

УДК 541.64 : 543.544

© 1990 г. А. А. Горбунов, А. М. Скворцов

## РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МЕТОДА ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩЕЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПОЛИМЕРОВ

Проведен теоретический анализ разрешающей способности метода ГПХ при разделении макромолекул и глобулярных белков. Установлена связь между оптимальными размерами разделляемых макромолекул и белков и шириной пор адсорбента. Показано, что для всех монопористых сорбентов ширина диапазона разделения по логарифму ММ полимеров одинакова и составляет  $\sim 1,5$  декады. Разрешающая способность ГПХ для белков в 1,5–1,8 раза хуже, а их рабочий диапазон настолько же шире, чем для гибкоцепных полимеров.

Оценка разрешающей способности метода ГПХ необходима практически во всех основных его приложениях. Разрешающая способность метода ГПХ полимеров обсуждалась во многих работах (см., например, [1–5]), однако большинство из них основано на упрощенных полуэмпирических представлениях, в частности на представлениях о линейности калибровки в ГПХ.

Цель настоящей работы – рассмотрение вопроса о разрешающей способности с позиций строгой теории ГПХ полимеров. Основное внимание уделено установлению общих закономерностей разрушения, спраедливых для различных полимеров и адсорбентов, что позволит нам сформулировать условия, необходимые для оптимизации разделения и анализа макромолекул и белков.

**Коэффициент разделения.** Ключевым понятием при определении разрешающей способности в хроматографии является коэффициент разделения пиков [1–4]

$$R = \frac{(V_2 - V_1)}{2(\sigma_1 + \sigma_2)}, \quad (1)$$

где  $V_1$  и  $V_2$  – удерживаемые объемы, соответствующие выходу двух индивидуальных полимерных компонентов с молекулярными массами  $M_1$  и  $M_2$ , а  $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  – стандартная ширина хроматограмм. Удерживаемый объем  $V_i$  обычно измеряется по положению максимума хроматографического пика, а в случае асимметричности хроматограммы – по ее первому моменту. Второй центральный момент (дисперсия пика) равен  $\sigma^2$ .

Формула (1) используется в хроматографии и для оценки разделения пиков полидисперсных образцов. В этом случае дисперсия каждого пика складывается из двух составляющих, одна из которых связана с полидисперсностью образца, а другая не зависит от полидисперсности и носит название приборного уширения. В дальнейшем при рассмотрении разрешающей способности мы будем обсуждать разделение монодисперсных компонент, считая, что  $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  в формуле (1) определяются только приборным уширением. Обычно полагают, что для соседних пиков  $\sigma_1 \approx \sigma_2 \approx \sigma$ .

Картины разделения пиков, соответствующие различным значениям коэффициента разделения  $R$ , приведены в работе [1]. Разделение принято считать хорошим при  $R \geq 1$ .

Расстояние между пиками  $\Delta V = V_2 - V_1$ , очевидно, зависит от разницы ММ разделяемых компонентов. Поэтому коэффициент разделения сам по себе еще не характеризует разрешающую способность метода ГПХ. Для более адекватного определения разрешающей способности в работе [1]

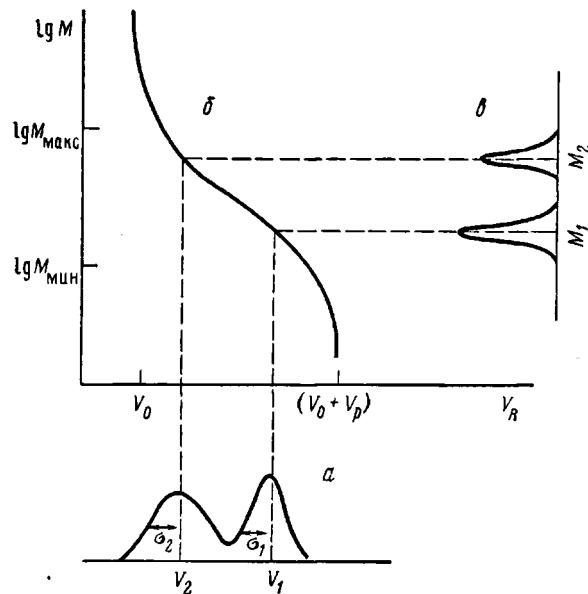


Рис. 1. Схематический вид хроматограммы, соответствующей двум близким полимеромологам (а), калибровочная зависимость (б) и ММР полимеромологов с молекулярной массой  $M_1$  и  $M_2$  (в). На калибровочной зависимости (б) отмечен рабочий интервал от  $\lg M_{\text{мин}}$  до  $\lg M_{\text{ макс}}$

предложено стандартизовать различие между ММ компонентов и введено понятие нормализованного коэффициента разделения

$$R_s = \frac{R}{\Delta \lg M} \quad (2)$$

Величина  $R_s$  численно равна коэффициенту разделения двух компонентов, ММ которых отличаются на декаду. Из формул (1) и (2) следует

$$R_s = \frac{1}{4\sigma} \frac{\Delta V}{\Delta \lg M} \quad (3)$$

На рис. 1 схематически показано, как из хроматограммы (а) с использованием калибровочной зависимости (б) получают ММР образцов (в).

Использование нормализованного коэффициента разделения  $R_s$  для характеристики разрешающей способности предполагает линейность калибровочной зависимости  $\lg M$  от  $V$  (рис. 1). Тогда величина  $\Delta V / \Delta \lg M$  постоянна и равна обратной крутизне этой зависимости. В то же время хорошо известно, что калибровочную зависимость можно считать линейной лишь приближенно, в ограниченном диапазоне ММ. Строго говоря, крутизна калибровки меняется непрерывно; она существенно различается в середине и на краях калибровочной кривой [1–5]. Поэтому для анализа разрешающей способности введем дифференциальный нормализованный (приведенный) коэффициент разделения

$$\bar{R}_s = \frac{1}{4\sigma} \frac{dV}{d \lg M} \quad (4)$$

**Оптимальное разделение.** Переидем от удерживаемого объема  $V$  к коэффициенту распределения

$$K = (V - V_0) / V_p,$$

где  $V_0$  и  $V_p$  – объем подвижной и неподвижной фаз. Тогда

$$\bar{R}_s = \frac{V_p}{4\sigma} \frac{dK}{d \lg M} \quad (5)$$

Первый сомножитель  $V_p/4\bar{b}$  называется пиковой емкостью [4, 5] и численно равен максимальному числу индивидуальных компонентов (полимергомологов), разделившихся в интервале от  $V_0$  до ( $V_0+V_p$ ) с коэффициентом разделения  $R_s=1$ . Пиковая емкость тем больше, чем больше объем пор сорбента  $V_p$  и чем меньше приборное уширение  $\bar{b}$ . Приборное уширение в ГПХ зависит от целого ряда факторов, главными из которых являются неоднородность набивки хроматографической колонки, размер зерен сорбента, скорость потока элюента, геометрические размеры колонки, размытие в экстраколоночных коммуникациях и т. п. [5]. Все эти факторы известны, и их влияние обычно учитывается.

Величину приборного уширения можно оценить экспериментально по ширине хроматограмм полимерных стандартов. Такая процедура, однако, не точна, поскольку полимерные стандарты и фракции все же обладают некоторой полидисперсностью. Другим способом экспериментального определения приборного уширения, не требующим строго монодисперсных образцов, является метод возвратного хроматографирования (метод Танга) [6].

Таким образом, первый член в формуле (5) неуниверсален, т. е. зависит от конструкции конкретной хроматографической системы (геометрии колонки и операционных параметров). Он, однако, может быть измерен и до некоторой степени поддается оптимизации [5]. В дальнейшем мы не будем рассматривать зависимость этого члена от коэффициента распределения, ширины пор и т. п. Этот вопрос неоднократно обсуждался в литературе, однако до сих пор не получил исчерпывающего объяснения.

Цель настоящей работы — рассмотрение второго сомножителя  $\psi=dK/d \ln M$ , введенного в работах [7, 8], и его зависимости от параметров системы  $K, d, R$  и качества растворителя.

Тем самым будет рассматриваться не полная разрешающая способность, а, строго говоря, только селективность метода ГПХ.

Используя универсальную зависимость коэффициента распределения  $K$  от отношения  $R/d$  размеров макромолекулы и поры, полученную в теории ГПХ Касасса [9], удалось установить, что величина  $\psi$ , т. е. крутизна калибровочной кривой, зависит только от коэффициента распределения и дается формулой [7, 8]

$$\psi(K) \approx \begin{cases} \frac{(1-K)}{2} & \text{при } K > 0,5 \\ K \cdot \ln \left( \frac{8}{\pi^2 K} \right) & \text{при } K < 0,5 \end{cases} \quad (6)$$

Экспериментальная проверка формулы (6) показала [8, 10], что эта зависимость хорошо выполняется для различных полимеров и разных адсорбентов.

На рис. 2, а приведены экспериментальные данные [11] по калибровочным зависимостям декстранов на пористых стеклах с различным диаметром пор. Эти же данные представлены на рис. 2, б в универсальных координатах  $\psi=dK/d \ln M$  от  $K$ . Видно, что для всех пяти сорбентов точки ложатся на единую кривую, совпадающую с теоретической зависимостью (6). На рис. 2 приведены также данные работы [10], для ПС на пористом модифицированном кремнеземе SW-3000 с диаметром пор  $\sim 15$  нм.

Зависимость  $\psi(K)$  на рис. 2, б еще раз демонстрирует ограниченность представлений о постоянстве крутизны калибровочных кривых и показывает, что существует максимальное значение  $\psi_{\max}$ , отвечающее оптимальным условиям разделения в методе ГПХ. Согласно теории [7],  $\psi_{\max} \approx 0,3$  при  $K \approx 0,3$ . В этих условиях приведенный коэффициент разделения достигает максимальной величины

$$(R_s)_{\max} \approx 0,69 \frac{V_p}{4\bar{b}} \quad (7)$$

Пусть  $2d$  — диаметр пор адсорбента, а  $\bar{R}$  — средний радиус инерции разделяемых макромолекул. Как уже говорилось, согласно теории ГПХ [9],

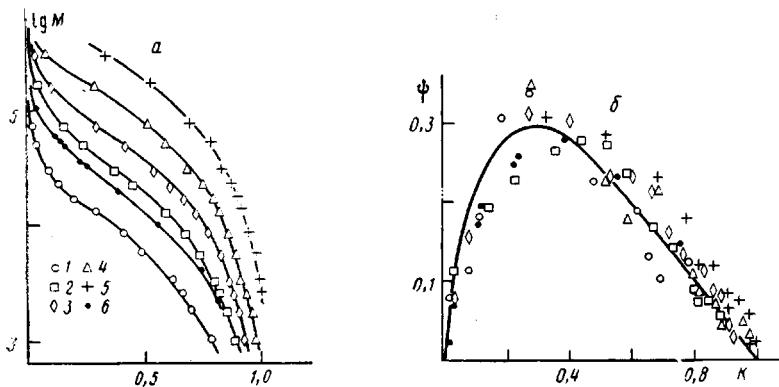


Рис. 2. Калибровочные зависимости для ГПХ узкодисперсных декстраполов на пористых стеклах с диаметром пор  $2d=8,4$  (1);  $15,9$  (2);  $22,7$  (3);  $31,4$  (4) и  $51,7$  нм (5), по данным работы [11], и для ГПХ ПС-стандартов на пористом кремнеземе SW-3000 с  $2d \approx 15$  нм (6) (по данным работы [10]). (а). Те же данные в универсальных координатах  $\psi=dK/d \ln M$  от  $K$  (б). Сплошная линия – теоретическая зависимость (б) для щелевидных пор

коэффициент распределения  $K$  является универсальной функцией отношения  $R/d$ . Это позволяет преобразовать формулу (6) к виду

$$\psi\left(\frac{R}{d}\right) \approx \begin{cases} (\pi)^{-1/2} \bar{R}/d & \text{при } \bar{R} < 0,45d \\ 2(\bar{R}/d)^2 \cdot \exp\left[-\left(\frac{\pi \bar{R}}{2d}\right)^2\right] & \text{при } \bar{R} > 0,45d \end{cases} \quad (8)$$

Зависимость  $\psi$  от  $\bar{R}/d$  представлена на рис. 3 (кривая 1). Из формулы (8) и рис. 3 следует, что максимум  $\psi$  и, следовательно, максимум разрешающей способности метода ГПХ для макромолекул реализуются при

$$\bar{R}_{\text{опт}} \approx \frac{1}{\pi} d \quad (9)$$

Формула (9) устанавливает оптимальное соотношение между средними размерами разделяемых макромолекул и размерами пор адсорбента.

Для обобщения формулы (9) на случай пор произвольной формы введем, следя [9], удельную поверхность  $\Sigma$  пор, равную отношению общей площади всех пор  $S_p$  к их суммарному объему  $V_p$ . Для пор правильной формы  $\Sigma=\alpha/d$ , где  $\alpha=1$  – для щелевидной,  $\alpha=2$  – для цилиндрической и  $\alpha=3$  – для сферической формы пор. Тогда имеем

$$\bar{R}_{\text{опт}} \approx \frac{2}{\pi} (\Sigma)^{-1} \approx 0,65 V_p / S_p \quad (10)$$

Наряду с оптимальным размером макромолекул важное значение имеет ширина рабочего диапазона по ММ (или по размерам), в пределах которого возможно хорошее разделение на данном адсорбенте. Чтобы найти рабочий интервал, среднюю часть калибровочной кривой (рис. 1) аппроксимируют линейной зависимостью, которую продолжают до пересечения с вертикальными прямыми  $V_R=V_0$  и  $V_R=V_0+V_p$ . В результате получают значения  $\lg M_{\text{макс}}$  и  $\lg M_{\text{мин}}$  и ширину рабочего интервала выражают в числе декад  $n=\lg(M_{\text{макс}}/M_{\text{мин}})$ . Нетрудно видеть, что ширина рабочего интервала  $n=\lg M_{\text{макс}}-\lg M_{\text{мин}}$  связана с максимальным значением  $\psi_{\text{макс}}$ . Действительно, согласно рис. 1,

$$n=V_p \left( \frac{d \ln M}{d V_R} \right)_{\text{макс}} = \left( \frac{dK}{d \ln M} \right)_{\text{макс}}^{-1} = (2,3 \psi_{\text{макс}})^{-1} \quad (11)$$

Поскольку  $\psi_{\text{макс}} \approx 0,3$  при любых  $d$ , то, согласно формуле (11), для любых

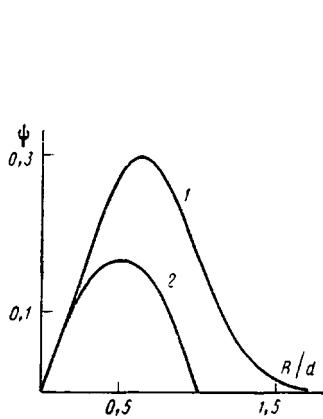


Рис. 3

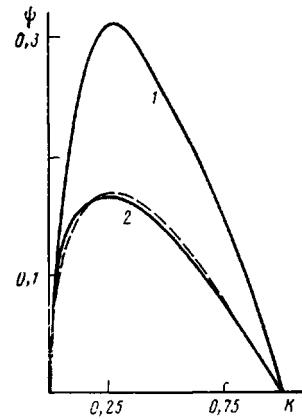


Рис. 4

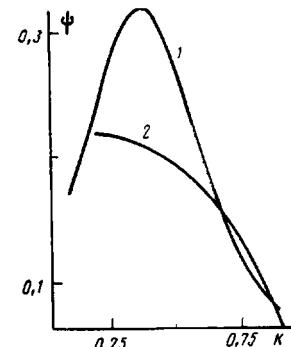


Рис. 5

Рис. 3. Зависимость наклона  $\psi$  калибровочных кривых от отношения размеров макромолекулы и поры для гауссовых клубков (1) и для белков (2)

Рис. 4. Зависимость  $\psi$  от  $K$  для гибкоцепных полимеров в хорошем растворителе с  $v=0,6$  (1) и в осадителе с  $v=1/3$  (2). Штриховая кривая – расчет по формуле (14) для сферических частиц (белков) в цилиндрических порах ( $\alpha=2$ )

Рис. 5. Зависимости  $\psi$  от  $K$  для декстранов (1) и глобулярных белков (2), построенные по эмпирическим формулам (16), (18), описывающим экспериментальные данные работы [15]

монофористых адсорбентов ширина рабочего интервала одинакова и составляет  $n \approx 1,46$  декад ММ.

**Разделение негауссовых макромолекул и белков.** Проведенный выше анализ разрешающей способности метода ГПХ, строго говоря, справедлив только для идеального  $\theta$ -растворителя, в котором  $\bar{R} \sim M^n$ , а  $v=v_\theta=0,5$ . На практике чаще используют хорошие растворители с  $0,6 < v < 0,5$ . Строгая теория ГПХ для макромолекул в хорошем растворителе (с объемными эффектами) в настоящее время отсутствует, однако экспериментально показано, что «универсальная калибровка Бенуа» [12], т. е. фактически универсальная зависимость  $K$  от  $\bar{R}$ , выполняется и для хороших и для  $\theta$ -растворителей. Поэтому можно полагать, что общие представления о разрешающей способности ГПХ для макромолекул останутся справедливыми, если качество растворителя учесть через параметр  $v$ . Тогда

$$\left. \begin{aligned} \psi &= \frac{dK}{d \ln M} = \frac{v}{v_\theta} \psi_\theta = \frac{v}{0,5} \psi_\theta \\ n &\approx \frac{0,5}{v} n_\theta \end{aligned} \right\} \quad (12)$$

Согласно формулам (12), в хороших растворителях с  $v=0,6$  разрешающая способность метода ГПХ на 20% выше, а рабочий диапазон уже, чем в  $\theta$ -растворителе.

Формулы (12) позволяют также оценить разрешающую способность метода ГПХ для макромолекул в осадителе при  $v_{\text{ос}}=1/3$ , т. е. фактически для глобулярных белков.

Зависимость  $\psi(K)$  белков можно получить и другим способом. Как известно [13, 14], коэффициент распределения  $K_\theta$  сферических молекул радиуса  $R$  равен

$$K_\theta = \left( 1 - \frac{R}{d} \right)^\alpha, \quad (13)$$

где  $\alpha=1, 2, 3$  для щелевидных, цилиндрических или сферических пор соответственно. Моделируя молекулы белков сплошными сферами с  $R \sim M^{\beta}$

из формулы (13) получаем

$$\psi_b(K) = \frac{dK_b}{d \ln M} = \frac{\alpha}{3} K^{(\alpha-1)/\alpha} (1 - K^{1/\alpha}) \quad (14)$$

Из анализа формулы (14) следует, что максимум  $\psi_b(K)$  достигается при  $K_{opt} = \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)^{\alpha}$  и равен  $(\psi_b)_{max} = \frac{1}{3} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)^{\alpha-1}$ . На рис. 4 представлена зависимость  $\phi$  от  $K$ , рассчитанная при цилиндрической форме пор для макромолекул в хорошем растворителе при  $v=0,6$  (кривая 1) и в осадителе при  $v=1/3$  (кривая 2, сплошная линия). Штриховой линией показана зависимость  $\psi_b(K)$ , рассчитанная по формуле (14) для модели цилиндрических пор при  $\alpha=2$ . Сравнение штриховой и сплошной линий 2 показывает, что зависимости  $\phi(K)$  для глобул и  $\psi_b(K)$  для белков практически одинаковы. Из сопоставления кривых 1 и 2 рис. 4 видно, что глобулы и белки в ГПХ делятся хуже, чем гибкоцепные полимеры. В то же время рабочий диапазон разделения по логарифмам ММ для белков шире, чем для синтетических полимеров, и, согласно формуле (12) составляет свыше двух декад.

Формула (14) позволяет также найти оптимальное соотношение между размерами молекулы белка (его радиусом  $R$ ) и шириной пор адсорбента. Для цилиндрических пор

$$R_{opt}=0,5d$$

Зависимость  $\phi$  от  $R/d$  для белков приведена на рис. 3 (кривая 2). Описанные закономерности разделения белков в ГПХ качественно согласуются с экспериментальными наблюдениями [15].

Интересно сопоставить калибровочную кривую, полученную экспериментально для ряда глобулярных белков с аналогичной кривой для тех же белков в денатурированном клубообразном состоянии. Численно проанализировав эти зависимости, можно было бы сравнить их с кривыми 1 и 2 на рис. 4. В работе [15] приведены ММ и стоксовские радиусы  $r_s$  (А) многих глобулярных белков. Обработка этих данных показала [16], что

$$r_s \approx 0,49 M^{0.378} \quad (15)$$

Авторы работы [15] тщательно измерили коэффициенты распределения  $K$  этих белков и привели эмпирическую зависимость между  $K$  и  $r_s$

$$r_s = 85,7 - 144,4K + 111,9K^2 - 47,6K^3 \quad (16)$$

Используя формулы (15), (16) как экспериментальную основу для калибровочной кривой для глобулярных белков, нетрудно получить для наклона этой кривой зависимость

$$\psi(K) = 0,38 \frac{(85,7 - 144,4K + 111,9K^2 - 47,6K^3)}{(144,4 - 223,8K + 142,8K^2)}, \quad (17)$$

которая представлена на рис. 5 (кривая 2).

Для денатурированных белков подобные зависимости отсутствуют. Можно, однако, воспользоваться экспериментальными данными работы [15] по ГПХ узкодисперсных декстранов на модифицированном пористом кремнеземе SW-3000. Согласно [15], эти данные хорошо аппроксимируются полиномом третьей степени

$$\lg M = 5,11 - 3,26K + 5,17K^2 - 4,69K^3$$

Дифференцируя это выражение, легко получить для клубообразных декстранов зависимость

$$\psi(K) = [2,3(3,26 - 10,34K + 14,07K^2)]^{-1}, \quad (18)$$

которая также представлена на рис. 5 (кривая 1).

Сопоставление экспериментальных данных для белков и декстранов (рис. 5) с теоретическими зависимостями для глобул и клубков (рис. 4)

свидетельствует о согласии теории и эксперимента. Из рис. 5 следует, что оптимального разделения клубкообразных макромолекул и глобулярных белков можно достичь при коэффициентах распределения  $K \approx 0,3$ . При этом разделение полимерных клубков окажется в 1,5 раза лучше, чем разделение глобулярных белков.

В заключение коснемся вопроса о разрешающей способности ГПХ для сильно разветвленных полимеров, получаемых полимеризацией функционально активных мономеров. В этом случае валентные связи случайно образуются между любой парой мономеров, содержащих свободные радикалы, и образующиеся структуры имеют вид так называемых решеточных зверушек [17]. Средний радиус инерции таких макромолекул подчиняется соотношению  $R \sim M^{\alpha}$ , независимо от качества растворителя [18]. Согласно формулам (12), разрешающая способность метода ГПХ для таких случайно разветвленных цепей вдвое ниже, чем для линейных гауссовых макромолекул той же ММ, а рабочий диапазон для них вдвое шире. Представляет интерес экспериментальная проверка этих предсказаний теории.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D., Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography. N. Y., 1979.
2. Separations Methods/Ed. by Deyl Z. Amsterdam, 1984. P. 275.
3. Balke S. T. Quantitative Column Liquid Chromatography. Amsterdam, 1988.
4. Нефедов П. П., Лавренко П. Н. Транспортные методы в аналитической химии полимеров. Л., 1979.
5. Беленъкий Е. Г., Виленчик Л. З. Хроматография полимеров. М., 1978.
6. Tung L. H., Moore J. C., Knight G. W. // J. Appl. Polymer Sci. 1966. V. 10. P. 1261.
7. Горбунов А. А., Скворцов А. М. // Высокомолек. соед. А. 1978. Т. 29. № 5. С. 920.
8. Горбунов А. А., Скворцов А. М., Теников М. Б. // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31. № 6. С. 1306.
9. Casassa E. F., Tagami Y. // Macromolecules. 1969. V. 2. № 1. P. 14.
10. Теников М. Б., Горбунов А. А., Скворцов А. М. // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31. № 6. С.
11. Haller H. // Macromolecules. 1977. V. 10. № 1. P. 83.
12. Grubisic Z., Rempp P., Benoit H. // J. Polymer Sci. B. 1967. V. 5. № 9. P. 7531.
13. Porath J. Pure Appl. Chem. 1963. V. 6. № 1. P. 233.
14. Giddings J. C., Kucera E., Russell C. P., Myers M. N. J. Phys. Chem. 1968. V. 72. № 13. P. 4397.
15. Frigon R. P., Leyboldt J. K., Uyeji S., Henderson L. W. // Analyt. Chem. 1983. V. 55. № 8. P. 1349.
16. Andrews P. // Meth. Biochem. Analys. 1970. V. 18. № 1. P. 1.
17. Обухов С. П. // IV Всесоюз. совещ. «Математические методы для исследования полимеров и биополимеров». Пущино, 1985. С. 14.
18. Пржак В. И., Розенберг Б. А., Ениколопян Н. С. Сетчатые полимеры. М., 1979.

Ленинградский институт  
особо чистых биопрепаратов

Поступила в редакцию  
21.11.88

Ленинградский химико-фармацевтический  
институт

A. A. Gorbunov, A. M. Skvortsov

#### RESOLUTION OF THE GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY OF POLYMERS

##### Summary

Resolution of the GPC method for separation of macromolecules and globular proteins has been theoretically analysed. The relation between optimal dimensions of separated macromolecules and proteins and the width of adsorbent pores is shown. For all monoporous sorbents the separation range towards the polymer MM logarithm is the same ( $\sim 1.5$  decade). The resolution of GPC for proteins is by 1.5-1.8 fold worse, while their working range is by same fold wider than for flexible polymers.