

УДК 541.64:543.544

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПОРИСТОЙ СТРУКТУРЫ
СОРБЕНТОВ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩЕЙ
ХРОМАТОГРАФИИ ПОЛИМЕРОВ**

Горбунов А. А., Соловьева Л. Я., Пасечник В. А.

Теоретически изучены возможности ГПХ полимеров как метода исследования пористой структуры сорбентов. Показано, в частности, что хроматографический метод может быть использован для количественной оценки средних размеров пор и дисперсии распределения по их размерам, но мало чувствителен к форме функции распределения. Для изучения и контроля пористой структуры сорбентов, применяемых в биотехнологии, предложен метод декстрановой ГПХ-порометрии. Возможности метода продемонстрированы на примере ГПХ-порометрии модельных смешанных сорбентов с заданными характеристиками пористой структуры.

Важнейшими характеристиками структуры сорбентов, применяемых в жидкостной колоночной хроматографии, являются размеры и форма пор, а также неоднородность пор по размеру (полидисперсность). Экспериментальное исследование пористости сорбентов обычно проводят методами малоуглового рассеяния рентгеновых лучей [1], оптической и электронной микроскопии [2], ртутной порометрии [3], а также методами, основанными на изучении сорбции газов или паров растворителя [4–6]. Рентгеновские и электронно-микроскопические исследования требуют, однако, предварительной обработки образцов, которая в ряде случаев изменяет их структуру. Применение сорбционных порометрических методов ограничено областью ненабухающих сорбентов. Метод ртутной порометрии неприменим для изучения мягких набухающих гелей.

Информацию о пористой структуре сорбентов любого типа можно получить из экспериментов по ГПХ полимеров на исследуемых сорбентах [7–11]. До недавнего времени этот метод, однако, применялся в основном для качественной оценки проницаемости сорбентов [9–11]. Основы хроматографической порометрии изложены в работе [8], но проблема чувствительности хроматографического метода к различным характеристикам структуры и неоднородности пористой среды осталась нерешенной.

Цель данной работы – разработка методов количественной характеристики структуры сорбентов методом ГПХ.

Основные следствия теории ГПХ макромолекул для сорбентов с одинаковыми размерами пор. Величиной непосредственно измеряемой в хроматографии, является удерживаемый объем V_e

$$V_e = V_0 + V_p K_d, \quad (1)$$

где V_0 и V_p – объемы неподвижной и подвижной фаз, K_d – коэффициент распределения, связанный с изменением свободной энергии макромолекулы при попадании ее внутрь поры и зависящий от ММ хроматографируемых частиц, размеров и формы пор сорбента и от характера взаимодействия макромолекул с сорбентом и растворителем [12–18].

Основным результатом теоретических работ [12–18], в которых получены выражения для коэффициента распределения линейных гибкоцепных макромолекул между разбавленным раствором и модельными сорбционно-неактивными порами, является универсальная зависимость коэффициента распределения от отношения радиуса инерции макромолекулы r

к радиусу поры R . Одна из математических форм такой зависимости, полученная Касасса [12–14] для модели линейной гауссовой цепи и правильной геометрии, имеет вид

$$K_d^\alpha = \sum_{m=1}^{\infty} \frac{2\alpha}{[\beta_m^\alpha]^2} \exp \left[- \left(\beta_m^\alpha \cdot \frac{r}{R} \right)^2 \right] \quad (2)$$

Для щелевидных пор $\alpha=1$, $\beta_m^\alpha = \pi(m-1/2)$, для цилиндрических — $\alpha=2$, а β_m^α — корень функции Бесселя порядка m $J_0(\beta)$, для сферических — $\alpha=3$, $\beta_m^\alpha = \pi m$.

Из формулы (2) следует, что при $r \gg R$ коэффициент распределения убывает с ростом отношения r/R по экспоненциальному закону

$$K_d^\alpha \approx \frac{2\alpha}{[\beta_1^\alpha]^2} \cdot \exp \left[- \left(\beta_1^\alpha \cdot \frac{r}{R} \right)^2 \right] \quad (3)$$

В другом предельном случае ($r \ll R$) коэффициент распределения убывает линейно с ростом отношения r/R

$$K_d^\alpha \approx 1 - \frac{2\alpha}{V\pi} \cdot \frac{r}{R} = 1 - \frac{r\Sigma}{V\pi} \quad (4)$$

где $\Sigma = 2\alpha/R$ — удельная поверхность поры, т. е. отношение поверхности поры к ее объему.

Из уравнений (1)–(4) следует, что пропуская через колонку с исследуемым сорбентом макромолекулы с известными размерами и анализируя измеренные зависимости $K_d(r)$, можно определить величину удельной поверхности пор, а также (предполагая определенную геометрию пор) оценить их поперечный размер. Отметим, что величина Σ является безразмерной характеристикой, имеющей смысл для пор любой формы, а введение радиуса означает переход к модельным представлениям.

ГПХ на неоднородных по размеру пор сорбентах. Реальные сорбенты в большинстве случаев обладают полидисперсностью по размерам пор. Введем для описания таких сорбентов дифференциальные функции распределения объема пор $f_V(R)$ и их поверхности $f_S(R)$, нормированные на полный объем пор V_p и на их суммарную поверхность S_p . Соответствующие этим функциям распределения средние размеры пор определим с помощью соотношений

$$\bar{R}_S = S_p^{-1} \cdot \int_0^{\infty} R \cdot f_S(R) dR = V_p \left(\int_0^{\infty} R^{-1} \cdot f_V(R) dR \right)^{-1} = 2\alpha \frac{V_p}{S_p} \quad (5)$$

$$\bar{R}_V = V_p^{-1} \cdot \int_0^{\infty} R \cdot f_V(R) dR = (\bar{R}_S)^{-1} S_p^{-1} \int_0^{\infty} R^2 f_S(R) dR \quad (6)$$

Неоднородность пор по размеру (полидисперсность) можно характеризовать величиной дисперсии σ^2 , определяемой по формуле

$$\sigma^2 = S_p^{-1} \cdot \int_0^{\infty} R^2 \cdot f_S(R) dR - (\bar{R}_S)^2 \quad (7)$$

Более удобными характеристиками полидисперсности являются безразмерные параметры — относительная ширина функции распределения

$$\gamma = \sigma / \bar{R}_S \quad (8)$$

или параметр полидисперсности

$$U = 1 + \gamma^2 \quad (9)$$

Пользуясь формулами (5)–(9), нетрудно убедиться, что параметр U имеет простой смысл: он равен отношению двух различных средних размеров пор

$$U = \bar{R}_V / \bar{R}_S \quad (10)$$

Для сорбентов с одинаковыми порами $U=1$ ($\gamma=0$) и чем сильнее полидисперсность, тем больше U и γ .

Поскольку объем V_e представляет собой статистическую сумму системы, при вычислении V_e для случая неоднородных сорбентов следует проводить суммирование по всем элементам неподвижной фазы, что приводит к следующей формуле:

$$V_e = V_0 + \int_0^{\infty} f_v(R) \cdot K_d(r/R) dR \quad (11)$$

Очевидно, что выражение (11) может быть записано в виде, аналогичном формуле (1)

$$V_e = V_0 + V_p \bar{K}_d, \quad (12)$$

где \bar{K}_d — среднее значение коэффициента распределения, определяемое как

$$\bar{K}_d = V_p^{-1} \cdot \int_0^{\infty} K_d(r/R) \cdot f_v(R) dR \quad (13)$$

Из формулы (13) следует, что характер зависимости $\bar{K}_d(r)$ определенным образом связан с распределением по размеру пор. Однако не видно, в какой степени хроматографические измерения чувствительны к основным характеристикам распределения, а именно к средним размерам пор, ширине и форме функции распределения. Чтобы ответить на эти вопросы, проанализируем зависимость $\bar{K}_d(r)$ более детально.

Рассмотрим предельный случай, когда $r \ll \bar{R}_s$. Подставив в выражение (13) формулу (4) и проведя интегрирование, нетрудно убедиться, что результатом по-прежнему останется выражение, аналогичное формуле (4)

$$\bar{K}_d \approx 1 - \frac{2\alpha}{\sqrt{\pi}} \frac{r}{\bar{R}_s} = 1 - \frac{r\Sigma}{\sqrt{\pi}} \quad (14)$$

Здесь $\Sigma = S_p/V_p$ имеет смысл удельной поверхности пор сорбента.

Из формулы (14) следует, что начальный наклон зависимости $\bar{K}_d(r)$ определяется величиной среднего радиуса пор \bar{R}_s (или удельной поверхностью Σ) и не зависит от ширины и вида функции распределения.

При соизмеримости размеров хроматографируемых макромолекул и средних размеров пор \bar{K}_d становится зависимым от ширины и формы функции распределения. На рис. 1 представлены кривые $\bar{K}_d(r)$, рассчитанные по формулам (13) и (2) для сорбентов с порами одинакового размера $R=5$ (кривая 1) и 15 нм (кривая 2), а также для модельных неоднородных сорбентов с унимодальной (3) и бимодальной (4) функцией распределения по размеру пор. Кривая 3 соответствует распределению вида

$$f_v(R) = \frac{V_p}{\bar{R}_s \sqrt{2\pi \ln U}} \cdot \exp \left[- \frac{\left(\ln \frac{R}{\bar{R}_s} + \frac{1}{2} \ln U \right)^2}{2 \ln U} \right] \quad (15)$$

с параметрами $\bar{R}_s=15$ нм и $U=2$, кривая 4 — бимодальному распределению с такими же значениями \bar{R}_s и U (два максимума при $R_1=8,8$ и $R_2=51,2$ нм). Из рис. 1 видно, что начальный ход зависимостей 2—4 совпадает. Это является следствием одинаковых средних размеров \bar{R}_s для модельных распределений 2—4. При больших значениях r , как видно из рисунка, кривые 3 и 4 для неоднородных сорбентов отклоняются от зависимости 2, причем, как показали расчеты, отличие становится больше при увеличении параметров полидисперсности γ и U . Следовательно, хроматографические измерения могут служить количественной оценкой характеристик полидисперсности сорбентов. Важно также отметить, что кривые 3 и 4 для столь различных по виду функций распределения близки друг к другу. Это означает, что хроматографические измерения мало чувствительны к форме функции распределения по размеру пор.

Таким образом, установлено, что метод ГПХ может быть применен для определения удельной поверхности пор сорбента, средних размеров пор и параметров полидисперсности.

Способ расчета характеристик пористых сорбентов по данным ГПХ декстранов. Для изучения сорбентов, используемых при препаративном разделении и анализе биополимеров, нами разработан способ декстранный ГПХ-порометрии.

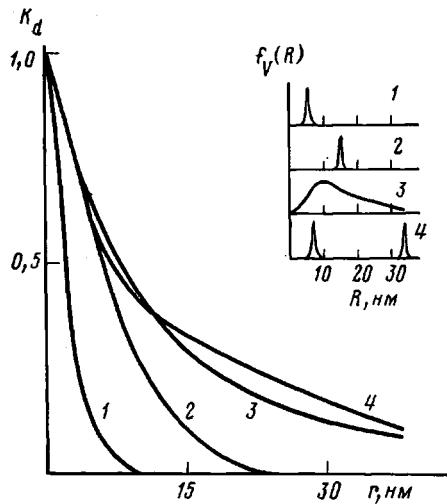


Рис. 1

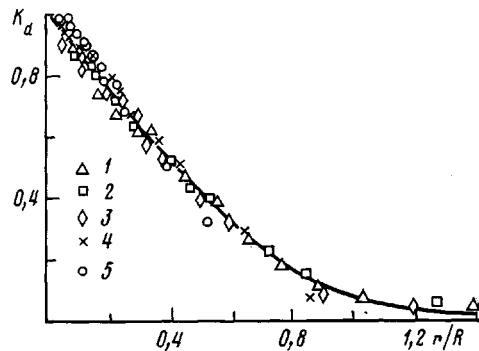


Рис. 2

Рис. 1. Теоретические зависимости коэффициента распределения от радиуса инерции хроматографируемых макромолекул для двух монодисперсных сорбентов (1, 2) и для модельных неоднородных сорбентов с унимодальным (3) и бимодальным распределением пор по размерам (4). Средний радиус пор $R_s=5$ (1) и 15 нм (2–4), параметр полидисперсности $U=1$ (1, 2) и 2 (3, 4). В верхней части рисунка – вид соответствующих распределений

Рис. 2. Зависимость K_d от отношения r/R при ГПХ декстранов на узкодисперсных пористых стеклах с радиусом пор $R=4$ (1); 8 (2); 11,5 (3); 15,5 (4) и 26 нм (5) по данным работы [19]

Декстрыны широко применяются в качестве водорастворимых полимерных стандартов и хорошо изучены. Они представляют собой гибкоцепные молекулы, радиус инерции которых связан с ММ соотношением

$$r=0,025 M^{1/2}, \quad (16)$$

где r выражено в нм. Для декстранов имеются надежные лит. данные [19–21] по хроматографии на эталонных пористых стеклах. Используя их, мы построили зависимость K_d от отношения r/R (рис. 2). Из рисунка видно, что экспериментальные точки, относящиеся к порам разных размеров, ложатся в полном соответствии с теорией на универсальную зависимость. Эта зависимость и является калибровочной кривой для ГПХ-порометрии сорбентов.

Процедура декстранный ГПХ-порометрии заключается в следующем. Измерив для исследуемого сорбента зависимость K_d от радиуса r молекул декстранов, нетрудно с помощью ЭВМ провести минимизацию суммы квадратов отклонений экспериментальных точек от теоретических зависимостей (13) при варьировании параметров модельной функции распределения (15) и использовании экспериментальной зависимости $K_d(r/R)$ (рис. 2). Вопрос о выборе модели функции распределения не является принципиальным, поскольку, как показано выше, метод ГПХ-порометрии мало чувствителен к форме функции распределения по размеру пор. Таким методом могут быть определены удельная поверхность Σ , средние значения размеров пор R_s и R_v , параметры полидисперсности γ и U .

Чтобы экспериментально продемонстрировать возможности метода ТПХ-порометрии, проведены опыты по хроматографии декстранов на узкодисперсных сорбентах с порами различных размеров и на модельных образцах, приготовленных смешением этих сорбентов.

В экспериментах использовали 11 фракций декстранов фирм «Pharmacia», «Loba» и «Serva» с $M=180$ (глюкоза) — $5 \cdot 10^6$ и полидисперсностью $M_w/M_n \approx 1,5-2$. Эксперименты проводили при 23° на колонке 6×300 мм в 0,1 н. фосфатном буфере при $\text{pH } 5$. Скорость потока $0,4$ мл/мин, концентрации декстрана в исходном растворе $0,25-0,5$ г/дл (зависимость коэффициентов распределения от концентрации в этой области не наблюдалась). Отсутствие температурной зависимости коэффициента распределения в интервале температур $6-36^\circ$ свидетельствует об эксклюзионном механизме хроматографии, т. е. об отсутствии адсорбционного взаимодействия молекул декстранов с поверхностью исследованных сорбентов.

Регистрацию хроматографических пиков осуществляли с помощью проточного рефрактометра «Waters Ass.». Объем подвижной фазы V_0 и общий объем $V_0 + V_p$ определяли путем хроматографирования высокомолекулярного декстрана с $M=5 \cdot 10^6$ и глюкозы соответственно. Определение V_e проводили по максимуму кривой изменения показателя преломления. Значения коэффициентов распределения K_d рассчитывали по формуле (12).

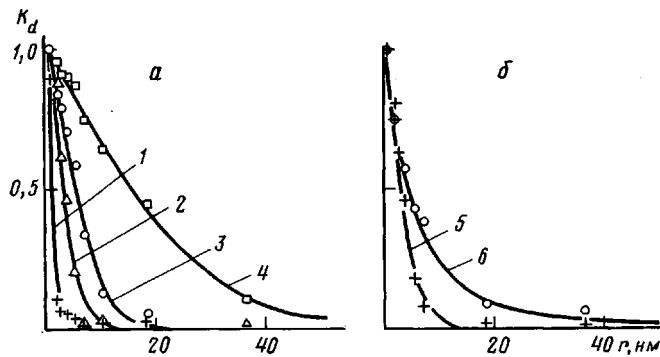


Рис. 3. Экспериментальные зависимости K_d от r для молекул декстранов на узкодисперсных сорбентах I—IV (1—4) (а) и на смешанных сорбентах (5, 6) (б); 5 — двух-, 6 — четырехкомпонентный образец

Измерены зависимости $\bar{K}_d(r)$ для четырех узкодисперсных сорбентов: силикагеля МСА-2500 (образец I) и стеклопористых сорбентов МПС-250 (II), ШПС-250 (III) и Bio-Glass-500 (IV), модифицированных полизифирными и эпоксидными смолами с последующим их гидролизом. Полученные зависимости представлены на рис. 3, а. Видно, что кривые 1—4 имеют различный наклон. Следовательно, все четыре сорбента отличаются друг от друга размерами пор. Значения радиусов \bar{R}_s , полученные при обработке хроматографических данных на ЭВМ, оказались равными 2,3 (образец I); 7,2 (II); 11,7 (III) и 31,5 нм (IV). Расчет также показал, что образцы I—III практически монодисперсны по размеру пор, для сорбента IV расчетано значение параметра неоднородности $U=1,1$.

Чтобы показать экспериментально чувствительность хроматографического метода к полидисперсности по размерам пор, приготовили два модельных образца: двухкомпонентную смесь сорбентов II и III с соотношением компонентов 61:39 по объему, а также четырехкомпонентную смесь сорбентов I—IV, взятых в пропорции 10:22:31:37. Составы этих смесей были специально подобраны таким образом, чтобы при одинаковых средних радиусах пор \bar{R}_s двух- и четырехкомпонентный сорбент имели различную полидисперсность. Согласно теории, для таких сорбентов следует ожидать зависимостей $\bar{K}_d(r)$, подобных кривым 2 и 3 на рис. 1, т. е. зависимостей, совпадающих на начальном участке, но расходящихся при больших значениях r . Экспериментально полученные для двух- и четырехкомпонентного сорбентов зависимости \bar{K}_d от r (рис. 3, б) действительно имеют ожидаемый вид, что свидетельствует о правильности теоретических представлений о закономерностях гель-хроматографии полимеров на неоднородных сорбентах.

В таблице приведены количественные данные о размерах пор и степени неоднородности смешанных сорбентов: значения \bar{R}_s и U , рассчитанные по формулам (5), (6) и (10), исходя из способа приготовления и из известных размеров пор для компонентов смесей, а также измеренные методом ГПХ-порометрии. Сравнение измеренных и рассчитанных величин показывает, что метод ГПХ дает правильную количественную оценку полидисперсности и размеров пор неоднородных сорбентов.

В заключение обсудим ограничения рассматриваемого метода и области его возможного использования. Вследствие малой чувствительности метода ГПХ к форме функции распределения нам представляются малоперспективными попытки использования уравнения (13) для расчета вида функции распределения по данным ГПХ. По-видимому, единственным случаем, когда по виду зависимости $\bar{K}_d(r)$ можно сделать заключение о форме функции распределения, является случай бимодального распределения с сильно отличающимися (на порядок и более) размерами R_1 и R_2 . Анализ

Характеристики пористой структуры смешанных сорбентов, рассчитанные и измеренные методом ГПХ-порометрии

Сорбент	Средний радиус пор \bar{R}_s , нм		Параметр полидисперсности U	
	расчет	эксперимент	расчет	эксперимент
Двухкомпонентная смесь	8,5	7,8	1,06	1,04
Четырехкомпонентная смесь	8,5	7,7	2,2	2,1

формул (2)–(4) и (13) показывает, что в этом случае на кривой $\bar{K}_d(r)$ могут наблюдаться два линейных участка. Один из них (начальный участок), как и в общем случае, несет информацию о среднем радиусе пор \bar{R}_s , а из наклона и отсечения второго линейного участка могут быть определены размеры и доля объема больших пор. Эти параметры в совокупности однозначно характеризуют бимодальное распределение.

ГПХ-порометрия как метод исследования пористых сред имеет и другие ограничения. Так, этот метод не дает информацию о наличии и размерах внутренних пор, не имеющих выхода на поверхность, а также о больших сквозных отверстиях с размерами порядка 1 мкм и выше. Конечно, для получения более полных сведений о структуре пористых тел целесообразно привлекать и другие методы: электронно-микроскопические, сорбционные, метод ртутной порометрии и т. п. Мы полагаем, однако, что при исследовании сорбентов наиболее ценную информацию дает именно хроматографический метод. Его преимущества заключаются в том, что сорбенты изучаются в условиях, близких к условиям их практического использования. Так, обсуждаемый метод декстрановой ГПХ-порометрии позволяет изучать в условиях буферных водных систем набухающие полимерные сорбенты для биомолекулярной хроматографии. Хроматографический метод исследования сорбентов и принцип их использования для разделения макромолекул основаны на одном и том же физическом явлении — проникновении молекул из раствора в поры сорбента. Поэтому можно полагать, что структурные различия, выявленные в сорбентах методом ГПХ, окажутся существенными и при использовании этих сорбентов.

ЛИТЕРАТУРА

- Стеттон В. В кн.: Новейшие методы исследования полимеров. М.: Мир, 1966, с. 198.
- Лукьянович В. М. Электронная микроскопия в физико-химических исследованиях. М.: Изд-во АН СССР, 1960, с. 318.
- Плаченов Т. Г. В кн.: Адсорбция и пористость. М.: Наука, 1976, с. 191.
- Экспериментальные методы в адсорбции и молекулярной хроматографии/Под ред. Киселева А. В., Древинга В. П. М.: Изд-во МГУ, 1973, с. 447.
- Тагер А. А., Цилипогкина М. В. Успехи химии, 1978, т. 47, № 1, с. 153.
- Белякова Л. Д., Киселев А. В., Платонова Н. П., Шевченко Т. И. Коллоидн. ж., 1980, т. 42, № 2, с. 216.
- Беленский Б. Г., Виленчик Л. З. Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978, с. 184.

8. Виленчик Л. З., Куренбин О. И., Жмакина Т. П., Беленький Б. Г. Докл. АН СССР, 1980, т. 250, № 2, с. 381.
9. Макарова С. Б., Литвак Ж. М., Вахтина И. А., Егоров Е. В. Высокомолек. соед. А, 1971, т. 13, № 9, с. 2160.
10. Юрченко В. С., Пасечник В. А., Кузнецова Н. Н., Рожецкая К. М., Соловьева Л. Я., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1979, т. 21, № 1, с. 179.
11. Werner W., Halasz I. J. Chromatogr., 1980, v. 15, № 6, p. 277.
12. Casassa E. F. J. Polymer Sci. B, 1967, v. 5, № 9, p. 773.
13. Casassa E. F., Tagami Y. Macromolecules, 1969, v. 2, № 1, p. 14.
14. Casassa E. F. Macromolecules, 1976, v. 9, № 1, p. 182.
15. Di Marzio E. A., Rubin R. J. Chem. Phys., 1971, v. 55, № 9, p. 4318.
16. Скворцов А. М., Горбунов А. А., Жулина Е. Б., Бирштейн Т. М. Высокомолек. соед. А, 1978, т. 20, № 4, с. 816.
17. Скворцов А. М., Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Теников М. Б. Высокомолек. соед. А, 1978, т. 20, № 3, с. 678.
18. Горбунов А. А., Скворцов А. М. Высокомолек. соед. А, 1980, т. 22, № 5, с. 1137.
19. Haller W. Macromolecules, 1977, v. 10, № 1, p. 83.
20. Basedow A. M., Ebert K. H., Ederer H. J., Hunger H. Makromolek. Chem., 1976, B. 177, № 5, S. 1501.
21. Basedow A. M., Ebert K. H., Ederer H. J., Fossag H. J. Chromatogr., 1980, v. 192, № 2, p. 259.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт особо чистых биопрепаратов

Поступила в редакцию
28.VII.1982

**DETERMINATION OF CHARACTERISTICS OF POROUS STRUCTURE
OF SORBENTS BY GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY
OF POLYMERS**

Gorbunov A. A., Solov'eva L. Ya., Pasechnik V. A.

Summary

The possibilities of GPC of polymers as a method of the study of porous structure of sorbents have been theoretically studied. Particularly this method can be used for the quantitative evaluation of average dimensions of pores and dispersion of their size distribution, but is less sensible to the shape of the distribution function. For the study and control of porous structure of sorbents which are used in biotechnology the method of dextrane GPC-porometry is proposed. The possibilities of this method are demonstrated for model mixed sorbents with known characteristics of porous structure.