

# **Aplikace gelové permeační chromatografie pro charakterizaci biopolymerů**

Roman Stojaspal

---

Bakalářská práce  
2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav potravinářského inženýrství  
akademický rok: 2006/2007

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Roman STOJASPAL**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
  
Téma práce: **Aplikace gelové permeační chromatografie pro  
charakterizaci biopolymeru**

Zásady pro vypracování:

Práce bude zaměřena na zpracování literární studie obsahující:

- popis principu metody
- použitou přístrojovou techniku
- přehled konkrétních aplikací GPC v analýze biopolymeru

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**Dle pokynů vedoucího bakalářské práce**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Věra Kašpárková, CSc.**

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**8. ledna 2007**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**4. června 2007**

Ve Zlíně dne 2. května 2007

*Ignác Hoza*

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*děkan*



*Ignác Hoza*

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*ředitel ústavu*

## **ABSTRAKT**

Gelová permeační chromatografie je zvláštním typem kapalinové chromatografie a je založena na principu separace látek podle velikosti molekul. Uplatňuje se především při stanovení molárních hmotností a distribuce molárních hmotností syntetických polymerů a biopolymerů. V potravinářství se nejvíce využívá při analýzách želatiny, proteinů a škrobů.

Klíčová slova: gelová permeační chromatografie, biopolymery

## **ABSTRACT**

Size exclusion chromatography is a special type of liquid chromatography in which particles are separated based on their size. It is mostly utilized for determination of molar mass and molar mass distribution of synthetic polymers and biopolymers. In food industry it is usually applied to analyses of gelatine, proteins and starches.

Keywords: size exclusion chromatography, biopolymers

Moje poděkování patří Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za ochotu, spolupráci a odbornou pomoc při psaní mé bakalářské práce.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>1 CHROMATOGRAFIE</b> .....	<b>9</b>
1.1    DEFINICE CHROMATOGRAFIE .....	9
1.2    MOBILNÍ FÁZE .....	9
1.3    STACIONÁRNÍ FÁZE .....	9
1.4    OBECNÁ TEORIE CHROMATOGRAFIE .....	9
1.5    DĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD.....	10
1.6    GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE (GPC).....	11
<b>2 ZÁKLADNÍ POJMY</b> .....	<b>13</b>
2.1    PARAMETRY CHARAKTERIZUJÍCÍ GELOVÉ LOŽE (KOLONU) .....	13
2.2    CHARAKTERISTIKA POLYMOLEKULARITY (POLYDISPERZITY) LINEÁRNÍCH HOMOPOLYMERŮ .....	14
<b>3 SEPARAČNÍ MECHANISMUS</b> .....	<b>18</b>
3.1    TEORIE SEPARAČNÍHO MECHANISMU .....	18
3.1.1    Rovnovážné teorie.....	18
3.1.2    Teorie omezené difúze .....	19
3.1.3    Separace tokem .....	20
<b>4 KOLONY</b> .....	<b>21</b>
4.1    MATERIÁL KOLON .....	21
4.2    NÁPLNĚ KOLON .....	21
4.2.1    Dextranové gely .....	21
4.2.2    Agarosové gely.....	22
4.2.3    Polyakrylamidové a metakrylátové gely.....	22
4.2.4    Polyvinylacetátové gely.....	23
4.2.5    Polystyrénové gely .....	23
4.3    PLNĚNÍ KOLON .....	23
<b>5 DETEKTORY</b> .....	<b>24</b>
5.1    DETEKCE .....	24
5.2    REFRAKTOMETRY .....	24
5.3    FOTOMETRY .....	25
5.3.1    UV detektory .....	25
5.3.2    IR detektory .....	26
5.4    DETEKTORY MĚŘÍCÍ MOLÁRNÍ HMOTNOST VZORKU .....	26
5.4.1    Viskozitní detektor .....	26
5.4.2    Detektor rozptylu světla .....	28

5.5	OSTATNÍ DETEKTORY .....	29
5.6	KOMBINOVANÉ DETEKTORY .....	30
<b>6</b>	<b>KALIBRACE V GELOVÉ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFII .....</b>	<b>32</b>
6.1	PŘÍMÁ KALIBRACE ÚZKÝMI FRAKCEMI .....	32
6.2	UNIVERZÁLNÍ KALIBRACE .....	33
<b>7</b>	<b>APLIKACE GELOVÉ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE .....</b>	<b>35</b>
7.1	APLIKACE GPC NA BIOLOGICKÉ SYSTÉMY .....	35
7.1.1	Bílkoviny a peptidy .....	35
7.1.1.1	Složky krevního oběhu .....	35
7.1.1.2	Enzymy .....	36
7.1.2	Nukleové kyseliny a nukleotidy .....	37
7.1.3	Nukleoproteiny .....	37
7.1.3.1	Viry .....	37
7.1.4	Sacharidy .....	38
7.1.5	Jiné biologické materiály a bioaktivní látky.....	38
7.2	VYUŽITÍ GPC V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU .....	39
7.2.1	Kolageny (želatina) .....	39
7.2.2	Proteiny .....	40
7.2.3	Škroby .....	41
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>43</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>44</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>52</b>

## ÚVOD

Optimální kvalita surovin pro výrobu potravin je závislá nejen na jejich nutričních vlastnostech, ale i na vlastnostech fyzikálně chemických, jakož i na změnách těchto vlastností, ke kterým může dojít během zpracování a skladování. Sledování změn v kvalitě potravin pomocí vhodných analytických metod je proto důležitou součástí oboru analýzy potravin. Dalším úkolem potravinářské analytiky je i vývoj a aplikace nových analytických postupů, které mohou být použity nejen pro charakterizaci změn probíhajících v potravinách během skladování a zpracování, ale například i pro průkaz použití netradičních surovin, falšování potravin či při detekci žádoucích i nežádoucích přísad.

Nedílnou součástí mnohých potravin jsou vysokomolekulární látky – biopolymery, jejichž vlastnosti, včetně velikosti molární hmotnosti a distribuce molárních hmotností, zásadně ovlivňují jak výživové, tak i sensorické, technologické a hygienicko-toxikologické parametry potravin ve kterých jsou použity. Jedná se například o polysacharidy, želatinu či bílkoviny. Široce používanou skupinou metod pro charakterizaci biopolymerů jsou chromatografické separační metody, které se stejně jako v řadě jiných vědeckých a průmyslových odvětví již řadu let v potravinářské analýze uplatňují. Jednou z chromatografických separačních metod je i gelová permeační chromatografie vhodná, mimo dalších aplikací, ke stanovení molárních hmotností a distribuce molárních hmotností biopolymerů i syntetických polymerů.

Cílem předložené bakalářské práce bylo zpracovat přehlednou literární studii se zaměřením na problematiku gelové permeační chromatografie a jejího použití pro analýzu biopolymerů. Práce se stručně věnuje teoretickým základům metody, instrumentaci a podává přehled o možnostech použití této metody jak v analýze biopolymerů obecně, tak i konkrétně v potravinářské analýze.



# 1 CHROMATOGRAFIE

## 1.1 Definice chromatografie

Chromatografie je obecně definována jako separační, fyzikálně chemická a současně analytická metoda určená pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi **mobilní** a **stacionární fázi**. [1]

Separací složek směsi je možné zjistit, že se zkoumaná směs skládá například ze tří různých látek a nebo naopak, že je tvořena pouze jedinou látkou a jedná se o látku v čistém stavu. [1]

Výsledkem **kvalitativní** analýzy je zjištění, jaké látky jsou v dané směsi obsažené a výsledkem **kvantitativní** analýzy je zjištění koncentrace jednotlivých složek ve směsi. Je zřejmé, že pro provedení kvalitativní a kvantitativní analýzy je nutné jednotlivé složky směsi od sebe nejdříve oddělit. [2]

## 1.2 Mobilní fáze

**Mobilní fáze** je ta, která se v chromatografickém systému pohybuje. Mobilní fází může být kapalina nebo plyn. Je-li mobilní fází kapalina, pak takovou chromatografii nazýváme „kapalinová chromatografie“, je-li mobilní fází plyn, pak se taková chromatografie nazývá „plynová chromatografie“. [3]

## 1.3 Stacionární fáze

**Stacionární fáze** je v chromatografickém systému ta fáze, která je nepohyblivá. Stacionární fází může být pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na pevné látce. [3]

## 1.4 Obecná teorie chromatografie

V průběhu chromatografické analýzy složky separované látky migrují chromatografickou kolonou jen tehdy, pokud se nachází v mobilní fázi, a relativní rychlost jejich pohybu vzhledem k rychlosti mobilní fáze je tím menší, čím větší afinitu k stacionární fázi vykazují. Vlastním mechanismem separace je tedy neustálé porušování určitého ustáleného rozdě-

lení jednotlivých složek vzorku mezi oběma fázemi v důsledku konvektivního pohybu jedné z nich a úsilí systému obnovit porušenou rovnováhu difúzí.

## 1.5 Dělení chromatografických metod

Chromatografické metody je možno dělit podle různých hledisek jako je například

- povaha mobilní fáze (kapalina / plyn)
- způsob provedení (na koloně / plošné uspořádání)
- princip separace (rozpuštění / adsorpce / iontová výměna) a další.

V tabulce č. 1 je uvedeno rozdělení chromatografických metod, které vychází z dělení na základě povahy mobilní fáze. Vzhledem k tomu, že mobilní fází může být plyn nebo kapalina a stacionární fází může být pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na povrchu pevné látky, dostáváme následující možné kombinace mobilních a stacionárních fází a od nich odvozené typy chromatografických metod

Tab. 1. Dělení chromatografických metod na základě povahy mobilní fáze

Hlavní typ chromatografie	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Název chromatografie	Zkratka	Anglický název
<i>plynová</i> (GC – <i>gass chromatography</i> )	plyn	kapalina	plynová rozdělovací	<i>GLC</i>	gass-liquid
		pevná látka	plynová adsorpční	<i>GSC</i>	gass-solid

Hlavní typ chromatografie	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Název chromatografie	Zkratka	Anglický název
<i>kapalinová</i> ( <i>LC – liquid chromatography</i> )	kapalina	kapalina	kapalinová rozdělovací	<i>LLC</i>	liquid-liquid
			gelová permeační	<i>GPC</i>	gel-permeation
			papírová	<i>PC</i>	paper
			tenkovrstvá	<i>TLC</i>	thin layer
		pevná látka	kapalinová adsorpční	<i>LSC</i>	liquid-solid
			iontově výměnná	<i>IEC</i>	ion exchange
			tenkovrstvá	<i>TLC</i>	thin layer

TLC chromatografie existuje jako rozdělovací (stacionární fází je kapalina zakotvená na pevné látce) i jako adsorpční (stacionární fází je přímo tuhá látka) chromatografie. [4]

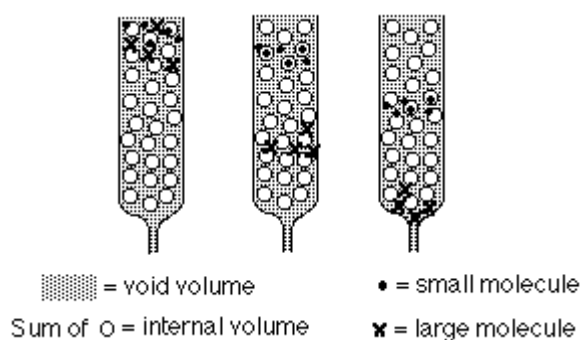
## 1.6 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Gelová permeační chromatografie (v anglické literatuře je možno najít rovněž název Size exclusion chromatography) je speciálním druhem kolonové kapalinové chromatografie. Lze ji využít k mnoha typům analýz o kterých bude pojednávat kapitola 7 této práce, především však nachází uplatnění při stanovení molárních hmotností, distribuce molárních hmotností a k analýze směsí oligomerních sloučenin u syntetických polymerů i biopolymerů. Bez zavedení GPC do praxe by byl nemyslitelný dnešní vývoj makromolekulární chemie a některých disciplín biochemie.

Na rozdíl od absorpční či rozdělovací chromatografie je separace u GPC závislá pouze na velikosti molekul analyzovaných látek a téměř vůbec nezávisí na jejich chemické povaze. Chemické vlastnosti separovaných látek určují pouze systém, v němž bude separace prováděna (volbu hydrofilního či hydrofobního gelu a s tím související volbu elučního činidla).

Pomocí gelové chromatografie je možno separovat jakékoliv molekuly, které se liší svými rozměry, pokud se dobře rozpouštějí v některém rozpouštědle. Velikost molekul nehraje roli, jelikož moderní gelová chromatografie umožňuje separaci celé řady látek od nízkomolekulárních až po vysokomolekulární, jejichž molární hmotnost je v rozmezí  $10^2$  až  $10^7$  g/mol.

Chromatografická kolona pro gelovou permeační chromatografii je naplněná malými částicemi gelu, který obsahuje póry různých rozměrů. Prostory mezi zrny gelové náplně i póry jsou vyplněny rozpouštědlem (mobilní fází). Zředěný roztok vzorku se nanese na vstup do kolony a postupně se mobilní fází vymývá. Koncentrace vzorku v eluátu na výstupu z kolony se sleduje vhodným detektorem. Při dělení například tří druhů molekul podle jejich velikosti mohou nejmenší molekuly difundovat až do vnitřního prostoru gelu, a jsou tudíž nejdéle zadržovány v koloně, zatímco středně velké molekuly se dostanou pouze do větších pórů gelu a nemohou difundovat až do jeho nitra. Molekuly, které mají rozměry větší než jsou rozměry pórů, jsou z gelové náplně vyloučeny (exkludovány), mohou se nacházet pouze v prostoru mezi zrny a procházejí kolonou bez zadržení. Jelikož mobilní fáze volně proudí pouze v prostoru mezi zrny, je pořadí eluce při gelové chromatografii takové, že největší molekuly opouštějí kolonu nejdříve a teprve potom odcházejí z kolony molekuly s menší molární hmotností. Nejmenší molekuly tedy musí vykonat mnohem delší cestu při průchodu kolonou.[5]



*Obr. 1. Separace vzorku procházejícího chromatografickou kolonou*

## 2 ZÁKLADNÍ POJMY

### 2.1 Parametry charakterizující gelové lože (kolonu)

Pojem stacionární fáze lze v gelové chromatografii chápat dvojím způsobem [6]. Buď je jím myšlena část volného prostoru uvnitř pórů gelu označovaná  $V_i$  nebo je myšlen celý objem gelu označovaný  $V_x$ . Dalšími často uváděnými konstantami jsou eluční objem exkludované látky  $V_o$  a celkový objem označovaný  $V_t$ . V gelové chromatografii uvažujeme tedy volný objem rozpouštědla  $V_o$ , jenž je definován jako objem kapaliny mezi částicemi gelu v koloně, a stacionární objem  $V_i$ , jenž představuje objem rozpouštědla v pórech gelu. Odečtením objemu matrice gelu  $V_{gm}$  od celkového objemu gelu  $V_x$  dostaneme hodnotu  $V_i$ :

$$V_i = V_x - V_{gm} \quad (1)$$

Vzájemný vztah těchto parametrů lze popsat těmito rovnicemi:

$$V_t = V_o + V_x \quad (2)$$

$$V_x = V_i + V_{gm} \quad (3)$$

$$V_t = V_o + V_i + V_{gm} \quad (4)$$

přičemž

$$V_{gm} = m_g \cdot V_g \quad (5)$$

$$V_i = V_x - m_g \cdot V_g \quad (6)$$

anebo

$$V_i = m_g \cdot S_R, \quad (7)$$

kde  $V_{gm}$  je objem matrice gelu,  $V_g$  – parciální specifický objem matrice xerogelu,  $m_g$  – hmotnost matrice xerogelu,  $S_R$  – schopnost xerogelu přijímat rozpouštědlo. Hodnota  $V_t$  se buď vypočte z délky a z průměru sloupce gelu, nebo přesněji je určit ji přímo změřením objemu rozpouštědla v prázdné koloně. Objem  $V_o$  se zjistí experimentálně tak, že se chromatografuje vysokomolekulární látka, která nemůže proniknout do pórů gelu, a určí se její eluční objem. Hodnota  $V_i$  se vypočítává z příslušných rovnic. Hodnota  $S_R$  je udávána výrobcem.

Eluční objem  $V_R$  v gelové chromatografii je popsán rovnicí:

$$V_R = V_o + K_D \cdot V_i, \quad (8)$$

kde  $K_D$  je distribuční konstanta, která může nabývat hodnot menších než 1. Je nezávislá na délce gelového sloupce a závisí pouze na velikosti a tvaru pórů v gelových částicích. [6]

Pro velké molekuly, které nemohou pronikat do gelu (tj. při exkluzi) je  $K_D = 0$  a platí  $V_R = V_o$  a eluční objem je roven mrtvému objemu kolony  $V_o$ . Dostatečně malým molekulám pro které platí  $K_D = 1$  jsou přístupné všechny póry. Eluční objem jakékoliv látky se tedy musí pohybovat v intervalu od  $V_o$  do  $V_o + V_i$ .

## 2.2 Charakteristika polymolekularity (polydisperzity) lineárních homopolymerů

Jedním ze základních parametrů, které mohou být pomocí GPC stanoveny je molární hmotnost a distribuce molárních hmotností polymerů. V případě lineárních homopolymerů stačí na charakterizaci délky řetězce jediný parametr – molární hmotnost  $M$  nebo stupeň polymerizace  $P$ , který udává počet stavebních jednotek (merů) v molekule. Platí

$$M = M_0 \cdot P, \quad (9)$$

kde  $M_0$  je molární hmotnost meru.

Veškeré potřebné informace o polymolekularitě vzorku však nelze získat, protože polymerizační stupeň většiny reálných polymerů dosahuje až desítek tisíc a bylo by proto potřeba dokonale rozlišit řetězce této délky, které se liší jen o jednu stavební jednotku. Tato okolnost však na druhé straně umožňuje aproximovat délku řetězce, která se ve skutečnosti mění nespojitě, spojitou veličinou  $M$ , případně  $P$ , a charakterizovat relativní zastoupení jednotlivých homopolymerů spojitou funkcí  $f_w(M)$ , případně  $f_w(P)$ , kterou nazýváme diferenciální hmotnostní distribucí. Do této funkce potom začleníme informaci o polymolekularitě vzorku. Funkce  $f_w(M)$  je definovaná tak, že součin  $f_w(M)dM$  udává hmotnostní zlomek řetězců, jejichž molekulová hmotnost leží v intervalu mezi  $M$  a  $M + dM$ .

Platí:

$$(10)$$

$$\int_{M_0}^{\infty} f_w(M)dM = 1$$

Vzhledem k tomu, že stanovení distribuční funkce není vždy jednoduchou záležitostí jsou často používány i „jednodušší“ parametry, které vhodným způsobem charakterizují polohu, šířku, resp. asymetrii distribuční křivky. [7]

Nejčastěji to jsou číselný ( $M_n$ ) a hmotnostní ( $M_w$ ) průměry molární hmotnosti, které jsou definované vztahy:

$$M_n = \frac{\sum n_i \cdot M_i}{\sum n_i} = \frac{\sum c_i \cdot M_i}{\sum c_i}, \quad (11)$$

kde  $n_i$  je látkové množství,  $M_i$  molární hmotnost a  $c_i$  je molární koncentrace dané látky.

$$M_w = \frac{\sum w_i \cdot M_i}{\sum w_i} = \frac{\sum c_i \cdot M_i^2}{\sum c_i \cdot M_i}, \quad (12)$$

kde  $w_i$  je hmotnostní zlomek,  $M_i$  molární hmotnost a  $c_i$  je molární koncentrace dané látky.

Číselný průměr molárních hmotností se stanoví měřením koligativních vlastností zředěných roztoků polymerů (např. osmotického tlaku), případně určením počtu koncových skupin. Hmotnostní průměr získáme například z měření rozptylu světla nebo sedimentační rychlosti v ultracentrifuze.

Kromě číselného a hmotnostního průměru molární hmotnosti se můžeme setkat i s dvěma dalšími průměry. Experimentálně je můžeme stanovit sledováním sedimentační rovnováhy v ultracentrifuze. Označují se  $M_z$  a  $M_{z+1}$ . Mezi jednotlivými průměry platí nerovnost

$$M_n \leq M_w \leq M_z \leq M_{z+1}.$$

Znaménko rovnosti platí pouze pro přísně monodisperzní vzorek.

Jako kritérium šířky distribuce (polymolekularity, polydisperzity) nejčastěji slouží podíl:

$$P = M_w / M_n \quad (13)$$

[8]

Nepřímá metoda stanovení molární hmotnosti, oblíbená pro svou experimentální nenáročnost, je viskozimetrie zředěných roztoků polymerů. Vztah mezi molární hmotností poly-



merního vzorku  $M$  a limitním viskozitním číslem  $[\eta]$  popisuje Mark – Houwinkova rovnice:

$$[\eta] = K \cdot M^a, \quad (14)$$

jejíž konstanty  $K$  a  $a$  jsou tabelovány. Dá se ukázat, že pokud změříme limitní viskozitní číslo polydisperzního vzorku, představuje hodnota  $M$ , vypočítaná s předchozí rovnice, viskozitní průměr molární hmotnosti  $M_v$ , definovaný vztahem:

$$M_v = \left[ \int M^a f_w(M) dM \right]^{1/a} \quad (15)$$

[9]

### 3 SEPARAČNÍ MECHANISMUS

#### 3.1 Teorie separačního mechanismu

V odborné literatuře je popsáno několik teorií separačního procesu. Tato bakalářská práce se stručně věnuje rovnovážné teorii, teorii omezené difúze a separaci tokem.

##### 3.1.1 Rovnovážné teorie

Do této skupiny patří teoretické přístupy, které jsou založeny na společném předpokladu, že retenční objem je dán rovnovážným rozdělením molekul uvažované látky mezi mobilní fázi v intersticiálním objemu a kapalinou imobilizovanou v pórech náplně, takže  $K_D$  představuje poměr rovnovážných koncentrací v obou fázích.

První teorii rozdělovacího koeficientu pro GPC vypracoval Porath [10], který uvažoval jednoduchý model stejných kuželovitých pórů a odvodil vztah:

$$K_D = k(1 - R_e / r_k)^3, \quad (16)$$

kde  $r_k$  je vstupní poloměr kuželovitého póru a  $R_e$  je efektivní poloměr molekuly. Pro makromolekuly ve tvaru statistického klubka dosadil  $k_1 M^{1/2}$  za  $R_e$  a dospěl k e vztahu:

$$K_D = k \left[ 1 - \frac{k_1 M^{1/2}}{(S_r - \alpha)^{1/3}} \right]^3, \quad (17)$$

kde  $S_r$  je celkový objem rozpouštědla v nabobtnalém gelu,  $\alpha$  je část objemu póru nepřístupná molekulám dané látky,  $k$  a  $k_1$  jsou koeficienty úměrnosti, které se stanoví pro daný typ gelu empiricky.

Laurent a Killander [11] navrhli realističtější model struktury úplně nabobtnalého, homogenně zesíťovaného gelu, kterou aproximovali systémem náhodně uspořádaných, nekoneč-

ně dlouhých tyčí. Objem dostupný sférickým molekulám pro tento model stanovil Ogston [12].

Le Page a kol. [13] a Cantow a Johnson [14] odvodili vztah mezi rozdělovacím koeficientem a distribucí rozměrů pórů. Studovali separaci v kolonách plněných částicemi silikagelu [13] a pórovitého skla [14] a zjistili, že separace je řízená sterickou exkluzí, i když retenční objemy vypočítané z nezávisle změřené distribuce rozměrů pórů byly vždy větší než experimentální. Později se zjistilo [15], že tento nesoulad je možné odstranit, pokud se explicitně zahrne do výpočtu omezení dostupného objemu pórů vlivem vyloučeného objemu molekul v blízkosti stěny pórů [16].

Staticko-termodynamický výpočet exkluze rigidních molekul z pórů geometricky jednoduchého tvaru uvedli Giddings a kol. [17]. Podobný výpočet pro ohebné makromolekulární řetězce uveřejnili Casassa [18] a později Casassa a Tagami [19], kteří připisují změnu volné energie při přechodu klubka z roztoku do prostoru uvnitř pórů snížením jeho konformační entropie a vypočítali rozdělovací koeficienty mezi volným roztokem a pórovitou náplní pro různé geometrické tvary pórů. Tato teorie předpovídá, že v GPC závisí separace výhradně na efektivním hydrodynamickém objemu molekul. Tuto představu zevšeobecnil Pouchlý [20], který zahrnul do výpočtu i adsorpční síly v blízkosti částečně propustné stěny póru, a Doi [21], který uvažoval složitější geometrii pórovitého sorbentu. Vilenčík a kol. [22] ukázali, že souhlas experimentu s teoretickou předpovědí pro válcovité póry je možné zlepšit volbou realističtější okrajové podmínky ve vztahu vytvořeném Cassasem [18].

### 3.1.2 Teorie omezené difúze

Mechanismus omezené difúze vychází z předpokladu, že nedochází k úplnému ustavení difúzní rovnováhy v jednotlivých částech chromatografického sloupce. Hloubka proniknutí molekul separované látky do pórů gelu je závislá na difúzním koeficientu, jenž je úměrný jejich molární hmotnosti a tedy i hloubce proniknutí molekul analyzované látky do gelu. Doba setrvání makromolekuly ve styku s náplní je srovnatelná s dobou potřebnou k difúzi této látky do pórů gelu a zpět.[26] Ackers [23, 24] předpokládal, že při konvekčním toku roztoku, který obsahuje makromolekuly různých rozměrů, v prostoru mezi pórovitými částicemi budou pomaleji difundující, velké molekuly zůstávat delší dobu v mobilní fázi a tím se začnou obohacovat v prvních podílech eluátu. Vliv radiální difúze na retenční objem teoreticky zpracovali Yau a Malone [25].

Kubín [27] analyzoval vliv difúze v zrně gelu pro případ separace makromolekul při GPC u náplně s nehomogenními póry za předpokladu, že pro molekuly daných rozměrů je za podmínek, které panují v GPC kolonách, efektivně dostupná pouze povrchová vrstva sorbentu. Pro rozdělovací koeficient  $K_D$  odvodil vztah:

$$K_D = (1 - \rho^3)K, \quad (18)$$

kde  $\rho$  je efektivní poloměr vnitřního nepřístupného jádra sorbentu a  $K$  je rovnovážný rozdělovací koeficient.

Proti teorii omezené difúze se však právem namítá, že v takovém případě by eluční objemy závisely na lineární rychlosti mobilní fáze [26].

### 3.1.3 Separace tokem

Jako další z možných mechanismů byl navržen i zcela odlišný mechanismus separace při gelové permeační chromatografii, který vychází z existence parabolického profilu rychlosti toku při laminárním proudění systémem úzkých kapilár. Předpokládá se, že pro každou molekulu existuje v blízkosti stěny oblast, do které nemůže z geometrických důvodů proniknout. Proto se větší molekuly statisticky častěji vyskytují blíže ke středu kapiláry, kde je rychlost proudění největší a v konečném důsledku se z kolony vymývají dříve. Dalším podpůrným jevem může být i zpomalení rychlosti pohybu makromolekul v porovnání s čistým rozpouštědlem v důsledku smykových napětí vyvolaných laminárním tokem v kapiláře. [28]

## 4 KOLONY

### 4.1 Materiál kolon

Na začátku vývoje GPC bylo konstrukčním materiálem kolon skoro výhradně sklo. Je chemicky i tepelně dostatečně odolné a inertní, což je především důležité při separaci biologických materiálů, které mohou denaturovat při styku s kovy. Průhlednost skla umožňuje vizuálně sledovat postup plnění kolony a stav gelového lůžka v průběhu jejího používání (usazování, vznik dutin, aj.). Nevýhodou skla jako konstrukčního materiálu jsou jeho mechanické vlastnosti, tj. citlivost na pnutí, nárazy a vibrace, a také malá odolnost vůči tlaku. [29]

V současné době je nejpoužívanějším konstrukčním materiálem na stavbu kolon nerezová ocel, někdy se používá také titan a nikl. Povrch kolon je možné pokrýt sklem.

Kolony mají nejčastěji tvar rovné válcovité trubice. [30]

### 4.2 Náplně kolon

Tato kapitola stručně shrnuje informace o nejčastěji používaných typech gelů používaných jako náplně pro GPC kolony.

#### 4.2.1 Dextranové gely

Vyrábí se z fragmentů dextranu, což je produkt bakteriální přeměny sacharosy (*Leuconostoc mesenteroides*), zesíťovaného epichlorhydrinem v alkalickém prostředí. Změnou poměru reaktantů lze ovlivnit stupeň zesíťování a tím i velikost pórů.

Komerční název tohoto typu gelů je Sephadex a jejich výrobcem je Amersham Biosciences:

- Sephadex G-10 a G-15 s malými póry jsou vhodné k dělení nízkomolekulárních látek (peptidy, aminokyseliny, koenzymy)
- Sephadex G-25 a G-50 pro odsolování roztoků proteinů
- Sephadex G-75, G-100, G-150 a G-200 se dodávají pro separace proteinů do velikosti molární hmotnosti  $M \sim 600\,000$  g/mol

- matrice řady LH (hydroxypropylované) jsou určeny pro práci v nepříliš hydrofobních prostředích (ethanol či chloroform)
- Sephadex LH 20 lze použít na dělení triacylglycerolů, mastných kyselin a steroidních hormonů. [31]

#### 4.2.2 Agarosové gely

Agarosa je polysacharid získávaný purifikací agaru z mořských řas. Zpracováním agaru se odstraní nabitě polysacharidy, zahřátý roztok elektroneutrální agarosy po ochlazení spontánně tvoří gel. Zesíťování (“cross-linking”) agarosy se provádí reakcí s 2,3-dibrompropanolem v alkalickém prostředí, případně reakcí s epichlorhydrinem. Velikost pórů je ovlivněna podílem agarosy.

Výrobci agarosových gelů jsou například Amersham Biosciences nebo Bio-Rad Laboratoriem a jsou dostupné pod komerčními názvy:

- Sepharose 2B, 4B, 6B
- Sepharose CL-2B, CL-4B, CL-6B (“cross-linked”)
- Sepharose 6, 12
- Bio-Gel A 0.5m (1.5m, 5m, 15 m a 50 m) [31]

#### 4.2.3 Polyakrylamidové a metakrylátové gely

Polyakrylamidové gely se připravují kopolymerací akrylamidu a *N,N'*-metylenbisakrylamidu. Výhodou oproti polysacharidovým dextranovým či agarosovým gelům je odolnost proti mikrobiálnímu růstu. Jsou rovněž prosté všech nabitých skupin. Výrobce je Bio-Rad Laboratories:

- Bio-Gel P-2 (P-4, -6, -10, -30, -60, -100, -150, -200 a -300) [31]

Významným dodavatelem metakrylátových gelů vhodných pro GPC ve vodné fázi je rovněž firma Tosoh Bioscience. Gely nesou komerční označení TSK-GEL PW a TSK-GEL Alpha.

#### 4.2.4 Polyvinylacetátové gely

Jedná se o kopolymer vinylacetátu a butandiol 1, 4 - divinyleteru, které jsou vhodné pro středně polární až polární rozpouštědla. [32, 33]

#### 4.2.5 Polystyrénové gely

V tomto případě jde o kopolymer styrenu a divinylbenzenu. Náplně jsou vhodné pro separaci polymerů rozpuštěných ve středně polárních až polárních organických rozpouštědlech. Výrobci jsou například Polymer Laboratories Ltd. (komerční označení PL gel), Waters Associates (Styragel) Tosoh Bioscience (TSK-GEL H) [32, 33] a Bio-Rad Laboratories (Bio-Beads S-X) [31]. Použití tohoto typu gelů pro analýzu polymerů v organických rozpouštědlech je značně rozšířené.

### 4.3 Plnění kolon

Plnění kolon patří mezi důležité pracovní postupy v kapalinové chromatografii, protože způsob uložení částic gelu v gelovém lůžku určuje hydrodynamické parametry kolony, odpor gelového lůžka i uniformitu toku a v důsledku toho podstatnou měrou i účinnost separace.

Organické, bobtnající gely se plní do kolon po dosažení rovnovážného nabobtnání v mobilní fázi. Před začátkem plnění je třeba z gelu odstranit vzduch například záhřevem nebo ultrazvukem. [34] Plnění kolon musí být rychlé, protože při pomalejším plnění se částečně rozdělují částice gelu v koloně podle rozměrů (jako první se usazují větší částice) a také nastává jejich aglomerace, která snižuje kvalitu naplnění kolony. [35]

Nebobtnající aerogely s částicemi většími než 20  $\mu\text{m}$  je možné plnit do kolon za sucha. Gel se pomalu nasype do kolony, která vibruje. Po uzavření se kolona promyje odplyněným eluentem a je připravená na použití. [35]

V současné době se však ve většině případů používají komerčně dostupné kolony naplněné gelem o žádaných vlastnostech čímž ztrácí „laboratorně“ plněné kolony význam.

## 5 DETEKTORY

### 5.1 Detekce

Obecně je chromatografická detekce definována jako proces, při kterém se indikuje poloha a určuje koncentrace, případně některé specifické vlastnosti složek směsi podrobených chromatografické separaci. Při detekci lze stanovit buď vlastnosti eluátu vycházejícího z kolony, nebo vlastnosti separované látky (solutu) rozpuštěné v eluátu.

Na detekci se nejčastěji používají kontinuálně pracující detektory a zjištěné výsledky se zaznamenávají. [36]

Na detektory jsou při analýze kladeny poměrně vysoké požadavky. Především to jsou:

- vysoká citlivost
- stabilita a reprodukovatelnost detekovaného signálu
- široký lineární dynamický rozsah
- rychlá odezva
- minimální objem detekční cely.

Detektory můžeme rozdělit na **specifické**, měřící určitou typickou vlastnost solutu (fotometry, coulometry a pod.), **nespecifické**, často nazývané **univerzální** (plamenoionizační detektory, refraktometry a pod.) a **smíšené**. [37]

### 5.2 Refraktometry

Refraktometry jsou typickým představitelem detektorů, které měří vlastnosti eluátu. Jejich principem je měření změn indexu lomu eluátu v závislosti na koncentraci solutu. Aby se zvýšila citlivost měření a omezily rušivé vlivy, jsou refraktometry konstruovány v diferenčním vyhotovení, kde se porovnává index lomu eluátu s indexem lomu eluentu. [38]



Z metod měření indexu lomu se v komerčně dostupných detektorech využívají čtyři principy:

- *Deflexní refraktometry* využívají lom světelných paprsků při průchodu přes rozhraní látek s rozdílnou optickou hustotou, popsany Snellovým zákonem.
- *Reflexní refraktometry* jsou založené na Fresnelově zákoně odrazu světla.
- *Refraktometry založené na Christiansenově jevu*. Prochází-li světlo kyvetou naplněnou malými částicemi se stejným indexem lomu jako má kapalina v kyvetě, jeho intenzita poklesne jen málo. Pokud se však index lomu eluátu změní, lomy a rozptyl světla na rozhraních kapalina-částice vzrostou a intenzita světla poklesne. Změny intenzity světla jsou úměrné změně indexu lomu eluátu.
- *Interferometry* ve kterých koherentní paprsky světla procházejí srovnávací a měřicí kyvetou. Přítomnost solutu v měřicí kyvetě způsobuje změnu efektivní optické dráhy paprsku. Tato dráha se měří interferometrem.

Refraktory jsou nejpoužívanější detektory v gelové permeační chromatografii. Detekují všechny látky, jejichž index lomu se dostatečně liší od indexu lomu mobilní fáze.

Problémy při použití refraktometru způsobuje závislost indexu lomu na teplotě a tlaku. [39]

### 5.3 Fotometry

Fotometry jsou typickými představiteli detektorů měřících vlastnosti solutů. Měří změny intenzity záření procházejícího měřicí kyvetou, způsobené přítomností solutu. Nejčastěji se sleduje absorpce záření v ultrafialové (UV) oblasti spektra, méně obvyklé je sledování absorpce v oblasti infračervené (IR).

#### 5.3.1 UV detektory

UV detektory pracují buď při pevné vlnové délce nebo lze vlnovou délku měnit v závislosti na analyzovaném solutu. Monochromatické záření v UV oblasti se nejčastěji získává filtrováním záření nízkotlakových nebo vysokotlakových rtuťových výbojek, deuteriových lamp a v poslední době i zinkových lamp, případně pomocí fosforečných zdrojů.

Přístroje pracující ve více vlnových délkách používají nejčastěji jako zdroj záření rovněž deuteriové lampy, ze kterého se monochromátory získá požadovaná vlnová délka. Měří se absorpce záření při zvolené vlnové délce.

Absorpce UV záření se řídí Lambert-Beerovým zákonem, podle kterého je množství absorbovaného záření funkcí počáteční intenzity záření, délky optické dráhy paprsku v kyvetě, koncentrace solutu a jeho molárního absorpčního koeficientu.

Použití UV detektoru je omezeno absorpcí eluentu při pracovní vlnové délce. [40]



*Obr. 2. UV detektor (výrobce Labio)*

### 5.3.2 IR detektory

Pomocí IR detektorů je možno detekovat prakticky všechny polymery, ale jejich použití je značně omezené spektrálními vlastnostmi mobilních fází. Jsou vhodné především na měření při vysokých teplotách a na detekci vícesložkových solutů.[41]

## 5.4 Detektory měřící molární hmotnost vzorku

Další skupinu detektorů tvoří moderní typy tzv. „molar mass sensitive detectors“, tj. detektorů, které zaznamenávají molární hmotnost nebo viskozitu měřeného polymerního vzorku.

### 5.4.1 Viskozitní detektor

Pro on-line měření viskozit v GPC systému se nejčastěji používá viskozitního detektoru tvořeného čtyřmi kapilárami, které jsou sestaveny do „můstku“ analogického „Wheatstoneovu“ můstku (viz. obr. 3). Proudí-li tímto systémem pouze čisté rozpouštědlo s viskozitou  $\eta_0$ , je diferenciální tlak (differential pressure) v můstku nulový  $\Delta P = 0$ , protože

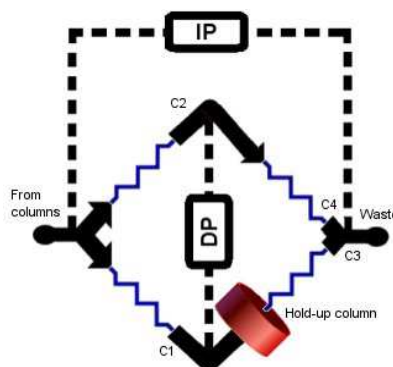
každá ze čtyř kapilár obsahuje pouze čisté rozpouštědlo. Začne-li můstkem proudit polymerní roztok, který je eluován z GPC kolony, vstupuje tento roztok do kapilár C1, C2 a C4, zatímco v kapiláře C3 zůstává, vzhledem k přítomnosti zásobníku („hold-up column“) stále čisté rozpouštědlo. Zvýšení viskozity v kapilárách C1, C2 a C4 ve srovnání s viskozitou čistého rozpouštědla v kapiláře C3 způsobí tlakovou nerovnováhu v můstku, která je měřena tlakovým snímačem. Vstupní tlak (inlet pressure  $P_{in}$ ) a diferenciální tlak jsou přímo úměrné specifické viskozitě polymerního roztoku.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{4\Delta P}{P_{in} - 2\Delta P} \quad (19)$$

Vzhledem k tomu, že měřené koncentrace polymerních roztoků jsou velmi nízké, je možno přímo stanovit limitní viskozitní číslo:

$$\left. \frac{\eta_{sp}}{c} \right|_{c \rightarrow 0} = [\eta] \quad (20)$$

Spojení refraktometrického a viskozitního detektoru poskytuje přesné stanovení molární hmotnosti pro všechny typy polymerů, na které lze aplikovat univerzální kalibraci. Z viskozitním měření lze získat i cenné informace o stupni větvení, které nejsou při měření se samotným refraktometrickým detektorem dostupné. [42]



Obr. 3. Schéma viskozitního detektoru

### 5.4.2 Detektor rozptylu světla

Dalším typem detektoru, kterým lze stanovit molární hmotnost vzorku je detektor rozptylový, jehož měřicí princip je následující. Při stanovení dopadá laserový paprsek do měrné kyvety obsahující eluát, který opouští chromatografickou kolonu. Dopadající primární laserový paprsek je rozptylován rozpuštěnými polymerními částicemi. Intenzita rozptýleného světla je úměrná velikosti částic, které rozptyl způsobují. Molární hmotnost měřená rozptylovým detektorem se stanoví pomocí Rayleighovy rovnice, kterou lze zjednodušeně uvést ve tvaru:

$$R(\theta)|_{\theta \rightarrow 0} \cong KCM \quad (21)$$

kde  $R(\theta)$  je intenzita rozptýleného světla,  $C$  je koncentrace polymerního roztoku,  $M$  je hmotnostní průměr molární hmotnosti a  $K$  je optická konstanta.

Pro výpočet molární hmotnosti je nutno stanovit  $R(\theta)$  při nulovém rozptylovém úhlu. Toho lze dosáhnout použitím buď tzv. detektoru „Maloúhlového rozptylu světla“ (Low Angle Light Scattering, LALS), což je detektor který snímá rozptýlené světlo pod úhlem menším než  $10^\circ$  vzhledem k primárnímu paprsku. Další možností je měření rozptýleného světla pod různými úhly pozorování a následná extrapolace k „nulovému“ úhlu. V tomto druhém případě hovoříme o tzv. „Mnohoúhlovém detektoru rozptylu světla“ (Multi Angle Light Scattering, MALS). Pomocí rozptylových detektorů lze stanovit jak hmotnostní průměr molární hmotnosti, tak velikost částic (gyrační poloměr). [42]



*Obr. 4. Detektor maloúhlového rozptylu světla (výrobce Viscotek)*



*Obr. 5. Detektor mnohoúhlového rozptylu světla (výrobce Bioscience Technology)*

## 5.5 Ostatní detektory

Kromě výše uvedených detektorů je možno použít řadu dalších zařízení, jejichž význam však nedosahuje významu detektorů diskutovaných ve výše uvedených kapitolách.

*Elektrochemické detektory* využívají elektrochemické reakce, především elektrolytické oxidace a redukce sledované polarograficky nebo coulometricky. [43, 44]

*Vodivostní detektory* měří elektrickou vodivost roztoků ionizovatelných solutů. Eluentem bývá většinou voda. Výhodou je jejich jednoduchost, malá závislost vodivosti na teplotě a malé rozměry měřící kvyety.

*Kapacitní detektory* měří dielektrické vlastnosti eluátu. Na rozdíl od vodivostních detektorů se jejich použití váže na elektricky nevodivé systémy. Nevýhodou je také značná citlivost na kolísání teploty.

*Hustotní detektor.* Jeho principem je snímání změn hustoty eluátu. Citlivost na otřesy a změny teploty. [45]

*Atomové absorpční spektrometry* se uplatnily při detekci eluátů obsahujících kovy v podobě organosilikonů [46] a anorganických solí [47-50]. Eluát se přímo přenáší do spektrometru, kde probíhá vlastní měření.

Další detekční principy využívají měření změn tepelné vodivosti, radioaktivity, jiné snímají teplo adsorpce solutu na vhodném sorbentu, elektronový záchyt nebo absorpci ultrazvuku.

Samostatnou skupinu detektorů tvoří zařízení určené na snímání koncentrace separované látky přímo v koloně. [51]

## 5.6 Kombinované detektory

Při separaci chemicky heterogenních systémů, jako jsou vzorky biologického původu, směsi nízkomolekulárních látek a polymerů nebo kopolymery, je často nevyhnutelné současné využití více detekčních principů. V takovýchto případech je nejjednodušší spojení dvou anebo více detektorů do série.

Příkladem mohou být tzv. duální detektory, které současně měří absorpci světla při dvou vlnových délkách, nebo UV absorpci a změny indexu lomu. [52]

V moderních přístrojích se často setkáváme i s kombinovanou detekcí umožňující stanovení absolutní hodnoty molárních hmotností polymerů. Příkladem mohou být duální detektory spojující refraktometr (detekce koncentrace) a viskozimetr (detekce viskozity), refrak-

tometr a detektor rozptylu světla a konečně i tzv. „triple“ detektor, který do série spojuje refraktometr, viskozimetr a rozptylový detektor.

## 6 KALIBRACE V GELOVÉ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFII

Gelová permeační chromatografie není „absolutní“ metodou pro stanovení molárních hmotností. Abychom mohli chromatogram interpretovat a stanovit molární hmotnost polymerů a její distribuci, je třeba GPC kolonu kalibrovat, tedy stanovit závislost mezi retenčním objemem (časem) a molární hmotností vzorků. Následující část práce se problematice kalibrace stručně věnuje.

### 6.1 Přímá kalibrace úzkými frakcemi

Standardy polymerů určené ke kalibraci GPC kolon mají pokrývat co nejširší oblast molárních hmotností a mají mít velmi úzkou distribuci ( $M_w/M_n \leq 1,1$ ), aby bylo možné s dostatečnou přesností položit  $M_n \approx M_w \approx M_{GPC}$ , kde  $M_{GPC}$  je molární hmotnost odpovídající elučnímu objemu maxima chromatogramu. Tyto podmínky splňují především aniontové polystyreny. Kalibrační křivky stanovené pomocí kvalitních polymerních referenčních materiálů jsou velmi spolehlivé, protože nevyžadují zavedení žádných předpokladů o tvaru distribučních funkcí ani o mechanismu separace.

Vlastní kalibrace se zakládá na změření chromatogramu řady úzkých frakcí uvažovaného polymeru se známými hodnotami molárních hmotností, které pokrývají co nejširší oblast  $M$ . Měříme za stejných podmínek, které se budou používat při analýzách neznámých vzorků. Doporučuje se pracovat s nejnižší možnou koncentrací kalibračních standardů, aby se omezil vliv koncentrační závislosti retenčních objemů. Retenční objemy  $V_R$  jednotlivých frakcí se potom vynesou proti logaritmu  $M$  a získaným bodovým polem se proloží hladká křivka. Aby se pokryla co nejširší oblast molárních hmotností, tak se obvykle spojuje do série několik kolon (nejčastěji 2 nebo 3) naplněných částicemi gelu a různým rozměrem pórů. Je účelně zvolit takovou kombinaci kolon, aby kalibrační křivka byla v co nejširším intervale retenčních objemů lineární. V tomto případě je možné kalibrační závislost popsat vztahem:

$$\log M = A - B \cdot V_R, \quad (22)$$

a informace o jejím průběhu je dána do dvou parametrů  $A$  a  $B$ .



Pokud se nepodaří dosáhnout linearity v celém požadovaném rozsahu  $M$ , je třeba zpracovat údaje regresní analýzou. [53]

Alternativou k použití dvou či tří kolon spojených do série jsou v současnosti tzv. „Mixed bed“ kolony. Každá z těchto kolon obsahuje náplň s póry o různých velikostech a poskytuje kalibrační křivku, která je lineární v širokém rozsahu retenčních objemů.

Kromě polystyrénových standardů jsou ke kalibraci GPC komerčně dostupné i další typy polymerů například polyethylenoxid, polymethyl metakrylát a pro vodné aplikace například polysacharidy .

## 6.2 Univerzální kalibrace

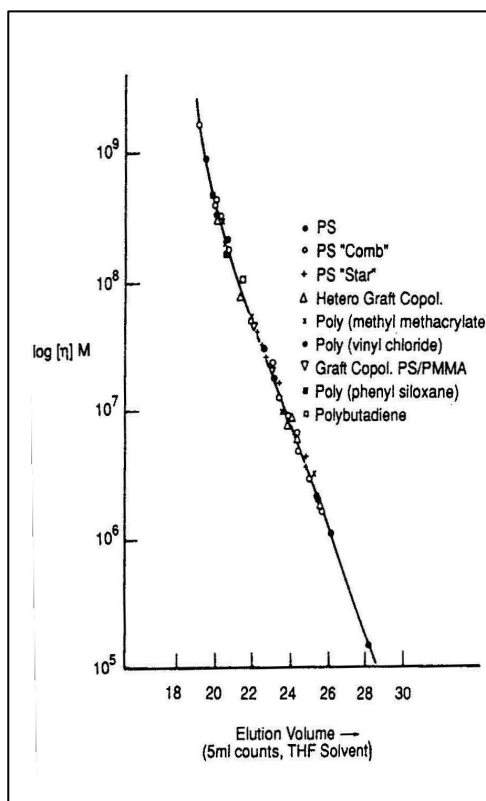
Koncept univerzální kalibrace zavedl v roce 1967 Benoit se spolupracovníky, kteří zjistili, že retenční objemy  $V_R$  homopolymerů i kopolymerů s různou strukturou (lineární i rozvětvené), které byly rozpuštěny v tetrahydrofuranu, sledují jedinou křivku, jsou-li vyneseny proti součinu  $\log [\eta]$  a  $M$  , kde  $[\eta]$  je limitní viskozitní číslo a  $M$  je molární hmotnost polymeru (obr. 6). Bylo dokázáno, že součin  $[\eta] M$  je úměrný hydrodynamickému objemu polymerního klubka. Vytvoření univerzální kalibrace umožňuje tedy analýzu téměř všech polymerů a stanovení jejich molární hmotnosti pomocí GPC. V původním konceptu použil Benoit pro měření viskozit polymerních standardů s nízkou polydisperzitou a polymerních vzorků skleněného kapilárního viskozimetru. Z viskozimetrických dat je pro kalibrační standardy možno sestavit Markův-Houwinkův graf, t.j. závislost  $\log [\eta]$  vs.  $\log M$ , jehož směrnice je rovna parametru  $a$  a úsek je roven  $K$ .

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (23)$$

Parametry  $K$  a  $a$  Markovy-Houwinkovy rovnice jsou pro daný polymer rozpuštěný v různých rozpouštědlech a při různých teplotách tabelovány a lze je nalézt např. v „Polymer Handbook“ [54]. Použití tabelovaných  $K$  a  $a$  hodnot v GPC softwaru umožňuje výpočet „absolutních hodnot molárních hmotností“ studovaného polymeru.

Pomocí moderních GPC systémů, které umožňují on-line spojení viskozitního a koncentračního detektoru (např. diferenciálního refraktometru) je možno přímo stanovit molární hmotnost pro každou frakci, která je eluována z kolony. Diferenciální refraktometr, jako koncentrační detektor poskytuje pro každou frakci koncentraci  $C$  a viskozimetrický detektor poskytuje součin  $[\eta] \cdot C$ . Vydělením signálu z viskozimetrického detektoru signálem z detektoru koncentračního, lze získat hodnotu limitního viskozitního čísla  $[\eta]_i$  každé polymerní frakce vycházející z kolony. Jelikož je známa hodnota limitního viskozitního čísla i retenční čas této každé frakce, lze použít křivku univerzální kalibrace a získat pro každou tuto frakci molární hmotnost  $M$ .

Platnost konceptu univerzální kalibrace byla prakticky ověřena na řadě typů polymerů, především pro polymery, které v roztoku zaujímají tvar statistického klubka. Existují však výjimky, kdy např. polymery tvořící ve roztoku tyčinky nebo tuhé koule křivce univerzální kalibrace nevyhovují.



Obr. 6. Křivka univerzální kalibrace

(Benoit 1967)

## 7 APLIKACE GELOVÉ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

Použití gelové permeační chromatografie ve výzkumné i průmyslové praxi je široké a mnohostranné. Obecně lze hlavní aplikační oblasti shrnout v následujících bodech:

- stanovení molární hmotnosti: je jednou z nejčastějších oblastí využití GPC
- určení distribuce molárních hmotností biopolymerů a syntetických polymerů: zde se GPC používá jako rychlá a ve srovnání s klasickou srážecí frakcionací jednoduchá metoda pro stanovení distribuce
- purifikace směsí od nežádoucích látek: rozdělení směsi látek na základě molárních hmotností jejích složek, například separace oligomerních složek od polymeru
- skupinová separace: dělení dvou látek nebo skupiny látek s velkým rozdílem molárních hmotností. Uplatňuje se například při odsolení proteinů, polysacharidů, odstranění extrakčního činidla z preparátů nukleových kyselin, ukončení reakce nízkomolekulární látky s biopolymerem (např. oddělení koenzymu, substrátu nebo inhibitoru od enzymu)
- zakoncentrování roztoků biopolymerů
- stanovení stupně větvení u biologických i syntetických polymerů
- stanovení rozměrů polymerního klubka [31]

### 7.1 Aplikace GPC na biologické systémy

Jelikož je bakalářská práce zpracována v rámci Ústavu potravinářského inženýrství, bude tato část práce zaměřena biologické a v potravinářské analýze aplikovatelné systémy. Analýza biologického materiálu gelovou permeační chromatografií se uskutečňuje téměř vždy ve vodném prostředí. Pracuje se tedy především s hydrofilními gely typu. [55]

#### 7.1.1 Bílkoviny a peptidy

##### 7.1.1.1 Složky krevního oběhu

Na separaci bílkovin krevního séra se osvědčil Sephadex G-200. Chromatogram se skládá v podstatě ze tří vrcholů, ze kterých jednu frakci tvoří směs lipoproteinů,  $\alpha$ -globuliny a  $\beta$ -

globuliny. Další, střední frakce obsahuje  $\gamma$ -globulin a třetí frakce se skládá z albuminu a částečně z transferinu. [56]

Toffaletti a kol. [57] studovali distribuci různých forem vápníku v lidském séru použitím různých gelů. Na Bio-Gelu P-2 se celkový vápník rozdělil na čtyři samostatné frakce, odpovídající vazbě vápníku na bílkovinu, na některé soli a vápník v podobě iontu. Na gelu Sephacryl S-200 se rozdělilo sérum na tři samostatné frakce, ve kterých analyzovali způsob vazby vápníku. [58]

### 7.1.1.2 Enzymy

Gelová permeační chromatografie se stala při charakterizaci především však při purifikaci enzymů neodmyslitelnou, často až nenahraditelnou metodou, i když samozřejmě nemůže nahradit klasické biochemické postupy.

Příkladem je purifikace argininsukcinátlyázy precipitací s  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  iontovýměnnou chromatografií a gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-200. Finální preparát byl 46-násobně purifikovaný vzhledem k surovému extraktu [59]. Rovněž u bakteriální lipoproteinlipázy došlo po použití gelové permeační chromatografie k 34-násobnému vyčištění preparátu (byl použit Sephadex G-50 a G-200) [60]. [62]

Na purifikaci ureázy z humusu extrakcí pyrofosfátem jsou některé všeobecně používané purifikační techniky nevhodné [61]. Nejefektivnějším purifikačním postupem je ultrafiltrace extraktu, dialýza proti 0,1 mol/l pyrofosfátu při pH 7,1 a následná gelová permeační chromatografie. [62]

Vedle vyčištění enzymů od doprovodných látek bylo v této oblasti GPC úspěšně použito k rozdělení enzymatické aktivity do několika frakcí, které měly stejnou specifickou aktivitu. [62]

### 7.1.2 Nukleové kyseliny a nukleotidy

Nukleové kyseliny jsou lineární polymery a svou strukturou se značně liší od bílkovin. Jejich sterické uspořádání velmi silně ovlivňuje prostředí, ve kterém se nachází (například iontová síla roztoku). Problémy, které takto vznikají z hlediska jejich analýzy gelovou permeační chromatografií jsou tím větší, čím větší je molekula nukleové kyseliny. [68]

Použití GPC na separaci několika druhů t-RNA popisují Armstrong a Fendler [63]. Cornelis [64] uvádí použití Sepharosy 4B při separaci t-RNA z rostlinných pletiv. Purifikaci mRNA nejdříve na celulóze a potom pomocí GPC na Sepharose 4B se zabývá Konecki a kol. [65]. Separaci složek RNA na Bio-Gelu P-2 v alkalickém tlumivém roztoku s nízkou iontovou silou popsal Khym [66], stupeň degradace DNA endonukleázou a exonukleázou sledovali pomocí GPC Miyagawa a kol. [67]. [68]

Problematice GPC nukleových kyselin na agarosovém gelu se systematicky věnoval Petrovič a kol., kteří ve svých publikacích popsali metodu frakcionace různých druhů RNA [69, 70], frakcionace DNA a dvouřetězové RNA [71] a separaci r-RNA od jiných částí vzorku. [72, 73] [74]

### 7.1.3 Nukleoproteiny

#### 7.1.3.1 Viry

Na gelovou permeační chromatografii tak velkých částic, jako jsou viry, nestačily rozměry pórů gelů, které byly k dispozici na začátcích komerční produkce. Později, když byly k dispozici agarosové gely s většími rozměry pórů, se objevují práce, ve kterých se využívá GPC na separaci virů.

Haller [75] popsal frakcionaci některých rostlinných virů pomocí GPC a studoval možnosti využití GPC při purifikaci bakteriofágů [74]. GPC bylo poté použito při purifikaci některých rostlinných virů. [76, 77]

Čech a kol. [78] využili GPC při purifikaci viru tabákové mozaiky ze šťávy získané z infikovaných listů tabáku. [79]

Chromatografie na agarosovém gelu byla použita i při stanovení poloměru částic adenoviru typu 5 [80]. Nienhaus [81] izoloval virus od ostatních rostlinných složek, které způsobovaly jeho inaktivaci. Poté bylo možné přenést infekční virus na testovací rostliny. [80]

#### 7.1.4 Sacharidy

Analýza sacharidů má důležitou úlohu v biochemii, fyziologii i různých odvětvích potravinářského průmyslu. Skutečnost, že GPC je vhodnou metodou pro separaci sacharidů podle jejich molární hmotnosti byla zjištěna brzy po zavedení této metody. Také se zjistilo, že retence sacharidů v gelu se liší od retence jiných druhů biomakromolekul jako jsou například bílkoviny nebo nukleové kyseliny. Constantopoulos a kol. [82] zjistili, že kyselé mukopolysacharidy se vymývají z kolony v pořadí jejich molárních hmotností, a že existuje korelace mezi  $\log M$  a retenčním objemem. Pomocí GPC byla například stanovena molární hmotnost amylozy a dextrinu [83].

GPC byla použita též na separaci sacharidové frakce hovězího protrombinu [84], při purifikaci lipopolysacharidů a buněčných stěn bakterií [85], při analýze glykoproteinů a glykolipidů z membrán lidských červených krvinek [86] a při dalších analýzách. [87]

#### 7.1.5 Jiné biologické materiály a bioaktivní látky

Kromě bílkovin a ostatních dosud popsaných látek se GPC uplatňuje při analýzách řady dalších biologických materiálů a látek s různými biologickými aktivitami (například hormony, vitamíny, toxiny a další).

Izolace a čištění hormonů štítné žlázy, hypofýzy a slinivky břišní pomocí GPC byly předmětem zájmu ihned po zavedení této metody. Linder a kol. [88] frakcionovali extrakt ze zadního laloku hypofýzy gelovou permeační chromatografií, později purifikovali i další hormony hypofýzy [89, 90, 91], štítné žlázy [92] a jiné. [87]

GPC se využívá i při studiu vlastností a při izolaci antibiotik.

Při studiu interakcí rifampicinu s bílkovinami hovězího séra se s úspěchem použila GPC a radioaktivně značené antibiotikum. Tato metoda umožnila získat kvalitativní i kvantitativní informace o vazebných reakcích. [93]

Gelovou permeační chromatografií se dají dobře oddělit biologicky aktivní formy vitamínu A nejen ve standardních roztocích, ale i v biologických materiálech. [99]

Weisman a kol. [94] analyzovali u dětí koncentraci vitamínu D v lipidových extraktech séra pomocí GPC metabolitů. [99]

Parkinson [95] studoval vliv pasterace a mražení konzumních vajec na stabilitu lipoproteinů. Gelovou permeační chromatografií separoval lipoproteiny čerstvých vaječných žloutků a získal dvě frakce. Mražením a rozmražením se asociovaná dimerová forma disociovala na monomerovou. Raju a Mahadevan [96] získali analýzou lipoproteinů slepičího vaječného žloutku 3 skupiny proteinů, nazývaných apoprotein A, B a C. V potravinářství se dá GPC dále použít například na separaci syntetických barviv z komerčních šťáv a sirupů [97] nebo separaci viditelných pigmentů masa hovězího dobytka a kuřat. [98] [99]

## 7.2 Využití GPC v potravinářském průmyslu

Z výše uvedeného širokého spektra aplikací GPC na biologické materiály je zřejmé, že potravinářský průmysl je odvětvím, kde tato metoda najde široké uplatnění. Využití gelové permeační chromatografie pro potravinářskou analýzu je v této části práce zaměřeno na stanovení molární hmotnosti potravinářsky široce používaných biopolymerů tedy kolagenů (želatiny), proteinů a polysacharidů. Oblasti jejího využití jsou pro tyto biopolymery zpracovány formou aktuální rešerše provedené pomocí databáze Web of Science a Science Direct a jsou prezentovány pouze stručně, ve formě literárních odkazů.

### 7.2.1 Kolageny (želatina)

**Charakterizace a hydrodynamického chování modifikované želatiny: II. Charakterizace pomocí vysokoúčinné gelové permeační chromatografie – srovnání s dextransy a proteiny.** Loret, C.; Chaufer, B.; Sebillé, B.; Hanselin, M.; Blain, Y.; Le Hir, A. *International Journal of Biological Macromolecules* (1988), 10(6), 366-372

**Určení molární hmotnosti želatiny substituované sukcinylem pomocí gelové permeační chromatografie - mnohoúhlový detektor rozptylu světla, sedimentační rovnováha a gelová permeační chromatografie.** Kaur, M.; Jumel, K.; Hardie, K. R.; Hardman, A.; Meadows, J.; Melia, C. D. *Journal of Chromatography* (2002), A 957, 139-148

**Analýzy nativních kolagenních monomerů a oligomerů pomocí vysokoúčinné kapalinové gelové permeační chromatografie a jejich aplikace.** Condell, R. A.; Hanco, V. P.; Larenas, E. A.; Wallace, G.; McCullough, K. A. *Analytical Biochemistry* (1993), 212 (2), 436-445

**Charakterizace želatiny a kyselého rozpustného kolagenu pomocí gelové permeační chromatografie spojené s mnohoúhlovým detektorem rozptylu světla.** Meyer, M.; Morgenstern, B. *Biomacromolecules* (2003), 4, 1727-1732

**Studium degradace želatiny při stárnutí papíru za použití vodné gelové permeační chromatografie.** Dupont, A.-L. *Journal of Chromatography A* (2002), 950 (1-2), 113-124

**Samoagregace želatiny nad želatinační teplotou analyzovaná pomocí gelové permeační chromatografie s použitím mnohoúhlového detektoru rozptylu světla.** Tromp, R. H.; ten Grotenhuis, E.; Olieman, C. *Food Hydrocolloids* (2002), 16 (3), 235-239

### **7.2.2 Proteiny**

**Určení distribuce molární hmotnosti proteinových hydrolyzátů potravin pomocí gelové permeační chromatografie a chemiluminiscenčního dusíkového detektoru.** Fujinari, E. M.; Manes, J. D. *Journal of Chromatography* (1997), A 763 (1-2), 323-329

**Charakterizace proteinových frakcí rýžových otrub k navrhnutí účinných metod rozpouštění proteinů.** Hamada, J. S. *Cereal Chemistry* (1997), 74 (5), 662-668



**Vývoj rychlé a přesné metody pro separaci a kvantifikaci myofibrilárních proteinů masa.** Toorop, R. M.; Murch, S. J.; Ball, R. O. Food Research International (1997), 30 (8), 619-627

**Kyselé modifikace proteinů ze zbytků sojového mléka.** Chan, W. M.; Ma, C. Y. Food Research International (1999), 32 (2), 119-127

**Využití vysokoúčinné gelové permeační chromatografie k charakterizaci složení proteinů v komerčních syrovátkových koncentrátech.** Roufik, S.; Paquin, P.; Britten, M. International Dairy Journal (2005), 15 (3), 231-241

**Chromatografie v systému s obrácenými fázemi a gelová permeační chromatografie hydrolyzátů mléčných bílkovin: vztah mezi elucí z kolony v systému s obrácenými fázemi a zdánlivou distribucí molární hmotnosti.** van der Ven, C.; Gruppen H.; de Bont, D. B. A.; Voragen, A. G. J. International Dairy Journal (2001), 11 (1-2), 83-92

### 7.2.3 Škroby

**Molární hmotnosti a velikosti škrobů pomocí vysokoúčinné gelové permeační chromatografie s mnohoúhlovým detektorem rozptylu světla.** Fishman, M. L.; Rodriguez, L.; Chau, H. K. J. Agric. Food Chem. (1996), 44, 3182-3188

**Makromolekulární vlastnosti škrobů stanovené vodnou vysokoúčinnou gelovou permeační chromatografií.** Bello-Pérez, L. A.; Roger, P.; Baud, B.; Colonna, P. Journal of Cereal Science (1998), 27 (3), 267-278

**Strukturní změny obilných škrobů zjištěné zahříváním a mícháním v DMSO měřené pomocí gelové permeační chromatografie s použitím mnohoúhlového detektoru roz-**

**ptylu světla diferenciálního refraktometru.** Han, J-A.; Lim, S-T. Carbohydrate Polymers (2004), 55 (3), 265-272

**Vylepšené metody pro strukturní analýzu na amylosu bohatých frakcí rýžové mouky.** Ward, R. M.; Gao, Q.; de Bruyn, H.; Gilbert, R. G.; Fitzgerald, M. A. Biomacromolecules (2006), 7, 866-876

## ZÁVĚR

Bakalářská práce, zpracovaná formou literární studie, je zaměřena na problematiku gelové permeační chromatografie a jejího praktického využití při charakterizaci biopolymerů. Stručně se věnuje principům metody, jednotlivým součástem chromatografického systému jako jsou detektory a kolony a uvádí dva nejčastěji používané principy kalibrace GPC.

Aplikační část práce je zaměřena především na využití GPC v potravinářské analytice. Přehledná rešerše ukázala skutečnost, že použití této metody je vsutku mnohostranné. Nejširší uplatnění v potravinářství má GPC při analýzách, jejichž cílem je stanovení molárních hmotností a distribuce molárních hmotností potravinářských biopolymerů – želatiny (kolagenu), proteinů a škrobů. Z dalších aplikačních oblastí lze například jmenovat purifikaci polymerních látek od nízkomolekulárních příměsí, stanovení podílu větvených a lineárních podílů ve škrobech či sledování stárnutí/degradace biopolymerů, kdy změna molární hmotnosti může vést ke snížení kvality potraviny, ve které je biopolymer použit .

Z práce vyplývá, že GPC je spolehlivá a robustní metoda, která má široké spektrum využití a je platným pomocníkem v každé moderní analytické laboratoři.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Dostupný na Internetu: <<http://www.lf3.cuni.cz/chemie/studium/chromatografie.doc>>.,  
s. 1.
- [2] Dostupné na Internetu: <<http://www.lf3.cuni.cz/chemie/studium/chromatografie.doc>>.,  
s. 1.-2.
- [3] Dostupné na Internetu: <<http://www.lf3.cuni.cz/chemie/studium/chromatografie.doc>>.,  
s. 2.
- [4] Dostupné na Internetu: <<http://www.lf3.cuni.cz/chemie/studium/chromatografie.doc>>.,  
s. 2.-3.
- [5] CHURÁČEK, J. a kolektiv. Analytická separace látek. Praha: SNTL – Nakladatelství  
technické literatury, 1990, s. 276.-277. ISBN 80-03-00569-8
- [6] CHURÁČEK, J. a kolektiv. Analytická separace látek. Praha: SNTL – Nakladatelství  
technické literatury, 1990, s. 277.-278. ISBN 80-03-00569-8
- [7] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélková chromatografie.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 23.-24.
- [8] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélková chromatografie.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 24.-25.
- [9] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélková chromatografie.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 25.
- [10] PORATH, J., Pure appl. Chem., 1963, 6, s. 233.
- [11] LAURENT, T. C., KILLANDER, J., J. Chromatogr., 1964, 14, s. 317.
- [12] OGSTON, A. G., Trans. Faraday Soc., 1958, 54, s. 1754.
- [13] LEPAGE, M., BEAU, R., DE VRIES, J., J. Polym. Sci., C, 1968, 21, s. 119.
- [14] CANTOW, M. J. R., JOHNSON, J. F., J. Polym. Sci., A-1, 1967, 5, s. 2835.
- [15] KUBÍN, M., VOZKA, S., J. Polym. Sci., Polym. Symposia, 1980, 68, s. 209.

- [16] TUNG, L. H., MOORE, J. C.: Gel Permeation Chromatography. In: Fractionation of Synthetic Polymers. Red. Tung, L. H., New York, M. Dekker, 1977, s. 561.
- [17] GIDDINGS, J. C., KUČERA, E., RUSSELL, C. P., MYERS, M. N., J. Phys. Chem., 1968, 72, s. 4397.
- [18] CASASSA, E. F., J. Polym. Sci., B, 1967, 5, s. 773.
- [19] CASASSA, E. F., TAGAMI, Y., Macromolecules, 1969, 2, s. 14.
- [20] POUCHLÝ, J., J. Chem. Phys., 1970, 52, s. 2567.
- [21] DOI, M., Rept. Progress polym. Phys. Japan, 1975, 18, s. 59.
- [22] VILENČIK, L. E., BĚLENKIJ, B. G., ALEKSANDROV, M. L., REJFMAN, L. S., ČUBAROV, B. A., Ž. Fiz. Chim., 1974, 48, s. 2086.
- [23] ACKERS, G. K., Biochemistry, 1964, 3, s. 723.
- [24] ACKERS, G. K., STEERE, R. L., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 59, s. 137.
- [25] YAU, W. W., MALONE, C. P., J. Polym. Sci., B, 1967, 5, s. 663.
- [26] CHURÁČEK, J. a kolektiv. Analytická separace látek. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1990, s. 280. ISBN 80-03-00569-8
- [27] KUBÍN, M., J. Chromatogr., 1975, 108, s. 1.
- [28] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografie. Bratislava: VEDA, 1983, s. 30.-33.
- [29] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografie. Bratislava: VEDA, 1983, s. 91.
- [30] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografie. Bratislava: VEDA, 1983, s. 92.
- [31] Dostupné na Internetu:  
<<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/Chromatografie.pdf>>.
- [32] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografie.

- Bratislava: VEDA, 1983, s. 140.
- [33] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 158.-159.
- [34] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 97.
- [35] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 99.
- [36] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 100.
- [37] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 101.
- [38] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 103.
- [39] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 104.-105.
- [40] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 106.
- [41] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 107.
- [42] Dostupné na Internetu: <<http://www.polymerlabs.com/gpc/plbv400.htm>>.
- [43] FLEET, B., LITTLE, C. J., J. Chromatogr. Sci., 1974, 12, s. 747.
- [44] KISSINGER, P. T., Anal. Chem., 1977, 49, s. A447.
- [45] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia.  
Bratislava: VEDA, 1983, s. 111.
- [46] CASSIDY, R. M., HURTEAU, M. T., MISLAN, J. P., ASHLEY, R. W.,

- J. Chromatogr. Sci., 1976,14, s. 444.
- [47] YOZA, N., KOUCHIYAMA, K., MIYAJIMA, T., OHASHI, S., Anal. Lett., 1975, 8, s. 641.
- [48] YOZA, N., MITSUYASU, A., MIYAJIMA, T., KOUCHIYAMA, K., OHASHI, S., J. Chromatogr., 1978, 152, s. 33.
- [49] MIYAJIMA, T., OHASHI, S., Bull. Chem. Soc. Japan., 1978, 51, s. 2543.
- [50] KOUCHIYAMA, K., YOZA, N., OHASHI, S., J. Chromatogr., 1978, 147, s. 271.
- [51] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia. Bratislava: VEDA, 1983, s. 112.
- [52] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia. Bratislava: VEDA, 1983, s. 113.
- [53] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia. Bratislava: VEDA, 1983, s. 45.
- [54] BRANDRUP, J., IMMERGUT, E. H., GRULKE, E. A., Polymer Handbook, 2003, 4
- [55] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia. Bratislava: VEDA, 1983, s. 264.
- [56] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia. Bratislava: VEDA, 1983, s. 265.
- [57] TOFFALETTI, J., SAVORY, J., GITELMAN, H. J., Clin. Chem., 1977, 23, s. 2306.
- [58] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia. Bratislava: VEDA, 1983, s. 266.
- [59] MATAGNE, R. F., SCHLOESSER, J. P., Biochem. J., 1977, 167, s. 71.
- [60] VOVK, V. A., LEVČUK, T. P., BALJASOVA, I. G., JAKOVLEV, V. A., Bioorg. Chim., 1975, 1, s. 512.
- [61] CECCANTI, B., NANNIPIERI, P., CERVELLI, S., SEQUI, P., Soil. Biol. Biochem.,

- 1978, 10, s. 39.
- [62] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia. Bratislava: VEDA, 1983, s. 267.
- [63] ARMSTRONG, D. W., FENDLER, J. G., *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 478, s. 75.
- [64] CORNELIS, P., *Plant Sci. Lett.*, 1978, 11, s. 3.
- [65] KONECKI, D., CIMADEVILLA, J. M., KRAMER, G., HARDESTY, B., *Mol. Biol. Rep.*, 1975, 2, s. 335.
- [66] KHYM, J. X., *Anal. Biochem.*, 1976, 71, s. 231.
- [67] MIYAGAWA, T., ANAI, M., URABE, H., *Arch. Dermatol. Res.*, 1975, 254, s. 79.
- [68] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia. Bratislava: VEDA, 1983, s. 271.
- [69] NOVAKOVIČ, M. B., PETROVIČ, S. L., *Anal. Biochem.*, 1972, 49, s. 367.
- [70] PETROVIČ, S. L., IVANUŠ, J. J., RAKIČ, L. M., *J. Neurochem.*, 1974, 22, s. 327.
- [71] PETROVIČ, S. L., ŠUMANJA, D. C., VASILJEVIČ, R. B., *Biochem. J.*, 1974, 139, s. 157.
- [72] PETROVIČ, S. L., PETROVIČ, J. S., NOVAKOVIČ, M. B., *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 308, s. 317.
- [73] PETROVIČ, S. L., PETROVIČ, J. S., MARKOVIČ, R. A., KNEZEVIČ, A. A., *Prep. Biochem.*, 1974, 4, s. 509.
- [74] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélová chromatografia. Bratislava: VEDA, 1983, s. 272.
- [75] HALLER, W., *Nature*, 1965, 206, s. 693.
- [76] MARCINKA, K., *Acta Virol.*, 1971, 15, s. 316.
- [77] MARCINKA, K., *Acta Virol.*, 1972, 16, s. 53.
- [78] ČECH, M., JELÍNKOVÁ, M., ČOUPEK, J., *J. Chromatogr.*, 1977, 135, s. 435.



- [79] SHORTRIDGE, K. F., BELYAVIN, G., OLIVER, C. J., *Microbios Lett.*, 1976, 2, s. 33.
- [80] NIENHAUS, F., *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 1975, 82, s. 739.
- [81] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. *Gélová chromatografia*. Bratislava: VEDA, 1983, s. 273.
- [82] CONSTANTOPULOS, G., DEHUBAN, A. S., CAROLL, W. R., *Anal. Biochem.*, 1969, 31, s. 59.
- [83] DINTZIS, F. R., TOBIN, R., *J. Chromatogr.*, 1974, 88, s. 77.
- [84] NELSESTUEN, G. L., SUTIE, J. W., *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, s. 6096.
- [85] ROMANOVSKA, R., *Anal. Biochem.*, 1970, 33, s. 383.
- [86] YAMATO, K., HANDA, S., YAMAKAWA, T., *J. Biochem.*, 1975, 78, s. 1207.
- [87] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. *Gélová chromatografia*. Bratislava: VEDA, 1983, s. 274.
- [88] LINDER, E. B., ELMQUIST, A., PORATH, J., *Nature*, 1959, 184, s. 1565.
- [89] ROOS, P., FEVOLD, H. R., GEMZELL, C. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 74, s. 525.
- [90] LEAVER, F. W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, 122, s. 188.
- [91] REICHERT, L. E. Jr., JIANG, N. S., *Endocrinology*, 1965, 77, s. 78.
- [92] SALVATORE, G., VECCHIO, G., SALVATORE, M., CAHNMANN, H. J., ROBBINS, J., *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, s. 2935.
- [93] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. *Gélová chromatografia*. Bratislava: VEDA, 1983, s. 275.
- [94] WEISMAN, Y., REITER, E., ROOT, A., *J. Pediatr.*, 1977, 91, s. 904.
- [95] PARKINSON, T. L., *J. Sci. Food Agric.*, 1977, 28, s. 806.
- [96] RAJU, K. S., MAHADEVAN, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 446, s. 387.

[97] MOROZOVA, G. I., Vopr. Pitanija, 1975, 4, s. 80.

[98] FAGER, L. Y., FAGER, R. S., Anal. Biochem., 1978, 85, s. 98.

[99] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. Gélková chromatografia.

Bratislava: VEDA, 1983, s. 276.

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. Separace vzorku procházejícího chromatografickou kolonou.....	12
Obr. 2. UV detektor (výrobce Labio).....	26
Obr. 3. Schéma viskozitního detektoru.....	27
Obr. 4. Detektor maloúhlového rozptylu světla (výrobce Viscotek).....	29
Obr. 5. Detektor mnohoúhlového rozptylu světla (výrobce Bioscience Technology).....	29
Obr. 6. Křivka univerzální kalibrace (Benoit 1967).....	34

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Dělení chromatografických metod na základě povahy mobilní fáze.....	10
---	----