

ZANEDBÁVANÉ APLIKACE MONOLITICKÝCH STRUKTUR: POČÁTKY PLANÁRNÍ CHROMATOGRRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRICKOU DETEKČÍ

FRANTIŠEK ŠVEC

*Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika
svecfr@faf.cuni.cz*

Došlo 13.2.23, přijato 10.3.23.

Planární chromatografie neboli tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla poprvé popsána N. A. Izmailovem a M. S. Schreiberovou koncem 30. let minulého století. Kapalná mobilní fáze se obvykle pohybuje v pórech vrstvy nanesené na pevnou podložku umístěnou vertikálně v jednoduché nádobě, např. kádince. Tok je poháněn pouze kapilárními silami v pórech a není potřeba žádné sofistikované přístrojové vybavení. Jednotlivé složky směsi jsou separovány na základě rozdílů v jejich afinitě k pevné stacionární a kapalné mobilní fázi. Typický formát stacionární fáze představuje tenkou vrstvu sorbentu nanesenou na skleněné, hliníkové nebo plastové desce. Porézní sorbenty mohou být oxid křemičitý (silika), oxid hlinitý (alumina) či celulóza, držené pohromadě např. sádrou. Hlavními výhodami TLC jsou snadnost provádění separací, které mohou probíhat i v paralelních liniích na stejné vrstvě, jednoduché vybavení, stacionární fáze pro jednorázové použití, statická detekce a možnost archivace výsledku separace ve vysušené vrstvě. Typické vrstvy o tloušťce 100–250 μm však nejsou příliš vhodné pro kombinaci TLC s hmotnostní spektrometrií (MS). To vedlo ke komercializaci ultratenkých 10 μm silných monolitických vrstev oxidu křemičitého. Jejich výroba byla bohužel brzy ukončena. Alternativní řešení tohoto problému pocházela z akademického prostředí. Jeden přístup zahrnoval vrstvy vytvořené z nanovláken připravených elektrostatickým zvlákněním. Alternativou byly porézní monolitické polymerní vrstvy vyrobené polymerací *in situ* a byla s nimi demonstrována řada separací jak malých, tak i velkých molekul. Použití MS detekce pak umožnilo zjištění molekulové hmotnosti látek v separovaných skvrnách. Přestože se příprava tenkých monolitických vrstev původně jevila jako jednoduchá, bylo nutné vyřešit některé neočekávané problémy. Tento přehled podrobně popisuje problémy související s historií monolitické TLC a představuje přístupy vedoucí k vrstvám vhodným pro požadované separace.

Klíčová slova: planární chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, monolitické vrstvy, separace, hmotnostní spektrometrie

Obsah

1. Úvod
2. Tenké vrstvy pro monolitickou planární chromatografii
 - 2.1. Monolitické ultratenké vrstvy z oxidu křemičitého
 - 2.2. Polymerní vrstvy připravené elektrostatickým zvlákněním
3. Trocha historie
4. Rané doby organo-monolitické planární chromatografie
5. Zvláštnosti přípravy tenkých vrstev
6. Závěry

1. Úvod

Pro připomenutí: Monolity jsme již dříve definovali jako pevnou látku ve formě jednoho kusu porézního anor-

ganického materiálu nebo organického polymeru, nejčastěji připravenou chemickou reakcí, jako je polykondenzace, polymerizace, či „click“ reakce uvnitř vhodného kontejneru nebo na povrchu nosiče. Přehledné referáty týkající se porézních polymerních monolitů nejsou v tomto časopise neobvyklé. Sluší se připomenout, že tento formát separačních medií se narodil na konci osmdesátých let minulého století v Praze a jeho historie byla podrobně popsána v obsáhlém referátu¹. Pěkný přehledný referát týkající se této problematiky byl publikován nedávno². Monolity byly původně vyvinuty jako alternativa ke kolonám plněným drobnými částicemi sloužícími jako stacionární fáze v kapalinové chromatografii. Nicméně, v průběhu doby se zjistilo, že monolitické struktury lze použít i jinde a paleta aplikací se začala rozšiřovat. Byly s úspěchem aplikovány v dalších chromatografických technikách, jako jsou tenkovrstvá a plynová chromatografie³, chromatografie

s použitím tekutiny v superkritickém stavu⁴, elektrochromatografie⁵, v přípravě vzorků včetně extrakce pevnou fází⁶ a metalo-organickými stavebními prvky⁷, či reaktivní filtrace⁸, jako nosiče pro kombinatoriální chemii⁹, jakož i pro přípravu účinných bioreaktorů a heterogenních katalyzátorů¹⁰, mikrofluidních zařízení¹¹, senzorů, podložek pro povrchem zesílený Ramanův rozptyl¹² a detektorů¹³. Rozsáhlejší přehled mnohých těchto méně rozšířených použití monolitických struktur byl v Chemických listech shrnut v dalším přehledném referátu¹⁴. Zatímco onen referát popsal mnohé aplikace ve velmi zhuštěné formě, tento příspěvek se soustředí na jedinou techniku, planární chromatografii též zvanou tenkovrstvou chromatografií (thin layer chromatography, TLC) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (mass spectrometry, MS), a předvede, že tato jednoduchá, leč v dnešních dnech zanedbávaná separační metoda může sloužit v řadě zajímavých aplikací.

TLC patří mezi nejstarší šířeji používané chromatografické techniky a byla poprvé popsána Izmailovem a Šrajberovou už v roce 1938 (cit.¹⁵). Kupodivu je tato separační metoda mnohem častěji používaná v organické chemii pro sledování reakcí a určování čistoty produktů než v dnešních analytických separacích. Kapalná mobilní fáze se většinou pohybuje v pórech vrstvy na desce postavené vertikálně v jednoduché nádobě např. kádince, a je poháněna pouze kapilárními silami v pórech. Roztok jednotlivých komponent dělené směsi je nakápnut na spodní část vrstvy a k separaci dojde na základě rozdílů v jejich afinitě k pevné stacionární a kapalné mobilní fázi. Typické provedení se děje na skleněné, hliníkové nebo plastové desce potažené tenkou vrstvou stacionární fáze, již může být oxid křemičitý (silika), oxid hlinitý (alumina) či celuloza, stmelené např. sádrou. Hlavními výhodami TLC jsou snadnost provedení separací, které mohou probíhat i v paralelních liniích na jedné desce, jednoduché vybavení, stacionární fáze k jednorázovému použití, statická detekce, a možnost archivování výsledku separace ve vysušené vrstvě. Detailní popis historie, metodiky a potřebného vybavení je popsán např. v obsáhlé monografii¹⁶.

2. Tenké vrstvy pro monolitickou TLC

2.1. Monolitické ultratenké vrstvy z oxidu křemičitého

V polovině 90. let minulého století Gusev a spol. poprvé demonstrovali TLC separace velkých molekul proteinů a peptidů na standardních vrstvách oxidu křemičitého s použitím detekce hmotnostní spektrometrií s laserovou desorpce a ionizací za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) a konvenčního UV laseru produkujícího záření o vlnové délce 337 nm (cit.¹⁷). Kromě úspěšné separace a detekce také zjistili, že detekční limit nebyl příliš vysoký. Pochopili, že většina vzorku není lokalizována na povrchu, na který dopadá laserové záření, ale uvnitř ve 100–250 μm silné vrstvě. Aby tento problém alespoň z části vyřešili, převedli analyty na povrch vrstvy pomocí extrakce methanolem nakápnutým na separovanou

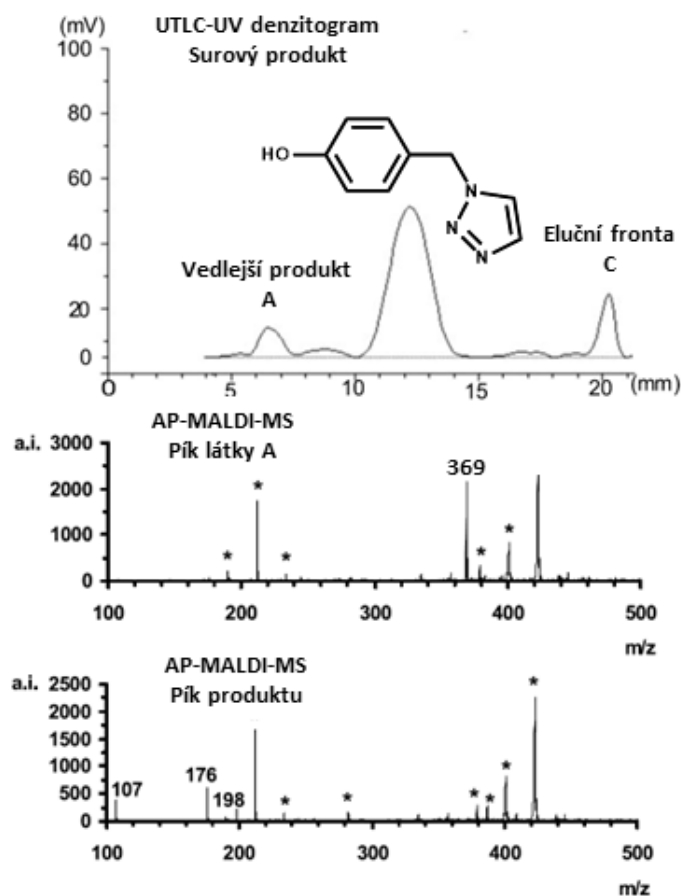
skvrnu a následným přidáním roztoku konvenční MALDI matrice. Naproti tomu použití MALDI s infračerveným laserem se zářením o vlnové délce 2,54 μm , které proniká do větší hloubky separační vrstvy, zlepšilo detekční limit až desetkrát¹⁸. Je pravděpodobné, že ke špatné separační účinnosti přispělo i použití nevhodných komerčních vrstev z oxidu křemičitého. Proto bylo žádoucí vyvinout nové typy vrstev. Jednou z odpovědí na tuto výzvu bylo zavedení komerčních monolitických ultratenkých vrstev na bázi tohoto materiálu.

Tenké monolitické vrstvy na bázi oxidu křemičitého se poprvé objevily jako komerční produkt distribuovaný společností Merck KGaA (Darmstadt, Německo) na počátku třetího tisíciletí¹⁹. Způsob jejich výroby pochopitelně nebyl firmou nikdy odhalen. Tyto relativně malé desky (6 × 3,6 cm) nesly 10 μm silné monolitické vrstvy, které daly název této technice: ultratenkovrstvá chromatografie neboli UTLC. Separace pomocí této techniky byly nejprve demonstrovány s malými molekulami léčiv²⁰. Tyto vrstvy byly později také použity v kombinaci s detekcí v módu hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s průletovým analyzátozem (time of flight-secondary ion mass spectrometry, TOF-SIMS)²¹ a MALDI, a to jak ve vakuu, tak i za atmosférického tlaku^{22,23}. Obr. 1 ilustruje MALDI spektra separovaných piků z monolitické vrstvy oxidu křemičitého získaná po aplikaci matrice α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA).

Výroba a prodej těchto monolitických desek však byly záhy ukončeny. Důvody, které by mohly stát za tímto rozhodnutím, uvádí Poole a Poole na základě analýzy, byť i omezeného počtu publikovaných studií²⁴: „*Ve srovnání se stabilizovanými částicovými vrstvami poskytují (ultratenké vrstvy) rychlejší separace, nižší limity hmotnostní detekce a nižší spotřebu rozpouštědel na úkor nižšího rozlišení a zvýšené složitosti manipulace. Aplikace vzorků je problematická kvůli malým objemům vzorků a malým aplikačním zónám potřebným pro optimální separace, což je přímý důsledek tenké vrstvy a krátkých migračních vzdáleností. Značná propustnost světla monolitickými vrstvami spolu s malými rozměry zón a krátkými migračními vzdálenostmi přispívá k problémům kvantitativních měření pomocí skenovací denzitometrie. Vzorky aplikované pomocí standardního laboratorního vybavení pro vysokouúčinnou tenkovrstvou chromatografii vedou spíše k méně uspokojivým výsledkům. Pro nízkomolekulární sloučeniny s hodnotami retenčního faktoru R_f mezi 0,1 a 0,5 byla získána zónová kapacita pouze 5–6 při tloušťce vrstvy 8–10 μm .*“

2.2. Polymerní vrstvy připravené elektrostatickým zvlákněním

Skupina Susan Olesikové byla průkopníkem zcela odlišného přístupu k ultratenkým vrstvám s monolitickou strukturou. Nejprve byly zkoumány vrstvy elektrostaticky zvlákněných poly(akrylonitrilových) nanovláken nanesených na hliníkovou fólii²⁵. Později byla připravena i čistě

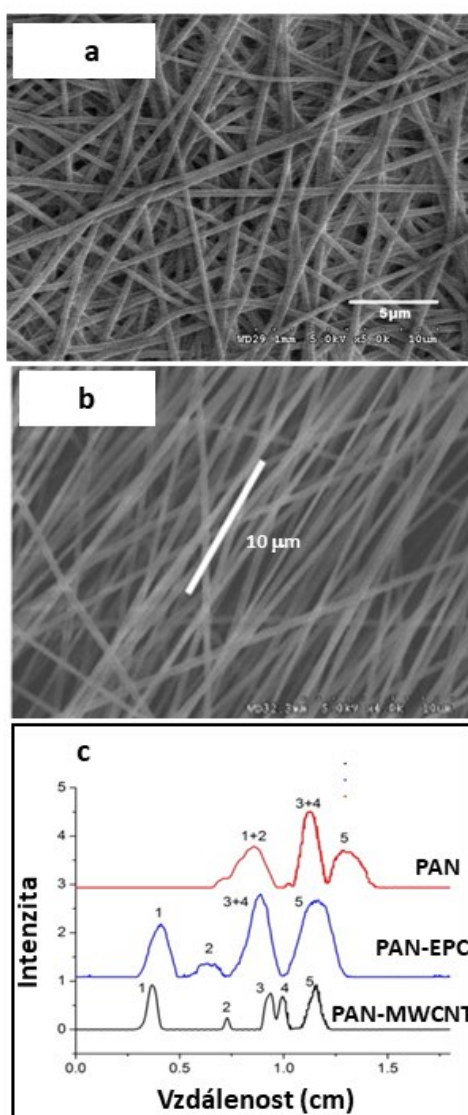


Obr. 1. Separace surových produktů syntézy substituovaného triazolu (m/z 175) s použitím mobilní fáze ethylacetát-hexan (1:2 v/v) obsahující 2 % octové kyseliny a prezentovaná jako UTLC-UV denzitogram surového vzorku po syntéze²³. Identifikace piků byla provedena pomocí spekter vedlejšího produktu A (m/z 369, $[M+H]^+$) a produktu (m/z 198, $[M+Na]^+$ a m/z 176, $[M+H]^+$) získaných detekcí MALDI-MS při atmosférickém tlaku. Hlavní maticové ionty jsou označeny hvězdičkami

uhlíková vlákna cestou *in situ* pyrolýzy výše uvedených poly(akrylonitrilových) prekurzorů²⁶. Struktura první z těchto vrstev je znázorněna na obr. 2a. Poole a Poole se k tomuto přístupu opět vyjádřili²⁴: „Vrstvy jsou dostatečně stabilní pro obecné použití v separacích bez nutnosti použití pojiva a byly připraveny o rozměrech 2 až 3 cm širokých a 6 cm dlouhých. Vrstvy z poly(akrylonitrilu) byly vyrobeny z vláken o průměru 400 nm a byly 25 μ m silné. Vrstvy z uhlíku se skládaly z vláken o průměru 200–350 nm a tloušťce 13–16 μ m. Roztoky vzorků o objemu 50 nl byly kapány injekční stříkačkou tak, aby vznikly počáteční zóny o průměru přibližně 0,25–0,50 mm, a po vyvolání kapilárním tokem byly odděleny zóny o průměru menším než 2,5 mm. Rychlosti pohybu mobilní fáze byly obecně vyšší, než se pozorovalo u vysoce účinných tenkovrstvých destiček. Pozoruhodnou vlastností těchto vrstev je, že pro mnoho sloučenin je rozšíření pásů minimální a byly pozorovány hodnoty výšky patra trvale pod 10 μ m při vzdá-

losti vyvolávání 1–6 cm. Tato separace je mnohem lepší než v případě stabilizovaných vrstev částic rovněž využívajících kapilární tok.“

Tato skupina posléze rozšířila svou technologii a připravila vláknité vrstvy se srovnanými poly(akrylonitrilovými) nanovláknými znázorněnými na obr. 2b, jejichž účinnost byla prokázána při separacích léčiv²⁷. Tyto vrstvy poskytovaly separace v kratším čase a s lepší reprodukovatelností. Kromě toho připravili také nanovlákněné vrstvy z roztoku poly(akrylonitrilu), ve kterých byly rozptýleny mnohovrstvé uhlíkové nanotrubičky (multi-walled carbon nanotubes, MWCNT) nebo uhlíkové nanočastice ve vlákních přispívaly k selektivě separace údajně díky silným π - π interakcím. Zvýšená selektivita a účinnost byla prokázána při separaci polycyklických aromatických uhlovodíků, která je znázorněna na obr. 2c. Otázkou zůstává, jak může tak malé množství nanouhlíku



Obr. 2. Skenovací elektronové mikrofotografie zobrazující poly(akrylonitrilovou) vrstvu připravenou „konvenčním“ elektrostatickým zvlákněním a zarovnaná polyakrylonitrilová nanovláknna vytvořená na rotujícím kolektoru při rychlosti otáčení 1250 ot/min (cit.^{25,27}) (a,b). Porovnání chromatogramů znázorňujících separaci (1) benzo[a]pyrenu, (2) chrysenu, (3) pyrenu, (4) fluoranthenu a (5) fenantrenu při použití vrstvy ze samotných poly(akrylonitrilových) vláken (PAN) za použití mobilní fáze acetonitril-voda, 70:30, jakož i s použitím vláken obsahujících 0,5 % uhlíkových nanotyčinek (PAN-EPCN) a vláken obsahujících 0,5 % vícevrstevných uhlíkových nanotrubiček (PAN-MWCNT), obojí s mobilní fází acetonitril-voda, 60:40 (cit.²⁸) (c)

a ještě k tomu podle skenovací elektronové mikrofotografie schované uvnitř vláken mít tak značný vliv na TLC separaci.

Arzenál polymerů pro přípravu elektrostaticky zvlákněných vrstev byl posléze rozšířen použitím poly(vinylalkoholu)²⁹ a acetátu celulosy³⁰. V prvním případě jimi byly separovány aminokyseliny včetně jejich fluorescenčně značených derivátů v mobilní fázi methanol-butanol-voda. Později byly použity pro screening steroidů za účelem důkazu falšování tradičních léčivých přípravků.

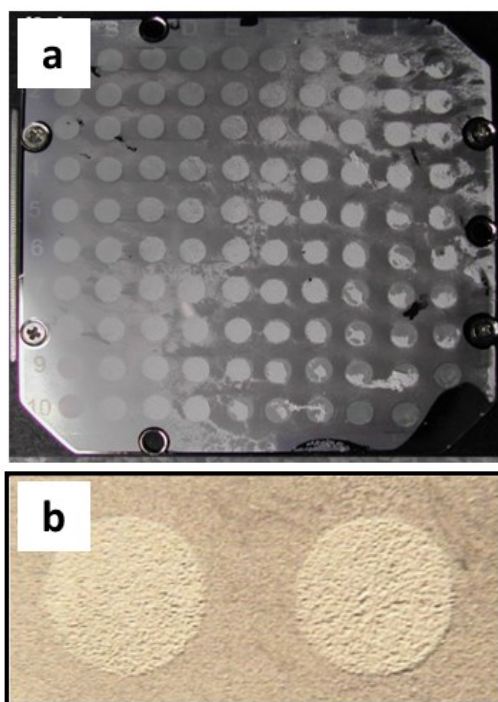
Nanovláknové vrstvy z polyakrylonitrilu a poly(vinylalkoholu) se rovněž ukázaly jako vynikající substráty pro hmotnostní spektrometrii malých i velkých molekul pomocí povrchem zesílené laserové desorpce/ionizace (surface-assisted laser desorption ionization, SALDI) bez nebo s asistencí nízkomolekulární matrice³¹. Například poly(oxyethylen) s molekulovou hmotností až 900 000 bylo možné detegovat v hmotnostních spektrech s dostatečným poměrem signálu k šumu. Ionizace polystyrenu s molekulovou hmotností 4000 bylo dosaženo v režimu SALDI bez přídavku jakékoliv matrice. Pro peptid angiotensin 1 však nebyl v tomto režimu pozorován žádný signál. Naopak při použití substrátu z nanovláken poly(vinylalkoholu) byl po aplikaci směsného roztoku peptidu a CHCA jako matrice zjištěn dobrý signál s malým pozadím. Síla tohoto signálu převyšovala sílu signálu získanou po aplikaci směsného vzorku přímo na MALDI desku z nerezové oceli.

3. Trocha historie

Jakkoliv se může zdát, že tenké monolitické vrstvy z organických polymerů byly zavedeny relativně nedávno, tedy až kolem roku 2007, jak bude uvedeno později, opak je pravdou. Není asi překvapením, že první zmínka týkající se použití monolitu podobné hydrogelové vrstvy opět pochází z Prahy³² stejně jako první monolitu podobná kolona³³. Miroslav Kubín z Ústavu makromolekulární chemie ČSAV připravil již v roce 1972 poly(2-hydroxyethyl-methakrylátový) hydrogel ve formě 1,5 mm silné a 1 × 2 cm velké vrstvy a použil jí pro separace myších, lidských a kuřecích erythrocytů. Tyto částice mají velikost 5,5, 7,2 a 11 μm a k jejich rozdělení došlo právě podle velikosti. I když výsledky této prvotní zprávy mají daleko do dnešní monolitické TLC, prvky této metody jsou v ní již obsaženy.

Ve skutečnosti prapředkem soudobých monolitických kolon zavedeném již na konci osmdesátých let minulého století, byly polymerní monolitické disky, které vlastně představovaly tenké vrstvy³⁴. Jejich příprava spočívala v polymerizaci směsi glycidyl-methakrylátu, ethylendimethakrylátu, cyklohexanolu, dodekanolu a volnoradikálového iniciátoru ve formě sestávající ze dvou vyhřívaných hliníkových desek oddělených od sebe polypropylenovým těsněním a sešroubovaných dohromady. Z takto připravených 10 × 10 cm velkých a 2 mm silných monolitických vrstev porézního polymeru se pak manuálně vykrajovaly požadované disky.

Nová reinkarnace tohoto postupu se objevila po více než deseti letech, když Dominic Peterson v roce 2004



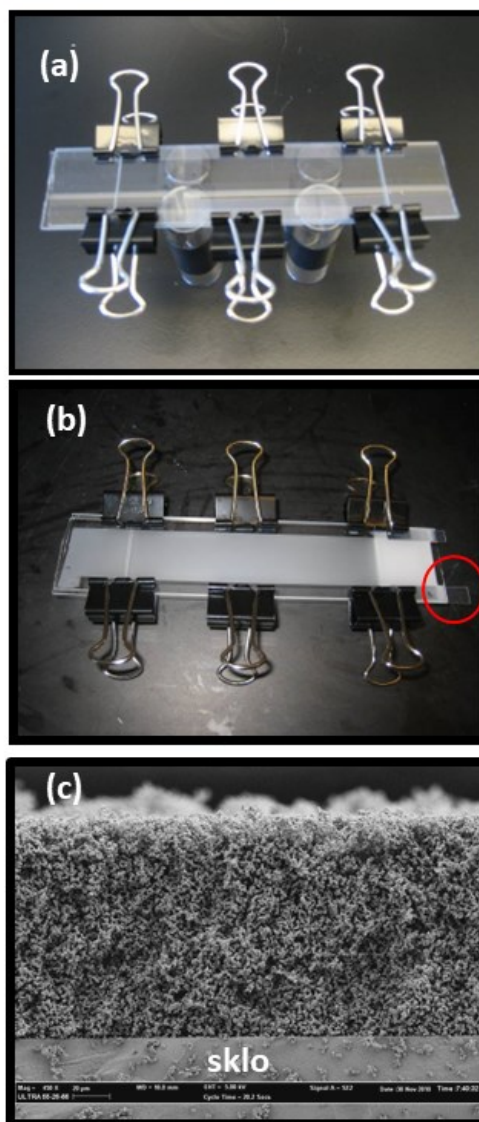
Obr. 3. Pohled na tenké válcovité monolitické struktury na povrchu MALDI podložky (a) a pohled v optickém mikroskopu shora na monolitické válečky (b)

připravil ze stejné směsi fotoinicovanou polymerizační reakcí 10 μm vysoké disky o průměru 3 mm ve formě sestávající ze standardní nerezové MALDI podložky oddělené polyethylenovými páskami od stejně velké skleněné destičky³⁵. Na krycí skleněné destičce byla nalepena maska z černě potištěné folie, na níž bylo ponecháno 100 průhledných kruhových ploch o požadovaném průměru 3 mm. Obsah formy byl pak ozařován UV světlem a jeho polymerizace vedla k válcovým strukturám prezentovaným na obr. 3. Ty byly pak použity pro povrchem zesílenou detekci látek v MALDI módu a fungovaly i bez přítomnosti jinak potřebné nízkomolekulární matrice.

4. Rané doby organo-monolitické TLC

Žádná z „historických“ aplikací polymerních monolitů uvedených v přechozí části však nesloužila skutečné TLC. První vlašťovkou v oblasti monolitické planární chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií byla v roce 2007 práce Ranii Bakry³⁶. Ta připravila poly(butyl-methakrylát-co-ethylendimethakrylátovou) vrstvu na povrchu skleněné destičky s použitím jednoduché formy. Jak ukazuje obr. 4, tato forma držená pohromadě kancelářskými sponkami se skládala ze dvou skleněných destiček, mezi nimiž byla na podélných okrajích vložena teflonová páska, jejíž síla definovala tloušťku

monolitické vrstvy. Polymerizační směs se do ní plnila působením kapilární síly a polymerizace se iniciovala UV zářením nebo zahříváním na vyšší teplotu. Po skončení polymerizace se uvnitř formy vytvořila bílá monolitická vrstva rovněž ukázaná na obr. 4. Forma se rozebrala tak, že se obě skleněné destičky mechanicky oddělily např. vsunutým nožem. Monolit na skleněné podložce byl pak použit k TLC separacím směsí obsahujících malé molekuly barviv, peptidy, či velké molekuly bílkovin, které byly detegovány hmotnostní spektrometrií v módu MALDI

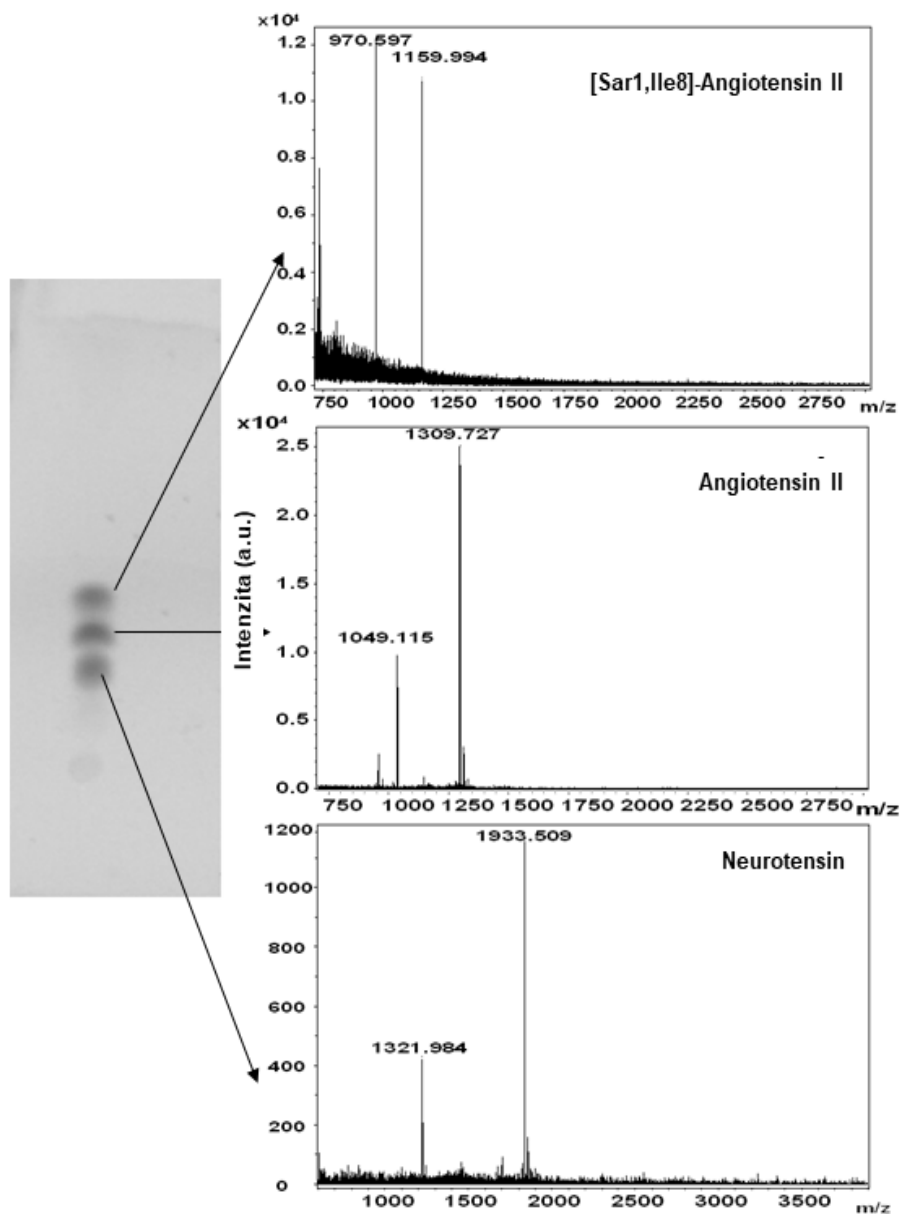


Obr. 4. Skleněná forma použitá k přípravě monolitické tenké vrstvy naplněná polymerizační směsí (a) a vzhled po skončení polymerizace (b). Zakroužkovaná část ukazuje teflonový pásek určující tloušťku vrstvy. Skenovací elektronová mikrofotografie vrstev po rozebrání skleněné formy potvrzuje porézni strukturu (c)

s použitím CHCA matrice. Obr. 5 ukazuje separaci peptidů opatřených kvůli viditelnosti ve vrstvě a přesnému cílení MALDI laseru fluorescaminovou fluorescenční značkou. Vzhledem k přítomnosti značených i neznačených molekul peptidů, spektra obsahují dvě maxima lišící se v molární hmotnosti právě o příspěvek značky. Pro aplikaci matrice byly testovány jak protokoly rozprašení, tak i bodové analýzy, tzv. spottingu. Při tomto procesu byla po aplikaci kapky matricového roztoku pozorována nežádoucí radiální migrace sloučenin v tenké vrstvě.

Tato migrace pak rozšířila skvrnu a vedla ke snížení rozlišení. Proto bylo v této studii používáno rozprašování roztoku matrice na povrch vrstvy a zvýšení účinnosti ionizace bylo pravděpodobně důsledkem extrakční funkce matricového roztoku, který zvýšil koncentraci peptidu na povrchu monolitické vrstvy, jak předpokládal již Gusev a spol.¹⁷

Podobně byly separovány i bílkoviny. Krátká optimalizace ukázala, že nejúčinnější mobilní fází pro tuto separaci byla směs 0,1% trifluoroctové kyseliny (TFA) v 55–60% vodném acetonitrilu. Fluorescenční značení proteinů

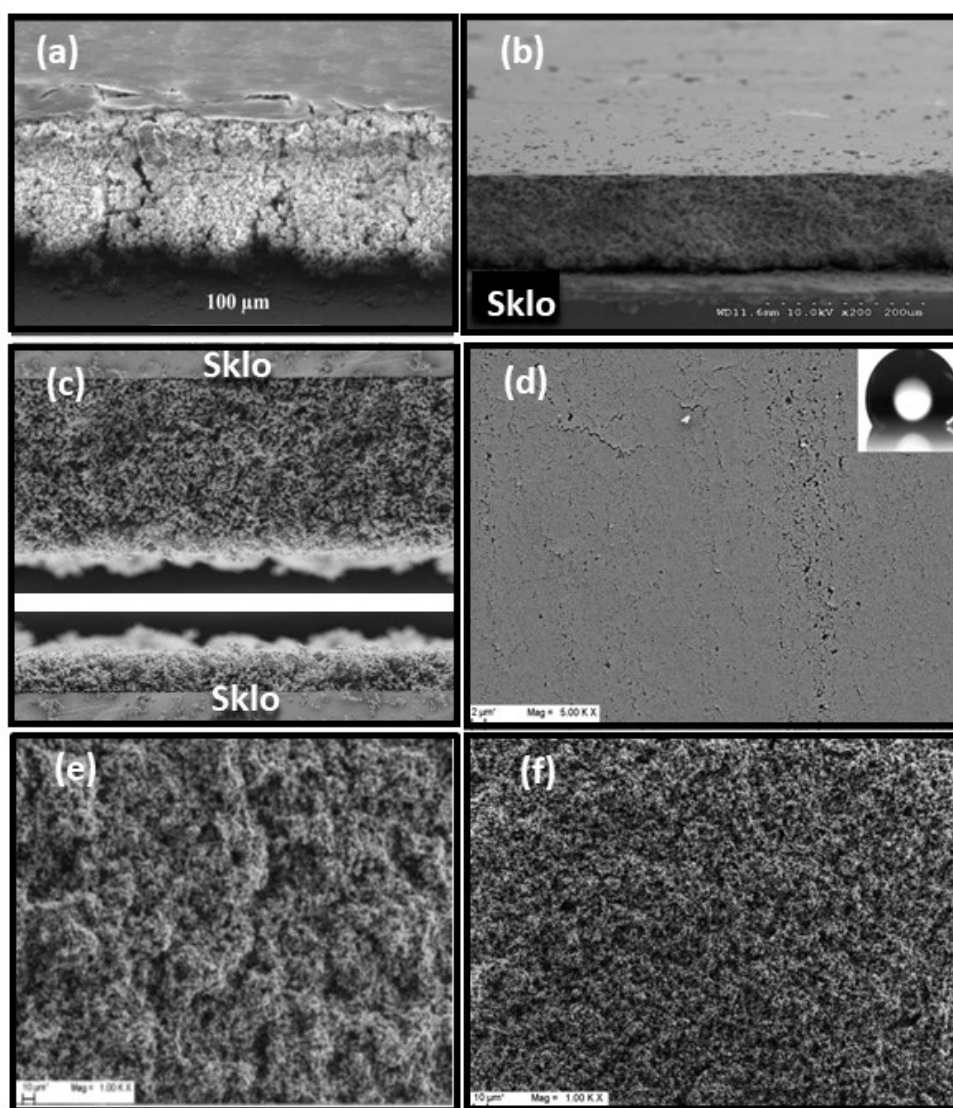


Obr. 5. TLC separace směsi peptidů označených fluorescaminem na 50 μm tenké monolitické vrstvě s použitím mobilní fáze obsahující 0,1 % trifluoroctové kyseliny ve 40% vodném roztoku acetonitrilu a MALDI TOF spektra [Sar1,Ile8]-angiotensinu II, angiotensinu II a neurotensinu získaná ze skvrn ve vrstvě s použitím α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny jako matrice

umožnilo jejich vizualizaci a skenování destičky pomocí fluorodenzitometru. Při značení však vznikla celá řada molekul lišících se počtem navázaných značek, což komplikovalo kvantifikaci. Aby se předešlo tomuto problému, byly separovány a detegovány neznačené bílkoviny. Bod aplikace vzorku byl označen tužkou na vrstvě a hmotnostní skenování probíhalo podél linie vyvolání.

Předchozí studie zahrnovala také přípravu monolitické vrstvy ze směsi sestávající ze styrenu, divinylbenzenu, dekan-1-olu a tetrahydrofuranu, přičemž iniciátorem byl

azobisisobutyronitril. Motivací pro použití tohoto polymeru byl předpoklad, že aromatický charakter vrstvy může ovlivnit její hydrofobicitu, a také přispět k selektivě prostřednictvím π - π interakcí. Tyto monomery ovšem absorbují UV záření, které se proto nedostane k molekulám iniciátoru tak, aby došlo k jeho rozpadu na volné radikály. Proto polymerace vyžadovala tepelnou iniciaci. Takto připravené vrstvy poly(styren-*co*-divinylbenzenu) byly nekvalitní a bylo možné pozorovat řadu defektů, jako jsou trhliny a nestejněměrná tloušťka. Proto tato polymerní vrstva nebyla ve výše uvedeném projektu použita a bylo



Obr. 6. Skenovací elektronové mikrofotografie monolitických tenkých vrstev. Poly(butyl-metakrylát-*co*-ethyléndimethakrylátová) vrstva získaná pomocí fotoinicované polymerizace připravená mezi dvěma nemoifikovanými sklíčky³⁷ (a), a poly(4-methylstyren-*co*-chlormethylstyren-*co*-divinylbenzenové) vrstvy připravené pomocí tepelně inicované polymerizace. Příčný řez vrstvou o tloušťce 50 µm připravené mezi dvěma sklíčky, z nichž jedno bylo modifikováno 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylátem (b) a její hladký povrch (d). Vrstva připravená ve formě sestávající ze dvou vinylizovaných skleněných desek lnoucí k oběma sklům (c), její drsný povrch (e) a vrstva s povrchem otevřeným pomocí lepicí pásky Scotch® (f)

třeba provést další experimenty k získání použitelné tenké vrstvy (vide infra).

5. Zvláštnosti přípravy tenkých vrstev

Jak bylo uvedeno výše, monolitická vrstva se tvoří většinou mezi dvěma skleněnými destičkami, většinou mikroskopickými sklíčky. Alternativně, leč méně často, pak mezi skleněnou destičkou a nerezovou MALDI podložkou. Nejjednodušší přístup spočívá v prostém použití nativního skla pro montáž formy. Například Wouters a spol. připravili 100 μm silnou porézní monolitickou vrstvu z poly(butyl-metakrylát-co-ethylendimethakrylátu) pomocí fotoiniciované polymerizace směsi monomerů umístěné mezi dvěma neupravenými komerčními mikroskopickými sklíčky³⁷. Jejich problémem spočíval v tom, že vzniklá vrstva měla hladkou povrchovou „slupku“ s občasnými trhlinami. Vlastnosti slupky se tedy lišily od vlastností vnitřního objemu vrstvy. To je dobře vidět na SEM snímku na obr. 6a. Vysvětlení tohoto jevu je třeba hledat v základech polymerizačních reakcí. Během reakce se monomerní jednotky spojují do řetězce, ve kterém jsou k sobě blíže ve srovnání se vzdáleností mezi nimi v roztoku monomerů. V důsledku toho dochází během polymerace ke smršťování objemu. UV záření, které proniká horní deskou, má největší intenzitu nejbliže u horní desky. Intenzita UV světla pak postupně slábne v důsledku samostatného působení polymerizační směsi. Rychlost iniciace v blízkosti spodní desky je tedy o něco nižší. V důsledku toho monolit přilne k hornímu sklíčku, zatímco ze spodního sklíčka se uvolňuje již během procesu přípravy. Prostor mezi uvolněným monolitem a spodní skleněnou destičkou je pak vyplněn vzduchem obsahujícím kyslík, polymerizační podmínky jsou odlišné od podmínek v převážné části vrstvy a vzniká nepropustná tenká „slupka“ občas přerušena trhlinami zčásti otevírajícími přístup do vnitřní makroporézní struktury. To vysvětluje i některé anomálie, které tyto autoři pozorovali.

Ačkoli to Wouters výslovně neuvádí, je pravděpodobné, že přilnavost monolitu k nativnímu povrchu skla nemusela být příliš silná a monolit se mohl rovněž odlupovat. Aby monolitická vrstva zůstala chemicky navázaná k povrchu skla, byl povrch jedné skleněné destičky ve formě modifikován 3-(trimethoxysilyl)propyl-methakrylátem, jehož dvojná vazby umožnily vznik kovalentní vazby mezi polymerem a povrchem skla. Naproti tomu, druhá skleněná destička funkcionalizovaná nebyla. Důvodem, proč by spodní skleněná deska neměla být funkcionalizována, bylo zabránění přilnutí vrstvy k této desce a usnadnění demontáže formy. Polymerní vrstva připravená za těchto podmínek je znázorněna na obr. 6b a 6d. Není překvapením, že opět vykazovala hladký povrch „slupky“ vzniklé na rozhraní polymeru a skla³⁸.

Situace se změnila, když bylo spodní sklo rovněž silylováno. Monolit při oddělování destiček, které bylo obtížné, lnul k oběma z nich, i když s různou pevností. Vrstva na skle, které bylo během ozařování UV světlem

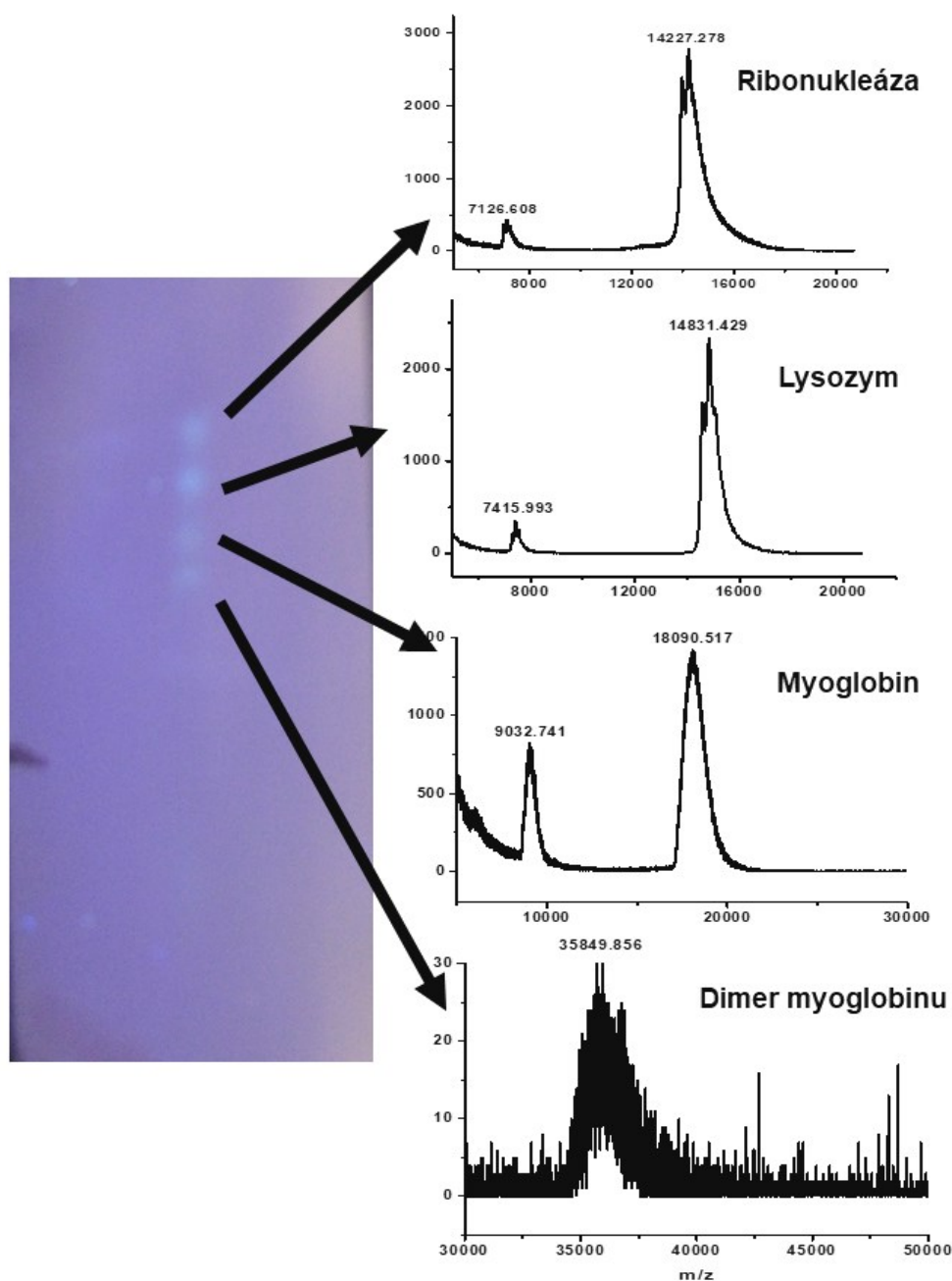
vespod, byla tenčí, což lze přičíst utlumení intenzity UV záření průchodem polymerizační směsí. Vznikal totiž gradient pevnosti vrstvy, neboť polymerizace ve spodní části formy probíhala o něco pomaleji. Na morfologii monolitu se však tento úkaz viditelně neprojevil (obr. 6c)³⁸ a žádná z vrstev neměla hladký povrch.

Přístup s oběma vinylizovanými skly, díky špatně definované tloušťce a drsnému povrchu, který ukazuje obr. 6e, očividně rovněž zcela nefungoval. Bylo proto vhodné se vrátit zpět k použití jedné nemodifikované destičky, na níž se monolitická polymerní vrstva nepřichytila a forma se dala snadno rozložit. Víme ale, že hladká povrchová „slupka“ na monolitu omezovala jeho použitelnost. Tento problém byl vtipně vyřešen pomocí jednoduchého triku. Pavel Levkin na hladký povrch připevnil proužky komerční lepicí pásky Scotch® a po jejich odtržení se vrchní polymerní „slupka“ přichycená k pásce homogenně odstranila z celé vrstvy. Tím se odhalila požadovaná relativně hladká a dobře vyvinutá globulární struktura, kterou ukazuje obr. 6f, jejíž aplikace již neměla žádná omezení. Je zřejmé, že podobného účinku by bylo možné dosáhnout s jakoukoliv adhezivní páskou.

Zajímavostí je, že morfologie povrchu se projevila i v jeho zjevné hydrofobnosti. Zatímco u hladkého povrchu byl kontaktní úhel pro vodu pouze 77°, protože postrádal potřebné topografické prvky, „otevřený“ porézní povrch se pak vyznačoval zvýšenou „hrubostí“ a kontaktní úhel se zvýšil na superhydrofobní hodnotu 154°. Tato skutečnost mohla pak být využita pro vývoj vrstev pro dvoudimenzionální TLC.

Původní experimenty s polystyrenovými vrstvami ukázaly, že hlavním problémem byla špatně prodyšná „slupka“³⁶. Odstranění této „slupky“, jak je popsáno výše, problém vyřešilo, a bylo možné se věnovat optimalizaci složení polymerizační směsi. Yongqin Lv použila polymerizační směs skládající se z 4-methylstyrenu, chlormethylstyrenu a divinylbenzenu, porogenu toluenu a dodekan-1-olu a iniciátoru azobisisobutyronitrilu³⁹. V porovnání s předchozími methakrylátovými vrstvami vykazovaly tyto monolitické vrstvy vyšší hydrofobicitu, což bylo potvrzeno lepší separací a pomalejší migrací peptidů, a to i v mobilní fázi obsahující vyšší procento acetonitrilu. Za zmínku stojí, že příprava byla vysoce reprodukovatelná. Experimenty s osmi různými destičkami a dvojitým vzorkováním směsi peptidů prokázaly vynikající opakovatelnost s RSD pro R_f menší než 2,5 %.

Tato vrstva byla také použita pro separaci tří fluorescenčně značených proteinů. Ribonukleasa A, lysozym a myoglobin byly separovány za 15 min do zřetelných skvrn znázorněných na obr. 7. Vzdálenost skvrn od startu se řídila hydrofobicitou jednotlivých bílkovin a MALDI hmotnostní spektra potvrdila identitu značených proteinů. Neočekávaná čtvrtá skvrna s m/z 34841,579, která měla nejmenší R_f , byla přiřazena dimeru myoglobinu, což je méně známá nečistota v komerční bílkovině. Ačkoli MS signál této skvrny byl slabý kvůli nízké koncentraci dimeru ve vzorku, obsahoval dvě fluorescenční značky, které zvýšily fluorescenci a umožnily jeho vizualizaci. Opako-



Obr. 7. TLC separace směsi proteinů ribonukleasy A, lysozymu, myoglobinu a dimeru myoglobinu označených fluorescaminem s použitím 50 μm silné poly(4-methylstyren-*co*-chlormethylstyren-*co*-divinylbenzenové) monolitické vrstvy. Separace byla uskutečněna v mobilní fázi obsahující 1% roztok trifluoroctové kyseliny v 65% vodném acetonitrilu a MALDI-TOF-MS spektra získaná za použití sinapové kyseliny jako matrice

vatelnost R_f byla opět vynikající s RSD menší než 2,4 %.

Další výhodou chemie těchto tenkých vrstev spočívala v jejich schopnosti hypersítování. Je známo, že Friedelova-Craftsova alkylační reakce katalyzovaná chloridem železitým vytváří velké množství mezopórů a vede k výraznému zvýšení měrného povrchu. Hypersítování monolitů obsa-

hujících chlormethylstyrenové jednotky bylo zavedeno později⁴⁰, a proto se pro rané monolitické tenké vrstvy nepoužívalo. Nicméně, na rozdíl od původní vrstvy, byla její hyperzesítená obdoba schopna rozdělit i malé molekuly, např. barviva³⁹.

6. Závěry

Předešlé řádky prokázaly, že monolitické vrstvy mohou skýtat značný potenciál i v separačních metodách odlišných od kapalinové či plynové chromatografie. Planární monolity od svých skromných začátků před dvaceti lety popsaných v tomto referátu dosáhly významného kvalitativního posunu a jejich vývojem se zabývalo několik akademických institucí i průmyslových producentů. Monolitická TLC byla použita pro rychlé a účinné separace jak malých molekul, tak i jejich velkých protějšků, jako jsou např. peptidy a bílkoviny. Významnou výhodou TLC je separace s použitím velice jednoduchých a snadno dostupných prostředků, která nevyžaduje žádné nákladné sofistikované přístroje. Zatímco tento přehled shrnuje rané práce v monolitické TLC oblasti, v jejím příštím pokračování budou popsány výzkumy týkající se pokročilých monolitických tenkých vrstev opět ve spojitosti s MS detekcí. Bude se jednat o vrstvy se zabudovanou MALDI maticí, vrstvy nesoucí na povrchu pórů nanočástice, či o přístupy umožňující snadnou TLC ve dvou dimenzích. Místo bude věnováno i nejnovějším trendům, které zahrnují 3D mikrotisk vrstev a monolitické tenké pásy v mikrofluidních čipech.

Tento referát vznikl za podpory projektu STARSS (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/ 0000465) cofinancovaného ERDF.

LITERATURA

- Švec F.: Chem. Listy 98, 232 (2004).
- Hefnawy M. M. a 10 spoluautorů: J. Chromatogr. A 1691, 463819 (2023).
- Sýkora D., Peters E. C., Švec F., Fréchet J. M. J.: Macromol. Mater. Eng. 275, 42 (2000).
- Zajičková Z., Nováková L., Švec F.: Anal. Chem. 92, 11525 (2020).
- Švec F., Deyl Z.: *Capillary Electrochromatography*. Elsevier, Amsterdam 2001.
- Masini J. C., Švec F.: Anal. Chim. Acta 964, 24 (2017).
- Saeed A., Maya A., Xiao D. J., Najam-ul-Haq M., Švec F., Britt D. K.: Adv. Funct. Mater. 24, 5790 (2014).
- Tripp J. A., Stein J. A., Švec F., Fréchet J. M. J.: Org. Lett. 2, 195 (2000).
- Švec F., Wulff D., Fréchet J. M. J., v knize: *Chiral Separation Techniques* (Subramanian G., ed.), str. 57. Wiley-VCH, New York 2000.
- Křenková J., Švec F.: J. Sep. Sci. 32, 706 (2009).
- Levkin P. A., Eeltink S., Stratton T. R., Brennen R., Robotti K., Yin H., Killeen K., Švec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr. A 1200, 55 (2008).
- Lv Y., Qin Y., Švec F., Tan T.: Biosens. Bioelectron. 80, 433 (2016).
- Luo J., Ma L., Švec F., Tan T., Lv Y.: Biotechnol. J. 14, 1900028 (2019).
- Švec F.: Chem. Listy 114, 718 (2020).
- Izmailov N. A., Shraiber M. S.: Farmatsiya 1938, 1 (1938).
- Poole C. F.: *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. Elsevier, Amsterdam 2015.
- Gusev A. I., Proctor A., Rabinovich Y. I., Hercules D. M.: Anal. Chem. 67, 1805 (1995).
- Gusev A. I., Proctor A., Rabinovich Y. I., Hercules D. M.: Fresenius' J. Anal. Chem. 366, 691 (2000).
- Hauck H. E., Bund O., Fischer W., Schulz M.: J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC 14, 234 (2001).
- Hauck H. E., Schulz M.: Chromatographia 57, S/313 (2003).
- Orinak A., Arlinghaus H. F., Vering G., Orinakova R., Hellweg S.: J. Chromatogr. A 1084, 113 (2005).
- Salo P. K., Vilmunen S., Salomies H., Ketola R. A., Kostianen R.: Anal. Chem. 79, 2101 (2007).
- Salo P. K., Salomies H., Harju K., Ketola R. A., Koti-aho T., Yli-Kauhaluoma J., Kostianen R.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16, 906 (2005).
- Poole S. K., Poole C. F.: J. Chromatogr. A 1218, 2648 (2011).
- Clark J. E., Olesik S. V.: Anal. Chem. 81, 4121 (2009).
- Clark J. E., Olesik S. V.: J. Chromatogr. A 1217, 4655 (2010).
- Beilke M. C., Zewe J. W., Clark J. E., Olesik S. V.: Anal. Chim. Acta 761, 201 (2013).
- Fang X., Olesik S. V.: Anal. Chim. Acta 830, 1 (2014).
- Lu T., Olesik S. V.: J. Chromatogr. B 912, 98 (2013).
- Rojanarata T., Plianwong S., Su-uta K., Opanasopit P., Ngawhirunpat T.: Talanta 115, 208 (2013).
- Lu T., Olesik S. V.: Anal. Chem. 85, 4384 (2013).
- Přistoupil T. I., Kramlová M., Kubín M., Špaček P.: J. Chromatogr. A 67, 362 (1972).
- Kubín M., Špaček P., Chromeček R.: Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 3881 (1967).
- Tennikova T. B., Švec F., Belenkii B. G.: J. Liquid Chromatogr. 13, 63 (1990).
- Peterson D. S., Hilder E. F., Luo Q., Švec F., Fréchet J. M. J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 18, 1504 (2004).
- Bakry R., Bonn G. K., Mair D., Švec F.: Anal. Chem. 79, 486 (2007).
- Wouters B., Vanhoutte D. J. D., Aarnoutse P., Visser A., Stassen C., Devreese B., Kok W. T., Schoenmakers P. J., Eeltink S.: J. Chromatogr. A 1286, 222 (2013).
- Han Y., Levkin P. A., Abarientos I., Liu H., Švec F., Fréchet J. M. J.: Anal. Chem. 82, 2520 (2010).
- Lv Y., Lin Z., Tan T., Švec F.: J. Chromatogr. A 1316, 154 (2013).
- Urban J., Švec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr. A 1217, 8212 (2010).

F. Švec (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*): **Neglected Applications of Monolithic Structures: The Beginnings of Planar Chromatography with Mass Spectrometric Detection**

Thin layer chromatography (TLC) has been first reported by N. A. Izmailov and M. S. Schreiber in the late 1930s. The liquid mobile phase usually moves in pores of a layer supported by a rigid plate placed vertically in a simple container, e.g., a beaker. The flow is driven by capillary forces in the pores only and no sophisticated instrumentation is required. The individual components of the mixture are separated based on differences in their affinity for the solid stationary and the liquid mobile phases. The typical format of the stationary phase represents a thin layer coated on a glass, aluminium, or plastic plate. The porous sorbents can be silicon dioxide (silica), aluminium oxide (alumina), and cellulose, held together, e.g., with gypsum. The main advantages of TLC are the ease of carrying out the separations, which can also take place in parallel lines on the same plate, simple equipment, stationary phase for single use, static detection, and the possibility of archiving the separation result in a dried layer. However, the typical 100–250 µm thick layers are not well

suitable for combination of TLC with mass spectrometry (MS). This has led to the commercialization of ultrathin 10 µm thick monolithic silica layers. Unfortunately, their production was soon discontinued. Alternative solutions to that problem originated from the academic environment. In one approach, the layers were formed from nanofibers prepared by electrospinning. Alternatively, the layers were porous monolithic polymers produced by polymerization *in situ* and a variety of separations of both small and large molecules was demonstrated. The use of MS detection then enabled determination of molecular mass of the compounds in the separated spots. Although preparation of the thin monolithic layers originally appeared straightforward, some unexpected problems had to be solved. This review details issues related to the history of the monolithic TLC and presents approaches leading to well behaving layers suitable for the desired separations.

Keywords: planar chromatography, thin layer chromatography, monolithic layers, separation, mass spectrometry

Acknowledgement

The author gratefully acknowledges the financial support of the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) co-funded by ERDF.