

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Příprava a testování kapilární
náplňové kolony sephadex G-10

*Preparation and testing of capillary
packed column sephadex G-10*

Bakalářská práce

Studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Jakub Tolasz

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Pavla Coufala, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
podpis

Tato bakalářská práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM0021620857.

Poděkování

Úvodem této bakalářské práce bych chtěl poděkovat svému školiteli panu doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za výborné vedení při mé práci, jeho ochotu a optimismus při řešení problémů a cenné rady, které mi poskytl. Také bych rád poděkoval Mgr. Martinu Francovi za pomoc při experimentálním řešení úkolů mé práce. Díky patří také mým rodičům, kteří mé studium umožnili a v jehož průběhu mě podporovali.

Abstrakt

Sephadex je v biochemických experimentech hojně využívaným sorbentem k separacím molekul v širokém rozmezí molekulových hmotností. Využívá se také k purifikacím nebo odsolování izolovaných proteinů. Dosud byly chromatografické aplikace na tomto principu prováděny jen v kolonách velkých rozměrů, čemuž musela předcházet účinná izolace proteinů, aby bylo na kolonu nanášeno dostatečné množství vzorku. Naplnění sephadexu do mikrokolony by snížilo potřebné množství vzorku a mohly by tak být dále zpracovávány obtížně izolovatelné proteiny, které se získávají v malém množství. V této bakalářské práci je s použitím suspenzního plnění mikrokolona opravdu naplněna. K vytvoření gelu jako takového je použito principu přípravy monolitických kolon, tedy naplnění a následné polymerizace, v našem případě hydratace a zgelování.

Předmětová hesla:

Analytická chemie, separační metody, kapilární gelová chromatografie

Klíčová slova:

Sephadex G-10, kapilární kolona

Abstract

Sephadex is a common sorbent in biochemistry for separation of molecules of a wide range of molecular masses. Sephadex is also used for purification or desalination of isolated proteins. Up to now, the gel chromatography has been performed in wide separation columns. Therefore, the isolation techniques for proteins had to be very effective to isolate enough proteins as a sufficient amount of the sample. The preparation and application of a capillary separation column packed with sephadex could decrease the needed sample amount and enable work with hardly isolable proteins obtained only in small quantities. In this bachelor project, the capillary column was packed with sephadex using the slurry packing procedure. The principle of monolithic columns was used to create a gel in the column. The column was packed in organic solvent first, and then hydrated when flushing with water to generate the gel.

Subject words:

Analytical chemistry, separation methods, capillary gel chromatography

Keywords:

Sephadex G-10, capillary column

Obsah

<u>1</u>	<u>ÚVOD</u>	<u>8</u>
1.1	MIKROKAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	8
1.2	GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE	8
1.3	SEPHADEX	9
1.4	TESTOVÁNÍ KOLON	10
<u>2</u>	<u>CÍL PRÁCE</u>	<u>13</u>
<u>3</u>	<u>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	<u>14</u>
3.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	14
3.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	14
3.3	PŘÍPRAVA KOLONY	15
3.4	PLNĚNÍ KOLONY	16
3.5	TESTOVÁNÍ KOLONY	17
<u>4</u>	<u>VÝSLEDKY A DISKUSE</u>	<u>19</u>
<u>5</u>	<u>ZÁVĚR</u>	<u>23</u>
	<u>PŘEHLED LITERATURY</u>	<u>24</u>

Použité symboly a zkratky

bar	Bar, jednotka tlaku
GPC	Gelová permeační chromatografie
H	Výškový ekvivalent teoretického patra
H_A	Příspěvek vířivé difúze
H_B	Příspěvek podélné difúze
H_C	Příspěvek odporu proti přenosu hmoty
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
L	Délka kolony
λ	Vlnová délka
n	Počet teoretických pater
PEEK	Polyetheretherketon
R	Rozlišení dvou píků
t_M	Mrtvý čas kolony
t_R	Retenční čas píku
u	Průtoková rychlost
w	Šířka píku při základně
$w_{1/2}$	Šířka píku v polovině jeho výšky

1 Úvod

1.1 Mikrokapalinová chromatografie

Miniaturizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se rychle rozšířila mezi moderní separační metody, zvláště kvůli její vysoké účinnosti a snížení spotřeby sorbentu, mobilní fáze i vzorku. První zmínky o použití tohoto systému s dobrými výsledky se objevily v roce 1979, kdy Guiochon [1] a Knox s Gilbertem [2] publikovali své práce. Oba dokumenty zdůrazňují nutnost používání citlivých detektorů pro malé objemy vzorku, aby potenciál kapilární kolony mohl být plně využit.

Miniaturizace HPLC přinesla spoustu výhod. Je zřejmé, že snížením rozměrů se sníží množství použitého materiálu a času potřebného k analýze. Další nespornou výhodou je možnost přímého napojení kapiláry na detektory, které právě malé množství vzorku vyžadují. To jsou například hmotnostní a plamenové detektory [3, 4].

1.2 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC) patří do skupiny separačních metod, které využívají principu molekulového síta. Sloučeniny se dělí na základě velikosti a tvaru svých molekul, tedy podle svých fyzikálních, nikoliv chemických vlastností. Částice gelu obsahují póry, jejichž velikost se pro daný gel pohybuje v určitém intervalu. Velikost těchto pórů pak určuje, jak velké molekuly mohou být na tomto gelu separovány.

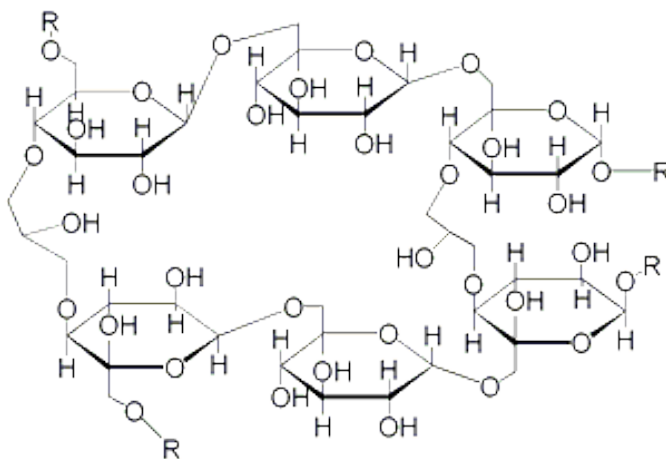
Molekuly, které jsou větší než póry gelu, jsou neustále unášeny mobilní fází, v koloně se vůbec nezadržují a jsou tedy značkovačem mrtvého času kolony. Oproti tomu malé molekuly, které jsou menší než nejmenší pór gelu, se zadržují nejvíce a všechny stejně. Tomuto rozmezí se říká frakcionační rozsah gelu a je pro každý gel charakteristické. Molekuly mimo tento frakcionační rozsah nemohou být daným gelem separovány. Protože se GPC více využívá především v biochemických aplikacích, je frakcionační rozmezí uváděno v jednotkách typičtějších pro biochemii, v daltonech [5].

Běžně používané kolony v GPC mají v průměru několik centimetrů, délku až jeden metr a separace je na nich prováděna samospádem. To znamená, že mobilní fáze proudí

kolonou jen vlivem vlastní tíhy a zemské přitažlivosti. Použití velmi dlouhých kolon, například z důvodu zvýšení účinnosti separace, prodlužuje čas potřebný k analýze. To je sice možné při řešení experimentálních problémů, ale například v klinické praxi nepřijatelné. Obzvláště v GPC, kde nemůže být čas analýzy zkrácen použitím vyšších tlaků, protože by to vedlo ke zhroucení struktury stacionární fáze [1].

1.3 Sephadex

Gel na bázi sephadexu byl poprvé představen v roce 1959 jako prostředí vhodné pro gelovou filtraci makromolekul rozpustných ve vodě, jak uvádí Kågedal [6] s odkazem na Poratha [7]. Od té doby se gelová chromatografie stala hojně využívanou a rozšířenou metodou pro separaci mnoha látek. Základ sephadexu tvoří prokřížený dextran, což je polymer glukosy (**obrázek 1**), s vysokou molekulovou hmotností produkovaný bakterií *Leuconostoc mesenteroides*. Sephadex je zástupcem třídy suchých gelů. Aby měl strukturu a funkci molekulového síta, musí být hydratován [5]. Pokud gel vyschne, tak dojde k totálnímu zhroucení struktury gelu.



Obrázek 1 Strukturální vzorec dextranu. (Převzato z [8])

Chromatografické separace s použitím sephadexu jako stacionární fáze, potřebují pro analýzu dlouhý čas, což je velkou nevýhodou této metody. Například Sweetman [9] provedl separaci purinových bází na koloně 0,9 x 100 cm s velkou účinností, ale

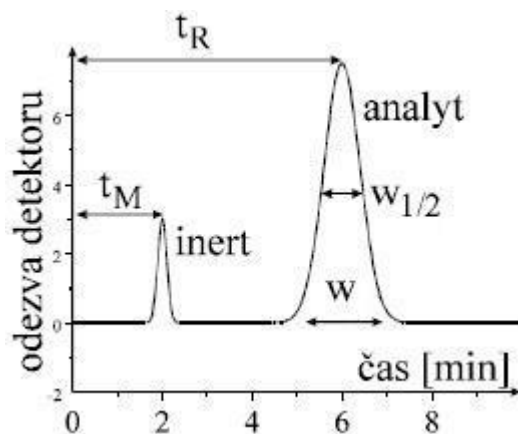
s dobou trvání analýzy 24 hodin. O několik let později Catsimpooolas [10], použitím kolony s menšími rozměry (2,8 x 500 mm), snížil dobu analýzy k hranici pouhé jedné hodiny. Je však důležité poznamenat, že prováděl separaci vyšších proteinů (thyroglobulinu a cytochromu c) na sephadexu s většími póry.

1.4 Testování kolon

Účinnost kolony charakterizuje, jak moc se zóny separovaných látek v koloně rozmývají. Mírou separační účinnosti chromatografické kolony je počet teoretických pater, který lze spočítat z charakteristik píků odečtených z chromatogramu. Například retenční čas a šířka píku při základně, respektive v polovině jeho výšky, jak ukazuje vztah,

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2, \quad (1)$$

kde n je počet teoretických pater, t_R [min] je retenční čas dané látky, w [min] je šířka píku při základně, $w_{1/2}$ [min] je šířka píku v polovině jeho výšky, jak je vidět na **obrázku 2**.



Obrázek 2 Ukázka chromatogramu získaného eluční metodou. (Převzato z [11])

Separční účinnost můžeme také charakterizovat pomocí výškového ekvivalentu teoretického patra H [mm]. Pomocí této veličiny můžeme porovnávat kolony různých délek,

$$H = \frac{L}{n} \quad , \quad (2)$$

kde L je právě délka kolony [mm]. Výškový ekvivalent je podle van Deemterovy rovnice dán součtem jednotlivých příspěvků H_A , H_B a H_C , kde H_A je příspěvek vířivé difúze, H_B je příspěvek podélné difúze a H_C je příspěvek odporu proti přenosu hmoty. Vzhledem k výše uvedeným příspěvkům lze výškový ekvivalent teoretického patra vyjádřit jako funkci lineární rychlosti mobilní fáze u , jak znázorňuje rovnice,

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad , \quad (3)$$

kde A , B a C jsou konstanty charakterizující kolonu, nezávislé na lineární rychlosti u [cm.min⁻¹].

Konstantní příspěvek A není ovlivněn lineární rychlostí mobilní fáze. Je způsoben rozdílnou délkou dráhy, kterou urazí molekula v koloně, když obtéká částice stacionární fáze. Tento příspěvek se nazývá tubulární difúze a jeho největším nežádoucím projevem je rozmývání píku. Nelineární příspěvek B vzniká v důsledku koncentračního gradientu. Molekuly se snaží tento gradient snížit tím, že difundují do míst s nižší koncentrací. Tento příspěvek, který se nazývá molekulární difúze, narůstá s časem, který složka stráví v koloně. V kapalinové chromatografii je molekulární difúze zanedbatelná, vzhledem k viskozitě mobilní fáze. Lineární příspěvek C , nazývaný odpor proti převodu hmoty, je způsoben pronikáním molekul do různé hloubky stacionární fáze a tedy délkou jejího setrvání v ní. Molekula, která ulpí jen na povrchu stacionární fáze, se do

proudící mobilní fáze dostane dříve než molekula, která pronikne hlouběji. Rychlost mobilní fáze způsobí větší vzájemné vzdálení těchto dvou molekul [12].

Pokud jsou separovány dvě nebo více látek, je třeba určit, zda tyto látky byly dostatečně odděleny. Využívá se k tomu rozlišení píku R , které se vypočte podle vztahu,

$$R = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_1 + w_2} , \quad (4)$$

kde $t_{R,1}$ je retenční čas první látky, $t_{R,2}$ je retenční čas druhé látky, w_1 je šířka píku při základně první látky a w_2 je šířka píku při základně druhé látky. Hodnota rozlišení umožňuje jednoznačně číselně vyjádřit úroveň separace. Látky považujeme za zcela oddělené, jestliže $R \geq 1,5$. Při hodnotách nižších se příslušné chromatografické píky částečně překrývají. Z praktického hlediska je možno považovat za dostačující hodnotu rozlišení $R = 1,0$.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je najít způsob, jak naplnit kapilární kolonu o vnitřním průměru 320 μm gelovou stacionární fází tvořenou sephadexem G-10. Následně pak ověřit, zda tento sorbent disponuje svou separační účinností také v tomto mikro-měřítku.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

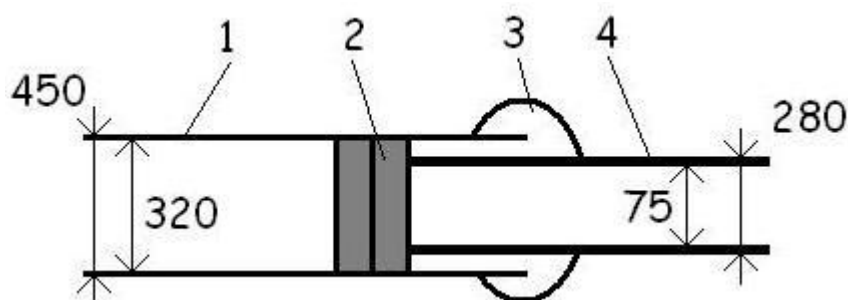
Kolona byla plněna stacionární fází sephadex G-10 o velikosti částic 40-120 μm a frakcionačním rozpětím 0 až 700 Da, (Pharmacia Fine Chemicals, Švédsko). Pro přípravu suspenze a plnění mobilní fáze byl použit acetonitril, čistota pro HPLC, LiChrosolv (Merck, Darmstadt, Německo). Pro testování kolon byla použita thiomocovina, čistá (Lachema Brno, závod Neratovice) a uracil, 99 % (Lachema Brno, závod Neratovice), KNO_3 , čistý (Lachema Brno, závod Neratovice). Jako mobilní fáze při testování byl použit fosforečnanový pufr $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, který byl připraven z $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, čistý (Lachema Brno, závod Neratovice) a z $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, čistý (Lachema Brno, závod Neratovice).

3.2 Použité přístroje

Veškerá vážení byla prováděna na analytických vahách XE-100A (Denver Instruments, Denver, USA). Pro plnění byla použita izokratická pumpa LCP4000 (Ecom, Praha, Česká republika). Promývání kolony bylo prováděno pomocí injekční pumpy KDS100 (kdScientific, Holliston, USA). Pro odvzdušnění mobilní fáze a veškerých vzorků dávkovaných na kolonu byla použita ultrazvuková lázeň Elmasonic S 15 H (P-Lab, Praha, Česká republika). HPLC systém pro testování kolony byl sestaven z pístové pumpy 100DM (Isco, Lincoln, USA), dávkovacího kohoutu o objemu 100 nl (Valco Instruments, Schenkon, Švýcarsko) a dvoukanalového spektrofotometrického detektoru UVIS-205 (Linear Instruments, San Jose, USA). Chromatogramy byly zaznamenány a následně vyhodnoceny programem Clarity 2.4.4.105 (Data Apex, Praha, Česká republika). Naměřená data byla exportována do Microsoft Office Excel 2007, kde byla dále zpracována.

3.3 Příprava kolony

Pro přípravu kolony byla použita křemenná kapilára potažená polyimidem, o vnitřním průměru 320 μm , vnějším průměru 450 μm a přibližné délce 18 cm. Aby stacionární fáze v koloně držela, musela být před koncem kolony vyrobena fritra. K tomu účelu byla použita skelná vata. Ta byla koncem kolony vyříznuta z disku o průměru asi 0,3 cm tak, aby se v ní uchytila. Do vzdálenosti asi 1 cm od konce byla posunuta zakončovací kapilárou o vnitřním průměru 75 μm , vnějším průměru 280 μm a délce asi 4 cm. Stejným způsobem byla přidána ještě jedna vrstva skelné vaty. Pro zajištění takto vyrobené frity, byla použita zakončovací kapilára následně vlepena do křemenné kapiláry epoxidovou pryskyřicí. **Obrázek 3** znázorňuje, jak takto vyrobené zakončení vypadá.



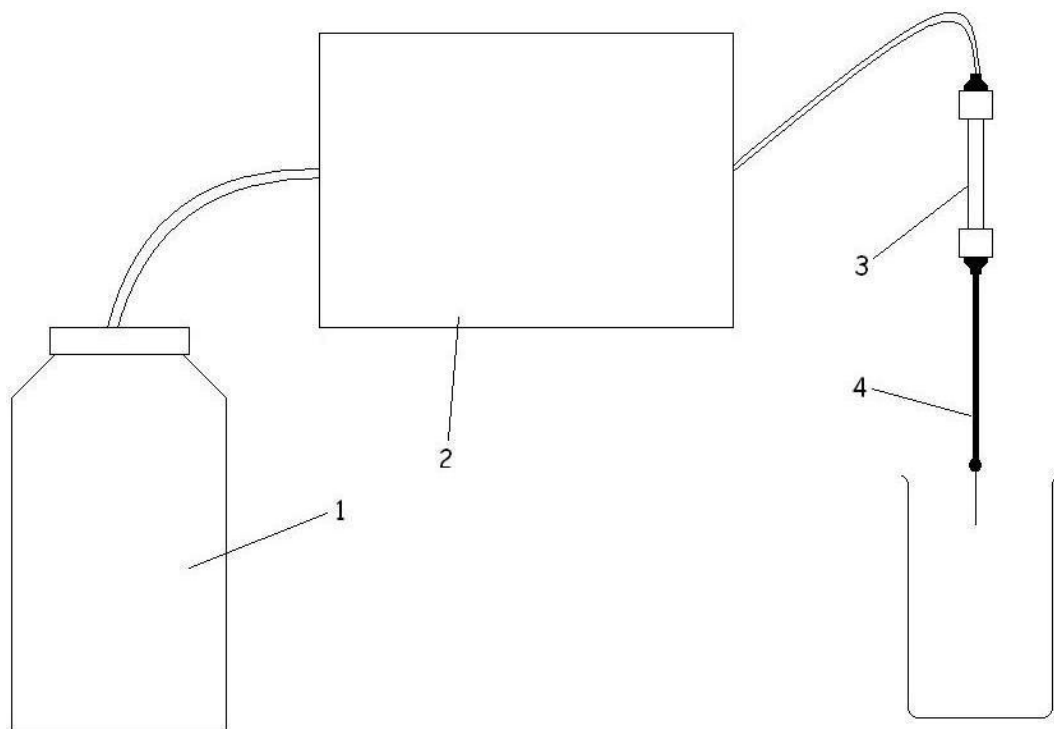
Obrázek 3 Zakončení kolony. Na obrázku jsou uvedeny vnitřní a vnější průměry kapilár v μm .

- 1 - kolona,
- 2 - fritra,
- 3 - epoxidová pryskyřice,
- 4 - zakončovací kapilára.

3.4 Plnění kolony

Kolona byla plněna metodou suspenzního plnění. Kapilára byla pomocí PEEKové trubičky a šroubu připevněna k zásobníku pro suspenzi, do kterého byla přiváděna plnicí fáze z pumpy, jak je vidět na **obrázku 4**. Plnicí fází byl čistý acetonitril, kterým byla nejprve aparatura promyta, aby se ověřila průchodnost kolon a těsnost jednotlivých spojů.

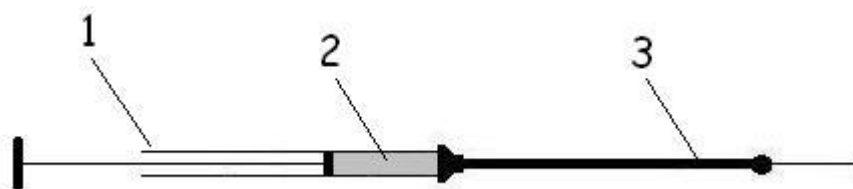
Po vyprázdnění suspenzního zásobníku, do něj bylo převedeno 400 μl čistého acetonitrilu, který byl převrstven 400 μl připravené suspenze. Zásobník byl ihned napojen k pumpě a malým průtokem $0,05 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ byla kolona snadno naplněna. Tlak během plnění nepřesáhl 100 bar. Použitá suspenze měla koncentraci $0,5 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Obrázek 4 Schéma plnicího systému.

- 1 - zásobník plnicí fáze,
- 2 - pumpa,
- 3 - suspenzní rezervoár,
- 4 - kolona.

Acetonitril není pro sephadex vhodné prostředí, a proto musela být kolona převedena do hydratovaného stavu. Kolona byla tedy promývána po dobu 24 hodin destilovanou vodou pomocí injekční pumpy, která je znázorněna na **obrázku 5**. Kolona byla jen pod velmi malým průtokem, za celou dobu promývání nebyl spotřebován ani 1 ml vody. Toto promývání je však vhodné udělat až těsně před samotným použitím kolony k separaci, v ideálním případě již v HPLC systému a za použití mobilní fáze, která bude použita i pro analýzy. A to především z důvodu nebezpečí vyschnutí kolony, jak bylo popsáno v kapitole 1.3.

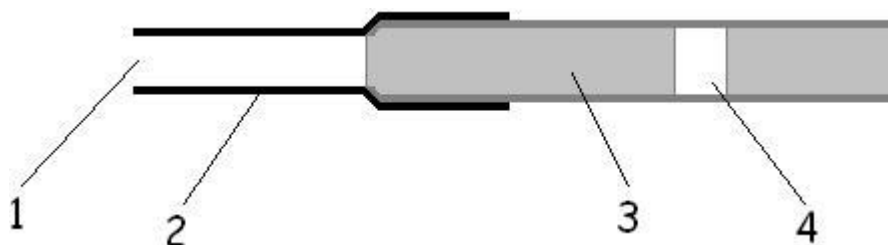


Obrázek 5 Promývací aparatura.
1 - skleněná injekční stříkačka s pístem,
2 - promývací kapalina (voda),
3 - kolona.

3.5 Testování kolony

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda mikrokapilární kolona naplněna gelovou stacionární fází má schopnost separovat různé látky. Proto nebyly zkoumány charakteristiky pro gelovou chromatografii běžně používané, jako je mrtvý objem kolony, objem stacionární fáze, objem pórů, apod. Jako mobilní fáze byl použit čerstvě připravený fosfátový pufr o koncentraci $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a $\text{pH} = 5,83$. Na kolonu bylo dávkováno vždy 100 nl vzorku. Látky byly detekovány spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce $\lambda = 200 \text{ nm}$. Efektivní délka kolony byla 16 cm; měřeno od počátku kapiláry po fritu umístěnou před koncem kapiláry.

V této bakalářské práci byla vyrobena detekční kapilára, pomocí níž bylo možné on-line detekovat proudící mobilní fázi. Tato detekční kapilára měla vnější průměr 300 μm , vnitřní průměr 100 μm a přibližnou délku 20 cm. Na ní byla přilepena teflonová spojka s vnitřním průměrem 170 μm . Pro změkčení teflonové spojky, musela být tato spojka při nasazování na kapiláru zahřívána, čímž získala pružnost a roztažnost. Detekční kapilára byla také potažena polyimidem, který musel být v místě detekce odstraněn. Aby mohlo být detekční okénko vypáleno, byla kapilára zasunuta do detektoru. Místo u detekčního paprsku bylo na kapiláře označeno lihovým fixem a po vyjmutí z detektoru vypáleno nad otevřeným ohněm. Po ochlazení očištěno ethanolem. Na **obrázku 6** je schéma takto připravené detekční kapiláry.

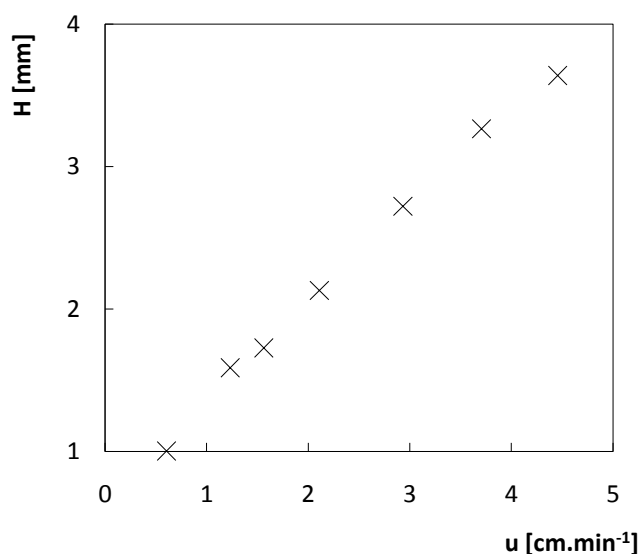


Obrázek 6 Detekční kapilára.

- 1 - místo pro zasunutí zakončovací kapiláry kolony,
- 2 - teflonová spojka,
- 3 - detekční kapilára,
- 4 - detekční okénko.

4 Výsledky a diskuse

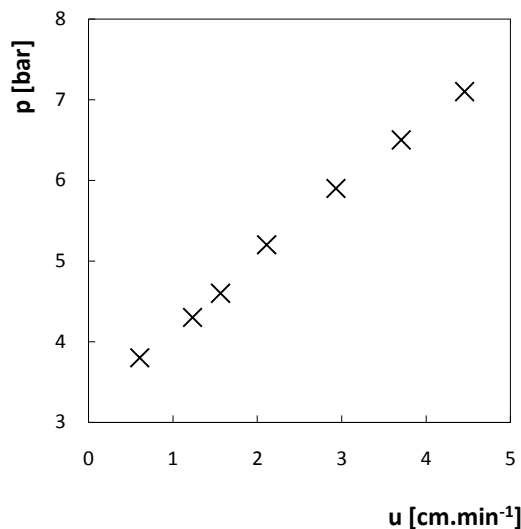
Nejprve byla zkoumána závislost účinnosti separace na průtokové rychlosti, k čemuž byl využit vzorek čisté thiomčoviny $c = 3 \text{ mg.ml}^{-1}$. Měření bylo prováděno v rozmezí průtokových rychlostí $0,4 - 3,0 \text{ } \mu\text{l.min}^{-1}$. Z naměřených hodnot byla sestrojena van Deemterova křivka, **obrázek 7**.



Obrázek 7 Van Deemterova křivka kolony. Testovací látka thiomčovina, mrtvý čas byl určen pomocí KNO_3 .

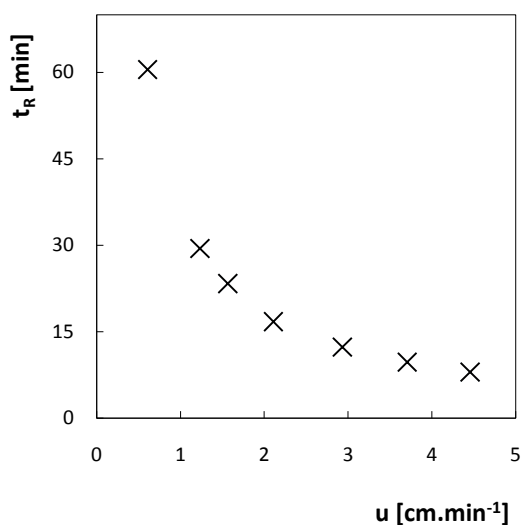
Protože nebyla použita dostatečně malá průtoková rychlost, neprojevil se nelineární příspěvek na počátku křivky způsobovaný molekulovou difúzí. Lze tedy říci, že čím nižší průtoková rychlost bude použita, tím větší účinnosti separace bude dosaženo. Důvodem neuplatnění tohoto příspěvku, může být vysoká hustota gelu. To, že ve své lineární části je křivka strmá, naznačuje očekávaný příspěvek odporu proti převodu hmoty ve stacionární a mobilní fázi.

Současně s tímto měřením byl odečítán také tlak mobilní fáze v koloně, jehož růst je znázorněn na **obrázku 8**.



Obrázek 8 Tlaková závislost při zvyšující se průtokové rychlosti.

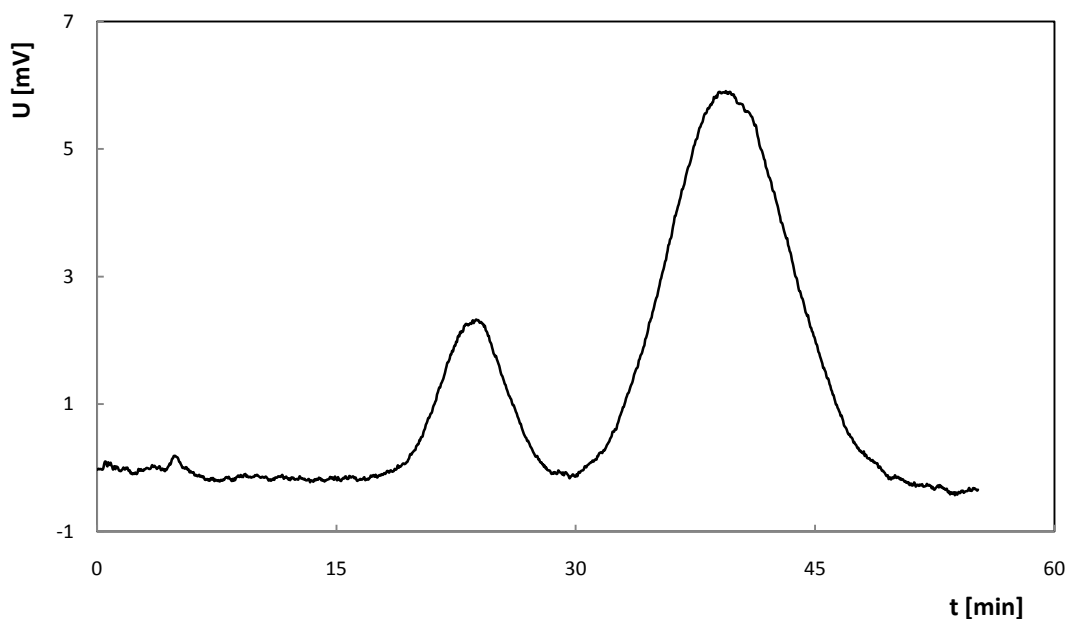
Tato měření byla prováděna hlavně pro nalezení optimální průtokové rychlosti. Takové rychlosti, při které je ještě dostatečně velká separační účinnost. Současně také nízký tlak, při kratší době analýzy. **Obrázek 9** ukazuje očekávané zrychlení analýzy při zvýšení průtokové rychlosti.



Obrázek 9 Časová závislost při zvyšující se průtokové rychlosti. Testovací látka thiomochovina

Za optimální průtokovou rychlost byl zvolen průtok $1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Tlak 4,6 bar nebyl tak velký, aby mohl nepříznivě působit na strukturu stacionární fáze, obzvláště když měřicí systém hlásil tlak 3,1 bar i při vypnuté pumpě. Doba trvání analýzy, která činila přibližně 25 minut, byla také uspokojivá.

Při tomto optimálním průtoku byla provedena analýza čistých látek – (uracil $c = 1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a thiomocovina $c = 3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Byla provedena také analýza směsi těchto látek. **Obrázek 10** je chromatogramem separace této směsi. Tato analýza však byla provedena až následujícího dne po tom, co byla měřena van Deemterova křivka. Přes noc byla kolona pod neustálým malým průtokem, aby se zabránilo vyschnutí kolony. Přesto po nastavení nalezeného optimálního průtoku se tlak zvedl na 7,2 bar a stále pomalu rostl. I za těchto podmínek byla separace směsi uracilu a thiomocoviny provedena.



Obrázek 10 Chromatogram směsi uracilu a thiomocoviny. Látky eluují v tomto pořadí.

Vyšší tlak v koloně byl pravděpodobně způsoben hroutící se strukturou gelu. Následkem toho se retenční čas thiomocoviny zvedl na 39 minut z původních 23 minut při stejném průtoku. Hodnota rozlišení těchto dvou píků $R = 1,14$, byla vypočtena podle

vztahu (4). Toto rozlišení je dostačující k prohlášení, že mikrokapilární kolona naplněna gelovou stacionární fází je schopna separace dvou látek. Kolona byla ještě jeden den ponechána pod průtokem $1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Tlak se nadále zvyšoval až na 24 bar, kdy byla kolona ze systému vyjmuta, protože k dalším pokusům už nebyla vhodná.

5 Závěr

V této bakalářské práci se podařilo připravit kapilární náplňovou kolonu s vnitřním průměrem 320 μm naplněnou sephadexem G-10 o velikosti částic 40 až 120 μm . Pro tuto kolonu byla s ohledem na tlak a účinnost separace určena optimální průtoková rychlost $1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, pomocí vzorku thiomočoviny. Výškový ekvivalent teoretického patra při tomto průtoku byl 2,2 mm pro thiomočovinu a 1,5 mm pro uracil, rozlišení těchto dvou látek bylo 1,14. Tyto hodnoty však odpovídají již hroutící se struktuře stacionární fáze. Nejpravděpodobnější příčinou ke zhroucení struktury gelu byl vysoký tlak u vyšší průtokové rychlosti při měření van Deemterovy křivky. Jen těžko lze odhadovat životnost kolony při používání nižších tlaků.

Přehled literatury

- [1] Guiochon, G.: Preparation and operation of liquid chromatographic columns of very high efficiency. *Journal of Chromatography* **185**, 3-26 (1979).
- [2] Knox, J. H.; Gilbert, M. T.: Kinetic optimization of straight open-tubular liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **186**, 405-418 (1979).
- [3] Oberacher, H.; Krajete, A.; Walther, P.; Huber, C. G.: Preparation and evaluation of packed capillary columns for the separation of nucleic acids by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **893**, 23-35 (2000).
- [4] McGuffin, V. L.; Novotný, M.: Micro-column high-performance chromatography and flame-based detection principles. *Journal of Chromatography* **218**, 179-187 (1981).
- [5] Káš, J.: Laboratorní cvičení z biochemie. Nakladatelství Olomouc (2000), 1.4.3.4. Gelová chromatografie 24-28.
- [6] Kågedal, L.; Engström, B.; Ellegren, H.; Lieber, A. K.; Lundström, H.; Sköld, A.; Schenning, M.: Chemical, physical and chromatographic properties of superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade gel filtration media. *Journal of Chromatography* **537**, 17-32 (1991).
- [7] Porath, J.; Flodin, P.: Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature* **183**, 1657-1659 (1959).
- [8] www.ecompound.com/Reaction%20reference/reaction_workup_and_separation.htm, 25. 4. 2010.
- [9] Sweetman, L.; Nyhan, W. L.: Sephadex G-10 adsorption chromatography of purines and related compounds. *Journal of Chromatography* **32**, 662-675 (1968).
- [10] Casimpoilas, N.; Kenney, J.: Rapid analytical gel chromatography of proteins and peptides on sephadex microbore columns. *Journal of Chromatography* **64**, 77-83 (1972).
- [11] web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html, 13. 5. 2010.
- [12] Klouda, P.: Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda (2003), 4.3.8. Účinnost separace v chromatografii 20-21.