

Grzegorz BOCZKAJ<sup>\*,1</sup>, Anna FOKT, Malwina MOMOTKO<sup>1</sup>, Marian KAMIŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,

\*Autor do korespondencji, e-mail: grzegorz.boczka@gmail.com

## Zastosowania chromatografii wykluczania (SEC) w analityce technicznej i preparatyce – część I-sza.

**Streszczenie:** W pracy scharakteryzowano założenia teoretyczne oraz mechanizm rozdzielania w warunkach chromatografii wykluczania (SEC). Przeanalizowano wady i zalety tej techniki rozdzielania. Przedstawiono przegląd zastosowań obejmujący wykorzystanie SEC w analityce technicznej oraz w preparatyce. SEC w warunkach liofilowych znajduje zastosowanie do rozdzielania mieszanin polimerów t.j. polistyren, polibutadien, poliizopren, poli(dimetylosiloksan), poliamidy (np. nylon 6), poliakrylonitryl, poliolefiny, poli(alkohol winylowy), polichlorek winylu. W warunkach niewodnych rozdzielaniu ulegają także substancje nisko-, średnio- i wysokocząsteczkowe, takie ropy naftowa, oleje, asfalty, smoły, żywice. Główne zastosowania dla mieszanin substancji niskocząsteczkowych to rozdzielanie sacharydów, tłuszczów (grupowo na TAG, DAG, MAG i WKT), środków powierzchniowo czynnych, dodatków w polimerach, antybiotyków, węglowodorów aromatycznych. W warunkach hydrofilowych rozdzielaniu ulegają bardzo polarne polimery, biopolimery polisacharydy, białka, nukleotydy, czasami także w połączeniach z substancjami chemicznymi o niższej polarności, rozpuszczalnymi w wodzie. W drugiej części pracy opisane zostaną specyficzne zastosowania SEC w rozdzielaniu wielowymiarowym oraz preparatyce.

**Słowa kluczowe:** chromatografia wykluczania, chromatografia żelowa, zastosowanie chromatografii, asfalteny, rozkład masy cząsteczkowej

## Applications of Size Exclusion Chromatography (SEC) in technical analytics and preparative scale separations – I-st part.

**Abstract:** The paper describe the theoretical basis and the separation mechanism in size exclusion chromatography (SEC). Advantages and disadvantages of the process are highlighted. This work contain a review of applications in technical analytics and preparative separations. SEC in lipophilic conditions is used for separation of polymer mixtures including polystyrene, polybutadiene, polyisoprene, poly (dimethylsiloxane), polyamides (eg. nylon 6), polyacrylonitrile, polyolefins, poly (vinyl alcohol), polyvinyl chloride. In non-aqueous conditions also other mixtures can be separated including low-, medium- and high-molecular components such as crude oil, oils, bitumen, tar, resins. Main applications regarding to low-molecular substances include separations of saccharides, fats (group-type separation as TAG, DAG, MAG and FFA), surfactants, polymer additives, antibiotics, aromatic hydrocarbons. In hydrophilic SEC conditions a mixtures containing polar polymers, biopolymers as polysaccharides, proteins, nucleotides sometimes also with connection with other low polarity chemical substances soluble in water. The second part of this paper will include a specific applications of SEC in multidimensional and preparative separations.

**Key words:** size exclusion chromatography, gel permeation chromatography, application of chromatography, asphaltene, molecular weight distribution

## Użyte skróty/ Used Abbreviations

Oznaczenie/skrót	nazwa polska	nazwa angielska
Å	Angstrom	Angstrom
ASTM	A amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów	American Society for Testing and Materials
ACN	Acetonitril	Acetonitrile
BHT	2,6-ditert-butylo-4-hydroksytoluen	2,6-ditert-butylo-4-hydroksytoluene
DVB	Diwinylobenznen	Divinylbenzene
DAG	Diacylglicerole	Diacylglycerols
GFC	Chromatografia sączenia molekularnego	Gel Filtration Chromatography
DMF	Dimetyloforamid	Dimethylformamide
DMSO	sulfotlenek dimetylu	Dimethyl sulfoxide
DVB	Diwinylobenznen	Divinylbenzene
GPC	Chromatografia żelowa	Gel Permeation Chromatography
M	Masa molowa	Molecular Mass
HFIP	Heksafluoroizopropanol	Hexafluoroisopropanol
HPMCP	Ftalan hydroksypropylometylocelulozy	hydroxypropylmethylcellulose phthalate
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa	High Performance Liquid Chromatography
HPSEC	Wysokosprawna chromatografia wykluczania	High Performance Size Exclusion Chromatography
IR	Podczerwień	Infrared
LALLSD	Laserowy detektor światła rozproszonego dokonujący pomiaru pod małą ilością kątów	Low Angle Laser Light Scattering Detector
LC	Chromatografia cieczowa	Liquid Chromatography
LMWH	Heparyny o niskiej masie cząsteczkowej	Low Molecular Weight Heparins
LLSD	Laserowy detektor światła rozproszonego	Laser Light Scattering Detector
mAb	Przeciwciała monoklonalne	Monoclonal Antibodies
MAG	Monoacyloglicerole	Monoacylglycerol
MALLSD-	Laserowy detektor światła rozproszonego dokonujący pomiaru pod wieloma kątami	Multi Angle Laser Light Scattering Detector
Mm	Masa molowa	Molecular Mass
Mn	Liczbowo średnia masa cząsteczkowa	Number-Average Molecular Weight
Mw	Wagowy średni ciężar cząsteczkowy	Weight-Average Molecular Weight
NMP	N-metylopirolidon	N-methylpyrrolidone
PDI	Wskaźnik polidispersyjności	Polydispersity index
PEG	Glikol polietylenowy	Polyethylene glycol
PEO	Tlenek polietylenu	Polyethylene oxide
PVP	Poliwinylopirolidonu	Polyvinylpyrrolidone,
RI (RID)	Detektor refraktometryczny	Refractive Index Detector
SEC	Chromatografia wykluczania	Size Exclusion Chromatography
TAG	Triacyloglicerole	Triacylglycerols
TCB	1,2,4-trichlorobenzen	1,2,4-trichlorobenzene
THF-	Tetrahydrofuran	Tetrahydrofuran
TMS	Trimetylosilil	Trimethylsilyl
UV	Ultrafiolet	Ultraviolet
WKT	Wyższe kwasy tłuszczowe	Higher fatty acids

## 1. WSTĘP (Introduction)

Techniki rozdzielania we współczesnej analityce technicznej stanowią podstawowe źródło identyfikacji związków chemicznych. Zapewniają rozdzielanie i izolację substancji chemicznych w postaci czystej z ich mieszanin. W połączeniu z odpowiednią metodą detekcji umożliwiają charakterystykę mieszaniny pod względem ilościowym i jakościowym. Techniki wykorzystywane do rozdzielania wykorzystuje się także w preparatyce. Preparatyka polega na wydzielaniu większych ilości frakcji zawierających wybrane związki. W przypadku technik preparatywnych i analitycznych mechanizm rozdzielania przebiega w identyczny sposób, różnice wynikają ze skali rozdzielania tzn. rozmiarów kolumny, wielkości przepływów oraz ilości i stężenia dozowanej mieszaniny. W wyniku pojedynczej analizy chromatograficznej można uzyskać informacje na temat składu i właściwości danej próbki. Stosując chromatografię cieczową można dokonać analizy około 80% znanych związków chemicznych [1].

Chromatografia wykluczania to jedna z odmian chromatografii cieczowej. Charakteryzuje się szerokim zastosowaniem w analizie i preparatyce związków wielkocząsteczkowych. Jest jedną ze starszych technik analitycznych, w której w dalszym ciągu ma miejsce intensywny rozwój. Technikę tą charakteryzuje szeroki

zakres zastosowań. Umożliwia wyznaczenie masy cząsteczkowej oraz jej rozkładu, często niezbędnej informacji do poznania właściwości fizykochemicznych polimerów oraz biopolimerów. Dzięki tej technice, można oznaczyć również dodatki uszlachetniające oraz zanieczyszczenia występujące w polimerach, olejach, tłuszczach, żywności i kosmetykach. W skali preparatywnej umożliwia otrzymywanie frakcji polimerów i biopolimerów m.in. z materiałów biologicznych, biochemicznych, mikrobiologicznych, a także przygotowanie próbek do badań. Reasumując wymienione zastosowania technika ta jest niezbędna w wielu branżach przemysłowych takich jak przemysł farmaceutyczny, spożywczy, tworzyw sztucznych [2].

Celem niniejszej pracy jest przybliżenie zasady rozdzielania, techniką chromatografii wykluczania. Przegląd zastosowań ma wykazać, jak ważną rolę w analityce i preparatyce pełni ta technika. W pracy opisano sposób postępowania w przypadku podstawowych analiz wykonywanych opisywaną techniką.

## **2. Chromatografia wykluczania (SEC) Size Exclusion Chromatography (SEC)**

### **2.1. Wprowadzenie (Introduction)**

Podstawowym celem i zastosowaniem chromatografii wykluczania (ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) jest zapewnienie informacji dla konkretnego materiału polimerowego dotyczącej rozkładu masy molekularnej. Cząsteczki można rozdzielić względem masy cząsteczkowej, ponieważ średni czas przebywania danej cząsteczki (zależny od współczynnika dyfuzji) w porach zależy od jej wielkości.

Nazwa SEC jest aktualnie głównie stosowaną dla tej techniki oraz będzie używana w tej pracy. Znane jest także określenie dawniej stosowane - chromatografia żelowa (ang. *Gel permeation chromatography*, GPC). Kolejnym określeniem opisywanej techniki chromatograficznej jest chromatografia sączenia molekularnego (*Gel Filtration Chromatography*, GFC). Pojęcie "żel" powszechnie kojarzy się z użyciem sztywnych lub półsztywnych żeli organicznych jako fazy stacjonarnej. W chromatografii wykluczania dotyczy to zarówno żeli organicznych jak i związków nieorganicznych. W praktyce, powyższe sposoby nazywania tej techniki stosowane są do dnia dzisiejszego zamiennie [3].

SEC jest jedną z ważniejszych technik rozdzielania. Powszechnie stosuje się ją do charakteryzowania polimerów. Chromatografia wykluczania prawie całkowicie zastępuje tradycyjne metody określania masy cząsteczkowej, takie jak osmometria, ultrawirowanie, a pomiar wiskozymetryczny i refraktometryczny prowadzone są głównie w połączeniu z tą techniką. Zalety SEC obejmują względną prostotę, uniwersalność oraz zdolność do określenia całkowitego rozkładu masy cząsteczkowej. Chromatografia wykluczania odgrywa ważną rolę w rozdzieleniu i charakteryzowaniu białek i polimerów. Technika ta w połączeniu z odpowiednią detekcją umożliwia stosunkowo szybką analizę [4].

### **2.2. Charakterystyka techniki chromatografii wykluczania (Description of Size Exclusion Chromatography)**

#### **2.2.1. Założenia teoretyczne i opis zjawisk w SEC (Theoretical Assumption and SEC phenomena description)**

W warunkach chromatografii wykluczania wykorzystuje się zróżnicowanie drogi i czasu dyfuzji podczas, którego przez pory przenikają cząsteczki o zróżnicowanej wielkości i masie cząsteczkowej. Przeplývają one przez pory, które znajdują się wewnątrz ziaren wypełnienia kolumny. Ważne jest, aby wyeliminować oddziaływania sorpcyjne między powierzchnią wypełnienia kolumny i cząsteczkami rozdzielanych substancji, tak by mechanizm rozdzielania był termodynamicznie prosty. Warunki SEC umożliwiają powiązanie wartości logarytmu masy cząsteczkowej rozdzielanych cząsteczek z objętością elucji z kolumny w postaci prostej korelacji liniowej [5]. Kolumny są wypełnione cząsteczkami z tworzywa porowatego, ziarna wypełnienia mają średnicę ok. 5 do 10 mikrometrów. Do wnętrza porów mogą dyfundować cząsteczki badane i cząsteczki eluentu. Faza ruchoma wypełnia pory i przestrzeń między nimi. Próbką wstrzykiwana jest w postaci rozcieńczonego roztworu w tym samym rozpuszczalniku, który stanowi fazę ruchomą. Cząsteczki są wmywane w kierunku wylotu kolumny wraz z eluentem w określony sposób, który jest monitorowany „online” przez detektor. Cząsteczki o rozmiarach większych niż średnica porów wypełnienia są wykluczane. Nie penetrują one ziaren wypełnienia i jako pierwsze opuszczają kolumnę. Kolejno eluowane są cząsteczki o pośrednich wielkościach. Długość czasu ich przebywania w porach wypełnienia zależy od ich promienia hydrodynamicznego, a także jest bezpośrednio związana z wielkością i kształtem cząsteczek. Analogicznie, cząsteczki o średnicach dużo mniejszych niż pory wypełnienia penetrują wewnątrz porów i w ten sposób są zatrzymywane na dłuższy czas - przez co są eluowane jako ostatnie. Cząsteczki, które wnikają do wszystkich porów oraz nie wykazują żadnych oddziaływań sorpcyjnych z fazą stacjonarną są eluowane z wartością tzw. objętości martwej kolumny. Cząsteczki wykazujące oddziaływania sorpcyjne z fazą stacjonarną są eluowane z objętością elucji wyższą, niż wartość objętości martwej [6].

Objętość elucji cząsteczek wykluczanych służy do określenia objętości przestrzeni międzyziarnowej w kolumnie oraz tzw. porowatości. Cząsteczki wykluczane posiadają bardzo wysokie wartości promienia hydrodynamicznego, więc nie są w stanie wnikać do porów i przebywają tylko w przestrzeni międzyziarnowej. Zarówno dla wykluczanych cząsteczek jak i najmniejszych (które wnikają do wszystkich porów) nie można scharakteryzować rozkładu masy. Dla najmniejszych cząsteczek można jedynie zastosować inną kolumnę lub szeregowo połączony zestaw kolumn [7].

Zasada opisana powyżej jest ogólnie znana i przyjęta jako główny mechanizm rozdzielania zwany wykluczeniem sterycznym. Poza wykluczeniem sterycznym wyróżnia się inne mechanizmy rozdzielania, które mogą odgrywać rolę w określonych warunkach: ograniczona dyfuzja oraz rozdzielanie podczas przepływu kapilarnego.

Mechanizm rozdzielania ograniczonej dyfuzji opiera się na założeniu, że czas potrzebny cząsteczką by dyfundować w głąb porów jest porównywalny z czasem pobytu w danej strefie kolumny. W takim przypadku głębokość przenikania jest regulowana przez współczynnik dyfuzji, który jest pośrednio związany z wielkością cząsteczki. Duże cząsteczki wnikają powoli, a zatem nie pozostają wystarczająco długo, by przeniknąć do całej dostępnej objętości. Rozdzielanie przez ograniczoną dyfuzję może mieć miejsce głównie przy rozdzielaniu małych cząsteczek.

Rozdzielanie podczas przepływu (chromatografia hydrodynamiczna) opiera się na idei strumienia przepływającego przez wąską kapilarę, w której występuje paraboliczny profil prędkości przepływu cieczy. Kolumnę wypełniają małe stałe nieporowate cząstki, które tworzą system wąskich „naczyn włosowatych”. Dla każdej rozdzielanej substancji chemicznej objętość wykluczania zależy od jej wymiaru geometrycznego i odległości od ścianek. Duże cząsteczki częściej występują bliżej środka kapilary i w związku z tym przepływają szybciej niż mniejsze cząsteczki, które mogą być usytuowane blisko ściany, gdzie przepływ jest powolny. Rozdzielenie mechanizmem przepływu kapilarnego może odbywać się w obszarze bardzo wysokich mas cząsteczkowych [5]. W SEC podział substancji rozpuszczonej między dwiema fazami jest kontrolowany wyłącznie przez entropię [3]. Liczba sposobów, w których poszczególne cząsteczki mogą zajmować przestrzeń wewnątrz poru, jest określona przez ilość pozycji (reprezentujących poszczególne stany) w siatce, która charakteryzuje dany por. Mniejsza cząsteczka jest utrzymywana dłużej w porach, ponieważ posiadają one większą liczbę prawdopodobnych stanów (i dlatego posiada większą entropię). Twierdzi się również, że chromatografia wykluczania jest techniką, w której efekt rozdzielczy jest niezależny od temperatury. W rzeczywistości jednak temperatura ma pośredni wpływ na rozdzielanie w SEC, poprzez jej wpływ na lepkość roztworów polimerowych [3].

Należy podkreślić, że w chromatografii wykluczania nie mogą zachodzić żadne chemiczne, ani fizyczne oddziaływania pomiędzy fazą stacjonarną, a analizowanymi substancjami. Prowadzą one do obniżenia sprawności kolumny. W przeciwieństwie do innych rodzajów chromatografii, w chromatografii wykluczania istnieje górny limit czasu retencji, przy założeniu braku zjawisk typu adsorpcja, rozpuszczanie. Dzieje się tak ponieważ nie ma takich cząsteczek, które pozostawałyby dłużej w kolumnie od cząsteczek całkowicie penetrujących fazę stacjonarną.

### **2.2.2. Rodzaje chromatografii wykluczania (Types of SEC)**

Chromatografia wykluczania może być wykonywana w dwóch różnych układach. Rozdzielanie może odbywać się w warunkach liofilowych (niewodnych) oraz w warunkach hydrofilowych (wodnych). W obydwu przypadkach stosuje się różne eluenty, fazy stacjonarne i rozdziela różne mieszaniny. Głównie w przypadku warunków wodnych stosuje się dodatki do eluentu. Warunki liofilowe stosuje się do rozdzielania nisko i średnio polarnych polimerów, natomiast hydrofilowe dla wysoko polarnych polimerów- polisacharydów, nukleotydów, białek i biopolimerów.

Istotne jest użycie odpowiednich faz ruchomych i stacjonarnych. Fazy stacjonarne nie mogą wchodzić w reakcje z analizowaną substancją. Sorbenty zbudowane są z żeli polimerowych lub nieorganicznych. Żele nieorganiczne stosuje się głównie w warunkach wodnych.

Rozpuszczalnik do SEC musi być „kompatybilny” z materiałem wypełniającym kolumny i musi tworzyć stabilne roztwory zapobiegające wytrącaniu polimeru z roztworu przed lub w trakcie analizy. Lepkość „dobrego” rozpuszczalnika powinna być niska, ponieważ wraz ze wzrostem lepkości efektywność rozdzielania zmniejsza się i zwiększa się opór przepływu. Jednakże, nie zawsze może być to osiągnięte ze względu na trudną rozpuszczalność niektórych polimerów a danym rodzaju rozpuszczalników. Rozpuszczalniki stosowane w technice SEC powinny mieć niską toksyczność, być niepalne, tanie, stabilne, nie korozyjne w stosunku do układu chromatograficznego i kolumny. Zazwyczaj, jest to niemożliwe, aby rozpuszczalnik spełniał wszystkie wymagania. Rozpuszczalniki o czystości stosowanej do *wysokosprawnej chromatografii cieczowej* (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) nie są konieczne, a czystość powyżej 99% jest dla większości zastosowań SEC wystarczająca [7,8].

### 2.2.2.1. Warunki liofilowe (Lyophilic conditions)

- Fazy stacjonarne

Obecnie na rynku dostępnych jest wiele różnych faz stacjonarnych. Pierwszą fazę stacjonarną do rozdzielania polimerów hydrofobowych opracował Moore The Dow Chemical Company- poprzez sieciowanie diwinylobenzenu (DVB), który nadal jest bardzo często stosowanym sorbentem. Powstałe porowate żele mogły być syntezowane z różną średnią wielkością porów. Następnie powstała skomercjalizowana linia tego produktu – „Styragel”. Jedną z kluczowych cech, które uczyniły „Styragel” szeroko stosowaną fazą stacjonarną jest ich minimalne oddziaływanie z polimerami organicznymi. Pojawiły się jednak mechaniczne ograniczenia w jej stosowaniu. Usieciowany polistyren będący żelem polimerowym jest powszechnie wykorzystywany do rozdzielania polimerów w niewodnych warunkach. Bardzo popularne są sorbenty zbudowane z kopolimeru styrenu oraz opisanego wcześniej diwinylobenzenu (SDVB). Mają różne nazwy firmowe tj. Poragel, Lichrogel, TSK-gel od G-1000 do G-7000.

W warunkach niewodnych stosuje się także porowatą krzemionkę. Jednak, pomimo większej stabilności od żelów polimerowych na jej powierzchni następuje niepożądana adsorpcja. Zmniejszenie wielkości porów mogło poprawić wydajność rozdzielania. W związku z tym, na rynku pojawiła się faza stacjonarna wprowadzona przez firmę Waters pod nazwą handlową  $\mu$ Porasil. Wytrzymałość i sztywność cząstek pozwoliła wytrzymać wysokie naprężenia ścinające związane z szybkością przepływu fazy ruchomej. Do niepolarnego rozdzielania stosuje się także powszechnie dezaktywowane silanami o krótkim łańcuchu alifatycznym. W 2011 roku pojawiły się kolumny o modyfikowanej powierzchni poprzez silanizację z trimetylosililem (ang. *Trimethylsilyl*, TMS). Główną zaletą tych cząstek jest obniżenie kwasowości grup silanolowych poprzez ich dezaktywację [9,10].

Poza wymienionymi poprzednio wyróżnia się także żele dekstranowe, agarozowe oraz akrylowe i metakrylowe, które stosowane są również w warunkach wodnych.

- Fazy ruchome

Tetrahydrofuran (THF), toluen, chloroform, dichlorometan, N-metylo-pirolidon stanowią typowe rozpuszczalniki do SEC. THF stanowi najczęściej organiczny rozpuszczalnik do SEC w warunkach niewodnych, ponieważ rozpuszcza wiele polimerów syntetycznych. Nie rozpuszcza biopolimerów, ale także niektórych ważnych syntetycznych polimerów: poliamidów, poliolefin, poli(tereftalanu etylenu) i poli(alkoholu winylowego). THF ma właściwości higroskopijne, poza tą wadą posiada wiele zalet w świetle zastosowania do SEC. Spełnia on takie warunki dobrego rozpuszczalnika jak niska lepkość, niska wartość zakresu absorpcji („cut-off”) dla promieniowania ultrafioletowego (ang. *Ultraviolet*, UV) oraz niska cena. Inne niekorzystne właściwości to tworzenie z powietrzem mieszaniny wybuchowej, oraz tworzenie wybuchowych nadtlenków – co ma istotne znaczenie w przypadku odzysku rozpuszczalników po analizie, oraz może mieć niekorzystny wpływ na przypadku rozdzielania substancji podatnych na utlenianie. Mimo potencjalnego zagrożenia można bezpiecznie wykorzystywać THF bez specjalnych laboratoryjnych środków ostrożności. Utlenianiu można skutecznie zapobiegać poprzez zastosowanie 0,025% 2,6-ditert-butylo-4-hydroksytoluenu (BHT).

Do badań poli(dimetylosiloksanu), jako eluent stosuje się toluen. Toluen jest również tradycyjnym rozpuszczalnikiem SEC, który rozpuszcza niepolarne i średnio polarne polimery, takie jak polistyren, polibutadien oraz poliiizopren. Zalety tego rozpuszczalnika to stosunkowo niską toksyczność i doskonałą stabilność. Jednak wadą jest brak możliwości stosowania z detekcją UV.

Chloroform posiada kilka cennych zalet jak wysoką zdolność rozpuszczania różnych polimerów, brak absorpcji światła dla detekcji UV czy niepalność. Jednak wady jakie posiada decydują o tym, iż jest używany tylko wtedy, gdy nie ma innej alternatywy. Jest bardzo toksyczny i zarazem ma wysoką lotność. Posiada silnie żrące właściwości. Utlenianie prowadzi do powstawania niebezpiecznego fosgeny. Należy uwzględnić również wysoki koszt utylizacji odpadów. Poza opisanymi charakterystycznymi rozpuszczalnikami wyróżnia się także inne, opisane poniżej.

1,2,4-trichlorobenzen (ang. *1,2,4-trichlorobenzene*, TCB) to typowy rozpuszczalnik w SEC stosowany dla poliolefin w temperaturze powyżej 135°C. Rozpuszcza polistyren, a więc może być stosowany do kalibracji metodyki.

1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanol (ang. *Heksafluoroizopropanol*, HFIP) wykazuje silne oddziaływania wodorowe i zdolność do rozpuszczania wielu polimerów, w tym organicznych, nierozpuszczalnych w innych rozpuszczalnikach, takich jak poliamidy (np. nylon 6), poliakrylonitryl, polietylen. HFIP jest żrący. Stosowalność jego ogranicza wysoka cena, choć koszty mogą być w pewnym stopniu obniżone przez redestylację. Dodatek 0,1% trifluorooctanu sodu stosuje się do powstrzymania efektu powstawania polielektrolitów analizowanych polimerów. HFIP nie rozpuszcza polistyrenu, a więc w celu kalibracji kolumny stosuje się poli(metakrylan metylu). Jest idealnym rozpuszczalnikiem do pomiarów w SEC z użyciem laserowego detektora światła rozproszonego (ang. *Laser Light Scattering Detector*, LLS).

Kolejnym przykładem rozpuszczalnika w warunkach hydrofobowych, średnio polarnym jest dimetyloformamid (DMF), który zwykle stosuje się z dodatkiem 0,1% bromku litu. Rozdzielanie z użyciem

czystego rozpuszczalnika prowadzi do uzyskania niepoprawnej powierzchni piku. Jest dobrym rozpuszczalnikiem dla poliakrylonitrylu lub poli(alkoholu winylowego). Rozpuszcza polistyren.

N-metylopirolidon (NMP) to eluent który jest dobrą alternatywą dla rozdzielania polimerów, które nie rozpuszczają się w THF. Posiada pożądane właściwości, takie jak niska lotność, niska palność, stosunkowo niska toksyczność i zdolność do rozpuszczania wielu polimerów.

Sulfotlenek dimetylu (ang. *Dimethyl sulfoxide*, DMSO) to również rozpuszczalnik organiczny, który może być używany do polimerów, które są nierozpuszczalne w THF lub w innych rozpuszczalnikach organicznych. DMSO to najlepszy wybór dla żywic mocznika formaldehydu, które są nierozpuszczalne w większości innych rozpuszczalników. Może on być również stosowany do analizy skrobi.

Do rozpuszczalników, które mogą być stosowane w wysokich temperaturach (220°C) należy o-chloronaftalen [5].

W niektórych przypadkach wymagane jest zastosowanie dodatków do fazy ruchomej. Na przykład, 0,05M bromek litu dodaje się do średnio polarnych rozpuszczalników, takich jak DMF, NMP. Te rozpuszczalniki wykorzystywane są do analizy polimerów takich, jak poliuretany lub poliimidy. Podczas analizy w wysokiej temperaturze poliolefin, należy dodać około jeden gram przeciwutleniacza na 4 litry fazy ruchomej (np. TCB). Pomoże to zmniejszyć utlenianie próbki, znajdującej się w podajniku w wysokiej temperaturze, przed dozowaniem. Dodatek do eluentu substancji o mniejszej masie cząsteczkowej jak np. sole powstrzymuje powstawanie agregatów, oddziaływań z fazą stacjonarną, a także oddziaływań międzycząsteczkowych.

Jeżeli w substancji rozdzielanej są obecne grupy funkcyjne (np. -COOH), dodanie do fazy ruchomej dodatku, który zawiera również niektóre grupy funkcyjne, zapewnia bezawaryjną pracę. Zapobiega to zniszczeniu kolumny poprzez zmianę chemizmu powierzchni. Typowymi dodatkami są: alkohole (metanol i etanol) zawierające grupę -OH, dietyloaminy zawierające grupę -NH<sub>2</sub>, kwas octowy lub kwas trifluoroctowy zawierające grupę -COOH [11].

Rozpuszczalniki w warunkach niewodnych mają wpływ na trwałość chemiczną żelu. Rozpuszczalniki mogą powodować pęcznienie żelów. Stopień pęcznienia w różnych rozpuszczalnikach będzie zależeć od stopnia sieciowania żelu. Generalnie, nowoczesne fazy stacjonarne w SEC mogą być stosowane w szerokim zakresie rozpuszczalników organicznych, chociaż, w zależności od procesu produkcyjnego te właściwości mogą się różnić. W związku z tym, zawsze zaleca się, aby stosować wytyczne producenta co do kompatybilności żelu z rozpuszczalnikiem. W przypadku dostarczania do kolumny jednego rozpuszczalnika i następnie drugiego, ważne jest sprawdzenie, mieszalności obydwu rozpuszczalników [3].

Podsumowując, na opisanych powyżej fazach stacjonarnych i ruchomych, charakteryzujących warunki liofilowe można rozdzielać głównie nisko i średni polarne polimery. Specyfikacje kolumn do SEC podają kompatybilne rozpuszczalniki organiczne oraz mieszaniny/ grupy związków, które w danych warunkach ulegają rozdzielaniu. Są to takie polimery jak polistyren, polibutadien, poliizopren, poli(dimetylosiloksan), poliamidy (np. nylon 6), poliakrylonitryl, poliolefiny, poli(alkohol winylowy), polichlorek winylu. W warunkach niewodnych rozdzielaniu ulegają także substancje nisko-, średnio- i wysokocząsteczkowe, takie ropa naftowa, oleje, asfalty, smoły, żywice. Substancje niskocząsteczkowe: sacharydy, tłuszcze, środki powierzchniowo czynne, dodatki w polimerach, antybiotyki, węglowodory aromatyczne.

**Tabela 1.** Podsumowanie względem polarności niektórych faz stacjonarnych, ruchomych oraz rozdzielanych mieszanin w warunkach hydrofobowych.

**Table 1.** Summary of SEC phases and it's applications.

Polarność	Nisko-polarne	Średnio-polarne
Faza stacjonarna	SDVB	Akrylowa/metakrylowa; Poliestrowa
Eluent	THF, toluen, TCB	DMF, DMSO, NMP
Rozdzielane substancje	Polistyren, poliolefiny, polichlorek winylu, żywice itp.	Poliuretany, poliimidy, celuloza, skrobia, itp.

#### 2.2.2.2. Warunki hydrofilowe (Hydrophilic conditions)

- Fazy stacjonarne

Pierwsze fazy stacjonarne polimerowe zostały opracowane przede wszystkim do analizy naturalnych polimerów i zostały one oparte na lekko usieciowanych polimerach np. dekstranu czy agarozy. Natomiast wypełnienia kolumn dla wysokosprawnej SEC w warunkach wodnych zostały opracowane tak, aby były sztywne i mogły tolerować szeroki zakres pH, zachowując funkcje podobne do miękkich żeli.

Chromatografia żelowa w wodnych rozpuszczalnikach odbywa się na półsztywnych i niesztynnych żelach. Związki o masie sięgającej kilkuset tysięcy mogą być rozdzielane na fazach stacjonarnych

zbudowanych z usieciowanego dekstranu (np. „Sephadex”). Stosuje się także usieciowany poliakryloamid (np. „Bio-Gel-P”) czy żele akrylowe i metakrylowe. „Sephacrose” to wypełnienie składające się z agarozy. Agarozę rozdziela także związki o większej masie cząsteczkowej i tak samo jak w dwóch wcześniej wymienionych fazach, rozdzielanie tych związków odbywa się pod niskim ciśnieniem, aby nie „sprasować” żelu. W celu polepszenia rozdzielania związków o dużej masie, rozpuszczalnych w wodzie powstały żele o specjalnym zastosowaniu, głównie żele nieorganiczne. Wyróżnia się tutaj: żel krzemionkowy, szkło porowate, a także dezaktywowany żel krzemionkowy (dawniej dezaktywacja glikolem polietylenowym, obecnie głównie silanizowanie powierzchni sorpcyjnej). Jako fazę stacjonarną zaczęto stosować także delikatnie sulfonowany polistyren pod nazwą „Aquapak”. Specjalnie do charakterystyki białek pojawiły się skomercjalizowane przez firmę Waters Corporation kolumny SEC z użyciem diolu jako grupy funkcyjnej [12].

Idealne fazy stacjonarne dla wodnego SEC powinny być wysoce hydrofilowe. Wymagania te wynikają z natury polimerów przeznaczonych do analizy. Zarówno naturalne, jak i syntetyczne polimery rozpuszczalne w wodzie mogą być niejonowe (neutralne) lub jonowe (polielektrolity), hydrofilowe lub stosunkowo hydrofobowe. Polimerowy materiał fazy stacjonarnej, który nie jest wysoce hydrofilowy może wykazywać oddziaływania hydrofobowe ze składnikami próbki. Dodatkowo, naładowana powierzchnia materiału wypełnienia może powodować jonowe oddziaływania z polielektrolitami polimerów. W praktyce w warunkach wodnych, niektóre fazy stacjonarne wykazują pewien stopień hydrofobowości i ładunek jonowy. Zarówno jonowe, jak i hydrofobowe właściwości są niepożądane, ponieważ powodują one obniżenie zjawisk wykluczania. Producenci materiałów wypełniających kolumny dążą do minimalizacji takich oddziaływań, jednak mimo to niezbędna jest modyfikacja eluentu.

- Fazy ruchome:

Wybór eluentu jest zależny od rodzaju rozdzielanej próbki oraz od oddziaływań z fazą stacjonarną. Zakłada się, że eluent, który można stosować do rozdzielania na kolumnach jednego producenta, powinien nadawać się do rozdzielania z zastosowaniem kolumny innych producentów.

W związku z niekorzystnymi zjawiskami jak oddziaływania sorpcyjne i jonowe stosuje się dodatki do eluentów. Oddziaływania adsorpcyjne mogą być zauważalne przez takie zjawiska jak ostre czołowe krawędzie piku, mała powierzchnia piku, niska powtarzalność. Oddziaływanie jonowe zakłócające zjawisko wykluczania może być zauważalne dla niskich wartości objętości elucji. Podczas optymalizacji składu eluentu, powtarzalność chromatogramów jest wskaźnikiem określającym najlepszy zestaw warunków.

Do wodnych faz ruchomych zwykle stosuje się roztwory soli/bufory, które obniżają oddziaływania jonowe lub modyfikatory organiczne, które zmniejszają właściwości hydrofobowe w stosunku do eluentu.

W przypadku rozdzielania polimerów niejonowych czysta woda często może być stosowana jako eluent. Dla próbek jonowych zaleca się stosowanie soli lub buforu jako dodatku do eluentu. Solami powszechnie stosowanymi są siarczan sodu, azotan sodu i octan sodu. Siłę jonową można zmieniać w zależności od rodzaju próbki, lecz na ogół nie przekracza się stężeń 1,0 M. Bufory stosuje się aby kontrolować pH [11].

Polimery anionowe np. sole sodowe kwasu akrylowego można eluować stosując bufor o pH 7-9. Sól sodowa sulfonianu polistyrenu również jest polimerem anionowym, ale często nie wymywany w takich warunkach, gdyż wykazuje oddziaływania hydrofobowe. Można je zniwelować poprzez wprowadzenie niektórych modyfikatorów organicznych do fazy ruchomej. Metanol jest zalecanym modyfikatorem w przypadku stosowania jako fazę stacjonarną żelu z grupami –OH. Można także stosować inne rozpuszczalniki np. acetonitryl (ACN). Ważne jest, aby przestrzegać zaleceń producentów dotyczących stosowania rozpuszczalników organicznych w warunkach wodnych, ponieważ zły rozpuszczalnik może nieodwracalnie uszkodzić kolumnę.

Polimery kationowe można eluować stosując wyższe stężenia soli będących dodatkami (0,3-1,0M), a pH w zakresie 2-7. Jako dodatek stosuje się chlorek sodu, ale także kwas mrówkowy i kwas trifluoroctowy. Tak jak w przypadku anionowych polimerów, występowanie silnych oddziaływań hydrofobowych w próbce, wymaga dodania organicznych modyfikatorów fazy ruchomej.

W przypadku rozdzielania białek i peptydów podstawowym dodatkiem jest arginina. Arginina stabilizuje strukturę białek oraz zapobiega wzajemnym oddziaływaniom pomiędzy białkiem, a fazą stacjonarną. Jednym z ograniczeń argininy, jest możliwość pogarszania czułości detekcji w zakresie długości fali poniżej 220 nm [3]. W przypadku analizy agregatów białka za pomocą SEC wykorzystuje się odpowiednią fazę ruchomą. Nowością jest stosowanie lotnej fazy ruchomej: 20% ACN, 0,1% trifluoroctowego kwasu i 0,1 % kwasu mrówkowego lub wodorowęglanu amonu o pH=7. Wykorzystując taki eluent uzyskuje się powtarzalne wyniki rozdzielania agregatów, a przy tym możliwe jest sprzężenie SEC z spektrometrią mas (MS) [13].

Ważne jest, aby bufory fazy ruchomej, sole, i modyfikatory, posiadały wysoką czystość w celu zminimalizowania szumów chromatograficznych.

Podsumowując, w warunkach hydrofilowych rozdzielaniu ulegają bardzo polarne polimery, biopolimery polisacharydy, białka, nukleotydy, czasami także w połączeniach z substancjami chemicznymi o niższej polarności, rozpuszczalnymi w wodzie. Polimery mogą mieć postać jonową (kationowe i anionowe) lub niejonową.

Typowym polimerem kationowym rozdzielanym w warunkach wodnych jest poli-2-winylopirydyna. Z kolei polimerem anionowym np. sól sodowa kwasu akrylowego lub sulfonian sodowy. W warunkach wodnych

rozdziela się głównie związki polarne, na polarnych fazach stacjonarnych i ruchomych. Tabela 2 przedstawia w skrócie dopasowanie tych 3 elementów.

**Tabela 2.** Podsumowanie względem polarności niektórych faz stacjonarnych, ruchomych oraz rozdzielanych mieszanin w warunkach hydrofilowych.

Table 2. A comparison of SEC hydrophilic conditions.

Polarność	Bardzo polarne	Mniej polarne
Faza stacjonarna	Akrylowe/akrylowe z grupami -OH	Żel krzemionkowy, SiO <sub>2</sub> -diol
Eluent	Woda; pH od 1,5 do 13	Wodna z dodatkami; pH od 2 do 10
Substancje rozdzielane	Dekstran, PEG, PEO,	Polimery anionowe i kationowe, białka, peptydy

### 2.2.3. Metody detekcji (Methods of detection)

Szczegółowy opis metod detekcji w SEC będzie przedmiotem odmiennej pracy. Detektory są używane do monitorowania cząsteczek substancji rozpuszczonej w eluencie podczas rozdzielania. Do detekcji w SEC wykorzystuje się detektory czułe na zmianę stężenia oraz na masę cząsteczkową. Detektor spektrofotometryczny światła UV oraz podczerwieni (ang. Infrared, IR) mają sygnał proporcjonalny wyłącznie do stężenia próbki w rozpuszczalniku, pod warunkiem wykazywania absorpcji światła w zastosowanym zakresie. Sygnał detektorów refraktometrycznych (ang. *Refractive Index Detector*, R) oraz LLSD jest proporcjonalny do masy molowej i stężenia. Wiskozymetr to detektor proporcjonalny do iloczynu stężenia i masy cząsteczkowej do potęgi wykładnika Marka-Houwinka. Choć detektory stężenia mogą występować samodzielnie, detektory masy cząsteczkowej zapewniają przydatne informacje jedynie w zestawieniu z detektorem stężeniowym [14]. Ponieważ detektor RI ma właściwości najbardziej odpowiednie, aby być uniwersalnym detektorem jest on najczęściej używany do analizy syntetycznych polimerów. Detektor UV może być stosowany do związków zawierających wiązanie podwójne, sprzężone podwójne wiązanie, pierścień aromatyczny, grupę karbonylową -CO lub grupę nitrową -NO<sub>2</sub>. Jego zastosowanie w SEC jest ograniczone przez fakt, że wiele polimerów wykazuje słabą absorpcję światła UV. Stosowanie detektora UV do SEC jest również ograniczone tym, że część rozpuszczalników, w tym THF, ma wysoki „cut-off” w zakresie UV do 230 nm, w porównaniu z innymi rozpuszczalnikami używanymi w chromatografii cieczowej jak metanol lub acetonitryl. Detektor UV stosuje się do detekcji substancji zawierających polistyren i kopolimery styrenu, nitrocelulozę, żywice epoksydowe, żywice fenolowo-formaldehydowe, nienasycone żywice alkidowe, poliestry i białka. Zasada działania detektorów IR jest podobna do detektorów UV. Głównym ograniczeniem detektora IR w SEC jest to, że stosowane rozpuszczalniki jako fazy ruchome mają silną absorpcję przy długościach fali, które mogą być potencjalnie stosowane w celu monitorowania polimeru eluowanego z kolumny. Detektory IR obecnie znajdują zastosowanie głównie w przypadku rozdzielania poliolefin w TCB, gdzie detektor IR może być stosowany nie tylko do monitorowania stężenia, ale również w celu określenia chemicznej różnorodności kopolimerów polietylenu i rozgałęzień polietylenu. Detektory współczynnika załamania światła (refraktometryczne) mogą być stosowane do wykrywania wszystkich związków o niezerowym przyroście współczynnika załamania światła. Refraktometryczny indeks przyrostu (dn/dc) może być różny dla różnych polimerów. Możliwe są wartości ujemne, a wartości bliskie zeru zdarzają się raczej rzadko. W przypadku zerowego dn/dc odpowiedź detektora może być polepszona poprzez wybór innego rozpuszczalnika o innym współczynniku załamania światła. Dla związków o wysokiej absorpcji światła UV, takich jak te, które zawierają pierścienie aromatyczne, czułość detektora RI, może być znacznie mniejsza w porównaniu z detektorem UV [3].

W przypadku detektorów stężeniowych LLSD jest detektorem masy cząsteczkowej, który nie wymaga założenia dotyczącego składu i budowy próbki. Korzystając z detekcji za pomocą wielo-kątowego laserowego detektora światła rozproszonego (ang. *Multi Angle Light Scattering Detector*, MALLSD) możliwe jest uzyskanie kolejnej informacji - promienia cząsteczki. Otrzymana wartość jest bardzo precyzyjna ponieważ dokonuje się pomiaru światła rozproszonego pod różnymi kątami w zależności od wybranego modelu Wyatt Technology produkuje detektory MALLS dokonujące pomiaru pod 18 kątami. Laserowy detektor małego kąta światła rozproszonego (ang. *Low Angle Light Scattering Detector*, LALLSD) dokonuje pomiaru pod małą liczbą kątów. Jest to detektor rzadziej stosowany ponieważ dokonuje mniej precyzyjnego pomiaru, niż detektor MALLS. Detektor pomiaru lepkości (wiskozymetr) jest wrażliwy na masę cząsteczkową, ale tylko z użyciem metody uniwersalnego kalibrowania. Wymaga to użycia polimerów o znanej masie cząsteczkowej, takich jak polistyren. Wartości masy cząsteczkowej obliczone za pomocą detektora pomiaru lepkości są poprawne jeśli standardowy polimer i próbki przygotowane są według



uniwersalnej kalibracji. Dla liczb bezwzględnych, które nie wymagają kalibracji kolumny stosuje się rozpraszanie światła. Nowością jest połączenie detektorów pomiaru lepkości i RI. Za pomocą takiego połączenia, możliwe jest określenie konformacji, w tym obecności długołańcuchowych rozgałęzień oraz właściwości polimerów w roztworze [15].

#### 2.2.4. Zalety i ograniczenia SEC

Stosując GPC można ustalić kilka ważnych parametrów takich jak m.in. średni (wagowy, masowy, liczbowy) ciężar cząsteczkowy, czy rozkład masy cząsteczkowej polimeru. Wartości te są ważne, ponieważ wpływają one na wiele charakterystycznych właściwości fizycznych polimeru i wpływają na różnice w końcowym wykorzystaniu polimeru. Chromatografia wykluczania w swoim zastosowaniu posiada wiele zalet, ale także i pewne ograniczenia. Analizowane składniki próbki są dość łatwe do wykrycia. Jest to jedna z zalet zastosowania tej metody. W SEC dla większości próbek otrzymuje się wysoki sygnał z zastosowaniem detektora refraktometrycznego, pomimo stosunkowo niskiej czułości tego detektora. W chromatografii wykluczania cała próbka jest eluowana szybko, bez potrzeby elucji gradientowej lub innej skomplikowanej procedury. Świadczy to o kolejnej zaletce tej metody. Kolejną zaletą jest przewidywalny czas rozdzielania. Zazwyczaj początek oraz koniec elucji może być dość dokładnie przewidziany jeszcze przed rozdzielaniem. Wszystkie związki eluują pomiędzy objętością dla retencji  $t_{ex}$  (czas całkowitego wykluczenia) i  $t_0$  (czas martwy). Dlatego serie różnych próbek mogą być dozowane ze z góry ustalonymi seriami w czasie, bez zagrożenia, że piki z pierwszej analiz nałożą się z pikami z analizy kolejnej. Sprzyja to zautomatyzowanemu dozowaniu próbek. Przewidywalny czas rozdzielania w SEC oznacza mniej czasu spędzonego na oczekiwaniu na całkowite wyeluowanie nieznanej próbki. W chromatografii wykluczania stosunkowo łatwo można zidentyfikować nieznaną próbkę. Dzieje się tak ponieważ retencja jest ściśle związana z masą molową, a także przewidywalna dla związków o znanej strukturze. W przypadku SEC, inaczej niż w innych odmianach cieczowej chromatografii (ang. *Liquid Chromatography*, LC), objętość czasu retencji jest związana tylko z strukturą, a nie także z różnymi aspektami oddziaływań sorpcyjnych. Piątym z kolei pozytywnym aspektem zastosowania chromatografii żelowej jest brak chemicznych przemian podczas rozdzielania. Zazwyczaj brak oddziaływań sorpcyjnych sprawia, że jest to jedna z „łagodniejszych” technik rozdzielania. Kolejną zaletą wynika z właściwości fazy stacjonarnej stosowanej podczas opisywanej metody chromatograficznej. Przejawia się brakiem problemów z dezaktywacją. Kolumna nie ma skłonności do akumulowania nierozdzielanych związków, pochodzących z zanieczyszczonych rozpuszczalników i próbek. Zagrożeniem i ograniczeniem w SEC, jak w każdej innej LC, jest zatykanie spieków kolumny przez próbkę, która zawiera cząsteczki stałe. W związku z tym próbki przed wstrzyknięciem są filtrowane. Najbardziej poważną wadą jest ograniczona „pojemność” pików. Tylko kilka pików próbki może być zawarte na chromatografie w postaci rozdzielonej. Zazwyczaj chromatografia wykluczania jest niezdolna do rozdzielania kompleksów, wieloskładnikowych próbek bez wcześniejszej separacji innymi metodami. Kolejnym ograniczeniem SEC jest brak możliwości stosowania do próbek, których składniki mają podobny rozmiar. Problem pojawia się np. przy rozdzielaniu izomerów. Analiza dużych cząsteczek wymaga cierpliwości. Czas rozpuszczania ich jest długi i może trwać, w najgorszym przypadku, nawet do kilku tygodni. Rozpuszczalność takich cząsteczek zależy od szeregu parametrów, takich jak rodzaj rozpuszczalnika, masa cząsteczkowa, polidispersyjność [12].

### 3. Przegląd zastosowań SEC (Review of SEC applications)

Podczas analizy SEC połączonej z różnymi metodami detekcji można zmierzyć absolutny ciężar cząsteczkowy, rozkład masy cząsteczkowej, wielkość cząsteczki, generować informacje o strukturze wielkocząsteczkowej, budowie, agregacji i rozgałęzieniu.

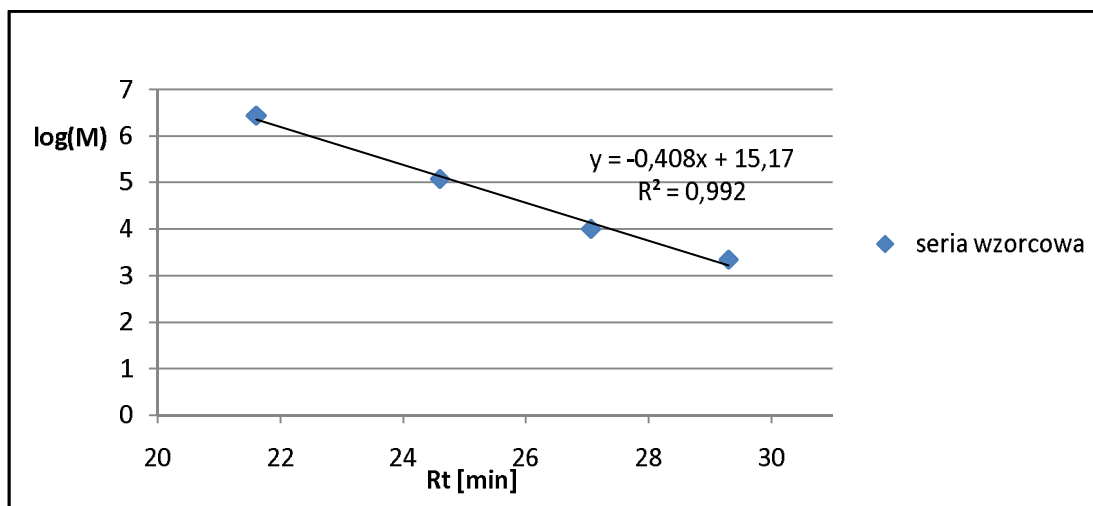
Stosując SEC naukowcy mogą charakteryzować cząsteczki, takie jak polimery syntetyczne, naturalne, związki pochodzenia biologicznego. Dla wszystkich cząsteczek oznaczane parametry mają niezliczone zastosowania. Dzięki tej technice można kontrolować wytrzymałość i wydajność otrzymywania polimeru oraz jego polidispersyjność. SEC ma zastosowanie także w przemyśle farmaceutycznym, gdzie producenci farmaceutyczni mogą analizować i dostosowywać „działanie” niektórych produktów oraz w przemyśle spożywczym ułatwiając analizę wydajności i jakości produktów.

- **Rozkład masy cząsteczkowej**

Określanie masy cząsteczkowej i jej rozkładu jest podstawowym i szeroko stosowanym zastosowaniem SEC. Za pomocą tej techniki wyznaczyć można liczbową średnią masę cząsteczkową ( $M_n$ ), wagowy średni ciężar cząsteczkowy ( $M_w$ ) i wskaźnik polidispersyjności (PDI). W warunkach analitycznych metodą SEC rozdzielać można oligomery, związki małych cząsteczek, polimery syntetyczne i pochodzenia naturalnego. Zazwyczaj, substancje będące polimerami syntetycznymi oraz pochodzenia naturalnego nie składają się z dużej liczby identycznych cząsteczek. Są to substancje polidispersyjne, składające się z

cząstek o różnej długości (różnej masie cząsteczkowej), zawierających różną liczbę jednostek. Podczas badania związków wielocząsteczkowych ważne są obliczone statystycznie informacje o średnich wartościach i odchyleniach od tych wartości. Poldispersyjność próbki rośnie wraz z rozszerzeniem rozkładu masy cząsteczkowej. Przed interpretacją chromatogramu, pod kątem masy cząsteczkowej próbki i jej rozkładu należy wykonać kalibrację metody. Kalibracja polega na określeniu zależności między objętością elucji, a masą cząsteczkową. Krzywą kalibracyjną można przygotować na kilka sposobów, w zależności dla jakich związków ma być użyta. Wyróżnia się cztery powszechnie stosowane metody kalibracji. Trzy z nich można stosować w połączeniu z pojedynczym detektorem, są to: bezpośrednia kalibracja za pomocą frakcji wąskodispersyjnych, kalibracja za pomocą polimerów poldispersyjnych oraz standardowa kalibracja z uniwersalnymi parametrami. Czwarty typ kalibracji SEC wymaga użycia dwóch detektorów, połączonych szeregowo. Dodanie do SEC drugiego detektora czułego na masę cząsteczkową zapewnia bezpośredni sposób kalibracji, bez potrzeby korzystania z zewnętrznego wzorcowania. Takie detektory są udoskonaleniem klasycznych technik. W celu takowej kalibracji korzysta się z LALLSD, MALLSD oraz z detektora pomiaru lepkości.

Najbardziej podstawowa kalibracja polega na pomiarze objętości retencji kilku wąskodispersyjnych frakcji danego polimeru, których wartości średniej masy cząsteczkowej są znane. Polimery wzorcowe powinny charakteryzować szeroki zakres mas cząsteczkowych oraz posiadać wąski rozkład, czyli  $M_w \approx M_n \approx M_{SEC}$ , gdzie  $M_{SEC}$  to masa cząsteczkowa odpowiadająca elucji w maksimum pików chromatograficznych. Odczytanie wartości  $M_{SEC}$  bezpośrednio z zależności kalibracyjnej nie jest poprawne w przypadku układów poldispersyjnych i nie jest stosowane. W wyniku kalibracji otrzymuje się chromatogramy kilku wąskodispersyjnych frakcji danego polimeru o znanych wartościach średniej masy cząsteczkowej. Należy pamiętać, że pomiary wykonywane w celu sporządzenia krzywej wzorcowej dokonuje się w tych samych warunkach jak podczas analizy badanych próbek. Same dane dotyczące objętości elucji nie są wystarczające. Wykreśla się punktowo zależność czasu retencji poszczególnych frakcji względem  $\log M$ , łącząc punkty krzywą/linią trendu. Uzyskaną w taki sposób krzywą przedstawia Rys. 1.



Rys. 1 Krzywa kalibracyjna

Fig. 1 Calibration curve

W takim przypadku zależność kalibracyjna opisana jest równaniem:

$$Y = AX + B, \quad (1)$$

Y -  $\log M$ , (M – masa cząsteczkowa)

X - czas retencji.

Jest to najprostszy sposób kalibracji, ale ma ograniczenia w swojej przydatności ze względu na mały wybór standardowych polimerów. Kalibracja ta wymaga użycia dużego zakresu różnych mas cząsteczkowych, aby całkowicie pokryć cały zakres mas badanej próbki. Obecnie w warunkach niewodnych stosuje się jako polimery wzorcowe polistyren, polimetakrylan metylu, polietylen. Natomiast w warunkach wodnych: politlenek etylenu lub glikol polietylenowy, poli(kwas akrylowy) i polisacharydy. Na mechanizmie tego typu kalibracji bazują pozostałe sposoby kalibracji.

Aby określić masę cząsteczkową i jej rozkład wyznacza się krzywą elucji próbki w tych samych warunkach jak krzywą kalibracji. Stosuje się ten sam eluent, szybkość przepływu, temperaturę. Wykreśla linię zerową chromatogramu, czyli łączy prostą linią, zaczynając od odcinka poprzedzającego pik, kończąc na odcinku, który może nastąpić po wymyciu zanieczyszczeń (pik ujemny). Do sporządzonej linii doprowadzane są linie prostopadłe dzielące chromatogram na przedziały o równej szerokości. Powinno

powstać co najmniej 25 przedziałów, jeśli wyznaczane są ręcznie. Najczęściej dostępne programy do obróbki danych SEC sporządzają minimum kilkaset fragmentów dla każdej analizy. Średnia masa cząsteczkowa jest przypisana do każdego przedziału czasu w oparciu o opisaną powyżej kalibrację, czyli o krzywą kalibracji. Do celów obliczeniowych przyjmuje się, że każdy przedział czasu charakteryzuje monodispersyjny rozkład masy cząsteczkowej. Odczytanie z otrzymanego pików, który jest podzielony na fragmenty o równej szerokości, odpowiedniego czasu retencji wymaga dalszej analizy otrzymanych danych [16]. Jednym ze sposobów jest stworzenie w arkuszu kalkulacyjnym tabeli, przedstawionej poniżej (Tabela 3).

**Tabela 3.** Tabela opisująca sposób obliczeń  $M_n$  i  $M_w$ .

**Table 3.** An example of SEC table calculation.

t[min]	A	$\Sigma A$	%A/ $\Sigma A$	$M_i$	$A_i/M_i$	$A_i \cdot M_i$	$A_i \cdot M_i^2$
...	...	...	...	...	...	...	...

Pierwsza kolumna tabeli informuje o czasie retencji, w którym ma miejsce elucja. Powierzchnie (A) obliczono dla pól poszczególnych fragmentów. Wykorzystuje się wartość różnicy czasu na osi x oraz różnicę sygnałów na osi y, których wartość rozpoczyna się w miejscu linii zerowej. Następnie obliczona się skumulowaną powierzchnię  $\Sigma A$  (np. dla kilkuset małych fragmentów). Kolumna „%A/ $\Sigma A$ ” określa stosunek [%] danej, pojedynczej powierzchni do skumulowanej powierzchni. Dla wartości 50% (połowy powierzchni danego fragmentu) odczytuje się czas retencji. Korzystając z równania krzywej kalibracyjnej oblicza dla danego czasu wartość  $M_i$ .  $A_i$  oznacza wartość skumulowanych powierzchni ( $\Sigma A$ ). Trzy ostatnie kolumny są to wartości wykorzystywane w obliczeniach.

Do obliczeń najczęściej stosuje się niżej przedstawione zależności [17]:

$$M_n = \frac{\sum A_i}{\sum (A_i/M_i)} \quad (2) \quad M_w = \frac{\sum A_i M_i}{\sum A_i} \quad (3) \quad PDI = \frac{M_w}{M_n} \quad (4)$$

$M_i$  - masa fragmentu i [g/mol]

$A_i$  - pole fragmentu pików o masie  $M_i$  [-]

W przypadku powyższych zależności należy dokonywać korekty wartości  $A_i$  dla poszczególnych zakresów  $M_i$  ze względu na zależność współczynnika załamania światła od masy cząsteczkowej. W przypadku prostej normalizacji ma miejsce zawyżanie zawartości frakcji wysokomolekularnej i zaniżanie zawartości frakcji niskomolekularnej.

Kalibracja z wykorzystaniem wąskich frakcji nie jest jedyną i niezawodną metodą. Stosuje się także kalibrację za pomocą polimerów polidispersyjnych. Dla wielu polimerów brakuje dobrych wzorców, a frakcjonowanie w celu ich otrzymania jest nieopłacalne. Określa się zależność kalibracyjną na podstawie znajomości funkcji rozkładu masy cząsteczkowej polidispersyjnego wzorca kalibracyjnego oraz korzystając z chromatogramu danej próbki polimeru. Procedura obejmuje porównanie znormalizowanej powierzchni pików z łączną frakcją pobraną z krzywej rozkładu.

Poszczególne objętości elucji  $V_i$  są dopasowane do masy cząsteczkowej  $M_i$  pobranej z krzywej rozkładu masy cząsteczkowej, jest to możliwe ponieważ procentowa część powierzchni pików i udział wagowy są identyczne. Krzywą rozkładu ciężaru cząsteczkowego polidispersyjnych próbek wzorcowych określono doświadczalnie. Rozkład masy cząsteczkowej wzorców musi objąć większość lub wszystkie zakresy dynamiczne próbek. Dwie określone doświadczalnie wartości średnich mas ( $M$ ) dla jednej lub dwóch różnych próbek polidispersyjnych muszą być znane jako wynik pomiarów pomocniczych do sporządzenia krzywej rozkładu masy cząsteczkowej. Balke wraz z współpracownikami opracował metodę efektywnej liniowej kalibracji. Krzywa została wyrażona poprzez równanie:

$$V_e = C_1 - C_2 \log M, \quad (5)$$

$V_e$  - objętość elucji (retencja) [ml]

$M$  - masa cząsteczkowa [g/mol]

Początkowo metoda ta sprawiała problemy podczas poszukiwania stałych  $C_1$  i  $C_2$ . Zmodyfikowana metoda bierze pod uwagę wyszukiwanie pojedynczego parametru. Zakłada się, że polidispersyjność -D, jest funkcją nachylenia -  $C_2$ . Otrzymane równanie kalibracji jest słuszne, gdy wartość współczynnika kierunkowego równania jest zoptymalizowana w celu zminimalizowania różnicy między rzeczywistą, a obliczoną polidispersyjnością. Współczynnik kierunkowy jest ustalony i stały. Następnie ustala się stałą  $C_1$ , która jest również zoptymalizowana w celu zminimalizowania różnicy między rzeczywistymi, a obliczonymi wartościami.

Opisaną kalibrację za pomocą frakcji lub niefrakcjonowanych polimerów stosuje się, gdy seryjnie analizuje się za pomocą SEC próbki jednego polimeru. W przypadku, gdy bada się różne polimery, zaleca się stosowanie innej zależności kalibracyjnej, która uzyskana jest poprzez pomiar objętości retencji dla wąskich frakcji polistyrenu. Stosuje się uniwersalne parametry kalibracyjne. W celu zrozumienia tej metody, należy rozważyć zależność między masą cząsteczkową, graniczną liczbą lepkościową, objętością

hydrodynamiczną, objętością przypadkowych swobodnie stykających się łańcuchów polimeru w roztworze. Relację tę opisuje równanie Einsteina–Simha dotyczące prawa dla cząsteczek w zawieszynie:

$$[\eta] = C \left( \frac{V_h}{M} \right), \quad (6)$$

$[\eta]$  - graniczna liczba lepkościowa zmierzona w warunkach rozdzielania chromatograficznego [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ]

$V_h$  - objętość hydrodynamiczna [ml]

$M$  - masa [g]

$C$  - stała [-]

Poniższa zależność charakteryzuje makrocząsteczki w roztworze. Bazuje na teorii Flory'ego-Foxa i pomaga zrozumieć metodę uniwersalnej kalibracji.

$$[\eta] = \phi \left( \frac{s^2}{M} \right)^{\frac{3}{2}}, \quad (7)$$

$\phi$  - stała Flory'ego [-]

$s^2$  - średni kwadrat odległości końców od środka łańcucha [cm]

Gdy oba równania mnoży się przez  $M$  otrzymuje się iloczyn  $[\eta] M$ , który jest uniwersalnym parametrem podczas kalibracji kolumn do SEC. Benoit i jego współpracownicy wykreślili ten parametr w funkcji objętości elucji dla polimerów o różnej strukturze, badanych w identycznych warunkach. Powstała jedna krzywa kalibracji. W praktyce można ustalić następującą zależność:

$$[\eta]_1 M_1 = [\eta]_2 M_2, \quad (8)$$

gdzie indeks 1 odnosi się do standardowych polimerów, a indeks 2 do próbek polimerów. Nieznaną masę można wyliczyć wykorzystując znajomość danych dotyczących uniwersalnego wzorca użytego do kalibracji. Zależność ta, aby była użyteczna musi zostać zmodyfikowana. Korzystać należy z równania:

$$\log M_1 = \frac{1}{1+a_2} \log \frac{K_1}{K_2} + \frac{1+a_1}{1+a_2} \log M_2, \quad (9)$$

Niezbędne jest także równanie Marka-Houwinka:

$$[\eta] = KM^a \quad (10)$$

Korzystając z zależności 10 można obliczyć wartości stałych  $K$  i  $a$  [3,18].

W wyniku analizy techniką chromatografii żelowej otrzymuje się zazwyczaj wartości  $M_n$  mniejsze, a wartości  $M_w$  większe w porównaniu z wartościami otrzymanymi metodami klasycznymi. Analizę masy cząsteczkowej metodą SEC przeprowadza się dla wielu substancji. SEC może być stosowany samodzielnie lub razem z innymi technikami w celu poprawy analizy jakościowej. W warunkach niewodnych bada się oligomery, związki wielkocząsteczkowe (np. nisko i średnio polarne polimery) oraz niektóre niskocząsteczkowe. Za pomocą SEC głównie określa się dla tych substancji średnie masy cząsteczkowe, ich rozkład oraz polidispersyjność.

W przypadku oligomerów, SEC umożliwia całkowite rozdzielanie w skali analitycznej niższych członów ich szeregu homologicznego. Wyższe oligomery posiadają piki odpowiadające poszczególnym członom szeregu (merom), które nie są całkowicie rozdzielone. Jeśli masa cząsteczkowa oligomeru rośnie dalej otrzymuje się ciągłą krzywą elucji, podobnie jak dla polimerów. Badane oligomery to np. polietery, poliuretany, żywice. Z przeprowadzonych badań dla żywic wynika, że technikę SEC można stosować do scharakteryzowania próbki przez producentów żywicy oraz przez użytkowników końcowych. Charakteryzuje się m.in. żywice fenyloowo-formaldehadowe powstałe przez polikondensację [19,20]. Rozdzielane w hydrofobowych warunkach polimery to głównie syntetyczne substancje oraz niektóre pochodzenia naturalnego. Analizę masy cząsteczkowej przeprowadza się np. dla nylonów – poliamidów [21]. Innym przykładem syntetycznego polimeru dla którego przeprowadza się, poza klasycznymi metodami określania ciężaru cząsteczkowego, analizę techniką SEC jest polichlorek winylu [22]. Próbkę polimerów liniowych powstałych przez termiczną polimeryzację eteru bisfenolu-A-diglicydylowego (ang. *bisphenol-A-diglycidyl ether*, DGEBA) z trzema aminami: benzyloaminą, *p*-chloroaniliną i cykloheksyloaminą bada się z wykorzystaniem THF jako eluentu. Określenie średnich wartości mas cząsteczkowych umożliwia ocenę stopnia cyklizacji [23]. Chromatografię żelową wyposażoną w LLSD z użyciem organicznego eluentu stosuje się do określenia  $M_n$  i  $M_w$  praktycznie każdego rodzaju polimerów, takich jak elastyczne polimery polistyrenowe, polimery prętowe, polimery gwiazdowe, liniowe kopolimery blokowe oraz gwiazdowe kopolimery blokowe [24]. W przypadku analizy kopolimerów blokowych, z wykorzystaniem SEC w warunkach wodnych, napotyka się trudności w uzyskaniu krzywej kalibracyjnej. Rozwiązaniem okazuje się sporządzenie krzywej kalibracyjnej za pomocą homopolimerów. Krzywą wykonuje się z wykorzystaniem parametrów Marka-Houwinka. Średnia masa cząsteczkowa oznaczona tą metodą jest w doskonałej zgodności z danymi otrzymanymi metodą osmometrii [25]. Wśród polimerów naturalnych, dla których przeprowadza się rozkład masy cząsteczkowej z organicznym eluentem można wymienić polisacharydy oraz ligninę. Można przeprowadzić analizę zarówno niemodyfikowanej celulozy oraz jej pochodnych. Przeprowadzone badania nad ftalanem hydroksypropylometylocelulozy (ang. *hydroxypropylmethylcellulose phthalate*, HPMCP) wykazują, że jest łatwo rozpuszczalny w wielu rozpuszczalnikach organicznych, które mogą być używane jako eluent w SEC. Analiza wykonana z zastosowaniem acetonu jako fazy ruchomej wykazała silne oddziaływanie pomiędzy polimerem, a materiałem wypełniającym kolumnę. Analiza wykonywana z użyciem THF jako fazy ruchomej wykazała również, że występują pewne oddziaływania z

kolumną, ale są one znacznie słabsze niż obserwowane w acetonie. W tym przypadku podają się informację, że nieprawidłowe zachowanie HPMCP w THF może być tłumione przez dodanie 5% roztworu kwasu octowego [26].

Rozkład masy cząsteczkowej w warunkach niewodnych można przeprowadzać również dla takich substancji jak ropa, oleje, asfalty. Często w przypadku np. ropy oraz smoły węglowej stosuje się metodę „odcisku palca” (ang. *fingerprinting*). Powstałe najróżniejsze chromatogramy porównywanych próbek umożliwiają stwierdzenie jak ropa była przerabiana lub jakiego jest pochodzenia. Do badań asfaltów w warunkach niewodnych wykorzystuje się kolumny wypełnione najczęściej wysoce usieciowanymi kopolimerami [27].

Niskocząsteczkowymi substancjami rozdzielanymi w celu sporządzenia rozkładu masy cząsteczkowej są sacharydy, tłuszcze, witaminy oraz dodatki w polimerach. Często dokonuje się pomiaru wartości masy cząsteczkowej i rozkładu mas cząsteczkowych dla niskocząsteczkowej heparyny (ang. *Low Molecular Weight Heparin*, LMWH), która jest polisacharydem, przy użyciu najczęściej dwóch metod detekcji: ultrafioletowej (UV) oraz refraktometrycznej. Jednak te detektory wymagają kalibracji z wykorzystaniem wzorców. European Pharmacopeia do analizy LMWH za pomocą chromatografii wykluczania zaleca użycie tych dwóch detektorów, które wymagają takowej kalibracji. Nowsza metoda proponuje korzystanie z MALLSD, który nie wymaga korzystania z wzorców [28].

W warunkach wodnych za pomocą chromatografii wykluczania dokonuje się głównie analizy materiałów biologicznych oraz polimerów polarnych. Substytuty osocza krwi, takie jak dekstran i hydroksyetyloskrobia, powodują rozszerzenie objętości cieczy w naczyniach krwionośnych ze względu na ich wysokie ciśnienie osmotyczne. Stosowane są klinicznie do rozszerzania naczyń krwionośnych. Efekt ten, uzyskuje się tylko wtedy, jeśli substytuty te są obecne w osoczu. Z tego powodu znajomość czasu retencji ma duże znaczenie. Czas przebywania jest bezpośrednio związany z rozkładem masy cząsteczkowej polidispersyjnych hydrokolooidów. Znajomość rozkładu, określonego metodą SEC z wykorzystaniem kalibracji wąsko-dispersyjnymi frakcjami, ma istotne znaczenie w kontrolowaniu zwiększania objętości osocza [29]. Żelatyna jest polipeptydem wytwarzanym z kwaśnej lub zasadowej hydrolizy kolagenu pochodzącego z skóry i kości. Żelatyna jest stosowana w przemyśle spożywczym i w przemyśle farmaceutycznym jako stabilizator do tabletek. Analiza techniką SEC może być stosowana do każdego rodzaju żelatyny, niezależnie od jej punktu izoelektrycznego oraz warunków procesu hydrolizy kolagenu. Wykorzystuje się eluent wodny z buforem fosforanowym o pH 5,5 dla kwaśnej żelatyny i o pH 6,6 dla żelatyny podstawowej [30]. W szczególności w przypadku związków pochodzenia biologicznego, technika SEC posiada szeroki zakres innych zastosowań poza przygotowaniem rozkładu masy cząsteczkowej. Natomiast z użyciem wodnego eluentu dokonuje się m.in. analizy rozkładu masy cząsteczkowej niektórych polielektrolitów. Zarówno biopolimery jak i polimery syntetyczne obdarzone ładunkiem można charakteryzować za pomocą chromatografii wykluczania. Przykładem charakteryzowanego polimeru może być poliakrylan sodu, który ma szerokie zastosowanie przemysłowe. Oznaczenie jego masy cząsteczkowej ( $M_w$ ) oraz analiza jej rozkładu jest ważnym elementem kontroli jakości tego produktu. Użycie do badania eluentu wodnego z buforem soli o pH>7 gwarantuje dokładną analizę rozkładu masy cząsteczkowej poliakrylanu sodu bez żadnych niepożądanych oddziaływań [31].

- *Oznaczanie dodatków/zanieczyszczeń (o innych masach)*

Chromatografię żelową wykorzystuje się m.in. do oznaczania substancji, które są składnikami próbki, w tym zanieczyszczeń, które różnią się rozmiarami cząsteczek.

W warunkach niewodnych SEC umożliwia rozdzielanie polimerów nisko i średni polarnych od związków powierzchniowo czynnych, które zawarte są w mniejszym stężeniu, z wykorzystaniem THF jako eluentu. Otrzymane związki mogą być odzyskane i oznaczone np. metodą spektrofotometryczną. Z wykorzystaniem THF można także określić stężenie dodatków lub produktów reakcji o dużej masie cząsteczkowej zawartych w komponentach o niższej masie. Polimer może być oddzielany np. od oleju smarowniczego. Stosując toluen jako eluent można rozdzielić mieszaniny łatwo topliwych klei zawierających polimery, żywice, woski [12]. Chromatografia wykluczania umożliwia oznaczanie także smarów, dodatków uszlachetniających, tłuszczów, kosmetyków, plastyfikatorów, antyutleniaczy, konserwantów, pozostałości rozpuszczalnika i innych substancji w polimerach. Wysokosprawna chromatografia wykluczania, z zastosowaniem organicznego rozpuszczalnika, podczas analizy tłuszczów może służyć do oddzielenia monomerów, dimerów i trimerów kwasów tłuszczowych zawartych w termicznie utlenionych lub zużytych tłuszczach i olejach jadalnych. Rozdzielanie odbywa się z użyciem kopolimeru SD-DVB jako fazy stacjonarnej i toluenu jako eluentu, z detekcją refraktometryczną. W tych samych warunkach można dokonać rozdzielania i analizy ilościowej mono-, di- i tri glicerydów. W przypadku analizy monomerów, dimerów i trimerów kwasów tłuszczowych można zastosować zarówno SEC jak i wysokosprawną chromatografię wykluczania (ang. *High Performance Size Exclusion Chromatography*, HPSEC). HPSEC oznacza zastosowanie sprawniejszych kolumn o mniejszych ziarnach, o wielkości około 5µm. Poniżej zobrazowane są obydwa chromatogramy dla mieszanin standardowych. HPSEC umożliwia szybszą elucję [32].

Wysokosprawna chromatografia wykluczania znalazła zastosowanie do badania rozpadu trzech różnych olejów po smażeniu: olej z oliwek, olej słonecznikowy oraz mieszaniny tych olejów. Oceniano i porównywano

je za pomocą pomiaru zawartości frakcji polarnych oraz oligomerów TAG. Podczas badania każdy olej stosowany był 10 krotnie. Po każdym użyciu uzupełniany nowym, ale nie wylewany. Za pomocą SEC zanalizowano zawartość TAG w wydzielonej wcześniej polarnej frakcji. Zawartość oligomerów TAG w polarnej frakcji obliczono jako sumę polimerów o niskiej  $M_w$  i dimerów TAG. Najmniejszą zawartość posiadała oliwa z oliwek, jednak ze względu na cenę i nienajlepsze wyniki dopuszcza się stosowanie mieszaniny olei [33].

• **Oznaczanie „grupowe” – MAG/DAG/TAG/WKT w tłuszczach**

Chromatografia wykluczania posiada zastosowanie w badaniu składu tłuszczów. Wynik oznaczania informuje o zawartości poszczególnych grup związków chemicznych w badanym materiale. Tłuszcze to estry glicerolu i kwasów tłuszczowych. Glicerol może tworzyć estry z jedną, dwiema i trzema cząsteczkami kwasu tłuszczowego. Powstają wtedy: monoacyloglicerole (MAG), diacyloglicerole (DAG), triacyloglicerole (TAG). Zawartość wymienionych związków oraz wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) w tłuszczu, analizowanym za pomocą techniki SEC w warunkach hydrofobowych, określa jego skład grupowy.

Podczas obróbki termicznej tłuszczów zachodzą przemiany oksydacyjne i oksydacyjno-termiczne, które powodują powstawanie wielu związków. Powstają związki takie jak polimery, dimery, utlenione TAG, WKT, DAG oraz MAG. Metoda wysokosprawnej chromatografii wykluczania pozwala na ich rozdzielanie, ponieważ różnią się masą cząsteczkową. Aby zidentyfikować grupy związków powstające w tłuszczach np. po smażeniu stosuje się następujące warunki: kolumny wypełnione usieciowanym kopolimerem styrenu i DVB, detektor refraktometryczny. Rozdzielenie odbywa się w warunkach niewodnych z zastosowaniem THF jako eluentu z dodatkiem utleniacza - BHT. Wykonuje się krzywe kalibracyjne z zastosowaniem jako wzorca glikolu polipropylenowego o znanej masie. Krzywe te można wyznaczyć dla jednej kolumny i dla dwóch kolumn połączonych szeregowo. Na podstawie tych krzywych wyznacza się masy cząsteczkowe związków występujących w tłuszczach smażalniczych oraz identyfikuje się je. Tabela 2.4. obrazuje wyniki analizy tłuszczów po smażeniu oraz porównuje dane uzyskane z użyciem jednej i dwóch kolumn.

**Tabela 4.** Identyfikacja związków obecnych w tłuszczu po smażeniu.

**Table 4.** Identification of compounds from lipid streams after frying.

Jedna kolumna	Dwie kolumny	Związek
Obliczona masa cząsteczkowa		
4280	8740 – 2440	Polimery
1830	1740	dimery TAG
910	930	utlenione TAG
850	860	TAG (frakcja niepolarna)
630	650	DAG
320	370	MAG
220	280	Kwasy tłuszczowe

Zaleca się stosowanie dwóch szeregowo połączonych kolumn. Pozwala to rozdzielić związki polimeryczne na 3 frakcje. Analizie najlepiej jest poddać wyodrębnione wcześniej frakcje polarne. Umożliwia to identyfikację wszystkich grup związków, które powstają w tłuszczach w czasie obróbki termicznej ponieważ identyfikacji związków takich jak np. utlenione TAG, DAG (o małej masie cząsteczkowej zbliżonej do TAG) przeszkadza obecność TAG (frakcja niepolarna). Natomiast produkty polimeryzacji identyfikowane są w próbach badanego oleju bezpośrednio. Analizę ilościową tłuszczów poddanych np. smażeniu metodą HPSEC prowadzi się z zastosowaniem detektora refraktometrycznego. Niezbędna jest znajomość, dla wszystkich rodzajów związków występujących w danych tłuszczach, wielkości sygnałów przypadających na jednostkę masy. Wyniki analizy ilościowej wykazują, że różne związki, które są obecne we frakcjach polarnych dają sygnały zbliżone do TAG z których powstały. Umożliwia to ilościowe oznaczenie poszczególnych grup związków, które znajdują się w tłuszczach poddanych działaniu wysokich temperatur [37].

SEC umożliwia określanie struktury makrocząstek, np. rozgałęzienia. Rozgałęzienie długołańcuchowe jest znanym zjawiskiem strukturalnym polietylenu, którego charakterystyka ma znaczenie, ponieważ wpływa na wiele właściwości tego polimeru. Oznaczanie rozgałęzienia można przeprowadzić przy użyciu chromatografii żelowej z detektorem lepkościowym i MALLSD (w celu określenia promienia bezwładności). Podstawą sposobu określenia rozgałęzienia jest użycie polidispersyjnych liniowych próbek odniesienia, do porównania z rozgałęzionymi polimerami. Rozgałęziony polimer jest bardziej zwarty, niż polimer liniowy dla danej masy cząsteczkowej. W rezultacie rozgałęzione cząsteczki mają mniejszą objętość

hydrodynamiczną, mniejszy promień bezwładności i niższą lepkość. Zatem stopień rozgałęzienia można wyznaczyć z różnicy w lepkości granicznej (oznaczonej metodą SEC-VIS) lub w promieniu bezwładności (określanego za pomocą SEC-MALLS). Porównuje się rozgałęziony polimer z analogiczną próbką prostoliniową [42].

W warunkach wodnych dokonuje się głównie analizy białek i peptydów, kwasów nukleinowych, hormonów, toksyn, witamin, niektórych sacharydów. SEC jest techniką szeroko stosowaną do szczegółowego charakteryzowania białek terapeutycznych oraz służy do oceny ilościowej i jakościowej agregatów. Łagodne warunki fazy ruchomej zezwalają na charakterystykę białek przy minimalnym wpływie na struktury konformacyjne i środowisko lokalne. W celu poprawy rozdzielania między białkiem, a agregatami dostosowuje się różne parametry prowadzenia analizy. Przede wszystkim dobierana jest odpowiednia wielkość porów. Dobór wielkości porów zależy od wielkości (masy cząsteczkowej) białka i jego składników, które mają być rozdzielone. Dla scharakteryzowania mieszaniny białek, stosowane są typowe wielkości porów pomiędzy 150 i 500 Å. Dla białek terapeutycznych (o  $M_w$  około 15-80 kDa) stosuje się wielkość porów 150-200 Å. Wielkość porów 200-300 Å jest zwykle stosowana dla mAb (przeciwciała monoklonalne -  $M_w$  około 50 kDa). W przypadku bardzo dużych białek ( $M_w > 200$  kDa) pory o wielkości 500-1000 Å oferują najlepszą selektywność. Do analizy białek, peptydów i związków pokrewnych najczęściej stosuje się detektory UV. Niedawno Latypov wykazał imponujący sposób, który ukazuje jak odróżnić rekombinowane ludzkie przeciwciała monoklonalne IgG1 i IgG2. Ze względu na ich skłonność do tworzenia agregatów były poddawane odwirowywaniu. Nienaruszone przeciwciała monoklonalne były oddzielone od rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych agregatów metodą chromatografii wykluczania [34, 35].

W warunkach hydrofilowych oczyszczanie próbek za pomocą metody chromatografii wykluczania ma zastosowanie nie tylko w przypadku materiałów biologicznych. Substancje pomocnicze w lekach to substancje nieaktywne farmakologicznie, stosowane głównie jako nośnik. Znaczna zawartość (30-80% substancji stałej) takich substancji polimerowych to celuloza, hydroksypropyloceluloza, hydroksypropylometyloceluloza, octan celulozy, bursztynian hydroksypropylometylocelulozy. Są to związki o bardzo dużej masie cząsteczkowej, których zawartość najdokładniej można oznaczyć metodą SEC w połączeniu z detekcją IR, stosując jako eluent wodę z dodatkiem 1,5% DMF [36].

Również na zasadzie większej i mniejszej masy molowej dwóch komponentów, można oznaczyć składnik o niskiej masie molowej od polimeru. Przykładem może być oczyszczanie poliwinylpirolidonu (ang. *Polyvinylpyrrolidone*, PVP) z etanolu z zastosowaniem Sephadexu jako faza stacjonarna.

#### *Wykorzystanie SEC do frakcjonowania i preparatyki.*

W przypadku techniki preparatywnej stosuje się urządzenia różniące się konstrukcją od stosowanych do SEC w warunkach analitycznych. Podczas rozdzielania preparatywnego dozuje się duże objętości i zwiększa stężenie próbki, aby osiągnąć wysoką wydajność próbki. Jednak objętość dozowania ma swoje ograniczenia, wielkość, której nie może przekraczać. Rozdzielanie preparatywne polega na uzyskiwaniu frakcji np. polimerów, biopolimerów. Często wyizolowaną frakcję, o określonym zakresie masy cząsteczkowej poddaje się dalszej analizie stosując inne metody analityczne/chromatograficzne. Wydzielone za pomocą preparatywnej techniki SEC niskocząsteczkowe frakcje z żywności, gleb, produktów naftowych poddawane są analizie na zawartość niskocząsteczkowych zanieczyszczeń. Frakcjonowanie za pomocą chromatografii żelowej asfaltów i składników asfaltu jest tak samo skuteczne jak przypadku precypitacji ich z rozpuszczalnikiem [38].

W układach biologicznych zastosowanie SEC opiera się głównie na oczyszczaniu substancji od domieszek stosując uprzednio frakcjonowanie w warunkach preparatywnych. Technika ta umożliwia również odsalanie białek. Rozdzielanie materiałów biologicznych prowadzone jest w warunkach wodnych. Jednym z rodzaju rozdzielanych białek są składniki krwi. Żelem stosowanym zazwyczaj do rozdzielania białek wchodzących w skład osocza krwi jest Sephadex G-200. Często do oczyszczania stosuje się łączenie metody chromatografii żelowej z innymi metodami analitycznymi. Przykładem może być oczyszczanie kininogenu z osocza krwi człowieka. Wyodrębnia się formę małowcząsteczkową, która spełnia funkcję fizjologiczną w procesach zapalnych. W organizmie ludzkim występują również formy wielocząsteczkowe, pełniące inne funkcje. Pierwsze oczyszczanie składało się z 9 etapów, poza chromatografią wykluczania wykorzystano chromatografię jonowymienną [39]. SEC w warunkach wodnych umożliwia badanie składników krwi ryb i innych zwierząt. Duże znaczenie chromatografia żelowa ma podczas oczyszczania enzymów. Wyróżnić można oczyszczanie składników celulozy- karboksymetylocelulozę i awicelulozę, oczyszczanie ureazy z próchnicy. Izolacja wielu enzymów nie odbywa się wyłącznie z zastosowaniem techniki SEC, ale jest ona nieodłącznym elementem, gdyż zwiększa ona czystość wyizolowanych substancji. Chromatografia wykluczania służy również do charakterystyki innych białek jak np. wirusy białkowe. Po wydzieleniu białek lub peptydów, pochodzących z wirusa, określa się ich masę. Różnica mas (dwa składniki o różnej masie) występuje również w przypadku białek jakimi są toksyny (pochodzące z grzybów, jadu wężów). Składniki o różnych masach wykazują często różne właściwości. Stosując do chromatografii w warunkach wodnych żele sztywne o dużych porach można oczyszczać wirusy, unikając zjawiska adsorpcji. Przykładem może być oczyszczanie wirusa mozaiki tytoniowej z wyciągu zakażonych liści tytoniowych. W

tym przypadku zaobserwowano, że wirus jest izolowany, od innych rozpuszczalnych substancji znajdujących się w roślinie, ponieważ jest wymywany w objętości martwej kolumny. SEC w tych warunkach (liofilowych) w układach biologicznych wykorzystywana jest również do rozdzielania sacharydów np. z krwi protrombiny. Można uzyskiwać oczyszczone hormony, witaminy i toksyny izolowane z organizmów roślinnych i zwierzęcych stosując zazwyczaj jako fazę stacjonarną Sephadex. Tego rodzaju faza stacjonarna umożliwia także badanie i wydzielanie antybiotyków. SEC znajduje zastosowanie także w przemyśle spożywczym, umożliwia m.in. rozdzielanie barwników syntetycznych z soków [18,40].

#### *Dodatkowe zastosowania.*

Kolumny stosowane do odsalania w warunkach SEC są wykorzystywane nie tylko w celu usunięcia zanieczyszczeń o małej masie cząsteczkowej takich jak sól. Wykorzystuje się je także w celu wymiany buforu przed i po zastosowaniu do różnych technik chromatograficznych oraz do szybkiego usuwania reagentów po zakończonej reakcji między wysokocząsteczkowymi i niskocząsteczkowymi reagentami. W ten sposób można usuwać fenol z cieczy przed wykonaniem rozdzielania w warunkach chromatografii jonowymiennej lub usuwać niezarejestrowane nukleotydy podczas sekwencjonowania, produkty i inhibitory enzymów oraz nieprzereagowane radioaktywne dodatki np. z reakcji znakowania kwasów nukleinowych przed przygotowaniem kwasu nukleinowego [41].

Sterylizacja jest podstawowym elementem procesu tworzenia polimerów stosowanych w medycynie. Jednak, techniki sterylizacji mogą mieć destrukcyjny wpływ na podstawowe cechy polimerów i wywoływać rozerwanie łańcucha, rozerwanie wiązania i zmiany w masie cząsteczkowej. W przypadku polimerów, które stosowane są do materiałów umożliwiających czasowe uwalnianie leku, wpływ sterylizacji musi być starannie monitorowany. Zmiany w strukturze polimeru mogą w zasadniczy sposób wpłynąć na wydajność i działanie danego leku. Chromatografia wykluczania z tradycyjną pojedynczą detekcją ma w tym przypadku ograniczone zastosowanie. Nie umożliwia niezbędnej, zaawansowanej analizy strukturalnej. Problem ten można rozwiązać poprzez zastosowanie w SEC połączenia kilku technik detekcji: MALLSD, refraktometrycznej i detektora lepkościowego. Uzyskane wyniki umożliwiają ilościową analizę destrukcji polimeru używanego w celach medycznych pod wpływem sterylizacji i umożliwiają rozwój skutecznych metod przygotowania danego polimeru [42-43].

Nowatorskim rozwiązaniem jest zastosowanie chromatografii wykluczania do wyznaczenia rozkładu temperatury destylacji z zastosowaniem metody destylacji symulowanej (SIMDIS). W tym rozwiązaniu zastosowano standardowe kolumny SDVB oraz tetrahydrofuran jako eluent [44].

#### *Porady przy stosowaniu GPC w analizie technicznej.*

Chromatografia wykluczania nastęrcza pewnych trudności, a także posiada istotne ograniczenia. Aby otrzymać wiarygodne wyniki warto zastosować się do szeregu „dobrych praktyk” stosowania SEC. Badanie należy rozpocząć od poprawnie przygotowanej próbki. Badana próbka musi być rozpuszczona. Nie zaleca się zastosowania w tym celu ultradźwięków lub miesadła magnetycznego, ponieważ może nastąpić degradacja próbki i rozrywanie łańcucha. Dlatego, należy cierpliwie poczekać, aż próbka rozpuści się, rozpuszczając pojedyncze łańcuchy. Jeśli proces rozpuszczania trwa kilka dni lub tygodni stosuje się stabilizowany rozpuszczalnik. W niektórych przypadkach zaleca się przechowywanie pojemnika z rozpuszczaną próbką w ciemnym otoczeniu/pomieszczeniu. W razie potrzeby, można zastosować delikatne mieszanie do uzyskania jednorodnego roztworu. W przypadku roztworów zawierających żele lub cząstki, filtruje się je przez filtr membranowy o średnicy porów równej lub mniejszej od 0,45µm. W przypadku próbek o dużych masach cząsteczkowych, filtr musi posiadać odpowiednią średnicę porów, aby uniknąć degradacji analizowanej substancji. Jednakże, nawet jeżeli cząsteczki są całkowicie rozpuszczone, to nie gwarantuje to odpowiedniej charakterystyki. Składniki mogą być zatrzymywane w kolumnie z powodu niepożądanych oddziaływań między fazą stacjonarną, a próbką lub częściowo usunięte podczas filtrowania. Dlatego zaleca się monitorowanie i mierzenie odzysku próbek. Najprostszym sposobem na sprawdzenie odzysku próbki jest pomiar powierzchni piku z i bez wypełnienia kolumny, zachowując niezmiennie pozostałe warunki. W celu pomiaru trzykrotnie wstrzykuje się ślepią próbę oraz badaną próbkę zaczynając od badania bez wypełnienia kolumny [45].

Dla próbek o dużej masie zaleca się przygotowanie niższych stężeń niż przy analizie związków małowagowych. Cząsteczki o wysokiej masie cząsteczkowej potrzebują miejsca do zajmowania ich hydrodynamicznych objętości bez ingerencji z innymi. Tabela 4. podsumowuje zalecane stężenia próbki na podstawie masy molowej. Zalecenia te są dla próbek o wąskim rozkładzie mas cząsteczkowych- o niskiej polidispersyjności. Dla próbek o dużej polidispersyjności wyższe stężenia są możliwe.



**Tabela 5.** Zalecane stężenia próbki na podstawie masy molowej [46].**Table 5.** Optimal concentration of samples depending on molecular mass.

Masa cząsteczkowa [g/mol]	Stężenie
100-10000	2 mg/mL (0.2%)
1000-1000000	1–2 mg/mL (0.1–0.2%)
>1000000	0.5 mg/mL lub mniej (0.05%)

Dla próbek które osiągają masę kilku milionów Daltonów rozważa się dodatkowe elementy doświadczalne. Ważne jest dostosowanie natężenia przepływu fazy ruchomej. Zwiększenie objętości przepływu może przyspieszyć analizę w warunkach SEC jednak dla związków o dużej masie może mieć niekorzystny wpływ na wynik. Polimery wykazują poszerzenie kształtu piku po uruchomieniu elucji w zbyt wysokiej prędkości przepływu, ponieważ mają bardzo niskie współczynniki dyfuzji. Zmniejszenie szybkości przepływu do np. 0,25 ml/min lub mniejszej spowoduje otrzymanie bardziej realistycznych kształtów pików dla próbek o dużej masie.

W celu poprawy analizy metodą SEC można także ograniczyć czas rozdzielania oraz ilość użytego eluentu poprzez zastosowanie krótszych kolumn, ale z tą samą średnicą wewnętrzną. Niestety, w wyniku takiego postępowania zmniejsza się rozdzielczość, a za nią dokładność i precyzja wyznaczenia masy cząsteczkowej. Na szybkość rozdzielania ma także wpływ dopasowanie wymiarów kolumny do czasu przepływu. Tabela 5. przedstawia optymalne dopasowanie średnicy wewnętrznej kolumny do prędkości liniowej i stosowanego przepływu. Stosując kolumny o dużej średnicy w połączeniu z dużą prędkością przepływu można osiągnąć dużą dokładność wyniku. Wewnętrzna średnica kolumny może być w tym przypadku tym większa, im krótsza jest kolumna [47].

**Tabela 6.** Prędkość liniowa i zalecana objętość przepływu dla typowych wymiarów kolumn stosowanych w SEC [47].**Table 6.** Optimal linear velocity and volumetric flow for typical dimensions of SEC columns

Rodzaj SEC	Średnica wewnętrzna kolumny [mm]	Prędkość liniowa [cm/min]	Objętościowe natężenie przepływu [ml/min]
Analityczna	7,5-8	2	0,5-1
Preparatywna	20	2	3-10

#### 4. Podsumowanie (Summary)

Mechanizm rozdzielania w SEC jest stosunkowo prosty, jeśli wyeliminuje się oddziaływania sorpcyjne między fazą stacjonarną, a fazą ruchomą. Opiera się na zasadzie przepływu cząsteczek, substancji rozpuszczonej w eluencie, o różnej wielkości i masie oraz „sączeniu” ich przez porowate wypełnienia kolumny. Rozdzielane cząsteczki wymywane są w zależności od wielkości - im mniejsze tym dłużej mogą przebywać wewnątrz porów. Rozdzielanie może następować w dwóch rodzajach warunków – liofilowych (z zastosowaniem organicznych eluentów) i hydrofilowych (z zastosowaniem wodnych eluentów wraz z dodatkami).

Chromatografię wykluczania charakteryzuje szeroki zakres zastosowań. Odpowiednio dobrane warunki rozdzielania, tzn. faza stacjonarna, faza ruchoma oraz dodatki, wpływają na efektywność rozdzielania. SEC poza zastosowaniem w analityce, charakteryzuje się szerokim wykorzystaniem w frakcjonowaniu i przygotowywaniu związków do dalszej analizy, w szczególności substancji pochodzenia biologicznego.

#### Literatura (Literature)

- [1] [http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Inzynieria/images/data/tch/tch\\_tr\\_wu5.pdf](http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Inzynieria/images/data/tch/tch_tr_wu5.pdf) [data dostępu: 15.06.2015]
- [2] P. Stepnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński; *Techniki separacyjne*; Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego; Gdańsk 2010.
- [3] Ch. Wu; *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques*; Marcel Dekker, Inc. 2 (2004).
- [4] C.E.H. Knapman; *Developments in Chromatography-1*; Applies Science Publisher LTD (1978).

- [5] S. Podzimek; *Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*; A John Wiley & Sons, Inc. (2011).
- [6] J. Nawrocki; *Wyznaczanie zakresu wykluczania dla wypełnień stosowanych w wysokosprawnej chromatografii wykluczania (HPSEC)*.  
<http://www.staff.amu.edu.pl/~ZTUW/ftp/B3%20Wyznaczanie%20zakresu%20wykluczania.pdf> [data dostępu: 16.12.2014].
- [7] M. Kamiński; *Chromatografia Cieczowa*; Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny. Bezpłatny dostęp do wersji elektronicznej:  
<http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Inzynieria/index.php/pl/matpomoc>
- [8] D. Held; *Tips & Tricks: GPC/SEC Method Optimization*; The Column 6 (4.04.2013).
- [9] E.S.P. Bouvier, S. M. Koza; *Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC*; Trends in Analytical Chemistry (2014).
- [10] [http://www.waters.com/waters/en\\_PL/Frequently-Asked-GPC-SEC-Questions/nav.htm?cid=10167847](http://www.waters.com/waters/en_PL/Frequently-Asked-GPC-SEC-Questions/nav.htm?cid=10167847) [data dostępu: 20.12.2013].
- [11] D. Held; *Tips&Tricks: GPC/SEC Method Development*; The Column 22 (3.12.2012).
- [12] L.R. Snyder, J.J. Kirkland; *Introduction to modern liquid chromatography*; John Wiley & Sons, Inc. (1974).
- [13] A. Chakrabarti, J. Steve; *Analysis of Monoclonal Antibody Aggregates by SEC Using MS-Friendly Mobile Phases*; LCGC (10.2014) 13.
- [14] S. Kromidas; *HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization*; Wiley-vCH Verlag BmbH & Co. KGaA, Weinheim (2006).
- [15] C. Henry; *Sec Weighs In*; Analytical Chemistry News & Features (1.07. 1996).
- [16] D. Held, P. Kilz; *Tips & Tricks: GPC/SEC From a Chromatogram to the Molar Mass Distribution*; The Column (15.12.2014).
- [17] *ASTM D5296:97; Standard test method for molecular weight averages and molecular weight distribution of polystyrene by high performance size-exclusion chromatography*.
- [18] D. Berek, M. Dressler, M. Kubinistr, K. Marcinka; *Chromatografia żelowa*; PWN 1 (1989).
- [19] S. Chakraborty, S. Bandyopadhyay, S. Dasgupta, R. Mukhopadhyay, A.S. Deuri. *Application of GPC in characterization of MP resin through correlation of softening point and methylol content with weight average molecular weight*, Polymer Testing 25 (2006) 12.
- [20] F. Gores; *Absolute Molar Masses for Phenol Formaldehyde Resins with GPC/SEC-ESI*; LCGC Asia Pacific (01.01.2012).
- [21] *Applictation Note: GPC Characterization of Nylon using Formic Acid for Reduced Cost per Analysis*; Malvern Instruments Limited (2014).
- [22] K.B. Andersson, A. Holmström, E.M. Sörvik; *A comparison between different ways to obtain molecular weight distributions of PVC and a study on the anomalies of PVC in tetrahydrofuran solutions*; Die Makromolekulare Chemie 1 (12.03.2003) 166 (1973), 247.
- [23] M. Szesztay, Z. László-Hedvig, F. Tüdös, H. H. Hörhold, J. Klee; *GPC estimation of molecular mass distribution of addition polymers from bisphenol-a-diglycidyl ether and amines*; Die Angewandte Makromolekulare Chemie 1(12.03.2003).
- [24] K. Se, T. Sakakibara, E. Ogawa; *Molecular weight determination of star polymers and star block copolymers using GPC equipped with low-angle laser light-scattering*; Polymer 43 (2002) 5447.
- [25] F. S.C. Chang; *GPC Analysis of Block Copolymers*; Advances in Chemistry, 125 (2009).
- [26] E. Meehan; *Characterisation of hydroxypropylmethylcellulose phthalate (HPMCP) by GPC using a modified organic solvent*; Anal. Chim. 557 (2006) 2.
- [27] L.R. Snyder; *Determination of asphalt molecular weight distributions by gel permeation chromatography*; Anal. Chem. 41 (1969).
- [28] L. Rao and J. Beirne; *Molecular Weight Determination of LMWH SEC/MALS vs. SEC/UV-RI*; Wyatt Technology Corporation 7/24/12 (2012).
- [29] R. Lemmes, D. Schwengers, B. Weimann; *Determination of molar mass and molar mass distribution of blood plasma substitutes (plasma expanders)*; Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia 1 (2.03.2011).
- [30] G. Reinhold; *Molar Mass Determination of Gelatins Using GPC/SEC*; LCGC (01.02.2012).
- [31] K. Ito; *Effects of Solvent pH on the SEC Analysis of Sodium Polyacrylate*; LCGC (01.01.2013).
- [32] C.N. Christopoulou, E.G Perkins; *High Performance Size Exclusion Chromatography of Monomer Dimer and Trimer Mixtures*; JAOCS, 1338 (1989), 66.
- [33] S. Bastida, F.J. Sanchez-Muniz; *Polar Content vs. TAG Oligomer Content in the Frying-Life Assessment of Monounsaturated and Polyunsaturated Oils Used in Deep-Frying*; JAOCS 5 (2002).
- [34] S. Fekete, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guillaume; *Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates*; J Pharm Biomed Anal 101 (2014) 161–173, 165.
- [35] H. Wang, Z. Hao, X. Liu, S. Lin; *Analysis of Monoclonal Antibodies and Their Fragments by SEC Coupled with HRAM-MS*; The Column (15.12.2014).
- [36] M. Zhou, K. Ito; *Characterization of Polymeric Excipients by SEC-IR*; LCGC (06.01.2012).

- [37] R. Pawłowicz, B. Drozdowski; *Analiza jakościowa i ilościowa tłuszczów smażalniczych metodą HPSEC*; *Tłuszcze Jadalne*, **32** (1997), 71.
- [38] K. H. Altgelt; *Gel permeation chromatography of asphalts and asphaltenes. Part I. Fractionation procedure*; *Die Makromolekulare Chemie* 1.
- [39] W. Sakamoto, O. Nishikaze; *Purification and immunochemical properties of human low molecular weight kininogen*. *J Biochem* (1979).
- [40] A. Striegel, W.W. Yau, J.J. Kirkland, D.D. Bly; *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*; John Wiley & Sons, Inc. (2009), 393.
- [41] Harvard Apparatus; *Guide to Gel Filtration or Size Exclusion Chromatography*; (2010) 11.
- [42] I. Suárez, B. Coto; *Determination of long chain branching in PE samples by GPC-MALS and GPC-VIS: Comparison and uncertainties*; *European Polymer Journal* **49** (2013) 492.
- [43] B. Sabagh, A. Valero-Navarro; *Using Multi-Detection GPC/SEC to Determine Impact of Sterilization on Medical-Grade Polymers*; *The Column* 10 (5.06.2014)
- [44] G. Boczkaj, A. Przyjazny, M. Kamiński, *Size-exclusion chromatography for the determination of the boiling point distribution of high-boiling petroleum fractions*, *J. Sep. Sci.* **38** (2015), 741.
- [45] D. Held, Peter Kilz; *Tips & Tricks GPC/SEC: Sample Recovery and More*; *The Column* (06.10.2014)
- [46] D. Held; *Tips & Tricks GPC/SEC: The Art of Analyzing High Molar Mass Samples*; *The Column* 10 (5.06.2014)
- [47] D. Held, G. Reinhold, Peter Kilz; *Tips & Tricks GPC/SEC: U-GPC? Making GPC/SEC faster*; *The Column* 6 (06.04.2010)