



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Kokoekskluusiokromatografian hyödyntäminen polymeerianalytiikassa

Milla Salmi

Luonnonyhdistekemia

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

19.5.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pääaine: Kemia

Tekijä(t): Milla Salmi

Otsikko: Kokoeksklusiokromatografian hyödyntäminen polymeerianalytiikassa

Ohjaaja(t): Maarit Karonen, Juha-Pekka Salminen

Sivumäärä: 19 sivua

Päivämäärä: 19.5.2025

Kokoeksklusiokromatografia (engl. size exclusion chromatography, SEC) on jo 1960-luvun alussa kehitetty nestekromatografinen erotusmenetelmä. Menetelmän avulla yhdisteen komponentit saadaan eroteltua, jonka jälkeen voidaan määrittää esimerkiksi molekyylin koko, molekyylipaino ja kokojakauma. SEC:ssä erottelu perustuu molekyylien hydrodynaamiseen tilavuuteen eli niiden kokoon liuoksessa. Isommat molekyylit eluoituvat ennen pienempiä, sillä pienemmät molekyylit tarttuvat kolonnin huokosiin, joihin isommat molekyylit eivät mahdu. SEC-laitteisto koostuu liuottimen syöttöpumpusta, injektorista, kolonnista, detektorista ja tietokoneesta, jossa on ohjelmisto datan analysointiin ja kalibrointiin. SEC:ssä käytettäviä kolonneja ja detektoreita on useita erilaisia ja niitä voidaan kytkeä laitteistoon yksi tai useampia.

Polymeerit muodostavat laajan ryhmän materiaaleja, kuten muoveja ja pinnoitteita. Polymeerien rakenne määrää polymeerimateriaalien ominaisuudet ja sen myötä materiaalin kysynnän, minkä takia niiden rakenteiden selvittäminen on tärkeää. SEC:n avulla pystytään kehittämään uusia materiaaleja, valvomaan olemassa olevien tuotteiden laatua sekä havaitsemaan valmistusprosessin aikana tapahtuvat muutokset. Polymeerit ovat rakenteeltaan erittäin monimutkaisia yhdisteitä, minkä takia niiden erottamiseen tarvitaan kehittyneitä erotusmenetelmiä kuten SEC.

SEC on menetelmänä helppokäyttöinen ja se mahdollistaa molekyylipainon ja molekyylien kokojakauman määrittämisen yhdellä analyysillä. Eri detektorien käyttö SEC-analyysissä mahdollistaa useita erilaisia määrittäyksiä. Useimmiten käytetään detektoria, joka ei tuhoa näytettä, joten näyte on mahdollista kerätä talteen, jolloin näytettä voidaan analysoida lisää. SEC-analyysi on suhteellisen nopea ja helposti toistettavissa. Haaroittuneiden ja erittäin suuren molekyylipainon polymeerien analysointi on kuitenkin haastavaa SEC:llä.

Edistysellinen polymeerikromatografia (engl. advanced polymer chromatography, APC) ja poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (engl. flow field flow fractionation, FFF) ovat uudenlaisia innovaatioita SEC:stä. Nämä menetelmät tarjoavat etuja, joita SEC:ssä ei ole, mutta eivät ainakaan vielä ole pystyneet korvaamaan SEC:tä. APC-analyysi on nopeampi ja tuloksena saadaan parempi resoluutio kuin SEC-analyysillä. Yleisin FFF-tekniikka on epäsymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (engl. asymmetrical flow field flow fractionation, AF4), joka mahdollistaa suurten polymeerien analysoinnin, mikä ei APC:llä onnistu ja on SEC:lläkin haastavaa.

Avainsanat: edistysellinen polymeerikromatografia, geelipermeaatiokromatografia, kemiallinen analyysi, nestekromatografia, poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi

Sisällys

Lyhenneluettelo	4
1. Johdanto	5
2. Polymeerianalytiikka	6
3. Kokoekskluusiokromatografian perusteet	8
3.1. Toimintamekanismi ja kolonnin valinta.....	8
3.2. Kokoekskluusiokromatografialaitteisto	10
3.3. Detektorin valinta.....	11
4. Kokoekskluusiokromatografian edut ja haasteet.....	13
5. Uudet innovaatiot	14
5.1. Edistyksellinen polymeerikromatografia	14
5.2. Poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi	15
6. Yhteenveto	17
Viitteet	18

Lyhenneluettelo

AF4	epäsymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (engl. asymmetrical flow field flow fractionation)
APC	edistyksellinen polymeerikromatografia (engl. advanced polymer chromatography)
DAD	diodirividetektori (engl. diode-array detector)
ELSD	haihduttava valonsirontadetektori (engl. evaporative light-scattering detector)
ESI	sähkösumutusionisaatio (engl. electrospray ionization)
FPP	täysin huokoiset partikkelit (engl. fully porous particles)
FFF	poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (engl. flow field flow fractionation)
GFC	geelisuodatuskromatografia (engl. gel filtration chromatography)
GPC	geelipermeaatiokromatografia (engl. gel permeation chromatography)
MALDI-ToF	matriisiavusteinen laser desorptio ionisaatio yhdistettynä lentoaika-analysointiin (engl. matrix assisted laser desorption ionization–time of flight)
MALS	monikulmainen valonsironta (engl. multiangle light scattering)
RID	taitekerroindetektori (engl. refractive index detector)
SEC	kokoekskluusiokromatografia (engl. size exclusion chromatography)
SPP	pinnalta huokoiset partikkelit (engl. superficially porous particles)
THF	tetrahydrofuraani (engl. tetrahydrofuran)
VWD	muuttuvan aallonpituuden detektor (engl. variable wavelength detector)

1. Johdanto

Kromatografia on menetelmä, jossa yhdisteen komponentit erotellaan käyttäen kahta eri faasia (Ahuja S, 2003). Erottuminen perustuu yhdisteiden eri vahvuisiin intermolekulaarisiin vuorovaikutuksiin liikkuvan ja stationäärifaasin kanssa (Vitha, 2017). Eri kromatografisilla menetelmillä voidaan erottaa suuri määrä erilaisia yhdisteitä, ja siksi kaikista erotusmenetelmistä käytetään useimmiten juuri kromatografiaa, kun halutaan erottaa monimutkaisia yhdisteitä (Ahuja S, 2003). Kromatografian avulla on mahdollista esimerkiksi löytää uusia lähestymistapoja erilaisten sairauksien hoitoon sekä edistää uusien lääkkeiden löytämistä (Ahuja S, 2003).

Polymeerien erottamiseen yleisesti käytetty menetelmä on kokoeksklusiokromatografia (engl. size exclusion chromatography, SEC). Menetelmä on kehitetty jo 1960-luvun alussa (Porath B Lindner, 1961), ja se tunnetaan myös nimillä geelipermeaatiokromatografia (engl. gel permeation chromatography, GPC) ja geelisuodatuskromatografia (engl. gel filtration chromatography, GFC) (Held and Kilz, 2021). Aluksi menetelmä soveltui ainoastaan vesiliukoisille yhdisteille, ja kolonni kesti vain matalia virtausnopeuksia ja paineita (Striegel, 2022). Laitteisto tuli kaupallisesti saataville vasta 1980-luvulla (Striegel, 2022). SEC:n avulla yhdisteiden komponentit saadaan eroteltua, minkä jälkeen on mahdollista määrittää esimerkiksi molekyylin koko, molekyyliaino ja kokojakauma (Lubomirsky et al., 2021). Nämä ominaisuudet määrittävät tuotteen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (Lubomirsky et al., 2021), ja siksi SEC onkin yleisimmin käytetty menetelmä synteettisten polymeerien karakterisoinnissa (Berek, 2010). SEC:tä käytetään myös esimerkiksi proteiinien, polysakkaridien ja nanopartikkelien erotukseen ja karakterisointiin (Lubomirsky et al., 2021). SEC:ssä molekyylien erottuminen perustuu niiden hydrodynaamiseen tilavuuteen eli niiden kokoon liuoksessa, jolloin isommat molekyylit eluoituvat ennen pienempiä, koska pienemmät molekyylit vuorovaikuttavat kolonnin huokosten kanssa, joihin isommat molekyylit eivät mahdu (Lubomirsky et al., 2021).

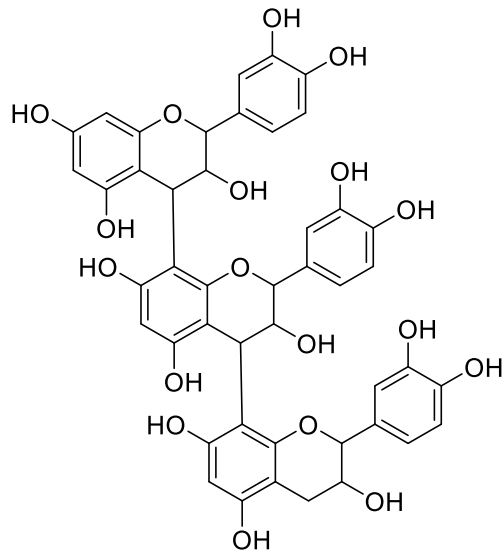
SEC:stä on kehitetty uudenlainen innovaatio edistyksellinen polymeerikromatografia (engl. advanced polymer chromatography, APC), joka mahdollistaa polymeerien erottelun lyhyemmässä ajassa, paremmalla resoluutiolla ja tarkkuudella (Meunier et al., 2021). Toinen uusi innovaatio on poikkivirtauskenttävirtausfraktiointi (engl. flow field flow fractionation, FFF), josta eniten käytetty menetelmä on epäsymmetrinen poikkivirtauskenttävirtausfraktiointi (engl. asymmetrical flow field flow fractionation, AF4). AF4 perustuu molekyylien kokoeroihin ja virtaussuuntaan nähden kohtisuorassa olevaan poikkivirtauskenttään. AF4 ei kuitenkaan ole yhtä paljon käytetty menetelmä kuin SEC, mutta se tarjoaa kuitenkin mahdollisuuksia, joita SEC:ssä ei ole (Meunier et al., 2021).

Polymeerien rakenteen selvittäminen on tärkeää, sillä rakenne määrää polymeerimateriaalien ominaisuudet ja lopulta niiden kysynnän markkinoilla (Meunier et al., 2021). Polymeerit ovat rakenteeltaan erittäin monimutkaisia, minkä takia kehittyneet erotusmenetelmät ovat välttämättömiä niiden karakterisoinnissa. SEC:n avulla pystytään myös kehittämään uusia materiaaleja ja valvomaan jo olemassa olevien tuotteiden laatua (Meunier et al., 2021). Kun raaka-aineista valmistetaan tuotteita, tapahtuu hajoamista ja derivatisointia haluttujen ominaisuuksien saavuttamiseksi, joten karakterisointi myös prosessin aikana on erittäin tärkeää (Lubomirsky et al., 2021). Lisäksi SEC:tä käytetään paljon teollisuudessa sekä kliinisessä ja akateemisessa tutkimuksessa (Lubomirsky et al., 2021).

SEC:llä on siis merkittävä rooli erilaisten yhdisteiden analysoinnissa ja menetelmän kehittyessä sen merkitys kasvaa tulevaisuudessa. Tässä tutkielmassa esitellään SEC menetelmänä ja tarkastellaan sen hyödyntämistä polymeerianalytiikassa. Tutkielmassa esitellään myös kaksi uutta innovaatiota SEC:stä. Lisäksi käsitellään menetelmän etuja ja haasteita sekä tulevaisuuden näkymiä.

2. Polymeerianalytiikka

Polymeerit koostuvat monomeereistä, jotka liittyvät toisiinsa kemiallisin sidoksin (kuva 1). Polymeerien suuri molekyylipaino on niiden merkittävin ominaisuus, joka aiheuttaa polymeerien fysikaaliset ominaisuudet (Berek, 2010). Makromolekyylit nimetään niiden molekyylipainon mukaan, joko oligomeereiksi tai suurpolymeereiksi, joita kutsutaan usein myös erittäin suuren molekyylipainon yhdisteiksi. Oligomeerien molekyylipainot vaihtelevat muutamasta sadasta muutamaan tuhanteen g/mol, kun taas suurpolymeerien molekyylipaino voi olla jopa miljoonia g/mol. Oligomeerimolekyylejä, joissa on kaksoissidoksia, kutsutaan makromonomeereiksi. Kopolymerit koostuvat kahdesta tai useammasta erilaisesta monomeeristä (Berek, 2010).



Kuva 1. Proantosyanidiini on useista flavonoidiyksiköistä koostuva fenolinen yhdiste, jota kasvit tuottavat.

Polymeerimateriaalien ominaisuuksiin vaikuttaa esimerkiksi molekyylipaino ja kemiallinen rakenne (Berek, 2010). Funktionaaliset ryhmät vaikuttavat varsinkin oligomeerien ominaisuuksiin, koska niiden suhteellinen merkitys oligomeereissä on suurempi kuin suurpolymeereissä. Synteettiset polymeerit muodostavat laajan ryhmän materiaaleja, kuten muoveja, pinnoitteita ja lisäaineita (Berek, 2010). Synteettiset polymeerit esitetään usein rakenteeltaan hyvin yksinkertaisina, mutta todellisuudessa ne koostuvat erittäin monimutkaisista rakenteista (Meunier et al., 2021). Haaroittuneet polymeerit ovat tärkeimpiä polymeerejä, joihin kuuluvat polyolefiinejä ja polysakkarideja (Gaborieau and Castignolles, 2011). Esimerkiksi muovipussien pääkomponentti, polyeteeni, on haaroittunut polymeeri. Haaroittuminen on merkittävässä roolissa polymeeriketjun dynamiikassa. Se on tärkeää käyttöominaisuuksien kuten mekaanisten ja kiinnittymiseen liittyvien ominaisuuksien sekä sulavuuden kannalta (Gaborieau and Castignolles, 2011).

Makromolekyylien kromatografialla tarkoitetaan pääasiassa proteiinien, peptidien, hiilihydraattien, oligonukleotidien ja nukleiinihappojen erottamista (Hostettmann et al., 1997). Näillä biopolymeereillä on usein hydrofobisia ja hydrofiilisiä ominaisuuksia ja ne denaturoituvat helposti. Makromolekyylejä voidaan analysoida useilla erilaisilla menetelmillä riippuen siitä, mitä halutaan selvittää. SEC:n avulla polymeerit saadaan erotettua toisistaan niiden tarkempaa analyysiä varten. Peptidien ja proteiinien erottaminen on yksi vaikeimmista kromatografian aloista, koska näytteet ovat monimutkaisia seoksia, jotka sisältävät hyvin samankaltaisia yhdisteitä. Myös polaaristen ja vesiliukoisten yhdisteiden eristäminen vaatii kehittyneitä tekniikoita kuten SEC (Hostettmann et al., 1997).

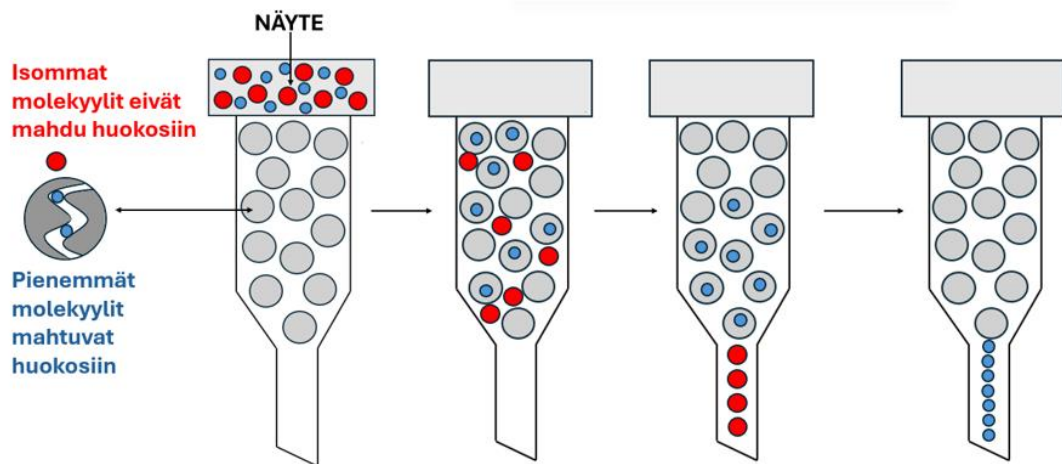
3. Kokoeksluusiokromatografian perusteet

3.1. Toimintamekanismi ja kolonnin valinta

Molekyylien erottuminen perustuu niiden hydrodynaamiseen tilavuuteen, jolloin isommat molekyylit eluotuvat ennen pieniä, kuten kuvassa 2 (Lubomirsky et al., 2021). Polymeerien molekyylipainon ja hydrodynaamisen tilavuuden välistä suhdetta voidaan kuvata Einstein Simhan yhtälöllä,

$$[\eta] = \gamma NV_h/M \quad (1)$$

jossa $[\eta]$ on polymeerin viskositeetti, γ on Shimaparametri, joka riippuu makromolekyylin geometriasta, N on avogadron vakio, V_h on hydrodynaaminen volyyymi ja M on polymeerin molekyylipaino (Dawkins and Hemmingt, 1975).



Kuva 2. Kokoeksluusiokromatografian toimintaperiaate (Giridhar et al., 2017; Kumari et al., 2023).

Kromatografiaa käytettäessä on tärkeää tietää kolonnin ominaisuuksien vaikutus kolonnin toimintaan (Held and Kilz, 2021). Kolonnin ominaisuudet vaikuttavat sen tehokkuuteen ja siihen, minkä kokoisia analyyttejä voidaan erottaa (Held and Kilz, 2021). Kolonnin koko vaikuttaa myös siihen, kuinka suurta liuostilavuutta ja konsentraatiota voidaan käyttää (Lubomirsky et al., 2021). Kolonnivaihtoehtoja on erilaisia, mutta SEC:ssä käytetään yleisimmin analyyttistä kolonnia, jonka sisäinen halkaisija on 0,7–0,8 cm ja pituus 25–30 cm (Held and Kilz, 2021). Preparatiivisella kolonnilla, jossa pituus on sama, mutta sisäinen halkaisija suurempi, voidaan erottaa suurempia näyte määriä. Yleensä kolonni valitaan käytettävän stationaarifaasin mukaan (Held and Kilz, 2021). Kolonnin geometrinen tilavuus voidaan laskea kaavalla,

$$V_C = V_s + V_0 \quad (2)$$

jossa V_c on geometrinen tilavuus, V_s on stationaarifaasin tilavuus ja V_0 on liikkuvan faasin tilavuus (Lubomirsky et al., 2021). Käänteisfaasin ja hydrofiilisten vuorovaikutusten kolonnit ovat mielenkiintoinen vaihtoehto stationaarifaasiksi, sillä niillä on monia hyviä ominaisuuksia, kuten yhteensopivuus orgaanisten liuottimien ja veden kanssa, lyhyt tasapainottumisaika ja lisäksi ne ovat suhteellisen edullisia (Meunier et al., 2021).

Kolonnin valinnassa on huomioitava kolme tärkeää asiaa (Lubomirsky et al., 2021). Stationaarifaasin pitää olla inertti eli analyyttien ja stationaarifaasin väliset reaktiot pitää estää. Myös muut ei-toivotut vuorovaikutukset pitää estää esimerkiksi valitsemalla liikkuva faasi, joka solvatoi stationaarifaasia, tai lisäämällä liikkuvaan faasiin modifikaattoreita kuten suojoja, happoja tai emäksiä. Lisäksi molekyyliellä pitää olla esteetön pääsy huokosten rakenteeseen, koska sen avulla saadaan minimoitua näyterintaman leveneminen. Massan siirtyminen aiheuttaa piikkien levenemistä kromatogrammissa. Makromolekyylien diffuusio on hidasta, joten liikkuvassa faasissa on suuri resistanssi massan siirtymiselle, joka taas aiheuttaa piikin levenemistä kromatogrammissa.

Lisäksi stationaarifaasin fysikaalisten ominaisuuksien pitää olla riittävät (Lubomirsky et al., 2021). Fysikaalisiin ominaisuuksiin vaikuttavat partikkelien ja kolonnin koko sekä huokosten koko ja volyyymi (Lubomirsky et al., 2021). Partikkelien koko vaikuttaa analyysin tehokkuuteen. Pieni partikkelikoko minimoi dispersion vaikutuksen, jonka takia pienemmällä partikkelikoolla saadaan parempi resoluutio (Held and Kilz, 2021). Alle 2 μm :n partikkeleita on käytetty erittäin tehokkaassa ja nopeassa ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografiassa (Lubomirsky et al., 2021). Näiden partikkelien käyttäminen SEC:ssä on kuitenkin haastavaa, koska näin pienien partikkelien huokoskoko on rajallinen ja korkea paine voi vaikuttaa analyyttien stabiiliuteen (Lubomirsky et al., 2021). Lisäksi suuret molekyylipainot ja korkea viskositeetti vaativat suurempaa partikkelikokoa, joten optimi partikkelikoko riippuu menetelmästä (Held and Kilz, 2021).

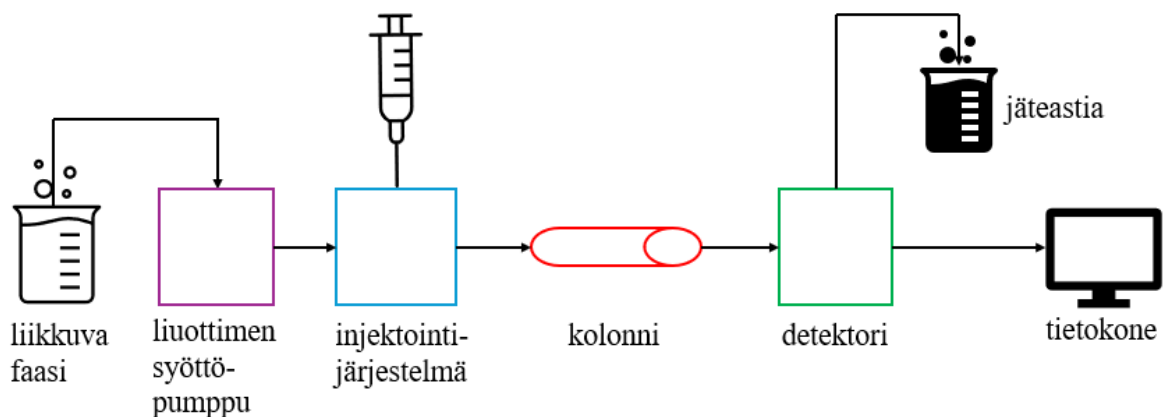
Huokosten koko määrittää, minkä kokoisia yhdisteitä voidaan erottaa (Lubomirsky et al., 2021). Huokoisuusominaisuudet vaikuttavat kromatografian laatuun, koska huokokset määrittävät kohdan, jossa erotus tapahtuu. Oligomeerien ja monodispersoitujen polymeerien erottelussa käytetään yleensä kolonnia, joka on pakattu polymeeripartikkeleilla, jossa huokosten kokojakauma on kapea. Laajemmilla molekyylipainoalueilla suositellaan kuitenkin käyttämään laajempaa huokosten kokojakaumaa (Lubomirsky et al., 2021). Lähes kaikissa SEC-menetelmissä käytetään stationaarifaasissa täysin huokoisia partikkeleita (engl. fully porous particles, FPP) (Meunier et al., 2021). Myös pinnalta huokoisia partikkeleita (engl. superficially porous particles, SPP), joissa on kiinteä ydin ja huokoinen kuori, voidaan käyttää SEC analytiikassa. SPP:t ovat tehokkaampia lyhyemmällä ajoajalla ilman paineen kasvattamista, mutta FPP:t ovat kuitenkin termodynaamisilta ominaisuuksiltaan parempia (Meunier et al., 2021).

Aluksi stationaarifaasina käytettiin polysakkaridigeelejä (Porath B Lindner, 1961) ja osittain ristisilloitunutta polyakryyliamidia (Hjertizn and Mosbach, 1962). Nestemäisissä olosuhteissa nämä materiaalit ovat sopivia biopolymeerien erottamiseen, mutta niiden alhainen

mekaaninen ja kemiallinen stabiilisuus rajoittaa niiden käyttöä korkeissa paineissa sekä orgaanisen liikkuvan faasin käyttöä, mikä tarvitaan synteettisten polymeerien erottamiseen (Lubomirsky et al., 2021). Tämän rajoituksen myötä synteettisten polymeerien erottamiseen alettiin käyttää mekaanisesti kestäviä polystyreenipartikkeleja (Lubomirsky et al., 2021). Nykyään stationaarifaasien materiaalit ovat joko silika- tai polymeeripohjaisia (Held and Kilz, 2021). Silikapartikkelit ovat mekaanisesti kestäviä ja mahdollistavat suuren huokoskoon (Lubomirsky et al., 2021). Silikapartikkeleita käytettäessä eluentin pH-alue on kuitenkin rajattu n. kahdeksaan, sillä silikapartikkelit hajoavat emäksisessä pH:ssa. Monoliitit ovat huokoisia partikkeleita ja ne ovat yksi vaihtoehtoinen materiaali SEC-kolonneille, sillä niillä on joitakin etuja verrattuna perinteisiin hiukkasmaisiin stationäärifaaseihin. Monoliitit mahdollistavat esimerkiksi suurien virtausnopeuksien käytön alhaisella paineella (Lubomirsky et al., 2021).

3.2. Kokoekskluusiokromatografialaitteisto

SEC-laitteisto koostuu useasta osasta, joita ovat liuottimen syöttöpumppu, manuaalinen tai automaattinen korkean paineen injektointijärjestelmä ja yksi tai useampi SEC-kolonne (kuva 3) (Held and Kilz, 2021). Lisäksi tarvitaan yksi tai useampi detektori sekä tietokone, jossa on ohjelmisto datan kalibrointiin ja analysointiin. Laitteistoon voidaan myös tarvittaessa lisätä kaasunpoistaja ja/tai kolonnin lämmitin tai termostaatti (Held and Kilz, 2021).



Kuva 3. Kokoekskluusiokromatografialaitteisto (Giridhar et al., 2017; Held and Kilz, 2021; Kumari et al., 2023).

Analysoitava näyte liuotetaan samaan liuottimeen, jota käytetään yleensä myös liikkuvassa faasissa (Held and Kilz, 2021). Laitteistoon injektoidaan analysoitava näyte, joka kulkeutuu kolonniin liikkuvan faasin mukana (Held and Kilz, 2021). Liikkuvassa faasissa voidaan käyttää liuottimena esimerkiksi suoloja, aminohappoja tai orgaanisia liuottimia (Kumari et al., 2023). Polymeerianalytiikassa yleisesti käytetty liuotin on tetrahydrofuraani (engl. tetrahydrofuran, THF),

sillä se on yhteensopiva kolonnin, detektorin ja polymeerien kanssa (Meunier et al., 2021). THF:n käyttöön liittyy ympäristö-, terveys- ja turvallisuusriskejä, minkä takia vaihtoehtoisten liuotinseosten käyttöä on kokeiltu. Vaihtoehtoiset liuotinseokset ovat toimineet SEC-analyyseissä lähes ideaalilla tavalla, mutta ne rajoittavat detektorin valintaa ja vaikeuttavat erityisesti tarkan molekyylipainon määrittystä (Meunier et al., 2021).

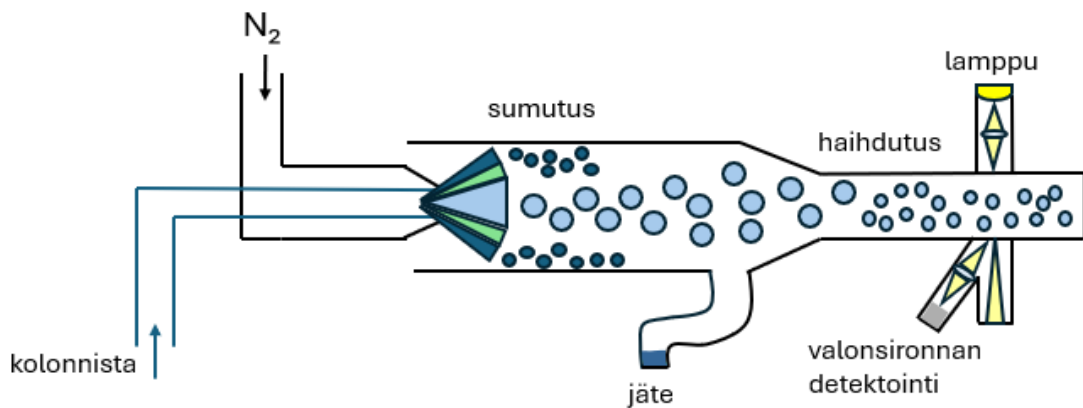
Kun käytetään SEC:tä molekyylipainojakauman tarkkaan määrittämiseen, on tärkeää, että erottuminen perustuu koko jakauman alueella puhtaasti molekyylien kokoon eikä muihin tekijöihin, kuten kemiallisiin vuorovaikutuksiin (Meunier et al., 2021). Suuri virtausnopeus tai pieni partikkelikoko voi vaikuttaa negatiivisesti SEC:n toimintaan tutkittaessa polymeerejä, joilla on suuri molekyylipaino. Erilaiset erotustekijät, kuten epätasainen kulkeutuminen liikkuvan ja stationaarifaasin välillä vaikuttavat myöhäiseen eluotumisaikaan. Tämän vuoksi suurpolymeerien erotus on haastavaa SEC:llä. Suurpolymeerien erotuksessa on tärkeää, että kolonnin halkaisija ja partikkelikoko ovat suuria, virtausnopeus ja liuoksen viskositeetti ovat pieniä sekä kolonnin lämpötila on korkea (Meunier et al., 2021).

3.3. Detektorin valinta

Markkinoilla on paljon erilaisia kromatografiadetektoreita, joista kuitenkin kaikki eivät ole hyödyllisiä makromolekyylien analysoinnissa (Held and Kilz, 2021) SEC:ssä käytettäviä detektoreita ovat esimerkiksi taitekerroindetektorit (engl. refractive index detector, RID), muuttuvan aallonpituuden detektorit (engl. variable wavelength detector, VWD), diodirividetektorit (engl. diode-array detector, DAD), haihduttava valonsirontadetektorit (engl. evaporative light-scattering detector, ELSD), online-valonsirontadetektorit (online light scattering detector), online-viskositeetidetektorit (online viscosity detector), massaspektrometri (mass spectrometer) ja infrapunadetektorit (IR detector) (Held and Kilz, 2021).

RID on yleisimmin käytetty detektorit SEC-analyyseissä, koska sillä on mahdollista analysoida lähes kaikenlaisia analyyttejä liuotimesta ja aallonpituudesta riippumatta (Kumari et al., 2023). RID mittaa referenssiaineen taitekertoimen muutosta verrattuna näytteen taitekertoimen muutokseen (Held and Kilz, 2021). RID:tä käytetään ensisijaisesti konsentraatioiden mittaamiseen, mutta isorefraktiivisia näytteitä ei voida kuitenkaan havaita RID:llä. RID:n tasapainottumisaika on suhteellisen pitkä ja selektiivisyys on pieni. VWD ja DAD mittaavat UV-absorptiota valitulla aallonpituudella näytteistä, joissa on kromoforeja. Nämä ovat yleisimmin käytettyjä detektoreita proteiinien karakterisoinnissa. Nämä detektorit ovat helppokäyttöisiä ja herkkiä verrattuna RID:hen, mutta näillä ei voida kuitenkaan analysoida polymeerejä, joissa ei ole kromoforeja. ELSD haihduttaa liikkuvan faasin, josta muodostuu hiukkasvirta, jossa hiukkasten määrä muuttuu analyytin konsentraation mukaan (kuva 4). ELSD on hyvin herkkä ja soveltuu erilaisille

liuottingradienteille, mutta sitä ei voida käyttää suurilla virtausnopeuksilla eikä sillä voida analysoida haihtuvia yhdisteitä (Held and Kilz, 2021).



Kuva 4. Haihduttava valonsirontadetektor (Christen and Veuthey, 2012; Scherf-Clavel, 2016).

Online-valonsirontadetektor mittaa yhdessä tai useammassa valitus- tai havaintokulmassa liuoksessa olevien makromolekyylien valonsirronnan aikakeskiarvoista intensiteettiä (Held and Kilz, 2021). Detektoria käytetään homopolymeerien ja proteiinien absoluuttisten molekyyliainepainojen ja polymeerirakenteiden määrittämiseen liuoksessa. Online-viskositeettidetektoreita on saatavilla useita erilaisia. Detektorilla mitataan näytteen ja referenssiaineena käytetyn puhtaan liuotimen välisiä paine-eroja. Viskositeettidetektorilla mitataan ominaisviskositeetteja ja molekyyliainepainoja. Erilaisia massaspektrometrisiä menetelmiä käytetään makromolekyylien analysoinnissa. Niiden avulla määritetään homopolymeerien ja kopolymeerien absoluuttisia molekyyliainepainoja sekä havaitaan polymeerien rakenteita. Online-IR-detektoria käytetään korkean lämpötilan SEC-analyysissä polyolefiinin karakterisointiin. Monissa muissa SEC-sovelluksissa online IR detektoria ei voida käyttää, koska tyypillisesti käytetyt liuottimet absorboivat samalla alueella kuin tutkittavat polymeerit (Held and Kilz, 2021).

Yleisimmin määritettäessä absoluuttista molekyyliainepainojakaumaa SEC:llä yhdistetään konsentraatiota mittaava detektor ja staattinen valonsirontadetektor (Held and Kilz, 2021). Massaspektrometri mahdollistaa polymeerin jokaisen makromolekyyliketjun analysoinnin ja siksi se onkin korvaamaton väline synteettisten polymeerien analysoinnissa (Jovic et al., 2019). Matriisiavusteinen laser desorptio ionisaatio yhdistettynä lentoaika-analysointiin (engl. matrix assisted laser desorption ionization–time of flight, MALDI-ToF) ja sähkösumutus-ionisaatio (engl. electrospray ionization, ESI) ovat yleisimmin käytettyjä massaspektrometrisiä menetelmiä SEC-analyysissä (Held and Kilz, 2021). MALDI-ToF:n käyttö rajoittuu kuitenkin pieniin molekyyliainepainoihin, eikä sitä voida soveltaa radikaalipolymerointiin, jota käytetään monien pinnoitteiden ja maalien valmistuksessa (Gaborieau and Castignolles, 2011). SEC:n ja ESI-MS:n

yhdistäminen nopeuttaa mittauksia ja mahdollistaa rakenteen määrittämisen kromatografisen erottelun lisäksi (Jovic et al., 2019).

4. Kokoekskluusiokromatografian edut ja haasteet

SEC:n etuna on sen nopeus ja hyvä erottelukyky (Kumari et al., 2023). Lisäksi SEC on menetelmänä helppokäyttöinen, etenkin käytettäessä vain yhtä detektoria (Striegel, 2022). SEC on myös suhteellisen halpa sekä helposti toistettavissa (Berek, 2010). Ennen SEC:n keksimistä tarvittiin pitkiä prosesseja ja useita fraktiointeja, ja saatiin silti vain osittainen käsitys molekyylipainon jakaumasta (Striegel, 2022). SEC:ssä kaksi kolonnia, eri kokoisilla huokoisilla voidaan yhdistää, mikä mahdollistaa molekyylipainon ja makromolekyylien kokojakauman määrittämisen yhdellä analyysillä. Lisäksi eri detektorien käyttäminen SEC-analyysissä mahdollistaa useita erilaisia määrittäyksiä (Striegel, 2022). Molekyylipainon ja kokojakauman lisäksi SEC:llä voidaan määrittää haaroittuneiden polymeerien molekyyliominaisuudet sekä liuoksessa olevien eristettyjen makromolekyylien koot (Berek, 2010). Nykyään käytetään yleensä detektoria, joka ei tuhoa näytettä, joten näyte saadaan kerättyä talteen ja sitä voidaan analysoida lisää (Held and Kilz, 2021). Muihin kromatografisiin menetelmiin verrattuna SEC:n analyysiaika on lyhyt ja liikkuvaa faasia ei tarvita niin paljoa (Kumari et al., 2023).

Useiden hyvien puolien lisäksi SEC:ssä on kuitenkin omat haasteensa. SEC ei erottele yhdisteitä molekyylipainon vaan koon mukaan, jonka takia samankokoiset molekyylit eri molekyylipainoilla eluoituvat samaan aikaan (Striegel, 2022). SEC:n erotusselektiivisyys on myös rajallinen, sillä kolonnin koko rajoittaa käytettävien huokosten kokoa (Berek, 2010). Erittäin suuren molekyylipainon makromolekyylien analysointi on siis haastavaa SEC:llä (Lubomirsky et al., 2021). Haaroittuminen vaikuttaa polymeerien viskoosiominaisuuksiin ja siten se vaikuttaa myös näiden polymeerien erottumiseen SEC:ssä (Gaborieau et al., 2007). Muutaman pitkäketjuisen haaran on osoitettu johtavan polymeerien huonoon erottumiseen SEC:ssä (Gaborieau et al., 2007). SEC on laajimmin saatavilla oleva menetelmä haaroittuneiden polymeerien erottamiseen, mutta sen erottelumekanismi ei kuitenkaan ole kaikkein sopivin haaroittuneille polymeereille (Gaborieau and Castignolles, 2011). Vaikka erottelu tapahtuukin nopeasti, koko SEC-analyysin nopeus on rajallinen ja nopeuden kasvattaminen heikentää tarkkuutta (Berek, 2010).

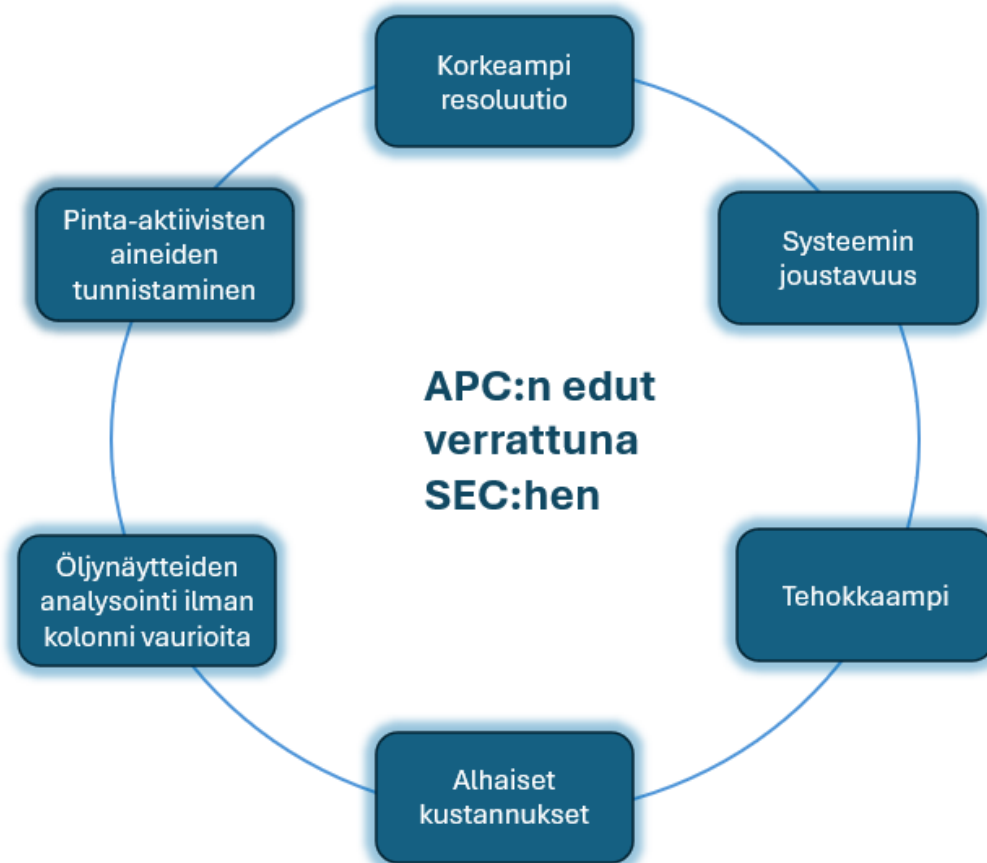
Onnistunut SEC-analyysi vaatii, että kromatografialaitteiston yleistietämyksen lisäksi kolonnia käytetään oikein ja näyte sekä eluentti valmistetaan oikein (Held and Kilz, 2021). Näyte ja eluentti pitää valmistaa niin, että liuotin on huolellisesti suodatettu sekä homogeeninen, puhdas ja kaasuton. Kolonni pitää tasapainottaa analyysissä käytettävällä eluentilla ja lämpötilalla ennen varsinaista analyysiä. Eluentin ja näytteen pitää myös olla yhteensopivia käytettävän kolonnin kanssa (Held and Kilz, 2021).

5. Uudet innovaatiot

5.1. Edistyksellinen polymeerikromatografia

APC on uusi innovaatio SEC:stä eli myös APC:n avulla on mahdollista erottaa oligomeeriseosten molekyylit, niiden hydrodynaamisen tilavuuden perusteella, säädettävällä massa-alueella (Berg et al., 2020). APC on tullut kaupallisesti saataville 2013 ja samana vuonna menetelmää käytettiin ensimmäistä kertaa synteettisten polymeerien erottamiseen orgaanisessa liuottimessa (Meunier et al., 2021). Menetelmässä polymeerit erotetaan liuoksessa käyttäen kolonnia, joka on pakattu alle 3 μm :n silloitetuilla etyleeni hybridi (engl. bridged ethylene hybrid, BEH) partikkeleilla. Partikkelit ovat kiinteitä ja niillä on suuri huokoskoko (Meunier et al., 2021). Kolonni kestää suuria paineita ja mahdollistaa eri liuotinvaihtoehtojen käytön ilman suorituskyvyn heikkenemistä (Berg et al., 2020). APC:n ja SEC:n välillä on havaittu olevan hyvä vastaavuus (Meunier et al., 2021).

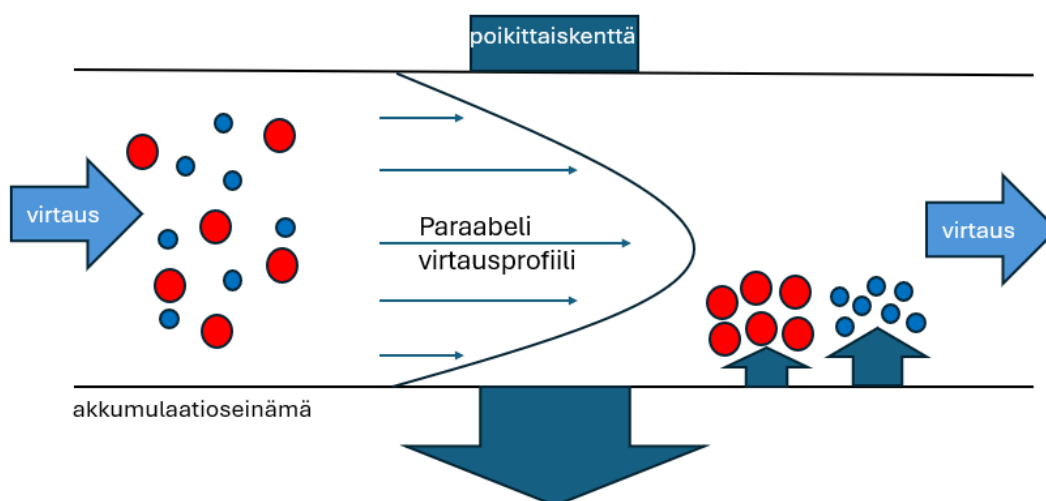
APC:n avulla erotus voidaan tehdä jopa kymmenen kertaa nopeammin ja saaden parempi resoluutio kuin tavallisella SEC-analyysillä (kuva 5) (Meunier et al., 2021). APC:llä ei voida kuitenkaan karakterisoida erittäin suuren molekyylipainon polymeerejä, johtuen suurten molekyylien hajoamisesta suurilla virtausnopeuksilla ja/tai leikkausvoimista johtuvasta muodonmuutoksesta (Meunier et al., 2021). APC:n avulla voidaan siis erottaa oligomeerejä, joilla on sama molekyylipaino, mutta erilainen sekvenssi (Berg et al., 2020). APC-kolonnit sopivat erittäin hyvin polaaristen liuottimien kuten metanolin kanssa (Vancoillie et al., 2016). APC on tehokas menetelmä myös muiden yhdisteiden kuten teknisten ligniinien karakterisointiin nopeasti ja informatiivisesti (Sulaeva et al., 2017). APC:tä on käytetty yhdessä ainakin massaspektrometrin ja infrapunadetektorin kanssa (Berg et al., 2020). Menetelmää voidaan nopeuttaa entisestään, kun saadaan alle 2 μm :n pakkausmateriaaleja sopivalla huokoskolla, ja jotka vuorovaikuttavat vähemmän kuin BEH-partikkelit (Meunier et al., 2021).



Kuva 5. Edistyneen polymeerikromatografian edut verrattuna kokoeksklusiokromatografiaan.

5.2. Poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi

FFF on kehitetty samoihin aikoihin kuin SEC, mutta sitä on käytetty kuitenkin SEC:hen verrattuna suhteellisen vähän (Meunier et al., 2021). Polymeerien erottaminen FFF:llä perustuu analyttien erilaisiin ominaisuuksiin, jotka riippuvat FFF-tekniikassa käytetystä kentästä (kuva 6) (Meunier et al., 2021). Julkaistujen artikkeleiden ja myytyjen laitteistojen perusteella AF4 on eniten käytetty FFF-tekniikka. AF4 onkin nykyään vakiintunut analyysimenetelmä, jolla on kiinnostavia tulevaisuudennäkymiä makromolekulaaristen, kolloidisten ja pienhiukkasmateriaalien analysoinnissa (Meunier et al., 2021). Vaikka menetelmä on vähemmän käytetty kuin SEC, siinä on kuitenkin joitakin etuja, joita SEC:ssä ei ole (Malik and Pasch, 2016).



Kuva 6. Poikittaisvirtauskenttävirtausfraktioinnissa molekyylit erotetaan kohdistamalla ulkoinen poikittaiskenttä kohtisuoraan ohuessa kanavassa virtaavaa näyteliuosta vastaan (Malik and Pasch, 2016; Perkiö, 2013).

Yhtenä etuna on se, että kanavassa on alhaisempi leikkausvoimista johtuva voima kuin pakatussa kolonnissa (Meunier et al., 2021). Tämä etu minimoi erittäin suurten polymeerien hajoamista, jota voi SEC-kolonnissa tapahtua. Lisäksi tämä mahdollistaa esimerkiksi ei-kovalenttisten vuorovaikutuksen kautta syntyvien aggregaattien tutkimista ja tämä etu on mahdollistanut AF4:n sovellutukset biolääketieteessä. AF4 on yksi tärkeimmistä analyttisistä menetelmistä tärkkelyksen karakterisoinnissa, joka on muuten ollut haastavaa. AF4:n avulla on myös mahdollista erottaa isompia yhdisteitä kuin SEC:llä, ja menetelmä sopii useimmiten paremmin haaroittuneiden polymeerien analysointiin. Useasti myös liuottimien vuorovaikutus AF4 kalvon on vähäisempää kuin SEC:n pakkausmateriaalien kanssa. AF4:n yhdistäminen monikulmaiseen valonsironta (engl. multiangle light scattering, MALS) detektoriin on laajentanut tekniikan soveltamista käytännössä huomattavasti. Myös erilaisten materiaalien käyttöä keräysseinämässä on tutkittu, minkä avulla on saavutettu parempi resoluutio ja selektiivisyys. AF4 on mahdollisesti myös monipuolisempi erotteluvälien, erotuskyvyn ja analyysiajan suhteen ilman, että kaupallisten kolonnien saatavuus rajoittaa sitä (Meunier et al., 2021).

AF4:n huono puoli SEC:hen verrattuna on se, että menetelmässä tarvitaan kalvo helpottamaan ristivirtausta (Meunier et al., 2021). Lisäksi joissakin sovelluksissa sopivan kalvon löytäminen voi rajoittaa menetelmän käyttöä. Fraktiot, joissa on pienen molekyylipainon yhdisteitä, voivat kulkea huokoisen kalvon läpi, mikä rajoittaa fraktioista saatavia tietoja. Fokusointi/relaksointivaiheessa voi joissakin tapauksissa tapahtua näytteen häviämistä, jolloin näytteen talteenotto jää alhaiseksi (Meunier et al., 2021). FFF:n käyttöä rajoittaa

fokusointi/tarkennusvaiheeseen liittyvät tekniset ratkaisut, ja siksi se on tutkimuksen kohteena tulevaisuudessakin (Wang et al., 2018). AF4-tekniikan ei ole siis tarkoitus korvata SEC:tä vaan sen olisi tarkoitus olla täydentävä tekniikka (Meunier et al., 2021).

6. Yhteenveto

SEC on yleisimmin käytetty menetelmä synteettisten ja luonnollisten polymeerien karakterisoinnissa sekä molekyylipainon ja molekyylipainonjakauman määrittämisessä. Esimerkiksi uuden polymeerin syntetisointi laboratoriossa on lähes mahdotonta ilman SEC:tä. Yhdisteiden komponenttien erottaminen ennen tarkempaa analyysiä on tärkeä, jopa välttämätön vaihe tutkimusta. Lisäksi erilaisten detektorien käyttö SEC-analyyseissä mahdollistaa useita erilaisia määrittäyksiä. Tulevaisuudessakin SEC:llä on varmasti merkittävä rooli käytettäessä sitä yksin ja yhdessä muiden spektroskopisten menetelmien kanssa. SEC:tä pitää kuitenkin kehittää menetelmänä ja kehittämisessä pitäisi keskittyä erotuksen lämpötilan ja nopeuden nostamiseen. Myös haaroittuneiden ja erittäin suurten polymeerien analysointi on vielä haastavaa SEC:llä. Valvomattomien erottelujen helpottamiseksi, SEC:n pitäisi tulevaisuudessa olla myös täysin automatisoitu. Lisäksi koulutus tällä alalla on tulevaisuudessa ensiarvoisen tärkeää.

APC:n ja AF4:n merkitys tulevaisuudessa kasvaa varmasti entisestään. Vaikka APC ja AF4 ovat vielä lähinnä SEC:tä täydentäviä menetelmiä, voivat ne tulevaisuudessa olla jopa enemmän käytettyjä kuin SEC. Jokaisessa näistä menetelmistä on kuitenkin omat hyvät ja huonot puolensa, ja analysoitava yhdiste määrittää myös osaltaan sen, mitä menetelmää kannattaa käyttää. Myös se, mihin suuntaan tutkimusta tulevaisuudessa viedään ja millaisia yhdisteitä tutkitaan, vaikuttaa siihen, mitkä menetelmistä ovat eniten käytettyjä. SEC, APC ja AF4 ovat kuitenkin kaikki varmasti tärkeässä asemassa polymeerianalytiikassa myös tulevaisuudessa.

Viitteet

- Ahuja S, 2003. Relating chromatography separations 4, 1–16.
- Berek, D., 2010. Size exclusion chromatography - A blessing and a curse of science and technology of synthetic polymers. *J Sep Sci*. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900709>
- Berg, M.T., Mertens, C., Du Prez, F., Kühne, T.D., Herberg, A., Kuckling, D., 2020. Analysis of sequence-defined oligomers through advanced polymer chromatographyTM - mass spectrometry hyphenation. *RSC Adv* 10, 35245–35252. <https://doi.org/10.1039/d0ra06419j>
- Christen, P., Veuthey, J., 2012. New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. *Curr Med Chem* 8, 1827–1839. <https://doi.org/10.2174/0929867013371563>
- Dawkins, J. V, Hemmingt, M., 1975. Gel permeation chromatography: universal calibration for rigid rod and random coil polymers. *Polymer (Guildf)* 16, 554–560.
- Gaborieau, M., Castignolles, P., 2011. Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Anal Bioanal Chem* 399, 1413–1423. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4221-7>
- Gaborieau, M., Gilbert, R., Gray-Weale, A., Hernandez, J.M., Castignolles, P., 2007. Theory of multiple detection size exclusion chromatography of complex branched polymers 16, 1–38. <https://doi.org/10.1002/mats.200600046i>
- Giridhar, G., Manepalli, R.K.N.R., Apparao, G., 2017. Size-exclusion chromatography, in: *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*. Elsevier, pp. 51–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00003-7>
- Held, D., Kilz, P., 2021. Size-exclusion chromatography as a useful tool for the assessment of polymer quality and determination of macromolecular properties. *Chemistry Teacher International*. <https://doi.org/10.1515/cti-2020-0024>
- Hjertizn, S., Mosbach, R., 1962. “Molecular-sieve” chromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamidel. *Anal Biochem* 3, 109–118.
- Hostettmann, K., Marston, A., Hostettmann, M., 1997. *Preparative chromatography techniques*. Springer.
- Jovic, K., Nitsche, T., Lang, C., Blinco, J.P., De Bruycker, K., Barner-Kowollik, C., 2019. Hyphenation of size-exclusion chromatography to mass spectrometry for precision polymer analysis-a tutorial review. *Polym Chem*. <https://doi.org/10.1039/c9py00370c>
- Kumari, Y., Chopra, A., Bhatia, R., 2023. Recent advancements and applications of size exclusion chromatography in modern analysis. *Curr Anal Chem*. <https://doi.org/10.2174/1573411019666230526144816>

- Lubomirsky, E., Khodabandeh, A., Preis, J., Susewind, M., Hofe, T., Hilder, E.F., Arrua, R.D., 2021. Polymeric stationary phases for size exclusion chromatography: A review. *Anal Chim Acta* 1151, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338244>
- Malik, M.I., Pasch, H., 2016. Field-flow fractionation: New and exciting perspectives in polymer analysis. *Prog Polym Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.03.004>
- Meunier, D.M., Wade, J.H., Janco, M., Cong, R., Gao, W., Li, Y., Mekap, D., Wang, G., 2021. Recent advances in separation-based techniques for synthetic polymer characterization. *Anal Chem* 93, 273–294. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04352>
- Perkiö, P., 2013. Ohran hordeiinien kokojakauman määrittäminen asymmetrisellä poikittaisvirtauskenttävirtausfraktioinnilla.
- Porath B Lindner, J.E., 1961. NATURE Simplified procedure for removing non-specific staining components from fluorescein-labelled conjugates. *Bioclim. Biophys. Acta* 191, 69–70.
- Scherf-Clavel, O., 2016. Impurity profiling of challenging active pharmaceutical ingredients without chromophore 1–194.
- Striegel, A.M., 2022. Size-exclusion chromatography: A twenty-first century perspective. *Chromatographia* 85, 307–313. <https://doi.org/10.1007/s10337-022-04143-1>
- Sulaeva, I., Zinovyev, G., Plankeele, J.M., Summerskii, I., Rosenau, T., Potthast, A., 2017. Fast track to molar-mass distributions of technical lignins. *ChemSusChem* 10, 629–635. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601517>
- Vancoillie, G., Vergaelen, M., Hoogenboom, R., 2016. Ultra-high performance size-exclusion chromatography in polar solvents. *J Chromatogr A* 1478, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.034>
- Vitha, F.M., 2017. Fundamentals of chromatography.
- Wang, J.L., Alasonati, E., Fiscaro, P., Benedetti, M.F., Martin, M., 2018. Theoretical and experimental investigation of the focusing position in asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). *J Chromatogr A* 1561, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.056>

