

Gel permeation chromatography, GPC

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

gelová chromatografie, gelová filtrace, filtrace molekulovým sítím, vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography SEC)

Princip: látky se dělí podle velikosti a tvaru jejich molekul, tzv. **molekulově síťový efekt**

Někdy se uplatňuje i adsorpce dělených látek na povrchu gelu.

Stacionární fáze je tvořena nerozpustným inertním gelem, který obsahuje póry.

Velké molekuly nemohou proniknout do pórů gelu a jsou unášeny mobilní fází.

Malé molekuly difundují do pórů gelu a jsou tak zpomalovány oproti molekulám velkým.

Látky eluují z kolony podle klesající Mr.

GELY POUŽÍVANÉ V GPC

1. **hydrofilní:** určeny pro dělení **ve vodě rozpustných látek**

- dextranové gely (Sephadex)
- polyakrylamidové gely (Ultrogel, Bio-Gel)
- hydroxyalkylmethakrylátové gely (Spheron)
- agarózové gely (Sepharosa, Bio-Gel A)

2. **hydrofobní:** určeny pro dělení **ve vodě nerozpustných látek**

- polystyrenové gely (Poragel, Aquapak)
- polyvinylacetátové (Fractogel PVA)

3. **nebobtnající** (aerogely): univerzální, vhodné pro obě skupiny látek ve vysokotlaké GPC

- pórovité silikagely (Porasil, Fractosil)
- pórovitá skla

Organické gely ve styku s mobilní fází bobtnají. **Stupeň bobtnání** je závislý na struktuře polymeru (stupni zesítnění) a na druhu mobilní fáze.

Podle mechanických vlastností:

- tvrdé:** anorganické materiály, silikagely, skla; snesou tlaky nad 15 MPa
- poloměkké:** více zesítněné polymery; použitelné v rozmezí 5 – 15 MPa
- měkké:** málo zesítněné polymery; použitelné pro tlaky 1 - 2 MPa

MOBILNÍ FÁZE V GPC

Mobilní fáze není významná, neovlivňuje interakce mezi dělenými látkami a stacionární fází.

MF mění stupeň bobtnání gelu a tím velikost pórů, eluční pořadí nemění.

Hydrofobní látky a gely: THF, toluen, dichlor- metan, 1- dichlorbenzen, 1,2,4 - trichlorbenzen

Hydrofilní látky a gely: voda, roztoky pufrů

KOLONY V GPC

- uspořádání stejné jako při jiných technikách kapalinové chromatografie

- **nízkotlaké** (skleněné) a **vysokotlaké** (silnostěnné skleněné, nerezové) **kolony**

Kolony musí být naplněny gelem rovnoměrně a bez vzduchových bublin.

Cirkulační forma GPC: eluát z kolony se pomocí vícecestného ventilu zavádí opět na kolonu, opakování separačního děje.

ČERPADLA V GPC

Mobilní fáze se kolonou pohybuje samospádem, na kolonu je i tak přiváděna.

Nízkotlaká GPC: peristaltická čerpadla

Vysokotlaká GPC: pumpy běžné pro HPLC

DETEKTORY V GPC

Diskontinuální detekce: sbírají se frakce eluátu a pak se obsah dělených látek vyhodnotí vhodnou analytickou metodou.

Kontinuální detekce: za kolonou připojen nedestruktivní detektor, usnadňuje sběr frakcí

- spektrofotometrický (UV), refraktometrický, vodivostní

APLIKACE

1. Skupinové dělení a odsolování

- oddělení vysokomolekulárních látek jako skupiny od látek nízkomolekulárních, k dělení uvnitř skupin nedochází

Pokud jsou nízkomolekulární látky anorganické soli nebo jiné disociované ionty, jde o proces **odsolování**.

Odsolování se používá k oddělení bílkovin, virů a polysacharidů od doprovodných solí.

2. Frakcionace

- dělení látek s nepříliš odlišnou relativní molekulovou hmotností

Biochemické laboratoře: dělení sacharidů, hormonů, enzymů, peptidů, NK, lipidů, AMK, virů a dokonce i buněk

Organické laboratoře: dělení směsí oligomerů a polymerů

- široké použití ve farmaceutickém průmyslu v preparativním měřítku

3. Stanovení relativní molekulové hmotnosti

- látky jsou eluovány podle klesající Mr

$$\log Mr = A - B \left(\frac{V_E}{V_0} \right)$$

Použitá kolona se okalibruje standardy o známé Mr. Z kalibrační závislosti $\log Mr - V_E$ se určí Mr pro neznámou látku s retenčním objemem V_E .