

MOJE SRDEČNÍ ZÁLEŽITOST: MONOLITY

Článek je věnován 100. výročí založení Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

FRANTIŠEK ŠVEC

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

Došlo 24.7.20, přijato 24.8.20.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: chromatografie, elektrochromatografie, GC, katalýza, monolit, nosiče, příprava vzorků, TLC

Obsah

1. Úvod
2. Chromatografie
 - 2.1. Kapalinová chromatografie
 - 2.2. Kapilární elektrochromatografie
 - 2.3. Plynová chromatografie
 - 2.4. Tenkovrstvá chromatografie
 - 2.5. Mikrofluidika
3. Příprava vzorků
4. Imobilizované enzymy
5. Monolity obsahující metalo-organické stavební prvky
6. Méně známé aplikace
7. Závěry

1. Úvod

Tento článek představuje moje vyznání k materiálům, jimiž jsem se zabýval značnou část svého života. Nemá to být klasické review, ale spíše krátký popis, kam až se tato problematika za posledních 30 let dostala. Jednotlivé sekce jsou ilustrovány příklady, které předvádějí spíše zajímavé méně známé výsledky, než aby prezentovaly ty ucelené, leč možná méně atraktivní. Proto také používám většinou odkazy na naše vlastní práce, které znám nejlépe.

Nejprve by asi bylo vhodné uvést definici monolitu. Oficiální definice pocházející např. z IUPAC dosud vytvořena nebyla. Žel, obvyklá cesta přes Google není rovněž příliš schůdná, protože heslo „Monolith“ vrátí téměř 27 milionů odkazů, leč většina z nich se týká skalních útvarů a podobných jevů. Tudy, jak praví klasik, cesta nevede. Pokusme se tedy vytvořit si definici vlastní. Ta by mohla například znít takto: „Monolit je pevná látka ve formě jednoho kusu porézního anorganického materiálu nebo organického polymeru, nejčastěji připravená chemi-

kou reakcí, jako je polykondenzace, polymerizace, či „click“ reakce uvnitř vhodného kontejneru nebo na povrchu nosiče“.

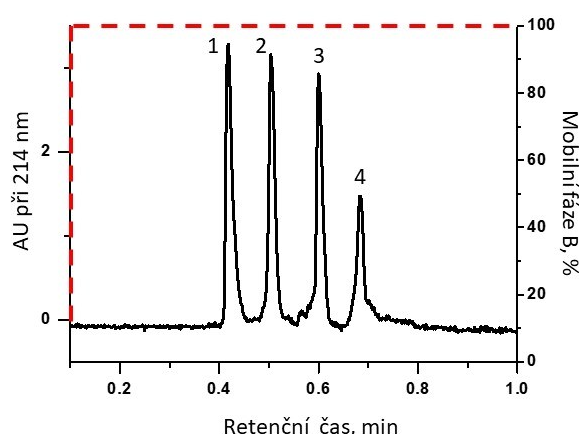
Monolity, tak jak je známe dnes, se zrodily na konci osmdesátých let minulého století. Pravda, i předtím lze v literatuře vysledovat jisté náznaky odkazující k materiálům, které bychom mohli podle soudobých měřítek nazvat monolity. Leč žádný z těchto produktů, ať již teoreticky předpokládaných nebo experimentálně připravených, nevykazoval takové vlastnosti, které by umožnily úspěšné použití třeba v separačních technikách¹. Takže na jejich soudobou inkarnaci se muselo čekat dlouhou řadu let. To jsem v Chemických listech uvedl již ve své předchozí stati². Tenkrát jsem se soustředil na jejich původ v Praze, popsal jejich chemickou různorodost i přípravu a věnoval se též aplikacím v kolonové chromatografii.

Dívám-li se na vývoj jenom od počátku tohoto století, monolity se staly předmětem mnoha stovek původních prací, desítek přehledných referátů včetně četných publikovaných českými autory^{1,3–23} a tří knih^{24–26}. Během této doby se rovněž významně rozšířilo spektrum aplikací od původní kapalinové chromatografie a elektrochromatografie až k chromatografii plynové a tenkovrstvé, k extrakci pevnou fází, mikrofluidice, heterogenní katalýze, bioreaktorům, nosičům v kombinatoriální chemii, senzorům či Ramanově spektroskopii. Polymerní chemii ve vztahu k monolitům jsem popsal do jisté míry již minule. Proto se v následujících řádcích spíše soustředím na některé názorné příklady jejich použití.

2. Chromatografie

2.1. Kapalinová chromatografie

Tato aplikace všechno začala. Úvodní práce se věnovala separaci bílkovin s použitím monolitických disků vyvinutých Tatianou Tennikovou²⁷. Tato technologie se ukázala úspěšnou i komerčně, neboť firma BIA, tehdy sídlící v Ljubljani, začala záhy licenčně vyrábět monolity v diskovém formátu. Nicméně, prudký rozvoj výzkumu po celém světě se dostavil až po zveřejnění první publikace popisující přípravu monolitických kolon, tedy formátu, který chromatografisté znali a používali²⁸. Ty umožnily použití standardních chromatografických systémů a velmi rychlé separace velkých molekul. Počáteční práce popisovaly monolitické kolony s poměrně velkým průměrem 8 mm, v nichž rychlé separace vyžadovaly značně vysoké průtoky mobilní fáze v řádu desítek ml za minutu. Zmenšení průměru na tehdy běžných 4,6 mm umožnilo snížení průtokových rychlostí, aniž by došlo ke zhoršení rychlosti a kvality separaci²⁹. Zlomovým byl rok 2004, kdy jsme použili monolitickou kolonu umístěnou v kapiláře o prů-



Obr. 1. Rychlá separace ribonukleázy A (1), cytochromu c (2), myoglobinu (3) a ovalbuminu (4) v monolitické koloně s použitím jednostupňového gradientu v módu s obrácenými fázemi³⁰. Podmínky: poly(styren-*co*-divinylbenzenový) monolit v kapilární koloně 100 × 0,2 mm (vnitřní průměr); mobilní fáze A 10 % acetonitrilu v 0,1% roztoku kyseliny trifluoroctové ve vodě; mobilní fáze B 90 % acetonitrilu v 0,1% roztoku kyseliny trifluoroctové ve vodě; gradientový profil ze 100 % mobilní fáze A do 100 % mobilní fáze B za 6 s je znázorněn čárkovanou čarou; průtoková rychlost 100 $\mu\text{l min}^{-1}$

měru 200 μm připravenou s použitím fotopolymerizace³⁰. Separace bílkovin se pak uskutečnila při průtoku pouhých 100 $\mu\text{l min}^{-1}$. Tento projekt byl zajímavý i tím, že jsme použili jednostupňový gradient. V praxi to znamenalo, že po nástřiku vzorku směsi bílkovin do počáteční mobilní fáze se prakticky okamžitě skokově zvýšil podíl silného rozpouštědla a pak proběhla blesková separace, kterou ukazuje obr. 1. Přes závistivé útoky ze strany výrobců kolon plněných částicemi bylo dokázáno experimentálně, že kapilární kolony s velmi dlouhou životností lze vyrábět reprodukovatelně³¹.

Zajímavé je si uvědomit, proč bylo potřeba více než 10 let k přechodu z velikostí tzv. analytických kolon k jejich kapilárním protějškům. Předně, v devadesátých letech nebyla snadno dostupná chromatografická přístrojová základna umožňující použití průtoků v rozsahu mikro- a nanolitřů za minutu, produkující spolehlivé gradienty mobilní fáze. Proto se také technologie vedoucí ke kapilárním HPLC kolonám nevyvíjely. Změna se udála díky prudkému nárůstu zájmu chromatografické komunity o kapilární elektrochromatografii (*vide infra*), v níž použití kapilárních kolon bylo absolutní podmínkou.

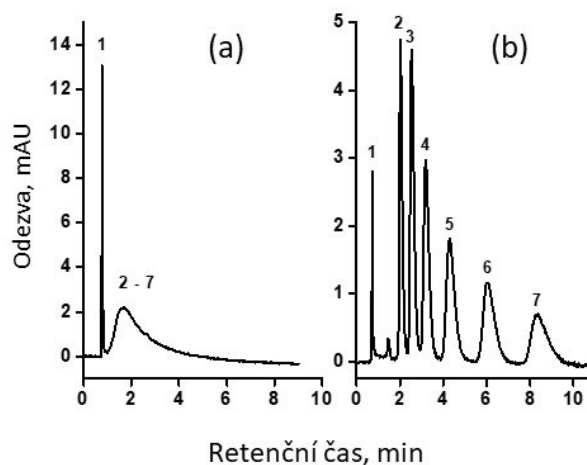
Jak vyplývá z předešlých řádků, monolitické kolony připravované z organických polymerů se s úspěchem používají k vysoce účinným separacím velkých molekul, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny, či rozpustné organické polymery. Ukázalo se totiž, že původní monolitické kolony nebyly vhodné pro separace malých molekul v isokratickém módu³². To sice nebylo na závadu, protože silikové monolitické kolony zprvu vyvíjené v Japonsku³³ to uměly, ale ty zase nebyly vhodné pro separace velkých

molekul. Nicméně, zmíněná neschopnost separovat malé molekuly se ukázala jako výzva. Celá řada výzkumných skupin proto vyvíjela postupy umožňující významně zvýšit účinnost monolitických kolon pro separace malých molekul¹⁴. Jeden příklad: Jiří Urban použil dlouhou dobu známý postup hypersítování vyvinutý kolem roku 1970 Vadimem Davankovem v Moskvě s cílem zvýšení měrného povrchu polymerních částic. Ukázalo se, že tento postup je vhodný i pro modifikaci monolitů připravených ze styrenových monomerů, a to vedlo k významnému nárůstu objemu menších pórů³⁴. Jak dokazuje obr. 2, tato v podstatě jednoduchá chemická modifikace monolitu umožnila mnohonásobně zvýšit účinnost kolony a poskytla dobrou separaci alkylbenzenů.

Kvalitativní změnu do oblasti monolitických separačních materiálů pro chromatografii vnesla již výše zmíněná firma BIA Separations³⁵. Na rozdíl od tradičních kolon obsahujících roubíky monolitické stacionární fáze operovaný v podélném směru, tato firma vyvinula monolity ve formě trubky, v níž průtok mobilní fáze byl ve směru radiálním, tedy od stěn do středu. Tento formát umožnil sériovou výrobu separačních jednotek o velikosti až 40 litrů a jejich použití ve velkoobjemových separacích v biotechnologickém průmyslu.

2.2. Kapilární elektrochromatografie

Jakkoliv se tato separační metoda dnes považuje za „klinicky mrtvou“, pořád se objevují publikace, v nichž je zmiňována. Ačkoliv byla známa od roku 1974, k životu se probudila až zhruba o 20 let později. Co bylo na kapilární elektrochromatografii (CEC) tak lákavé? Nejspíš příslib, že bude možné realizovat separace chromatografického



Obr. 2. Separace uracilu a alkylbenzenů s použitím poly(styren-*co*-4-vinylbenzyl chlorid-*co*-divinylbenzenové) kolony s vnitřním průměrem 100 μm (a) a téže kolony po hypersítování (b)³⁴. Podmínky: mobilní fáze 80 % acetonitrilu ve vodě; UV detekce při 254 nm, průtok 1,5 $\mu\text{l min}^{-1}$; (A) délka kolony 201 mm, tlaková ztráta 17,0 MPa; (B) délka kolony 170 mm, tlaková ztráta 16,4 MPa. Píky: uracil (1), benzen (2), toluen (3), ethylbenzen (4), propylbenzen (5), butylbenzen (6) a amylbenzen (7)

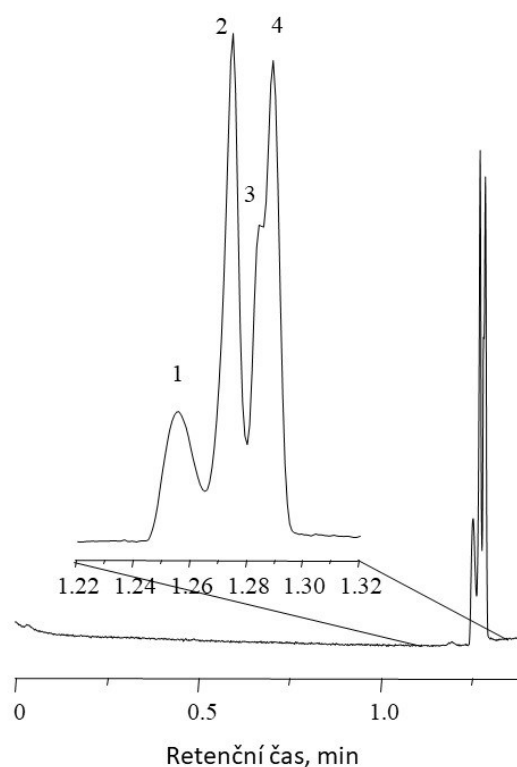
typu v kapilárních kolonách, v nichž pohyb mobilní fáze je vytvářen elektroosmotickým tokem generovaným přiloženým napětím namísto mechanickou pumpou. Od poloviny devadesátých let se do výzkumu CEC pustila po celém světě řada výzkumných skupin vedených věhlasnými chromatografisty. Různé technologie vedoucí k CEC kolonám se publikovaly ve špičkových časopisech. Separace dokládající účinnosti ve stotisících teoretických pater nebyly výjimkou, neboť na rozdíl od parabolického profilu toku v koloně, kde tok je vyvoláván mechanickou pumpou, profil vytvářený elektroosmoticky byl plochý a rozmývání píků tedy značně omezeno. Netřeba zdůrazňovat, že monolitické kolony hrály v této oblasti prim, protože jejich příprava byla velice snadná a jejich separační schopnost vynikající³⁶. Obr. 3 okazuje jednu takovou separaci. Emily Hilder roubováním monolitu poly(*N,N*-dimethyl-*N*-(2-methakryloyloxyethyl)-*N*-(3-sulfopropyl)-amonium) betainem připravila monolitickou kolonu produkující reprodukovatelně více jak milion teoretických pater při separaci bílkovin³⁷. I když podobné parametry separace mohly hrát důležitou roli v té době právě se rozvíjející proteomice, k žádnému uplatnění nedošlo.

Zvláštní a málo známou implementací této metody je tlaková planární CEC. Je to vlastně aplikace tenké vrstvy, v našem případě monolitické, o níž bude pojednáno později, jako separačního media namísto plněné kapiláry. Použití elektroosmotického toku v monolitické vrstvě poly(butylmethakrylát-*co*-ethylendimethakrylátu) s naroubovanou směsí monomerů 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonovou kyselinou a 2-hydroxyethyl-methakrylátu umožnilo separovat bílkoviny za méně než 1 min (cit.³⁸).

CEC se rovněž zdála být metodou volby pro separace v mikrofluidních čípech vzhledem k možnosti pohybu mobilní fáze bez použití čerpadla. Řada prací se soustředila na tuto aplikaci a prokázala vcelku dobré vlastnosti³⁹. Nicméně, ani tento typ separací nenalezl širší uplatnění v praxi.

Co tedy vedlo po zhruba deseti letech k téměř úplnému opuštění této oblasti? Především nejspíš skutečnost, že se nepodařilo nalézt aplikaci, která by byla unikátní pro CEC, a tudíž by znamenala dobrý „business“ pro průmysl vyrábějící vhodné přístroje. Nebyl-li k dispozici instrument vyvinutý specificky pro CEC, používaly se náhradní, avšak komerčně dostupné systémy určené typicky pro kapilární elektroforézu. Rovněž potřeba, aby stacionární fáze plnila současně dvě úlohy, tedy podporovala chromatografickou separaci a paralelně také generovala elektroosmotický tok, byla nad její schopnosti a mnohdy vedla k obtížím s reprodukovatelností jak samotných kolon, tak i separací. Ačkoliv se CEC zdá být v podstatě mrtvou, pořád jsou ve světě skupiny, které ji nechtějí pochovat a pokračují v její aplikaci⁴⁰. Tyto studie však už nepřinášejí nic nového. Nicméně nelze zcela vyloučit, že někdy v budoucnu CEC obrazně povstane z popela jako bájný Fénix podobně jako se stalo i s některými jinými analytickými metodami např. superkritickou fluidní chromatografií či kapilární elektroforézou.

Jeden kladný bod však nelze CEC upřít už dnes. Díky ní se vzdmul zájem o kapilární kolony, které umožňují

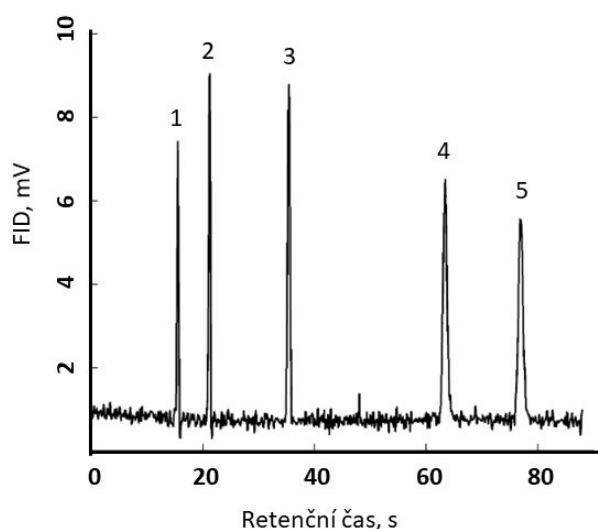


Obr. 3. Použití monolitické kapilární kolony s naroubovanou vrstvou *N,N*-dimethyl-*N*-(2-methakryloyloxyethyl)-*N*-(3-sulfopropyl)ammonium betainu pro separaci bílkovin s použitím CEC³⁷. Podmínky: kapilára 50 μm (vnitřní průměr), celková délka 34,5 cm, délka monolitu 8,5 cm; mobilní fáze 5 mmol l^{-1} fosfátový pufr (pH 7,0) 20 %/acetonitril 80 %; použité napětí -15 kV ; teplota 60 $^{\circ}\text{C}$. Píky: cytochrom c (1), holotransferrin (2), ribonukleasa a (3), myoglobin (4)

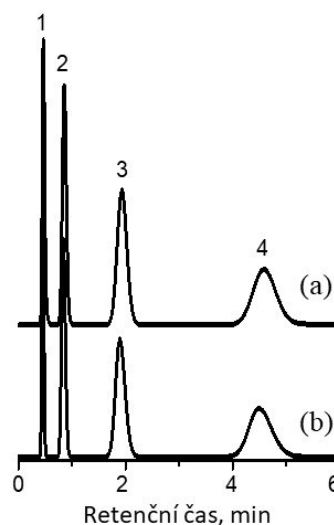
separace velmi malých vzorků, jako jsou ty pocházející např. z proteomického výzkumu, a výrobci se pustili do vývoje a produkce HPLC systémů dovolující průtoky v nl min^{-1} , při nichž mohou být kapiláry používány.

2.3. Plynová chromatografie

I tato separační metoda měla prospěch z elektrochromatografie. První práce popisující plynovou chromatografii (GC) s použitím monolitické kapilární kolony byla opublikována v roce 2000 Davidem Sýkorou⁴¹. Inspirován předchozím výzkumem sorbentů pro přípravu vzorků⁴² (*vide infra*) použil polydivinylbenzenový monolit charakterizovaný velkým měrným povrchem důležitým pro adsorpci separovaných látek. Překvapivě zjistil, že tento polymer dobře odolával teplotám do 380 $^{\circ}\text{C}$, což ho kvalifikovalo pro separace v typických teplotních režimech této metody. Jeho separační schopnost předvedl na separaci směsi 11 organických rozpouštědel za 10 minut v koloně dlouhé pouhých 50 cm. Kolona sama by jistě umožnila dosáhnout daleko rychlejší separace, leč plynový chromatograf, který byl v té době k dispozici, neumožňoval použi-



Obr. 4. Rychlá isothermální plynově chromatografická separace lehkých uhlovodíků s použitím monolitické polydivinylbenzenové kolony⁴³. Podmínky: kolona 50 cm × 320 μm (vnitřní průměr); teplota 80 °C; vstupní tlak 5,5 MPa. Píky: methan (1), ethan (2), propan (3), 2-methylpropan (4), butan (5)



Obr. 5. Plynově chromatografická separace prosté směsi alkoholů (a) a jejich 10% roztoku ve vodě (b) s použitím monolitické polydivinylbenzenové kolony⁴¹. Podmínky: kolona 50 cm × 320 μm (vnitřní průměr); teplotní gradient 120–300 °C při 20 °C/min; vstupní tlak 0,55 MPa. Píky: methanol (1), ethanol (2), 1-propanol (3), 1-butanol (4)

tí tlaku převyšujícího hodnotu 0,55 MPa. Jak ukazuje obr. 4, skutečný potenciál těchto kolon předvedl Alexander Kurganov, když použil doma vyrobený přístroj pracující s tlaky až 7 MPa (cit.⁴³). Jeho monolitická kolona dokázala separovat směs permanentních plynů za neobyčejně krátkou dobu.

Monolitická kolona prokázala ještě jednu pozitivní vlastnost. Zatímco voda ve vzorku nastříknutém do typické kapilární GC kolony s nanosenou poly(ethylen-glykolovou) fází je fatální pro její účinnost, použití takového vzorku nemá na separaci v monolitické koloně žádný vliv, jak dokládá obr. 5 (cit.⁴¹). Chromatogramy znázorňují jak separaci prosté směsi alkoholů, tak i jejich 10% roztoku jsou prakticky totožné.

Je zajímavé, že přes jisté výhody, jež monolitické kolony v GC poskytují, nenašly žádnou odezvu v pracích jiných vědeckých týmů kromě již zmíněného Kurganova⁵ a Janssena⁴⁴. Důvod lze patrně hledat v nutnosti pracovat při vyšších tlacích, na něž normální GC přístroje nejsou přizpůsobeny. Jistou možností by mohlo být použití přístrojové techniky vyvinuté pro chromatografii používající superkritické kapalnou fázi (SFC), které by však musely být schopny pracovat s kapilárními kolonami a v nichž by musel být zabudován vhodný detektor. I kdyby k tomu došlo, GC určená pro práci s vyššími tlaky nebude nejspíš běžnou součástí analytických laboratoří.

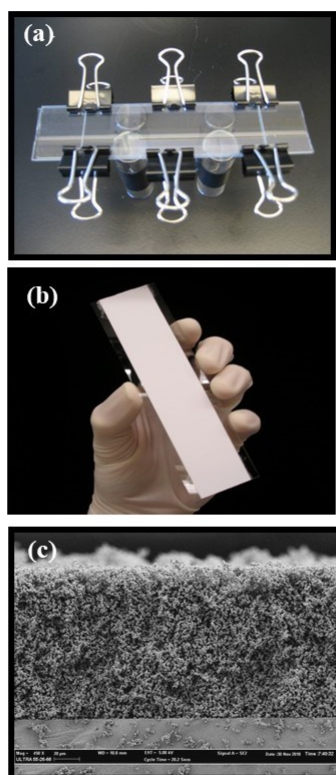
2.4. Tenkovrstvá chromatografie

Jestliže GC může být nazývána popelkou mezi aplikacemi separačních medií z organických monolitických po-

lymerů, pak použití monolitických vrstev v tenkovrstvé chromatografii (TLC) je superpopelkou a náš příklad následoval v jedné publikaci pouze Wouters a spol.⁴⁵. Přitom jsme naše výsledky publikovali v řadě prací a nedávno byl shrnut i v obsáhlém přehledném referátu¹⁹. Příprava monolitických tenkých vrstev na povrchu skleněné destičky je velice jednoduchá. Forma se složí ze dvou destiček, mezi nimiž je na podélných krajích položena teflonová páska, jejíž síla definuje tloušťku monolitické vrstvy. Celá forma byla v našem uspořádání držena pohromadě prostými kancelářskými sponkami (obr. 6). Polymerizační směs se do formy naplní působením kapilární síly a polymerizace se iniciuje UV zářením. Aby vrstva zůstala chemicky navázaná k povrchu skla, skleněná destička se funkcionalizuje 3-(trimethoxysilyl)propyl-methakrylátem. Po rozebrání formy se získá vrstva rovněž ukázaná na obr. 6.

Monolitické vrstvy mohou být použity okamžitě po přípravě ve standardním módu, nebo je možné provést jejich chemickou modifikaci a vytvořit vlastnosti tak říkajíc na míru. Příkladem budiž opět hypersíťování popsané výše. Taková vrstva může separovat malé molekuly, ale umožňuje rovněž separace molekul velkých, jako jsou bílkoviny, jež lze pak detegovat s použitím MALDI hmotnostní spektrometrie⁴⁶.

Zajímavé je, že tyto vrstvy připravené z nepolárních monomerů, jako je třeba butyl-methakrylát, mají strukturu, která jim propůjčuje superhydrofobní charakter⁴⁷, který lze s výhodou využít při formování vrstvy určené ke dvoudimenzionálním separacím v iontoměničovém a reverzně-fázovém mechanismu. Fotoiniciované roubování 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonové kyseliny přes



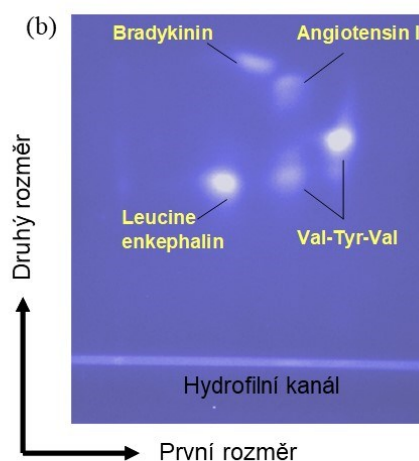
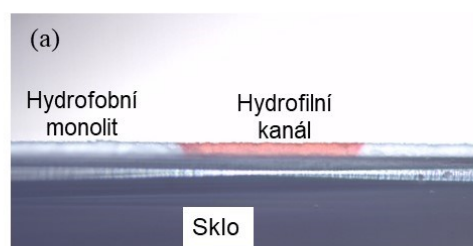
Obr. 6. Skleněná forma vhodná k přípravě monolitické tenké vrstvy (a), příklad polymerizované vrstvy nanesené na skle (b), SEM snímek vrstvy potvrzující její porézní strukturu (c)

masku vedlo ke tvorbě hydrofilního kanálku s iontovýměnnými skupinami v superhydrofobní poly (butyl-akrylát-*co*-ethylendimethakrylátové) vrstvě ukázané na obr. 7. Jak dokládá tento obrázek, série peptidů byla pak dokonale separovaná, což nebylo možné docílit ani v jedné samostatné dimenzi⁴⁸.

Dvoudimenzionalita bylo možné docílit rovněž foto-iniciovaným roubováním čtvercové desky v úhlopříčném směru. Iva Urbanová nejprve připravila poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylendimethakrylátovou) vrstvu, kterou hydrofilizovala roubováním poly(ethylenglykol-methakrylátu) iniciovaným UV zářením⁴⁹. Poté celou vrstvu smočila lauryl-methakrylátem a postupně ozařovala UV světlem tak, že použila masku taženou v úhlopříčném směru. To vedlo k vytvoření úhlopříčného gradientu hustoty hydrofobních skupin s jejich největším zastoupením na začátku, odkud byla maska tažena, a nejmenším na konci, kde ozařování trvalo nejkratší dobu. Dvoudimenzionalita separace bílkovin byla pak dosažena vyvíjením eluční fázi obsahující acetonitril ve směru osy *x* a po otočení o 90° ve směru osy *y* eluční fázi obsahující odlišnou proporci acetonitrilu.

Malý zájem o monolitické tenké vrstvy z organických polymerů nespíš pramení z několika důvodů: Předně, nejsou komerčně dostupné na trhu. Avšak to by nemusel být až tak důležitý aspekt, vezmeme-li do úvahy skuteč-

nost, že firma Merck KGaA měla v katalogu na počátku tohoto tisíciletí tenkovrstvé desky o velikosti 6 × 3,6 cm připravené z monolitické porézni siliky nanesené na skleněný podklad⁵⁰. I přes jejich produkci mocnou firmou se tyto materiály neuchytily a Merck je záhy přestal nabízet. Patrně důležitějším momentem je konzervativnost uživatelů TLC, kteří standardně používají klasické tenké vrstvy většinou připravované ze silikových částic spojených do vrstvy nejčastěji sádrou. S jejich použitím vznikly tisíce aplikačních publikací. Kdo by pak chtěl zkusit něco úplně jiného a ještě za podmínky, že si vrstvu musí vyrobit sám. A konečně přehlédnout nelze ani skutečnost, že, jak dosvědčuje omezený počet nových publikací na toto téma, TLC už zdaleka není metodou volby pro chromatografické separace, protože v účinnosti nemůže konkurovat modernějším metodám, jako je HPLC. Je to škoda, neboť TLC je technikou velice levnou bez nároků na nákladné přístrojové vybavení. A tak zůstává doménou syntetických organických chemiků, kteří s její pomocí běžně kontrolují průběhy reakcí.



Obr. 7. (a) Optický mikroskopický snímek řezu superhydrofobní monolitickou vrstvou se zabudovaným hydrofilním kanálkem opatřeným iontovýměnnými skupinami naplněným vodním roztokem červeného barviva, (b) separace fluoresceminem UV značených peptidů ve dvoudimenzionálním provedení kombinujícím iontovýměnnou separaci v první dimenzi a obrácenou fázi ve druhé dimenzi⁴⁸

2.5. Mikrofluidika

Mikrofluidní čipy jsou výsledkem nekončící snahy o miniaturizaci analytických systémů. Cílem je vyrábět zařízení o velikosti několika centimetrů čtverečních zvaných laboratoř-na-čipu, která umožňují integrovat série jednotkových procesů, jako je příprava vzorku, separace komponent, jejich modifikace a detekce do jediné jednotky s jednoduchou obsluhou. Po počátečních výzkumech datovaných do osmdesátých let minulého století se mikrofluidika stala velice rozsáhlým oborem. Detaily lze nalézt v tisících publikací a mnoha monografiích, např.⁵¹, která patří mezi ty nejnovější. Snadná příprava monolitické struktury UV iniciovanou polymerizací v požadované lokalitě přesně definované fotomaskou se stala lákadlem pro četné výzkumné týmy na celém světě. Monolity pak našly v této oblasti celou řadu uplatnění⁵².

Osvědčily se například jako účinné mixéry kapalin. Thomas Rohr připravil monolit z 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethyldimethakrylátu fotoiniciovanou *in situ* polymerizací uvnitř kanálu vyleptaného ve skle a opticky monitoroval mísení dvou roztoků fluorescenčních barviv přitékajících do centrálního kanálu ze dvou oddělených větví⁵³. Účinnost a rychlost jeho mixéru převyšovala funkčnost obdobných zařízení vyrobených klasickými fotolitografickými technikami.

Výroba mikročipů ze skla zčásti adoptovala metodiky používané již dlouho předtím v mikroelektronickém průmyslu. Jednalo se o fotolitografii spočívající v nánosu fotoresistu, jeho osvětlení skrze fotomasku a leptání. Jakkoliv kanály v těchto čípech mohly mít téměř libovolnou geometrii, jejich výroba byla poměrně náročná a produkty tudíž drahé. Proto řada pracovišť pátrala po náhradě skla a pracně fotolitografie pro získávání čipů. Jednou z možností bylo ražení kanálových struktur do desky z plastu. V průmyslu plastických hmot je běžným procesem vstřikování. Plast se zahřeje na taveninu, která se vstříkne do formy, v níž se v jednom kroku získá požadovaný tvar. Proč tedy nepoužít tyto procesy pro velkovýrobu mikrofluidních čipů⁵⁴? Z bohaté nabídky polymerů byl vybrán jako nejvhodnější kopolymer norbornenu a ethylenu zvaný COC (cyclic olefin copolymer), který se nerozpouští v běžných rozpouštědlech používaných v chromatografických separacích a také je transparentní pro UV světlo používané pro fotopolymerizaci monolitů. Povrch kanálů se funkcionalizuje požadovanými chemickými skupinami, jež pak slouží v dané aplikaci, např. ke generaci elektroosmotického toku nebo ke kovalentnímu přichycení monolitu ke stěně kanálu. Tim Stachowiak předvedl, že se v takovém polymerním čipu dá snadno vyprodukovat monolit dokonce v předem určených místech ozařováním přes masku⁵⁵.

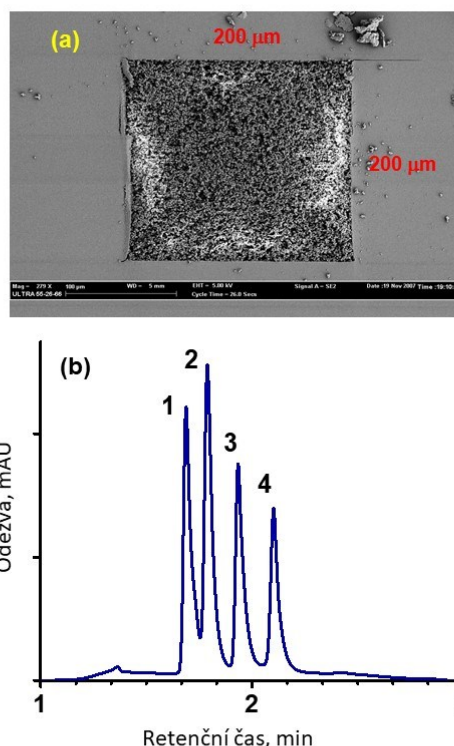
Na rozdíl od předešlé studie, Pavel Levkin použil termálně iniciovanou polymerizaci styrenu a divinylbenzenu pro přípravu monolitické stacionární fáze v polyimidovém čipu určeném pro kapalinovou chromatografii⁵⁶. Za pozornost stojí, že, vzdor nemodifikovaným stěnám mikrofluidního kanálu, monolit drží pevně přitisknut ke stěně, jak ukazuje obr. 8. To jsme nedokázali vysvětlit, avšak ukázalo se, že podobnou přilnavost ke stěně měl též mono-

lit připravený z lauryl-methakrylátu a ethyldimethakrylátu. Tento čip byl posléze použit pro rychlou separaci bílkovin v módu s obrácenými fázemi při použití strmého gradientu, jak také ukazuje obr. 8.

Zatímco plynová a tenkovrstvá chromatografie s použitím monolitů žádnou díru do světa neudělaly, v mikrofluidice je tomu naopak. Monolity v mikrofluidních čípech se staly předmětem mnoha publikací a patentů.

3. Příprava vzorků

Jestliže některé výše uvedené metodiky využívající monolitické struktury mohly být sotva označeny za velice úspěšné, příprava vzorků mezi ně určitě nepatří, neboť se jedná o jednu z vlajkových lodí aplikací monolitů. Leč i tato aplikace prošla zajímavým vývojem. První práce týkající se extrakce pevnou fází (solid phase extraction, SPE) byla publikována v roce 1998 (cit.⁴²). Nicméně, kapitola o SPE v knize o monolitech publikované o pět let později čítala pouhých 10 stran a zahrnovala jenom několik málo publikací²⁴. Další přehledný referát z roku



Obr. 8. (a) SEM snímek poly(styren-co-divinylbenzenového) monolitu uvnitř mikrofluidního kanálu generovaného v polyimidovém čipu, (b) gradientová eluce ribonukleasy A (1), cytochromu c (2), myoglobinu (3) a ovalbuminu (4) s použitím tohoto 68 mm dlouhého monolitu⁵⁶. Podmínky: gradient mobilní fáze 0–60 % acetonitrilu v 0,1% roztoku kyseliny trifluoroctové ve vodě během 2 min; nástřik 40 nL; průtoková rychlost 4 $\mu\text{L min}^{-1}$

2006 už shrnoval poznatky z více než padesáti prací⁷ a v následujícím přehledném referátu v roce 2017 jich bylo již přes 170, a to se týkal jenom použití on-line¹⁸.

„Klasická“ SPE je založena na adsorpci/absorpci. Proto musí adsorbent vládnout co největším povrchem, na němž dochází k sorpci. Původní monolity používané v chromatografii měly měrný povrch v jednotkách či nízkých desítkách $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ a byly tedy pro standardní SPE prakticky nepoužitelné. Nicméně, Shaofeng Xie obešel toto omezení tepelně iniciovanou polymerizací jediného monomeru, kterým byl komerční divinylbenzen, a získal materiál s měrným povrchem $367 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Vhodnou volbou porogenních rozpouštědel nedošlo ke zhoršení průtokových parametrů monolitu, který umožňoval neobyčejně rychlý přenos hmoty zvyšující rychlost adsorpce, a tudíž mohl být použit při velkých průtokových rychlostech. Samotný polydivinylbenzen se ukázal být vynikajícím sorbentem nepolárních látek. Méně vhodný byl ale pro adsorpci polárních sloučenin. Tuto nevýhodu pak eliminoval přídavek necelých 5 % 2-hydroxyethyl-methakrylátu do polymerizační směsi. Měrný povrch tohoto monolitu se poněkud zmenšil na $330 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, leč výtěžek extrakce substituovaných fenolů vzrostl z průměrných 58–80 % na vynikajících 90–99 %.

Zatímco předešlý monolit adsorboval látky na základě hydrofobních interakcí, Cong Yu rozšířil spektrum interakcí o iontovou výměnu a připravil monolitický adsorbent ve skleněném mikrofluidním čipu⁵⁷. Zde ovšem musel použít fotoiniciovanou polymerizaci, která není vhodná k polymerizaci UV absorbujících monomerů, jako je divinylbenzen. Proto použil kombinaci monovinylových monomerů: hydrofilního 2-hydroxyethyl-methakrylátu a iontového 2-(methakryloyloxy)ethyltrimethylamoniumchloridu spolu se síťovadlem ethylendimethakrylátem. Pravda, měrný povrch monolitu byl významně zmenšen, ale pro adsorpci byly využívány kvarterní amoniové iontovýměnné skupiny. Více než stonásobné zkoncentrování po adsorpci fluorescenčního barviva s karboxylovými skupinami Coumarinu 519 bylo dosaženo po desorpci 34 nl pulsem jednomolárním roztokem salicylátu sodného.

Zcela nový aspekt do „monolitické“ přípravy vzorků vneslo pokrytí povrchu pórů nanočásticemi. Aby je bylo možné nanést v dostatečném množství a aby držely dostatečně pevně, byly potřebné thiolové skupiny. Proto jsme vyvinuli metodu modifikace spočívající v reakci poly(glycidyl-methakrylát-co-ethylendimethakrylátového) monolitu nejprve s cysteaminem⁵⁸, která byla posléze vylepšena a spočívala v reakci s cystaminem a poté s tris(karboxyethyl)fosfinem⁵⁹, jež produkovala ještě větší množství thiolů. Tyto sorbenty se ukázaly jako výhodné pro „bottom-up“ proteomické studie, jelikož umožňovaly z velkého množství peptidů selektivní extrakci těch, které obsahují cystein⁵⁸.

4. Imobilizace enzymů

Imobilizace biologických katalyzátorů byla jednou z prvních aplikací monolitických struktur ve tvaru disků

publikovaných už v roce 1991(cit.⁶⁰). Imobilizace na monolitu v kolonovém formátu byly demonstrovány záhy poté Miroslavem Petro, který imobilizoval trypsin a provedl závratně rychlé štěpení bílkovin s jeho pomocí⁶¹. Podobně jako při použití v chromatografii, rychlý přenos hmoty uvnitř nosiče umožnil významné zlepšení reakční kinetiky. Detailní pohled na danou problematiku shrnují mnohé přehledné články, např.^{12,22,62}. Prvotní přístupy využívaly reaktivitu epoxidových skupin populárních poly(glycidyl-methakrylát-co-ethylendimethakrylátových) monolitů, s nimiž jsme pracovali i v chromatografických aplikacích. V průběhu doby se ukázalo, že přímá vazba enzymů přes epoxidovou skupinu není příliš účinná, zatímco efektivnější přístup s použitím glutaraldehydu vyžadoval několik reakčních kroků⁶¹. Proto jsme vyvinuli monolity s reaktivními 2-vinyl-4,4-dimethylazlaktanovými skupinami, které umožnily navázání enzymu v jediném stupni, a opět jsme je použili pro imobilizaci trypsinu⁶³. Důležité bylo také vyloučit nespecifické interakce bílkovin se samotným nosičem. Tohoto úkolu se zhostila Jana Křenková, když nejprve hydrofilizovala monolitický nosič a poté ho aktivovala roubováním azlaktanového monomeru uvedeného výše⁶⁴. Nepřítomnost nežádoucí adsorpce bílkovin byla prokázána s použitím fluorescenčně značené hydrofobní bílkoviny albuminu. Urban použil monolitický nosič s fotoiniciovaně naroubovanými azlaktanovými řetězci k imobilizaci lipasy⁶⁵. Maximální reakční rychlost tohoto konjugátu byla téměř čtyřnásobná ve srovnání s reakcí v roztoku.

Fotoiniciované roubování však také umožňovalo imobilizovat několik enzymů ve zvolené sekvenci a jejich použití v multienzymové reakci⁶⁶. Poly(butyl-methakrylát-co-ethylendimethakrylátový) monolit připravený v kapi-láře byl nejprve celý hydrofilizován naroubovaným poly(ethylenglykolem), aby se zamezilo nežádoucí adsorpci. V dalším stupni pak proběhlo fotoiniciované roubování azlaktanového monomeru přes masku, která zakrývala části monolitu, jež neměly být aktivovány, a následovala imobilizace prvního enzymu, totiž peroxidasy. Masku se potom přenesla na další část monolitu a zakryla jak již imobilizovaný enzym, tak i část dosud neaktivovaného nosiče, a azlaktanový monomer aktivoval další segment, na němž byla imobilizována glukosoxidasa. A konečně, po aktivaci třetí části monolitu byla imobilizována invertasa. Délka jednotlivých sekvencí odpovídala potřebné době zdržení umožňující dosažení žádoucí úplné konverze. Tento reaktor se sekvencí tří enzymů byl použit ke stanovení sacharosy. Nástřík se uskutečnil na konci reaktoru s imobilizovanou invertasou, která rozložila disacharid na glukosu a fruktosu. V dalším segmentu byla glukosa oxidována na glukonolakton a peroxid vodíku. Ten sloužil v peroxidasové části k oxidaci barviva Amplex Red. Toto barvivo, které bylo přidáváno do reakčního roztoku, měnilo barvu, což umožnilo kvantitativní vyhodnocení obsahu sacharosy v původním roztoku. Celý proces byl díky výhodným průtokovým vlastnostem nosiče opět velmi rychlý. Pokus o použití reaktoru v opačném průtoku nevedl k žádné oxidaci barviva a potvrdil nutnost použití správné sekvence enzymů.

Zajímavých výsledků bylo dosaženo při imobilizaci enzymu na nosiči, v němž povrch pórů byl pokryt zlatými nanočásticemi, na nichž se imobilizovala lipasa prostřednictvím své thiolové skupiny⁶⁷. Ve srovnání s výše uvedenou imobilizací prostřednictvím naroubovaných azlaktonových řetězců, vazba k nanočásticím zvýšila maximální reakční rychlost oproti reakci v roztoku tisíckrát. Co ovšem činí tento přístup ještě zajímavějším, je možnost recyklování nosiče po odstranění neaktivního enzymu z nosiče roztokem thioethanolu a jeho reaktivaci následující imobilizací čerstvého enzymu. Jakkoliv je tento způsob imobilizace velice atraktivní, jeho nedostatkem je skutečnost, že enzym musí obsahovat thiolovou skupinu na vnější části své terciární struktury, což nebývá příliš častý případ.

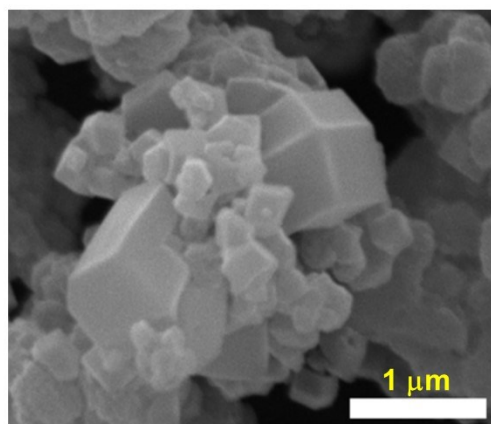
5. Monolity obsahující metalo-organické stavební prvky

Monolity obsahující metalo-organické stavební prvky (metalorganic frameworks, MOF) jsou relativně novou třídou porézních koordinačních polymerů. Jejich příprava je snadná a vyžaduje sůl vhodného kovu, jehož ionty slouží jako centra koordinace organických spojek, typicky sestávajících z aromatického jádra a dvou či více karboxylových skupin. MOF se vyznačují značným specifickým povrchem v řádu stovek až tisíců $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. Proto jsme usoudili, že jejich přítomnost v monolitické struktuře může významně zvýšit rozsah povrchu a rozšířit aplikační spektrum monolitů.

V našich prvních implementacích jsme připravili MOF reakcemi ve vrstvách. Proces jsme zahájili polymerizací monolitu v kapiláře ze směsi styrenu, divinylbenzenu a methakrylové kyseliny⁶⁸. Karboxylové skupiny pak posloužily pro zadržení železitých iontů z roztoku jejich chloridu. V následujícím stupni pak byla tato kolona promývána roztokem 1,3,5-benzen-trikarboxylové kyseliny, která vytvořila komplex se železem. Na volné karboxyly byly opět navázány železité ionty, poté opět trikarboxylová kyselina, čímž se ve vrstvách vytvářel požadovaný MOF. Tento cyklický proces byl opakován desetkrát a přítomnost MOF byla detegována významným přírůstkem množství pórů s velikostí 1–3 nm. Takto modifikovaná kolona pak posloužila k selektivnímu vychytávání fosfopeptidů ze složité směsi peptidů získaných štěpením bílkovin trypsinem.

Obdobný přístup byl použit i s oblíbeným poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylendimethakrylátovým) monolitem. Ten byl v první vrstvě funkcionalizován *N*-(3-aminopropyl)imidazolem, na nějž byly navázány zinečnaté ionty⁶⁹. V dalších reakčních stupních se pak tento monolit promýval střídavě roztoky 2-methylimidazolu a dusičnanu zinečnatého. Po pětinasobném opakování těchto cyklů obsahoval monolit dostatečné množství MOF, který byl poté použit k imobilizaci trypsinu.

Stejný MOF byl připraven s použitím nanočástic z oxidu zinečnatého, které byly přimíchány do směsi methakrylové kyseliny a ethylendimethakrylátu⁷⁰. Tato směs byla pak polymerizována v kapiláře. Póry tohoto monoli-



Obr. 9. SEM snímek vnitřního povrchu monolitu připraveného polymerizací v přítomnosti nanočástic z oxidu zinečnatého, které posloužily jako centra pro tvorbu dobře patrných krystalů metalo-organických stavebních prvků⁷⁰

tického prekurzoru byly naplněny roztokem 2-methylimidazolu a ponechány reagovat po delší dobu při zvýšené teplotě. Obr. 9 dokládá přítomnost krystalů MOF v monolitické struktuře. Katalytická aktivita zabudovaného MOF byla demonstrována významným urychlením Knoevenagelovy kondenzační reakce benzaldehydu s ethylkyanoacetátem a jeho absorpční schopnost extrakce chlorfenolových mikropolutantů z vody.

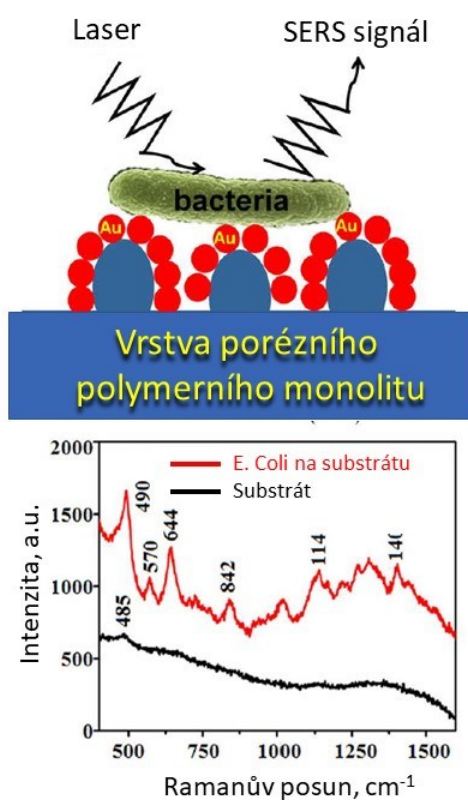
6. Méně známé aplikace

Kromě tak říkajíc masových použití monolitických struktur popjatých výše, byla též vyvinuta plejáda menších, leč rovněž zajímavých aplikací. Zde je několik příkladů.

Monolity s reaktivními 2-vinyl-4,4-dimethylazlaktonovými skupinami, které umožnily výše popsané navázání enzymů, byly použity rovněž v procesu, který jsme nazvali reaktivní filtrací. Povrch pórů poly(styren-*co*-divinylbenzenových) disků byl pokryt reaktivním gelem termálně iniciovaným roubováním azlaktonového monomeru s přísadkou malého množství síťovačla. Jejich použití pak bylo předvedeno na odstraňování přebytku aminu z produktu po jeho reakci s *t*-butylisokyanátem^{71,72}.

Podobně stříbrné nanočástice imobilizované v pórech monolitu stejným způsobem použitým výše pro vazbu zlatých nanočástic umožnily Ondřeji Sedláčkovi kompletně vychytat nuklid ¹²⁵I zbývající v roztoku po přípravě značeného farmaceutika jodobenzylguanidinu, a tak významně omezit objem radioaktivního odpadu⁷³.

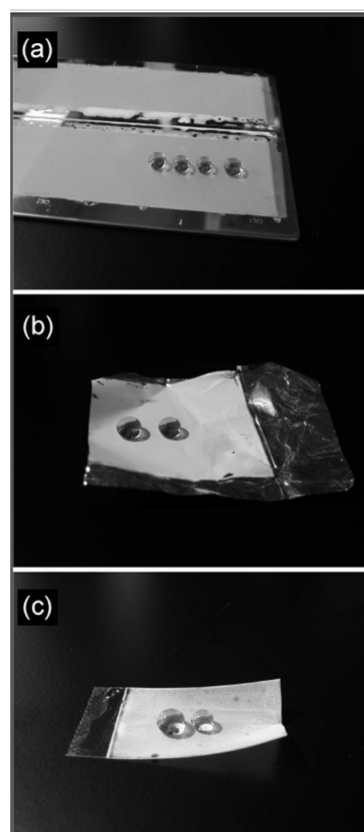
Další, zatím poněkud kuriózní aplikací, je detekce bakterií ve vodě senzorem využívajícím monolitické planární vrstvy pro povrchem zesílený Ramanův rozptyl (surface enhanced Raman scattering, SERS)⁷⁴. Skleněné krycí sklíčko bylo pokryto tenkou vrstvou typického poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylendimethakrylátového) monolitu funkcionalizovaného thiolovými skupinami,



Obr. 10. Schématické zobrazení průřezu senzoru s navázanou bakterií *E. coli* spočívajícího v monolitickém substrátu se zlatými nanočásticemi a srovnání SERS spekter samotného substrátu a po navázání bakterie⁷⁴

přes které byly nakonec navázány zlaté nanočástice o velikosti 40 nm. Díky třídimenziálnímu charakteru povrchu polymerní vrstvy došlo ke zvýšení plasmonické interakce a k dosažení meze detekce až na $5 \cdot 10^{-8}$ mol l⁻¹ monitorované jako výška píku barviva Nile blue A. Schematický pohled na tento senzor bakterií, jakož i demonstrace významného rozdílu ve spektru SERS substrátu před a po navázání bakterie *E. coli*, je na obr. 10.

Ze zcela jiného soudku je příprava superhydrofobních monolitických vrstev. Jako superhydrofobní se označují povrchy, jejichž kontaktní úhel pro vodu převyšuje 150°. Pavel Levkin vyvinul snadný postup, jak toho dosáhnout polymerizací monolitu majícího specifickou porézní strukturu na povrchu zvoleného substrátu⁴⁷. Obr. 11 ukazuje, že lze superhydrofobizovat substráty jako je sklo, ocel, hliníková fólie či guma. Takový povrch pak brání jejich poškození i takovými činidly, jako jsou koncentrovaná kyselina či louh. Pokračování tohoto projektu na vyšší úrovni pak vedlo k přípravě vrstev, jejichž polaritu je možné řídit od superhydrofobní k superhydrofilní pouhou změnou pH (cit.⁷⁵). Toho bylo dosaženo modifikací monolitické vrstvy mající správnou kombinaci mikro- a nanoporozity nesoucí thiolové skupiny (*vide supra*). Reakce typu „thiol-ene



Obr. 11. Vodní kapky spočívající na superhydrofobních površích připravených jednostupňovou polymerizací na povrchu oceli (a), hliníkové fólie (b) a plastové pásky (c) (cit.⁴⁷)

click“, např. se směsí 10-undecylenové kyseliny a lauryl-methakrylátu, modifikovala povrch monolitu a umožnila dosažení požadovaných vlastností, kdy při kyselém pH byl povrch superhydrofobní zatímco v bazickém prostředí byl kontaktní úhel vody rovný nule a kapka se na tomto superhydrofilním povrchu okamžitě rozptýlila.

7. Závěry

Tento referát představuje vzorník aplikací monolitických polymerů a má za účel naznačit, že jejich arsenál je v pravdě bohatý. Pozorný čtenář si jistě uvědomil, že i zde platí známé filosofické pravidlo, které tvrdí, že všechno souvisí se vším. Tak např. kapilární monolitické kolony pro HPLC vznikly jako produkt kapilární elektrochromatografie, aby posléze byly nasyceny metalo-organickými stavebními prvky (MOF) a použity jako heterogenní katalyzátor v kontinuálním reaktoru. Tenké vrstvy se ukázaly výhodnými v TLC, ale bylo je možné použít i v senzoru na bázi povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS) či k superhydrofobizaci povrchů. Monolity s nanočásticemi pak našly uplatnění v přípravě vzorků pro

chromatografii, imobilizaci enzymů a v SERS. Podobných příkladů by se dalo nalézt ještě mnoho. I když světová odborná literatura neustále rozšiřuje poznatky týkající se monolitů, mezi něž se řadí příprava z nových kombinací monomerů, rozvoj aplikací, či neobvyklé formáty, jejich budoucnost se nejspíše vymezí do zcela originálních postupů jejich přípravy, jimiž může být i třídímenzionální tisk. První náznaky aplikace těchto technologií v monolitické oblasti už byly publikovány⁷⁶. Takový vytištěný monolit bude mít optimální strukturní parametry pro danou aplikaci s přesným designem vytvořeným v počítači. Nezanedbatelnou předností pak bude i dokonalá opakovatelnost produktů tištěných podle stejného vzoru. Masovému nasazení 3D tiskáren zatím brání relativně nízká rychlost tisku a v mnoha případech i jejich nedosta- tečná rozlišovací schopnost. Rovněž zatím ještě chybí vhodné materiály pro tisk. Leč je jenom otázkou času, kdy tyto problémy budou vyřešeny a tištěné monolity budou k dispozici.

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

LITERATURA

- Švec F.: *Electrophoresis* 38, 2810 (2017).
- Švec F.: *Chem. Listy* 98, 232 (2004).
- Klodzinska E., Moravcova D., Jandera P., Buszewski B.: *J. Chromatogr. A* 1109, 51 (2006).
- Štulík K., Pacáková V., Suchánková J., Coufal P.: *J. Chromatogr. B* 841, 79 (2006).
- Švec F., Kurganov A. A.: *J. Chromatogr. A* 1184, 281 (2008).
- Švec F.: *Electrophoresis* 27, 947 (2006).
- Švec F.: *J. Chromatogr. B* 841, 52 (2006).
- Mikšik I., Sedláková P.: *J. Sep. Sci.* 30, 1686 (2007).
- Jandera P., Hájek T., Staňková M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 139 (2015).
- Urban J., Jandera P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2123 (2013).
- Jandera P.: *J. Chromatogr. A* 1313, 37 (2013).
- Urban J., Jandera P.: *J. Sep. Sci.* 31, 2521 (2008).
- Nováková L., Vlčková H.: *Anal. Chim. Acta* 656, 8 (2009).
- Švec F.: *J. Chromatogr. A* 1228, 250 (2012).
- Currivan S., Jandera P.: *Chromatography* 1, 24 (2014).
- Moravcová D., Rantamaki A. H., Duša F., Wiedmer S. K.: *Electrophoresis* 37, 880 (2016).
- Lv Y., Švec F.: *Anal. Chem.* 87, 250 (2015).
- Masini J. C., Švec F.: *Anal. Chim. Acta* 964, 24 (2017).
- Lv Y., Švec F. v knize: *Handbook of Advanced Chromatography / Mass Spectrometry Techniques* (Holčápek M., Byrdwell W. C., ed.), kap. 9, str. 141. Academic Press, Amsterdam 2017.
- Coufal P., Čihák M., Suchánková J., Tesařová E.: *Chem. Listy* 95, 509 (2001).
- Křenková J., Foret F., Švec F.: *J. Sep. Sci.* 35, 1266 (2012).
- Křenková J., Švec F.: *J. Sep. Sci.* 32, 706 (2009).
- Švec F., Křenková J.: *LC-GC America* 26, 24 (2008).
- Švec F., Tennikova T. B., Deyl Z.: *Monolithic Materials: Preparation, Properties, and Applications*. Elsevier, Amsterdam 2003.
- Unger K., Tanaka N., Machtejevas E.: *Monolithic Silicas in Separation Science: Concepts, Syntheses, Characterization, Modeling and Applications*. Wiley, Weinheim 2011.
- Wang P. G.: *Monolithic Chromatography and its Modern Applications*. ILM Publications, St. Albans, UK 2010.
- Tennikova T. B., Švec F., Belenkii B. G.: *J. Liquid Chromatogr.* 13, 63 (1990).
- Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* 64, 820 (1992).
- Xie S., Allington R. W., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogr. A* 865, 169 (1999).
- Lee D., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogr. A* 1051, 53 (2004).
- Geiser L., Eeltink S., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogr. A* 1140, 140 (2007).
- Wang Q., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogr. A* 669, 230 (1994).
- Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N.: *Anal. Chem.* 68, 3498 (1996).
- Urban J., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* 82, 1621 (2010).
- Podgornik A., Barut M., Strancar A., Josic D., Koloini T.: *Anal. Chem.* 72, 5693 (2000).
- Hilder E. F., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogr. A* 1044, 32 (2004).
- Hilder E. F., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Electrophoresis* 23, 3934 (2002).
- Woodward S. D., Urbanová I., Nurok D., Švec F.: *Anal. Chem.* 82, 3445 (2010).
- Stachowiak T. B., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogr. A* 1044, 98 (2004).
- Hu L.-F., Yin S.-J., Zhang H., Yang F.-Q.: *J. Sep. Sci.* 43, 1942 (2020).
- Sýkora D., Peters E. C., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Macromol. Mater. Eng.* 275, 42 (2000).
- Xie S., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Chem. Mater.* 10, 4072 (1998).
- Korolev A. A., Popova T. P., Shiryaeva V. E., Kozin A. V., Kurganov A. A.: *Russ. J. Phys. Chem.* 81, 469 (2007).
- Peroni D., Vonk R. J., van Egmond W., Janssen H. G.: *J. Chromatogr. A* 1268, 139 (2012).
- 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).
- Lv Y., Lin Z., Tan T., Švec F.: *J. Chromatogr. A* 1316, 154 (2013).
- Levkin P. A., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Adv. Funct. Mater.* 19, 1993 (2009).
- Han Y., Levkin P. A., Abarientos I., Liu H., Švec F.,

- Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* **82**, 2520 (2010).
49. Urbanová I., Švec F.: *J. Sep. Sci.* **34**, 2345 (2011).
50. Hauck H. E., Bund O., Fischer W. R., Schulz M.: *J. Planar Chromatogr., Mod. TLC* **14**, 234 (2001).
51. Song Y. C. D., Zhao L.: *Microfluidics: Fundamental, Devices and Applications: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim 2018.
52. Švec F., Fréchet J. M. J., Hilder E. F., Peterson D. S., Rohr T., v knize: *Micro Total Analysis Systems 2002* (Baba Y., van den Berg A., ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2002.
53. Rohr T., Yu C., Davey M. H., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Electrophoresis* **22**, 3959 (2001).
54. Mair D. A., Geiger E., Pisano A. P., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Lab-on-a-chip* **6**, 1346 (2006).
55. Stachowiak T. B., Rohr T., Hilder E. F., Peterson D. S., Yi M., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Electrophoresis* **24**, 3689 (2003).
56. 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).
57. Yu C., Davey M. H., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* **73**, 5088 (2001).
58. Xu Y., Cao Q., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* **82**, 3352 (2010).
59. Lv Y., Maya A., Fréchet J. M. J., Švec F.: *J. Chromatogr. A* **1261**, 121 (2012).
60. Abou-Rebyeh H., Josic D., Gottschall K., Schubert-Rehberg K., Korber F.: *J. Chromatogr.* **566**, 351 (1991).
61. Petro M., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 355 (1996).
62. Safdar M., Spross J., Janis J.: *J. Chromatogr. A* **1324**, 1 (2014).
63. Xie S., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 30 (1999).
64. Křenková J., Lacher N. A., Švec F.: *Anal. Chem.* **81**, 2004 (2009).
65. Urban J., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 371 (2012).
66. Logan T. C., Clark D. S., Stachowiak T. B., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Anal. Chem.* **79**, 6592 (2007).
67. Lv Y., Lin Z., Tan T., Švec F.: *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 50 (2014).
68. Saeed A., Maya A., Xiao D. J., Najam-ul-Haq M., Švec F., Britt D. K.: *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 5790 (2014).
69. Wen L., Gao A., Cao Y., Švec F., Tan T., Lv Y.: *Macromol. Rapid Commun.* **37**, 551 (2016).
70. Darder M. d. M., Salehinia S., Parra J. B., Herrero-Martinez J. M., Švec F., Cerdà V., Turnes Palomino G., Maya F.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 1728 (2017).
71. Tripp J. A., Stein J. A., Švec F., Fréchet J. M. J.: *Org. Lett.* **2**, 195 (2000).
72. Tripp J. A., Švec F., Fréchet J. M. J.: *J. Comb. Chem.* **3**, 216 (2001).
73. Sedláček O., Kučka J., Švec F., Hrubý M.: *J. Sep. Sci.* **37**, 798 (2014).
74. Cao Y., Lv M., Xu H., Švec F., Tan T., Lv Y.: *Anal. Chim. Acta* **896**, 111 (2015).
75. Lv Y., Cao Z., Švec F., Tan T.: *Chem Commun.* **50**, 13809 (2014).
76. Urban J.: *J. Sep. Sci.* **43**, 1628 (2020).

F. Švec (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **My Love Affair: Monoliths**

Current organic polymer-based monoliths emerged some 30 years ago. Their well-known advantages include ease of the preparation, robustness, high permeability to flow, mass transport *via* convection, and a vast variety of chemistries. The early polymer-based monoliths were used almost entirely for the rapid separations of proteins and other large molecules using liquid chromatography. A number of new chemistries and functionalization methods were meanwhile developed to produce monolithic columns for the separations in various chromatographic modes including gas chromatography, electrochromatography, and microfluidics. In addition to the typical chromatographic separations, several new applications were recently reported thus confirming versatility of the monoliths. For example, monoliths are excellent materials for sample preparation prior to chromatography. Their functionalization *via* attachment of gold nanoparticles to pore surface thiols provides materials for highly sensitive surface enhanced Raman spectroscopy. Thin monolithic layers are gaining more attention as well since they enable efficient separations of proteins using very simple means followed by an easy detection using mass spectrometry. This review is a showcase demonstrating just a few examples of the substantial variety of applications of monoliths that were developed since their introduction.

Keywords: catalysis, chromatography, electrochromatography, GC, monolith, sample preparation, supports, TLC

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.