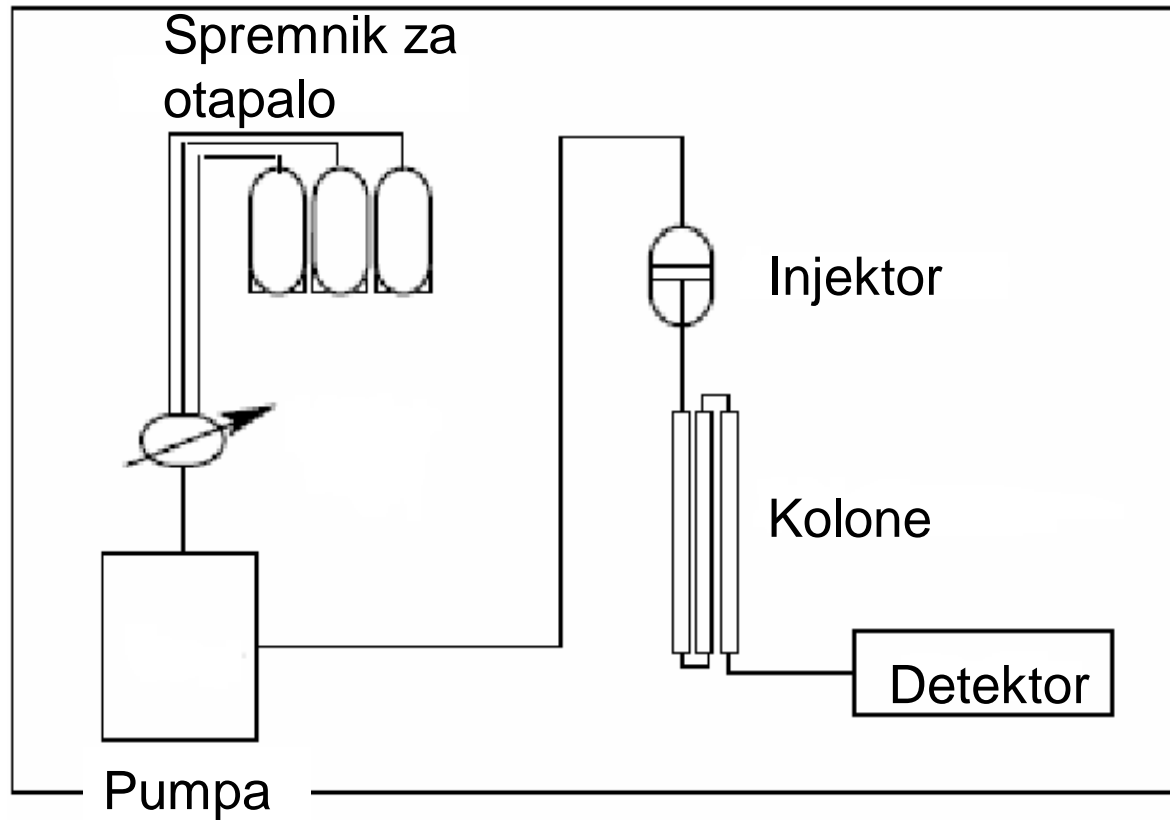


# Kromatografija na propusnom gelu

(GPC, engl. *gel permeation chromatography*),

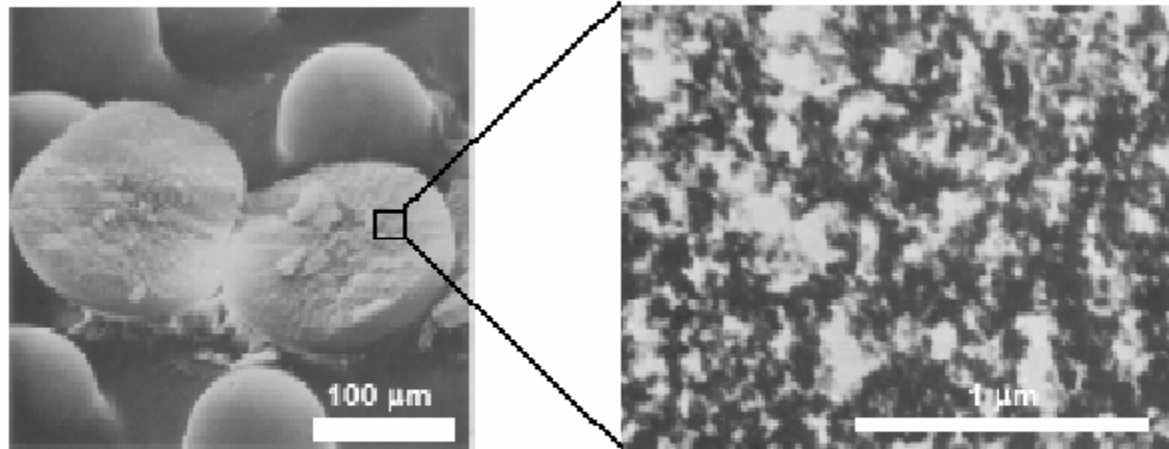
- često se naziva i **kromatografija isključenjem po veličini** (SEC, engl. *size exclusion chromatography*),



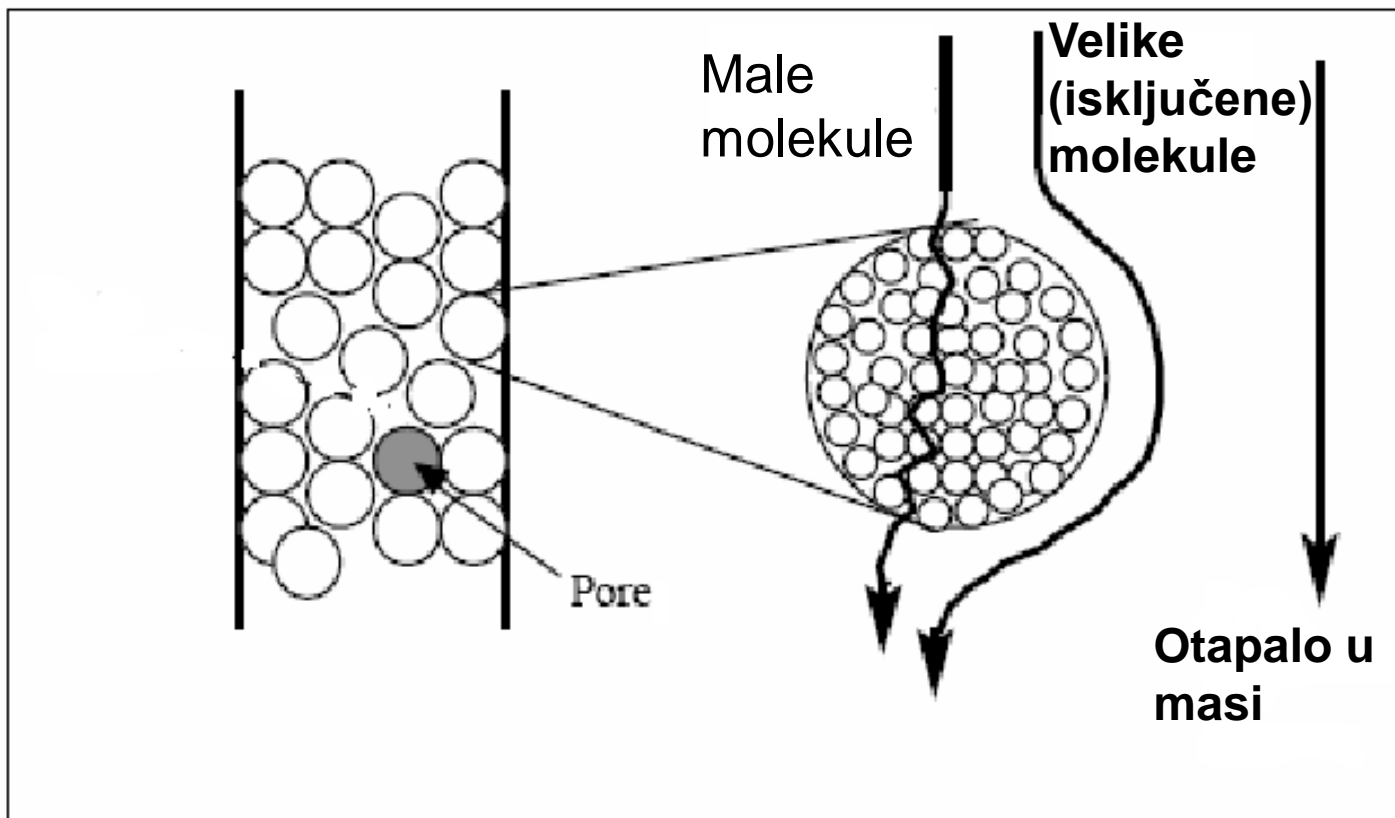
Osnovni dio svakog uređaja za kromatografiju isključenjem po veličini je **kolona**.

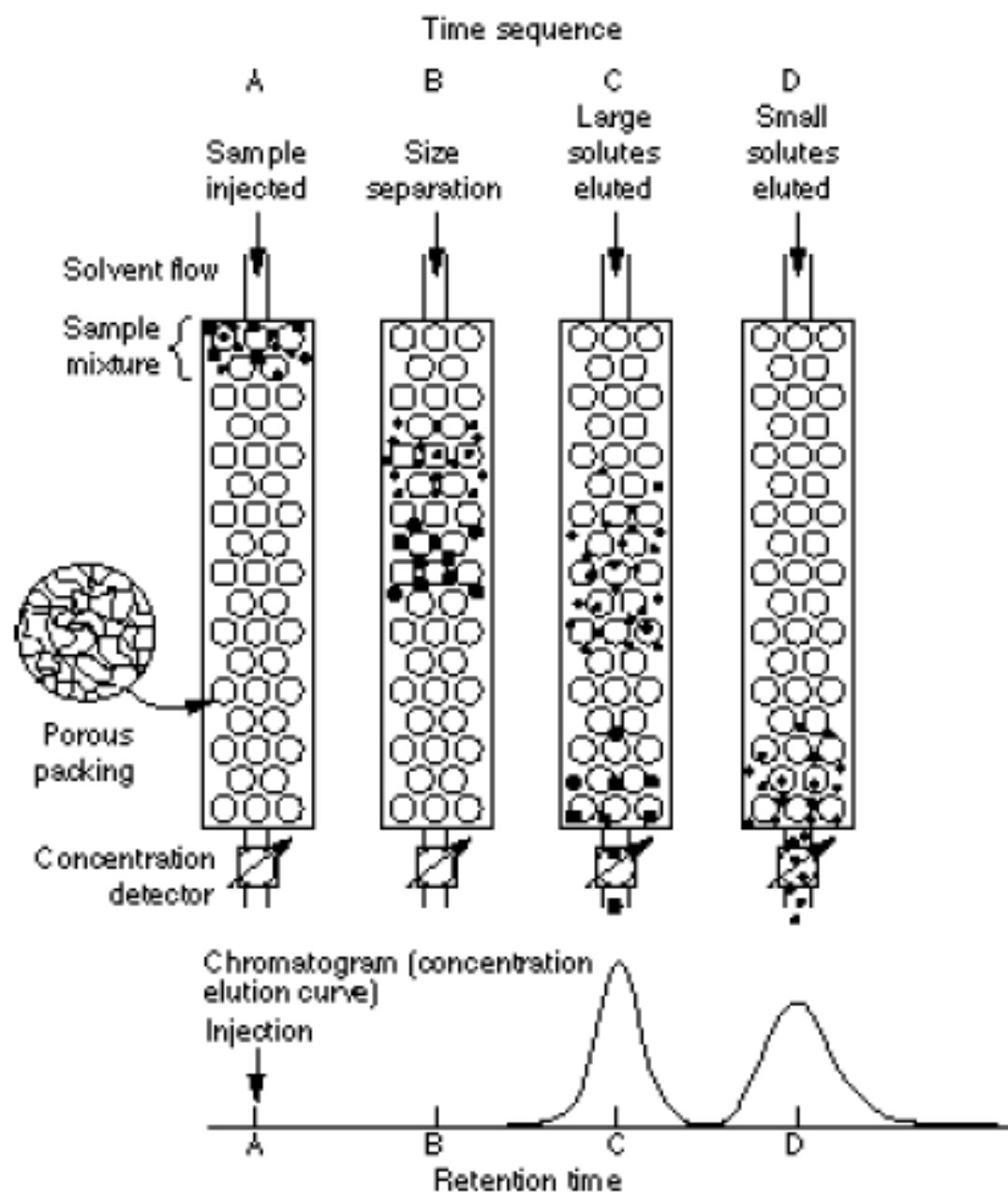
U koloni se nalazi **porozni gel** umreženog polimera **s definiranom raspodjelom veličina pora**, te **otapalo** kojim je polimerni gel nabubren.

Otapalo koje se nalazi u porama polimernog gela je **stacionarna faza**, a isto otapalo koje struji konstantnim protokom kroz kolonu (eluens) je **obilna faza**.

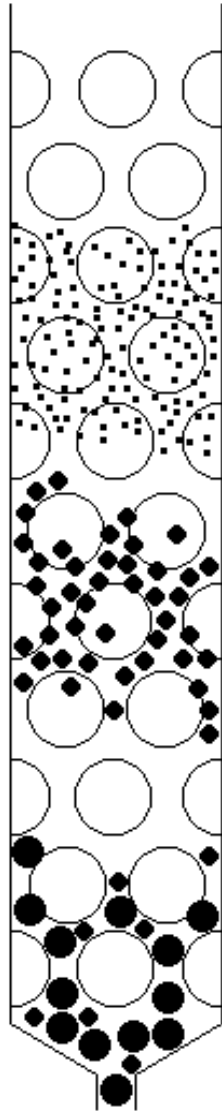


E.A. Collins, J. Bares, and F.W. Billmeyer, "Experiments In Polymer Science" Wiley, 1973.





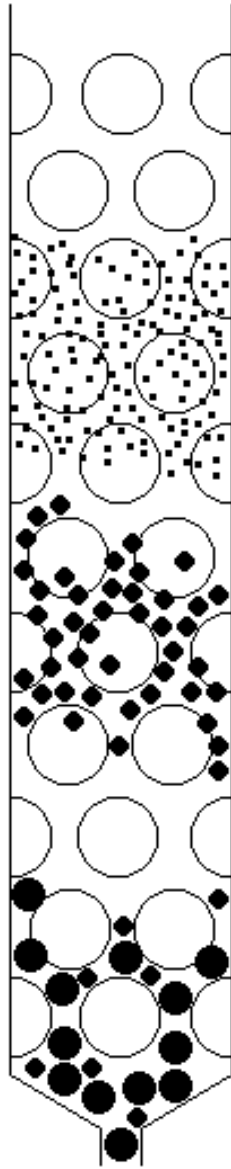
$$V_e = V'$$



Gel u koloni djeluje poput filtra ili sita.

Otopljene molekule koje su veće od najveće pore ne mogu difundirati ni u jednu poru, pa je njihov volumen eluiranja,  $V_e$ , jednak tzv. **mrtvom volumenu kolone**,  $V'$ , tj. volumenu između čestica nabubrenog gela ( $V_e = V'$ ).

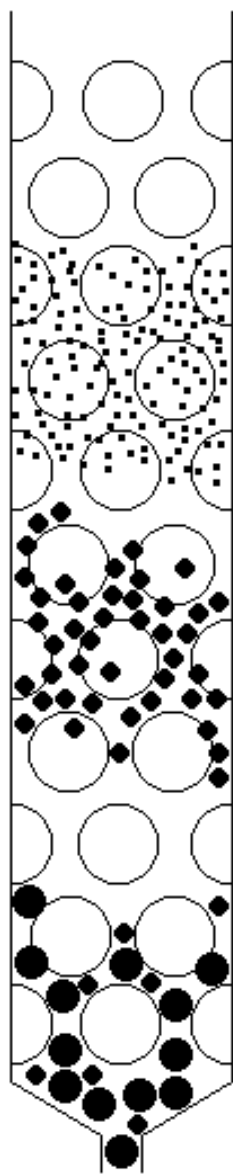
$$V_e = V' + V''$$



Male polimerne molekule, koje mogu difundirati u sve pore izlaze posljednje iz kolone, a njihov volumen eluiranja jednak je zbroju **volumena pora u koloni,  $V''$** , i mrtvog volumena kolone ( **$V_e = V' + V''$** ).



$$V_e = V' + KV''.$$



Polimerne molekule srednjih veličina mogu difundirati tek u **dio pora**, pa će volumen eluiranja biti veći što je taj dio pora veći, tj. što je polimerna molekula manja.

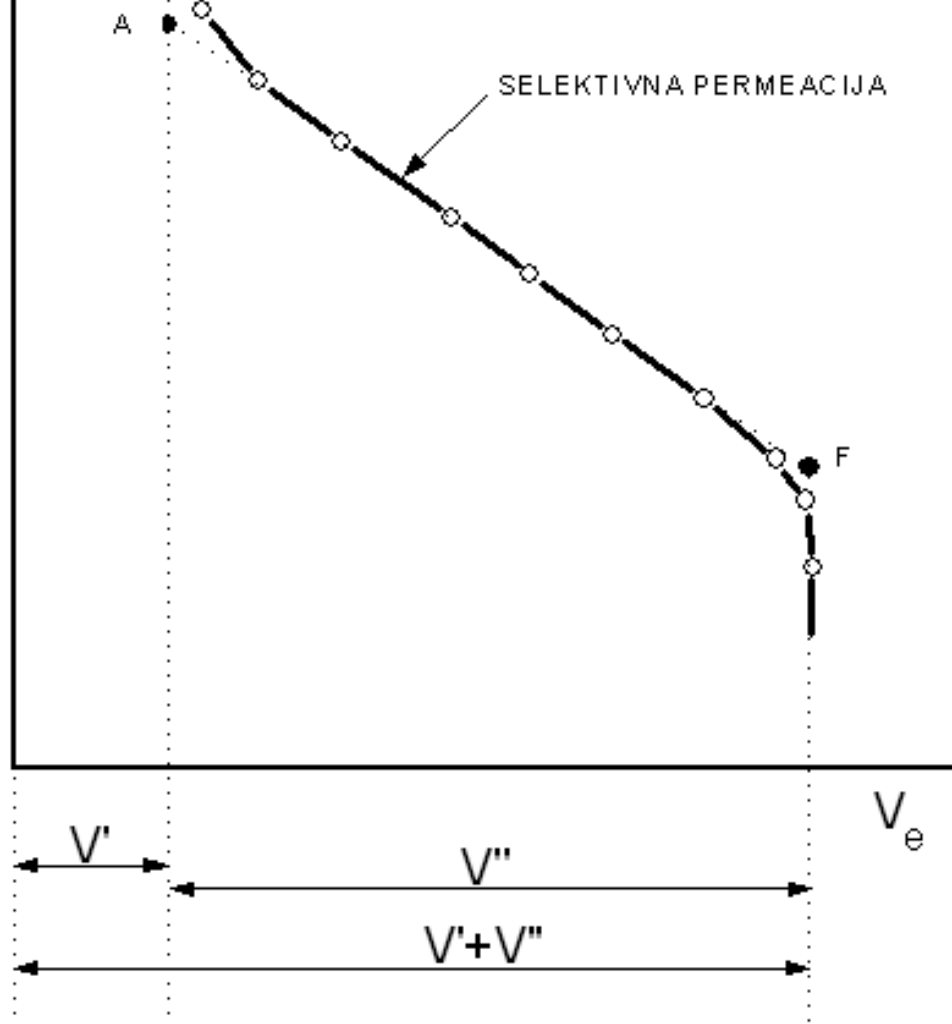
Dio pora u koji makromolekule određene veličine mogu difundirati opisuje se **konstantom raspodjele**,  $K$ .

$$V_e = V' + KV''.$$

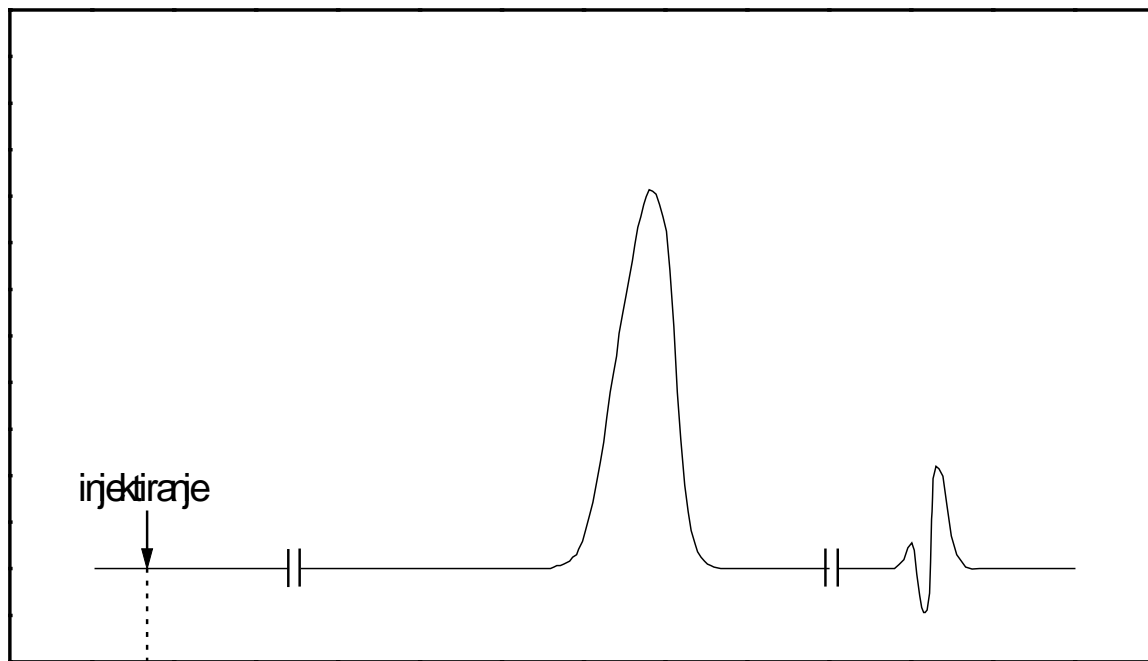
Najveća molekula koja još uvijek može difundirati u pore određuje **granicu isključenja**, a najmanja molekula koja se još separira određuje **prag separacije**.

log M

- $V'$  → MRTVI VOLUMEN KOLONE
- $V''$  → VOLUMEN PORA
- $V'+V''$  → UKUPNI VOLUMEN
- F → PRAG SEPARACIJE
- A → GRANICA ISKLJUČENJA



signal detektora



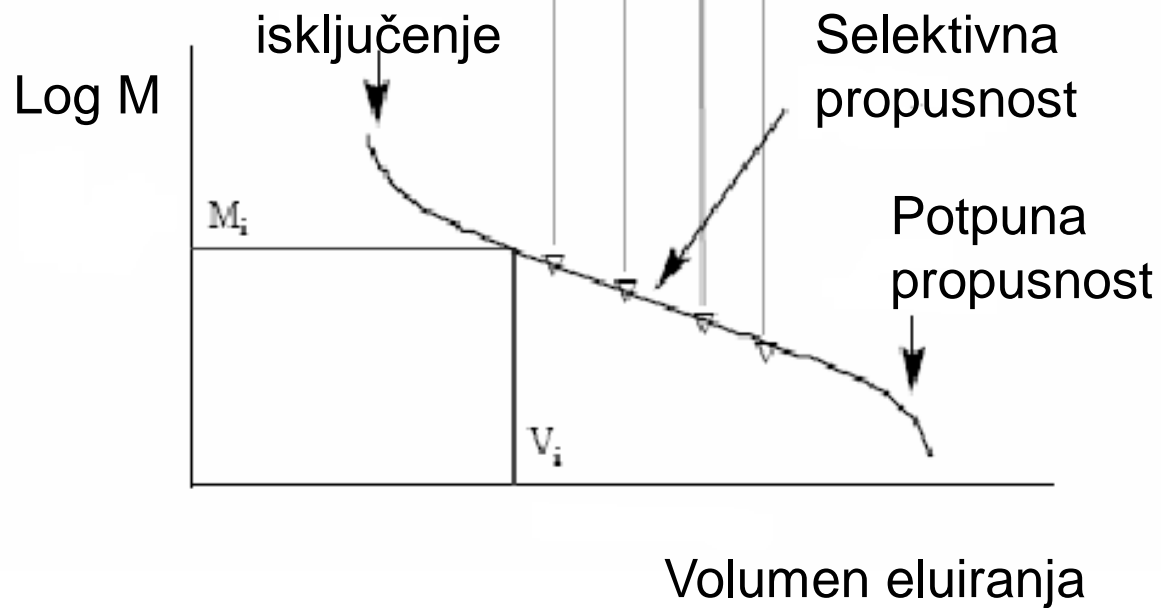
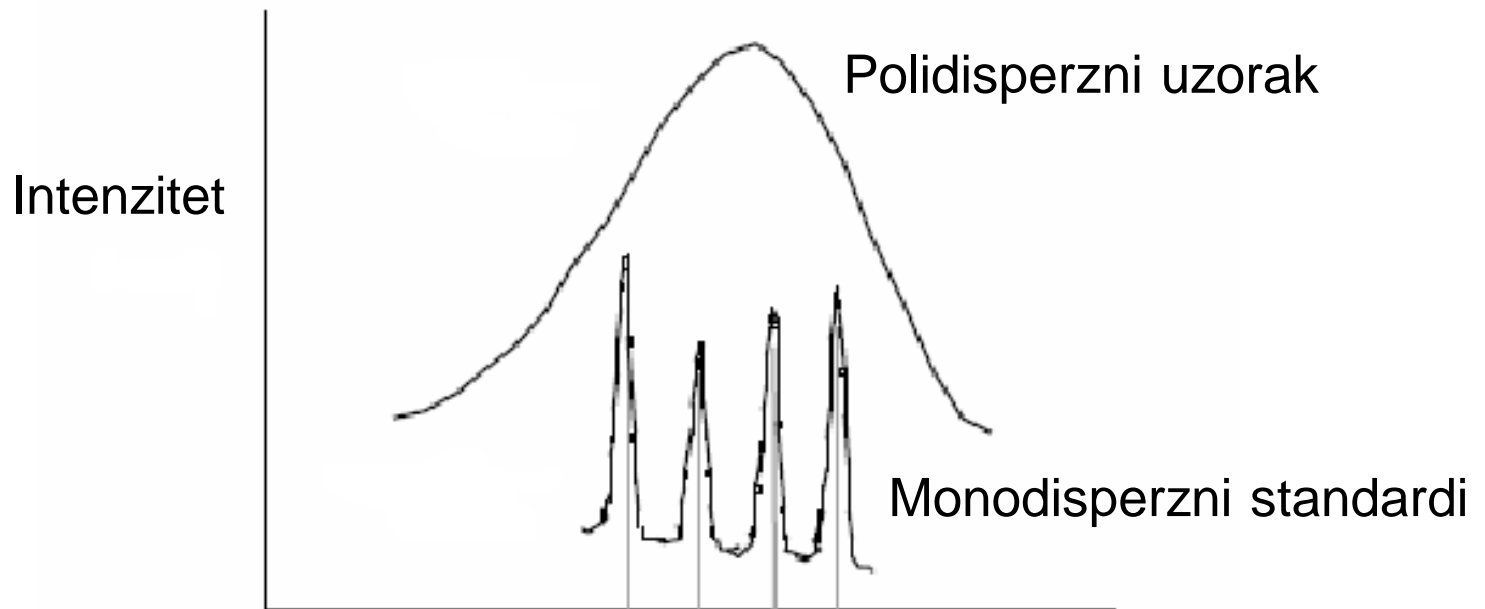
volumen eliranja,  $V_e$

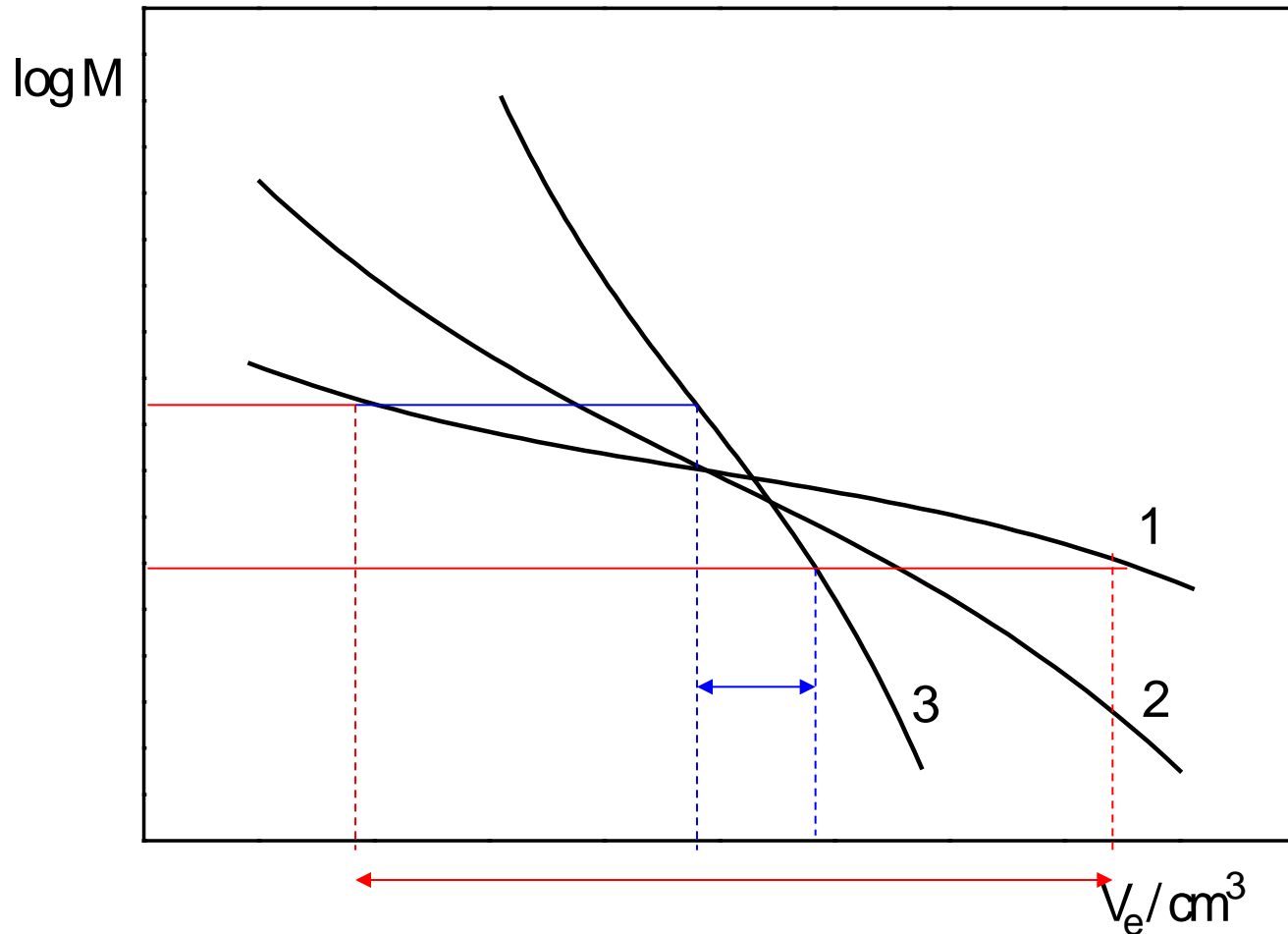
Da bi se krivulja eluiranja mogla kvantitativno prevesti u krivulju raspodjele molekulskih masa potrebno je poznavati **baždarne relacije** .

U SEC-kromatografiji kalibracija se provodi (**monodisperznim**) **uniformnim polimernim standardima**, pri čemu se određuje kalibracijska funkcija

$$V_e = f(\log M).$$

Takva funkcijska ovisnost naziva se **specifična kalibracija** i može se dati u obliku dijagrama ili kao analitički izraz.





Specifične baždarne krivulje:

1-velika selektivnost kromatografskog sustava

3-mala selektivnost kromatografskog sustava

Baždarne krivulje mogu biti približno linearne, tj:

$$\log M = C_0 + C_1 \cdot V_e$$

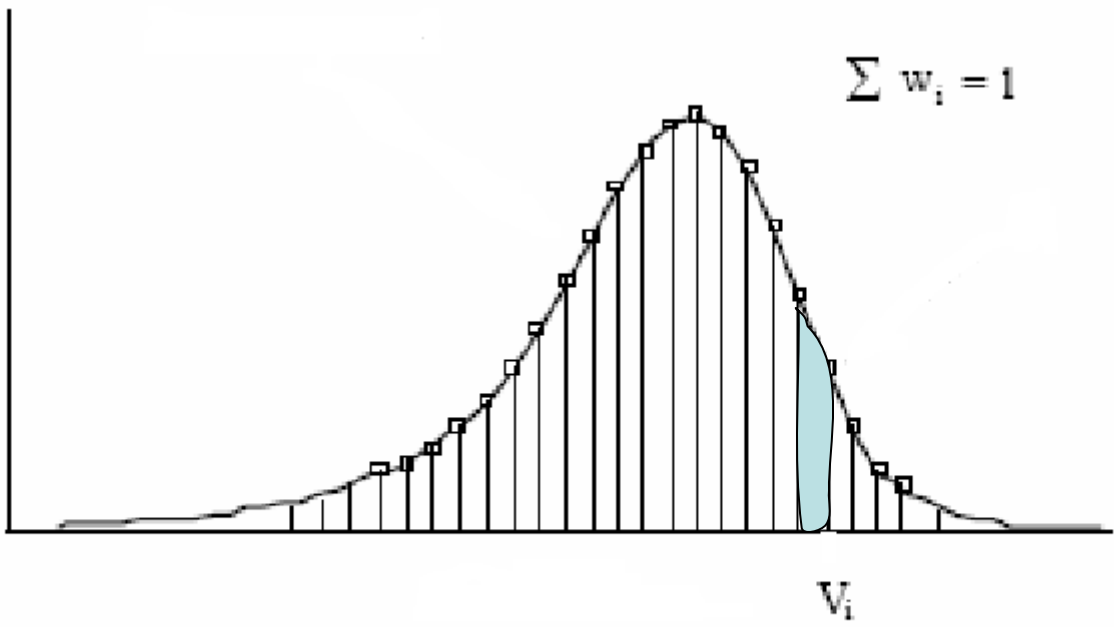
ili se mogu opisati polinomima trećeg stupnja:

$$\log M = C_0 + C_1 \cdot V_e + C_2 \cdot V_e^2 + C_3 \cdot V_e^3$$

gdje je  $M$  molekulska masa, a  $C_i$  su baždarne konstante kromatografskog sustava.



Koncentracija



Normalizacija

$$w_i = \frac{h_i}{\sum h_i}$$

$$w_i = \frac{A_i}{\sum A_i}$$

$$\overline{M}_w = \sum w_i M_i = \frac{\sum h_i M_i}{\sum h_i}$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum A_i M_i}{\sum A_i}$$

$$\overline{M}_n = \frac{1}{\sum \frac{w_i}{M_i}} = \frac{\sum h_i}{\sum (h_i / M_i)}$$

$$\overline{M}_n = \frac{\sum A_i}{\sum (A_i / M_i)}$$

## Problemi primjene specifične kalibracije:

-polimerne molekule jednakog kemijskog sastava i jednake molekulske mase, ali **različite strukturne makromolekulske građe** imaju različitu veličinu polimernog klupka u otopini.

Tako npr. **lančani polistiren**, zbog toga što ima veći hidrodinamički volumen od **zvjezdastog polistirena** iste molekulske mase, ima manji volumen eluiranja, a ovaj pak, zbog istog razloga, manji volumen eluiranja od **razgranatog polistirena**.

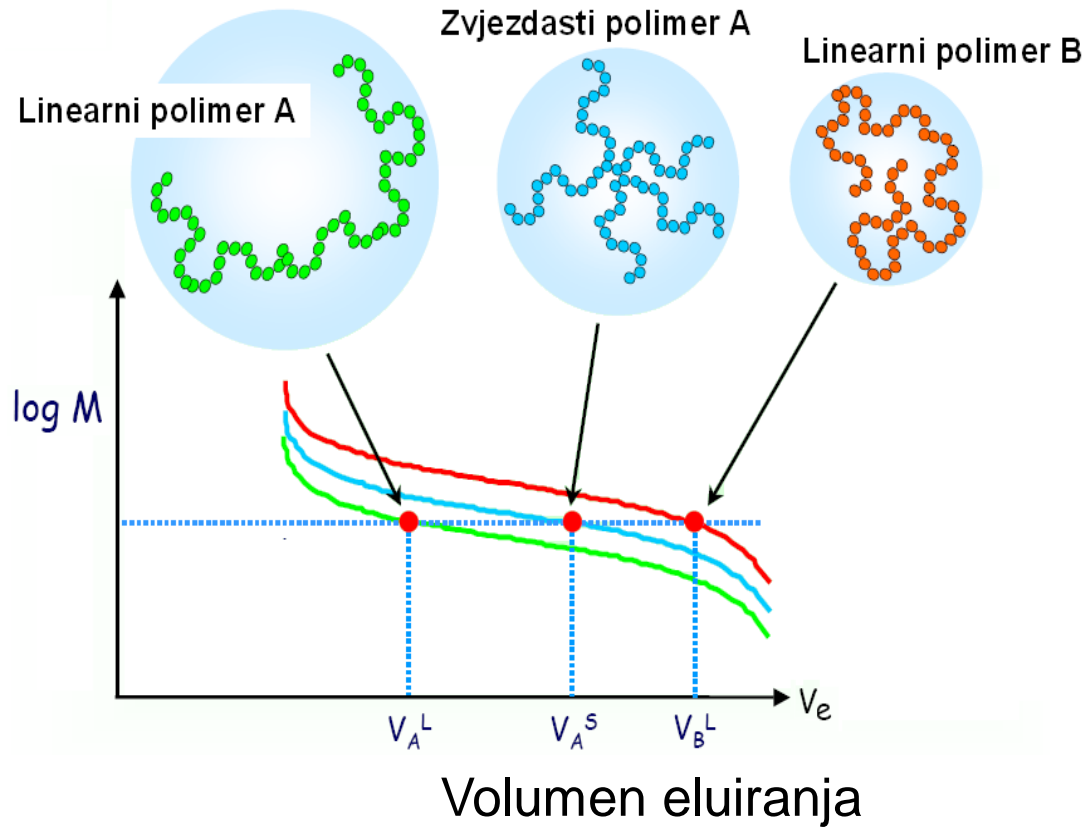
Dakle, za svaki polimer trebalo bi imati i **definirane standarde s obzirom na građu makromolekule**.

Kemijski različiti polimeri iste molekulske mase imaju u istom otapalu različitu veličinu klupka u otopini, pa tako i različite volumene eluiranja.

Stoga se može zaključiti da molekulska masa nije parametar separacije u kromatografiji isključenjem po veličini.

# Kalibracijske krivulje

Isto otapalo  
Ista temperatura



Pretpostavlja se da je parametar separacije **veličina polimernog klupka u otopini**, odnosno **hidrodinamički volumen solvatirane makromolekule**.

Prema Einsteinovoj jednadžbi

$$[\eta] = 2,5 \cdot \frac{N_A}{M} V_h$$

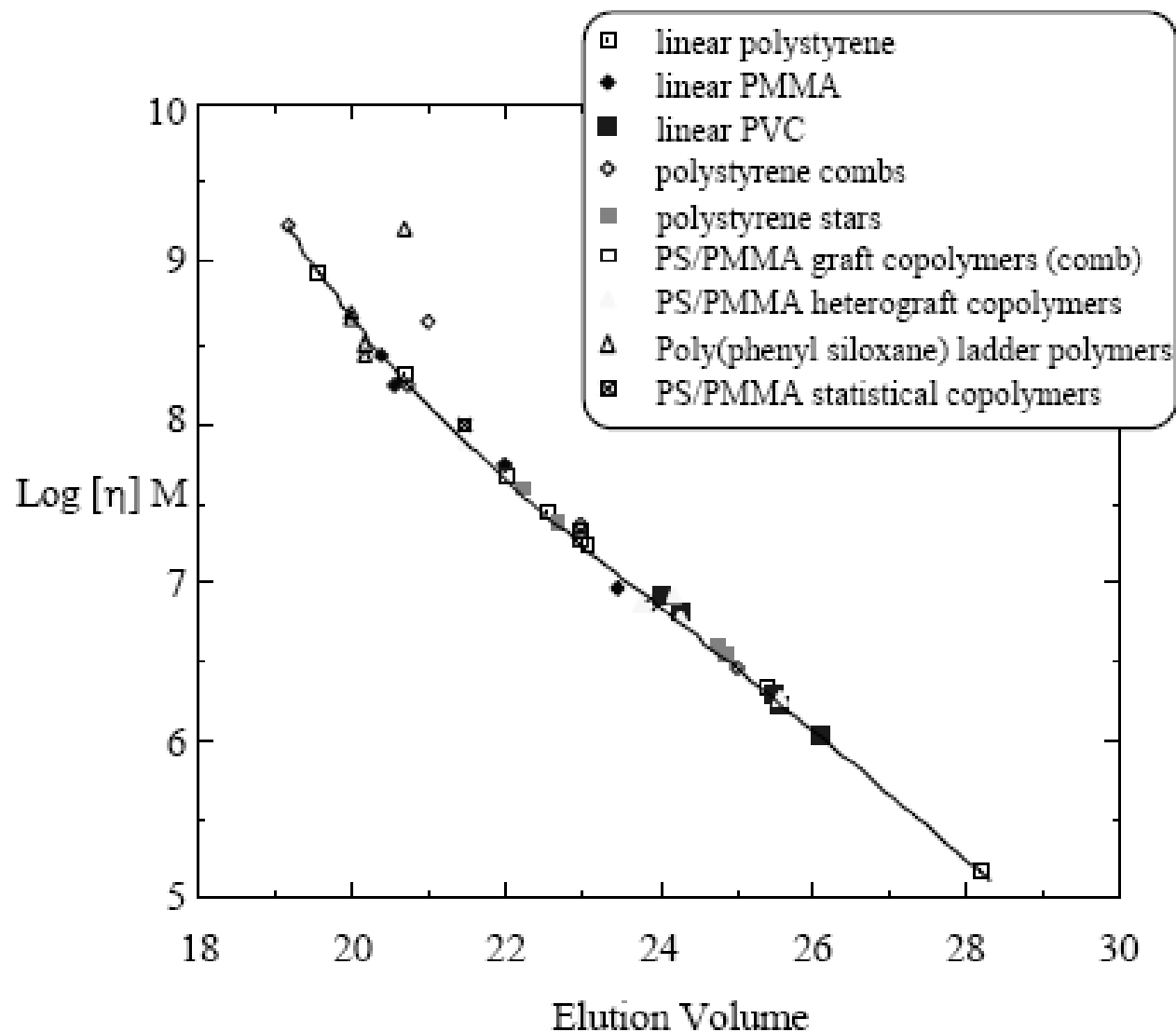
$V_h$  je razmjeran produktu graničnog viskoznog broja i molekulske mase,  **$[\eta] \cdot M$** .

Kalibracija pri kojoj se primjenjuje hidrodinamički volumen kao opći parametar separacije naziva se **univerzalna kalibracija**.

Smatra se da **molekule jednakog hidrodinamičkog volumena imaju jednak volumen eluiranja**, te se može primjeniti zajednička, univerzalna baždarna krivulja, oblika:

$$\log(M \cdot [\eta]) = C_0 + C_1 \cdot V_e + C_2 \cdot V_e^2 + C_3 \cdot V_e^3 + L$$

Međutim, **navedena pretpostavka vrijedi tek ako nije djelatan nijedan drugi mehanizam separacije osim isključenja po veličini (SEC)**.



A universal calibration plot of  $\log [\eta]M$  vs elution volume for various polymers.  
Redrawn from the data of Z. Grubisic, P. Rempp and H. Benoit.



# Realna kromatografija na propusnom gelu

Pretpostavka da se polimerne molekule separiraju na poroznom gelu samo zbog razlike u veličini idealizirana je slika.

U realnim uvjetima, međudjelovanja polimernog uzorka, stacionarne faze (otapala i/ili eluensa) unutar pora gela, te poroznog gela ne mogu se opisati samo jednim mehanizmom, već **superponiranjem različitih, sekundarnih mehanizama na mehanizam isključenja po veličini.**

U realnom kromatografskom sustavu dolazi do **privlačenja** ili **odbijanja otopljenog polimera** od gel-matrice, što utječe na oblik i položaj kromatograma, kojeg treba prevesti u raspodjelu molekulskih masa.

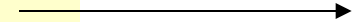
Prilikom obrade rezultata realne gel-kromatografske metode posebnu pozornost treba obratiti na **odnos polarnosti** svih komponenteata u sustavu, tj. gel-matrice, polimera i otapala/eluensa.

**Razlike u polarnosti komponenata imaju veliki utjecaj na pomake krivulja eluiranja prema manjim ili većim vremenima zadržavanja u koloni.**

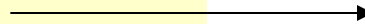
Nepolarni gel  
Nepolarni polimer  
Polarno otapalo



Povećanje  $V_e$



Netočne krivulje  
eluiranja  
(nije prema SEC)



Netočna raspodjela  
molekulnih masa

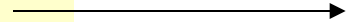


Premali prosjeci molekulnih masa

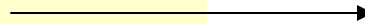
Nepolarni gel  
Polarni polimer  
Polarno otapalo



Smanjenje  $V_e$



Netočne krivulje  
eluiranja  
(nije prema SEC)



Netočna raspodjela  
molekulnih masa



Preveliki prosjeci molekulnih masa

