má silikagel vlastnosti měniče kationtů. V prostředí pufrů jsou protony silanolových skupin vyměňovány za kationty elektrolytu. Tento proces je silně závislý na pH mobilní fáze a na vlastnostech silikagelu. Hodnota pK_a silanolových skupin je teoreticky rovna 7, ale prakticky bývá podstatně nižší, kolem 4 (cit.¹⁰). V literatuře uváděné hodnoty je třeba vždy chápat jen jako průměrné. Ve skutečnosti mohou být, a bývají, na povrchu silikagelu silanoly značně různé kyselosti a je známo, že i velmi malá populace extrémně kyselých silanolových skupin může zásadně měnit vlastnosti sorbentu jako celku^{11,12}.

Reverzní fáze na bázi silikagelu jsou dnes nejběžněji připravovány reakcí vhodného monofunkčního organosilanu (např. ethoxydi(methyl)oktadecylsilanu) se silikagelem. Kovalentně vázaný alifatický řetězec, kterým je nejčastěji okta-decylová nebo oktylová skupina, uděluje vzniklé stacionární fázi hydrofobní charakter. Je ovšem prokázáno, že silanizace vede ke zreagování jen asi poloviny všech přítomných silanolových skupin na povrchu silikagelu¹³. Za



Obr. 1. Různé typy funkčních skupin na povrchu silikagelu;
 1 – vicinální silanolové skupiny; 2 – geminální silanolové skupiny;
 3 – siloxanové skupiny; 4 – asociované silanolové skupiny;
 5 – izolovaná silanolová skupina

jistých okolností se zbytkové silanoly mohou spolupodílet (vedle žádoucí hydrofobní interakce) na retenci analytů. Tato obvykle nežádoucí interakce je často doprovázena snížením separační účinnosti a chvostováním piků. Uvedený efekt se projevuje především při dělení bazických látek, které mohou být protonizovány, což vede k jejich zadržování na deprotonovaných silanolech elektrostatickou interakcí. Právě tyto nežádoucí sekundární iontově-výměnné interakce na povrchu silikagelových reverzních fází vždy do jisté míry omezovaly jejich univerzální použitelnost. Jednoduché řešení tohoto problému, tj. snížení protonizace báze zvýšením pH pufru, totiž není možné vzhledem k rozpustnosti silikagelu při vyšším pH. Eliminaci nebo alespoň potlačení iontové výměny na reverzních silikagelových fázích bylo věnováno mimořádné úsilí také proto, že celá řada důležitých analytů (léčiv apod.) má bazickou povahu.

3.1.1. Zlepšení kvality výchozího silikagelu

Koncem 80. a začátkem 90. let bylo jasně ukázáno, že kvalita výchozího silikagelu (před jeho modifikací na reverzní fázi) má mimořádnou důležitost. Žádná následující chemická modifikace nevede ke vzniku kvalitní reverzní

fáze, pokud samotný výchozí materiál nemá vhodné a dobře kontrolované vlastnosti. V tomto směru byly velmi přínosné práce Köhlera a Kirklanda, kteří experimentálně prokázali tehdy poměrně překvapivou skutečnost, že reverzní fáze s omezenou nežádoucí sorpcí bazických látek jsou připraveny na těch silikagelech, které před RP modifikací nesou velké množství homogenně distribuovaných asociovaných silanolových skupin. Naopak přítomnost malého počtu silanolů, a zvláště silně kyselých izolovaných silanolů, je nevhodná^{7,8}. Nawrocki a spol. hledali příčiny velké kyselosti některých silanolových skupin a v této souvislosti odhalili negativní roli kovových nečistot v silikagelové matici¹⁴. Na základě uvedených poznatků se začalo intenzivně pracovat na vývoji tzv. bazicky deaktivovaných fází („base deactivated phases“). Většinou šlo o přípravu velmi čistého silikagelu s homogenní distribucí asociovaných silanolových skupin. (V souvislosti s velmi čistými silikagely se kromě označení „base deactivated silica“ můžeme v odborné literatuře setkat také s označením „type B silica“.) Dnes již prakticky všechny světově významné chromatografické firmy vyrábějí a pro přípravu vázaných fází používají ultračisté silikagely uvedeného typu. Výrobní technologie je zvládnuta natolik, že výrobci s kolonou dodávají i detailní informace o fyzikálně-chemických vlastnostech sorbentu. Pro jejich charakterizaci se využívají moderní analytické metody jako infračervená spektroskopie a nukleární magnetické rezonance v kombinaci s řadou chromatografických testů. Vzhledem k tomu, že silikagel je připravován z velmi čistých vstupních surovin za důkladně kontrolovaných podmínek, lze dnes např. množství příměsí kovů v matici kontrolovat na úrovni jednotek miligramů na kilogram (ppm) sorbentu a méně. Výsledné reverzní fáze poskytují pro většinu látek, včetně bazických, symetrické píky s vysokou účinností nejen v kyselých mobilních fázích, ale i při neutrálním pH.

3.1.2. Zlepšení chemické odolnosti reverzních silikagelových fází

Jednou z velkých slabin reverzních fází na bázi silikagelu je jejich omezená stabilita v bazickém a silně kyselém prostředí. Rozpustnost silikagelu ve vodném prostředí je silně závislá na jeho formě a fyzikálně-chemických charakteristikách. Typická C₁₈ fáze je stabilní jen v úzkém rozsahu pH, asi 3–9, často se dokonce uvádí jen 3–7, pokud je míněna dlouhodobá stabilita. Jakmile je pH mobilní fáze nižší než 3, dochází ke kyselé katalyzované hydrolyze siloxanové vazby mezi silikagelem a organosilanem¹³. Tento proces vede ke kontinuální ztrátě vázané fáze a ve svém důsledku ke ztrátě chromatografické retence pro hydrofobní analyty. Při hodnotě pH nad ~9 nastává naopak rozpouštění silikagelové matrice¹⁵. Rozpouštění silikagelu je doprovázeno poklesem účinnosti, vznikem volného prostoru v koloně, nakonec dojde k úplné destrukci stacionární fáze.

Navíc je vhodné si uvědomit, že dalším důležitým faktorem ovlivňujícím stabilitu stacionární fáze je teplota¹³. V současnosti bývá chromatografická kolona v průběhu separace umístěna v termostatu a analýza obvykle probíhá

za konstantní teploty, často poněkud vyšší než je teplota laboratoře, protože díky poklesu viskozity a zrychlení přenosu hmoty dochází ke zlepšení separační účinnosti. Teplotní stabilita reverzních fází na bázi silikagelu bývá uváděna v rozmezí od 5 °C do asi 100 °C. Obecně ovšem platí, že zvyšování teploty vždy vede k rychlejší degradaci sorbentu, což se zejména projevuje při extrémních (z hlediska dané stacionární fáze) hodnotách pH.

Nejjednodušším řešením problému omezené stability sorbentu je striktní udržování pH mobilních fází v rozmezí od 3 do 7–9, což však zásadně omezuje možnost optimalizace složení mobilní fáze. Například při dělení bazických léčiv je často vhodné užití mobilní fáze buď silně kyselou, nebo naopak zásaditou. V silně kyselé oblasti pH dochází k potlačení nežádoucích iontových interakcí mezi protonizovanou bází a silanolovými skupinami, protože silanoly jsou zde nedisociovány. Eliminace sekundárních (iontově-výměnných) interakcí vede ke zvýšení separační účinnosti a zlepšení symetrie píků bazických látek. Naopak zvýšení pH mobilní fáze nad 7 může vést k deprotonizaci bazického analytu, a tím ke zvýšené retenci na obrácené fázi v důsledku nárůstu hydrofobicity analytu, a tím také ke zlepšené účinnosti separace a rozlišení.

Z výše uvedených důvodů byla a je motivace pro vývoj silikagelových stacionárních fází s rozšířeným rozsahem stability vzhledem k hodnotám pH a teplot velmi silná.

Zlepšení stability v kyselém prostředí

Již koncem 80. tých let bylo prokázáno, že zvětšení velikosti a hydrofobicity organosilanu vázaného na silikagel vede ke zvýšení odolnosti připravené fáze vůči kyselé hydrolyze¹⁶. C₁₈ fáze je tedy z tohoto pohledu stabilnější než C₈ > C₄ > C₁. Předpokládá se, že objemný alkyl lépe chrání siloxanovou vazbu před hydrolyzou.

Jiné přístupy vedoucí ke zvýšené odolnosti sorbentu vůči silně kyselému prostředí jsou založeny na vzniku většího počtu kovalentních vazeb mezi silikagelem a modifikujícím silanem („multi-dentate approach“). Například pro vznik vázané fáze lze použít difunkční (R₂SiX₂) nebo trifunkční (RSiX₃) organosilany (X=Cl, OR). Oba reagenty se budou vázat více kovalentními vazbami na povrch silikagelu, ale současně bude docházet v určité míře i k tvorbě polymerních struktur na povrchu stacionární fáze. Uvedený postup sice snižuje riziko kyselé hydrolyzy fáze, je ale poměrně málo reprodukovatelný, a navíc vede ke tvorbě nových reaktivních silanolových skupin. Moderní vázané fáze jsou proto dnes téměř výhradně připravovány s využitím monofunkčních organosilanů¹⁷. Komerčně nejspěšnější je zatím použití tzv. stericky chráněných silanů. Tato cesta přípravy byla vyvinuta a patentována Glajchem a spol.^{16,18}. Stericky chráněné silany jsou tvořeny jedním alkylem (C₃, C₈, C₁₈) nebo fenylem, dvěma objemnými isopropylými nebo isobutylovými skupinami a jednou reaktivní funkční skupinou (Cl), vázanými na křemíkový atom. Vzniklé fáze jsou stabilní i v agresivních podmínkách, např. v 0,1% trifluoroctové kyselině při pH ~ 0,9 za teploty 90 °C (cit.^{13,16}). Isobutylová i isopro-

pylová skupina velmi dobře stíní kovalentní siloxanovou vazbu vůči kyselé hydrolyze.

Zlepšení stability v alkalickém prostředí

Úsilí o zlepšení odolnosti vázaných fází v alkalickém prostředí bylo zaměřeno na zvýšení stupně pokrytí silikagelové matrice hydrofobními funkčními skupinami a na její odstínění. Pouhé prodloužení alkylových modifikujících řetězců vede ke zlepšené odolnosti v alkalickém prostředí pravděpodobně v důsledku zlepšeného stínění silikagelové matrice¹³. Tento přístup však neposkytuje dostatečnou ochranu fáze a bylo nutno hledat alternativy. Jinou možností jsou dodatečné modifikující reakce („endcapping“). Technika je založena na modifikaci povrchu organosilanem s příslušně dlouhou hydrofobní skupinou a následné dodatečné modifikaci povrchu reakcí např. s trimethylchlorsilanem nebo hexamethyldisilazánem⁹. Malé rozměry endkapujících činidel jim umožní lépe proniknout k povrchu silikagelu. Tak dojde ke zreagování dalšího podílu silanolových skupin, které byly pro objemnější organosilan použitý v prvním stupni modifikace nepřístupné. Proces vede k dramatickému zlepšení odolnosti fáze vůči alkalickému prostředí. Technika tzv. dvojitého endkapingu („double endcapping“) poskytuje ještě lepší odstínění matrice^{15,19,20}.

3.1.3. Speciální sorbenty určené pro RP-HPLC

v mobilních fázích s vysokým obsahem vody

Při chromatografii v obráceném módu může analytik ovlivňovat kvalitu separace mnoha faktory. Zásadní vliv má složení mobilní fáze: volba organické složky a volba jejího množství, výběr pufru a jeho pH, přídavek aditiva (povrchově aktivní látky, iontově párového činidla, chirálního selektoru, apod.), resp. volba teploty. Optimalizace složení mobilní fáze je poměrně obtížná při chromatografii silně polárních látek na obrácených fázích. Jejich velmi malá retence vyžaduje užití minimálního množství organického modifikátoru v mobilní organicko-vodné fázi nebo dokonce jeho úplnou eliminaci. Za takových podmínek ovšem dochází v případě konvenčních alkylových reverzních fází k tzv. „kolapsu fáze“, kdy analyty (leckdy i poměrně hydrofobní) eluují z kolony velmi rychle a bez separace. Mechanismus fázového kolapsu byl v literatuře poměrně hojně diskutován; kromě jiného přitom bylo experimentálně prokázáno, že užívaný pojem „kolaps fáze“ je částečně zavádějící, neboť skutečná podstata procesu je odlišná²¹. Bylo navrženo několik způsobů řešení problémů se ztrátou retence ve 100% vodném prostředí²²: a) užití „neendkapovaných“ obrácených fází s krátkým alkylovým řetězcem, b) užití stacionárních fází naopak (a poněkud překvapivě) s velmi dlouhým řetězcem, C₃₀ fáze, c) aplikace makroporézních sorbentů, d) využití hydrofilních a „polárně endkapovaných“ stacionárních fází, e) použití sorbentů se zabudovanou polární funkční skupinou v alkylovém řetězci („polar-embedded alkyl phases“, PEP). Zvláště posledně zmíněná skupina moderních sorbentů pro RP-HPLC ve vodném prostředí je v současnosti početná a zasluhuje samostatnou pozornost.

Reverzní fáze se zabudovanou polární funkční skupinou

Podobně jako v případě nejtypičtějších reverzních fází založených na silikagelu modifikovaném dlouhými alifatickými (nejčastěji oktadecylovými) řetězci je v případě PEP silikagel kovalentně modifikován dlouhými alifatickými zbytky, ale tentokrát je do struktury těchto ligandů navíc zabudována určitá polární funkční skupina, vždy lokalizovaná v těsné blízkosti povrchu silikagelu. Díky včlenění polární skupiny do alifatického řetězce nedochází k fázovému kolapsu, stacionární fáze zůstává plně solvatovaná i v prostředí 100% vodné mobilní fáze a alkylové řetězce si zachovávají svou konformační volnost a schopnost interagovat s analyty. Navíc experimentální poznatky ukazují, že zabudované polární skupiny vstupují do interakcí se zbytkovými silanolovými skupinami na povrchu silikagelu, tím dochází k jejich stínění a omezení nežádoucího vlivu na separaci některých, zejména bazických, analytů.

Bouřlivý rozvoj PEP stacionárních fází nastal teprve v nedávné době. Postupně byly do alkylového řetězce zabudovány různé polární strukturní motivy, např. močovina, ethery, aminy, směsné amidy a jiné. Řada výrobců detailně chemickou strukturu PEP fází neuvádí z důvodů utajení.

Koncept sorbentů se zabudovanou polární funkční skupinou přináší řadu výhod:

- především sorbenty mohou být užity i ve 100% vodném prostředí bez nebezpečí fázového kolapsu, tento rys je zvláště důležitý pro dělení vysoce polárních látek,
- sorbenty vykazují obvykle nižší retenci a odlišnou selektivitu pro polární analyty ve srovnání s konvenčními čistě alkylovanými fázemi,
- analyty schopné tvořit vodíkové můstky mohou poměrně intenzivně interagovat se zabudovanými polárními skupinami a jejich retence bývá větší než na konvenčních fázích,
- sorbenty se vyznačují potlačenou aktivitou silanolových skupin, což vede ke snížení chvostování zásaditých látek zejména při neutrálním pH mobilní fáze,
- díky vodíkovým vazbám je na povrchu sorbentu přítomno více vody než na klasických alkylovaných fázích, čímž dochází k zeslabení interakce s bazickými látkami.

3.2. Hybridní anorganicko-organické sorbenty pro RP-HPLC

Velmi odlišný, zajímavý a komerčně úspěšný přístup k syntéze odolnějších reverzních fází na bázi silikagelu navrhl a poprvé publikoval Unger a spol.²³. Koncept využívá reakce anorganického alkoxyasilanu s organickým alkoxyasilanem za vzniku anorganicko-organické hybridní částice²⁴.

Hybridní anorganicko-organické stacionární fáze kombinují nejlepší vlastnosti silikagelu, tj. vysokou účinnost a vynikající mechanickou stabilitu, s nejlepšími vlastnostmi polymerních sorbentů, tj. mimořádnou pH stabi-

litou a sníženým efektem reziduálních silanolů. V roce 1999 byla na trh uvedena první generace hybridních fází pod názvem XTerra firmou Waters²⁴. Syntéza je založena na reakci dvou organosilanů, jeden z nich tvoří silikagelovou matici a druhý do vznikající matrice vnáší methylsiloxanové jednotky. Konkrétně se jedná o reakci tetraethoxyasilanu s methyltriethoxyasilanem. Vzniklé hybridní částice obsahují methylsiloxanové jednotky, a to jak uvnitř matrice sorbentu, tak na povrchu. Stechiometrický poměr reaktantů 2:1 se osvědčil jako optimální z hlediska vlastností připraveného sorbentu. Pro potřeby RP-HPLC je povrch následně kovalentně modifikován buď trifunkčními silany za vzniku fází MS C₈ a MS C₁₈, optimalizovaných pro maximální chemickou stabilitu a určených pro LC-MS, a nebo monofunkčními silany za vzniku fází RP₈ a RP₁₈, s vloženými karbamáty, optimalizovaných pro minimální chvostování bazických látek. Experimentálně bylo prokázáno, že selektivita MS C₈ a C₁₈ stacionárních fází pro hydrofobní i polární analyty je obdobná jako na běžných silikagelových reverzních fázích²⁴. Obdobně také selektivita hybridů se zabudovanou karbamátovou polární funkční skupinou se téměř nelišila od čistě silikagelových karbamátových kolon. Tato skutečnost se dá vhodně využít při přenosu chromatografických metod z konvenčních silikagelových sorbentů na materiály hybridní, kdy často není nutná nová optimalizace separačních podmínek. Vzhledem k tomu, že na povrchu hybridu je ve srovnání s klasickými silikagelovými materiály asi jen třetina silanolových skupin, chvostování bazických látek je na hybridních fázích výrazně omezeno a symetrie píků daleko lepší. Hybridy vykazují velkou odolnost vůči vysoké hodnotě pH mobilní fáze. Hybridní reverzní fáze byly úspěšně testovány v rozmezí pH 1,2 až 11,5 (cit.²⁵). Analyty bazické povahy tak mohou být často separovány ve formě volných bází s daleko lepší separační účinností a odlišnou selektivitou než v kyselém prostředí. Další důležitou vlastností hybridních sorbentů je jejich zlepšená odolnost vůči zvýšené teplotě mobilní fáze²⁴. Možnost chromatografie při teplotách i kolem 60 °C přináší řadu výhod: snížení viskozity mobilní fáze, a tím tlaku na koloně, zlepšení separační účinnosti a zmenšení závislosti účinnosti kolony na rychlosti průtoku (velmi zajímavý a důležitý efekt); tím se vytváří příznivé podmínky pro uplatnění uvedených sorbentů při velmi rychlých separacích.

V minulém roce byl úspěšně dokončen vývoj druhé generace hybridních sorbentů. Ty jsou připravovány reakcí tetraethoxyasilanu s bis(triethoxysilyl)ethanem²⁶. Ve srovnání se sorbenty XTerra byla dále podstatně zvýšena chemická odolnost v silně bazickém prostředí a separační účinnost²⁶.

3.3. Reverzní fáze založené na oxidech hliníku, zirkonia a titanu

Vzhledem k omezené chemické odolnosti silikagelu v alkalickém prostředí byly hledány jiné chemicky odolnější materiály použitelné pro přípravu obrácených fází. Ukázalo se, že oxidy hliníku, zirkonia a titanu jsou pod-

statně stabilnější v silně alkalickém prostředí než silikagel^{27,28}. Navíc jsou tyto nové materiály v bazickém prostředí stabilní i při zvýšené teplotě, což neplatí pro silikagelové fáze. Zvýšená stabilita a pracovní rozsah pH přináší řadu výhod, kromě jiného i možnost regenerace kolon za velmi agresivních podmínek bez nebezpečí poškození sorbentu. Srovnávací testy jednotlivých oxidů prováděné za extrémních podmínek ukázaly, že oxid zirkonia je stabilnější než oxid hliníku jak v silně kyselém, tak alkalickém prostředí. Oxid zirkonia je naprosto stabilní v rozsahu pH 1–14, také oxid titanu je údajně stabilní ve stejném rozsahu, ale jednoznačný experimentální důkaz zatím podán nebyl. Naproti tomu, oxid hliníku je nezanebatelně rozpustný v kyselém prostředí, zvláště v kyselině chlorovodíkové. Mechanická odolnost vůči vysokému tlaku je u všech zmíněných oxidů velmi dobrá, plně srovnatelná nebo lepší než v případě silikagelu.

Chemické vlastnosti povrchu oxidů hliníku, zirkonia a titanu jsou podstatně odlišné od silikagelu²⁷. Zatímco nemodifikovaný silikagel má povahu měniče kationtů, zmíněné oxidy mají amfoterní charakter a jsou tedy schopny v závislosti na pH mobilní fáze vystupovat buď jako měniče kationtů, nebo aniontů. Druhou velmi významnou odlišností je skutečnost, že na povrchu oxidů zmíněných kovů jsou místa s vlastnostmi Lewisovy kyseliny. Tato centra umožňují interakce na bázi ligandové výměny. Obecně lze říci, že chemie povrchu oxidů kovů je velmi složitá, mnohem komplikovanější než v případě silikagelu, např. na povrchu oxidů kovů jsou podobně jako na povrchu silikagelu lokalizovány hydroxylové skupiny, ale konkrétně v případě oxidu titanu se v literatuře uvádí, že je třeba rozlišovat 12 různých typů –OH skupin²⁹.

Pro RP-HPLC aplikace je nezbytná hydrofobizace povrchu oxidů hliníku, zirkonia a titanu. Dosud neexistuje žádná modifikační technika vedoucí k úplnému odstínění povrchu sorbentů, a proto je nutno vždy počítat s tím, že konečná interakce s analytem nemusí mít čistě hydrofobní charakter. Pokud se jedná o způsoby modifikace povrchu, lze je třídit do několika skupin: a) dynamická modifikace se provádí přidávkou látky, která silně interaguje s povrchem sorbentu, do mobilní fáze, b) permanentní kovalentní chemická modifikace využívá reaktivity vhodných modifikujících činidel za vzniku stabilní vazby mezi povrchem sorbentu a činidlem, c) podstatou fyzikální modifikace povrchu je pokrytí povrchu vhodným polymerem nebo vrstvou uhlíku.

Silanizační techniky, velmi úspěšné při přípravě silikagelových obrácených fází, které měly vést ke kovalentní modifikaci povrchu oxidů kovů, se příliš neosvědčily. Experimentálně byla potvrzena platnost řady hydrolytické stability vazby mezi křemíkem a kyslíkem v pořadí: Si-O-Si-R >> Zr-O-Si-R > Ti-O-Si-R >> Al-O-Si-R. Důsledkem toho je fakt, že většina pokusů o stabilní silanizaci povrchů oxidů kovů monofunkčními silany byla neúspěšná. Modifikace provedené trifunkčními silany v některých případech alespoň částečně k úspěchu vedly, ale otázkou zůstává, zda tento výsledek nespočíval spíše v horizontální polymeraci trifunkčních silanů na porchu

oxidů kovů. Navíc pokud jsou pro silanizaci využity trifunkční silany, vzniknou nevyhnutelně reakcí s povrchem i skupiny M-O-Si-OH (M = Al, Zr nebo Ti), které svou velkou kyselostí dále přispějí k značné heterogenitě modifikovaného povrchu. Příprava současných komerčně dostupných RP sorbentů na bázi oxidů kovů proto není založena na využití silanizačních reakcí. Nejdůležitější postupy spočívají v pokrývání povrchu vhodnými hydrofobními vrstvami. Nejčastěji jsou oxidy kovů modifikovány polybutadienem (PBD), který má pro neionizovatelné látky podobnou separační selektivitu jako silikagelové C₈ a C₁₈ fáze, nebo polystyrenem (PS), který je svou selektivitou spíše blízký fenylové modifikaci silikagelu. Je třeba ale zdůraznit, že nabitě a ionizovatelné látky se chovají na PBD a PS modifikacích oxidů kovů podstatně odlišně než na silikagelových reverzních fázích, což je důsledek silných iontových a ligandově-výměnných interakcí mezi nedokonale odstíněným povrchem oxidů kovů a analyty. Pro uvedené sorbenty je proto typické, že volba typu pufru a jeho koncentrace má daleko větší vliv na retenční časy ionizovatelných analytů a na tvar píků, než je běžné v případě silikagelových reverzních fází. PBD sorbenty vykazují velmi dobrou pH stabilitu, pro oxid hliníku v rozmezí pH 3–12, pro oxid zirkonia v rozmezí pH 1–14. Kromě toho také tepelná odolnost zvláště zirkoniových PBD fází je mimořádná. K degradaci nedochází ani při aplikaci 1 mol l⁻¹ hydroxidu sodného při 100 °C. Velmi dobrou pH a tepelnou stabilitu mají i kovové oxidy pokryté vrstvou polystyrenu, které mohou být provozovány v rozmezí pH nejméně 1–13 a při teplotách až do 160 °C. Vedle PBD a PS byl povrch oxidu zirkonia úspěšně modifikován také pyrogenním uhlíkem³⁰. Tato stacionární fáze je schopná velmi citlivě rozlišovat analyty podle tvaru jejich molekul, a je proto vhodná pro dělení geometrických isomerů³¹.

Důležitou vlastností moderních PBD, PS a uhlíkových fází je skutečnost, že separační účinnosti pro neutrální analyty jsou plně srovnatelné s účinnostmi dosahovanými na silikagelových fázích C₁₈ a C₈, což znamená, že přenos hmoty ve stacionární fázi je dostatečně rychlý. V této souvislosti je třeba upozornit, že plně polymerní sorbenty, na bázi např. styren-divinylbenzenu nebo poly(methylmethakrylátu) jsou také vysoce chemicky stálé, ale účinnosti na nich dosahované bývají zpravidla podstatně nižší než na silikagelových reverzních fázích, pravděpodobně v důsledku přítomnosti mikropórů.

Kompatibilita sorbentů s vysokými teplotami nabízí mnoho zajímavých aplikačních výhod. Řada z nich již byla výše zmíněna, zde lze navíc připomenout možné využití samotné vody jako mobilní fáze. Je totiž známo, že při teplotě 200 °C má voda podobnou polaritu jako methanol při laboratorní teplotě³². Tímto způsobem lze dosáhnout snížení spotřeby organických rozpouštědel. Navíc vyloučení organických solventů může nabídnout i nové detekční možnosti (např. měření ve vzdálené UV oblasti < 210 nm).

V budoucnu lze předpokládat další rozvoj sorbentů odvozených od oxidů kovů. Je například pravděpodobné, že budou připraveny monolitické fáze. Také se dá očeká-

vat, že bude pokračovat vývoj modifikačních technik, které povedou k dokonalejšímu odstínění matrice stacionární fáze. Nejnovější způsoby pokrývání oxidů kovů vrstvami uhlíku a možnosti jejich následující chemické modifikace jsou v tomto směru velkým příslibem.

3.4. Monolitické stacionární fáze pro RP-HPLC

Monolity jsou zvláštní separační média, která nemají interpartikulární prostory^{33,34}. Lze si je představit jako jednu jedinou velkou částici sorbentu. Morfologie monolitů je již dnes natolik vyladěna, že monolitické kolony mohou být často provozovány při $\sim 5\times$ větších průtocích než konvenční kolony plněné 5 μm sorbentem, přitom tlaky jsou srovnatelné. Podrobná teorie procesu přenosu hmoty v monolitických médiích byla nedávno vypracována Liapisem^{35,36} a Tallarekem³⁷.

3.4.1. Makroporézní monolitické disky

Přestože první pokusy o přípravu monolitických kolon se datují již do šedesátých a sedmdesátých let minulého století³⁸, prakticky použitelné materiály se objevily až později. Jedním z prvních chromatograficky využitelných formátů monolitických médií byly monolitické disky (monolitické membrány). Tyto materiály různého chemického složení a v mnoha geometriích byly poprvé úspěšně připraveny až v polovině 80. let, především za účelem rychlých separací bílkovin. Brzy se potvrdilo, že pro dosažení dobrého dělení stačí jen poměrně tenká membrána, a tím se vytvořil široký prostor pro další vývoj konceptu monolitických médií ve formě disku. Na výzkumu se významně podíleli i pracovníci Ústavu makromolekulární chemie v Praze. V současnosti jsou již monolitické disky komerčně dostupné, konkrétně např. od firmy CIM (BIA Separations). Disky o tloušťce do 3 mm jsou při vlastní separaci umístěny ve speciálním držáku, kam může být vloženo i několik různých membrán lišících se chemickou modifikací, a tak lze provádět vícerozměrné separace.

Hlavní využití tohoto formátu dnes stále spočívá především v oblasti rychlého dělení velkých biomolekul gradientovou elucí³⁹. Většina komerčních disků je připravována z reaktivních monomerů, např. glycidylmethakrylátu, které jsou následně vhodně chemicky modifikovány pro jejich použití v různých separačních modech.

3.4.2. Rigidní makroporézní polymerní monolitické kolony

Začátkem devadesátých let připravili Švec a spol. první rigidní makroporézní monolitické kolony⁴⁰. Jejich syntéza se provádí velmi jednoduchým způsobem, a to *in situ* polymerací vhodných monomerů přímo v chromatografické koloně. Příprava spočívá v naplnění trubice směsí monomerů, radikálového iniciátoru a porogenu. Následně je trubice uzavřena, utěsněna a provedena polymerace za pečlivě kontrolované teploty. Koncová těsnění jsou potom nahrazena standardními koncovkami pro HPLC a připravená monolitická kolona je připojena k separačnímu systému. Nezreagované látky jsou vymyty

vhodným solventem, a tím je kolona připravena k provozu.

Tyto rigidní monolity byly s úspěchem vyrobeny nejen ve formátu typických nerezových HPLC kolon, ale i v kapilárách^{41,42}, které nacházejí velké uplatnění při spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Jejich velkou předností je fakt, že provedení polymerace přímo v kapiláře je snazší než její plnění mikročásticemi konvenčního sorbentu.

Syntéza monolitů použitelných v různých chromatografických modech je uskutečnitelná několika postupy. Tak například přímá polymerace styrenu a divinylbenzenu vede ke stacionární fázi velmi vhodné pro RP-HPLC peptidů a proteinů. Jinou možností je aplikace reaktivních funkcionalizovaných monomerů a následná modifikace vzniklého polymeru v podobném smyslu, jak bylo zmíněno v předchozí kapitole. V neposlední řadě je třeba upozornit i na možnost roubování monolitů s využitím UV záření, které umožňuje přípravu stacionárních fází s vysokou separační kapacitou.

3.4.3. Tubulární monolitické kolony s radiálním tokem

Principiálně by vše nasvědčovalo tomu, že monolitické kolony by mohly být velmi zajímavé také pro preparativní separace. Problém je ovšem v tom, že radikálová polymerace v koloně je exotermní proces, při kterém se uvolňuje velké množství tepla. Polymerace probíhá bez míchání a odvod tepla je obtížný. Zatímco při výrobě monolitů pro analytické aplikace je tato komplikace zvládnutelná, dostatečně přesná kontrola teplotních poměrů při polymeraci velkých monolitů je mimořádně obtížná⁴³. Takovéto monolity mají v důsledku vytvořeného teplotního gradientu nehomogenní distribuci pórů v radiálním směru, a to vede ke zhoršení chromatografických parametrů.

Tato obtíž byla do značné míry elegantně vyřešena konceptem tubulárních monolitů s radiálním tokem⁴⁴. Jedná se o trubice s definovanou tloušťkou monolitem tvořených stěn, mobilní fáze a analyty procházejí přes stěnu v radiálním směru. Tyto kolony mohou mít objemy i kolem 10 litrů, používané průtoky jsou asi 10 l min⁻¹ a množství separovaných proteinů nebo oligonukleotidů může dosahovat i 200 g v jednom nástřiku.

3.4.4. Silikagelové monolitické kolony

První silikagelové monolity byly syntetizovány Tanakou⁴⁵. Na rozdíl od rigidních makroporézních polymerních médií, silikagelové monolity analytických rozměrů nemohou být připraveny přímo v chromatografické koloně, neboť při solidifikaci během hydrolytické iniciované polykondenzace tetraalkoxysilanů v prostředí polyethylen-glykolu (porogen), dochází k výraznému zmenšování objemu. Nejprve je tedy připraven monolit, ten je pak zatěsněn do kolony odpovídajících rozměrů, a nakonec obvykle následuje chemická modifikace povrchu podle účelu použití monolitu. Vzhledem ke srážení monolitu při jeho syntéze je obtížné připravit média s délkou nad ~ 15 cm. Pravděpodobně z podobných důvodů není snadná ani výroba monolitů s průměrem menším než 3 mm. Komerčně jsou

zatím dostupné kolony od firem Merck (Německo)⁴⁶ a Phenomenex (USA), ovšem jen ve dvou průměrech 4,6 mm (pro separace v analytickém měřítku), a pak až 100 μm (pro kapilární chromatografii). Platí, že příprava silikagelových monolitů v kapilárním měřítku je snazší a reprodukovatelnější než výroba kolon větších rozměrů, a to proto, že kapiláry se s úspěchem polymerují podobně jako rigidní polymerní monolity, tedy přímým *in situ* procesem.

Silikagelové tyče obsahují jak velké póry o velikosti kolem 1 μm , tak i velké množství mesoporů, a proto má výsledný monolit poměrně značně velký povrch, což je vlastnost důležitá zvláště při izokratických separacích v reverzním módu. Monolitické silikagelové kolony jsou vhodné pro rychlé separace především malých a středně velkých molekul. Tím se liší od všech ostatních typů monolitů, protože ty jsou naopak většinou užívány pro dělení makromolekulárních látek, většinou v gradientovém uspořádání.

3.4.5. Monolity – stacionární fáze budoucnosti

Podle některých odborníků představují monolitická média největší průlom v oblasti chromatografie od dob jejího vzniku⁴⁷. Monolitická média jsou někdy označována jako „stacionární fáze čtvrté generace“ s přesně laděnými vlastnostmi⁴⁸. V každém případě jim je v současnosti věnována velká pozornost mnoha vědeckými týmy a firmami. Je zřejmé, že potenciál monolitů ještě není plně využit. Díky jejich unikátním vlastnostem, tj. snadné přípravě a toleranci k vysokým průtokům, jsou již dnes v řadě konkrétních případů preferovány před klasickými partikulárními sorbenty. Vzhledem k tomu, že monolitické kolony patří mezi nové stacionární fáze, není zatím jejich sortiment tak pestrý jako v případě částicemi plněných kolon, ale tento stav se pravděpodobně rychle změní.

4. Závěr

Moderní trendy ve vývoji a výrobě stacionárních fází pro RP-HPLC směřují k produkci fází se stále větší mechanickou, chemickou a tepelnou odolností. Rozměry kolon a sorbentů se postupně zmenšují, což umožňuje zvýšit separační účinnost, zrychlit analýzy, zlepšit detekční limity, a přitom snížit spotřebu solventů.

Vysoce čistý silikagel se stále dobře osvědčuje jako výchozí matrice pro přípravu moderních vázaných fází. Ovšem hybridní anorganicko-organické materiály navíc vykazují vynikající odolnost vůči alkalickému prostředí. Nadějně jsou pravděpodobně i stacionární fáze založené na oxidech zirkonia a titanu. Velmi perspektivní, a dosud ani zdaleka nevyčerpanou oblastí jsou monolitická média.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT ČR MSM 6046137307: „Fyzikálně-chemické metody analýzy a popisu chemických systémů a biosystémů“.

LITERATURA

1. Majors R. E.: LCGC North America 23, 248 (2005).
2. Barder T. J., Wohlman P. J., Thrall C., DuBois P. D.: LCGC 15, 918 (1997).
3. Iberer G., Hahn R., Jungbauer A.: LCGC North America 17, 998 (1999).
4. Afeyan N. B., Gordon N. F., Mazsaroff I., Varady L., Fulton S. P., Yang Y. B., Regnier F. E.: J. Chromatogr. 519, 1 (1990).
5. Regnier F. E.: Nature 350, 634 (1991).
6. Miyabe K., Guiochon G.: J. Chromatogr., A 903, 1 (2000).
7. Kohler J., Chase D. B., Farlee R. D., Vega A. J., Kirkland J. J.: J. Chromatogr., A 352, 275 (1986).
8. Kohler J., Kirkland J. J.: J. Chromatogr., A 385, 125 (1987).
9. Neue U. D. (ed.): *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, New York 2001.
10. Mendez A., Bosch E., Roses M., Neue U. D.: J. Chromatogr., A 986, 33 (2003).
11. Nawrocki J.: Chromatographia 31, 193 (1991).
12. Nawrocki J.: Chromatographia 31, 177 (1991).
13. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. (ed.): *Practical HPLC Method Development*. 2. vyd. Wiley-Interscience, New York 1997.
14. Nawrocki J., Moir D. L., Szczepaniak W.: Chromatographia 28, 143 (1989).
15. Claessens H. A., van Straten M. A., Kirkland J. J.: J. Chromatogr., A 728, 259 (1996).
16. Kirkland J. J., Glajch J. L., Farlee R. D.: Anal. Chem. 61, 2 (1989).
17. Gritti F., Guiochon G.: Anal. Chem. 75, 5726 (2003).
18. Glajch J. L., Kirkland J. J. (du Pont de Nemours, E. I. and Co. USA): US 4705725; Chem. Abstr. 108, 146734 (1988).
19. Glajch J. L., Kirkland J. J. (du Pont de Nemours, E. I. and Co. USA): US 4746572; Chem. Abstr. 110, 208923 (1988).
20. Kirkland Jr. J. J., Adams J. B. (Hewlett-Packard Company, USA): US Patent 5,869,724; Chem. Abstr. 130, 162560, (1999).
21. Przybyciel M., Majors R. E.: LCGC Europe 15, 652 (2002).
22. Majors R. E., Przybyciel M.: LCGC Europe 15, 780 (2002).
23. Unger K. K., Becker N., Roumeliotis P.: J. Chromatogr., A 125, 115 (1976).
24. Cheng Y. F., Walter T. H., Lu Z. L., Iraneta P., Alden B. A., Gendreau C., Neue U. D., Grassi J. M., Carmody J. L., O'Gara J. E., Fisk R. P.: LCGC North America 18, 1162 (2000).
25. Neue U. D., Walter T. H., Alden B. A., Jiang Z. P., Fisk R. P., Cook J. T., Glose K. H., Carmody J. L., Grassi J. M., Cheng Y. F., Lu Z. L., Crowley R. J.: Am. Lab. 31, 36 (1999).
26. Wyndham K. D., O'Gara J. E., Walter T. H., Glose K. H., Lawrence N. L., Alden B. A., Izzo G. S., Hudalla

- C. J., Iraneta P. C.: *Anal. Chem.* 75, 6781 (2003).
27. Nawrocki J., Dunlap C., McCormick A., Carr P. W.: *J. Chromatogr., A* 1028, 1 (2004).
28. Nawrocki J., Dunlap C., Li J., Zhao J., McNeff C. V., McCormick A., Carr P. W.: *J. Chromatogr., A* 1028, 31 (2004).
29. Hadjiivanov K. I., Klissurski D. G.: *Chem. Soc. Rev.* 25, 61 (1996).
30. Weber T. P., Jackson P. T., Carr P. W.: *Anal. Chem.* 67, 3042 (1995).
31. Wong V., Sweeney A. P., Khurram M., Shalliker R. A.: *J. Liq. Chromatogr.* 25, 363 (2002).
32. Kephart T. S., Dasgupta P. K.: *Talanta* 56, 977 (2002).
33. Svec F., Tenikova B., Deyl Z. (ed.): *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*. Elsevier, Amsterdam 2003.
34. Svec F.: *LCGC-LC Column Technology Supplement*, June 2004, str. 18.
35. Liapis A. I., Meyers J. J., Crosser O. K.: *J. Chromatogr., A* 865, 13 (1999).
36. Meyers J. J., Liapis A. I.: *J. Chromatogr., A* 852, 3 (1999).
37. Leinweber F. C., Lubda D., Cabrera K., Tallarek U.: *Anal. Chem.* 74, 2470 (2002).
38. Kubin M., Spacek P., Chromecek R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32, 3881 (1967).
39. Josic D., Strancar A.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 333 (1999).
40. Svec F., Frechet J. M. J.: *Anal. Chem.* 64, 820 (1992).
41. Holdšvendová P., Coufal P., Suchanková J., Tesařová E., Bosáková Z.: *J. Sep. Sci.* 26, 1623 (2003).
42. Moravcová D., Jandera P., Urban J., Planeta J.: *J. Sep. Sci.* 26, 1005 (2003).
43. Peters E. C., Svec F., Frechet J. M. J.: *Chem. Mat.* 9, 1898 (1997).
44. Podgornik A., Barut M., Strancar A., Josic D., Koloini T.: *Anal. Chem.* 72, 5693 (2000).
45. Tanaka N., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Hosoya K., Ikegami T.: *J. Chromatogr., A* 965, 35 (2002).
46. Cabrera K., Lubda D., Eggenweiler H. M., Minakuchi H., Nakanishi K.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 93 (2000).
47. Al Bokari M., Cherrak D., Guiochon G.: *J. Chromatogr., A* 975, 275 (2002).
48. Iberer G., Hahn R., Jungbauer A.: *LCGC North America* 17, 998 (1999).

D. Sýkora^a, E. Tesařová^b, M. Vosmanská^a, and M. Zvolánková^a (^a *Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b *Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Modern Stationary Phases for RP-HPLC**

Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is one of the most utilized chromatographic methods. Current trends towards more mechanically and chemically stable RP-HPLC stationary phases are discussed in the review. Column dimensions, sorbent particle size and solvent consumption are continuously decreasing. This enables faster and more efficient analyses. Highly pure silica still holds its position as the most frequently utilized starting material for RP preparation. However, hybrid silica-based stationary phases are significantly more stable in alkaline buffers. Also sorbents based on zirconia, alumina and titania seem to be promising. A bright future is envisioned for monolithic media.