

**CHROMATOGRRAFIA
WYKLUCZANIA
(dawniej – ŻELOWA – PC/SEC)**



Układy chromatograficzne typu GPC / SEC

1. W warunkach nie-wodnych - eluenty: THF, dioksan, czerochloroetylen, chlorobenzen, ksylen; fazy stacjonarne: kopolimer styren-diwinylbenzen; do badań rozkładu masy cząsteczkowej polimerów nisko i średnio polarnych, a także lipidów, fosfolipidów itp..
2. W warunkach wodnych- eluenty: dimetyloformamid, metanol, acetonitryl i ich mieszaniny z wodą i z wodnymi roztworami soli, kwasów i zasad, fazy stacjonarne: polidekstrany, policukry, poliwęglany, szkła porowate, silanizowany żel krzemionkowy



Zakres zastosowań chromatografii wykluczania

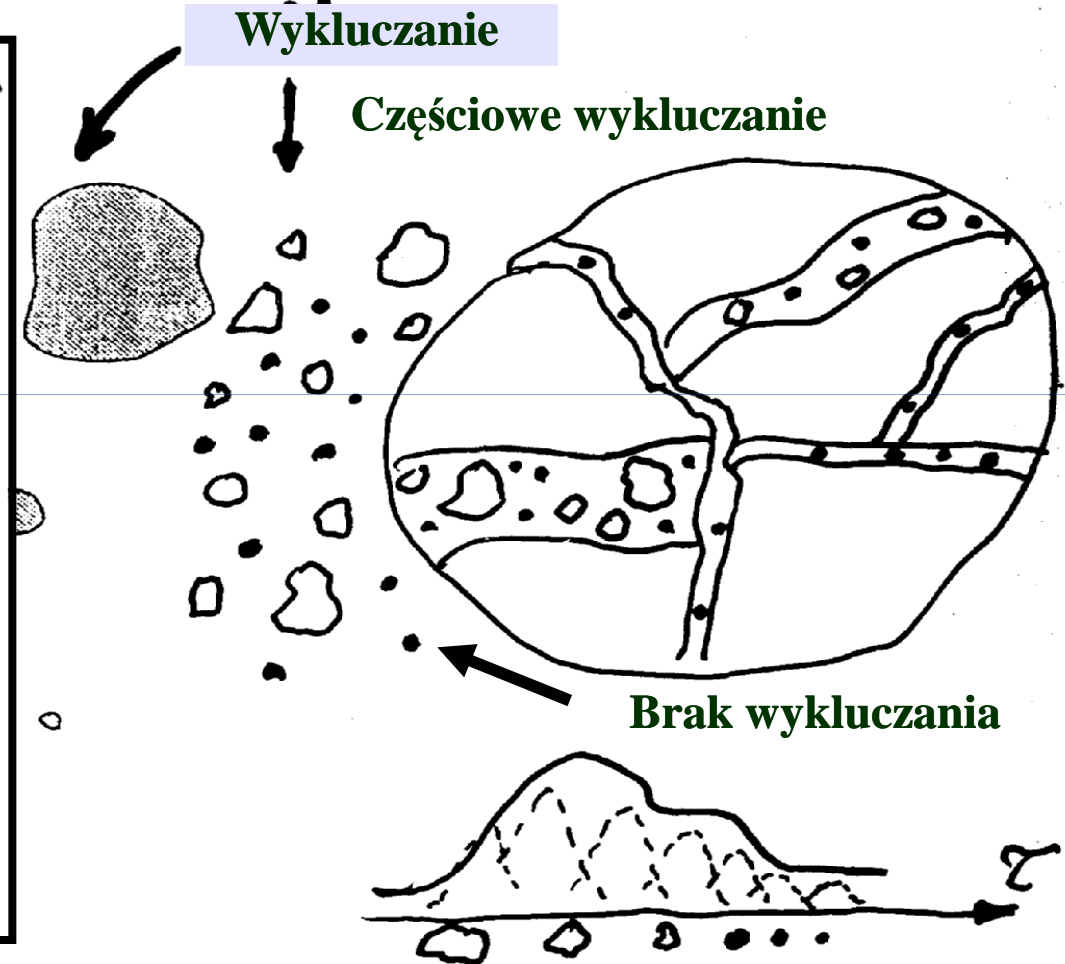
- Badanie rozkładu masy molekularnej różnego typu materiałów – polimerów i biopolimerów
- Otrzymywanie frakcji polimerów o mało zróżnicowanej lub jednakowej wielkości masy molekularnej (*nisko-dyspersyjnych*) i frakcjonowania (*najczęściej wstępnego*) materiałów w badaniach biochemicznych, mikrobiologicznych oraz w biotechnologii
- Oznaczanie składników próbki, różniących się znacznie masą molekularną, np. oznaczanie zawartości pektyn, antyutleniacza w olejach i smarach, wiskozatora, środków myjących itp.,
- Przygotowanie próbki (zwłaszcza wyodrębnianie frakcji nisko-molekularnej z materiału o wyższej masie cząsteczkowej, np.. WWA, pestycydów, niektórych witamin, ... – z tłuszczów itp.

-Odsalanie białek



Chromatografia wykluczania (żelowa) – GPC/SEC – mechanizm rozdzielania

Technika rozdzielania pod względem wielkości cząsteczek / cząstek w warunkach eliminacji, albo co najmniej - minimalizacji sorpcji. O rozdzielaniu powinna decydować tylko różnica czasu dyfuzji molekuł / cząstek koloidalnych w przestrzeni porów wypełnienia kolumny. Idea niemożliwa do realizacji z zastosowaniem TLC – wymaga długiej kolumny.



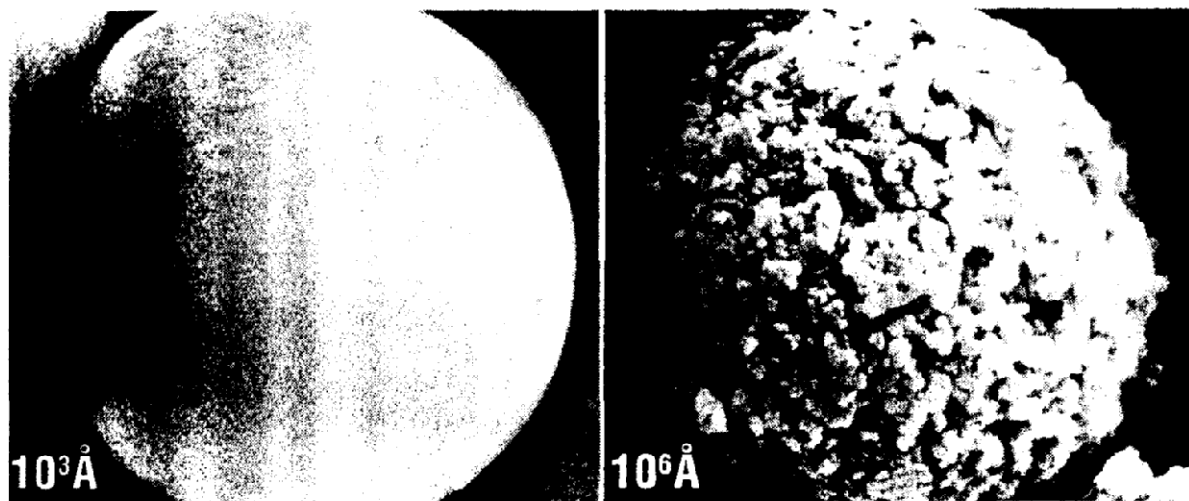
Technika wykorzystywana dla substancji lipofilowych, (THF, CH_2Cl_2 , ...) albo hydrofilowych (bufory z dodatkiem EDTA, ...). Nie wolno skokowo zmieniać polarności !!!

Technical Specifications

Material:	SDVB	
Particle Size:	5, 10, 20 μ	
Porosities:	50Å to 10 ⁶ Å, and mixed beds	
Typical Pressure:	5 μ : 350 psi	10 μ : 200 psi
Maximum Pressure:	1000 psi	
Maximum Temperature:	140°C	
Minimum Efficiency*:	5 μ :	45,000 p/m**
	10 μ :	35,000 p/m**
Typical Flow Rates:	4.6mm ID:	0.35 mL/min
	7.8mm ID:	1.0 mL/min
	21.2mm ID:	8.0 mL/min
End Fittings:	Valco Compatible	

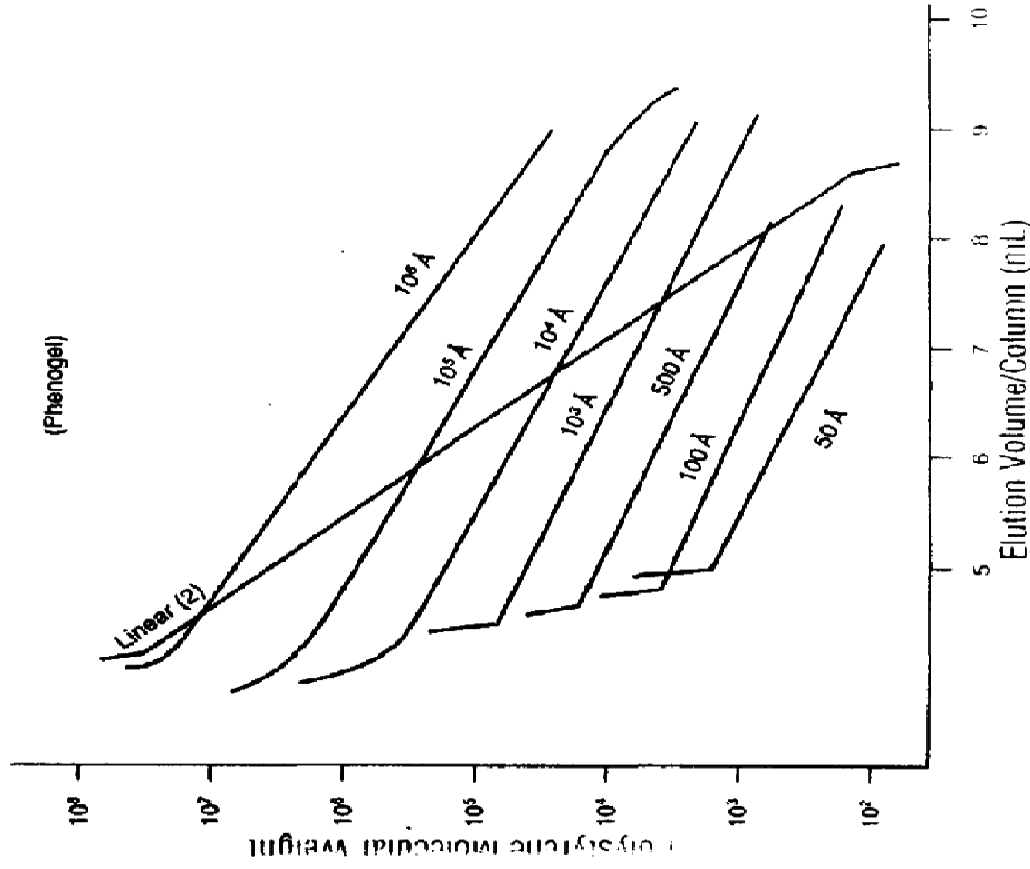
* Tested in THF ** For 300 x 7.8mm ID columns

SEM Photos of Phenogel Polymer Beads



Najczęściej stosowane są obecnie do chromatografii wykluczania substancji liofilowych usieciowane przestrzennie porowate kopolimery styren – di-vinylobenzen, natomiast do chromatografii wykluczania substancji hydrofilowych – porowate „sorbenty” typu DIOL, najkorzystniej na bazie ZrO₂.

Column Molecular Weight Calibration Curves



Column Selection by Molecular Weight

Sample Type	Molecular Weight	Pore Size Column
Small Organics	100 - 3K	50 Å
	500 - 6K	100 Å
	1K - 15K	500 Å
Resins	1K - 75K	10 ³ Å
	5K - 500K	10 ⁴ Å
	10K - 10,000K	10 ⁵ Å
High MW Polymers	60K - 10,000K	10 ⁶ Å
	100K - 10,000K	Linear(2)

Wielkość porów, a zakres rozdzielania

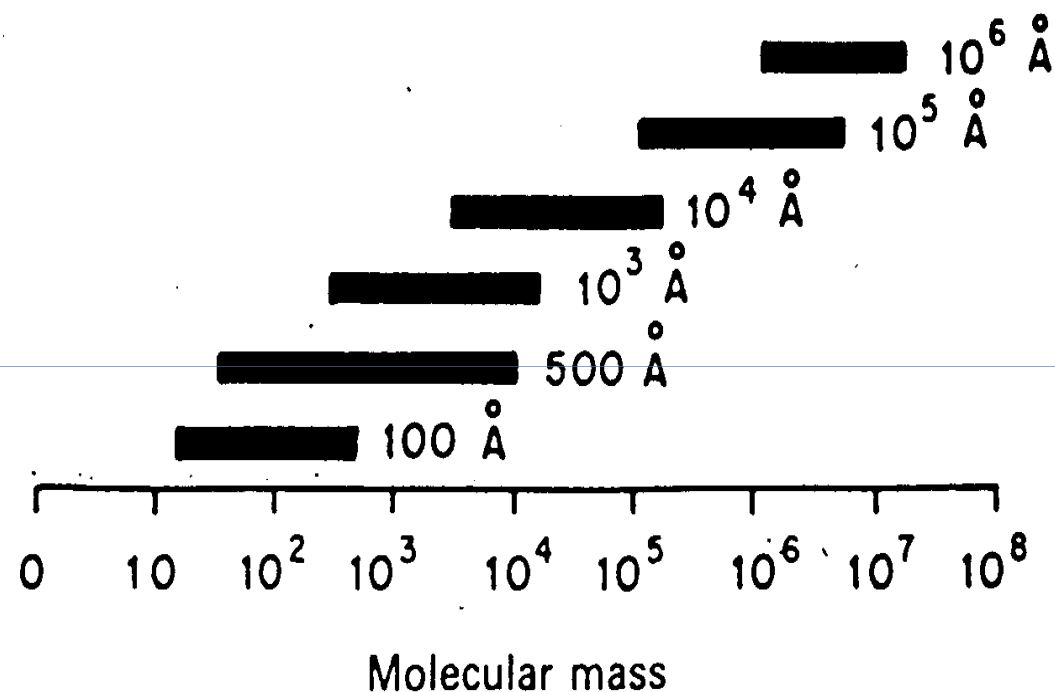
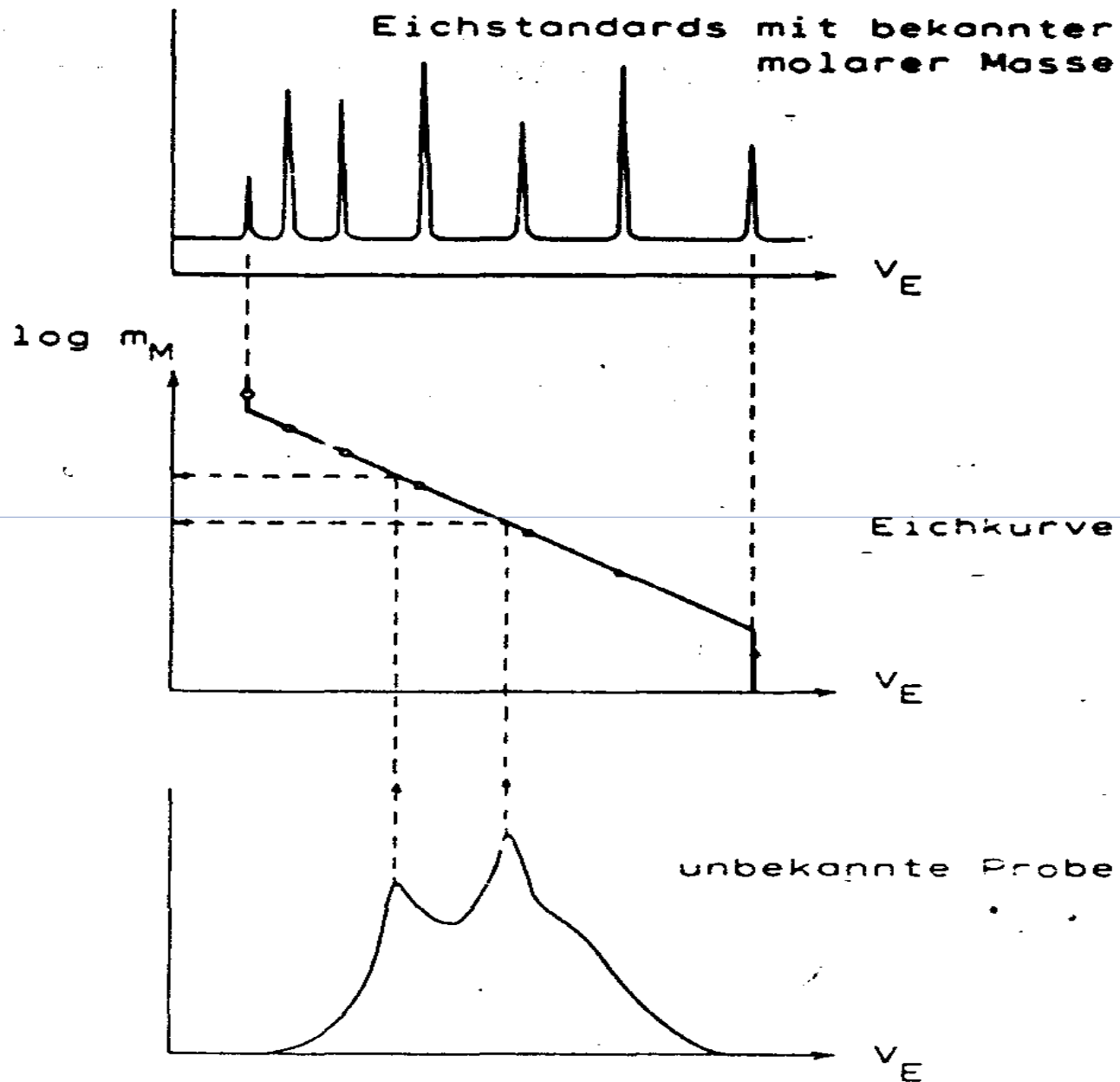
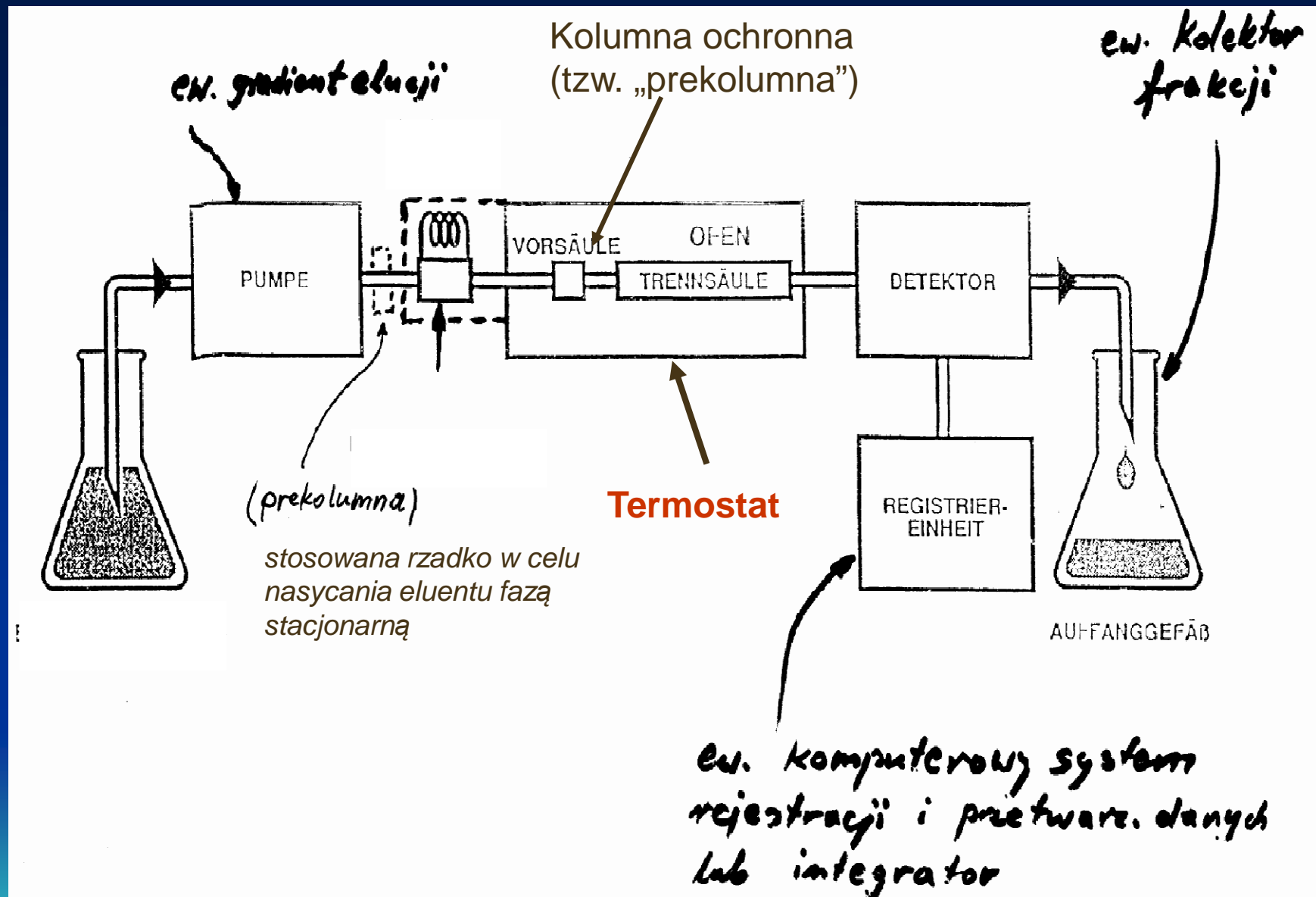


Fig. 16.4 Pore width and separating range of a typical commercial column set (Waters).

Uwaga -- Wysokie wartości średnic porów - „umowne”

**Kalibracja
w zakresie
rozkładu
masy
molekular-
nej i postępo-
wanie w celu
określenia
polidispersyj-
ności
kopolime- ru o
bimo- dalnej
charakte-
rystyce
polidispersyj-
ności**





Schemat ideowy najprostszego układu aparatu chromatograficznego - HPLC do chromatografii GPC/SEC – warunki z reguły izokratyczne, detekcja – RID / LLSD

PCV i plastyfikatory PCV - oznaczanie rozkładu masy molekularnej oraz zawartości plastyfikatorów

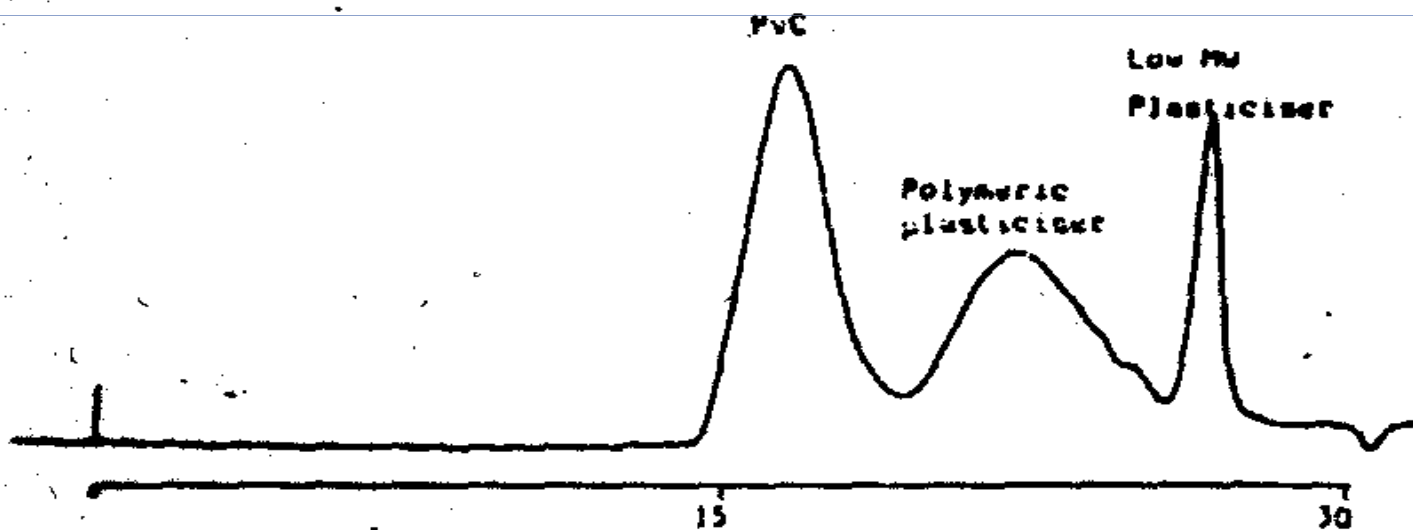
PVC - plasticizers

columns: LiChrogel PS 400/20/4 (10 μ m); 30 cm

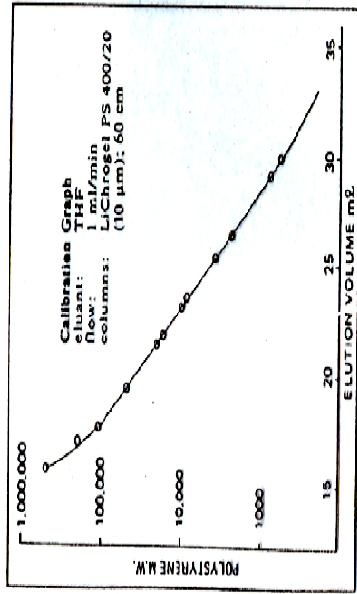
eluent: THF

flow: 1.0 ml/min

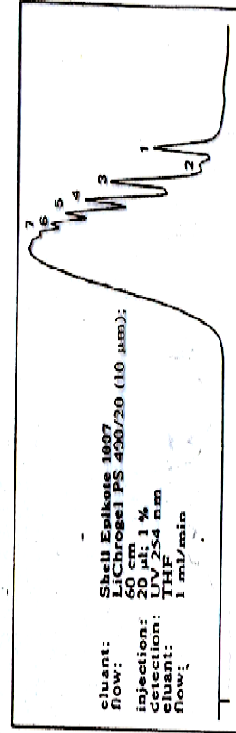
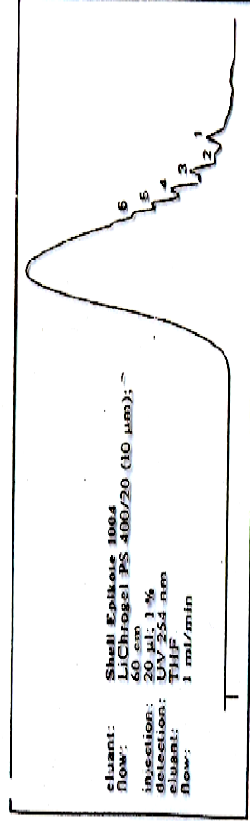
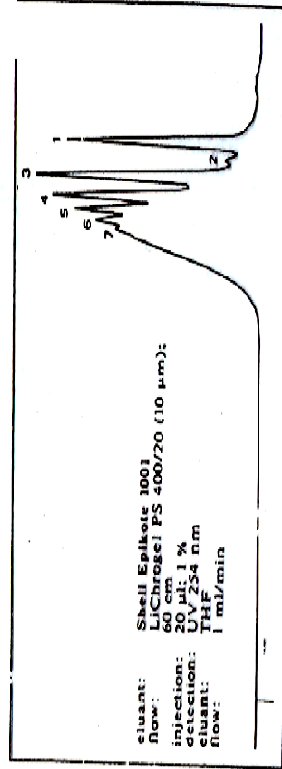
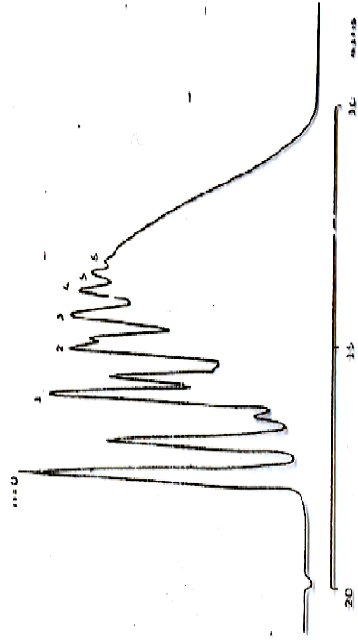
detection: RI



EPOXY RESINS (High molecular weights up to 500,000)



resin: Araldite B
 columns: LiChroGel PS 20 (5 μm); 60 cm
 solvent: THF
 flow: 1 ml/min



Shell Epikote* 1001, 1004 and 1007 are typical examples of the high molecular weight epoxy resins used for surface coatings.

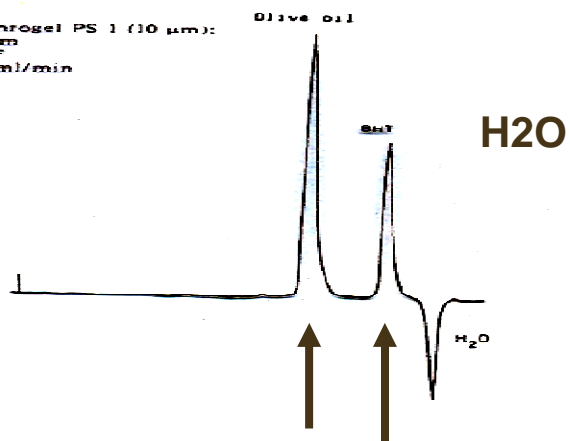
* Epikote - registered trade mark of Shell

NATURAL COMPOUNDS/SAMPLE PREPARATION

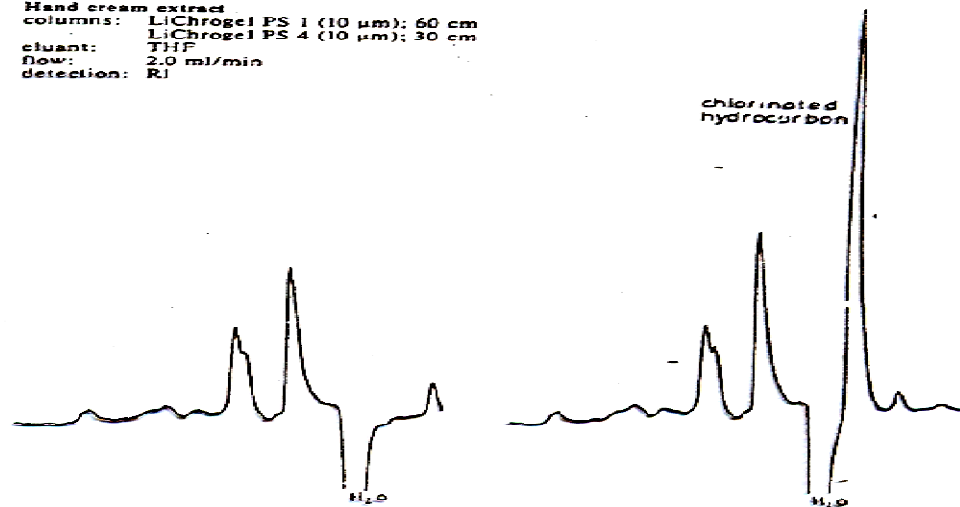
olej

BHT

Olive oil
 column: LiChrogel PS 1 (10 µm): 30 cm
 eluant: THF
 flow: 1.0 ml/min
 detection: RI

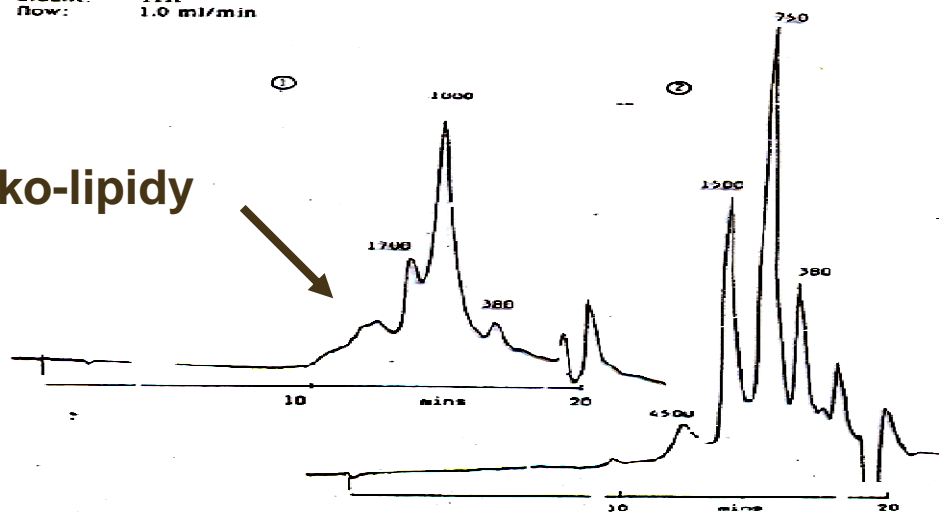


Hand cream extract
 columns: LiChrogel PS 1 (10 µm): 60 cm
 LiChrogel PS 4 (10 µm): 30 cm
 eluant: THF
 flow: 2.0 ml/min
 detection: RI

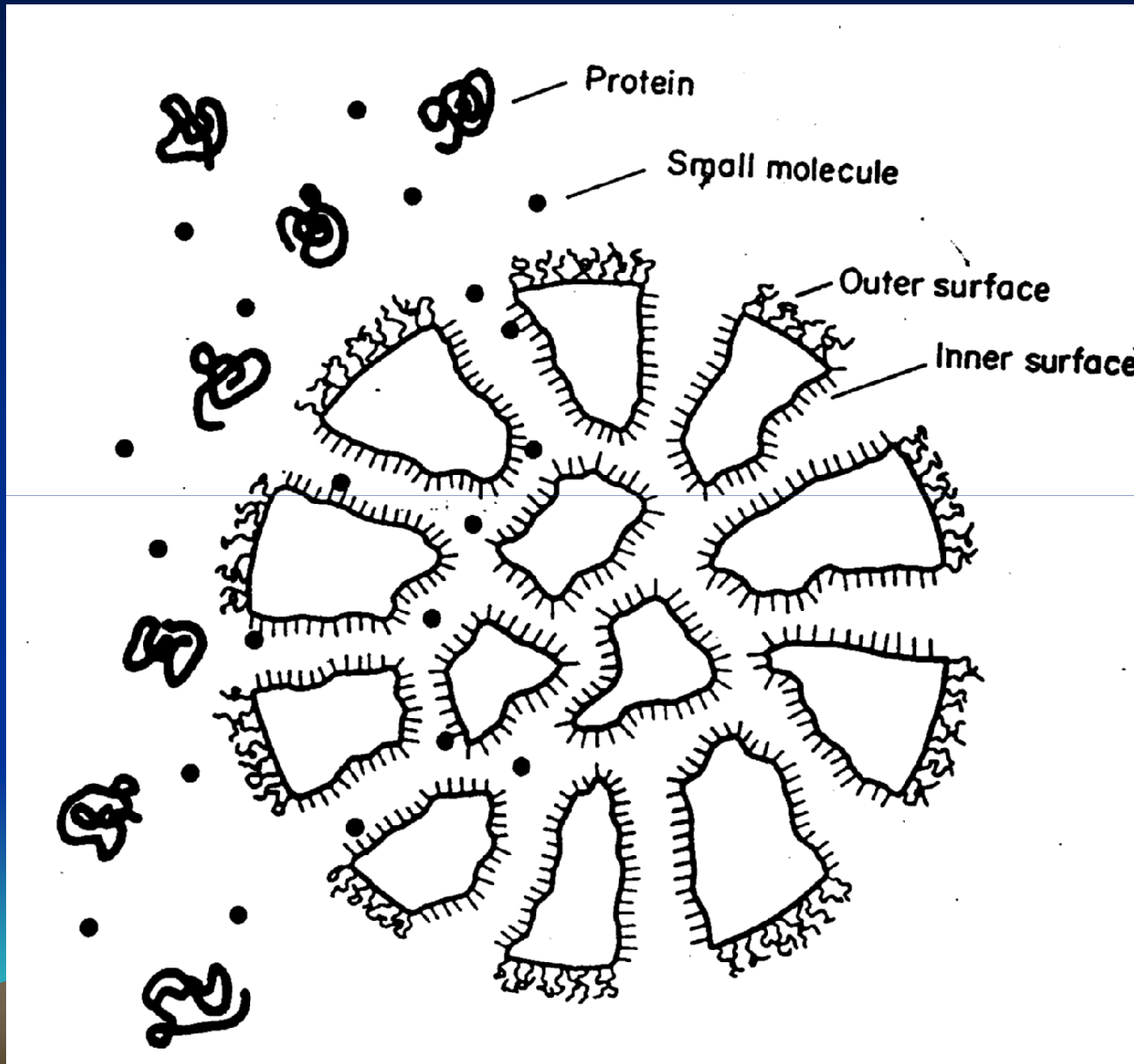


Phospho/glyco lipids
 ① Free lipids from *Corynebacterium Diphtheriae*
 ② Free lipids from *Mycobacterium Avium*
 columns: LiChrogel PS 20 (10 µm): 60 cm
 eluant: THF
 flow: 1.0 ml/min

Fosfo-gliko-lipidy



Odsalanie

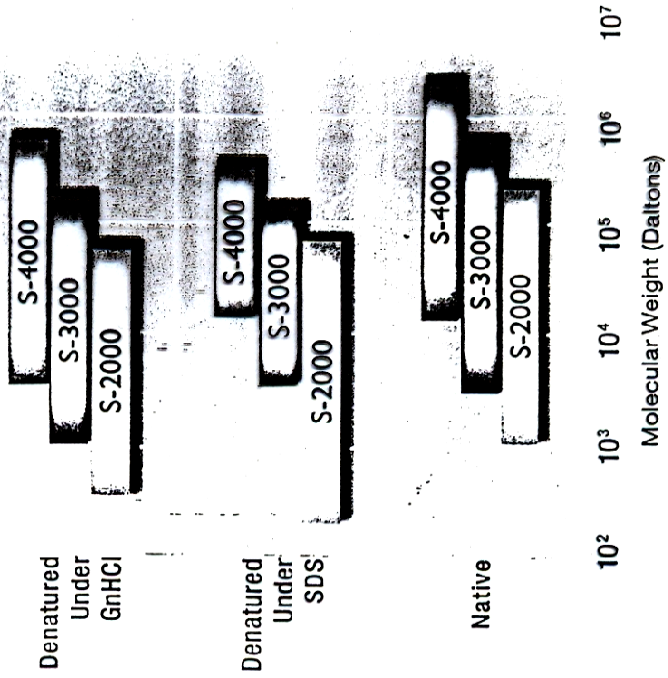


Selecting the appropriate column for gel filtration/size exclusion applications is not always straightforward. Sample details, such as molecular weight and native vs. denatured state, dictate the suitable phase to use. The chart below clearly illustrates which of the 3 BioSep phase options to use based on the characteristics of your sample mixture.

1) Based on Size

(Molecular Weight) of your Sample Mixture

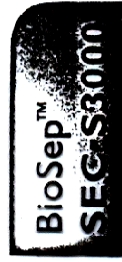
Molecular Weight Separation
Range for Proteins BioSep™-SEC-S



2) Based on a Guaranteed

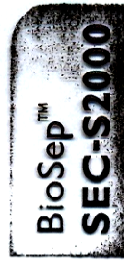
Alternative to the Column You Currently Use

Column Cross Reference Chart



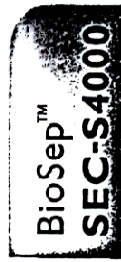
Tosoh Bioscience
TSK-GEL® 3000SW
Bio-Rad
Bio-Sil® SEC 250
Agilent Technologies
Zorbax® GF-450

... Refer to page 6



Tosoh Bioscience
TSK-GEL® 2000SW
Bio-Rad
Bio-Sil® SEC 125
Agilent Technologies
Zorbax® GF-250

... Refer to page 5

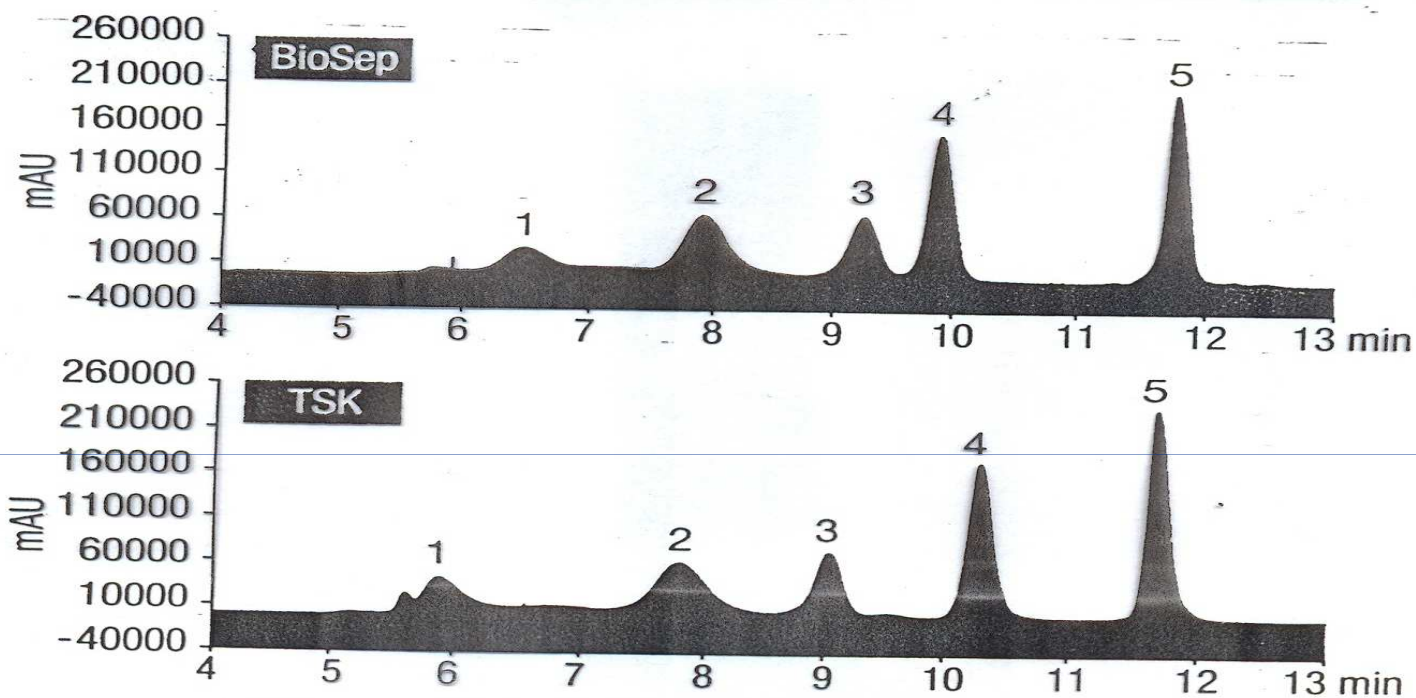


Tosoh Bioscience
TSK-GEL® 4000SW
Bio-Rad
Bio-Sil® SEC.400
Agilent Technologies

... Refer to page 6

GPC/SEC - białka

Proteins on BioSep™-SEC-S3000 & TSKgel SW3000_{XL}



Column: BioSep™-SEC-S3000

TSKgel SW3000_{XL}

Dimensions: 300 x 7.8mm

Order No.: 00H-2146-K0

Mobile Phase: 100mM Potassium phosphate, pH 6.8

Flow Rate: 1 mL/min

Detection: UV @ 280nm

Temperature: 22°C

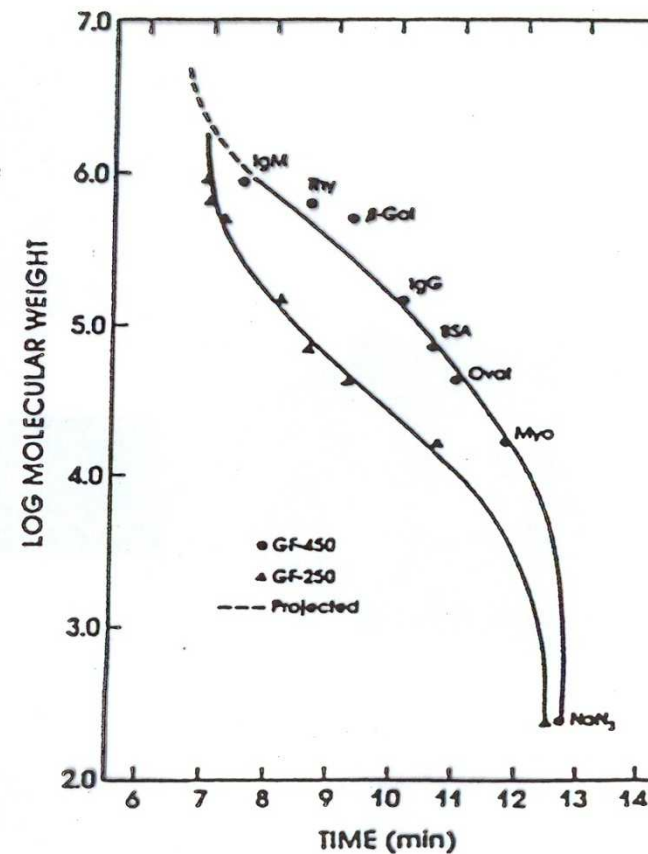
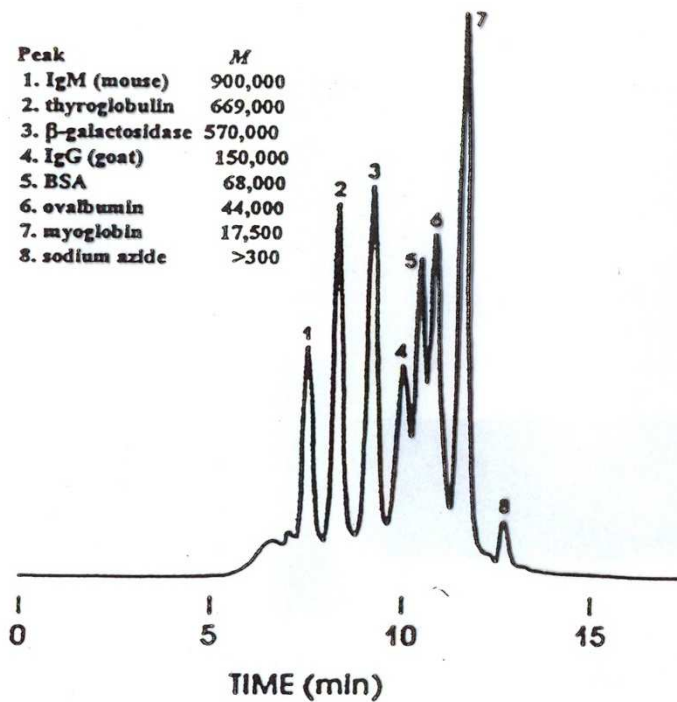
Sample: 1. Thyroglobulin

4. Myoglobin

2. Gammaglobulin

5. Uridine

3. Ovalbumin



1 Analysis of a mixture of proteins on ZORBAX® GF450. Calibration curves of proteins on ZORBAX GF250 and GF450 columns. Mobile phase: 0.2M sodium phosphate, pH 7.5; UV detection at 280 nm. (Printed with permission of Hewlett-Packard.)

Rozdzielanie i kalibracja - GPC/SEC białek, kolumny - ZrO₂-DIOL

Rozdzielanie białek i peptydów serwatki mleka
w kolumnie wypełnionej żelem
krzemionkowym TSK 3000 SW 10 μm

Warunki GPC/SEC z dodatkową adsorpcją;

Eluent - bufor fosforanowy, $\text{dp}=10\mu\text{m}$,
 $\text{Lc}=60\text{cm}$, $w=0.5\text{ml/min}$

Probe: 100 μl Molke aus roher Magermilch
(Casein bei pH 4,6 gefällt)
Säule: 7,5 mm x 60 cm
stationäre Phase: TSK 3000 SW (Silicagel 10 μm)
mobile Phase: 0,5 ml/min Puffer mit
0,1 M NaH_2PO_4 , 0,05 M NaCl und 0,02%
 NaN_3 (pH 6,8)
Detektor: UV 280 nm

- 1) hochmolekulare Proteine
 - 2) γ -Globulin $M = 150'000$
 - 3) Rinderserumalbumin 69'000
 - 4) β -Lactoglobulin 35'000
 - 5) α -Lactalbumin 16'500
- übrige Komponenten nicht identifiziert

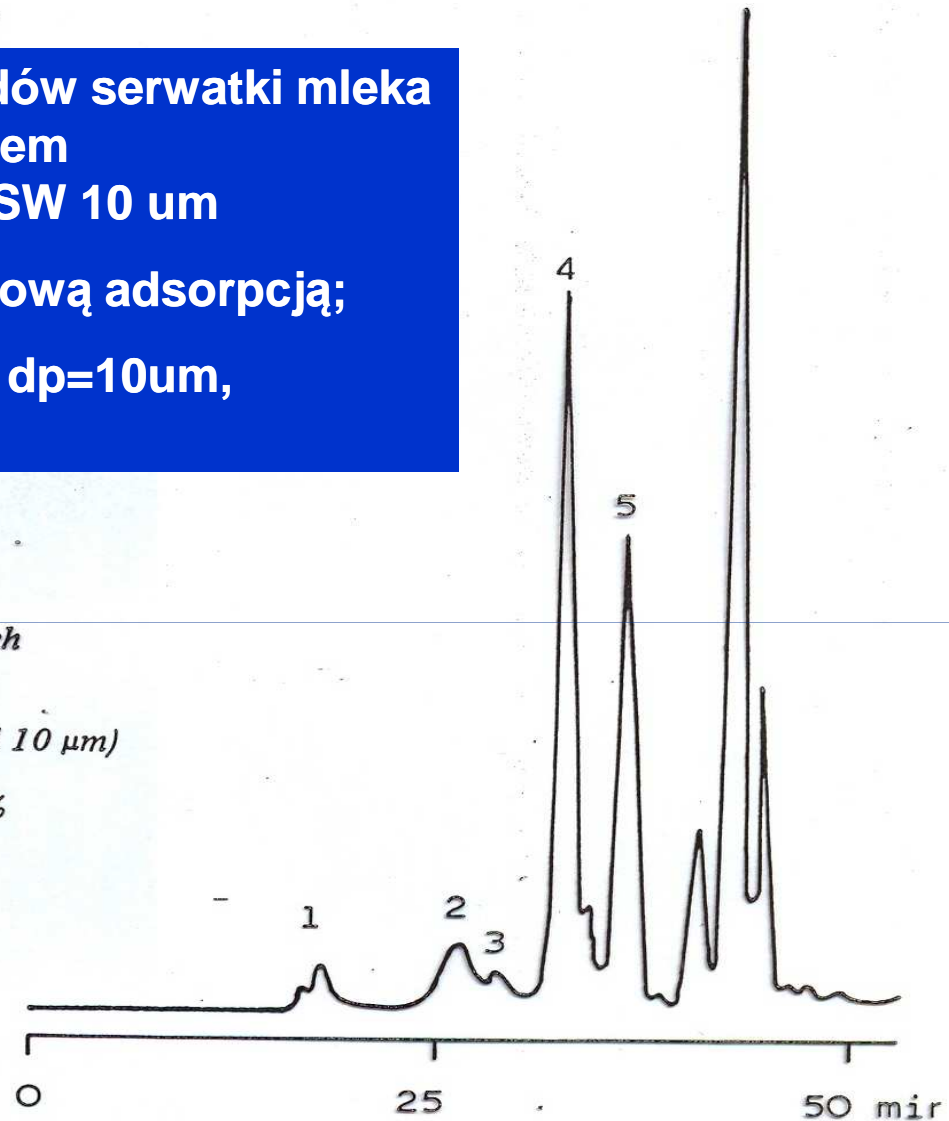
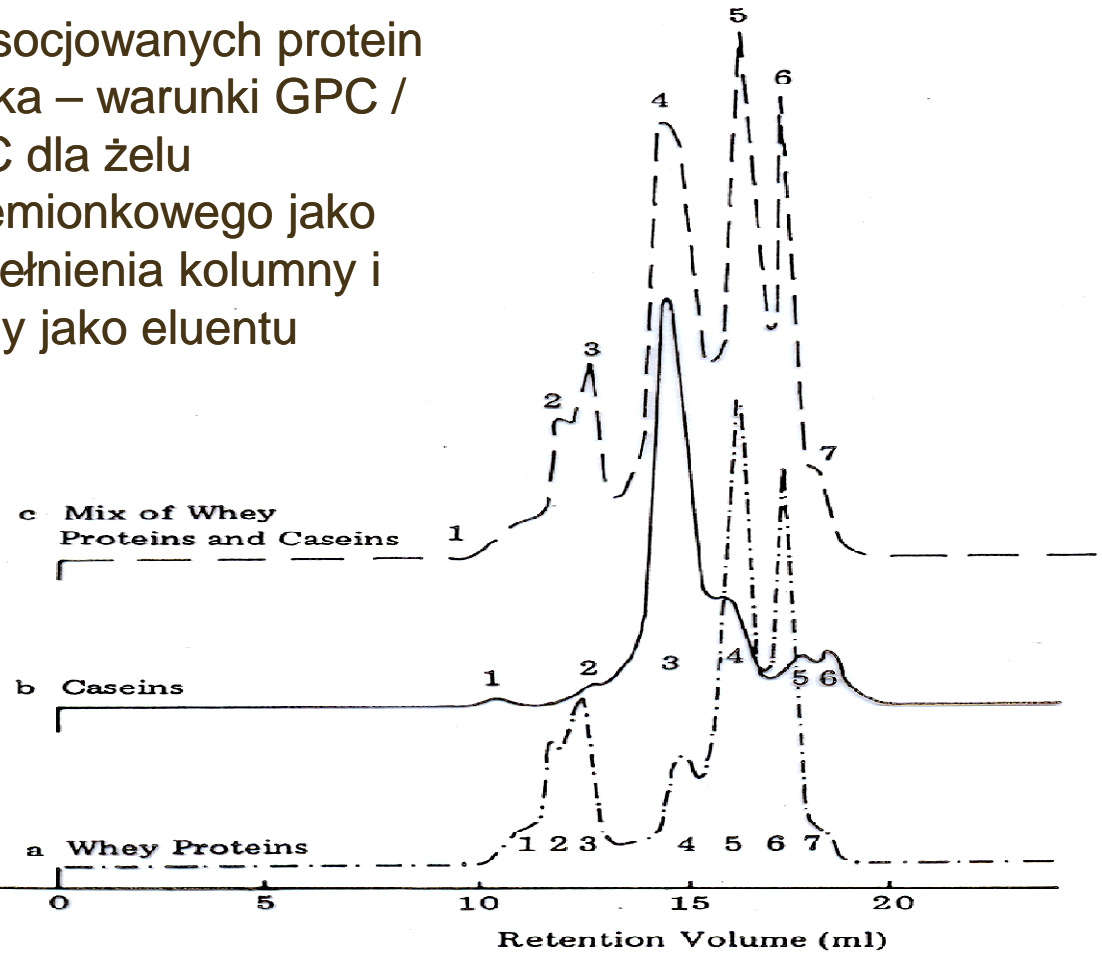


Abb. 16.13 Trennung von Milchproteinen (nach B.B. Gupta, J. Chromatogr. 282, 463 (1983))

B. B. Gupta, J. Chromatogr. 282 (1983) 463.

Rozdzielanie
zdysocjowanych protein
mleka – warunki GPC /
SEC dla żelu
krzemionkowego jako
wypełnienia kolumny i
wody jako eluentu



4. Elution curves of dissociated protein samples separated on a TSK 3000 SW column. (a) Same mixture of proteins as in Fig. 2a: 1 = undissociated γ -globulin and bovine serum albumin, 2 = bovine serum albumin, 3 and 4 = heavy- and light-chain fractions of γ -globulin, 5 = β -lactoglobulin monomer, 6 = α -lactalbumin, 7 = aggregated SDS molecules; (b) whole casein: 1 and 2 = undissociated casein, 3 = α -lactalbumin and β -casein, 4 = κ -casein, 5 = γ -casein, 6 = aggregated SDS molecules; (c) mixture of (a) and (b): 1 = high-molecular-weight proteins, 2 = bovine serum albumin, 3 = γ -globulin heavy-chain fraction, 4 = α -lactalbumin and β -casein and light-chain fraction, 5 = β -lactoglobulin monomer and κ -casein, 6 = α -lactalbumin and γ -casein, 7 = aggregated SDS molecules.

CHROMATOGRRAFIA WYKLUCZANIA (dawniej – ŻELOWA – PC/SEC)

-- powtórzenie --



Układy chromatograficzne typu GPC / SEC

1. W warunkach nie wodnych- eluenty: THF, dioksan, czerochloroetylen, chlorobenzen, ksylen; fazy stacjonarne: kopolimer styren-diwinylbenzen; do badań rozkładu masy cząsteczkowej polimerów nisko i średnio polarnych, a także lipidów, fosfolipidów itp..
2. W warunkach wodnych- eluenty: dimetyloformamid, metanol, acetonitryl i ich mieszaniny z wodą i z wodnymi roztworami soli, kwasów i zasad, fazy stacjonarne: polidekstrany, policukry, poliwęglany, szkła porowate, silanizowany żel krzemionkowy



HPLC Imię mechanizmy selektywności

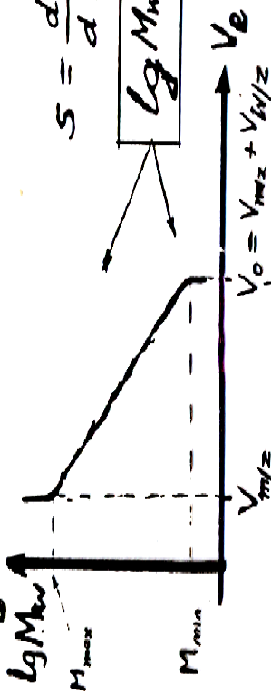
M. Kamiński

GPC - wykluczanie molekularne - „sito molekularne”

$$V_e = V_{m/z} + K_d \cdot (V_0 - V_{m/z})$$

$S = \frac{d V_e}{d \ln M_w}$ - pojemność rozdzielcza kolumny GPC
 $mp: K_d \approx k \left[1 - \frac{k_2 M_w^{1/2}}{T_1} \right]^3$

$$\lg M_w = A - B V_e$$



$$E_0 = \frac{V_0}{V_2} ; E_{m/z} = \frac{V_{m/z}}{V_2} ; V_0 = V_{m/z} + (V_0 - V_{m/z}) E_i = \frac{V_{m/z}}{E_i}$$

Rodzaje faz stajeni: (ogólnie)

- Pęczniące (przygotowanie) (SP max)
- twarde
- lipofilowe
- hydrofilowe (dezaktywacja) np glikol polietyl.

Specyfika wykorzystania GPC dla biopolimerów (białka, cukry, wirusy) (dezaktywacja) np glikol polietyl.



Stosowane eluenty:

„Sita elucyjna” of J. Bartona:

toluen: 8.9; THF: 9.1; aceton: 9.9; dwuchlorobenz: 10.1; DMFA: 12.8; inne.

Problemy i zaktócenia, które trzeba brać pod uwagę:

- możliwości oddziaływań sorpcyjnych, - przesunięcie i kurwienie szereu pod upł. różny
- ściśliwość żeli, - wolna dyfuzja makromolekuł, - wzajemne przekładanie molekuł i zatykanie niektórych porów, polikondensacja makromolekuł i inne.
- Możliwość oznaczenia rozkładu mas cząstekowych - metodyka:

- kalibracja bezpośrednia (problem posiadania wzorów)

- kalibracja uniwersalna $\log[M] \cdot M_w = f(V_e)$

- Problem eliminacji wpływu dyspersji hydrodynamicznej podczas określ.

- dostępność specjalistycznego oprogramu f(Mw)

- wyspecjalizowane integratory

Detekcja: RI, UV, lepkości, S, ZLSD, laserowe rozpr.

Typy żeli handlowych:

- Organiczne:
 - dektrowane (Sephadex 4-10-500) LH-20, LH60, Sephacryl)
 - agarozowe (Sephacrose, Biogel A, Ultragel A,)
 - akrylowe, metakrylowe (Biogel P, Ultragel ACA, imc)
 - polistyrenowe (PS-DVB) (TSK G7000-37000, Biogel 60-500)
- Nieorganiczne (często modyfika wane)
 - Silikagiele (Lichrospher SI 100-100)
 - Siatka Porowate CPG 40-30000
 - Alumina

Literat: M. Benek, M. Dressler, M. Kubin, K. Marcińska, „Chromatografia Żelowa”, PWN, Warszawa, 1989



ZASTOSOWANIE GPC / SEC

- Oznaczenie rozkładu masy cząsteczkowej polimerów
- Oznaczenie dodatków uszlachetniających lub zanieczyszczeń polimerów, smarów, olejów, tłuszczów, kosmetyków
- Do otrzymywania frakcji polimerów o mało zróżnicowanej lub jednakowej wielkości (*nisko-dyspersyjnych*)
- Przygotowanie próbek; do oznaczania niskocząsteczkowych zanieczyszczeń w żywności, produktach naftowych i w środowisku
- Do frakcjonowania (*najczęściej wstępnego*) materiałów w badaniach biochemicznych, mikrobiologicznych, biotechnologii
- Do odsalania – po wysoleniu i rozpuszczeniu precypitatu

