

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ
СОЕДИНЕНИЯ

Том (A) XVII

№ 4

1975

УДК 541.64:543.544

ОСОБЕННОСТИ ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩЕЙ ХРОМАТОГРАФИИ
ГИБКОЦЕПНЫХ ПОЛИМЕРОВ
НА МАКРОПОРИСТЫХ НАБУХАЮЩИХ СОРБЕНТАХ

*Л. З. Виленчик, Б. Г. Беленький, В. В. Нестеров,
В. И. Колегов, С. Я. Френкель*

Показано, что при хроматографии гибкоцепных полимеров на макропористых набухающих сорбентах разделение компонентов осуществляется в основном двумя механизмами: молекулярно-ситовым и эксклюзионным. Последний зависит от степени термодинамической совместимости макромолекул с матрицей сорбента: несовместимые с сорбентом макромолекулы полностью исключаются из плотных областей сорбента, совместимые способны проникать в эти области, что оказывает влияние на величину удерживаемого объема и приводит к отклонению от принципа универсальной калибровки Бенуа. Эксклюзионный эффект можно описывать по аналогии с исключенным объемом макромолекул, что позволяет извлекать при использовании гель-проникающей хроматографии сведения о константах взаимодействия полимерных сегментов друг с другом, сорбентом и растворителем.

Эффект разделения макромолекулярных компонентов в гель-проникающей хроматографии (ГПХ) обусловлен несколькими механизмами. Основными среди них являются: молекулярно-ситовой [1–4], диффузионный [5–9] и эксклюзионный (т. е. механизм объемного исключения) [10–12]. Действие каждого из этих механизмов в конечном счете сводится к более быстрому продвижению вдоль хроматографической колонки крупных макромолекул по сравнению с макромолекулами меньших размеров. В основе молекулярно-ситового механизма лежит соизмеримость размеров элюируемых макромолекул и пор сорбента. Диффузионный механизм определяется подвижностью макромолекул в стационарной фазе колонки. От него зависит степень неравновесности процесса. Причиной эксклюзионного механизма является типичный для макромолекул эффект взаимного объемного исключения полимерных сегментов [13].

Обычно ГПХ-эксперимент стараются проводить в условиях, близких к равновесным. Тогда влияние диффузионного механизма на разделение макромолекул становится малосущественным. Если к тому же в качестве насадки используются иенабухающие сорбенты типа пористых стекол, силикагелей и стирогелей, когда в принципе отсутствует объемное взаимодействие макромолекул с матрицей сорбента, то в основе процесса ГПХ лежит только молекулярно-ситовой эффект. В этом случае при интерпретации получаемых хроматограмм в МВР полимеров хорошо работает принцип универсальной калибровки Бенуа [14–15], в соответствии с которым ГПХ-разделение макромолекул происходит по их гидродинамическим объемам $V \sim M[\eta]$. Этим принципом также широко пользуются и в ГПХ на набухающих сорбентах – гелях, что далеко не во всех случаях корректно. Недавно мы описали [16] существенное отклонение от универсальной калибровки в гель-проникающей хроматографии на сефадексах.

Гелевую хроматографию трех типов полимеров: декстранов, поливинилпирролидонов (ПВП) и полиэтиленгликолей (ПЭГ) – проводили на колонках длиной 96 см, внутренним диаметром 20 мм, заполненных сефадексами G-75 и G-100 (диаметр ча-

стич 40–120 мкм). Скорость потока элюента 0,3%-ного водного раствора NaCl составляла 50 мл/час. В качестве детектора использовали дифференциальный проточного рефрактометр с объемом кюветы 50 мкл и чувствительностью $\Delta n = 10^{-6}$.

Полученные результаты представлены на рис. 1. Видно, что зависимости удерживаемого объема V от $\lg(M[\eta])$ существенно различаются для ПВП и декстранов, с одной стороны, и ПЭГ – с другой. Более того, логарифм разницы в значениях V обратно пропорционален молекулярному весу ПВП или декстра (рис. 2).

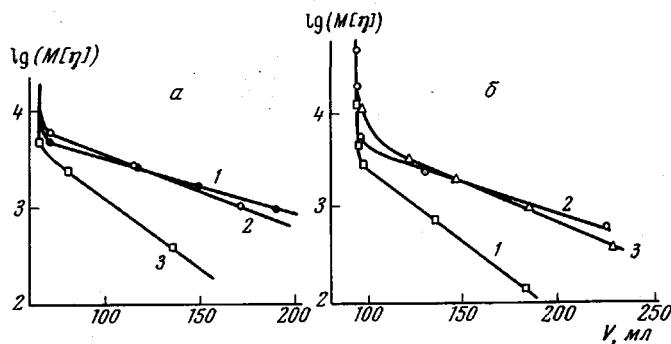


Рис. 1. Зависимость удерживаемых объемов от логарифма произведения молекулярного веса на характеристическую вязкость полимера, полученная на колонке, заполненной сефадексом G-100 (а) и G-75 (б)

а: 1 — декстран, 2 — ПВП, 3 — ПЭГ; б: 1 — ПЭГ, 2 — декстран, 3 — теоретическая кривая для декстрина, полученная с помощью уравнения (6) при $\chi^* = 0,47$

Этим результатам может быть дано следующее объяснение. При ГПХ на набухающих сорбентах макромолекулы в соответствии с молекулярно-ситовым механизмом с различной вероятностью, определяемой их гидродинамическими размерами, проникают в макропоры сорбента. От суммарного объема этих пор зависит величина доступного для макромолекул объема сорбента V_d , а следовательно, и величина удерживаемого объема V . Эта зависимость является универсальной, т. е. общей для всех типов макромолекул. Однако стенки макропор набухающих сорбентов проницаемы для макромолекулярных звеньев, и последние, в соответствии с эксклюзионным механизмом, могут с определенной вероятностью проникать через них в плотные области сорбента, т. е. в микропоры, увеличивая тем самым доступный объем сорбента на некоторую величину ΔV_d . Эта способность макромолекулярных цепей дифундировать в плотные области набухающего сорбента тесно связана с термодинамической совместимостью хроматографируемых макромолекул с матрицей сорбента и может трактоваться в рамках концепции исключенного объема [13] как свойство, дополнительное к молекулярно-ситовому фактору.

Для макромолекул, совместимых с данным сорбентом, расчет ΔV_d можно осуществлять следующим образом. Будем рассматривать находящийся в растворителе набухший сорбент — гель как раствор из макромоле-

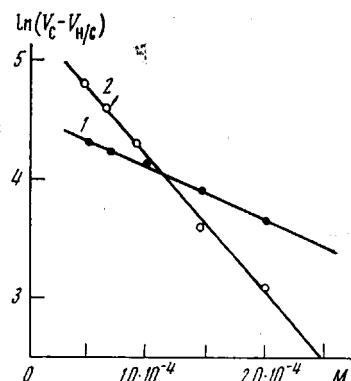


Рис. 2. Логарифм разности удерживаемых объемов ПЭГ и декстрина как функция молекулярного веса декстрина, полученная на колонках, заполненных сефадексами G-100 (1) и G-75 (2)

кул, в ролях которых выступают плотные области каждой гранулы геля. Для такого раствора с помощью стандартной методики [17] можно расчитать свободную энергию смешения полимера с растворителем. Тогда изменение свободной энергии, связанное с проникновением сегментов элюируемых макромолекул в плотные области геля, легко оценить, используя аналогию с исключенным объемом макромолекул [13]. Если считать, что каждая плотная область геля представляет собой сферу радиуса R , равномерно заполненную звеньями и по своим размерам намного большую макромолекулы, рассматриваемой как гауссов клубок ($R \gg (\bar{r}^2)^{1/2}$, где $(\bar{r}^2)^{1/2}$ — радиус инерции макромолекул), то выражение для полного изменения свободной энергии системы гель — макромолекула — растворитель приближении макромолекулы и плотной области геля до расстояния a по аналогии с [17] можно в расчете на одну макромолекулу записать в виде

$$\Delta F_a = kT \frac{V_r V_m}{V_1} \left[\int \rho_r \rho_m dV + \sum_{k=2}^{\infty} \sum_{n=1}^k \frac{(k-1)!}{n! (k+1-n)} (V_r^{n-1} V_m^{k-n}) \times \right. \\ \left. \times \int \rho_r^n \rho_m^{k+1-n} dV - (\chi_{1r} + \chi_{1m}) \int \rho_m \rho_r dV + \chi_{rm} \frac{V_1}{V_r} \int \rho_m \rho_r dV \right] \quad (1)$$

Здесь V_1 — объем молекулы растворителя, V_r и V_m — объемы звеньев геля и макромолекулы, ρ_r и ρ_m — число звеньев геля и макромолекулы в единице объема, a — расстояние между центрами соответствующей плотной области геля и макромолекулы, χ_{1r} и χ_{1m} — константы взаимодействия с растворителем звеньев геля и макромолекулы, χ_{rm} — константа, характеризующая взаимодействие звеньев геля и макромолекулы в данном растворителе; величина ρ_r вне плотных областей геля обращается в нуль.

Проводя в равенстве (1) интегрирование и для простоты пренебрегая входящим в него рядом (ввиду его малости), получим

$$\Delta F_a = \begin{cases} 0, & \text{если } a > R \\ kT \frac{V_r V_m}{V_1} \left[1 + \chi_{rm} \frac{V_1}{V_r} - (\chi_{1r} + \chi_{1m}) \right] \rho_r Z, & \text{если } a < R \end{cases} \quad (2)$$

Здесь $Z = M/M_0$ — число звеньев в макромолекуле, M_0 — вес одного звена.

Изменение свободной энергии ΔF_a задает вероятность $\exp[-\Delta F_a/kT]$ того, что макромолекула находится на расстоянии a от плотной области геля.

Произведение $\exp[-\Delta F_a/kT] 4\pi a^2 da$ представляет собой таким образом доступную для макромолекулы часть объема сферического слоя геля $4\pi a^2 da$. Распространяя интегрирование по a на всю гранулу геля и учитывая долю плотных областей в каждой грануле, найдем

$$\Delta V_d = \frac{V_r - V_{dc}}{V_r} \int_0^{R_r} 4\pi a^2 \exp[-\Delta F(a)/kT] da \quad (3)$$

Здесь R_r — радиус гранул набухшего геля, V_r — его полный объем, а V_{dc} — объем геля, доступный для макромолекул в соответствии с молекулярно-сетевым механизмом. Если элюируемые макромолекулы в условиях данного ГПХ-эксперимента несовместимы с сеткой геля, величина удерживаемого объема V_{dc} для них полностью определяется значением V_{dc}

$$V_{dc} = V_0 + V_{dc} \quad (4)$$

Для полимера, совместимого с гелем, имеем другую зависимость

$$V_c = V_0 + V_{dc} + \Delta V_d = V_{h/c} + \Delta V_d, \quad (5)$$

где ΔV_d определено равенством (3), а V_0 — объем каналов подвижной фазы данной хроматографической системы.

Равенства (2)–(5) показывают, что, располагая значениями констант Флори — Хаггинса χ_{1m} , χ_{1r} , χ_{rm} и зная удерживаемые объемы для полимеров, заведомо несовместимых с сорбентом в данных условиях, легко рассчитать удерживаемые объемы для совместимых полимеров. Можно поступить наоборот, определяя константы χ_{ij} по значениям V_c и $V_{h/c}$. В нашем эксперименте ПЭГ был несовместим с сорбентом, а ПВП и декстрран совместимы с ним. Выбор в качестве сорбента декстранового геля-сепадекса позволил при расчете ΔV_d для макромолекул декстрана положить $\chi_{1r} = \chi_{1m} = \chi^*$, $\chi_{rm} = 0$. Расчеты проводили по формуле

$$V_c = V_{h/c} + (V_k - V_{h/c}) \exp[-k_c M_c], \quad (6)$$

которая получается из (5) подстановкой вместо ΔV_d его значения из (3). В равенстве (6) использованы следующие обозначения: V_k — полный объем хроматографической системы, M_c — молекулярный вес декстрана, k_c — параметр, характеризующий систему сепадекс — декстрран — водный раствор

NaCl и равный $k_c = \frac{1}{M_c} \frac{\Delta F_a}{kT} \Big|_{a < R}$. При этом из (2)

$$\chi^* = \frac{1}{2} \left(1 - k_c \frac{M_0 V_1}{V_r V_m \rho_r} \right) \quad (7)$$

Значения удерживаемых объемов, полученные в экспериментах на колонке, заполненной сепадексом G-100, подставляли в формулу (6). Отыскивался параметр k_c и затем по формуле (7) рассчитывали константу χ^* . Результаты расчетов приведены ниже.

Мол. вес декстрана	$5 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$
χ^* из уравнения (7)	0,45	0,48	0,47	0,49
$\chi_{sp}^* = 0,47$				

Найденное таким образом среднее значение константы Флори — Хаггинаса для декстрана $\chi_{sp}^* = 0,47$ использовали для расчета удерживаемого объема макромолекул декстрана при их элюировании через колонку, заполненную сепадексом G-75, отличающимся от сепадекса G-100 своей плотностью, по-ристостью и степенью набухаемости. При этом, как и в предыдущем случае, значения удерживаемых объемов для несовместимых с сепадексом полимеров отождествляли с удерживаемыми объемами полиэтиленгликолов. Результаты расчетов представлены на рис. 1, б. Совпадение экспериментальных данных с расчетными лежит в пределах 15 %.

Эти результаты в сочетании с зависимостью $\ln(\Delta V_d)$ от молекулярного веса декстрана, изображенной на рис. 2 и согласующейся с зависимостью (6), предсказываемой теорией, позволяют судить об адекватности предложенной нами модели гель-проникающей хроматографии гибкоцепных полимеров на набухающих сорбентах.

Авторы благодарны Ю. Е. Эйзнеру и Ю. Я. Готлибу за плодотворные дискуссии по затронутым в работе вопросам.

Институт высокомолекулярных соединений АН СССР

Поступила в редакцию
27 VII 1973

ЛИТЕРАТУРА

1. *J. Porath*, Pure Appl. Chem., 6, 233, 1963.
2. *T. Lourent, J. Killander*, J. Chromatogr., 14, 317, 1964.
3. *P. Squire*, Arch. Biochem. and Biophys., 107, 471, 1964.
4. *A. DeVries*, IUPAC International Symposium of Macromolecular Chemistry, Prague, 1965.
5. *G. Ackers*, Biochemistry, 3, 723, 1964.
6. *W. Yau, C. Malone*, J. Polymer Sci., B5, 663, 1967.
7. *W. Yau, H. Suchan, C. Malone*, J. Polymer Sci., 6, A-2, 1349, 1968.
8. *W. Yau, C. Malone, S. Fleming*, J. Polymer Sci., B6, 803, 1968.
9. *T. Germans*, J. Polymer Sci., 6, A-2, 1247, 1968.
10. *C. Lather, C. Ruthven*, Biochem. J., 62, 665, 1956.
11. *K. Pederson*, Arch. Biochem. and Biophys., 1, 157, 1962.
12. *P. Flodin*, J. Chromatogr., 5, 103, 1961.
13. *P. Flory*, Principles of Polymer Chemistry, N. Y., 1953.
14. *H. Benout, Z. Grubisic, P. Rempp, D. Decker, J. Zilliox*, J. Chem. Phys., 63, 1507, 1966.
15. *Z. Grubisic, P. Rempp, H. Benout*, J. Polymer Sci., B5, 753, 1967.
16. *Б. Г. Беленъкий, Л. З. Виленчик, В. В. Нестров, Т. И. Шашина*, Высокомолек. соед., А15, 2614, 1973.
17. *В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель*, Структура макромолекул в растворах. «Наука», 1964.