

FRAKCIONACE TOKEM VE FOKUSUJÍCÍCH POLÍCH

JOSEF JANČA

*Université de la Rochelle, Pôle Sciences et Technologie,
Avenue Marillac, 17042 La Rochelle Cedex 01, France*

Došlo dne 1. VIII. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Fokusační a polarizační FFF
3. Izoperichorická fokusace a FFF
4. Gradient příčného toku kombinovaný s polem
5. Hydrodynamické síly kombinované s polem
6. Kombinace stříhového napětí s polem
7. Gradient nehomogenního pole
8. Preparativní frakcionace
9. Perspektivy
10. Závěr

1. Úvod

Vědecké objevy i technické vynálezy bývají někdy očividně, jindy zastřené, patrně však vždy výsledkem snoubení intelektuálního dědictví po předchůdcích s mimořádnými tvůrčími schopnostmi a představivostí současníků. Výjimkou není ani idea frakcionace tokem v polích, jejíž původní anglický název je *field-flow fractionation*, ve zkratce FFF, a která byla ve svém počátku navržena pouze v polarizační verzi. Rozvoj její metodologie vzbuzuje uznání a představuje nesporně jeden z nejvýznamnějších příspěvků k vědě o separacích velkých molekul a částic za posledních 30 let. Frakcionace tokem ve fokusujících polích byla rozvinuta nezávisle, avšak v myšlenkové souvislosti s polarizační FFF, jak v teorii tak v analytické metodologii. Původní a jedinečné metody a techniky polarizační i fokusační FFF byly navrženy mnoha různými autory. Soutěž, obvyklá v podobných případech, byla většinou doprovázena pocitem kolegiality a sdíleného dědictví. Tato

soutěž byla možná subtilní a velmi diskrétní, avšak reálná, jak lze dnes soudit i ze skutečnosti, že J. Calvin Giddings, původce myšlenky polarizační FFF, byl dvakrát, v letech 1984 a 1992, nominován na Nobelovu cenu. Předkládaný článek podává kritický přehled pokroku, dosaženého v posledních letech ve fokusační FFF. Tento princip si činí nárok být současně autonomní i plně příslušející do rodiny FFF, jejíž vznik byl oznámen Giddingsem v roce 1966.

Těžba zlata rýžováním, známá a využívaná již přibližně 5000 let před naším letopočtem, pochopená Archimedelem před nějakými 2222 lety a popsána patrně poprvé vědeckou metodou v roce 1556 Georgem Agricolou¹, německým lékařem, žijícím v Jáchymově, je založena na principu rozdílného usazování těžších částic zlata a tím jejich oddělování od lehčích částic současným působením zemské tíže a zhruba horizontálního proudu vody. Toto horní řemeslo, nacházející se někde mezi uměním a vědou již od dob antiky, je velmi důmyslně i s jemným estetickým citem



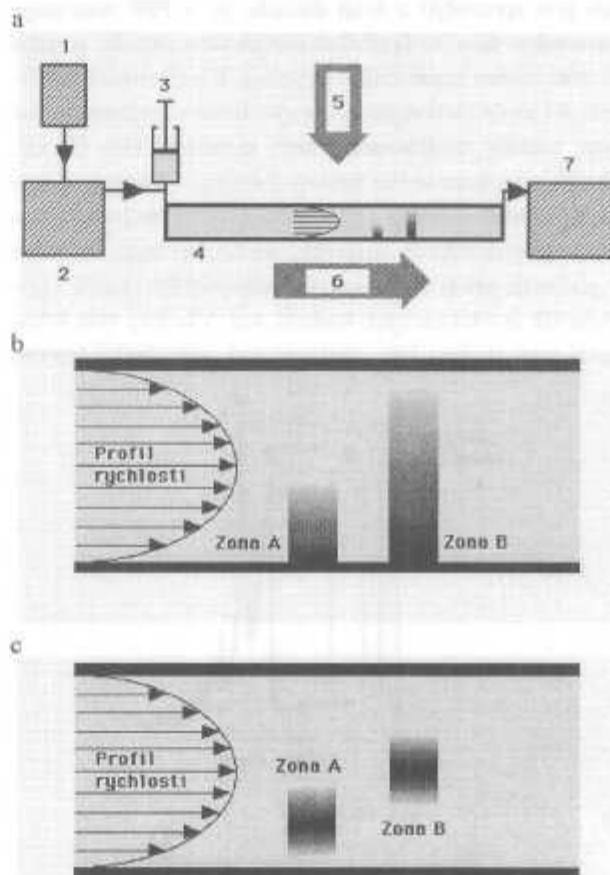
Obr. 1. Středověká technologie rýžování zlata je předchůdcem *field-flow* frakcionace ve své fyzikální podstatě a autor této rytiny, shodou okolností a poněkud anekdoticky, jako by předvídal co bude vymyšleno ve dvacátém století a jakou zkratku vynález ponese

symbolizováno na obr. 1, převzatém bez souhlasu nakladatele z díla¹. Polarizační FFF má tak své, dokonce antické, předchůdce. Z pohledu dlouhé historie vědeckého bádání byl však princip FFF ve své polarizační variantě publikován Giddingsem teprve nedávno². Vznášející se balon bratří Josepha a Etienna Montgolfierů³, je fenomenologickým předchůdcem do téhož rodokmenu příslušejících vynálezů izopyknické⁴ a izoelektrické⁵ fokusace. Princip fokusační FFF byl poprvé publikován v roce 1982 (cit.⁶) s příkladem potenciálního využití hustotního gradientu. Giddings⁷ zvolil název hyperlayer FFF pro tentýž princip. Posléze byla fokusační FFF jasně vymezena jako nová metodologie a byly zveřejněny první teoretické a experimentální výsledky⁸⁻¹¹. Vědci roztroušení v laboratořích po celém světě přispěli postupně a nezávisle k dosaženému pokroku.

2. Fokusační a polarizační FFF

Princip FFF je založen na současném působení sil efektivních polí a toku kapaliny na jednotlivé složky frakcionovaného vzorku uvnitř separačního kanálu. Vektory pole sil a hydrodynamického toku jsou vzájemně kolmé, jak je znázorněno na obr. 2a. Jako analytická dělicí metoda je FFF v současné době užívána pro frakcionace zejména makromolekul a částic, rozpuštěných či dispergovaných ve vhodné kapaliny. Vzorek v roztoku či v disperzi je nastříknut do separačního kanálu jako krátký puls anebo kontinuálně a je transportován nosnou kapalinou podobně jako v chromatografii. Pole interaguje se složkami vzorku a způsobuje vytváření koncentračního gradientu každé z nich napříč kanálu. Vzniklý gradient je příčinou vyrovnávajícího difuzního toku. Při dosažení rovnováhy dojde k vytvoření ustáleného koncentračního rozdělení napříč kanálu. Výsledné zóny složek vzorku jsou buď fokusovány v různých vertikálních polohách anebo různou měrou komprimovány, obvykle u spodní stěny kanálu. Protože nosná kapalina současně teče ve směru podélné osy kanálu a v ní se vytváří rychlostní profil jako důsledek viskozitních jevů, jsou jednotlivé složky vzorku unášeny tokem různými rychlostmi, odpovídajícími příčné poloze každé ze složek v rychlostním profilu, a jsou eluovány z kanálu v různých časech. Tato situace je schematicky znázorněna na obr. 2b pro polarizační mechanismus separace a na obr. 2c pro fokusační FFF. Principiální rozdíl mezi fokusačním a polarizačním mechanismem tkví v silách efektivního pole, jejichž intenzita a směr jsou funkcí polohy napříč kanálu v případě fokusační FFF, zatímco u polarizační FFF jsou

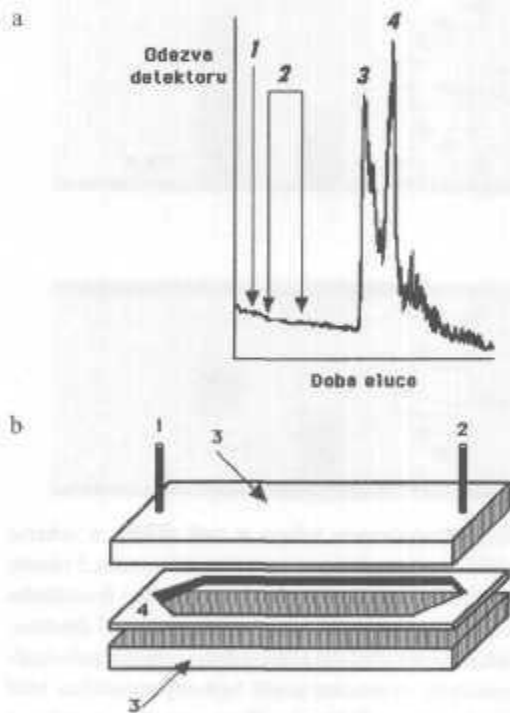
tyto veličiny neměnné ve směru příčné osy. Různé kombinace polí a gradientů mohou vybudit fokusační jev a být využity v FFF. V této práci je referováno o pokroku dosaženém přibližně v posledních deseti letech ve fokusační FFF, referát o polarizační FFF byl již v tomto časopise zveřejněn¹².



Obr. 2. Princip frakcionace tokem v poli (FFF); a schéma zařízení pro FFF: 1 zásobník nosné kapaliny, 2 čerpadlo, 3 nástřik vzorku, 4 separační kanál, 5 směr působení vnějšího fyzikálního pole, 6 směr hydrodynamického toku nosné kapaliny, 7 detektor; b výšek kanálu se schematickým znázorněním principu polarizační FFF. Parabolický rychlostní profil hydrodynamického toku unáší v podélném směru složky A a B separovaného vzorku ve dvou zónách, které mají za ustáleného stavu exponenciální rozdělení koncentrace v příčném směru. Zóna A, která je více komprimována k akumulaci stěně kanálu je transportována v podélném směru pomaleji; c výšek kanálu se schematickým znázorněním principu fokusační FFF. Parabolický rychlostní profil hydrodynamického toku unáší v podélném směru složky A a B separovaného vzorku ve dvou zónách, které mají za rovnovážného stavu přibližně gaussovské rozdělení koncentrace v příčném směru. Zóna A, která se nachází v oblasti nižších rychlostí podélného toku je transportována pomaleji

3. Izoperichorická fokusace a FFF

Gradient efektivní vlastnosti nosné kapaliny, kombinovaný s působením vhodného pole, může vést k fokusačnímu jevu. Termín nosná kapalina namísto konvenčního pojmu mobilní fáze, který je užíván v chromatografii, se zde jeví správnější z toho důvodu, že v FFF neexistuje stacionární fáze ve fyzikálně-chemickém smyslu, tj. jako aktivní složka separačního systému. Koncentrační rozdělení, jež je příčinou separace, je vytvářeno v kontinuující fázi, nikoliv rozdělováním mezi dvěma či více fázemi. Například částice určité hustoty fokusují v hustotním gradientu kombinovaném s gravitačními či odstředivými silami v izopyknických vrstvách, amfoterní látky fokusují v gradientu pH kombinovaném s elektrickým polem v příslušných izoelektrických bodech, atd. Všechny tyto fokusační jevy mohou být zahrnuty pod zobecňující termín,



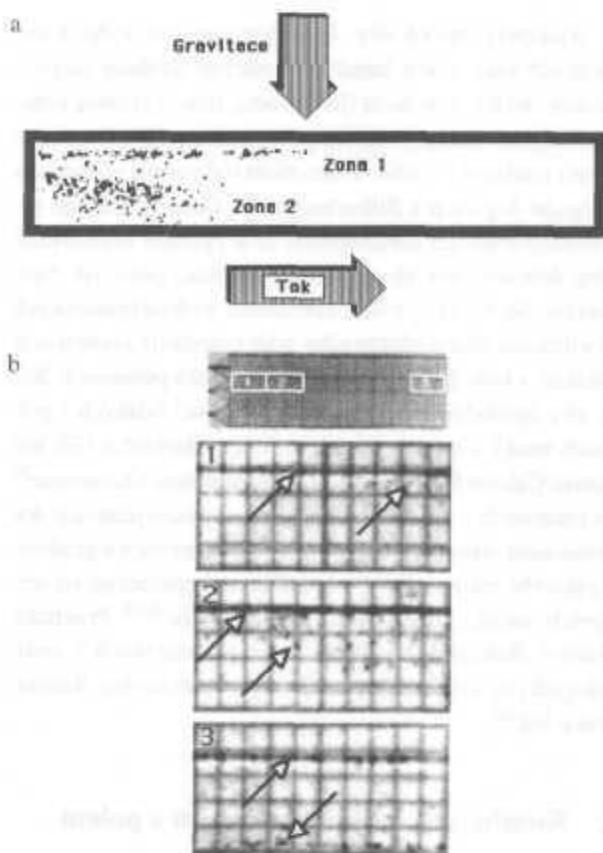
Obr. 3. Izoperichorická fokusační FFF v hustotním gradientu, využívající kombinace elektrického a gravitačního pole; a fraktogram separace dvou polystyrenových (PS) latexů lišících se hustotou ($A_p = 0,0005 \text{ g cm}^{-3}$) a rozměrem: 1 nástřík, 2 relaxační perioda se zastavením toku, zlepšující rozlišení separace, 3 PS latex s nižší hustotou a průměrem částic 10 μm , 4 PS latex s vyšší hustotou a průměrem částic 40 μm ; b schéma kanálu použitého při separaci: 1 vstup nosné kapaliny a nástřík vzorku, 2 výstup do detektoru, 3 elektrody tvořící současně stěny kanálu, 4 teflonová izolační fólie v níž je vyříznut tvar kanálu

izoperichorická fokusace, zavedený Kolínem¹³. Termín izoperichorický má původ v řečtině (isos = stejný a perichoron = prostředí) a znamená, že fokusační síly vznikají rozdílem v efektivní lokální vlastnosti dispergujícího prostředí a fokusovaného vzorku. V izoperichorickém bodě je výslednice všech sil nulová.

Obvykle jsou síly primárního pole, tj. gravitačního, odstředivého nebo elektrického, které vytváří gradient hustoty či pH, i příčinou tvorby izoperichorických fokusovaných zón. Původnost nedávného návrhu¹⁴ spočívá ve využití sekundárního pole sil jiného charakteru k vytváření fokusovaných zón. Tento nový princip izoperichorické fokusace, využívající kombinovaného působení dvou polí různého fyzikálního charakteru ve statických či dynamických podmínkách hydrodynamického toku, se ukázal být velmi slibným pro analytické i mikropreparativní separace. Experimentální ověření bylo uskutečněno s modelovými vzorky polystyrenových latexových částic, dispergovaných v koloidním silikagelu, jak za statických podmínek, tj. ve fokusační cele bez toku, tak v dynamických podmínkách fokusační FFF¹⁵. Zatímco za statických podmínek nebyla separace různých částic latexu pozorována, fokusační FFF umožnila velmi zřetelné rozdělení, jehož jeden příklad je ukázán na obr. 3a. Důležitým faktorem je, že separační kanál pro izoperichorickou fokusační FFF s využitím elektrického a gravitačního pole, viz obr. 3b, je velmi jednoduchý a nesrovnatelně levnější než ultracentrifuga, která by mohla být srovnávána jako kompetitivní metoda izoperichorické fokusace za statických podmínek. Protože vzdálenost mezi elektrodami je velmi krátká, řádově desítky milimetrů, stačí i velmi nízké elektrické napětí, řádu desítek voltů, k vytvoření dostatečně silného elektrického pole. Teoretické výpočty¹⁶ umožnily vysvětlit zvýšení rozlišení a tedy účinnosti separace při dynamické fokusační FFF ve srovnání se statickými experimenty.

Současné použití dvou polí různého charakteru představuje velmi zajímavou alternativu izoperichorické fokusační FFF, nikoliv však jedinou. Přirozená gravitace byla použita jako jediné pole k separaci velkých částic (100–200 μm) v hustotním gradientu za podmínek izopyknické fokusační FFF¹⁷. Digitalizovaná makrofotografie na obr. 4a představuje jednu z fází procesu fokusace uvnitř separačního kanálu. Jisté pochybnosti v souvislosti s touto prací¹⁷ se týkaly možnosti ustavení hustotního gradientu pouze vlivem přirozené gravitace, dostatečně strmého tak, aby k fokusačnímu jevu mohlo dojít za dobu experimentu. Jiné vysvětlení pozorované fokusace mohlo být založeno na skutečnosti, že krátkodobě je vytvořen hustotní gradient

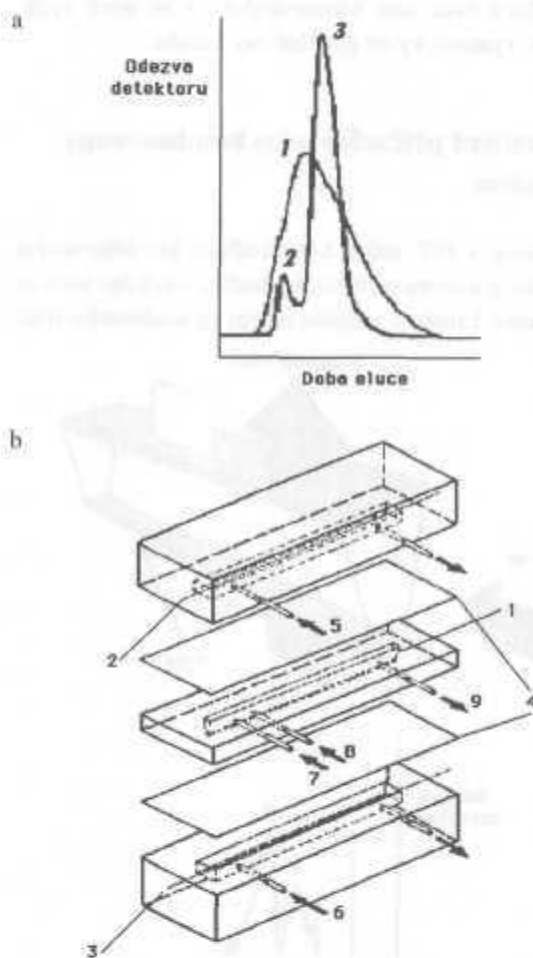
při nástřiku vzorku fokusovaných částic, dispergovaných v kapalině, jejíž hustota není zcela totožná s hustotou nosné kapaliny. Pečlivá experimentální práce při preparativní fokusační FFF v nespojitě preformovaném hustotním gradientu¹⁸⁻¹⁹ potvrdila, že fokusační proces je v takových podmínkách velmi rychlý. Jeden z nepublikovaných výsledků z té doby je reprodukován na obr. 4b. Na druhé straně, současná studie²⁰ přechodového stavu při sedimentaci částic stejného silikagelu jako byl použit v předchozím experimentu¹⁷ ukázala, že kinetika tohoto transportního jevu je dosti pomalý proces i při podstatně vyšších intenzitách odstředivých sil. Intenzivnější odstředivé síly byly využity k fokusování modelových polystyrenových



Obr. 4. Izoperichorická fokusační FFF v hustotním gradientu, využívající pouze gravitačního pole; a makrofotografie výseku kanálu ukazující vytváření dvou fokusovaných zón 1 a 2; b makrofotografie výseku kanálu na pozadí milimetrového papíru, ukazující vytváření dvou fokusovaných vrstev při preparativní kontinuální frakcionaci částic různých hustot v preformovaném hustotním gradientu; 1, 2, 3 detaily různých pozic podél kanálu. Šipky ukazují postupnou fokusaci separovaných částic na rozhraní příslušných hustotních vrstev

a polyglycidyl methakrylátových latexů²¹, experimentální práce však byla přerušena a přístroj vyvíjený pro tento účel od roku 1982 (cit.²²) a ukončený v roce 1986 (cit.²³), zůstává zřejmě nevyužit²⁴.

Samotné elektrické pole bylo využito k vytvoření gradientu pH a k separaci složek koňského myoglobinu technikou izoelektrické fokusační FFF²⁵. Výsledek této separace je ukázán na obr. 5a a schéma kanálu, jehož bylo k separaci použito, je na obr. 5b, který byl původně publikován v práci²⁶ a reprodukován bez souhlasu vydavatele i autorů i bez citace zdroje v práci²⁷. Jiný pokus separovat

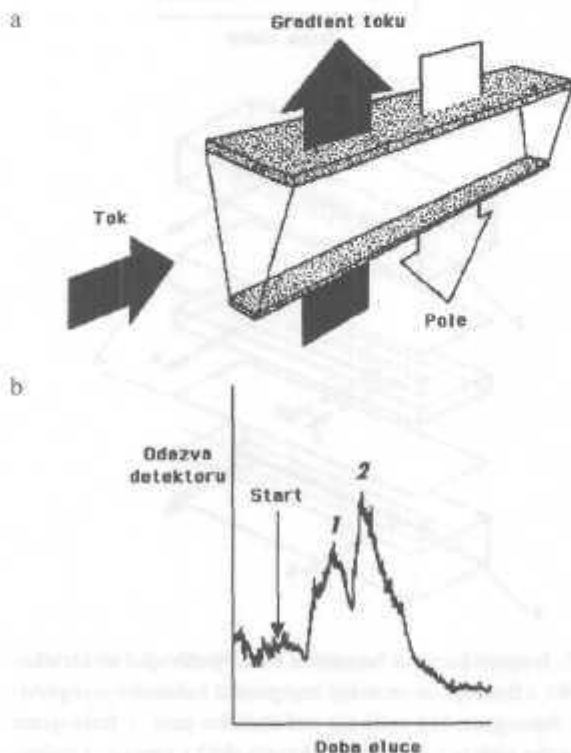


Obr. 5. Izoperichorická fokusační FFF využívající elektrického pole; a fraktogram separace komponent koňského myoglobinu: 1 fraktogram bez aplikace elektrického pole, 2 fraktogram s aktivním elektrickým polem - kyselá složka vzorku, 3 fraktogram s aktivním elektrickým polem - zásaditá složka vzorku; b schéma kanálu použitého při separaci: 1 lichoběžníkový kanál (s modulovanou průřezovou permeabilitou), 2 Pt anoda, 3 Pt katoda, 4 polopropustné membrány, 5 vstup anolytu, 6 vstup katolytu, 7 vstup amfolytu, 8 nástřik vzorku, 9 výstup do detektoru

amfoterní proteiny byl méně úspěšný²⁸. Výzkum vlivu experimentálních podmínek na vytváření gradientu pH v podmínkách izoelektrické fokusační FFF^{27,29} ukázal obecný soulad se známými teoretickými a experimentálními poznatky. Využití jiného než axiálně symetrického parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku i v případě izoelektrické fokusační FFF²⁷ by bylo potěšitelným pokud by byla korektně citována původní idea³⁰ z práce z roku 1983. Separační kanály s modulovanou průřezovou permeabilitou³⁰, umožňující vytvoření takového rychlostního profilu, řeší problém stejné podélné rychlosti eluce dvou zón fokusovaných ve stejných vzdálenostech, symetricky od podélné osy kanálu.

4. Gradient příčného toku kombinovaný s polem

Fokuse v FFF může být dosaženo kombinovaným působením gradientu rychlosti hydrodynamického toku ve směru napříč kanálu s vnějším polem za současného toku



Obr. 6. Elutriační fokusační FFF v kanálu lichoběžníkového průřezu; a princip elutriační fokusační FFF v kanálu s modulovanou průřezovou permeabilitou; b separace dvou polystyrenových latexů: 1 PS latex o průměru částic 1,6 μm , 2 PS latex o průměru částic 5 μm

nosné kapaliny v podélném směru^{31,32}. Tato technika elutriační fokusační FFF byla použita k separaci modelové směsi částic polystyrenového latexu a koloidních částic silikagelu. Princip této techniky je znázorněn na obr. 6a a fraktogram směsi částic polystyrenového latexu na obr. 6b. Giddings³³ navrhnul podobný princip fokusační FFF, avšak realizované v kanále klasického obdélníkového průřezu. V tomto případě byl gradient příčného toku vytvořen rozdílem průtoků oběma protilehlými stěnami kanálu.

5. Hydrodynamické síly kombinované s polem

Hydrodynamické síly, které vznikají při vyšších rychlostech toku nosné kapaliny a udržují unášené suspendované částice ve vznosu (lift forces), jsou-li vhodně kombinovány se silami vnějšího pole, mohou způsobit fokusování unášených částic. Tento efekt byl poprvé pozorován a popsán Segréem a Silberbergem³⁴. Částice unášené tokem mají tendenci koncentrovat se a vytvářet fokusované zóny dokonce bez vlivu dalšího vnějšího pole, jak bylo ukázáno Smallem³⁵, avšak kombinace hydrodynamických sil s dalšími silami efektivního pole umožňuje kontrolovat fokusaci v širších mezích experimentálních podmínek. Silný vliv hydrodynamických sil na separaci lidských i zvířecích buněk a modelových latexů při polarizační FFF byl ukázán Caldwellovou a kol.³⁶, a Wahlundem s Litzenem³⁷ při separacích v asymetrickém kanále s pouze jednou polo-propustnou stěnou. Kombinovaný vliv gravitace a gradientu příčného toku umožnil velmi účinnou separaci polystyrenových latexů a koloidních částic silikagelu^{38,39}. Prakticky užitečné frakcionace vzorků částic pocházejících z technologických výrobních procesů byly realizovány Barnanem a kol.⁴⁰.

6. Kombinace stříhového napětí s polem

Vysoký stříhový gradient, vedoucí k deformaci ohebných makromolekulárních klubek v roztoku, způsobuje vzrůst entropie klubka. Vzniklý gradient entropie by měl způsobit transport makromolekul do oblasti s nižším stříhovým napětím. Pozorování⁴¹ obráceného sledu eluce polystyrenových standardů od vyšších molárních hmotností k nižším při polarizační termické FFF za vysokých průtoků nosné tekutiny bylo přičítáno uvedenému entropickému efektu. Nicméně detailní studie⁴² vlivu operačních proměn-

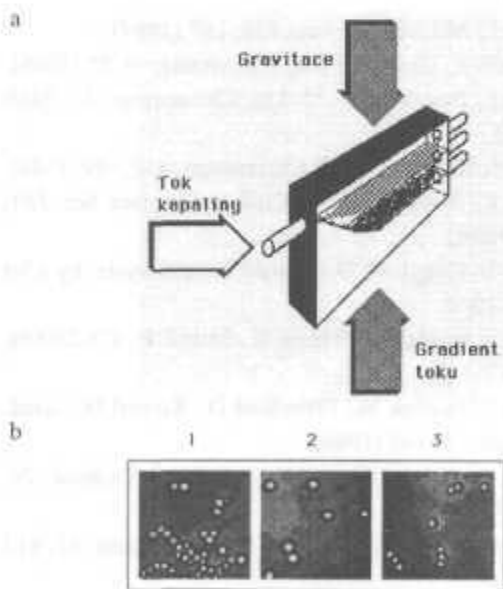
ných naznačila i možnosti jiné interpretace těchto skutečností. Hlubší studium těchto jevů je nesporně nutné před definitivními soudy o původu jinak velmi zajímavých experimentálních nálezů.

7. Gradient nehomogenního pole

Použití vysokého gradientu magnetického pole bylo teoreticky navrženo k separaci diamagnetických a paramagnetických částic mechanismem fokusační FFF⁴⁻⁵. Teorie se jeví zajímavě a zaslouží si experimentální ověření.

8. Preparativní frakcionace

Často bývá vznášena otázka, zda metodologie fokusační FFF umožňuje frakcionace větších množství vzorku. Žádné zásadní omezení neexistuje a fokusační FFF může být dokonce výhodně k takovým účelům použita^{9,44}. Je-li frakcionační kanál vybaven více výstupními kapilárami v několika příčných polohách, je možný kontinuální odběr vzorků fokusovaných v různě položených vrstvách. Toto uspořádání bylo navrženo brněnskou skupinou⁹, následně



Obr. 7. Preparativní fokusační FFF; a schéma kanálu pro fokusační FFF v kontinuálním preparativním uspořádání; b fotografie z optického mikroskopu ukazující frakcionaci polydisperzního vzorku částic silikagelu (průměry částic mezi 3 až 5,9 μm): 1 původní nefrakcionovaný vzorek, 2 frakce odebraná z dolního výstupu, 3 frakce odebraná z horního výstupu

Giddingsem⁴⁴, a experimentálně realizováno a publikováno posléze³². Princip experimentálního zařízení i s příkladem frakcionace částic silikagelu, jejichž velikost byla blízká průměru krevních buněk, pro něž se praktické uplatnění zdálo výhodným i reálným, je znázorněn na obr. 7a resp. 7b. Přestože tato frakcionace byla uskutečněna s využitím kombinace přirozeného gravitačního pole a v opačném směru působícím gradientu hydrodynamického toku, neexistuje žádný důvod aplikovat pouze tento typ polí. Využití izopyknického, izoelektrického atd., tedy obecně izoperichorického fokusačního jevu, je snadno představitelné a všechny výše uvedené příklady analytických separací jsou snadno transformovatelné do preparativního měřítka.

9. Perspektivy

Fokusační FFF představuje příspěvek k separační vědě a technologii i k analytické chemii makromolekul a částic syntetického i přírodního původu, v širokém měřítku molárních hmotností až po částice v mikronové oblasti i organizované supramolekulární struktury, mikroorganismy apod. To neznamená, že malé molekuly nemohou být touto metodologií separovány. Molekuly, které přímo neinteragují či interagují pouze slabě s aplikovanými poli, mohou být separovány za předpokladu jejich specifického zakotvení nebo rovnovážné sorpce na částicích, které s polem interagují dostatečně. V takovém případě je třeba v daném separačním mechanismu zvažovat i tyto sekundární rovnováhy. Prozatím zůstává tato hypotéza námětem k realizaci.

Výzkum, vývoj a technologie spojené s vědami o živé přírodě, analytické problémy ve vztahu k ochraně životního prostředí a mnoho jiných vědeckých i technologických činností stimulují rozvoj nových analytických metodologií. Předkládaný referát se pokusil ukázat, že většina experimentálních prací byla dosud vedena s cílem ověřit principy a teorii a/nebo demonstrovat, že „ono to chodí“, spíše nežli vypracovat dokonalou metodologii, prakticky použitelnou v nejmenších detailech. Některé výhody již existujících metod jsou ihned zřejmé. Patří k nim ku příkladu zásadní absence velkého aktivního povrchu s nímž by separované makromolekuly či částice interagovaly, což je podmínka nutná u většiny chromatografických metod. Separace se v principu odehrává v jediné fluidní fázi. Operační proměnné ovlivňující separaci, jako je intenzita efektivních sil, mohou být měněny v širokém rozmezí spojitě. Všechny tyto faktory a celá řada dalších jsou velmi důležité, jedná-li

se o separaci málo stabilních objektů biologického původu, které mohou být velmi málo odolné vůči povrchovým interakcím.

Nedostatek komerčně dostupných přístrojů je zdánlivě omezujícím faktorem k rychlejšímu šíření nové metodologie fokusační FFF. Proč je tento nedostatek zdánlivý? Odpověď je jednoduchá. V podstatě všechny komponenty kompletního zařízení pro fokusační FFF jsou dostupné jako části modulárních kapalinových chromatografů. Výjimku tvoří separační kanály, které jsou však vesměs snadno vyrobitelné v laboratorních podmínkách a to by mělo představovat spíše výzvu tvořivosti a invenci než technickou překážku. V základním experimentálním výzkumu tomu tak vždy bylo.

10. Závěr

Cílem tohoto referátu bylo shrnout nejdůležitější výsledky, jichž bylo v oblasti fokusační FFF metodologie dosaženo v přibližně posledních deseti letech. Toto období se příliš neliší od stáří této nové separační techniky. Proto se zdálo být účelné koncipovat text tak, aby byl srozumitelný zejména nespecialistům v oboru separační vědy a tím mohl přispět k probuzení či zvýšení zájmu, případně vybudit motivaci k výzkumnému či aplikačnímu záměru. Seznam původní literatury není zdaleka kompletní, více zainteresovanému čtenáři je možné doporučit některé souborné referáty, hodnotící současný stav v daný okamžik, zejména ty z poslední doby^{24,45-47}.

Hlavní aktivita profesora J. Calvina Giddingse v oblasti FFF byla orientována na polarizační metodologii v níž počet publikovaných prací jeho a jeho spolupracovníků čítá přibližně dvě stovky za právě uplynulých 30 let. Byl však nezanedbatelným způsobem přítomen i na poli fokusační metodologie. Pracoval jsem v jeho laboratoři v letech 1978-79 a značná část mé následné vědecké činnosti byla zasvěcena FFF, která pro mne znamenala obrovskou výzvu, ale i uspokojení ve chvílích úspěšného dosažení postupných cílů s mými bývalými i současnými spolupracovníky, jejichž příspěvek v přibližně posledních 15 letech si velmi vážím. Chtěl jsem tento příspěvek věnovat památce Cal Giddingse, kterému nebylo dopřáno dojít do dalších cílů.

LITERATURA

1. Agricola G.: *De Re Metallica*, Libri XII, QVI, Basileae 1556.

- Giddings J. C.: *Separ. Sci.* 7, 123 (1966).
- Montgolfier J., Montgolfier E.: *Description des expériences aérostatiques de MM. de Montgolfier, et de celles auxquelles cette découverte a donné lieu*, Cu-chet, Paris 1784.
- Meselson M., Stahl F. W., Vinograd J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 43, 581 (1957).
- Svensson H.: *Acta Chem. Scand.* 75, 325 (1961).
- Janča J.: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 3, 887 (1982).
- Giddings J. C.: *Separ. Sci. Technol.* 18, 765, (1983).
- Janča J.: *Trends Anal. Chem.* 2, 278 (1983).
- Janča J., Chmelík J.: *Anal. Chem.* 56, 2481 (1984).
- Janča J.: *Trends Anal. Chem.* 6, 147 (1987).
- Janča J.: *Field-Flow Fractionation: Analysis of Macromolecules and Particles*. M. Dekker, New York 1988.
- Janča J.: *Chem. Listy* 76, 785 (1982) a 81; 1034 (1987).
- Kolin A.: *Electrofocusing and Isotachopheresis* (Radola B. J., Graesslin D., ed.) de Gruyter, Berlin 1977.
- Janča J., Audebert R.: *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp.* 52, 63 (1993).
- Janča J., Audebert R.: *Mikrochim. Acta* 777, 163 (1993).
- Janča J.: *Mikrochim. Acta* 772, 197 (1994).
- Chmelík J., Janča J.: *J. Liq. Chromatogr.* 9, 55 (1986).
- Janča J., Nováková N.: *J. Liq. Chromatogr.* 10, 2869 (1987).
- Janča J., Nováková N.: *J. Chromatogr.* 452, 549 (1988).
- Janča J., Špírková M.: *J. Colloid Interface Sci.* 184, 181 (1996).
- Janča J., Příbylová D.: nepublikované výsledky z let 1982-1990.
- Janča J., Janíček M., Slavík V., Stehlík F.: *CS 230086 (PV 5061-82)*.
- Janča J., Janíček M., Příbylová D., Klesnil M.: *Anal. Instrum.* 75, 149 (1986).
- Janča J.: *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 20, 2555 (1997).
- Chmelík J., Deml M., Janča J.: *Anal. Chem.* 61, 912 (1989).
- Janča J., Chmelík J., Jáhnová V., Nováková N., Urbánková E.: *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp.* 45, 39 (1990).
- Chmelík J.: *J. Chromatogr.* 545, 349 (1991).
- Thormann W., Firestone M. A., Dietz M. L., Cecconie T., Mosher R. A.: *J. Chromatogr.* 461, 95 (1989).

29. Chmelfk J.: *J. Chromatogr.* 539, 111 (1991).
30. Janča J., Jáhnová V.: *J. Liq. Chromatogr.* 6, 1559 (1983).
31. Janča J.: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 8, 233 (1987).
32. Urbánková E., Janča J.: *J. Liq. Chromatogr.* 13, 1877 (1990).
33. Giddings J. C.: *Separ. Sci. Technol.* 21, 831 (1986).
34. Segré G., Silberberg A.: *Nature (London)* 189, 209 (1961).
35. Small E. H.: *J. Colloid Interface Sci.* 48, 147 (1974).
36. Caldwell K. D., Cheng Z. Q., Hradecký P., Giddings J. C.: *Cell Biophys.* 6, 233 (1984).
37. Wahlund K. G., Litzen A.: *J. Chromatogr.* 461, 73 (1989).
38. Chen K., Wahlund K. G., Giddings J. C.: *Anal. Chem.* 60, 362 (1988).
39. Ratanathanawongs S. K., Giddings J. C.: *J. Chromatogr.* 467, 341 (1989).
40. Barman B. N., Myers M. N., Giddings J. C.: *Powder Technol.* 59, 53 (1989).
41. Giddings J. C., Li S., Williams P. S., Schimpf M. E.: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 9, 817 (1988).
42. Janča J., Martin M.: *Chromatographia* 34, 125 (1992).
43. Semyonov S. N., Kuznetsov A. A., Zolotaryov P. P.: *J. Chromatogr.* 364, 389 (1986).
44. Giddings J. C.: *Separ. Sci. Technol.* 21, 831 (1986).
45. Janča J.: *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp.* 57, 91 (1992).
46. Janča J.: *Am. Lab.* 24, 15 (1992).
47. Janča J.: *Int. Lab.* 25/7, 8A (1995).

J. Janča (*Pôle Sciences et Technologie, Université de La Rochelle, La Rochelle, France*): **Focusing Field-Flow Fractionation**

The invention of the field-flow fractionation concept represents a most important contribution to the science of separation of large molecules and particles in the course of the last 30 years. A generic focusing field-flow fractionation principle has developed both in theory and in analytical methodology. Particular methods and techniques were proposed and implemented independently by several laboratories in the world. This review summarizes the progress achieved during the last few years.