

ZANEDBÁVANÉ APLIKACE MONOLITICKÝCH STRUKTUR: POKROČILÉ STUDIE TENKOVRSŤVÉ CHROMATOGRRAFIE-HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

FRANTIŠEK ŠVEC

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

Došlo 10.5.23, přijato 29.5.23.

Tenkovrstvá nebo též planární chromatografie (TLC) se neustále rozvíjí, i když pomalejším tempem než její mocnější příbuzní – kapalinová a plynová chromatografie. Představuje totiž neustále velice jednoduchou alternativu k těmto metodám bez nároku na složitou přístrojovou základnu. To ovšem neznamená, že TLC nelze spojit se sofistikovanými detekčními metodami jako je MS, či provádět ji v několika dimenzích. K tomu, aby TLC byla použitelná v širším měřítku, je neustále zdokonalován její separační potenciál. Proto jsou vyvíjeny vrstvy s novým chemickým složením a inovativní postupy vedoucí k vrstvám umožňujícím dosud nepopsané aplikace. Tento referát se věnuje použití monolitických vrstev z porézních organických polymerů vyvinutých ke spojení s hmotnostní spektrometrií s laserovou desorpčí a ionizací bez účasti nízkomolekulární matrice či přípravě vrstev s netradičními formáty pro separace ve dvou dimenzích. Pozornost je také cílena na dosud neobvyklé přístupy, v nichž je TLC realizována v mikrofluidním prostředí.

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

Obsah

1. Úvod
2. Přímá MALDI detekce z monolitické tenké vrstvy
3. MALDI detekce z tenké vrstvy se zabudovanou maticí
4. Vrstvy pro separace ve dvou dimenzích
5. Nové trendy v monolitické TLC
 - 5.1. Monolitické mikropásky
 - 5.2. Třidimenzionální mikrotisk
6. Závěry

1. Úvod

Předchozí pojednání, uvedené v tomto časopise a týkající se počátků monolitické tenkovrstvé chromatografie (thin layer chromatography, TLC) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (mass spectrometry, MS), naznačilo, že monolitické vrstvy vnesly na počátku tohoto století do této oblasti novou kvalitu¹. Bylo ukázáno, že typické vrstvy o tloušťce 100–250 μm nejsou příliš vhodné pro kombinaci TLC s MS detekcí. První vlašťovkou k nápravě byly komerční ultratenké 10 μm silné monolitické vrstvy z porézního oxidu křemičitého – siliky^{2–7}. Ty se však příliš neujaly a jejich výroba byla záhy ukončena. Alternativním produktem byly vrstvy vytvořené z nanovláken připravených elektrostatickým zvláknováním^{8–14}. Jiným přístupem, jenž se objevil ve stejné době, byly tenké vrstvy vytvořené z porézních monolitických

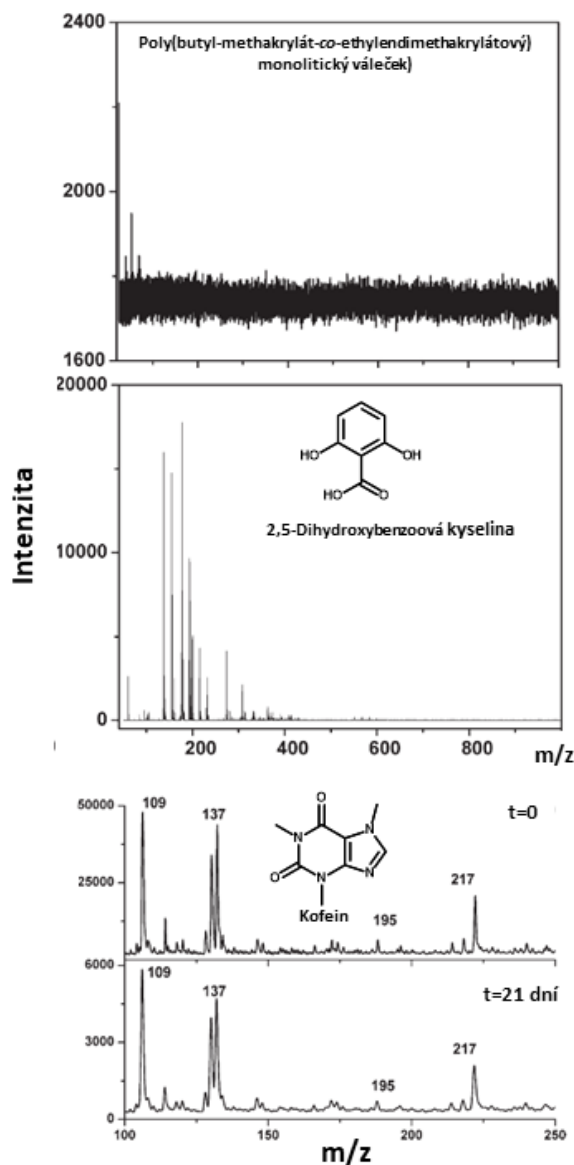
polymerů získané *in situ* polymerizací v jednoduché formě sestávající ze dvou skleněných destiček oddělených od sebe teflonovými pásky, které definovaly tloušťku vrstvy¹⁵. Poté byla demonstrována řada separací jak malých, tak i velkých molekul s pomocí těchto vrstev, ukázaných v předchozím referátu¹, i jinde¹⁶. Použití MS detekce pak umožnilo charakterizaci molární hmotnosti látek v separovaných skvrnách. Přestože se příprava tenkých monolitických vrstev původně jevila jako banální záležitost, bylo nutné vyřešit některé neočekávané problémy a teprve poté byly získány tenké vrstvy vhodné pro požadované separace. Tato práce popisuje pokročilé porézní polymerní tenké vrstvy a jejich použití v sofistikovaných aplikacích, jakož i nové přístupy k těmto vrstvám.

2. Přímá MALDI detekce z monolitické vrstvy

Jak bylo uvedeno v minulém článku, pro detekci s použitím hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) byly jako první použity nízké monolitické terče z poly(butyl-methakrylátu-*co*-ethylen-dimethakrylátu). Hydrofobní porézní povrch těchto monolitů umožnil přenos dostatečného množství energie na zkoumané látky tak, aby se vyvolala desorpce a ionizace před MS (cit.¹⁷).

Desorpční/ionizační schopnost samotných monolitických materiálů závisí na několika faktorech. Důležitou

proměnnou je například použitý výkon laseru. Horní panel na obr. 1 zobrazuje hmotnostní spektrum získané ozářením monolitu na bázi methakrylátů při výkonu laseru o něco vyšším, než se obvykle používá pro ionizaci s tradičními maticemi. Jakýkoliv ještě vyšší výkon laseru ovšem vedl k degradaci samotného monolitu a byly pozorovány píky typické pro produkty rozkladu methakrylátového polymé-



Obr. 1. Hmotnostní spektra laserové desorpce/ionizace prázdného místa porézního poly(butyl-methakrylát-co-ethylendimethakrylátového) monolitu (horní panel), 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny aplikované přímo na MALDI podložku (prostřední panel) a spektrum kofeinu desorbovaného/ionizovaného z povrchu porézního monolitu na bázi butyl-methakrylátu získané bezprostředně po aplikaci vzorku a spektrum téhož monolitu zaznamenané po třech týdnech¹⁷ (dolní panel). Hodnoty m/z jsou stejné pro oba horní obrázky

ru. Pro srovnání je na prostředním panelu ukázáno nízkenergetické hmotnostní spektrum 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB), která je běžnou MALDI maticí, získané při typickém výkonu laseru za použití standardní podložky z nerezové oceli. Tato matrice vytváří velké množství píků, zejména v oblasti odpovídající hodnotám m/z nižším než 600. U matrice DHB počet i intenzita nežádoucích píků převyšovaly hodnoty pozorované u relativně bezpříznakových spekter naměřených z monolitické matrice. Kupodivu, i přes tento známý problém, se DHB matrice stále běžně používá pro detekci malých molekul. Není třeba dodávat, že měřítka os intenzit píků na obou panelech se liší o dva řády, což znamená, že při běžném použití monolitické porézní polymerní matrice nelze pozorovat žádné významné interference¹⁷.

Při desorpci a ionizaci hraje roli také velikost pórů monolitické vrstvy. Naštěstí, další výhodou těchto vrstev je snadná kontrola porézních vlastností prostřednictvím změny složení polymerizační směsi, která umožňuje snadnou optimalizaci velikosti pórů pro požadovanou aplikaci. Byl také pozorován vliv rozpouštědla použitého pro přípravu vzorku, pravděpodobně kvůli rozdílům ve smáčení povrchu monolitu.

Na rozdíl od mnoha nízkomolekulárních MALDI matic nepředstavuje vystavení porézního polymerního monolitu působení vzduchu problém, protože neobsahuje na povrchu žádné funkční prvky citlivé na kyslík, které by způsobily ztrátu jeho ionizační účinnosti. Dolní část obr. 1 porovnává hmotnostní spektrum kofeinu zaznamenané bezprostředně po nanesení vzorku na monolitickou vrstvu s hmotnostním spektrem získaným při použití téhož vzorku na monolitu, poté co byl ponechán bez ochrany ve standardní chemické laboratoři po dobu tří týdnů. Spektra jsou prakticky identická. To dokazuje, že jak monolitická matrice, tak vzorek obsažený ve vrstvě se ani po dlouhé době nezměnily. Není proto třeba uplatňovat žádná zvláštní opatření, aby se zabránilo kontaktu s okolním prostředím. Toto zjištění rovněž naznačuje, že monolitické vrstvy lze použít pro skladování a archivaci přinejmenším netěkavých vzorků.

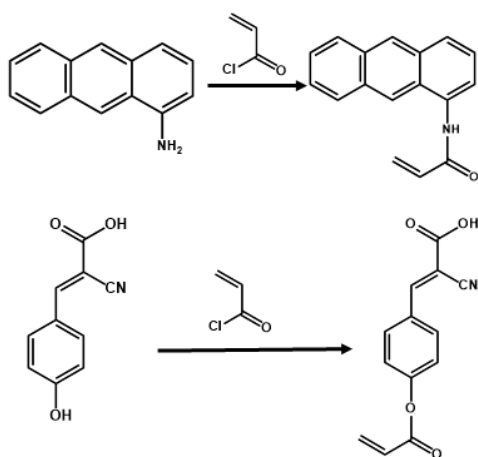
Jedna z dalších výhod monolitů spočívá v jejich neutrálním chemickém složení. Je dobře známo, že mnoho běžných nízkomolekulárních matic používaných v MALDI má kyselé charakter. To ztěžuje použití této ionizační metody pro analýzu látek nestabilních v kyselém prostředí, protože se mohou rozkládat již před desorpcí a ionizací. Například komplexní, na kyseliny citlivý, *N,N'*-bis(trifluoroacetyl-di-(2-aminoethoxy))-[4-(1,4,7,10-tetraoxaundecyl)fenyl]methan s molekulovou hmotností 564 neposkytl po aplikaci žádné běžné nízkomolekulární matrice použitelné MALDI spektrum při použití MS s detektorem doby letu. Naproti tomu ionizace z monolitické vrstvy vedla k dobrému spektru, které zahrnovalo píky pro molekulový ion, jakož i sodíkové a draslíkové adukty¹⁷. Tento výsledek jasně ukázal, že monolitické vrstvy mohou usnadnit ionizaci sloučenin, které by bylo velmi obtížné či nemožné analyzovat pomocí konvenčních technik s typickou MALDI maticí.

3. MALDI detekce z tenké vrstvy se zabudovanou maticí

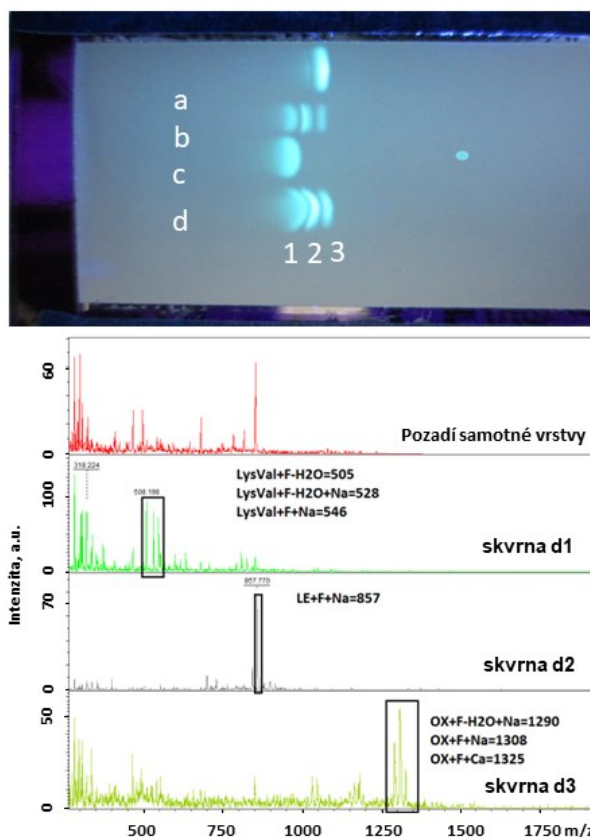
Jakkoliv samotné monolitické polymerní vrstvy umožňují ionizaci a desorpci analytů po jejich TLC separaci, toto pravidlo neplatí obecně a některé látky nebylo možné v módu MALDI detegovat. Jednalo se především o molekuly s vyšší molární hmotností, např. peptidy a bílkoviny. Jak bylo uvedeno dříve, tento problém byl úspěšně vyřešen rozprašením nízkomolekulární matrice na povrch vrstvy¹. Nicméně, tento přístup vyžadoval pro uživatele o jeden krok navíc v TLC analýzách. Přímocharost jednoduché přípravy tenkých vrstev prostou polymerizací ve formě ovšem poskytuje další možnost, která do dnešních dnů ještě nebyla použita, a to modifikaci polymerizovatelnou maticí. Syntéza podobné matrice může být velmi jednoduchá. Jak na příkladech ukazuje obr. 2, aminoskupinu 1-aminoanthracenu lze esterifikovat chloridem akrylové kyseliny a získat 1-anthrylakrylamid. Alternativně je možné hydroxylovou skupinu α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny převést obdobnou reakcí snadno na α -kyano-4-methakryloylskořicovou kyselinu (CMCA). Podobně je možné modifikovat i další matrice např. sinapovou nebo 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu.

Vlastní kopolymerizací CMCA komonomeru s butylmethakrylátem a ethylen-dimethakrylátem lze uskutečnit jak s použitím termální iniciace, tak i po iniciaci UV světlem. Vzhledem k aromatické povaze CMCA a její absorpci UV záření je však první metoda upřednostněna, i když samotná polymerizace trvá déle.

Obr. 3 ukazuje relativně rychlé, 7 min trvající, dělení směsi fluorescenčně značených peptidů ve vrstvě obsahující 30 hm.% CMCA a jejich detekci pomocí MALDI MS. Tak vysoký obsah je nutný, aby této sloučeniny byl dostatek na povrchu vrstvy, kde se odbývá požadovaná desorpce a ionizace. Je zřejmé, že tak velké množství dalšího



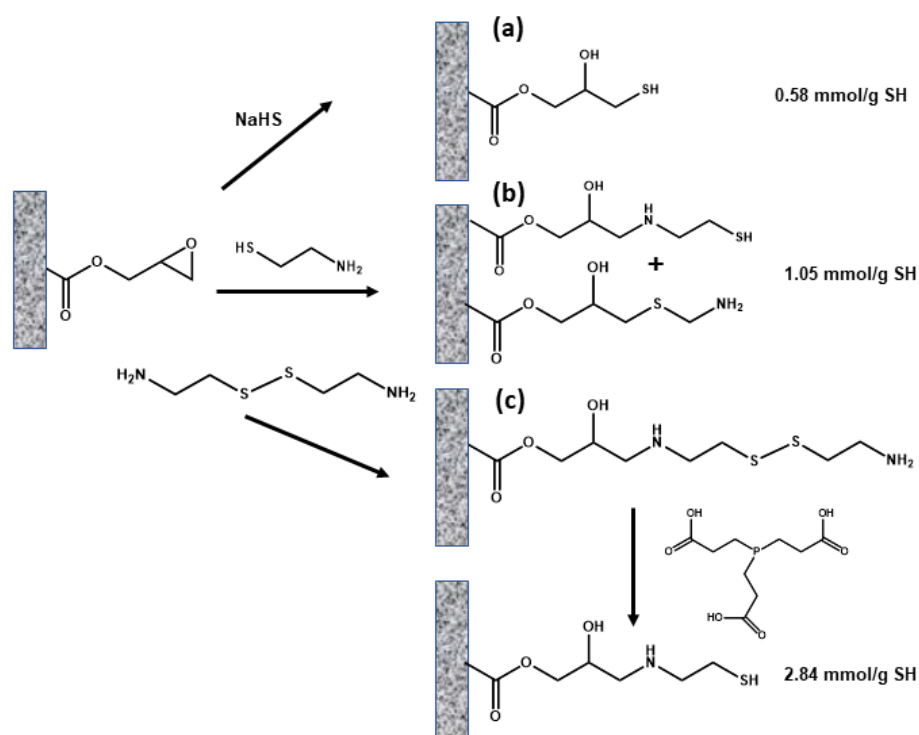
Obr. 2. Reakční schémata syntéz 1-anthrylakrylamidu a α -kyano-4-methakryloyl-skořicové kyseliny



Obr. 3. Separace peptidů na vrstvě připravené kopolymerizací butyl-methakrylátu, α -kyano-4-methakryloylskořicové kyseliny a ethylen-dimethakrylátu s použitím směsi acetonitrilu a 10 mM triethylammonium fosfátového pufru (60:40 obj.%) jako mobilní fáze. Skvrny: pás (a) oxytocin (OX), (b) dipeptid lys-val, oxytocin, leu-enkephalin (LE), (c) dipeptid lys-val, (d) viz (b), ale s dvojnásobnou koncentrací v aplikovaném vzorku. V MALDI spektrech jsou obsaženy píky peptidů, jejich fluorescenčně značených derivátů a aduktů (nepublikované výsledky)

monomeru, v jinak tradiční směsi, mění její vlastnosti a nalezení optimálního složení porogenních rozpouštědel vyžadovalo jistou pozornost. Vrstvu s požadovanými vlastnostmi, např. s větším měrným povrchem až $43 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, se podařilo vytvořit teprve při použití směsi dimethylformamidu a 1-dodekanolu. Velký obsah CMCA také mění chemické vlastnosti povrchu díky přítomnosti hydrofilních karboxylových skupin, které nejsou žádoucí v materiálu určeném pro separaci v obrácené fázi. A konečně, velký obsah je též plýtváním potenciálně vzácným monomerem. K překonání výše uvedených kvantitativních problémů byly použity dva přístupy, které umožnily funkcionalizaci pouze povrchu pórů, „click“ reakce a roubování.

Monovalentní soli mědi katalyzovaná azid-alkynová cykloadice byla poprvé popsána již v roce 1967 (cit.¹⁸). Ačkoliv nejprve přehlédnutá, stala se posléze východis-



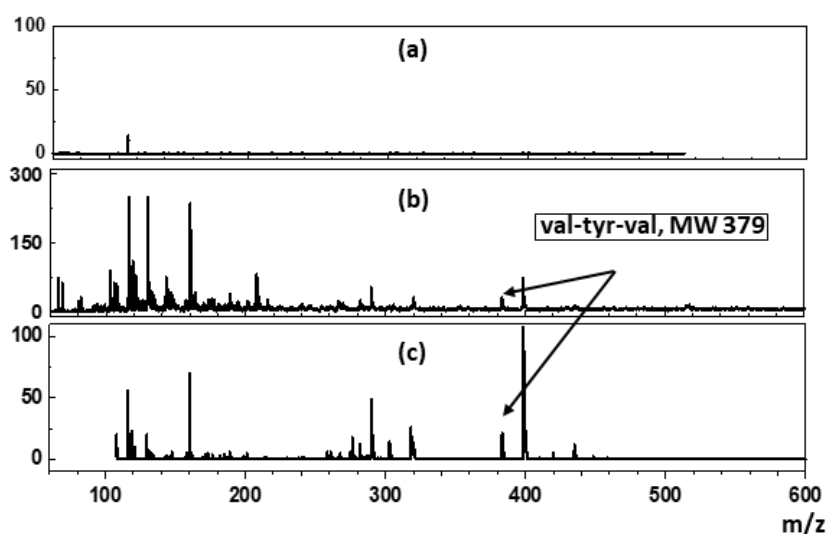
Obr. 4. Reakční schémata přípravy vrstvy s thiolovými skupinami reakcí poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylendimethakrylátového) monolitu

kem k současné „click“ chemii široce rozvinuté Barry Sharplessem¹⁹, který za její výzkum získal v roce 2021 Nobelovu cenu. Jím prokázána užitečnost této reakce podpořila zájem o další reakce, které rovněž vykazují rysy původního „click“ procesu. K nim patří i reakce thiol-alken. Na rozdíl od četných příkladů použití azid-alkynové cykloadice při přípravě a funkcionalizaci separačních médií pro chromatografii²⁰, bylo použití „click“ reakcí zahrnujících thioly výrazně méně časté a produkty byly povětšinou použity v kapilární elektrochromatografii^{21–23}. Na příklad skupina Wolfganga Lindnera ve Vídni připravila monolity s thiolovými skupinami reakcí poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylendimethakrylátového) monolitu s hydrogensulfidem sodným. Reakce je znázorněna na obr. 4a. Jak jsme však sami zjistili, obsah thiolových skupin v monolitu (pouhých 0,58 mmol g⁻¹) byl nevalný²⁴. Většího množství thiolových skupin (1,05 mmol g⁻¹) bylo dosaženo při použití cysteaminu jako činidla²⁴. Přítomnost dvou nukleofilních skupin thiolové a primární aminové v cysteaminu však vedla k reakci obou z nich s epoxidovým cyklem a snížil se obsah volných thiolů (obr. 4b). Proto jsme nakonec zvolili reakci epoxidových skupin s cystaminem, tedy dimeru spojujícího dvě molekuly cysteaminu prostřednictvím disulfidového můstku, zobrazenou na obr. 4c, která poskytla až 2,84 mmol g⁻¹ thiolových skupin²⁵. Na rozdíl od předešlých dvou jednostupňových reakcí, je tento výsledek dosažen dvěma reakcemi, reakcí s cystaminem následovanou rozštěpením

disulfidového můstku prostřednictvím tris(2-karboxyethyl)fosfinu²⁶. Nebylo žádným překvapením, že vrstva obsahující pouze thiolové skupiny neumožnila ionizaci žádných látek, jak dokazuje obr. 5a.

Leč zpět k přípravě TLC vrstev obsahujících zabudovanou MALDI matici. Jelikož CMCA obsahuje vinylové skupiny, je vcelku snadné navázat tuto matici na thiol obsahující monolit prostřednictvím thiol-alken „click“ reakce. Vrstva byla proto napuštěna methanolkým roztokem monomeru a fotoiniciátoru 2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenonu a „click“ reakce proběhla při pokojové teplotě a působení UV záření o vlnové délce 360 nm po dobu 30 min. Ačkoliv reakci lze kontrolovat časem a koncentracemi monomeru a iniciátoru, množství navázaných molekul CMCA nemůže překročit počet thiolových skupin v monolitu. Jejich funkce je však patrná z tripeptidu valtyr-val ve spektru generovaném z této vrstvy (obr. 5b). Jakkoliv tento postup vedl k požadovanému cíli, svojí složitostí se díky několika reakčním stupňům ukazuje jako méně efektivní. Kromě toho, takto modifikovaná vrstva nesplňovala ani požadavek dostatečné hydrofobicity tolik potřebné pro separace v obrácené fázi.

Východiskem se ukázalo prosté fotoroubování poly(butyl-methakrylát-*co*-ethylendimethakrylátové) vrstvy. Tento postup byl před lety vyvinut Thomasem Rohrem jako prostředek pro kontrolu chemie povrchu pórů v monolitických strukturách²⁷. Je vskutku jednoduchý. Póry vrstvy se naplní roztokem CMCA a benzofenonu



Obr. 5. MALDI spektra tripeptidu val-tyr-val získaná z vrstvy s pouhými thiolovými skupinami (a), z vrstvy připravené thiol-alken „click“ reakcí (b) a z vrstvy připravené UV iniciovaným roubováním polymerizovatelné matrice v přítomnosti benzofenonu (c) (nepublikované výsledky)

v dimethylformamidu a vrstva se ozařuje UV světlem. Již po 15 min bylo pokrytí pórů tvořené kovalentně navázanými řetězci polyCMCA dostatečné, aby umožnilo desorpci a ionizaci peptidů, jak dokládá obr. 5c.

Za zmínku stojí, že v obou předchozích případech je významně potlačen rozpad samotné matrice. To samo o sobě je povzbuzujícím faktorem. I kdyby se použití monolitických vrstev se zabudovanou maticí neshledalo vhodným pro účely TLC separace, i samotné vrstvy mohou nalézt použití při MALDI analýze malých molekul, neboť fragmenty této polymerní matrice interferují daleko méně s píky malých molekul či krátkých peptidů.

4. Vrstvy pro separace ve dvou dimenzích (2-D)

Díky svému planárnímu charakteru je TLC snadno použitelná pro dvourozměrné separace, což výrazně zvyšuje kapacitu zón. Nejjednodušší dvourozměrné provedení zahrnuje nanášení vzorku v blízkosti jednoho rohu vrstvy, vyvolání separace v jednom směru pomocí první mobilní fáze, vysušení vrstvy a vyvolání druhou mobilní fází po otočení o 90°. Poole popsal několik technik pro vytvoření ortogonalit v 2-D TLC (cit.²⁸). Snadný přístup používá dvě různá rozpouštědla s komplementární selektivitou. Nalezení systému dvou skutečně ortogonálních rozpouštědel však může být náročný úkol.

Důležitá je také detekce nutná pro vizualizaci výsledků separace v 2-D TLC. Zatímco „klasické“ metody detekce, jako je stínování vrstvy nebo UV značení látek, poskytují informace týkající se polohy skvrny a retardačního faktoru R_f , MS přidává separaci další rozměr tím, že

identifikuje izotopickou hmotnost separovaných sloučenin a poskytuje řadu informací o jejich struktuře. Žádoucího zvýšení citlivosti bylo dosaženo zavedením desorpčního elektrosprejového ionizačního rozhraní (desorption electrospray ionization, DESI)²⁹, které bylo také použito pro přímou detekci sloučenin z komerčních TLC vrstev vyrobených z částic^{30,31}.

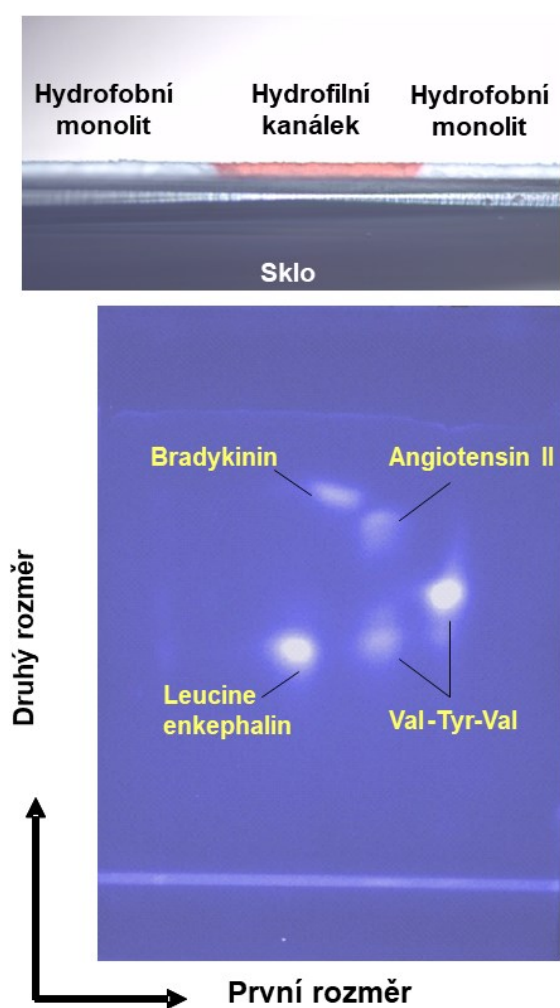
Při přípravě vrstev pro 2-D TLC je třeba zvážit několik faktorů. Mezi ně patří hydrofobnost, porézní vlastnosti, separační schopnost a mechanická pevnost optimalizované tak, aby odpovídaly požadavkům zamýšlené aplikace. Například hydrofobicita, která je vyžadována pro separaci peptidů v režimu obrácené fáze, byla definována výběrem chemie poly(butyl-methakrylát-co-ethylendimethakrylátové) monolitické vrstvy a nastavením jejich porézních vlastností kontrolou podílu porogenních rozpouštědel v polymerizační směsi³².

Pro vývoj formátu 2-D TLC vrstvy, umožňující separaci pomocí dvou různých mechanismů, byla s výhodou využita superhydrofobicita tenké vrstvy reprezentovaná kontaktním úhlem pro vodu vyšším než 150° (cit.^{32,33}). Při jedné hraně takovéto superhydrofobní polymerní tenké vrstvy na skleněné podložce byl vytvořen virtuální hydrofilní kanálek s iontově výměnnými skupinami. Separace v prvním rozměru pak probíhala v mechanismu iontové výměny v hydrofilním kanálku, zatímco hydrofobní zbytek desky byl poté použit ve druhém rozměru pro separaci v obrácené fázi.

Pro vytvoření iontoměničového kanálu bylo použito fotoiniciované roubování. Za tímto účelem byly póry celé superhydrofobní vrstvy vyplněny směsí 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonové kyseliny, 2-hydroxyethyl-

methakrylátu a benzofenonu rozpuštěného ve směsi 2-methylpropanolu a vody. Poté byla UV zářením, přes jednoduchou laboratorně vyrobenou masku, iniciována polymerizace, aby se v celé tloušťce vrstvy vytvořil trojrozměrný kanálek o šířce 0,6 mm. Jak demonstruje obr. 6, byla v něm pak vodná fáze zadržována povrchovým napětím na rozhraních se superhydrofobní částí, které jí bránilo proniknout do přilehlých oblastí monolitické vrstvy.

Připravené 2-D vrstvy byly následně použity pro separaci fluorescenčně značených peptidů leucine enkefalínu, bradykininu, angiotenzinu II a val-tyr-val. Vodný roztok směsi peptidů opatřených UV značkou byl nanesen v blízkosti začátku roubovaného hydrofilního kanálku. Separace v první dimenzi pak byla docílena s použitím mobilní fáze

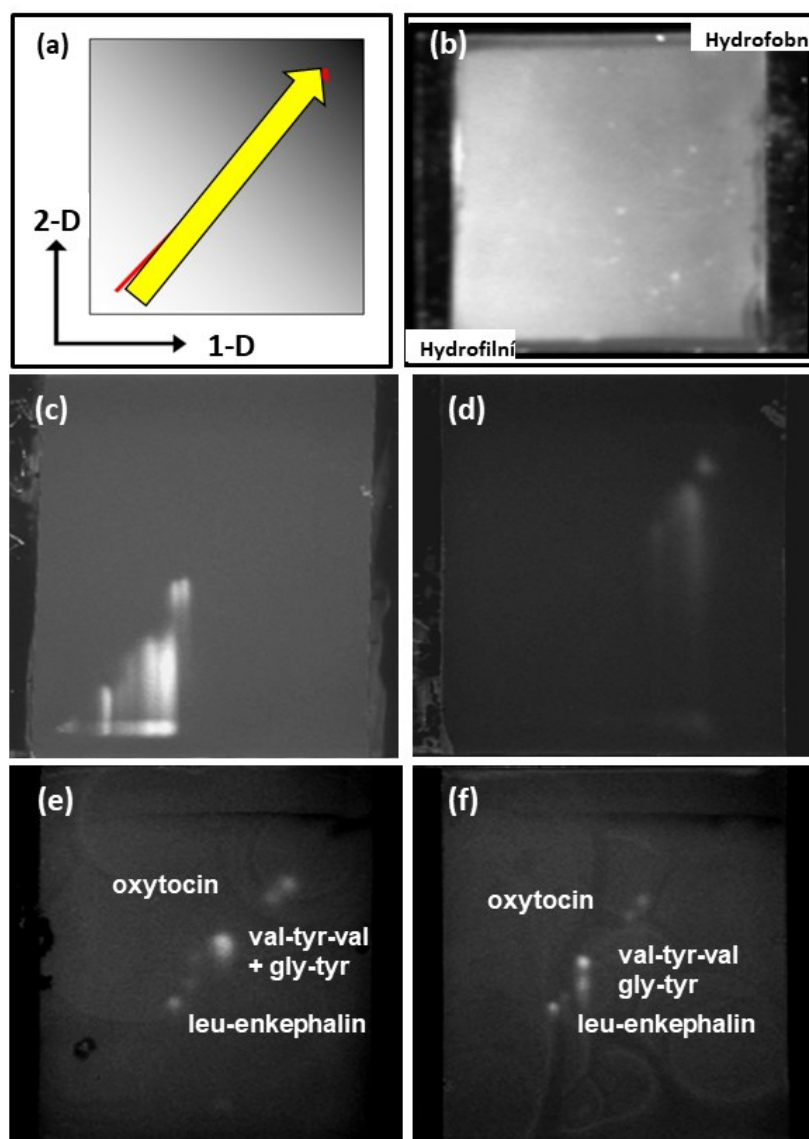


Obr. 6. Optický mikroskopický snímek řezu superhydrofobní monolitickou vrstvou se zabudovaným hydrofilním kanálkem s iontovýměnnými skupinami naplněným vodním roztokem červeného barviva (horní část) a separace fluorescencí UV značených peptidů ve dvoudimenzionálním provedení kombinujícím iontově výměnnou separaci v první dimenzi a separaci s obrácenou fází ve druhé (dolní část)³²

nasávané kapilární silou z přiloženého filtračního papíru nasyceného roztokem acetonitrilu ve vodném roztoku octanu amonného, který měl pH 7. Pro separaci ve druhém rozměru ortogonálně k té v prvním rozměru byla pak použita mobilní fáze obsahující 0,1 % trifluoroctové kyseliny (TFA) ve vodném acetonitrilu. Po dokončení dvourozměrné separace byla destička vysušena na vzduchu a rozdělené peptidy byly detegovány v UV světle. Zajímavé bylo, že val-tyr-val se oddělil ve dvou skvmách. MS analýza tohoto komerčního tripeptidu ukázala, že obsahuje molekuly s očekávanou molekulovou hmotností 380 a dimer s hmotností 760, čímž se vysvětlil původ dvou skvm.

Pro MS detekci stejných leč neoznačených peptidů bylo použito jednosměrné DESI skenování v pruzích popsané v literatuře již dříve³⁰. Skleněná destička s porézní vrstvou byla umístěna na x/y pohyblivém stolku. První pruh byl skenován pohybem stolku ve směru rovnoběžném s osou x, což představuje směr 1-D, t.j. od nízkého k vyššímu R_f . Na konci skenu prvního pruhu byla vrstva posunuta zpět na začátek osy x a rovněž o trochu ve směru osy y a byl skenován další pruh. Osa y představuje směr separace ve 2-D. Tento postup se opakoval, dokud nebyla naskenována celá vrstva. Hmotnostní spektra odpovídající jednotlivým peptidům jsou výrazně čistší, což potvrzuje zlepšení rozlišení po separaci ve druhém rozměru. Také vzdálenost detegovaných peptidů od startu se změnila a byla odlišná od pořadí pozorovaného v první dimenzi. Obrázek demonstrující tuto separaci byl prezentován v jedné z předešlých prací v tomto časopise³⁴.

Zatímco výše bylo roubování použito k vytvoření virtuálního kanálku, Iva Urbanová tuto techniku použila i pro přípravu vrstev s gradientem hydrofobicity rovněž určených pro 2-D separaci³⁵. Východí monolitická porézní vrstva nanesená na skleněné podložce byla připravena z glycidyl-methakrylátu a ethylendimethakrylátu a poté hydrolyzována pomocí zředěné kyseliny sírové za vzniku tenké vrstvy poly(glycerol-methakrylát-co-ethylendimethakrylátu). Ačkoli tato reakce zvýšila hydrofilitu vrstvy, ta nebyla dostatečná k tomu, aby zcela zabránila adsorpci některých hydrofobnějších látek. Proto byl povrch pórů nejprve roubováním pokryt poly(ethylenglykol)-methakrylátem, čímž vznikl povrch, který vykazoval kontaktní úhel pro vodu blízký 0° , což znamená, že celá vrstva se stala superhydrofilní. Tato hydrofilizovaná monolitická vrstva byla pak pokryta roztokem benzofenonu ve směsi lauryl-methakrylátu a ethanolu a zakryta tenkou křemennou deskou. Na horní povrch této desky byla přiložena maska neprůhledná pro UV světlo. Vytvoření diagonálního gradientu bylo velmi jednoduché. Masky byla posouvána konstantní rychlostí diagonálně přes formu v průběhu 5 min. Přítomnost gradientu byla potvrzena měřením kontaktního úhlu vody v různých místech povrchu. Levý dolní roh byl nejhydrofilnější částí s kontaktním úhlem 0° , zatímco nejhydrofobnější část v pravém horním rohu vykazovala kontaktní úhel 135° (obr. 7a). Profil gradientu byl také vizualizován v UV světle po označení vrstvy roztokem 1-anilinaftalen-8-sulfonové

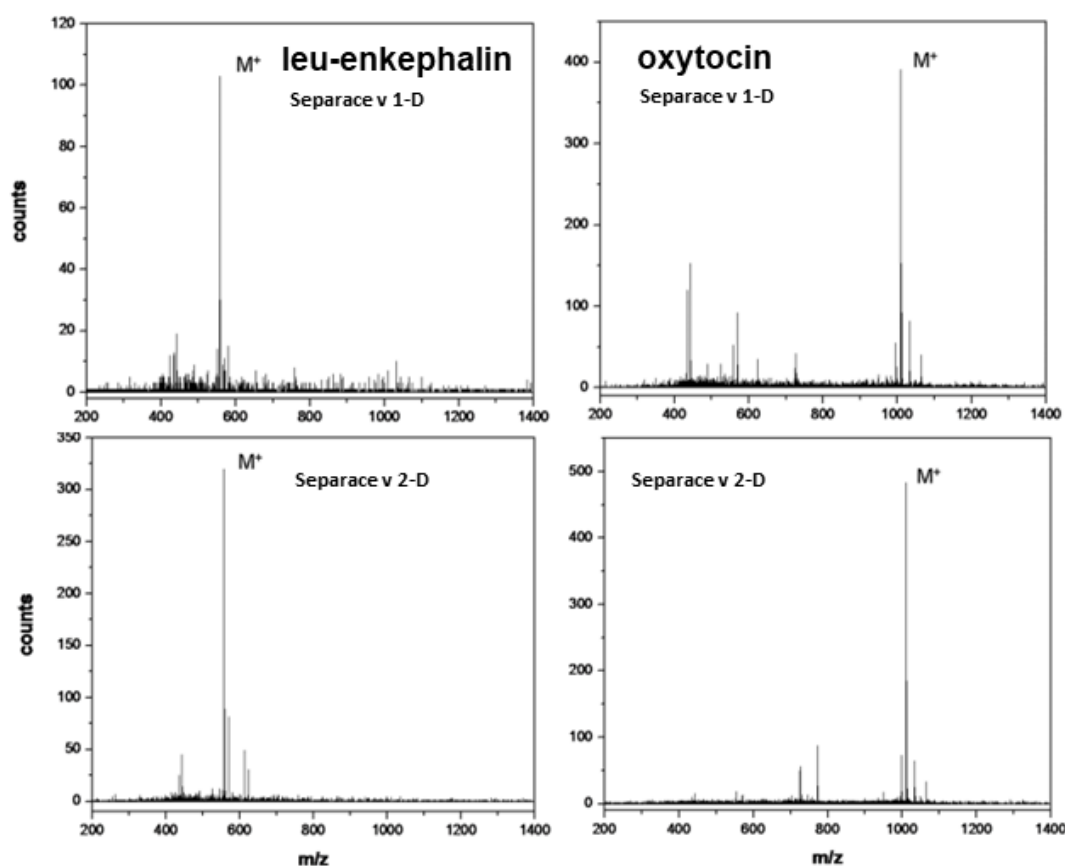


Obr. 7. Schematické ztvárnění gradientu hydrofobnosti na monolitické TLC vrstvě rostoucí ve směru šipky spolu s navrženými směry separací v prvním (1-D) a druhém rozměru (2-D) (a), vizualizace gradientu hydrofobnosti použitím fluorescenčního značení 1-anilinaftalen-8-sulfonovou kyselinou (b). Světlá oblast v levém dolním rohu představuje nejvíce hydrofilní část a tmavá vpravo nahoře nejhydrofobnější část. Separace leucin enkefalinu, gly-tyr, val-tyr-val a oxytocinu na monolitických vrstvách: poly(glycidyl-methakrylát-co-ethylendimethakrylát) (c), též monolit ale s hydrolyzovanými epoxidovými skupinami (d), vrstva celoplošně homogenně fotoroubovaná poly(ethylenglykol)-methakrylátem (e) a předchozí vrstva s hydrofilizovaným povrchem fotoroubovaná diagonálním gradientem poly(lauryl-methakrylátu) (d). Separace za použití mobilní fáze obsahující 0,1 % trifluoroctové kyseliny v 30% acetonitrilu ve vodě v prvním rozměru a 0,1 % trifluoroctové kyseliny v 50% vodném methanolu ve druhém rozměru⁴⁴

kyseliny (obr. 7b). Pozitivní účinek TLC s gradientem poly(lauryl-methakrylátu) ve srovnání s vrstvami v předchozích reakčních stupních byl dokumentován separacemi peptidů gly-tyr, val-tyr-val, leucin enkefalinu a oxytocinu (obr. 7d–f). První dva peptidy nebyly v první dimenzi rozděleny vůbec při použití roztoku TFA ve vodném acetonitrilu. Po otočení destičky o 90° a jejím vyvolání ve

druhé dimenzi roztokem TFA ve vodném methanolu však byly od sebe jasně odděleny, přičemž val-tyr-val měl větší hodnotu R_f .

Proveditelnost MS detekce byla poté demonstrována s leucin enkefalinem a oxytocinem, jak ukazuje obr. 8. Tyto dva nezačtené větší peptidy byly smíchány v ekvivalentních množstvích a jejich separace provedena za pod-

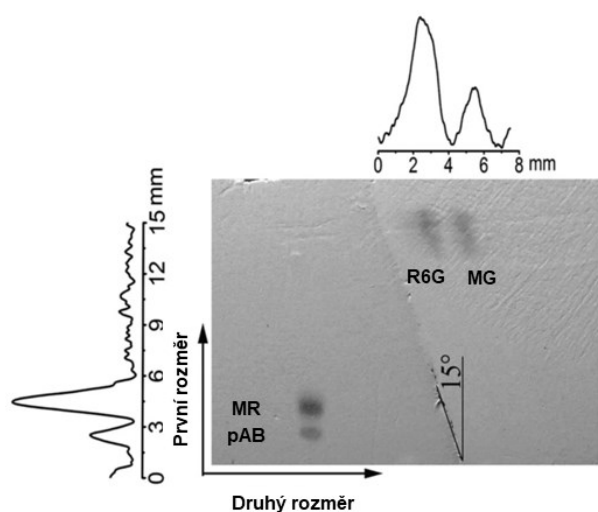


Obr. 8. MALDI-MS spektra získaná ze skvrn leucin enkefalinu a oxytocinu získané po ionizaci s použitím hydroxyskořicové kyseliny jako matrice z vrstvy, na níž byly rozděleny v první (levé panely) a druhé dimenzi (pravé panely)⁴⁴

mínek aplikovaných se značenými peptidy v předchozím experimentu. Po dokončení separace v obou rozměrech byl monolit postříkán roztokem matrice, vysušen a skvrny detegovány pomocí MALDI MS.

Důvodem lepší separace na diagonálně roubované vrstvě byly následující skutečnosti. Na desce roubované „lineárním“ způsobem přicházejí peptidy do kontaktu se stejnou hydrofobností v prvním i druhém rozměru. Proto jsou všechny skvrny seřazeny podél diagonály (viz obr. 3). Naproti tomu vrstva roubovaná diagonálně poskytuje během separace gradient hydrofobicity v obou rozměrech a umožňuje jemné vyladění separace. Oxytocin se tak oddělil do dvou dalších skvrn. MS analýza komerčního nonapeptidu ukázala, že obsahuje molekuly s očekávanou molekulovou hmotností, jakož i molekuly jeho dimeru, čímž se opět objasnil původ dvou skvrn. Za zmínku stojí, že separace ve druhém rozměru byla dokončena za méně než 3 min. Poměr signál/šum byl dobrý již po separaci v první dimenzi, přičemž v separovaných skvrnách nebyl pozorován žádný signál druhého peptidu. Nicméně, spektra obou peptidů získaná po dvourozměrné separaci byla čistší, protože hlavní skvrna byla oddělena od nečistot obvykle obsažených v umělé vyrobených peptidech.

Zheng a spol. použili pro přípravu vrstev pro 2-D TLC odlišný přístup. Namísto polymer-analogických reakcí vedoucích k chemicky modifikovaným vrstvám uvedené výše, které se jim zdály příliš složité, zvolili dvě oddělené polymerizace v jedné formě³⁶. Nejprve připravili 200 μm silnou porézní monolitickou poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylendimethakrylátovou) vrstvu postupem jako v předešlém případě. Po rozebrání skleněné formy byla část monolitu zhruba do poloviny odškrábána tak, aby jeho čelo mělo 15° sklon vůči delší straně sklíčka. Poté formu znovu sestavili, naplnili polymerizační směsí obsahující hydrofobní butyl-methakrylát a ethylendimethakrylát a fotopolymerizovali ji přes masku, která bránila tvorbě polymeru v předchozí vrstvě. Konečná fáze přípravy vrstvy spočívala v hydrolyze epoxidových skupin glycidyl-methakrylátových jednotek na hydrofilní diolové skupiny. Na rozdíl od autorů se mi tento vícestupňový postup zdá být složitější než předešlé dva, neboť vyžaduje manuální zručnost a velmi přesné postupy zaručující, že se při druhé polymerizaci nezaplňují póry vrstvy první a také mezi vrstvami nevznikne mezera, což by ovlivnilo opakovatelnost procesu.



Obr. 9. 2-D TLC separace polárního 4-aminoazobenzenu (pAB) a methyl červeně (MR), jakož i hydrofobní malachitové zeleně (MG) a rhodaminu R6G (R6G) s použitím monolitické vrstvy složené z tandemem dvou typů polymerů, poly(butyl-methakrylát-co-ethylendimethakrylátu) a poly(glycerol-methakrylát-co-ethylendimethakrylátu) (upraveno z cit.³⁶). Mobilní fází v první hydrofobní dimenzi byl ethyl-acetát/ethanol/voda (4:5:9), ve druhé 10 mM NaCl v methanolu. Chromatografický záznam byl vytvořen z denzitogramu pořízeného TLC skenerem

Vhodnost této vrstvy pro 2-D separace byla demonstrována rozdělením směsi čtyř malých molekul barviv významně se lišících polaritou. Aplikace směsi byla provedena na hydrofobní vrstvu, v níž byly nepolární molekuly v mobilní fázi sestávající z ethylacetátu, ethanolu a vody sice v mechanismu obrácené fáze rozděleny, ale jejich pohyb ve vrstvě byl díky retenci omezený. Naproti tomu nezadržené hydrofilní molekuly se během 3 min posunuly jako jedna skvrna do horní části vrstvy. Po vysušení byly tyto složky směsi rozděleny ve druhé dimenzi v módu HILIC s použitím roztoku NaCl ve vodném methanolu. Obr. 9 ukazuje konečný výsledek.

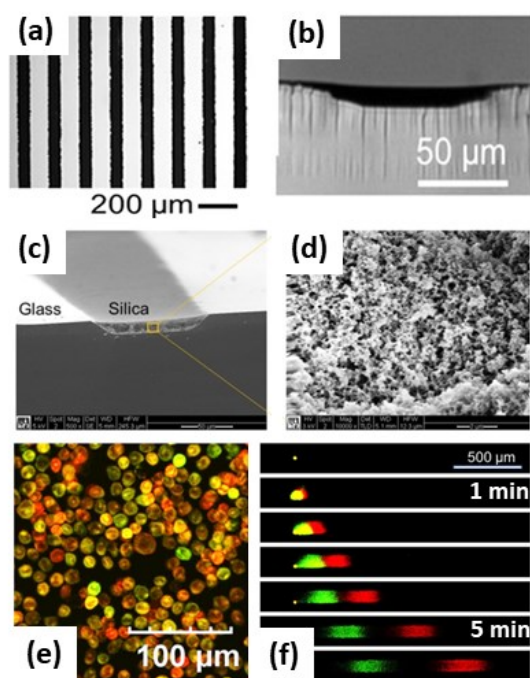
5. Nové trendy v monolitické TLC

Předcházející texty se soustředily na popis TLC vrstev, které, ač nové, byly formátem podobné jejich klasickým předchůdcům. Tedy relativně velká plocha porézního materiálu, z níž je pro účely separace použita jenom menší část, neboť jednotlivé dráhy jsou od sebe odděleny oblastmi nepoužitými. Jakkoliv se tento přístup osvědčuje již po dobu téměř 100 let, nelze se divit, že se, pravda ještě zřídka, objevují nové, odlišné formáty a výrobní postupy. Mezi ně např. patří miniaturizace a použití nevšedních prostředků k přípravě TLC vrstev³⁷.

5.1. Monolitické mikropásy

Známým problémem „klasické“ TLC je potřeba aplikovat relativně velké množství vzorku nutné k ať již optické, či hmotově spektrometrické detekci skvrn. Rovněž laterální difuze představuje obtíž. Zavedení ultratenkovrstvé chromatografie UTLC (cit.³) blíže popsané v předchozím referátu¹ sice snížilo vzorkovou náročnost typické TLC, nicméně ani tato metoda neumožňovala analýzu extrémně miniaturních vzorků, jako je např. obsah jedné buňky, která má objem zhruba 1 pl. Bylo proto nutné vyvinout novou platformu. Tohoto úkolu se nedávno ujala Nancy Allbritton se svou skupinou pracující na univerzitě v Seattlu³⁸ a vyrobili mikročip pro pikolitrovou tenkovrstvou chromatografii (pTLC), který se skládá ze soustavy mikrokanálek vyleptaných běžnou metodou ve skleněné podložce a zaplněných porézním monolitickým pásem oxidu křemičitého (siliky) navrženým tak, aby mohl fungovat s nepatrnými objemy vzorků. Výhodou mikrokanálového uspořádání je i omezení nežádoucí laterální difuze.

Jak ukazuje obr. 10, samotné kanálky měly šířku 60 až 80 μm a hloubku 13 μm řádově srovnatelnou s velikostí



Obr. 10. Mikroskopické snímky čipu pro pTLC při pohledu shora při malém (a) a velkém (b) zvětšení, boční pohled (c), SEM snímek porézní struktury silikového monolitu (d), fotografie U-937 buněk obsahujících lipidy značené červeně 3,3-dioktadecyloxa-karbokyaninem a zeleně 1,1'-dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodikarbokyaninem (e) a časový průběh jejich separace při použití 1-pentanolu jako mobilní fáze (f) (upraveno z cit.³⁸)

jednotlivých buněk. Před přípravou monolitického separačního média byl celý čip uzavřen poly(dimethylsiloxanovým) (PDMS) krytem. Silikové monolity v kanálcích byly připraveny běžnou sol-gel technologií z prekurzorové směsi sestávající z tetramethyl-orthosilikátu, poly(ethylenglykolu), močoviny a vodného roztoku octové kyseliny, který byl vakuově nasát do kanálků. Po vzniku a zrání gelu byl PDMS kryt odstraněn a monolity kalcinovány při vysoké teplotě na hotovou pTLC fázi.

Vzhledem k malým objemům vzorků, se kterými bylo manipulováno, bylo jejich dávkování prováděno komerčním piezoelektrickým tiskovým vstřikovačem s průměrem trysky pouhých několik desítek mikrometrů. Čip byl umístěn na desce obráceného mikroskopu, aby bylo možné odspoda pozorovat dělení fluorescenčně značených látek ukázané na obr. 10f. Na počátek monolitické fáze byly naneseny velmi malé objemy desítek pikolitřů roztoků modelových sloučenin, ty byly poté separovány a detegovány fluorescencí pomocí standardních mikroskopických metod v atomolárním množství. Separační charakteristiky a migrace analytu závisely na velikosti makropórů, která byla nastavitelná změnou obsahu porogenu poly(ethylenglykolu) použitého ve směsi během sol-gel procesu³⁹. Monolit s menšími póry o velikosti 0,3 μm umožňoval rychlejší a účinnější separace ve srovnání se svým protějškem s 2 μm velkými póry.

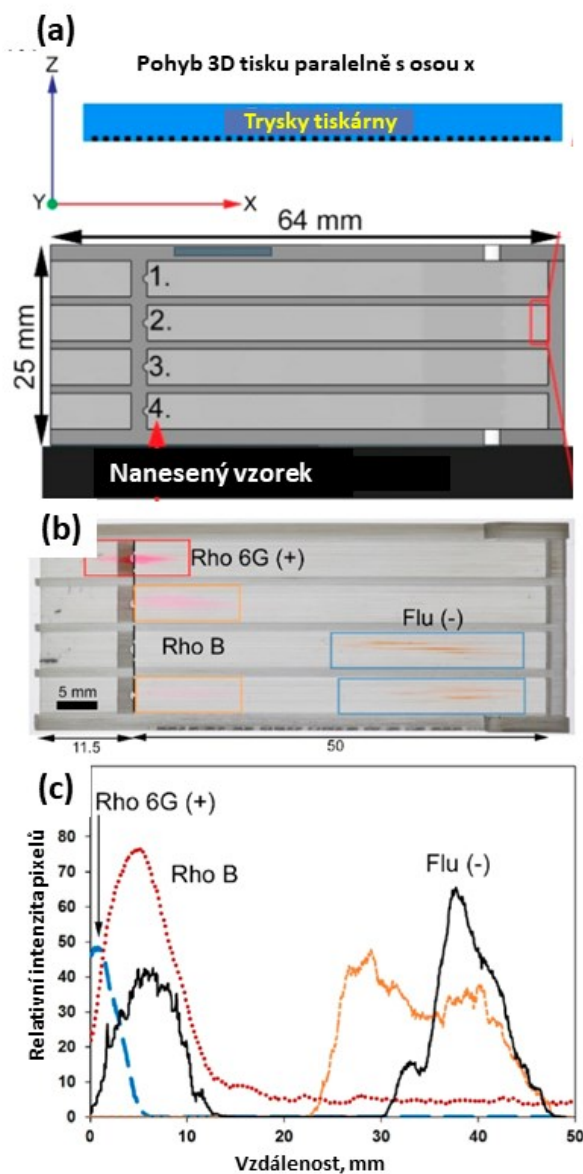
Obr. 10 také ukazuje buňky, v nichž byly lipidy označeny dvěma různými barvami. Heterogenita zbarvení byla způsobena rozdílnou rychlostí difuze barviv do jednotlivých buněk, kde reagovaly. Na každý monolitický mikropás byla vstříknuta jedna buňka obsahující lipidy obou barev. Značené lipidy z nich pak byly extrahovány a separovány v 1-pentanolu v módu normální fáze. Migrace červeně značených lipidů byla rychlejší díky vyšší polaritě značky. Po pouhých 6 minutách separace bylo dosaženo perfektního rozlišení při migrační vzdálenosti méně než 10 mm s pozoruhodnou účinností 13 000 teoretických pater/m.

Uvedené výsledky ukázaly potenciál pTLC pro aplikace v mnoha oblastech, kde jsou k dispozici pouze nepatrné vzorky a potřeba vysoce účinné paralelní analýzy. Ve srovnání s jinými analytickými technikami používanými pro jednotlivé buňky, jako jsou kapilární a mikrofluidní elektroforéza, je předností pTLC techniky její jednoduchá obsluha a snadnost paralelizace, což jí činí vhodnou pro analýzu velkého počtu jednotlivých buněk na stejném čipu. Jednoduchým odpařením rozpouštědla se separace ukončí a jednotlivé skvrny se mohou kdykoliv detegovat. Autoři zdůraznili i možnost použití jejich metody v oblastech, jako je diagnostika nemocí, analýza heterogenity buněk, monitorování reakcí v kapkách a detekce miniaturních vzorků ze životního prostředí, potravin, jakož i vzorků forenzních a farmaceutických.

5.2. Třídímní mikrotisk

Třídímní (3-D) tisk, neboli aditivní výroba, se pozvolna prosazuje i v separačních metodách, jak doka-

zuji zajímavé práce, jejichž počátek se datuje do roku 2014 (cit.⁴⁰). Bližší informace lze nalézt v nedávno publikovaných referátech^{41–43}. Není proto divu, že 3-D tisk pronikl i do oblasti TLC. Brett Paull se svou skupinou v Tasmánii prokázal, že 3-D tisk nabízí možnost přímé přípravy planárního substrátu v relativně krátkém čase a při nízkých nákladech, který byl vhodný pro separace



Obr. 11. Návrh 3D tištěného TLC čipu se čtyřmi 64 mm dlouhými porézními separačními vrstvami a místy určenými pro aplikaci vzorků. Vrstvy byly vytvořeny řízením flouštky destiček (a). Fotografie zobrazující čip se separovanými fluorescenčními barvami rhodamin 6G (Rho 6G), rhodamin B (Rho B) a fluorescein (Flu) (b). Chromatogram vygenerovaný ze snímku v přechodí části (c) (upraveno z cit.⁴⁴). Separační podmínky: vzorek 0,5 μl , mobilní fáze 0,2 M NaOH

bez nutnosti dalších úprav. Proces lze snadno přizpůsobit k výrobě vrstev různých tlouštěk, délek i šířek⁴⁴.

Pro tisk použili komerční směs Veroclear, která podle výrobce Materialise obsahuje řadu patentovaných složek, jako jsou akrylový monomer, akrylový oligomer, fotoiniciátor, ester akrylové kyseliny a další. Aby získali lepší přehled o složení této směsi, analyzovali ji pomocí plynové chromatografie, jakož i infračervené a Ramanovy spektroskopie. Jednotlivé komponenty charakterizovali jako fotoiniciátor Irgacure 184, monomery isobornyl-akrylát a 4-akryloylmorfolín, síťovadla glycerolpropoxylát-triakrylát a tricyklohexan-dimethanoldiakrylát, a cyklický keton cyklohexanon. Samotný polymer vzniklý UV iniciovanou fotopolymerizací byl mírně hydrofilní s kontaktním úhlem pro vodu 62,1°.

Jak ukazuje obr. 11, tisk byl prováděn nanášením polymerizační směsi lineárně uspořádanými tryskami ve vrstvičkách tenkých pouhých 16 µm, které byly průběžně fotopolymerizovány. Celková tloušťka hotové transparentní polymerní sestavy byla pak 200 µm. Mezi vrstvičkami zůstávaly mezery tvořící separační kanály. Vedlejším, leč žádoucím produktem tisku, byla tvorba mřížek vytvářejících propojenou síť napříč v meziprostorech mezi jednotlivými tištěnými vrstvičkami, která vedla ke vzniku průtočných pórů, ne nepodobných porézním monolitickým stacionárním fázím. Ty pak poskytly větší povrch s potenciálem pro interakci separovaných látek.

K důkazu aplikovatelnosti vytištěného zařízení autoři použili nejprve separaci tří fluorescenčních barviv rhodaminu 6G, rhodaminu B a fluoresceinu lišících se v alkalické mobilní fázi nábojem od pozitivního přes neutrální až k negativnímu (obr. 11). Zatímco první z těchto látek zůstala při vyvolávání v místě aplikace směsného vzorku, druhá vykázala R_f 0,07 a třetí 0,59. Separace větších molekul pak byla demonstrována rozdělením fluorescenčně značených bílkovin lysozymu a myoglobinu v 10 mM NaOH k němuž došlo na základě jejich pI (6,8 a 11,35). První z nich se za těchto podmínek sotva pohnula od startu s R_f 0,03, zatímco myoglobin byl zadržen mnohem méně, což se projevilo na R_f 0,71. Za povšimnutí stojí reprodukovatelnost separací v jednotlivých dráhách charakterizovaná relativní standardní odchylkou (RSD) pro použité proteiny s hodnotami 15 a 9,1 %.

Je jasné, že zbývá ještě dostatek prostoru pro další zlepšení. Nicméně, již první výsledky dosažené v tomto výzkumu jsou pozitivním příslibem na nedávno vzniklém poli 3D tisku separačních médií.

6. Závěry

Předešlé řádky shrnuly přípravu a použití monolitických vrstev v pokročilých planárních separačních technologiích. Jakkoliv TLC zůstává do značné míry na okraji zájmu o analytické separační metody, její, byť i pomalý, vývoj pokračuje i nadále. Nelze totiž přehlédnout, že separaci v TLC se často docílí při aplikaci velice jednoduchých a snadno dostupných prostředků, aniž by bylo vyžadováno

použití nákladných sofistikovaných přístrojů. Monolitické vrstvy pro TLC s neobvyklými vlastnostmi zahrnujícími např. vrstvy s vlastnostmi umožňujícími přímou desorpci a ionizaci či se zabudovanou MALDI maticí představují novou kvalitu. Podobně, specificky chemicky upravené vrstvy připravované s využitím metod polymerní chemie zjednodušují separace ve dvou dimenzích. V poslední době se však objevily zcela nové přístupy k separačním vrstvám, a to jak jejich formováním v mikrofluidních čípech nebo výrobou s použitím 3-D tisku. I když tento referát popsal řadu zajímavých přístupů a aplikací monolitických vrstev, další, jako je planární elektrochromatografie^{45,46} či vrstvy modifikované nanočásticemi⁴⁷, se do něj nevešly a bude o nich muset být pojednáno jinde.

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

LITERATURA

1. Švec F.: Chem. Listy 117, 308 (2023).
2. Hauck H. E., Schulz M.: Chromatographia 57, S/313 (2003).
3. Hauck H. E., Bund O., Fischer W., Schulz M.: J. Planar Chromatogr. Mod. TLC 14, 234 (2001).
4. Bezuidenhout L. W., Brett M. J.: J. Chromatogr. A 1183, 179 (2008).
5. Orinak A., Arlinghaus H. F., Vering G., Orinakova R., Hellweg S.: J. Chromatogr. A 1084, 113 (2005).
6. Salo P. K., Vilmunen S., Salomies H., Ketola R. A., Kostianen R.: Anal. Chem. 79, 2101 (2007).
7. Salo P. K., Salomies H., Harju K., Ketola R. A., Koti-aho T., Yli-Kauhaluoma J., Kostianen R.: J. Amer. Soc. Mass Spectrom. 16, 906 (2005).
8. Wang Y., Olesik S. V.: Anal. Chim. Acta 970, 82 (2017).
9. Fang X., Olesik S. V.: Anal. Chim. Acta 830, 1 (2014).
10. Lu T., Olesik S. V.: J. Chromatogr. B 912, 98 (2013).
11. Beilke M. C., Zewe J. W., Clark J. E., Olesik S. V.: Anal. Chim. Acta 761, 201 (2013).
12. Lu T., Olesik S. V.: Anal. Chem. 85, 4384 (2013).
13. Clark J. E., Olesik S. V.: J. Chromatogr. A 1217, 4655 (2010).
14. Clark J. E., Olesik S. V.: Anal. Chem. 81, 4121 (2009).
15. Bakry R., Stoggl W. M., Hochleitner E. O., Stecher G., Huck C. W., Bonn G. K.: J. Chromatogr. A 1132, 183 (2006).
16. Korzhikova-Vlakh E. G., Antipchik M., Tennikova T.: Polymers 13, 1059 (2021).
17. Peterson D. S., Hilder E. F., Luo Q., Švec F., Fréchet J. M. J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 18, 1504 (2004).
18. Huisgen R., Szeimies G., Munchen L.: Chem. Ber. 100, 2494 (1967).
19. Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: Angew.

- Chem., Int. Ed. 40, 2004 (2001).
20. Chu C., Liu R.: Chem. Soc. Rev. 40, 2177 (2011).
 21. Veigl E., Boehs B., Mandl A., Krametter D., Lindner W.: J. Chromatogr. A 694, 151 (1995).
 22. Krawinkler K. H., Maier N. M., Ungaro R., Sansone F., Casnati A., Lindner W.: Chirality 15, S17 (2003).
 23. Shen A., Guo Z., Yu L., Cao L., Liang X.: Chem. Commun. 47, 4550 (2011).
 24. Xu Y., Cao Q., Švec F., Fréchet J. M. J.: Anal. Chem. 82, 3352 (2010).
 25. Lv Y., Maya A., Fréchet J. M. J., Švec F.: J. Chromatogr. A 1261, 121 (2012).
 26. Lv Y., Lin Z., Švec F.: Analyst 137, 4114 (2012).
 27. Rohr T., Hilder E. F., Donovan J. J., Švec F., Fréchet J. M. J.: Macromolecules 36, 1677 (2003).
 28. Poole C. F., Poole S. K.: J. Chromatogr. A 1218, 2648 (1995).
 29. Takats Z., Wiseman J. M., Cooks R. G.: J. Mass Spectrom. 40, 1261 (2005).
 30. Kertesz V., Van Berkel G. J.: Anal. Chem. 80, 1027 (2008).
 31. Van Berkel G. J., Ford M. J., Deibel M. A.: Anal. Chem. 77, 1207 (2005).
 32. Han Y., Levkin P. A., Abarientos I., Liu H., Švec F., Fréchet J. M. J.: Anal. Chem. 82, 2520 (2010).
 33. Levkin P. A., Švec F., Fréchet J. M. J.: Adv. Funct. Mater. 19, 1993 (2009).
 34. Švec F.: Chem. Listy. 114, 718 (2020).
 35. Urbanová I., Švec F.: J. Sep. Sci. 34, 2345 (2011).
 36. Zheng B., Liu Y., Li D., Chai Y., Lu F., Xu J.: J. Sep. Sci. 38, 2737 (2015).
 37. Morlock G. E.: J. Chromatogr. A 1382, 87 (2015).
 38. Wang Y., Yao M., Sims C. E., Allbritton N. L.: Anal. Chem. 94, 13489 (2022).
 39. Hara T., Desmet G., Baron G. V., Minakuchi H., Eel-tink S.: J. Chromatogr. A 1442, 42 (2016).
 40. Fee C., Nawada S., Dimartino S.: J. Chromatogr. A 1333, 18 (2014).
 41. Kalsoom U., Nesterenko P. N., Paull B.: TrAC, Trends Anal. Chem. 105, 492 (2018).
 42. Belka M., Bączek T.: TrAC, Trends Anal. Chem. 142, 116322 (2021).
 43. Wang L., Pumera M.: TrAC, Trends Anal. Chem. 135, 116151 (2021).
 44. Macdonald N. P., Curriuan S. A., Tedone L., Paull B.: Anal. Chem. 89, 2457 (2017).
 45. Wang P., Tao D., Zhang L., Liang Z., Zhang Y.: J. Sep. Sci. 32, 2629 (2009).
 46. Woodward S. D., Urbanová I., Nurok D., Švec F.: Anal. Chem. 82, 3445 (2010).
 47. Cao Y., Lv M., Xu H., Švec F., Tan T., Lv Y.: Anal. Chim. Acta 896, 111 (2015).

F. Švec (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*): **Neglected Applications of Monolithic Structures: Advanced Thin Layer Chromatography-Mass Spectrometry Approaches**

Thin-layer or planar chromatography (TLC) continues to evolve, albeit at a slower pace than its more powerful counterparts, liquid and gas chromatography. This is easy to understand as TLC has always been a very simple alternative to these methods without the need for complex instrumentation. This does not mean, however, that TLC cannot be combined with sophisticated detection methods such as mass spectrometry or performed in multiple dimensions. To make TLC more widely applicable, its separation potential is constantly being improved. Therefore, layers with new chemical compositions and innovative processes are being developed leading to layers that enable applications not yet described. This review describes the use of monolithic layers formed from porous organic polymers developed for use in mass spectrometry with laser desorption and ionization without the participation of a low molecular weight matrix or for the preparation of layers with unconventional formats for separations in two dimensions. Attention is also given to so far unusual approaches where TLC is realized in microfluidic environments.

Keywords: thin layer chromatography, planar 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.