

Vylučovací chromatografie (Size Exclusion Chromatography, SEC)

- gelová filtrační chromatografie (GFC), gelová permeační chromatografie (GPC), gelová chromatografie, gelová filtrace, filtrace molekulovým sítem

Princip: látky dělíme podle velikosti a tvaru molekul, využíváme molekulově síťový efekt (nerovnovážený děj)

- stacionární fáze je tvořena nerozpustným inertním gelem, který obsahuje ve své struktuře póry (vyplněny kapalinou)
- velké molekuly nemohou proniknout do pórů gelu a jsou unášeny mobilní fází - nastává **exkluze (eluční objem V_0)**
- malé molekuly difundují do pórů gelu (do kapaliny v pórech) a jsou tak zpomalovány oproti molekulám velkým - nastává **permeace, totální průnik (eluční objem V_{max} , V_T)**
- někdy se uplatňuje i nežádoucí adsorpce dělených látek na povrchu gelu

látky eluují z kolony podle klesající molekulové hmotnosti

1. velké 2. střední 3. malé molekuly

GELY (stacionární fáze) POUŽÍVANÉ V SEC

1. hydrofilní: dělení ve vodě rozpustných látek/v polárních org. rozpouštědlech

- dextranové gely (Sephadex)
- agarosové gely (Sepharosa, Bio-Gel A)
- polyakrylamidové kopolymery (Ultrogel, Bio-Gel, Novema)
- hydroxyalkylmethakrylátové gely (Spheron, Suprema, TSKgel PW)
- sulfonovaný ST-DVB kopolymer (Mcx)
- bobtnající

2. hydrofobní: dělení látek rozpustných v organických rozpouštědlech

- polystyrenové kopolymery (Poragel, Aquapak, Polefin, SDV, TSKgel H)
- polyesterové kopolymery (Gram)
- polyvinylacetátové gely (Fractogel PVA)
- méně bobtnají než hydrofilní gely - menší kapacita, méně pórů

3. nebobtnající (aerogely): univerzální, vhodné pro obě skupiny látek ve vysokotlaké GFC i GPC, kompatibilní s vodnou i organickou fází

- porézní modifikovaný silikagel (Proteema, TSKgel SW, PFG, PolarSil)
- porézní skla


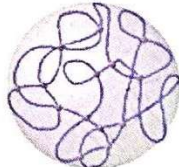
Podle mechanických vlastností dělíme gely v SEC na:

- a) **měkké**: málo zesítené polymery (zesítení do 10 %); **mikroporézní struktura**, vykazují velké bobtnání
 - dextran, agarosa, polyakrylamid
 - použitelné pro tlaky 1 - 2 MPa, dlouhé analýzy, malý průtok MF
 - omezená odolnost vůči pH a organickým rozpouštědlům

- b) **poloměkké** (semirigidní): více zesítené polymery (> 20%); **makroporézní struktura**, omezené bobtnání
 - použitelné v rozmezí 5 - 15 MPa
 - různá polarita a velikost pórů gelu (kontrola při výrobě)

- c) **tvrdé**: anorganické materiály, silikagely, skla
 - použitelné pro tlaky nad 15 MPa
 - různá polarita a velikost pórů gelu (kontrola při výrobě)

Organické SEC gely ve styku s mobilní fází bobtnají. **Stupeň bobtnání** je závislý na struktuře polymeru (chemické složení, porozita, stupeň zesítnění) a na druhu mobilní fáze.

	Macroporous	Microporous
		
Crosslink density	High > 20%	Low 2–12%
Swell	Low	High
Pore size	Independent of eluent	Determined by eluent
Mechanical strength	Good	Poor
Operating conditions	High pressure, low flow	Low pressure, low flow
Examples	PS/DVB	Polydextrans, polyacrylamides

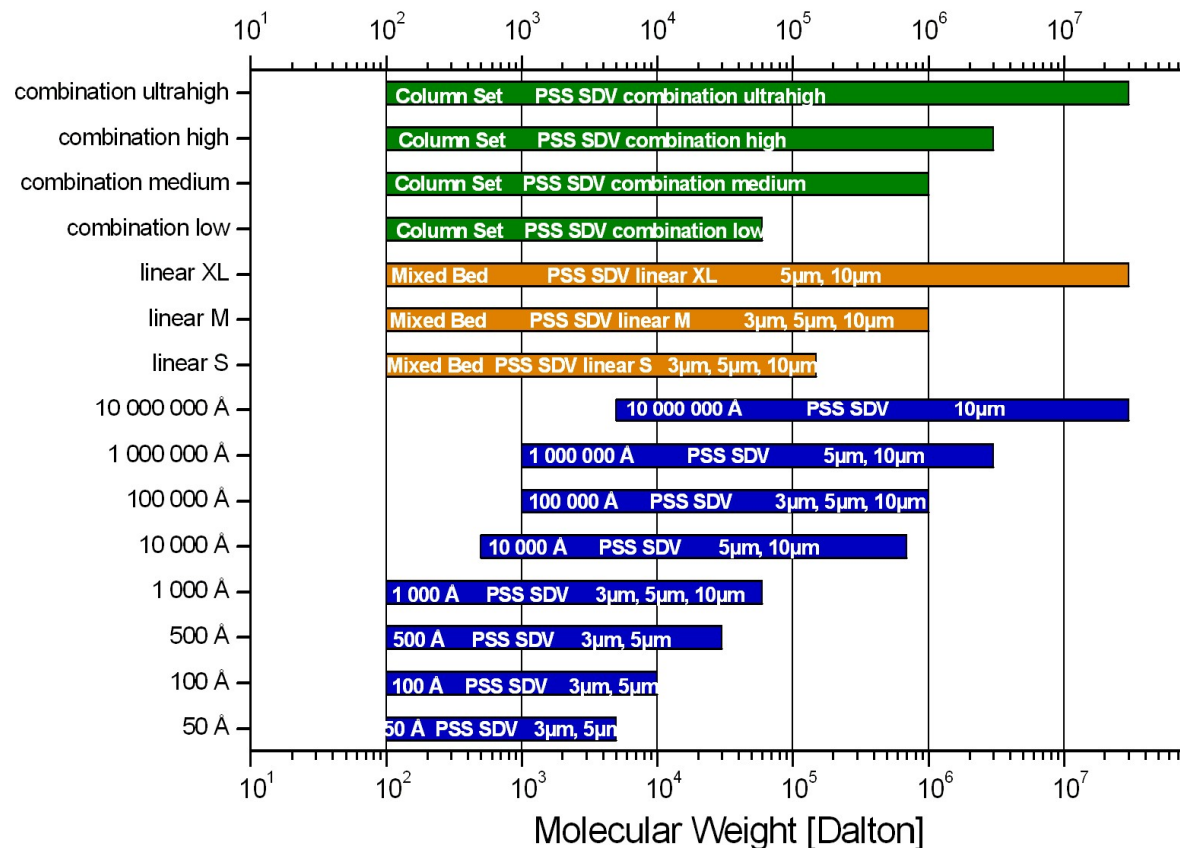
KOLONY V SEC

- experimentální uspořádání SEC je stejné jako při jiných technikách kapalinové chromatografie (čerpadlo-dávkoř-ř-kolona-detektor/jímač frakcí-počítač)
- nízkotlaké (skleněné) kolony nebo vysokotlaké (silnostěnné skleněné, nerezové) HPLC kolony
- kolony musí být naplněny gelem rovnoměrně a bez vzduchových bublin
- neuplatňuje se trend „zmenřování“ částic sorbentu - prostor mezi částicemi v koloně je potřebný pro pohyb a dobrou přístupnost pórů pro makromolekuly

Vylučovací limit kolony (stacionární fáze)

- charakterizuje stacionární fázi a určuje její pracovní rozsah
- velikost pórů materiálu (v Å) určuje rozsah dělených molekulových hmotností (v $g \cdot mol^{-1}$)
- kolona typu individual pore size
- kolona typu mixed bed
- kolona typu multipore particles

Separation Range of PSS SDV Columns



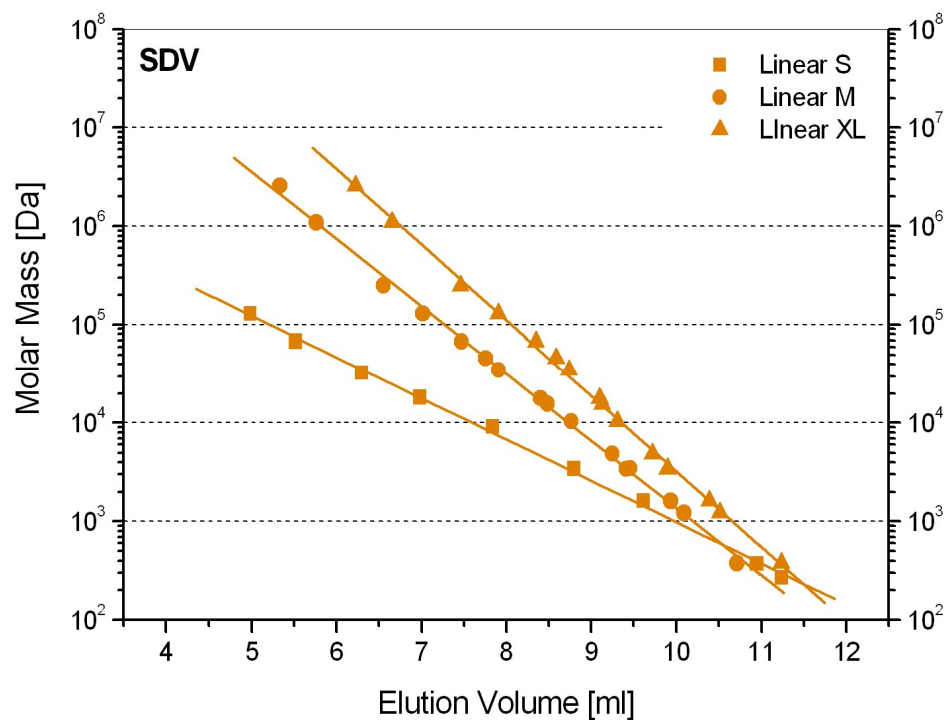
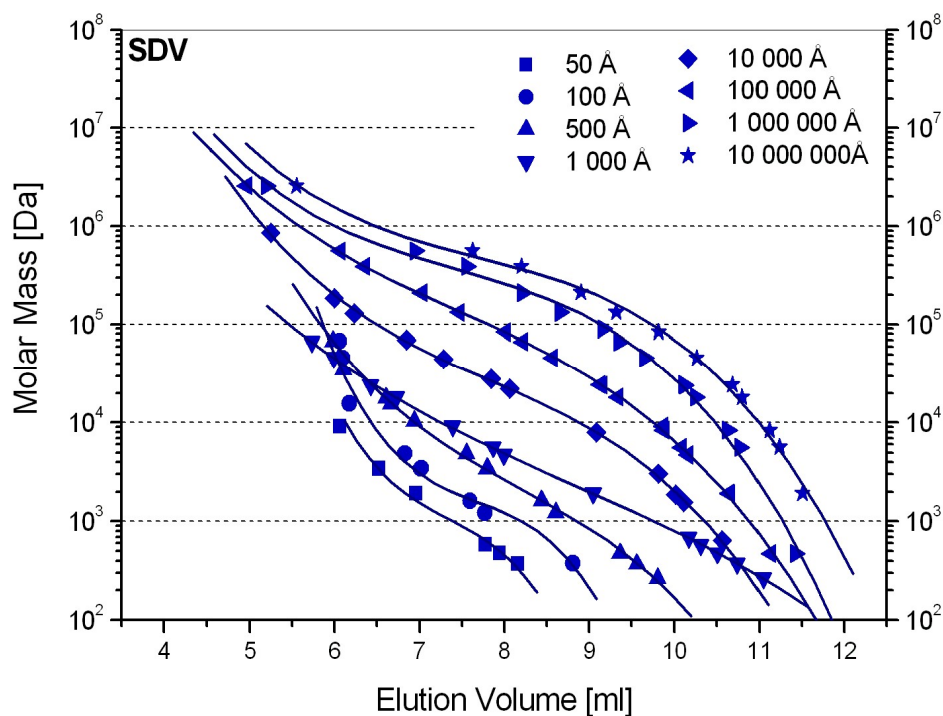
Separation Range [Da]	Multipore particles
100 - 60 000	Combination low
100 - 1 000 000	Combination medium
100 - 3 000 000	Combination high
100 - 30 000 000	Combination ultrahigh
Separation Range [Da]	Mixed bed
100 - 150 000	linear S
100 - 1 000 000	Linear M
100 - 3 000 000	Linear XL
Separation Range [Da]	Single Porosity
100 - 5 000	50 Å
100 - 10 000	100 Å
100 - 30 000	500 Å
100 - 60 000	1 000 Å
500 - 700 000	10 000 Å
1 000 - 1 000 000	100 000 Å
1 000 - 3 000 000	1 000 000 Å
5 000 - 30 000 000	10 000 000 Å

V SEC vyjadřujeme molekulovou hmotnost jako násobek atomové hmotnostní konstanty m_u , používáme jednotku Dalton.

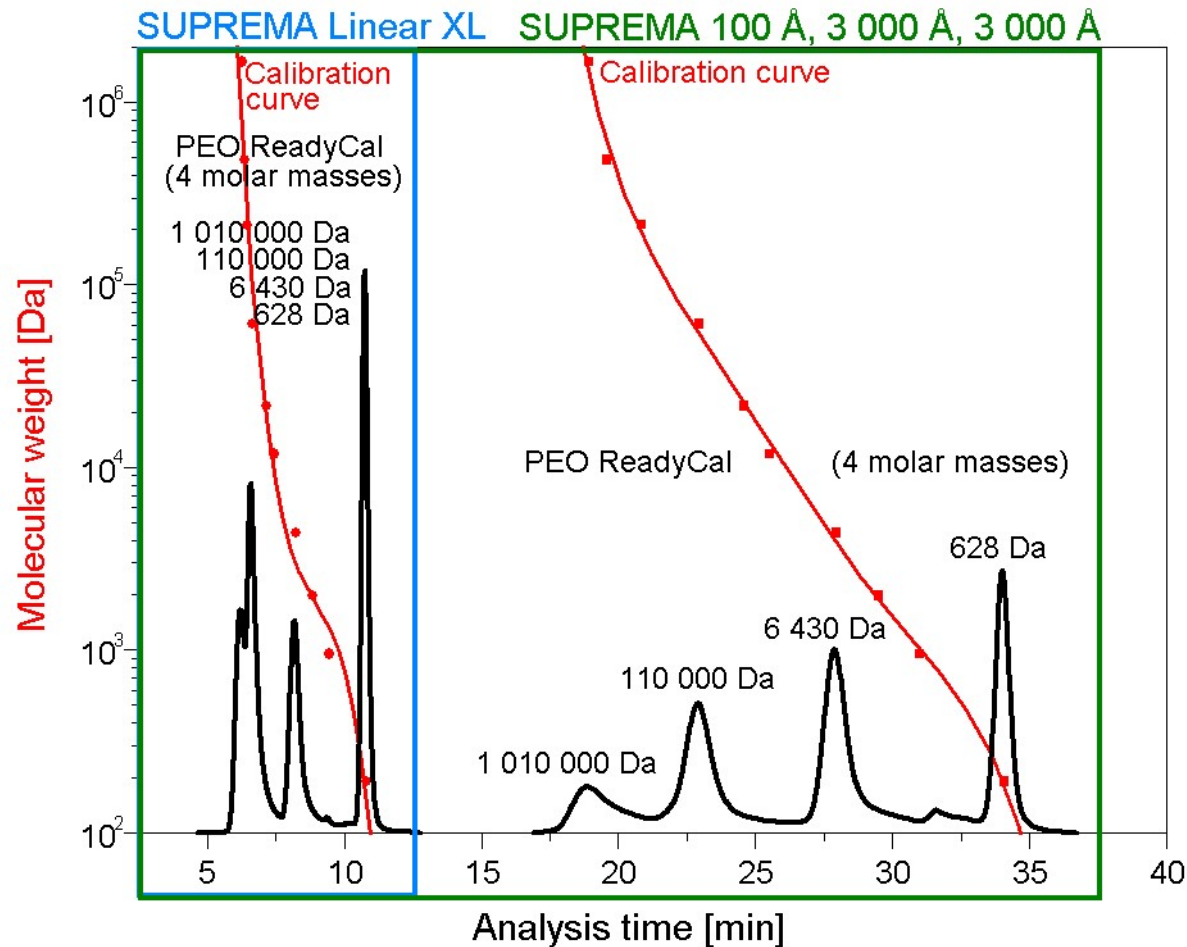
atomová hmotnostní jednotka u

$$m_u = 1 u = 1 \text{ Da} = (1,660\,539\,040 \pm 0,000\,000\,020) \times 10^{-27} \text{ kg}$$

Kalibrační graf pro „single porosity“ a „mixed bed“ SDV kolonu



Kolona: styren-divinylbenzenový kopolymer, eluent: THF, standardy: polystyreny



Separace polyethylenoxidů na koloně SUPREMA na bázi polyhydroxymethakrylátu

- kolona Linear XL: rychlá analýza, široký rozsah molekulových hmotností (4 řády), nízké rozlišení vysokých molekulových hmotností
- kombinace kolon s porozitou 100 Å a 3000 Å (2x): vysoké rozlišení v celém rozsahu molekulových hmotností, dlouhá analýza

MOBILNÍ FÁZE V SEC

- mobilní fáze neovlivňuje interakce mezi dělenými látkami a stacionární fází, nesoutěží s analytem o vazebné místo ve SF
- mění stupeň bobtnání gelu a tím velikost pórů, eluční pořadí nemění
- musí dobře rozpouštět vzorek
- nesmí reagovat s náplní kolony, ale musí ji dobře smáčet a umožnit tak průnik do pórů

Hydrofobní látky a gely: THF; toluen; xylen; chloroform; dichlormethan; nižší alkoholy; ethylacetát; aceton; dioxan; DMF; DMSO

Hydrofilní látky a gely: voda; roztoky pufrů, methanol, acetonitril, polární organická rozpouštědla mísitelná s vodou

ČERPADLA V SEC

- **sloupcová SEC:** mobilní fáze se pohybuje samospádem, i v koloně
- **nízkotlaká SEC:** pohyb mobilní fáze peristaltickým čerpadlem, pozor na kompatibilitu čerpadla a hadiček s organickými rozpouštědly
- **vysokotlaká SEC:** pumpy běžné pro HPLC

DETEKTORY V SEC

Diskontinuální detekce: sbíráme frakce eluátu a obsah dělených látek vyhodnocujeme vhodnou analytickou metodou

Kontinuální detekce: za kolonou připojíme nedestruktivní detektor

1. spektrofotometrický (UV), refraktometrický, vodivostní
2. light scattering detektor (LSD), viskozimetrický detektor

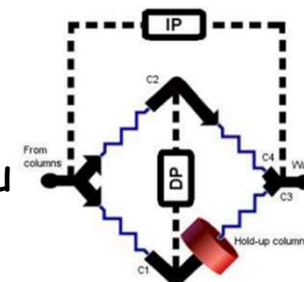
refraktometrický + viskozimetrický + detektor rozptylu světla = triple detection in SEC

Detektor rozptylu světla (LSD): reaguje na molekulovou hmotnost analytu, informace o velikosti a konformaci makromolekuly v roztoku

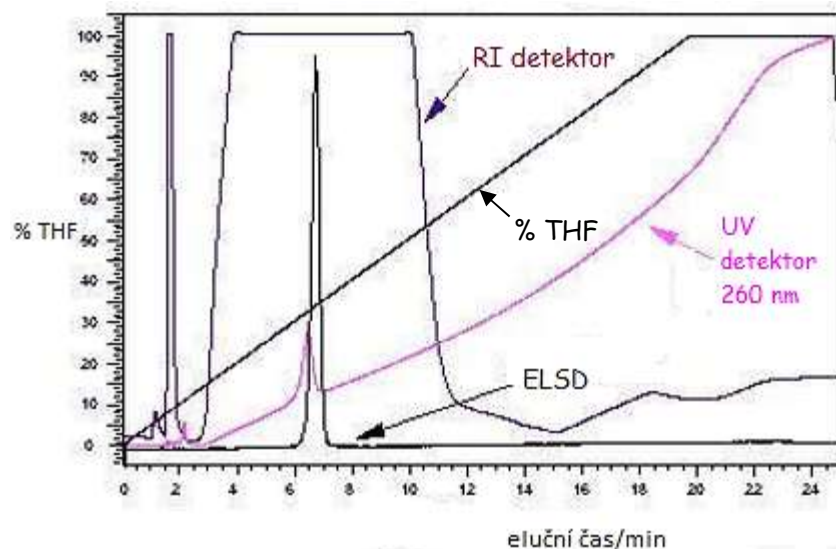
- laserový paprsek rozptylován na rozpuštěných polymerních částicích

Viskozimetrický detektor: reaguje na vlastnosti molekuly, ne koncentraci

- měří specifickou viskozitu vzorku
- detekce na základě průchodu kapaliny kapilárou (kapilárami)
- určení molekulové hmotnosti analytu + stupeň větvení polymeru



SEC analýza polymerů za použití gradientové eluce



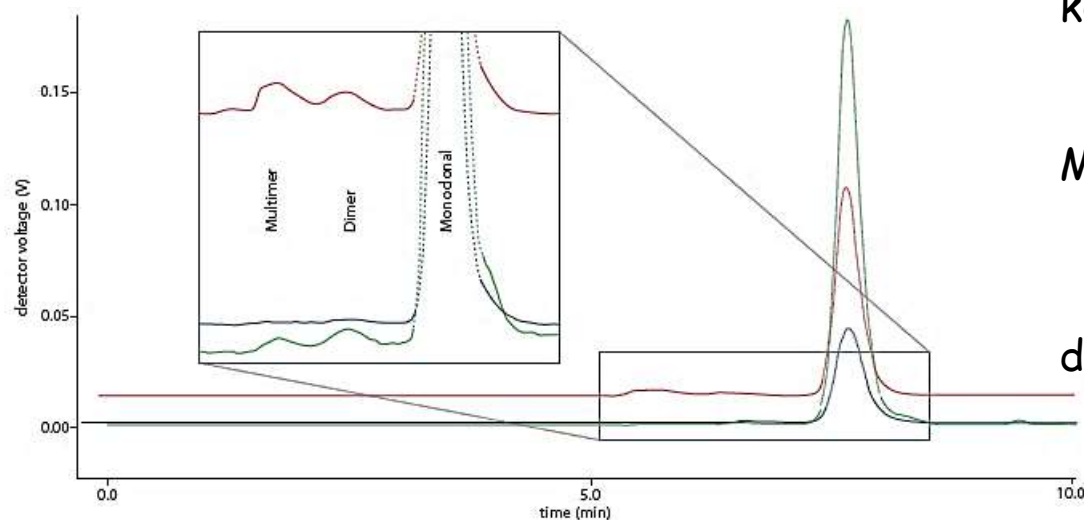
DVB/vinylpyrolidonová kolona (3,9x150 mm)

Vzorek: 0,5% styren-akrylonitrilový
kopolymer (25% akrylonitril)

MF: gradient 100% ACN do 100% THF za 20
minut, průtok 1mL min⁻¹

detekce ELSD + RI + UV @ 260 nm

SEC analýza agregátů komerčních monoklonálních protilátek



kolona TSKgel G3000SW_{XL}
(5 μm; 7,8 mm x 30 cm)

MF: PBS (phosphate buffred saline,
NaCl+KCl+Na₂HPO₄+KH₂PO₄),
průtok 1 mL min⁻¹

detekce ELSD + RI + UV @ 280 nm

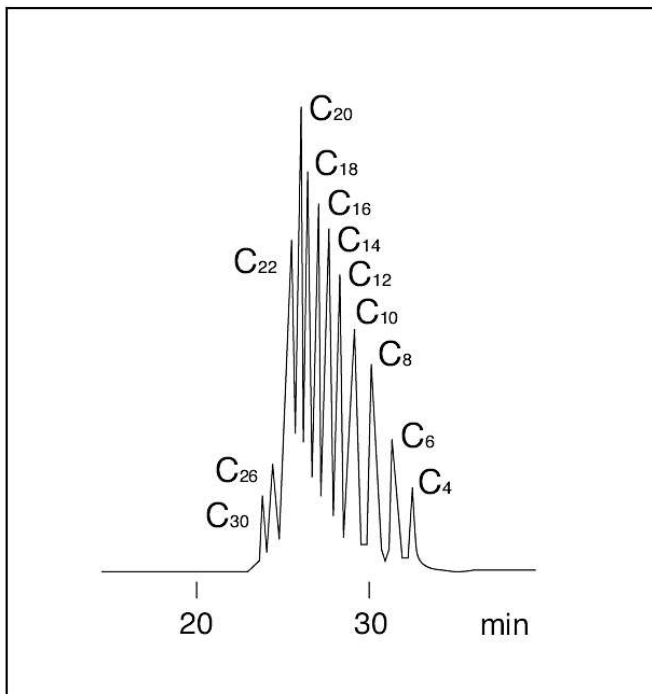
PRAKTICKÉ VYUŽITÍ SEC

1. Skupinové dělení a odsolování

- oddělení vysokomolekulárních látek jako skupiny od látek nízkomolekulárních, k dělení uvnitř skupin nedochází
- nízkomolekulární látky jsou zadrženy na koloně, vysokomolekulární látky procházejí
- pokud jsou nízkomolekulární látky anorganické soli - **odsolování**
- odsolování je běžné v biochemických laboratořích
 - oddělení bílkovin a polysacharidů od doprovodných solí (náhrada za zdlouhavou dialýzu, při které může dojít k denaturaci)
 - ukončení reakce nízkomolekulární látky s biopolymerem (oddělení koenzymu, substrátu nebo inhibitoru od enzymu)

2. Frakcionace

- dělení látek s podobnou molekulovou hmotností
- biochemické laboratoře: purifikace sacharidů, hormonů, enzymů, peptidů, NK, lipidů, virů a dokonce i buněk
- organické laboratoře: dělení směsí oligomerů a polymerů
- široké použití ve farmaceutickém průmyslu v preparativním měřítku



Separace mastných kyselin na ST-DVB gelu

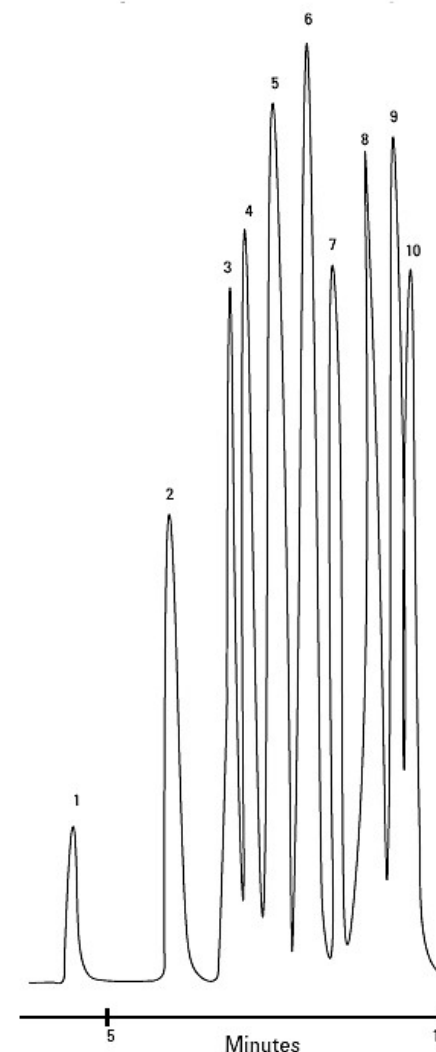
kolona TSKgel G2500H_{XL} (7,8 mm ID x 30 cm)
 2 kolony v sérii, vylučovací limit 2×10^4 Da (polystyreny)
 eluent THF
 průtok 1 ml min^{-1}
 detekce refraktometrická

Separace esterů kyseliny ftalové na ST-DVB kopolymeru

kolona TSKgel G1000H_{XL} (7,8 mm ID x 30 cm)
 vylučovací limit kolony 1×10^3 Da (polystyreny)

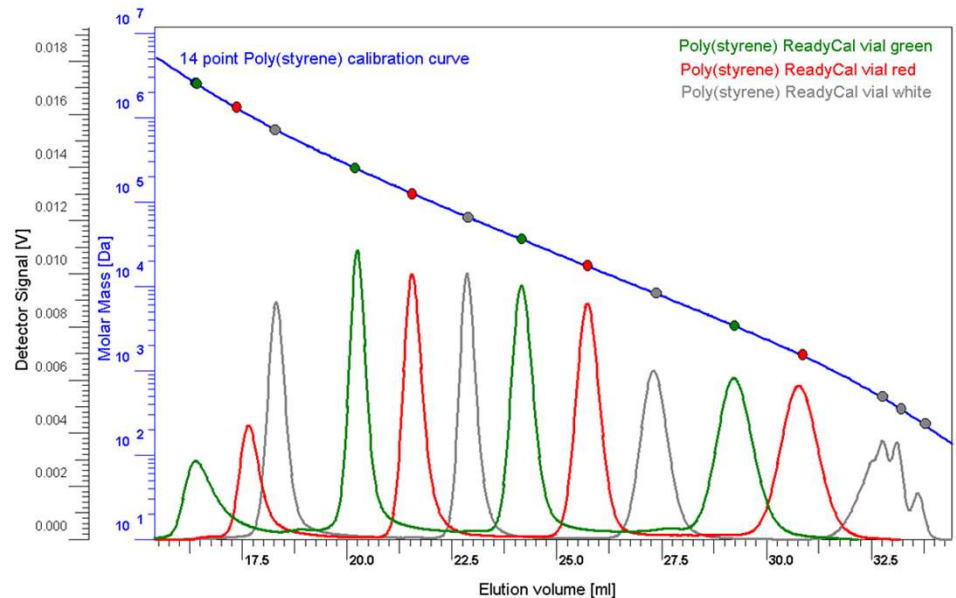
1. polystyren (10 200Da), 2. dioktylftalát (391Da), 3. dibutylftalát (278Da),
 4. dipropylftalát (250Da), 5. diethylftalát (222Da), 6. dimethylftalát (194Da),
 7. *n*-propylbenzen (120Da), 8. ethylbenzen (116Da), 9. toluen (92Da),
 10. benzen (78Da)

eluent THF
 průtok 1 mL min^{-1}
 detekce UV při 254 nm

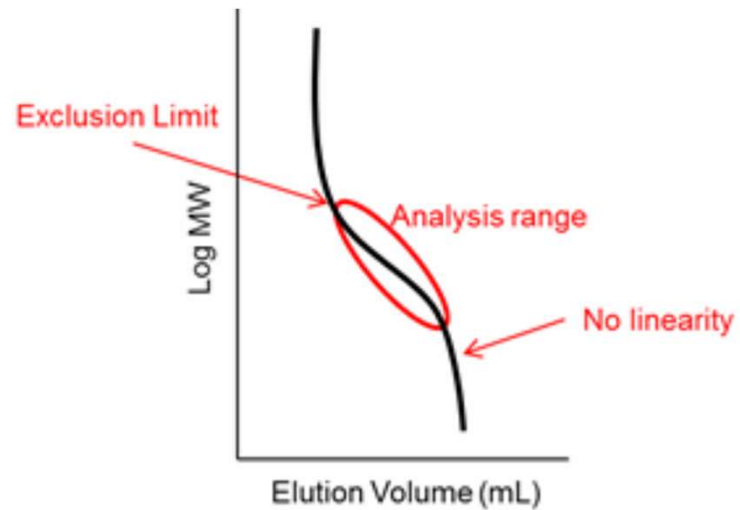
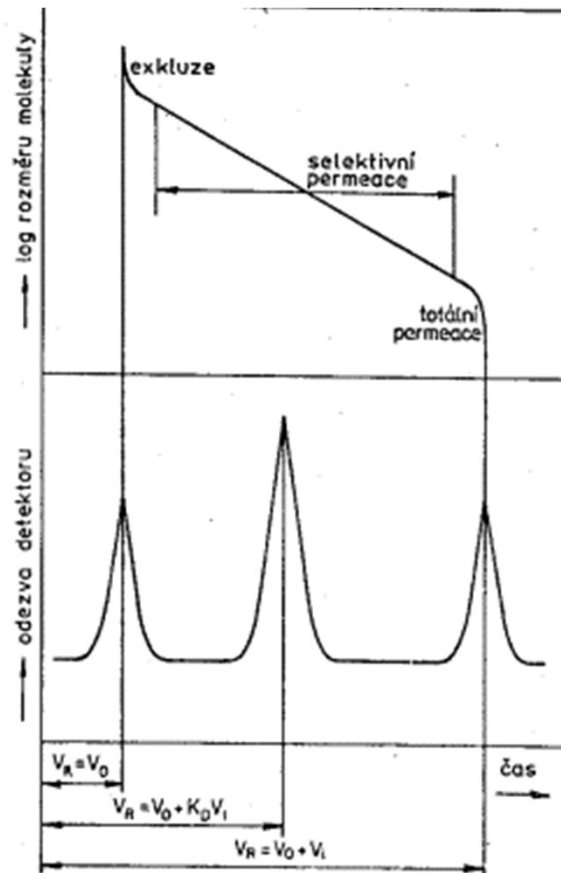
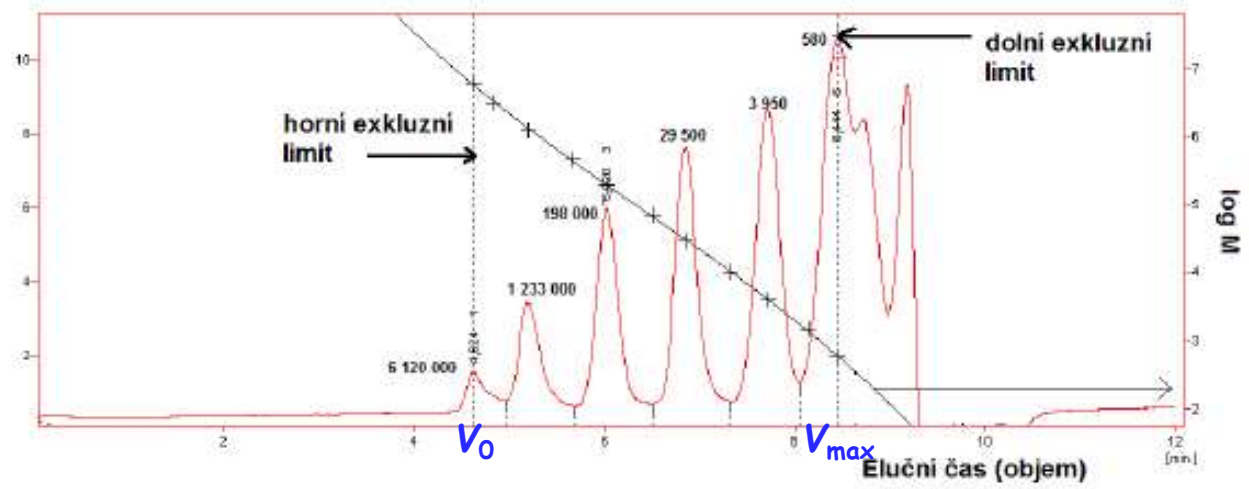


3. Určení molekulové hmotnosti

- látky eluují z kolony podle klesající molekulové hmotnosti M
- kolonu okalibrujeme standardy o známé molekulové hmotnosti M
- sestrojíme kalibrační graf - závislost elučního objemu na molekulové hmotnosti



- z elučního objemu neznámé látky určíme její molekulovou hmotnost
- okalibrovanou kolonu můžeme využít pro **určení distribuce biopolymerů a syntetických polymerů** (určíme velikost jednotlivých polymerů a jejich kvantitativní zastoupení ve směsi)



Studium vazby ligandu na biopolymer

- kolonu naplněnou dextranovým gelem Sephadex G25 promýváme (ekvilibrujeme) mobilní fází obsahující ligand
- poté přidáme známého množství proteinu vážícího daný ligand → dojde k vyvázání ligandu ze stacionární fáze
- z množství ligandu navázaného na gel při různých koncentracích ligandu v mobilní fázi a z množství vneseného proteinu vypočítáme charakteristiky interakce protein-ligand (vazebná konstanta a stechiometrie vazby)

