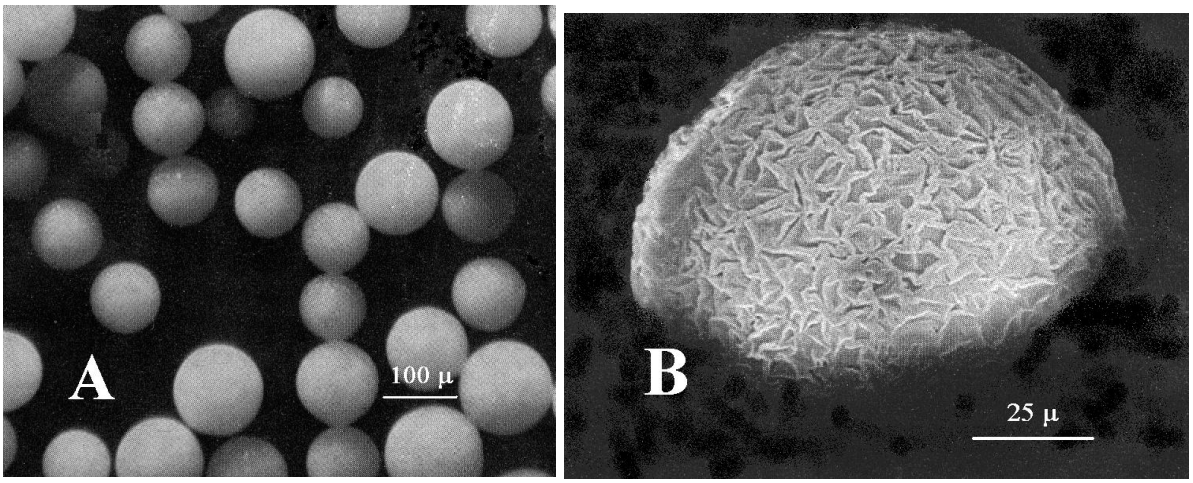
WARNING
Materiały publikowane w formie „jest jak jest”, mogą wymagać rozszerzenia lub komentarzy.

Mikołaj Akartel, grupa I

# Chromatografia żelowa

Chromatografia żelowa, GPC (ang. Gel Permeation Chromatography) - odmiana kolumnowej chromatografii cieczowej. Polega na rozdziale składników mieszaniny na żelu lub sitach molekularnych w zależności od rozmiarów cząsteczek. Stosowana m.in. do określania średnich mas cząsteczkowych polimerów.

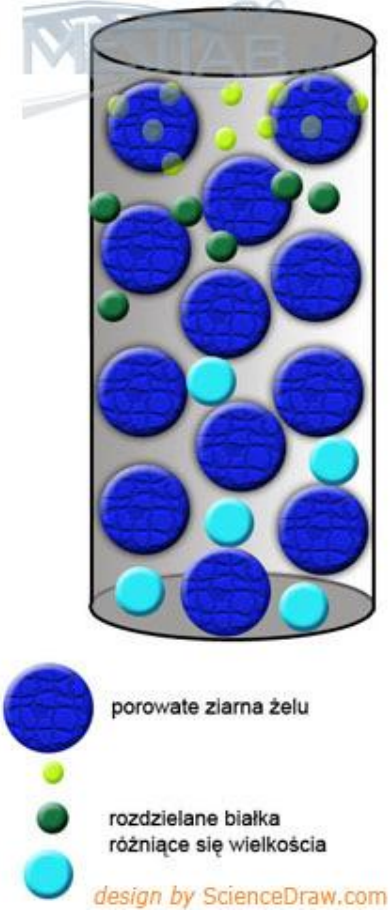
Separacja makrocząsteczek przy zastosowaniu techniki filtracji żelowej polega na wykorzystaniu porowatej struktury ziaren żelu oraz zjawiska dyfuzji, któremu podlegają zarówno molekuły solwentu, jak i separowane makromolekuły. Załóżmy, że dysponujemy żelem, którego ziarna mają kształt kulisty, z jednoczesną głęboką porowatością, przy czym ściśle kontrolowane podczas produkcji żelu były zarówno rozmiary ziarna, jak i wielkość oraz jednorodność porów.




**Sephadex G-200** widziany pod skaningowym mikroskopem elektronowym. Uwagę zwraca kulisty kształt ziaren (A) oraz porowatość powierzchni ziarna (B).

Po uwodnieniu takiego żelu, we wszystkich porach ziaren oraz wokół nich znajdą się cząsteczki wody. W takiej postaci żel można łatwo upakować w kolumnie chromatograficznej o odpowiednio dobranych rozmiarach. Zwykle przed rozpoczęciem rozdziału chromatograficznego dokonuje się równoważenia kolumny (złoża) solwentem odpowiednio dobranym dla separowanego materiału wyjściowego. W trakcie równoważenia kolumny dochodzi do wymiany wody na solwent - najszybciej w otoczeniu ziaren żelu, a dopiero później - dzięki zjawisku dyfuzji, w całej objętości porowatego ziarna złoża. Właśnie proces dyfuzyjnej wymiany solwentów w porowatościach żelu decyduje o tym, że zrównoważenie kolumny wymaga przepuszczenia przez nią solwentu w ilości równej kilku jej objętościom. Gdy kolumna jest już zrównoważona, czyli gdy cała objętość kolumny jest równomiernie wypełniona wybranym solwentem, można na nią nanieść materiał przeznaczony do separacji.

Krytycznym parametrem w technice filtracji żelowej jest objętość naniesionej na kolumnę próbki. Objętość ta nie powinna przekraczać 3-5% objętości kolumny. W przeciwnym razie wynik separacji może być zupełnie niezadowalający. Po naniesieniu na kolumnę materiału przeznaczonego do separacji dochodzi do jego wniknięcia w złoże. Małe makrocząsteczki, o rozmiarach mniejszych od rozmiarów porów, mogą dyfundować w porowatości złoża.




Makrocząsteczki o rozmiarach porównywalnych z rozmiarami porów i większe, przepływają przez kolumnę wraz z solwentem, nie wnikając w porowatości żelu. Im mniejsze są makromolekuły tym głębiej mogą penetrować porowatości złoża. Obszar zajmowany przez strefę naniesionej próbki przemieszcza się wzdłuż kolumny wraz z solwentem, ale prędkość przepływu makromolekuł jest mniejsza bądź równa prędkości przepływania solwentu. Te makromolekuły, które są zbyt duże aby wnikać w porowatą strukturę złoża, przemieszczają się równie prędko jak solwent. Pozostałe makromolekuły poruszają się tym wolniej, im są mniejsze. W związku z tym, pierwsze kolumnę opuszczą te makrocząsteczki, które były zbyt duże aby wnikać w porowatości ziaren, a później będą wymywane coraz mniejsze makromolekuły, w porządku podyktowanym ich rozmiarami.

**Zastosowanie chromatografii żelowej**

Główny zakres zastosowań chromatografii żelowej to rozdzielanie substancji różniących się ciężarem cząsteczkowym (i związaną z nim wielkością cząsteczek), a w pierwszej kolejności różnego typu polimerów, a na mniejszą skalę smarów, olejów, kosmetyków. Poza badaniem składników podstawowych (głównych) chromatografia żelowa wykorzystywana jest także do oznaczania zawartości dodatków modyfikujących i uszlachetniających, a zatem do oznaczania zawartości plastyfikatorów, antyutleniaczy, konserwantów, barwników. Służy wówczas do wyodrębnienia składników próbki, które różnią się zasadniczo masą molową od pozostałych, np. plastyfikatora w polimerze, zagęszczacza w oleju smarowym, modyfikatora polimerowego w masie bitumicznej (np. asfalcie drogowym)itp.

Inną grupą zastosowań chromatografii żelowej jest przygotowanie próbek do oznaczania niskocząsteczkowych zanieczyszczeń w żywności, produktach naftowych i w środowisku. Zasada postępowania polega na wydzieleniu frakcji o niskich wartościach ciężaru cząsteczkowego i poddaniu wyizolowanej frakcji analizie z zastosowaniem innego rodzaju układu chromatograficznego, najczęściej w układzie odwróconych faz. Można w ten sposób przygotować próbki do oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, pestycydów, toksycznych związków metaloorganicznych (tetraetyloołów)i podobnych im zanieczyszczeń w glebie, żywności (mięsie, warzywach i owocach, zbożach, mleku i przetworach), w materiale biologicznym pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i ludzkiego (analiza toksykologiczna i kryminalistyka) a także w olejach technicznych, asfaltach (związki siarki i azotu, tzw. trucizny katalizatora).

Chromatografię żelową wykorzystuje się powszechnie do wstępnego frakcjonowania badanych materiałów w badaniach biochemicznych, mikrobiologicznych i w biotechnologii, a także w preparatyce, np. przy pozyskiwaniu substancji biologicznie czynnych w medycynie, chemii kosmetyków, czy do odsalania roztworów peptydów i białek, otrzymanych po zastosowaniu wysalania frakcyjnego, albo strącania w punkcie izoelektrycznym.

## Zalety i wady techniki filtracji żelowej

**Zalety:**

- technika łatwa do zastosowania oraz interpretacji wyników
- można separować wszystkie rodzaje biomolekuł
- próbka może być naniesiona na kolumnę i eluowana z niej w tym samym solwencie
- proces separacji bardzo słabo zależy od składu solwentu

**Wady:**

- objętość nanoszonej próbki jest ograniczona i zawsze musi pozostawać w odpowiedniej proporcji do objętości kolumny
- rozdzielczość metody jest znacznie gorsza w porównaniu z metodami adsorbcyjnymi, szczególnie gdy stosowane są techniki elucji gradientowej.