

# VYUŽITÍ FIELD-FLOW FRAKCIONACE PRO MĚŘENÍ VLASTNOSTÍ MAKROMOLEKUL A ČÁSTIC

JOSEF CHMELÍK

Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno

Práce je věnována památce profesora J. Calvina Giddingse

Došlo dne 3.XI. 1998

Klíčová slova: Field-flow frakcionace, makromolekuly, částice

## Obsah

1. Úvod
2. Princip FFF a možnosti jejího využití
3. Teoretický popis
  - 3.1. Terminologie
  - 3.2. Teoretické základy
4. Měření pomocí FFF
  - 4.1. Brownovský mod
  - 4.2. Sterický eluční mod
  - 4.3. Fokusační eluční mod
5. Závěr

## 1. Úvod

Field-flow frakcionace (FFF) je relativně nová skupina flexibilních elučních technik schopných současné separace a charakterizace analytů. Rozsah velikostí látek, které jsou analyzovány pomocí FFF, je zhruba od jednotek nanometrů do stovek mikrometrů a zahrnuje látky anorganického, biologického i syntetického původu, které často mají velký průmyslový, biomedicínský a ekologický význam. Využití různých fyzikálních polí dovoluje separovat komplexní vzorky jednotlivými FFF technikami podle určitých fyzikálních vlastností a tím zjednodušit další postup jejich charakterizace. Vlastnosti měřitelné pomocí FFF zahrnují hmotnost, velikost, hustotu, difuzní koeficient, tvar, plasticitu, náboj, izoelektrický bod, koeficient termální difuze aj. Díky elučnímu charakteru FFF je spojení s dalšími technikami charakterizujícími jiné vlastnosti nebo stejnou vlastnost při využití jiného fyzikálního principu, ať již v on-line nebo off-line modu, snadné.

Pro charakterizaci makromolekul a částic existuje celá řada metod založená na různých principech<sup>2,3</sup>, které zpravidla poskytují spolehlivé výsledky v případě jednoduchých vzorků s úzkou distribucí vlastností, zatímco v případě složitých směsí se účinnost těchto metod snižuje. Studium polydisperzních směsí makromolekul a částic vyžaduje zpravidla jako klíčový krok separaci, která tyto vzorky zjednoduší rozdělením na frakce vhodné pro další analýzu a měření. Současný rychlý rozvoj studia a využití makromolekulárních a částicových materiálů v mnoha oblastech vědy a technologie vyža-

duje zlepšené separační metody s větším rozsahem použití a rozlišením. Rovněž pro biomedicínský výzkum je často nezbytná separace komplexních vzorků biologických makromolekul a částic, které zpravidla vyžadují fyziologické podmínky. FFF splňuje většinu těchto požadavků díky vysoké selektivitě a rychlosti separace, snadnému odběru frakcí, relativně jednoduchému spojení s dalšími měřicími metodami, velkému rozsahu velikostí analytů a možnosti měření za relativně mírných podmínek, což je významné u biologických materiálů. Pro charakterizaci analytů je zvláště významná možnost simultánního měření vlastností z elučních dat<sup>4</sup>.

Možnostmi FFF pro charakterizaci makromolekul a částic se zabývá tento příspěvek. Nezabývá se detailně experimentálními zařízeními a postupy, ani není zamýšlen jako souhrnný přehled výsledků FFF (přehledy tohoto typu byly již v Chemických listech publikovány<sup>5,6</sup>), nýbrž je zaměřen na měření různých vlastností analytů pomocí jednotlivých technik FFF. Z tohoto důvodu se nezabývá všemi technikami (a subtechnikami), které byly navrženy, ale pouze těmi, které již byly použity pro měření nebo vykazují potenciál pro taková měření.

V průběhu více než 30 let své existence se FFF vyvinula do celé řady technik a pro dokonalý popis a interpretaci výsledků je nezbytná jednoznačná terminologie. Taková terminologie v současnosti chybí, což způsobuje nedorozumění především u těch výsledků, kde se uplatňuje fokusační eluční mod, který nebyl zahrnut v původním konceptu FFF<sup>1</sup>, ale problémy jsou i s popisem základních rozměrů separačního kanálu či způsobu označování jednotlivých technik. Z tohoto důvodu je součástí tohoto příspěvku návrh nové terminologie, která usnadní interpretaci výsledků získaných pomocí FFF.

## 2. Princip FFF a možnosti jejího využití

FFF je založena na současném působení laminárního toku nosné kapaliny uvnitř separačního kanálu a externího fyzikálního pole (působícího kolmo na směr toku) na analyzované látky<sup>1</sup>. Z toho je zřejmé, že FFF kombinuje prvky elučních metod a metod založených na působení externích silových polí. Působení fyzikálních polí ve FFF, které ji odlišuje od chromatografie, je nekonvenční, neboť použitá pole nezpůsobují separaci přímo, ale svým působením vyvolávají pohyb složek vzorku do různých proudnic laminárního toku nosné kapaliny. Nestejné rychlosti proudnic způsobují rozdílnou migraci složek analyzovaného vzorku a tím jejich separaci, která probíhá v podélném směru kanálu, tj. kolmo na směr působení polí. Právě tato vzájemně kolmá orientace směru působení polí a směru separace odlišuje FFF od klasických metod založených na působení polí (např. centrifugace, elektroforéza). Protože geometrie separačního kanálu a rychlostní profil toku nosné kapaliny jsou ve FFF dobře definovány, mohou být vlastnosti analyzovaných látek poměrně přesně vypočteny z teoretických vztahů pro retenční poměr na základě experimentálně změřených elučních časů. Změnami silového pole lze rychle dosáhnout změn elučních časů a tak lze

Tabulka I  
Označení nejdůležitějších technik, použitých polí a měřených veličin

Název techniky	Zkratka	Použité pole	Měřená veličina
Elektrická FFF	EFFF	elektrické pole	$Q$
Toková FFF	FFFF	příčný tok nosné kapaliny	$M_r, d_p, D, V_p$
Gravitační FFF	GFFF	zemská gravitace	$m, d_p, \rho, V_p$
Centrifugační FFF	CFFF	odstředivé pole	$M_r, m, d_p, \rho, V_p$
Termální FFF	TFFF	termální gradient	$D_r, M_T$
Elutriační-gravitační FFF	EGFFF	příčný tok nosné kapaliny + gravitační pole	$m, d_p, \rho, V_p$
Izoelektrická fokusační FFF	IEFFFF	elektrické pole + pH gradient	$p/$
Sedimentační-flotační fokusační FFF	SFFFFF	gravitace + hustotní gradient	$p$

Tabulka II  
Eluční módy nejčastěji se vyskytující ve FFF

Eluční mod	Koncentrační profil	Poloha koncentračního maxima	Retenční poměr $R^a$
Brownovský	exponenciální	dno (jinde $c \neq 0$ )	0-1
Fokusační	gaussovský	uvnitř kanálu	0-1,5
Sterický	vrstva	dno (jinde $c = 0$ )	0-1

<sup>a</sup> Pro částice  $0 < r \leq w/2$

flexibilně ovlivňovat retenci různých analytů a využívat programování pole pro optimalizaci separace.

Výhodou FFF ve srovnání s chromatografií (obě metody využívají zhruba stejné experimentální zařízení, pouze chromatografická kolona je nahrazena separačním kanálem a jeho příslušenstvím) je mnohem menší mezifázový povrch mezi stacionární a mobilní fází. To je významné zejména pro analýzu makromolekul a částic, neboť tyto druhy analytů jsou zpravidla povrchově aktivní a velmi často se adsorbují na různé povrchy nebo s nimi reagují. Významnou výhodou FFF je flexibilita jejich technik (retence analytů je řízena velikostí použitého pole a v některých případech i průtokem nosné kapaliny, což jsou parametry, které lze snadno změnit), kterou užívané chromatografické techniky nemají. Na druhou stranu je nutno říci, že většina polí není tak selektivní jako chromatografické fáze a ani není dostatečně silná, aby byla schopna účinně zadržet nízkomolekulární látky. Z toho vyplývá, že obě techniky jsou svým způsobem komplementární: FFF je vhodnější pro separaci a charakterizaci vysokomolekulárních látek a částic, zatímco chromatografie je dominantní pro analýzu nízkomolekulárních látek (ale samozřejmě existuje celá řada velmi důležitých aplikací chromatografie pro separaci makromolekul).

### 3. Teoretický popis FFF

#### 3.1. Terminologie

Jak již bylo řečeno, je jednoznačná terminologie nezbytným předpokladem pro správnou interpretaci FFF měření.

V české literatuře se pro FFF někdy používá termín „frakcionace tokem v poli“, ačkoliv toto označení vcelku vystihuje podstatu separačního děje, domnívám se, že je vhodnější název nepřekládat, a používat field-flow frakcionace, tak jako používáme termíny elektroforéza a chromatografie a nikoliv jejich překlady do češtiny.

Prvním problémem je pojmenování a označování technik. Původní koncepce - nazvat techniku pomocí použitého pole a označit jeho jednopísmenovou zkratkou doplněnou o zkratku FFF (např. EFFF pro elektrickou field-flow frakcionaci) - byla později rozšířena<sup>7</sup> na dvoupísmenové zkratky pro pole a doplněna o dvoupísmenovou zkratku označující eluční mod, takže označení elektrické field-flow frakcionace pak bylo EI/NIFFF. Avšak jak bude ukázáno v kapitole o teoretických základech, eluční mod nezávisí jen na silovém poli, ale také na vlastnostech analyzované látky. To znamená, že v průběhu jedné separace se v případě rozdílných částic mohou uplatňovat různé eluční módy, což bylo prokázáno experimentálně<sup>8</sup>. Navíc tento způsob označování vede někdy k nejasnostem, např. izoelektrická fokusační field-flow frakcionace (IEFFFF) je podle rozšířené terminologie nazývána EI/HyFFFF, což nevystihuje její podstatu a může vést k záměně např. s field-flow frakcionací v elektrickém poli s využitím hydrodynamických sil, která vůbec nevyužívá principu izoelektrické fokuse a neseperuje látky podle jejich izoelektrického bodu, ale podle elektrického náboje a velikosti částice.

Domnívám se, že původní terminologie byla vhodnější. Z tohoto důvodu jsou v navrhované terminologii jednotlivé techniky označovány primárně co nejstručnějším označením silového pole, případně principu v případě kombinované techniky ve spojení se zkratkou FFF (viz tabulka I). Typ elučního modu není v navrhované terminologii součástí názvu techniky, což nesnižuje jeho význam. Spíše naopak, eluční mod musí být určen pro každý analyt v dané separaci, aby bylo možné použít správný vzorec pro retenční poměr a pomocí něj vypočítat správnou hodnotu studované vlastnosti.

Ve FFF se nejčastěji vyskytují tři eluční módy (brownovský, sterický a fokusační - tabulka II). K nim můžeme přidat ještě některé další, které se vyskytují zřídka. Tyto minoritní eluční módy jsou založeny např. na použití cyklických polí, sekundárních rovnováh, kombinaci s chromatografií. Přestože tyto módy mají určitý potenciál pro měření vlastností makromolekul a částic, nebudeme se jimi blíže zabývat, neboť tyto vlastnosti mohou být efektivněji stanoveny pomocí jiných metod.

Dalším problémem (především v anglické terminologii) je označení rozměrů kanálu. Nejvíce matoucí je použití  $w$  pro výšku (height), čímž se myslí jeho tloušťka (thickness) ve směru silového pole, jehož působení je naštěstí téměř ve všech pracích popisováno ve směru osy  $x$ . Označení  $w$  se občas zaměňuje se šířkou kanálu (width), která bývá většinou označována  $b$  (breadth) - naštěstí vždy je tento rozměr ve směru osy  $y$ . Nejméně problémů je s délkou kanálu  $L$  ve směru osy  $z$  (viz tabulka III a obr. 1).

Tabulka III

Přehled označení rozměrů frakcionačních kanálů a jejich orientace

Rozměr	Označení	Osa	Poznámka
Výška	$w$	$x$	směr pole
Šířka	$b$	$y$	kolmo na pole i tok
Délka	$L$	$z$	směr toku

### 3.2. Teoretické základy

Koncentrační profil analytu ve FFF můžeme vypočítat z obecné transportní rovnice

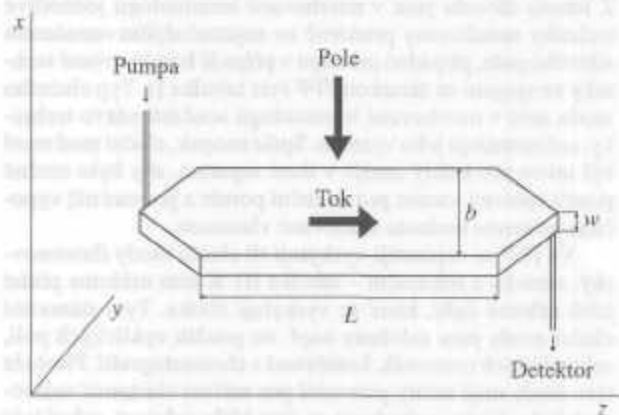
$$J = Wc - DVc \quad (1)$$

kde  $J$  označuje tok analytu,  $W$  je transportní rychlost analytu, která je součtem ( $W = U + v$ ) transportní rychlosti  $U$  vyvolané působením silového pole a transportní rychlosti  $v$  vyvolané působením toku,  $c$  je koncentrace analytu,  $D$  reprezentuje součet všech příspěvků k efektivní difuzi a  $V$  je operátor gradientu.

Pro výpočet koncentračního profilu ustálené zóny lze použít jednorozměrnou transportní rovnici

$$J_x = W_x c(x) - D \frac{5c}{x} \quad (2)$$

kde  $J_x$ ,  $W_x = U_x + v_x$  a  $c(x)$  jsou složky ve směru osy  $x$ . Protože



Obr. 1. Schematické znázornění kanálu pro FFF, popis jeho rozměrů a orientace v souřadném systému

směr toku nosné kapaliny uvnitř kanálu je kolmý na osu  $x$  pak  $v_x = 0$  a tedy platí, že  $W_x = U_x$

Pro výpočet koncentračního profilu analytu lze využít Giddingsova postupu<sup>7</sup>: pro ustálenou zónu platí podmínka

$$\delta t \quad (3)$$

a z rovnice kontinuity vyplývá vztah

$$\frac{\delta c}{8f} = \frac{5A}{5A} \quad (4)$$

Obecné řešení koncentračního profilu má tvar

$$c(x) = c_0 e^{-\int \left(\frac{U_x}{D}\right) dx} \quad (5)$$

Jednotlivá konkrétní řešení jsou pak závislá na průběhu silového pole, které vyvolává pohyb analytu a na poměru velikostí  $U_x$  a  $D$ . Giddings<sup>9</sup> získal z Taylorova rozvoje  $U(x)$  při zanedbání vyšších členů pro transportní rychlost vztah

$$U_x = -ax^n \quad (6)$$

kde  $a$  je konstanta a  $n$  se rovná 0 nebo 1. Příklad  $n = 0$  znamená konstantní  $U_x$ , případ  $n = 1$  znamená závislost  $U_x$  na poloze v kanálu.

a) Rychlost pohybu analytu vyvolaná silovým polem je v separačním kanálu konstantní a srovnatelná s rychlostí pohybu analytu vyvolanou jeho difuzí ( $U_x = \text{konstanta}$ ,  $U_x t \approx \sqrt{2Dt}$ , kde  $t$  je čas). Výsledný koncentrační profil analytu je exponenciální

$$c(x) = c_0 e^{-\frac{U_x x}{D}} \quad (7)$$

kde  $c_0$  je maximální koncentrace u akumulační stěny kanálu. Eluční mod s exponenciálním koncentračním profilem se v FFF nazývá brownovský (dříve se tento mod nazýval normální nebo klasický).

b) Rychlost pohybu analytu vyvolaná silovým polem je v separačním kanálu konstantní a mnohem větší než rychlost pohybu analytu vyvolanou jeho difuzí ( $U_x = \text{konstanta}$ ,  $U_x t \gg \sqrt{2Dt}$ ). V tomto případě tvoří částice vrstvu na akumulační stěně a nikde jinde se nevyskytují (poloměr částic  $r_p$  udává vzdálenost středu částic od akumulační stěny).

$$c(r_p) = c_0 \quad \text{a} \quad c(x \neq r_p) = 0 \quad (8)$$

Tento eluční mod se nazývá sterický.

c) Rychlost pohybu analytu  $U_x$  vyvolaná silovým polem je závislá na poloze v separačním kanálu ( $U_x \neq \text{konstanta}$ ). Na základě rovnice (6) lze nekonstantní transportní rychlost v kanálu vyjádřit rovnicí

$$U_x = -ax \quad (9)$$

jejímž dosazením do rovnice (5) získáme vztah pro výsledný koncentrační profil

$$c(x) = c_0 e^{-\frac{\lambda}{2D}(x-s)^2} \quad (10)$$

kde  $c_0$  představuje maximální koncentraci analytu ve středu zóny ve vzdálenosti  $s$  od akumulační stěny kanálu, kde výslednice působících sil se rovná nule. Koncentrační profil analytu je gaussovský a eluční mod se nazývá fokusační.

Schematické znázornění separace analytů různými elučními mody ve FFF je znázorněno na obr. 2. V brownovském elučním modu jsou koncentrační profily analytů A a B znázorněny dvěma různě vysokými exponenciálami. Částice A jsou více ovlivněny působícím polem než částice B, což znamená, že těžiště jejich zóny je blíže akumulační stěně kanálu než těžiště částic B. To má za následek, že částice B se pohybují kanálem rychleji a jsou eluovány dříve než částice A.

Ve sterickém modu je rozhodující vlastností pro rychlost eluce průměr částic, neboť všechny částice leží na akumulační stěně kanálu. Působením toku kapaliny s parabolickým rychlostním profilem se tedy rychleji pohybují částice, které zasahují do oblastí vyšších průtokových rychlostí, tj. částice většího průměru. To znamená, že větší částice D se pohybují kanálem rychleji než menší částice C.

Ve fokusačním modu závisí rychlost eluce na vzdálenosti fokusovaných zón od akumulační stěny kanálu, což vysvětluje proč je analyt F, který je fokusovaný ve větší vzdálenosti od akumulační stěny kanálu, eluován rychleji než analyt E.

Eluční chování analytů ve FFF lze popsat pomocí retenčního poměru definovaného jako poměr střední rychlosti pohybu zóny analytu v kanálu  $v_A$  a střední lineární rychlosti toku kapaliny  $v_K$  nebo jako poměr elučního času (resp. objemu) nezadržované látky  $t_0(V_0)$  k elučnímu času (resp. objemu) zadržované látky  $t_c(V_c)$ .

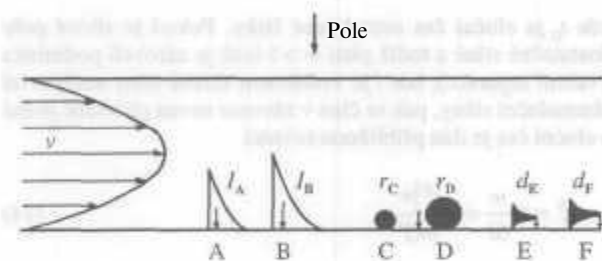
$$R = \frac{\bar{v}_A}{\bar{v}_K} = \frac{t_0}{t_c} = \frac{V_0}{V_c} = \frac{\langle c(x)v(x) \rangle}{\langle c(x) \rangle \langle v(x) \rangle} \quad (11)$$

kde lomené závorky označují střední hodnotu a  $c(x)$  a  $v(x)$  udávají hodnoty koncentrace analytu a rychlost proudnice nosné kapaliny v souřadnici  $x$ . Dosazením koncentračních profilů analytu v jednotlivých modech dostaneme řešení, které se dá přibližně vyjádřit shodně pro všechny tři mody ve formě

$$R = 6q \quad (12)$$

kde  $q$  reprezentuje v brownovském modu parametr  $\lambda - D/(Ww)$ , ve sterickém modu parametr  $a = r_p/w$  a ve fokusačním modu parametr  $\delta = s/w$ . V případě brownovského modu parametr  $\lambda$  reprezentuje poměrnou vzdálenost těžiště zóny analytu od akumulační stěny kanálu. Ve sterickém modu  $a$  reprezentuje poměrnou vzdálenost středu částice od akumulační stěny, po níž se pohybuje, absolutní hodnota této vzdálenosti se rovná poloměru částice. Ve fokusačním modu  $\delta$  reprezentuje relativní vzdálenost středu fokusované zóny od akumulační stěny ( $s$  udává vzdálenost absolutní).

Přes tuto formální podobnost existují mezi jednotlivými elučními mody značné rozdíly. Například pro částice stejné hustoty může dojít s rostoucí velikostí částic ke změně elučního pořadí v důsledku změny elučního modu. Pro částice v brownovském modu platí, že menší jsou eluovány dříve než



**Obr. 2. Schematické znázornění separace analytů působením různých elučních módů ve FFF. Koncentrační profily analytů A a B, separovaných v brownovském elučním modu, jsou znázorněny dvěma různě vysokými exponenciálami. Ve sterickém modu jsou separovány částice C a D a ve fokusačním modu analyty E a F znázorněné gaussovskými koncentračními profily ve směru působení pole**

větší. Avšak od určité velikosti částic je sedimentační působení způsobené jejich hmotností větší než termální energie vyvolávající jejich difuzní pohyb, čímž dojde ke změně elučního modu na sterický, při kterém jsou eluovány dříve větší částice než menší. Tím dojde ke změně elučního pořadí, což může způsobit problémy při interpretaci experimentálních výsledků.

#### 4. Měření pomocí jednotlivých technik FFF

Vlastnosti analytů lze charakterizovat z naměřených elučních časů (nebo retenčního poměru). Jak již bylo řečeno, pro interpretaci výsledků je nutné znát typ elučního modu pro daný analyt (nejen pro celou danou separaci, neboť jak již bylo uvedeno výše, v závislosti na vlastnostech jednotlivých analytů se mohou jejich eluční mody lišit). Dále je také nutné minimalizovat všechny nežádoucí interakce (především interakce mezi částicemi a stěnami kanálu) a také pracovat s vhodným množstvím vzorku, neboť při větších nastříknutých množstvích do kanálu dochází k tzv. „overloading“ efektům<sup>10</sup>, které způsobují podobně jako interakce se stěnami deformace pík a tím změny retenčního poměru, což má za následek nesprávné hodnoty měřených vlastností.

Změny elučního modu jsou často důsledkem konečných velikostí analytů a jejich interakcí s tokem nosné kapaliny, s takzvanými hydrodynamickými silami<sup>8,9</sup> (HDS). Tyto síly, jejichž podstata nebyla dosud vysvětlena, způsobují laterální pohyb analytů od stěny kanálu a zkracují tak eluční časy (zvyšují retenční poměr), což opět způsobuje chyby ve výpočtu. Protože velikost HDS je závislá na rychlosti toku nosné kapaliny, mění se s průtokovou rychlostí i retenční poměr, zatímco v případech brownovského a sterického elučního modu je retenční poměr na průtok nezávislý. To znamená, že stačí provést separaci při dvou různých průtocích a podle retenčních poměrů odlišit tokem nosné kapaliny vyvolaný fokusační eluční mod od brownovského a sterického.

Separace využívající brownovského elučního modu byly nejvíce používány a prostudovány. Eluční čas zadržované látky v brownovském modu je dán rovnicí

$$t_c^b = t_0 \left[ \frac{F|w}{6kT} \left( \coth \frac{F|w}{2kT} - \frac{2kT}{F|w} \right) \right]^{-1} \quad (13)$$

kde  $t_0$  je eluční čas nezadržené látky. Pokud je silové pole dostatečně silné a tudíž platí  $w > 1$  (což je zároveň podmínka kvalitní separace), kde  $Z$  je vzdálenost těžiště zóny analytu od akumulační stěny, pak se člen v závorce rovná přibližně jedné a eluční čas je dán přibližnou rovnicí

$$t_e^b = t_0 \frac{w}{6l} = t_0 \frac{|F|w}{6kT} \quad (14)$$

Z této rovnice vyplývá, že eluční čas je úměrný síle použitého pole a jeho charakter zároveň určuje, jakou vlastnost analytu bude možné měřit.

V případě sterického modu je působení silového pole větší než energie termálního pohybu. Všechny částice se pak pohybují po akumulační stěně a eluční čas je úměrný pouze velikosti částic a není závislý na působící síle:

$$t_e = \frac{t_0 w}{3d_p} \quad (15)$$

kde  $d_p$  je průměr částice.

V ustáleném stavu fokusačního elučního modu jsou částice lokalizovány v takové poloze uvnitř kanálu, kde výslednice na ně působících sil se rovná nule. Můžeme-li některou z těchto sil měnit nezávisle na ostatních, pak ze změny elučního času můžeme vypočítat změnu velikosti této síly (to je velmi významné např. pro HDS, které jsou jinak obtížně měřitelné):

$$t_e' = \frac{t_0 w}{6s} \quad (16)$$

kde  $s$  je vzdálenost středu fokusované zóny od akumulační stěny.

Z výše uvedeného je zřejmé, že FFF je metoda schopná měřit sílu působící na analyt. Překvapující je citlivost těchto měření. Pro koloidy a makromolekuly separované v brownovském modu je retenční vyvolána silami řádově  $10^{-15}$  N a změny síly o  $10^{-17}$  N mohou způsobit změnu elučního času zhruba o 10 %. Tyto síly jsou asi miliardkrát menší než síla potřebná k přerušení jedné C-C vazby. Tato vysoká citlivost je důsledkem rovnováhy sil externího pole a termální energie analytu<sup>4</sup>. V případě fokusačního elučního modu vyvolaného hydrodynamickými silami jsou měřitelné síly poněkud větší, přibližně  $10^{-14}$  až  $10^{-8}$  N.

U těch FFF technik, kde retenční poměr závisí na velikosti analytu, je eluční čas funkcí mocniny průměru analytu ( $t_e \approx d_p^n$ ), kde  $n$  se přibližně rovná selektivitě na základě velikosti  $S_d$ , která je definovaná<sup>12</sup> rovnicí

$$S_d = \left| \frac{d \log t_e}{d \log d_p} \right| \quad (17)$$

Hodnota  $n$  se pohybuje v rozmezí od 0 do 3. Vyšší hodnota  $n$  znamená vyšší selektivitu a tedy rychlejší změnu  $t_e$  se změnou velikosti analytu.

#### 4.1. Brownovský eluční mod

Rovnice, popisující síly používané v jednotlivých technikách a z nich vyplývající veličiny, které je těmito technikami

možné měřit, jsou pro sedimentační, tokovou, elektrickou a termální FFF uvedeny níže:

*Sedimentační (gravitační) FFF* je nejčastěji používanou technikou FFF pro měření vlastností analytů, neboť vyjádření působící síly je jednoduché:

$$F_s = m'G = V_p \Delta \rho G = \frac{\pi}{6} d_p^3 \Delta \rho G \quad (18)$$

$m'$  je efektivní (archimédovská) hmotnost částice ( $m' = m_p - V_p \rho_{\text{NK}}$ ),  $V_p$  je objem částice,  $\Delta \rho = \rho - \rho_{\text{NK}}$  je rozdíl hustot částice ( $\rho$ ) a nosné kapaliny ( $\rho_{\text{NK}}$ ),  $G$  je odstředivé zrychlení (v případě centrifugační FFF (CFFF), v případě gravitační FFF (GFFF) je  $G$  tíhové zrychlení Země). Z rovnice (18) je zřejmé, že tyto techniky měří efektivní (archimédovskou) hmotnost analytů. Pokud jsou známy hustoty analytu a nosné kapaliny, můžeme vypočítat skutečnou hmotnost analytu  $m$ , efektivní průměr  $d_p$  a distribuční křivky těchto veličin. Jestliže není hustota analytu známa, může být vypočtena na základě měření s nosnými kapalinami o různých hustotách<sup>13</sup>. Z rozdílu elučních časů samotných analytů a analytů s povrchově navázanými dalšími látkami můžeme vypočítat množství těchto navázaných látek, případně určit tloušťku jejich vrstvy<sup>14</sup>.

Z rovnice (18) rovněž vyplývá vysoká selektivita sedimentační FFF ( $S_d = 3$ ). Odvrácenou stranou této výhody je prodloužení elučních časů, např. pro 3 krát větší částice je jejich eluční čas delší 27krát. Tuto nevýhodu je možné překonat programováním pole<sup>15</sup>. Pomocí CFFF byla charakterizována celá řada biologických, syntetických i anorganických analytů od DNA<sup>16</sup> a proteoglykanů<sup>17</sup>, přes ekologicky zajímavé koloidy z říčních vod<sup>18,19</sup>, až po viry<sup>20</sup> a silikagelové nosiče pro HPLC<sup>21</sup>.

GFFF využívá relativně slabé zemské gravitace a proto se používá zpravidla pro nadmikronové částice, které jsou výrazně ovlivněny HDS. Tato technika a její výsledky jsou podrobněji popsány v jiném příspěvku<sup>22</sup>. CFFF a GFFF se výrazně liší v konstrukci kanálu. Zatímco kanál pro CFFF (umístěný na obvodu rotoru průtočné centrifugy) patří k nejsložitějším ze všech FFF kanálů, je kanál pro GFFF (tvořený dvěma skly oddělenými fólií, ve které je vyřiznut tvar kanálu) ze všech nejjednodušší. Právě zařízení, umožňující kontinuální průtok nosné kapaliny kanálem CFFF (zpravidla nazývané rotační průchodka), omezuje možnost dosažení velmi vysokých polí. Největší pole použitá<sup>23</sup> v CFFF jsou řádově  $10^5$  G což omezuje její použití na separace polymerů větších než  $10^6$  D a částic větších než 10 nm. Ostatní FFF techniky jsou schopny separovat i menší analyty. CFFF a ultracentrifugace se liší nejen mechanismem, ale i faktorem ovlivňujícím rychlost pohybu analytu:  $F/f$  při ultracentrifugaci ( $f$  je frikční koeficient) a  $F$  v CFFF, což usnadňuje interpretaci výsledků v této technice, jejíž další výhodou je možnost snadné optimalizace separace změnami síly pole a rychlosti toku nosné kapaliny.

*Toková (flow) FFF (FFFF)* je nejuniverzálnější technika FFF, schopná separovat analyty od velikostí asi 1 nm výše. Silové pole je realizováno příčným tokem kapaliny (kolmo na směr podélného toku) k akumulační stěně, která je tvořena permeabilní membránou (velikost jejich pórů určuje minimální velikost separovatelných analytů). Hnací silou separace je tedy viskozitní síla příčného toku působící na analyt daná Stokesovým zákonem:

$$F = f \cdot U = 3\pi\eta U d_p = kTU/D \quad (19)$$

kte poslední člen vychází ze Stokes-Einsteinova vztahu  $D = kT/f$ . Ze vztahu (19) je patrné, že eluční čas je úměrný  $d_p$  a  $D^{-1}$ . Výhodou FFFF je, že příčný tok působí na všechny analyty. Interpretace výsledků je jednoduchá, protože eluční čas je úměrný první mocnině velikosti analytu. Ačkoliv rozměrová selektivita ( $S_d = 1$ ) je menší než u SFFF, je pro separační účely dostatečná a značně vyšší než u gelové chromatografie ( $S_d = 0,2$ ). Pomocí FFFF byly měřeny difuzní koeficienty bílkovin, DNA, buněk, koloidních silikagelů, latexů atd.<sup>24-26</sup>

Elektrická FFF (EFFF) byla z počátku považována za jednu z nejnadějnějších technik vzhledem k možné vysoké intenzitě použitého elektrického pole  $E$  a snadné možnosti ovlivnění náboje analytu změnou pH nosné kapaliny. Nicméně problémy s elektrolytickou tvorbou plynů a s adsorbci analytů na membránové stěny kanálu vedly k dočasnému opuštění této techniky a teprve nedávné práce K. Caldwellové a spolupracovníků<sup>27</sup> oživily tuto techniku. Hnací síla v EFFF, která je daná rovnicí

$$F = Q \cdot E \quad (20)$$

je úměrná náboji analytu  $Q$  a separace analytů je dána rozdílem nábojů, zatímco v elektroforéze je separace založena na rozdílu elektroforetických mobilit, které jsou úměrné  $Q/f$ .

Termální FFF (TFFF) se liší od výše uvedených technik tím, že eluční časy analytů nelze vypočítat z jejich vlastností, neboť není znám vztah pro koeficient termální difuze  $D_T$ , který hraje důležitou roli v rovnici pro hnací sílu<sup>2</sup>

$$F = kT \frac{D_T}{D} \frac{dT}{dx} \quad (21)$$

Na druhou stranu, jsou-li známy difuzní koeficienty analytů, mohou měření pomocí TFFF přispět k vysvětlení mechanismu termální difuze<sup>28</sup>.

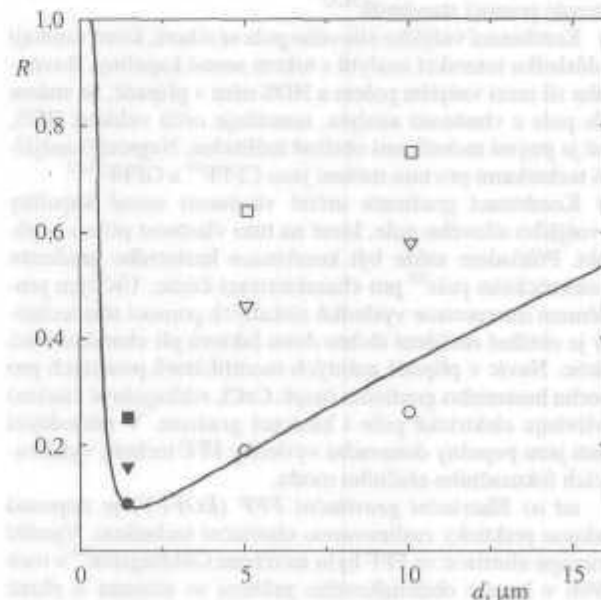
#### 4.2. Sterický eluční mod

V tomto modu se částice pohybují po akumulaci stěně kanálu (viz obr. 2) a z retenčního poměru je možné snadno spočítat jejich velikost (viz rovnice 12 a 75). Sterický mod se zdá být ideální pro měření velikostí částic, neboť při těchto měřeních by nemělo záležet na znalosti přesné hodnoty působícího pole ani průtokové rychlosti nosné kapaliny (retenční poměr na ní není závislý). Pole by mělo být tak silné, aby překonalo termální energii částic a ty vytvořily vrstvu na akumulaci stěně kanálu. Jak vyplývá z rovnice (72), retenční poměr se dá vypočítat z hodnot elučního času (nebo objemu) píku nezadržovaných látek a píku měřených částic.

Teoreticky lze tohoto modu dosáhnout zvýšením síly pole ve všech FFF technikách. Prakticky je situace komplikovaná, neboť při interakcích (např. repulse, adsorpce) analytů s akumulaci stěnou dochází často k ovlivnění jejich chování, které je ovlivněno i působením HDS, nejsilnější působící na částice právě v blízkosti stěn kanálu. Zatímco atrakce a adsorpce prodlužují eluční čas (vypočtený průměr částic je pak menší než skutečný), repulse a HDS eluční čas zkracují (vypočtený

průměr je pak větší než skutečný). V praxi se sterický mod pro měření téměř nevyužívá, neboť zabezpečení podmínek, za kterých jsou analyty eluovány v ideálním sterickém modu, je velmi obtížné. V podstatě by byl sterický mod realizovatelný při velmi malých průtokových rychlostech a pro částice, které jsou malé ve srovnání s výškou kanálu ( $d_p < 0,01 w$ ), ale přitom jsou silně ovlivněny působícím polem (tak, aby se všechny částice pohybovaly po akumulaci stěně kanálu) a neinteragovaly s materiálem, ze kterého je kanál vyroben.

Nejúspěšněji byl sterický mod využit v sedimentační FFF, kde zvýšení odstředivého pole minimalizovalo vliv HDS<sup>29</sup>. Dosažená rozměrová selektivita  $S_d$  se pohybovala kolem 0,8 (teoretická hodnota se rovná jedné), což je mnohem menší hodnota, než která je pozorována v sedimentační FFF při brownovském elučním modu. Postupné zvyšování odstředivého pole použitého k překonání působení HDS na částice dobře charakterizovaných latexů, potvrdilo teorii o působení inerciálních lift forces<sup>10a2</sup>, a současně upozornilo na existenci dodatečných sil působících v těsné blízkosti stěn kanálu. Tyto síly jsou definovány vztahem:  $F_L \sim s_0 d^3 \eta / \rho$ , kde  $s_0$  je střižná rychlost nosné kapaliny u stěny kanálu,  $\eta$  je viskozita prostředí v okolí částice a  $h$  udává vzdálenost částice od stěny kanálu. Původ těchto sil zůstává nejasný, předpokládá se, že může být spojen s lubrikačními jevy<sup>29</sup>. Z výsledků práce nicméně vyplývá, že většina experimentů neproběhla ve sterickém modu, ale ve fokusačním. Ke stejnému závěru vede i obr. 3, kde je shrnuta řada měření silikagelových částic pomocí GFFF<sup>33</sup>. Ze všech experimentů odpovídá sterickému modu pouze jeden, jeden odpovídá brownovskému modu, v jednom případě je retenční poměr menší než odpovídá sterickému modu (to může být způsobeno buď atraktivními interakcemi silikagelových částic se stěnou kanálu nebo zpožděním částic za tokem nosné kapaliny), ale ve většině



Obr. 3. Retenční poměry silikagelových částic změřené pomocí GFFF. Křivka, která odpovídá retenčním poměrům brownovskému a sterickému, je definována<sup>4</sup> rovnicí  $R = 6(a - \alpha^2) + 6\lambda(1 - 2a) [\coth((1 - 2\alpha)/2\lambda) - 2\lambda/(1 - 2\alpha)]$ . Plocha nad ní odpovídá retenčním poměrům pozorovaným ve fokusačním modu

případů je retenční poměr větší než by odpovídalo sterickému modu. Toto zvýšení je způsobeno vlivem HDS a eluční mod je fokusační.

#### 4.3. Fokusační eluční mod

Z retenčního poměru analytů eluovaných ve fokusačním modu můžeme vypočítat vzdálenost pohybující se zóny analytu od stěny kanálu, neboť v tomto modu jsou zóny analytů lokalizovány uvnitř kanálu v poloze, kde výslednice sil působících na analyt se rovná nule. Fokusace uvnitř kanálu má pozitivní důsledek v minimalizovaném kontaktu analytů se stěnami kanálu. Známe-li průběh působících sil uvnitř kanálu a jejich vztah k vlastnostem analytu, můžeme vypočítat vlastnosti částic z hodnot těchto sil v rovnovážné poloze. Známe-li až na jednu veličnost všech ostatních působících sil, můžeme vypočítat hodnotu zbývající síly. To znamená, že fokusační techniky slouží jak k měření vlastností analytů, tak k měření veličností působících sil.

Fokusace analytu v kanálu FFF může být vyvolána několika způsoby:

a) Vhodnou kombinací proti sobě působících vnějších sil. Přes zdánlivou jednoduchost nebyly dosud techniky založené na tomto principu příliš využívány. Jednou z použitých technik je elutriační-gravitační FFF, která využívá kombinace gravitačního pole a příčného toku kapaliny<sup>34,35</sup>.

b) Gradientově techniky využívají pro fokusaci tvorbu gradientů pomocí vhodné nosné kapaliny. Gradient je umístěn ve směru působícího vnějšího pole, které jej vytváří, tj. kolmo na směr toku nosné kapaliny. Prakticky byly dosud využity hustotní a pH gradienty<sup>36-39</sup>. Známe-li průběh gradientu v kanále můžeme vypočítat měřenou vlastnost. Průběh gradientu může být vypočten na základě teoretických vztahů<sup>40</sup>, změřen odebráním frakcí nosné kapaliny přímo v kanálu<sup>41</sup> nebo charakterizován pomocí standardů<sup>31,42</sup>.

c) Kombinací vnějšího silového pole se silami, které vznikají v důsledku interakcí analytů s tokem nosné kapaliny. Rovnováha sil mezi vnějším polem a HDS nám v případě, že známe sílu pole a vlastnosti analytu, umožňuje určit velikost HDS, což je jinými technikami obtížně měřitelné. Nejpoužívanějšími technikami pro tato měření jsou CFFF<sup>29</sup> a GFFF<sup>31,32</sup>.

d) Kombinací gradientu určité vlastnosti nosné kapaliny a vnějšího silového pole, které na tuto vlastnost přímo nepůsobí. Příkladem může být kombinace hustotního gradientu a elektrického pole<sup>43</sup> pro charakterizaci částic. Určitým problémem interpretace výsledků získaných pomocí této techniky je obtížné rozlišení těchto dvou faktorů při charakterizaci částic. Navíc v případě nabitých modifikátorů použitých pro tvorbu hustotního gradientu (např. CsCl, silikagelové částice) ovlivňuje elektrické pole i hustotní gradient. V následující části jsou popsány dosavadní výsledky FFF technik využívajících fokusačního elučního modu.

ad a) *Elutriační gravitační FFF (EGFFF)* je doposud jedinou prakticky realizovanou elutriační technikou. Využití principu elutriační ve FFF bylo navrženo Giddingsem<sup>34</sup> v roce 1986 v kanále obdélníkového průřezu se stěnami o různé permeabilitě pro rozpouštědlo, což vytváří rychlostní gradient příčného toku, proti kterému je aplikováno vnější silové pole. V EGFFF se zóna analytu vytváří v tom místě kanálu, kde se sedimentační rychlost analytu rovná lokální hodnotě rychlosti příčného toku. V tomto uspořádání dosud nebyla EGFFF

realizována. Separace dvou polystyrenových latexů o různých průměrech (1,6  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ ) byla provedena v kanále lichoběžníkového průřezu<sup>44</sup>, přičemž z kanálu byly nejdříve eluovány menší částice, které byly fokusovány v horní širší části kanálu, kde je sice nižší rychlost příčného toku, ale větší podélná rychlost. Relativně komplikovaný kanál a rychlostní profil toku nosné kapaliny a celková kvalita výsledků nedovolily jejich využití pro měření velikosti částic. Vzhledem k tomu, že separace látek tohoto typu lze snadněji a lépe provést jinými technikami (např. experimentálně nejjednodušší technikou GFFF), nebyla EGFFF dále vyvíjena.

ad b) *Sedimentační flotační fokusační FFF (SFFFFF)* v gravitačním poli byla první technikou, kde byl vědomě využit fokusační eluční mod<sup>36</sup>. V kanále lichoběžníkového průřezu byly separovány polystyrenové latexy od polyglycidylmetakrylátových, či různé druhy hustotních standardů<sup>31</sup>. Přestože se ukázalo, že tato technika je schopna dělit látky lišící se hustotou jen o 0,01  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , nebyla dosud vzhledem k obtížnému vyjádření rychlostního profilu toku nosné kapaliny s gradientem hustoty použita pro měření hustot částic. Pro tyto účely je jednodušší využití izopyktnické centrifugace. Původně navržená SFFFFF v odstředivém poli<sup>45</sup> nebyla dosud úspěšně realizována.

Izoelektrická fokusační FFF (IEFFFF) byla realizována v kanálech obdélníkového i lichoběžníkového průřezu<sup>37,38</sup>. Zatímco v kanálech obdélníkového průřezu se nepodařilo dosud zlepšit původní výsledky ukazující (nikoliv však prokazující) fokusaci sérumalbuminu, byly po optimalizaci experimentálního zařízení využity kanály lichoběžníkového průřezu jak k charakterizaci pH gradientu uvnitř kanálu, tak pro separace nízko- i vysokomolekulárních amfolytů<sup>9,42,46-48</sup>. Ikdyž by tato technika byla při využití p/ standardů schopná charakterizovat izoelektrické body měřených amfolytů, ukázalo se, že souběžně studovaná kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) s elektroosmotickou mobilizací fokusovaných zón amfolytů je technika s mnohem vyšší účinností a větším rozlišením<sup>49-50</sup>. IEFFFF (podobně jako SFFFFF) by mohla být využita pro mikropreparace frakcí ze směsí částic (např. živých buněk) pro další (zejména biologické) aplikace.

ad c) *Využití HDS* byla věnována značná pozornost, i když dlouhou dobu převažovala snaha se jejich působení vyhnout, neboť výsledky získané za jejich působení neodpovídaly původnímu konceptu FFF<sup>1</sup>. Nicméně později se ukázalo, že jejich z počátku nechtěné působení<sup>1</sup> přináší některé výhody: např. zrychlení separace a minimalizace kontaktu analytů se stěnami kanálu. Působení HDS bylo pozorováno jak v případě separace velkých makromolekul<sup>51</sup> tak i mikronových<sup>8</sup> a větších částic<sup>31,32,51</sup>. Podrobný popis instrumentace pro GFFF a řada aplikací jsou uvedeny v práci<sup>22</sup>.

## 5. Závěr

FFF má značný potenciál nejen pro měření vlastností makromolekul a částic, ale může být použita i pro měření sil působících na analyt. Velkou výhodou zejména pro měření vlastností složek komplexních směsí je skutečnost, že současně s měřením probíhá i separace jednotlivých komponent, což zjednodušuje interpretaci výsledků.

Nejčastěji jsou pro měření využívány separace v brownovském elučním modu, neboť v tomto modu existuje dobře

definovaný vztah mezi elučním časem a měřenou veličinou. Navíc je tento mod velice citlivý, neboť jeho princip je založen na rovnováze mezi působící silou a termální energií analytu. Určitou nevýhodou jsou interakce analytu s akumulací stěnou (kde je koncentrace analytu nejvyšší). Přehlížení tohoto problému vedlo k určitému rozčarování, neboť reprodukovatelnost výsledků byla v některých případech malá. V poslední době byla tomuto problému věnována značná pozornost. Bylo navrženo použití nových materiálů modifikace stěn kanálu a složení nosné kapaliny, což vedlo ke značnému zlepšení reprodukovatelnosti.

Měření ve sterickém modu je teoreticky velmi vhodné pro měření velikostí analytů, nicméně prakticky je tento mod vzhledem k interakcím analytů se stěnou kanálu a působení HDS jen obtížně realizovatelný.

Interakce analytů se stěnami kanálu jsou minimalizovány ve fokusačním elučním modu. Pro výpočty vlastností analytů je určitou nevýhodou používání komplexnějších silových polí, jejichž některé složky nejsou někdy explicitně známy. Na druhou stranu, jsou-li známy ostatní síly, můžeme neznámou sílu vypočítat z měření se standardními látkami.

*Tato práce byla podpořena grantem GA AV ČR. A4031805.*

#### LITERATURA

- Giddings J. C.: *Sep. Sci. Technol.* 1, 123 (1966).
- Provdar T., Barth H. G., Urban M. W. (ed.): *Chromatographic Characterization of Polymers, Hyphenated and Multidimensional Techniques*. (Adv. Chem. Ser. 247). ACS, Washington D. C. 1995.
- Kompala D. S., Todd P. (ed.): *Cell Separation Science and Technology*. (ACS Symp. Ser. 464). ACS, Washington D. C. 1991.
- Giddings J. C.: *Science* 260, 1456 (1993).
- Janča J.: *Chem. Listy* 76, 785 (1982).
- Janča J.: *Chem. Listy* 81, 1034 (1987).
- Giddings J. C.: *Unified Separation Science*. Wiley, New York 1991.
- Pazourek J., Wahlund K.-G., Chmelík J.: *J. Microcolumn Sep.* 8, 331 (1996).
- Giddings J. C.: *J. Chem. Phys.* 49, 81 (1968).
- Pazourek J., Chmelík J.: *J. Chromatogr.* 715, 259 (1995).
- Caldwell K. D., Nguyen T. T., Myers M. N., Giddings J. C.: *Sep. Sci. Technol.* 14, 935 (1979).
- Myers M. N., Giddings J. C.: *Anal. Chem.* 54, 2284 (1982).
- Giddings J. C., Karaiskakis G., Caldwell K. D.: *Sep. Sci. Technol.* 16, 607 (1981).
- Beckett R., Ho J., Jiang Y., Giddings J. C.: *Langmuir* 7, 2040 (1991).
- Williams P. S., Giddings J. C.: *Anal. Chem.* 59, 2038 (1987).
- Schallinger L. E., Yau W. W., Kirkland J. J.: *Science* 225, 434 (1984).
- Arner E. C., Kirkland J. J.: *Biochim. Biophys. Acta* 993, 100 (1989).
- Karaiskakis G., Graff K. A., Caldwell K. D., Giddings J. C.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 12, 1 (1982).
- Beckett R., Hotchin D. M., Hart B. T.: *J. Chromatogr.* 517, 435 (1990).
- Caldwell K. D., Karaiskakis G., Giddings J. C.: *J. Chromatogr.* 215, 323 (1981).
- Giddings J. C., Moon M. H.: *Anal. Chem.* 63, 2869 (1991).
- Chmelík J., Krumlová A., Matulík F., Pazourek J., Plocek J., Pločková J., Urbánková E.: *Chem. Listy*, připravováno k otištění.
- Kirkland J. I., Dilks C. H. Jr., Yau W. W.: *J. Chromatogr.* 255, 255 (1983).
- Giddings J. C., Yang F. J., Myers M. N.: *Science* 193, 1244 (1976).
- Wahlund K.-G., Litzén A.: *J. Chromatogr.* 461, 73 (1989).
- Ratanathanawongs S. K., Giddings J. C.: *ACS Symp. Ser.* 521, 13 (1993).
- Caldwell K. D., Gao Y. S.: *Anal. Chem.* 65, 1764 (1993).
- Myers M. N., Chen P., Giddings J. C.: *ACS Symp. Ser.* 521, 63 (1993).
- Williams P. S., Koch T., Giddings J. C.: *Chem. Eng. Commun.* 13, 637 (1992).
- Cox R. G., Brenner H.: *Chem. Eng. Sci.* 23, 147 (1968).
- Pazourek J., Matulík F., Filip P., Chmelík J.: *Sep. Sci. Technol.* 28, 1859 (1993).
- Pazourek J., Chmelík J.: *Chromatographia* 35, 591 (1993).
- Pazourek J., Chmelík J.: *J. Microcolumn Sep.* 9, 611 (1997).
- Giddings J. C.: *Sep. Sci. Technol.* 21, 831 (1986).
- Janča J., Chmelík J., Jahnová V., Nováková N., Urbánková E.: *Chem. Anal.* 36, 657 (1991).
- Chmelík J., Janča J.: *J. Liquid Chromatogr.* 9, 55 (1986).
- Chmelík J., Deml M., Janča J.: *Anal. Chem.* 61, 912 (1989).
- Chmelík J., Janča J.: *Chem. Listy* 83, 321 (1989).
- Thormann W., Firestone M. A., Dietz M. L., Cecconie T., Mosher R. A.: *J. Chromatogr.* 641, 95 (1989).
- Schure M. R., Caldwell K. D., Giddings J. C.: *Anal. Chem.* 58, 1509 (1986).
- Chmelík J.: *J. Chromatogr.* 539, 111 (1991).
- Chmelík J.: *J. Chromatogr.* 545, 349 (1991).
- Janča J.: *Microchim. Acta* 112, 197 (1994).
- Janča J., Urbánková E.: *J. Liquid Chromatogr.* 13, 1877 (1990).
- Janča J.: *Macromol. Chem., Rapid Commun.* 3, 887 (1982).
- Chmelík J., Thormann W.: *J. Chromatogr.* 600, 297 (1992).
- Chmelík J., Thormann W.: *J. Chromatogr.* 600, 305 (1992).
- Chmelík J., Thormann W.: *J. Chromatogr.* 632, 229 (1993).
- Thormann W., Caslavská J., Molteni S., Chmelík J.: *J. Chromatogr.* 589, 321 (1992).
- Caslavská J., Molteni S., Chmelík J., Šlais K., Matulík F., Thormann W.: *J. Chromatogr. A* 680, 549 (1994).
- Wahlund K. G., Litzén A.: *J. Chromatogr.* 461, 73 (1989).
- Giddings J. C., Li S., Williams P. S., Schimpf M. E.: *Macromol. Rapid Commun.* 9, 817 (1988).

**J. Chmelík** (*Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*): **Measurement of Properties of Macromolecules and Particles by Field-flow Fractionation**

The paper describes a new terminology and theoretical background of field-flow fractionation based on the character of the elution mode as well as utilization of this method for measurement of properties of macromolecular and particulate analytes.