

Magdalena B. ZARZYCKA

Politechnika Koszalińska, Zakład Toksykologii i Bioanalityki,
ul. Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin
e-mail: mbzarz@wp.pl

Wykorzystanie danych retencyjnych uzyskanych przy pomocy techniki mikro-TLC w doborze warunków procesu ekstrakcji do fazy stałej (SPE) prowadzonej z użyciem faz odwróconych

Application of retention data derived from micro-TLC plates for optimization of a reversed phase solid-phase extraction protocol

Streszczenie: W pracy dokonano omówienia wyników dostępnych w literaturze, a także z badań własnych dotyczących współczesnej chromatografii planarnej, oraz doboru składu eluentów stosowanych w ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z wykorzystaniem danych retencyjnych, otrzymanych z mikro-TLC, z użyciem wysokosprawnych płytek typu HPTLC RP18W. Przedstawiono sposób optymalizacji składu eluentów stosowanych w procedurach SPE dla wybranych hormonów sterydowych z grup estrogenów oraz progestagenów. Zaprezentowano wykresy, które mogą być przydatne do bezpośredniego wyznaczenia składu binarnych metanolowo-wodnych faz wymywających oraz czyszczących. Krzywe ilustrujące zmiany objętości retencji zależnie od składu fazy ruchomej zostały obliczone na podstawie wyznaczonych w poprzednich pracach współczynników równań regresji liniowej typu $\log k_{SPE} = aR_M + b$ dla wybranych hormonów sterydowych chromatografowanych w układzie faz odwróconych.

Słowa kluczowe: Mikro-TLC, chromatografia planarna, ekstrakcja do fazy stałej, układ faz odwróconych, hormony, sterydy, estrogeny, progestageny

Abstract: This short review communication presents modern planar chromatography, the general ideas of solid-phase extraction (SPE) and especially optimization of the extraction protocol involving retention data derived from micro-TLC plates under reversed phase conditions using wettable with water stationary phase (HPTLC RP18W). Particularly, the graphs that allow a direct selection of an appropriate cleaning and eluting solvents based on the binary methanol/water mixtures for selected estrogens and progestogens were plotted. The computations were based on available in literature slope and intercept coefficients of the linear-regression equation formed as $\log k_{SPE} = aR_M + b$ for given steroid hormones chromatographed under reversed-phase (RP) conditions.

Key words: Micro-TLC, planar chromatography, solid phase extraction, reversed phase, hormones, steroids, estrogens, progestogens

1. Mikrochromatografia cienkowarstwowa (*Planar microchromatography*)

Chromatografia planarna z niewymuszonym zewnętrznym ciśnieniem przepływem fazy ruchomej w wersji „mikro”, czyli na płytkach z drogą rozwijania nie przekraczającą 5-7 cm, była przed powstaniem komercyjnie dostępnych urządzeń i kolumn HPLC jedną z najczęściej wykorzystywanych technik rozdzielania [1-6]. Zadowalające rozdzielanie kilku składników uzyskiwano najczęściej w układzie faz normalnych i zazwyczaj w warunkach nietermostatowanych [7-9]. Rozwój wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz elektroforezy kapilarnej, który nastąpił w latach 1970-2000, znacznie zmniejszył zainteresowanie mikro-TLC. Obecny wzrost zainteresowania techniką mikro-TLC związany jest z komercyjnie dostępnymi wysokosprawnymi płytkami typu HPTLC (*high-performance thin-layer chromatography*) jak również płytkami monolitycznymi (*Ultra-thin monolithic TLC plates*; UTLC), badaniami nad wspomnianymi wyżej metodami elektromigracyjnymi, jak również urządzeniami mikrokanałowymi oraz typu *microfluidic paper based microdevices* [10-18]. Firma Merck opracowała fazy stacjonarne charakteryzujące się zmniejszoną gęstością pokrycia krzemionki łańcuchami C18, które umożliwiły rozdzielanie przy pomocy faz ruchomych o dowolnej zawartości wody (*wettable with water, water tolerable*; RP18-W). Płytki te są szczególnie przydatne w analizie materiałów fitochemicznych i preparatów farmaceutycznych [19-23]. Nie bez znaczenia jest również bardzo małe zużycie faz ruchomych, często poniżej 1 mL, co wpisuje się w zasady tzw. zielonej chemii (*green chemistry*), kładącej szczególny nacisk na opracowywanie procesów chemicznych i procedur analitycznych o małej szkodliwości dla środowiska naturalnego [24-26]. Należy zwrócić uwagę, że metodyki analityczne oparte na klasycznej chromatografii cienkowarstwowej, szczególnie prowadzonej w układzie faz normalnych (NP), są do chwili obecnej szeroko stosowane w analizie preparatów farmaceutycznych [19-21, 27].

W ostatnich latach atrakcyjność chromatografii cienkowarstwowej w tym mikro-TLC jako pełnowartościowej metody analitycznej znacząco wzrosła, głównie za sprawą opracowania szeregu prostych urządzeń sprzęgających, umożliwiających zastosowanie czułych detektorów identyfikujących anality, w oparciu o różnego typu detektory włączając w to również spektrometrię mas [22, 23]. Z powodzeniem udaje się sprzęgać technikę planarną ze spektrometrami promieniowania elektromagnetycznego w zakresach UV, Vis oraz IR [23, 28, 29]. Rozdzielone substancje można analizować metodami spektroskopii ramanowskiej oraz technikami analizującymi światło rozproszone na plamkach analitów [12, 28, 30, 31]. Czułą detekcję związków biologicznie czynnych można osiągnąć przy pomocy technik fluorescencyjnych oraz bioluminescencyjnych [22, 29, 32, 33]. W chwili obecnej istnieje duży wybór detektorów spektrometrii mas umożliwiających analizowanie chromatogramów cienkowarstwowych, jak również włączając w to urządzenia z desorpcją próbek przeprowadzaną różnymi metodami (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*, TLC-MALDI-MS;

electron impact ionization mass spectrometry, TLC–EI-MS; *desorption electrospray ionization mass spectrometry*, DESI-MS) [33-41]. Wymienione wyżej metody detekcji umożliwiają zastosowanie chromatografii planarnej w badaniach złożonych próbek biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem badań typu metabolomika [21, 23].

2. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) (*Solid-phase extraction - SPE*)

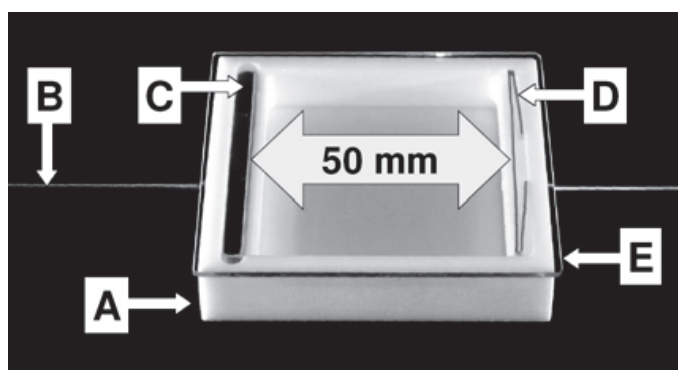
Ekstrakcja do fazy stałej (*solid phase extraction*; SPE) jest obecnie podstawowym sposobem przygotowywania różnorodnych próbek do analizy chromatograficznej lub innych rodzajów analiz instrumentalnych [42-45]. Procedurę SPE stosuje się w dwóch zasadniczych celach: oczyszczenia oraz zateżenia analitów w próbkach wieloskładnikowych [46]. Umożliwia ona również wstępne frakcjonowanie grup analitów o żądanych właściwościach fizykochemicznych [47]. Obecnie istnieje szereg odmian ekstrakcji do fazy stałej np. bardzo szeroko wykorzystywana dla celów chromatografii gazowej, mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) [48-51]. Głównymi zaletami SPE są szybkość i prostota wykonania, duża powtarzalność wyników, możliwość analizy próbek cieczy o dużych objętościach oraz automatyzacji procesu. Bardzo dużą zaletą jest również szeroki wybór dostępnych komercyjnie adsorbentów typu NP i RP oraz innych jak np. wymiennicze jonowe. Zasada działania SPE jest połączeniem filtracji oraz chromatografii kolumnowej a efektywną izolację oraz zateżenie analitów uzyskuje się poprzez dobór odpowiedniej fazy stacjonarnej oraz składu i objętości cieczy czyszczącej i wymywającej. Sposoby wykonania poszczególnych etapów procedury SPE zostały szczegółowo opisane w literaturze poświęconej metodom przygotowywania próbek do analizy oraz chromatografii cieczowej [52, 53].

Do najważniejszych etapów procedury SPE należy zaliczyć: wybór rodzaju i masy fazy stacjonarnej, wybór składu oraz cieczy czyszczącej oraz wymywającej anality, oczyszczanie fazy stacjonarnej (kondycjonowanie), nanoszenie badanej próbki, oczyszczanie próbki roztworem czyszczącym oraz selektywne wymywanie poszukiwanych analitów. W przypadku końcowej analizy wykonywanej za pomocą HPLC oraz CE pożądane jest odparowanie roztworu wymywającego i zastąpienie go odpowiednią fazą ruchomą lub buforem. W literaturze istnieje szereg gotowych procedur, w których dla danych grup związków określono rodzaje adsorbentów SPE jak również objętości i składy roztworów czyszczących oraz wymywających. Jednakże w praktyce często zachodzi potrzeba modyfikacji procedur przygotowania próbek do analizy, co prowadzi do zmiany sposobu oczyszczania. Zastosowanie prostej metody doboru faz ciekłych w oparciu o metodę krzywych przebiecia jest precyzyjne, ale bardzo pracochłonne i wymaga użycia znacznych ilości substancji wzorcowych, które są zazwyczaj bardzo drogie [54, 55]. Dlatego dobór odpowiednich warunków oczyszczania SPE prowadzi się zazwyczaj metodami obliczeniowymi, w oparciu o wybrane parametry fizykochemiczne rozpuszczalników i analitów [56]. Często stosuje się rów-

niez proste badanie odzysku analitów, przy ustalonej arbitralnie (na podstawie polarności analizowanych substancji oraz układu faz SPE) objętości oraz składu cieczy czyszczącej matrycę biologiczną i wymywającej anality [52].

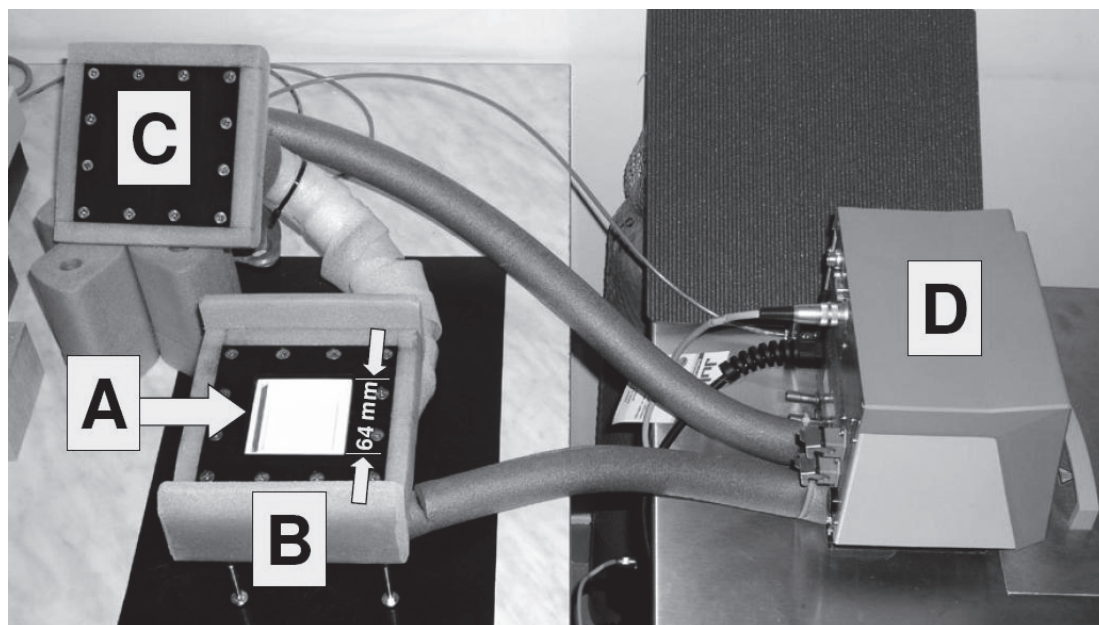
3. Optymalizacja procesu ekstrakcji do fazy stałej przy użyciu danych retencyjnych uzyskanych z mikro-TLC dla wybranych hormonów sterydowych (*Optimization of solid-phase extraction of selected steroids using retention data from micro-thin-layer chromatography*)

Najczęściej wykorzystywanym adsorbentem w analizie sterydów w preparatach farmaceutycznych, materiałach biologicznych oraz środowiskowych jest krzemionka pokryta łańcuchami oktadecylsilanowymi (C18). Przykładowe procedury optymalizacji SPE w oparciu o profile przebiecia dla szeregu sterydów z grup estrogenów i progestagenów, oznaczanych w materiałach biologicznych (krew) oraz środowiskowych (wody powierzchniowe, ścieki oczyszczone i nieoczyszczone) zostały przedstawione w literaturze [43, 47, 57]. W celu weryfikacji danych dotyczących krzywych przebiecia obserwowanych na kolumnkach typu RP (C18), dla związków z grup estrogenów, posłużono się termostатовaną mikrochromatografią cienkowarstwową z użyciem płytek typu HPTLC RP-18W (rysunek 1-3) [55, 58, 59]. W przeciwieństwie do klasycznej fazy stacjonarnej RP18, faza stacjonarna tego typu (charakteryzująca się zmniejszoną gęstością pokrycia krzemionki niepolarnymi łańcuchami C18) umożliwia chromatografowanie sterydów przy zastosowaniu eluentów o dowolnej zawartości wody. W badaniach własnych jako substancji testowych użyto progesteronu oraz dwóch jego pochodnych: 17α - i 20α -hydroksyprogesteronu. Hormony te są kluczowe dla oznaczeń i diagnostyki medycznej wielu procesów biochemicznych zachodzących w organizmach zwierząt i ludzi, szczególnie związanych z przebiegiem i diagnostyką cykli miesięcznych oraz ciąży.



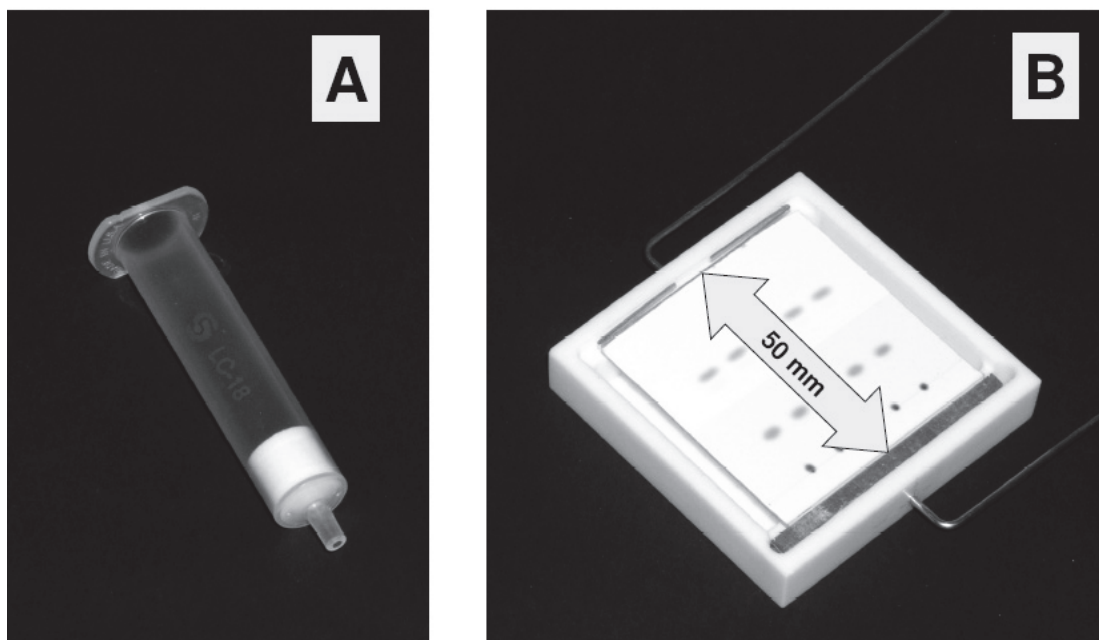
Rys. 1. Komora do mikro-TLC. Teflonowa podstawa modułu mikrokomory (A), rurka doprowadzająca fazę ruchomą (B), zbiornik z elementem rozprowadzającym eluent na mikro-płytkę (C), sprężyna dociskająca mikro-płytkę (D), pokrywa szklana (E) [58]

Fig. 1. Perspective view of removable horizontal micro-TLC chamber unit. Chamber body (A), application pipe (B), eluent application bar (C), metal spring for the plate positioning (D), glass cover (E) [58]



Rys. 2. Mikrokomora TLC pracująca z zewnętrznym termostatem cyrkulacyjnym, umożliwiającym precyzyjne kontrolowanie temperatury rozdzielania. Moduł mikrokomory TLC (A), podstawa i pokrywa pieca termostatujującego mikrokomorę (B, C), głowica termostatu cyrkulacyjnego (D)

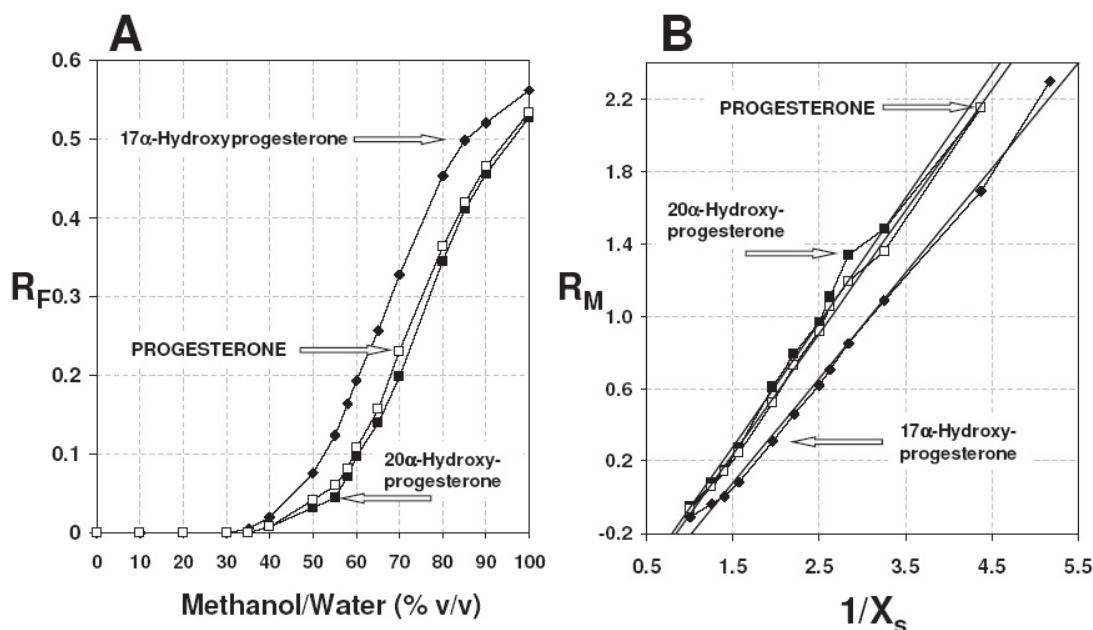
Fig. 2. Perspective view of temperature controlled micro-planar chromatography device: horizontal chamber unit (A) working inside temperature controlled metal oven (B) equipped with movable cover (C) and connected to pump head of the external liquid circulating thermostat (D)



Rys. 3. Porównanie wielkości typowej kolumnienki do SPE (wypełnionej 0.6 g fazy stacjonarnej) z modulem komory mikro-TLC [59]

Fig. 3. Size comparison of typical SPE tube (filled with 0.6 g of stationary phase) and removable horizontal micro-TLC chamber unit [59]

Uzyskane dane retencyjne na mikroplótkach RP18W z użyciem binarnych faz ruchomych metanol/woda przedstawiono na rysunku 4A. Stwierdzono, że dane retencyjne uzyskane w badanym układzie chromatograficznym można przedstawić w postaci linii prostej, stosując transformację jednostek osi X oraz Y wykresu do R_M oraz $1/X_S$. (rysunek 4B). Należy podkreślić fakt, iż zależność liniową obserwowano dla pełnego zakresu danych retencyjnych badanych sterydów, czego nie udało się, uzyskać stosując przekształcenia opisane w literaturze dla innych substancji małowcząsteczkowych (np. pestycydów) oraz układu faz normalnych [60-62].



Rys. 4. Zmierzone wartości parametru retencji R_F (wykres A) dla progesteronu i jego dwóch hydroksylowych pochodnych 17 α - oraz 20 α -hydroksyprogesteronu, na mikroplótkach pokrytych fazą stacjonarną typu RP18W oraz obliczone wartości parametru R_M (wykres B) w zależności od składu binarnej fazy ruchomej metanol/woda, wyrażonej jako odwrotność ułamka molowego składnika organicznego w wodzie ($1/X_S$)

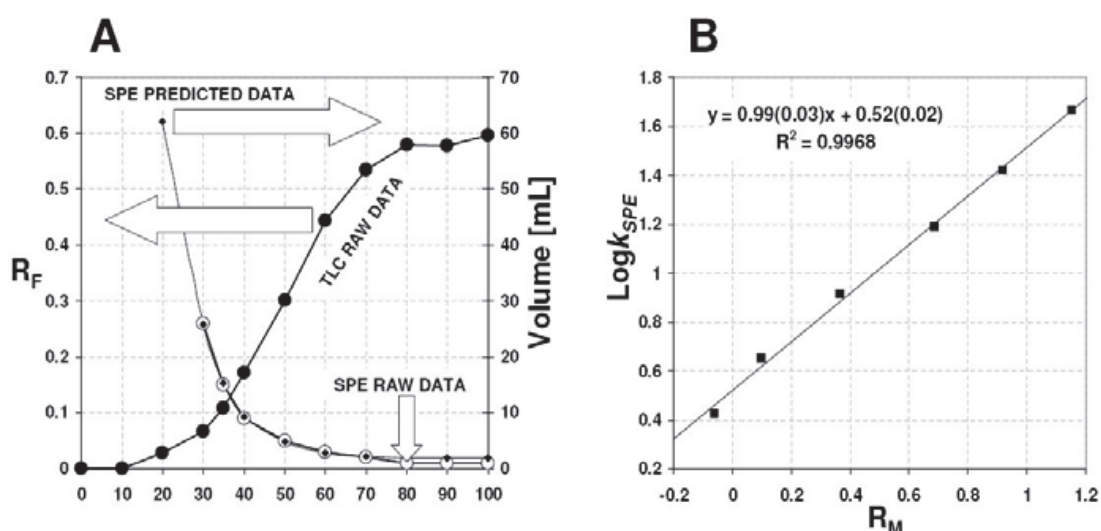
Fig. 4. R_F and R_M values of progesterone and 17 α - as well as 20 α -hydroxyprogesterone plotted against the mobile phase composition (RP18W plates), expressed as % of methanol in water (A) and a reciprocal form of the organic modifier molar fraction (B)

Uwzględniając dane przedstawione w tabeli 1 [59] wykazano, że możliwe jest oszacowania profili przebiecia kolumnienek SPE na podstawie danych retencyjnych uzyskanych z mikroplótek RP18W, zgodnie z procedurą przedstawioną na rysunku 5 [58, 59]. Sposób ten eliminuje czasochłonną analizę ilościową poszczególnych frakcji eluowanych z kolumnienek SPE, metodą wykorzystującą krzywe przebiecia złoża (rysunek 6) [63]. Metoda z zastosowaniem mikro-TLC umożliwiła dobór parametrów SPE również dla innych grup sterydów np. znacznie bardziej polarnych estrogenów [55, 59].

Tabela 1. Zależność pomiędzy wartościami parametrów retencji uzyskanymi metodą SPE oraz mikro-TLC. Współczynniki równania regresji liniowej ($\log k_{SPE} = \text{nachylenie} R_M + \text{przecięcie}$) zostały obliczone uwzględniając wybrane zakresy stężeń faz ruchomych [59]

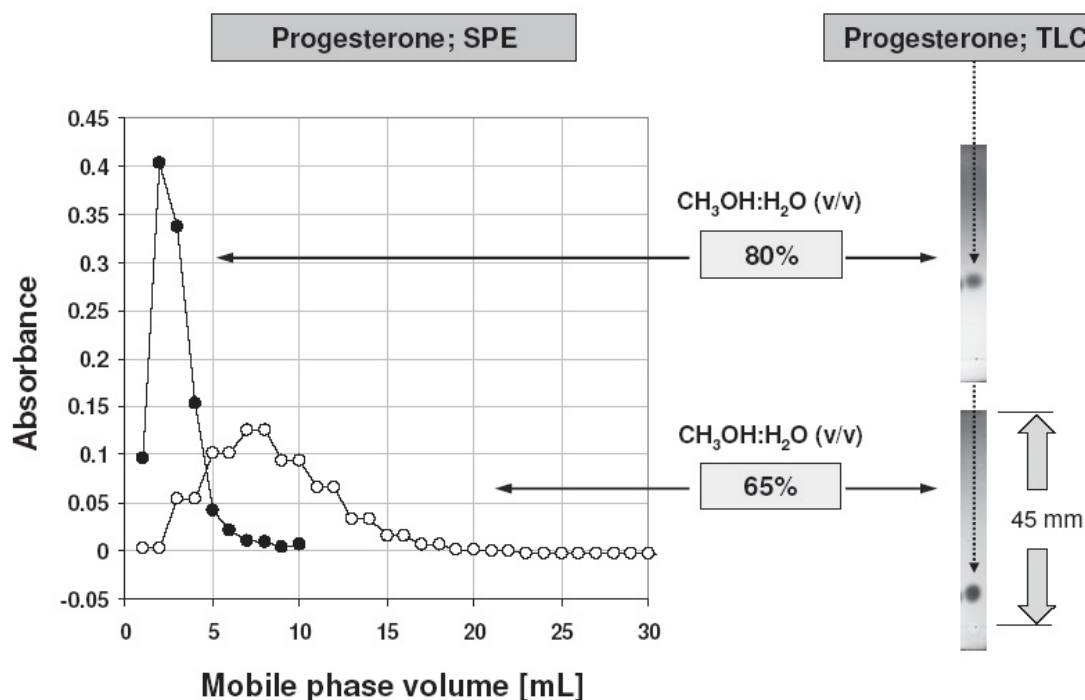
Table 1. Relationship between SPE and micro-TLC data. Slope (a) and intercept (b) coefficients of the linear-regression equation ($\log k_{SPE} = aR_M + b$) were calculated from $\log k_{SPE}$ and R_M data using selected mobile-phase concentrations [59]

STERYD (Steroid)	Zakres stężeń faz ruchomych (% v/v) (mobile phases concentration range)	n	Nachylenie (slope)	Odchylenie standardowe (standard error)	Przecięcie (intercept)
Estetrol	30-70	6	0.99	0.03	0.53
Estriol	40-80	5	1.12	0.05	0.52
Equilin	55-90	5	1.00	0.03	0.74
Estrone	50-90	5	0.94	0.05	0.75
17alpha-Hydroxyprogesterone	60-90	5	1.02	0.08	0.89
17alpha-Estradiol	60-90	4	1.04	0.05	0.7
17beta-Estradiol	50-90	6	1.22	0.08	0.44
Progesterone	65-90	4	1.3	0.1	0.74
20alpha-Hydroxyprogesterone	70-90	3	1.3	0.1	0.73



Rys. 5. Wykresy ilustrujące możliwość oszacowania krzywych przebiegu kolumnienki SPE dla estetrolu, za pomocą danych chromatograficznych uzyskanych z mikro-TLC. Punkty zaznaczone dużymi czarnymi i białymi kołami przedstawione na wykresie A odzwierciedlają dane z eksperymentów prowadzonych z użyciem mikro-TLC oraz SPE. Małymi rombami na wykresie A zaznaczono punkty obliczone na podstawie zależności $\log k_{SPE} = aR_M + b$ przedstawionej na wykresie B [58]

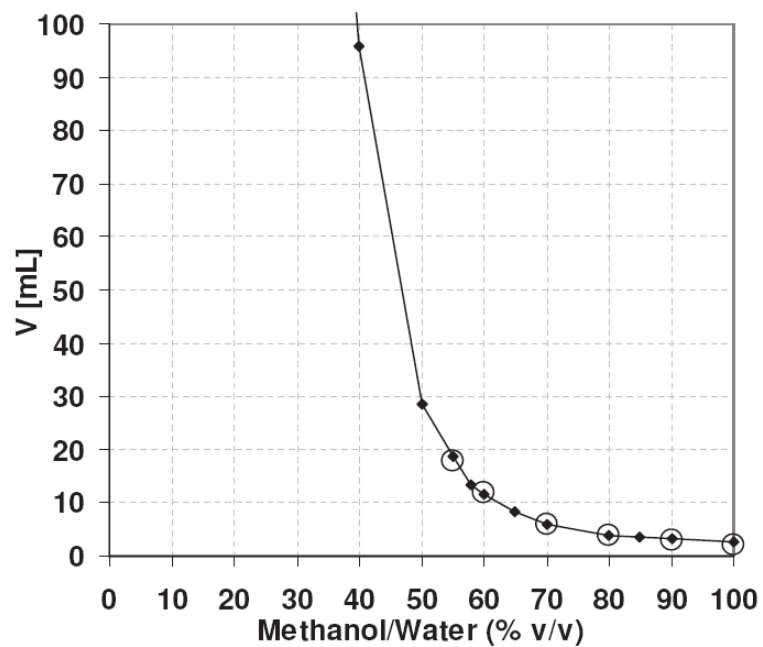
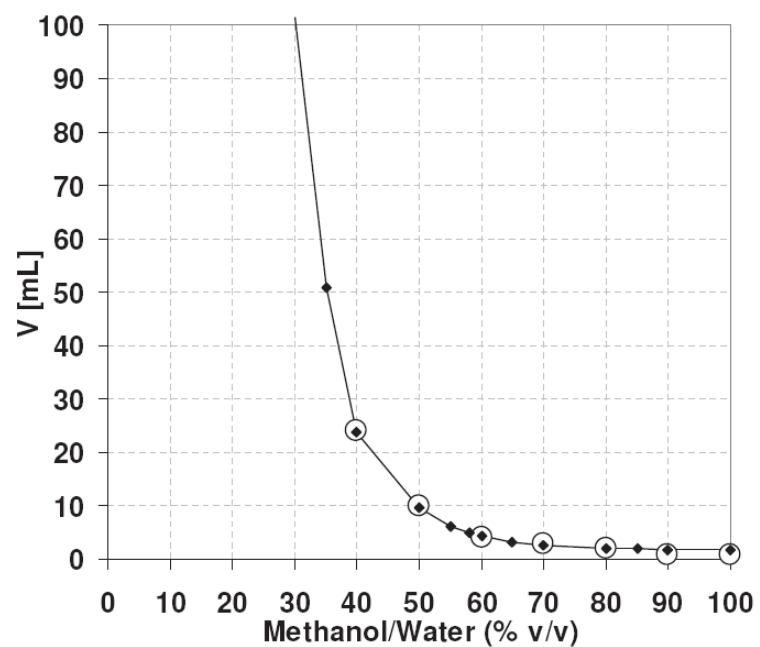
Fig. 5. Estimation of the estriol elution volumes from an SPE tube, using micro-TLC data. Circles and black dots on graph A correspond to the real elution data points obtained from SPE and micro-TLC experiments, respectively. Small black diamonds represent a back-calculated SPE elution volumes curve of estriol, using the micro-TLC data via $\log k_{SPE} = aR_M + b$ equation (graph B) [58]



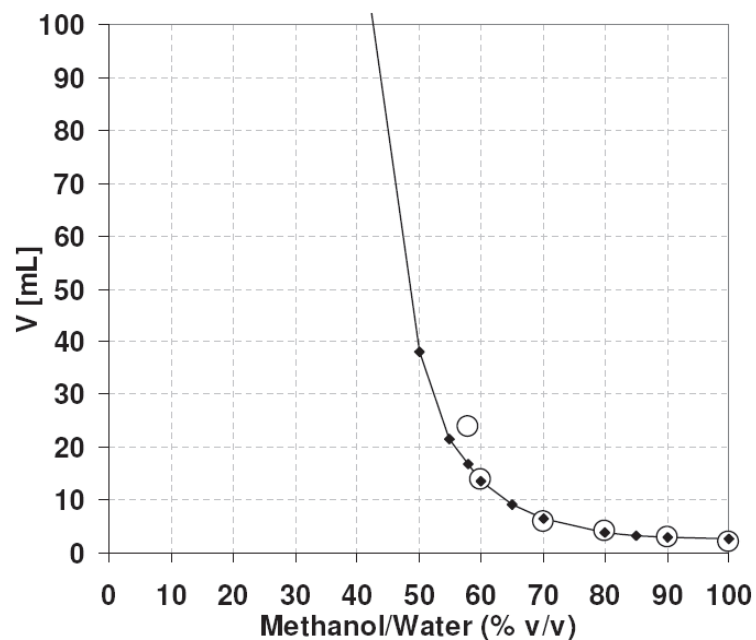
Rys. 6. Typowe profile wymywania progesteronu z kolumnienki SPE typu C18 i odpowiadające mu mikrochromatogramy wykonane przy zastosowaniu mikroplitek HPTLC RP18W oraz faz ruchomych o składzie 65 oraz 80% (v/v) metanol/woda [63]

Fig. 6. Elution profiles of progesterone from C-18 solid-phase extraction (SPE) tube and corresponding micro-TLC chromatograms obtained using RP18W plates. In both separation systems studied the retention data were obtained using eluents composed of 65 and 80% (v/v) methanol in water [63]

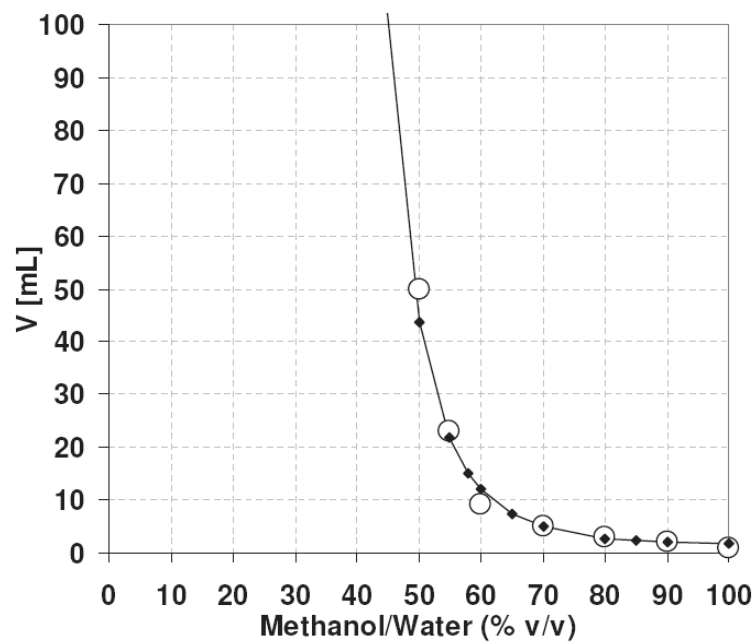
Na wykresach przedstawionych na rysunku 7 wykreślono krzywe przedstawiające obliczone objętości retencji wybranych hormonów sterydowych dla kolumnienek SPE typu C18. Obliczenia wykonano na podstawie wyznaczonych współczynników równań regresji liniowej typu $\log k_{SPE} = aR_M + b$ (tabela 1) [59]. Dla porównania, na wykresach zaznaczono również objętości retencji wyznaczone bezpośrednio z kolumnienek SPE [57]. Bardzo istotnym jest fakt, że opisana procedura może służyć w badaniach krzywych przebiecia substancji, które są przezroczyste w zakresie widma elektromagnetycznego UV-Vis, ale możliwe do detekcji za pomocą odczynników wywołujących na płytkach TLC np. kwasem fosforomolibdenowym [64]. Należy również podkreślić, iż zebrane dane chromatograficzne umożliwiają precyzyjne określenie retencji analitów dla faz ruchomych o dużej zawartości wody. Pomiar taki jest bardzo utrudniony w metodzie krzywych przebiecia, ze względu na znaczne rozmycie pasm analitów wymywanych z kolumnienek SPE eluentami o dużej zawartości wody.

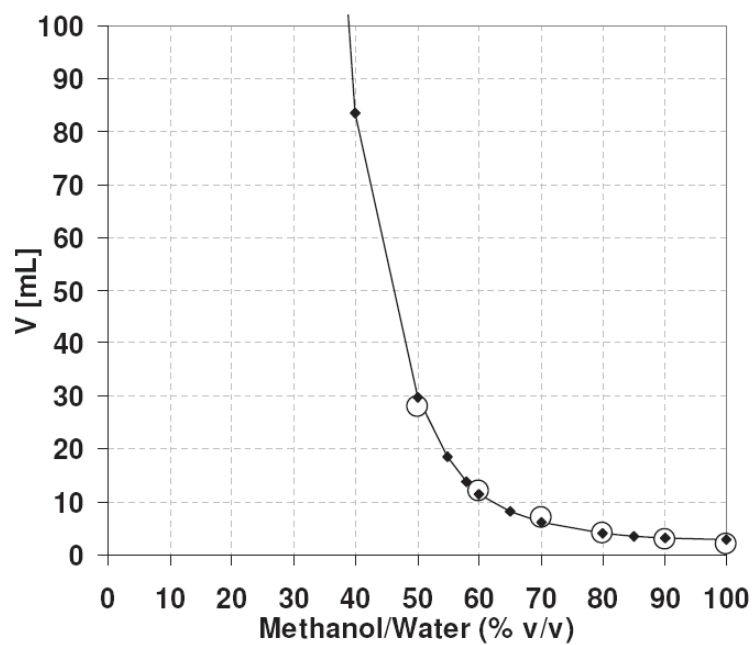
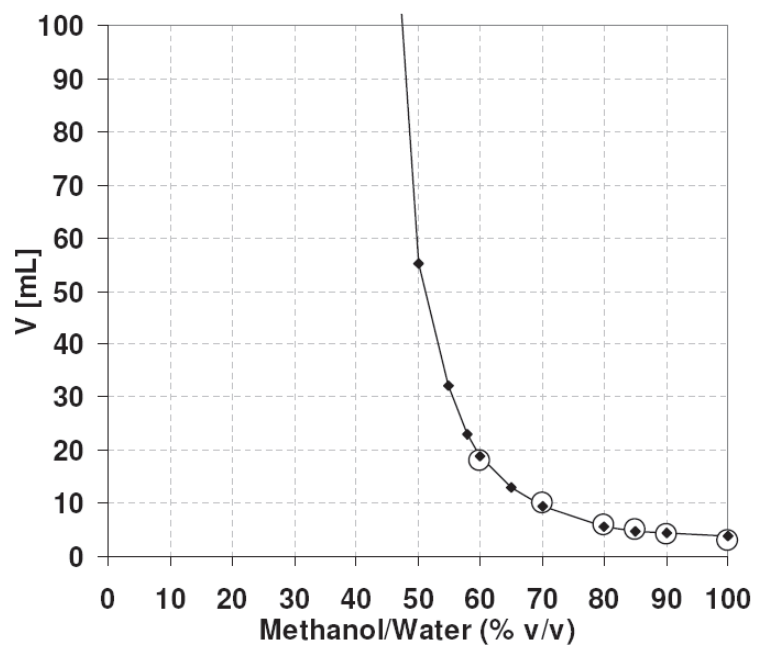
EQUILIN**ESTRIOL**

17alpha-ESTRADIOL

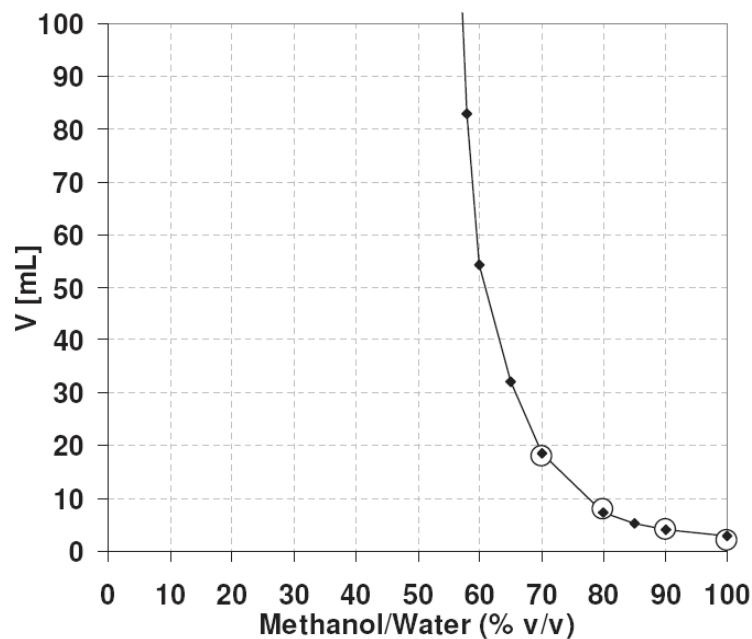


17beta-ESTRADIOL

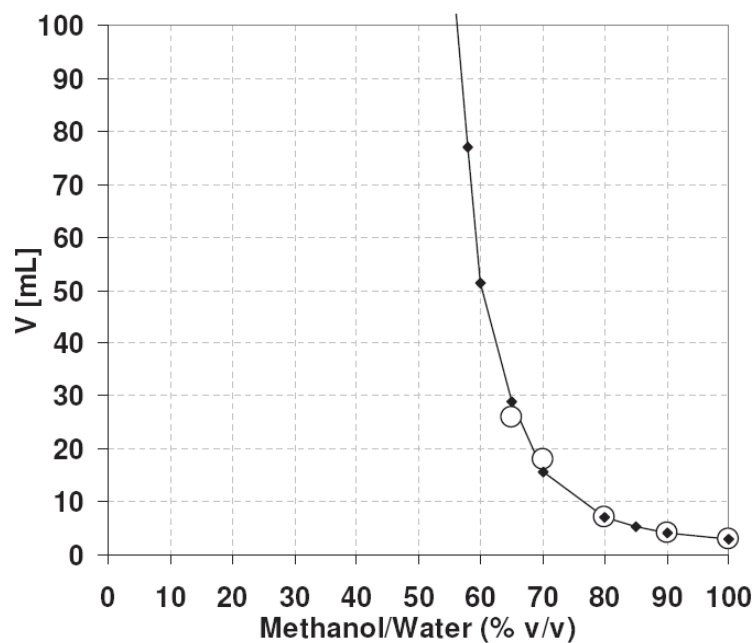


ESTRONE**17alpha-HYDROXYPROGESTERONE**

20alpha-HYDROXYPROGESTERONE



PROGESTERONE



Rys. 7. Objętości retencji wybranych hormonów sterydowych dla kolumniek SPE typu C18 obliczono na podstawie wyznaczonych współczynników równań regresji liniowej typu $\log k_{SPE} = aR_M + b$ (tabela 1) [59]. Kołami zaznaczono objętości retencji wyznaczone bezpośrednio z kolumniek SPE [57]

Fig. 7. Elution volumes of selected steroid hormones determined for C18 SPE tubes (black diamonds [57]) and calculated using the micro-TLC data via $\log k_{SPE} = aR_M + b$ equation (table 1) [59]

Literatura (Literature)

1. Merkus F.W.H.M., *Inorganic micro-thin-layer chromatography*, J. Chromatogr., **41**(1969)497-499.
2. Liwnicz B.H., *Simple adjustable holder for micro TLC plates*, Anal. Biochem., **43**(1971)620-622.
3. Svetashev V.I., Vaskovsky V.E., *A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids*, J. Chromatogr., **67**(1972)376-378.
4. Vaskovsky V.E., Dembitzky V.M., *Determination of plasmalogen contents of phospholipids classed by reaction micro-thin-layer chromatography*, J. Chromatogr., **115**(1975)645-647.
5. Frederiks W.M., Broekhoven S., *Separation and determination of lipids by one-dimensional micro-thin-layer chromatography followed by densitometry*, J. Chromatogr. A., **150**(1978)171-177.
6. Geiss F., *Fundamentals of thin layer chromatography (planar chromatography)* - Heidelberg: Hüthig, 1987.
7. Ettre L.S., Kalasz H., *The story of thin-layer chromatography*, LCGC **19**(2001)712-721.
8. Sherma J., Fried B., (Eds.), *Handbook of thin-layer chromatography*, 3rd ed., Marcel Dekker, New York, 2003.
9. Wall P.E., *Thin-layer chromatography a modern practical approach*, Springer/Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006.
10. Bouffard S.P., Katon J.E., Sommer A.J., Danielson N.D., *Development of microchannel thin-layer chromatography with infrared microspectroscopic detection*, Anal. Chem., **66**(1994)1937-1940.
11. Danielson N.D., Katon J.E., Bouffard S.P., Zhu Z., *Zirconium oxide stationary phase for thin-layer chromatography with diffuse reflectance Fourier transform infrared detection*, Anal. Chem., **64**(2002)2183-2186.
12. Musial B.A., Sommer A.J., Danielson N.D., *Microchannel thin layer chromatography with in situ plate scanning micro-DRIFTS detection using plain and polybutadiene modified zirconia stationary phases*, Applied Spectroscopy, **56**(2002)1059-1066.
13. Carrilho E., Martinez A.W., Whitesides G.M., *Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics*, Anal. Chem., **81**(2009)7091-7095.
14. Carrilho E., Phillips S.T., Vella S.J., Martinez A.W., Whitesides G.M., *Paper Microzone Plates*, Anal. Chem., **81**(2009)5990-5998.
15. Li X., Tian J. Shen W., *Quantitative biomarker assay with microfluidic paper-based analytical devices*, Anal. Bioanal. Chem., **396**(2010)495-501.
16. Lu Y., Shi W., Qin J., Lin B., *Fabrication and characterization of paper-based microfluidics prepared in nitrocellulose membrane by wax printing*, Anal. Chem., **82**(2010)329-335.
17. Martinez A.W., Phillips S.T., Whitesides G.W., Carrilho E., *Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices*, Anal. Chem., **82**(2010)3-10.

18. Morlock G.E., Oellig C., Bezuidenhout L.W, Brett M.J., Schwack W., *Miniaturized planar chromatography using office peripherals*, Anal. Chem., **82**(2010)2940-2946.
19. Hahn-Dienstrop E., *Applied thin-layer chromatography*, Wiley-VCH, New York, 2006.
20. Reich E., Schibli A., *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*, Thieme Medical Publishers, New York, 2007.
21. Waksmundzka-Hajnos M.E., Sherma J., Kowalska T., (Eds.), *Thin layer chromatography in phytochemistry*, CRC Press/Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2008.
22. Sherma J., *Planar chromatography*, Review: Anal. Chem., Article ASAP DOI: 10.1021/ac902643v, 2010.
23. Srivastava M. (Ed.) *High-performance thin-layer chromatography (HPTLC), 1st Edition*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2011.
24. Welch C.J., Brkovic T., Schafer W. Gong X., *Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC*, Green Chem., **11**(2009)1232-1238.
25. Guardia M., Armenta S., *Green solvents for analytical separation and analyses*, Encyclopedia of Analytical Chemistry, R.A. Meyers (ed.) John Wiley & Sons Ltd, 2010.
26. Gonzalez-Ruiz V., Leon A.G., Olives A.I., Martin M.A. Menendez J.C., *Eco-friendly liquid chromatographic separations based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives*, Green Chem., **13**(2011)115-126.
27. European Pharmacopoeia 5th Edition, *General monographs*, European Directorate for the Quality of Medicines, France, Strasbourg, 2004.
28. Danielson N.D., Katon J.E., Bouffard S.P., Zhu Z., *Zirconium oxide stationary phase for thin-layer chromatography with diffuse reflectance Fourier transform infrared detection*, Anal. Chem., **64**(2002)2183-2186.
29. Morlock G.E., Schwack W., *Hyphenations in planar chromatography*, J. Chromatogr. A, **1217**(2010)6600-6609.
30. Heigl N., Huck C.W., Rainer M., Najam-Ul-Haq M., Bonn G.K., *Near infrared spectroscopy, cluster and multivariate analysis hyphenated to thin layer chromatography for the analysis of amino acids*, Amino Acids, **31**(2006)45-53.
31. Zhang J.Z., Wang Y., Chen H. Shao H.B., *TLC-SERS study on evodiamine in evodia rutaecarpa*, Spectrosc. Spectral. Anal., **27**(2007) 944-947.
32. Lamparczyk H., *Analysis and characterization of steroids*, CRC Press. Boca Raton 1992.
33. Mroczek T., *Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography*, J. Chromatogr. A, **1216**(2009)2519-2528.

34. Crecelius A., Clench M.R., Richards S., *TLC–MALDI in pharmaceutical analysis*, *Current Trends In Mass Spectrometry*, **19**(2004)28-34.
35. Jautz U., Morlock G., *Efficacy of planar chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry for employment in trace analysis*, *J. Chromatogr. A*, **1128**(2006)244-250.
36. Janecki D.J., Novotny A.L., Woodward S.D., Wiseman J.M., Nurok D., *A preliminary study of the coupling of desorption electrospray ionization–mass spectrometry with pressurized planar electrochromatography*, *J. Planar Chromatogr.*, **21**(2008)11-14.
37. Harry E.M., Reynolds J.C, Bristow A.W.T., Wilson I.D., Creaser C.S., *Direct analysis of pharmaceutical formulations from non-bonded reversed-phase thin-layer chromatography plates by desorption electrospray ionisation ion mobility mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**(2009)2597-2604.
38. Kennedy J.H., Wiseman J.M., *Direct analysis of Salvia divinorum leaves for salvinatorin A by thin layer chromatography and desorption electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**(2010)1305-1311.
39. Meisen I., Wisholzer S., Soltwisch J., Dreisewerd K., Mormann M., Müthing J., Karch H., Friedrich A.W., *Normal silica gel and reversed phase thin-layer chromatography coupled with UV spectroscopy and IR–MALDI-o-TOF-MS for the detection of tetracycline antibiotics*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**(2010)2821-2831.
40. Teuber K., Riemer T., Schiller J., *Thin-layer chromatography combined with MALDI-TOF-MS and 31P-NMR to study possible selective bindings of phospholipids to silica gel*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**(2010)2833-2842.
41. Wiseman J.M., Li J.B., *Elution, partial separation, and identification of lipids directly from tissue slices on planar chromatography media by desorption electrospray ionization mass spectrometry*, *Anal. Chem.*, **82**(2010)8866-8874.
42. Perez-Palacios T., Ruiz J., Antequera T., *Improvement of a solid phase extraction method for separation of animal muscle phospholipid classes*, *Food. Chem.*, **102**(2007)875-879.
43. Zarzycki P.K., Włodarczyk E., Baran M.J., *Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography II. Fast screening of free steroids and related low-molecular-mass compounds fraction in the environmental samples derived from surface waters, treated and untreated sewage waters as well as activated sludge material*, *J. Chromatogr. A.*, **1216**(2009)7612-7622.
44. Lim K.B., Ozbal C.C., Kassel D.B., *Development of a high-throughput online solid-phase extraction/tandem mass spectrometry method for cytochrome P450 inhibition screening*, *J. Biomolecular Screening*, **15**(2010)447-452.
45. Abdolmohammad-Zadeh H., Kohansal S., Sadeghi G.H., *Nickel–aluminum layered double hydroxide as a nanosorbent for selective solid-*

- phase extraction and spectrofluorometric determination of salicylic in pharmaceutical and biological samples*, *Talanta*, **84**(2011)368-373.
46. Tippins B., *Solid phase extraction fundamentals*, *Nature*, **334**(1988) 273-274.
 47. Clifton V.L., Bisits A., Zarzycki P.K., *Characterization of human fetal cord blood steroid profiles in relation to fetal sex and mode of delivery using temperature-dependent inclusion chromatography and principal component analysis (PCA)*, *J. Chromatogr. B*, **855**(2007)249-254.
 48. Pawliszyn J., *Applications of solid phase microextraction*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
 49. Hinshaw J.V., *Solid-phase microextraction*, LC•GC Europe December 2003, 1-5.
 50. Queiroz M.E.C., Lanças F.M., *Practical tips on preparing plasma samples for drug analysis using SPME*, *LCGC North America*, **22**(2004)970-980.
 51. Ogawa M., Saito Y., Shirai S., Kiso Y., Jinno K., *Determination of Bisphenol A in water using a packed needle extraction device*, *Chromatographia*, **69**(2009)685-690.
 52. Zarzycki P.K., *Wybrane elementy teorii i praktyki chromatografii cieczowej*, Monografia Wydziału Budownictwa i Inżynierii Środowiska Nr 26, Wydawnictwo Uczelniane Politechniki Koszalińskiej, Koszalin 2006.
 53. Perez-Palacios T., Ruiz J., Antequera T., *Improvement of a solid phase extraction method for separation of animal muscle phospholipid classes*, *Food. Chem.*, **102**(2007)875-879.
 54. Ozretich R.J., Schroeder W.P., *Determination of selected neutral priority organic pollutants in marine sediment, tissue, and reference materials utilizing bonded-phase sorbents*, *Anal. Chem.*, **58**(1986)2041-2048.
 55. Włodarczyk E., *Znaczenie i występowanie wybranych substancji typu EDCs w środowisku*, Rozprawa doktorska, Koszalin 2009.
 56. Seibert D.S., Poole C.F., *A general model for the optimization of sample processing conditions by solid-phase extraction applied to the isolation of estrogens from urine*, *J. High Resol. Chromatogr.*, **21**(1998) 481-490.
 57. Zarzycki P.K., Kulhanek K.M., Smith R., Clifton V.L., *Determination of steroids in human plasma using temperature-dependent inclusion chromatography for metabolomic investigations*, *J. Chromatogr. A*, **1104** (2006)203-208.
 58. Zarzycki P.K., *Simple horizontal chamber for thermostated micro-thin-layer chromatography*, *J. Chromatogr. A*, **1187**(2008)250–259.
 59. Zarzycki P.K., Włodarczyk E., Zarzycka M.B., Głód B.K., *Optimization of a solid-phase extraction protocol for fractionation of selected steroids using retention data from micro thin-layer chromatography*, *Anal. Sci.*, **25**(7)(2009)935-939.
 60. Soczewiński E., in: Issaq H.J. (ed.), *A century of separation science: quantitative retention–eluent composition relationships in partition and adsorption chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2002.

61. Tuzimski T., Soczewiński E., *Retention and selectivity of liquid-solid chromatographic systems for the analysis of pesticides*. Problems of Science, Teaching and Therapy. No 12, Medical University of Lublin, Lublin 2002.
62. Tuzimski T., Soczewiński E., *Use of a database of plots of pesticide retention (R_F) against mobile-phase composition. Part I. Correlation of pesticide retention data in normal- and reversed-phase systems and their use to separate a mixture of ten pesticides by 2D TLC.*, Chromatographia, **56**(2002)219-223.
63. Zarzycki P.K., Ślęczka M.M, Zarzycka M.B., Bartoszek M.A., Włodarczyk E., Baran M.J., *Temperature-controlled micro-TLC: a versatile green chemistry and fast analytical tool for separation and preliminary screening of steroids fraction from biological and environmental samples*, J. Steroid Biochem., (2011); praca w druku.
64. Modzelewski T., Włodarczyk E., Harasimiuk F.B., Zarzycka M.B., Baran M., Zarzycki P.K., „Prosty przyrząd do wizualizacji plamek w chromatografii cienkowarstwowej w warunkach podwyższonej temperatury”, *Simple device for TLC spots visualisation at elevated temperatures*, Pomiary Automatyka Kontrola, **4**(2008)184-186.