

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 541.64

© 1991 г. Б. Г. Беленький, Э. С. Ганкина, В. Н. Згонник,
И. И. Малахова, Е. Ю. МеленевскаяТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ:
МЕХАНИЗМ РАЗДЕЛЕНИЯ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ПОЛИДИСПЕРСНОСТИ

Методом ТСХ изучены закономерности разделения блок-сополимеров (БС) типа АВ, состоящих из ПС и поли-*трет*-бутилметакрилата (ПБМА). Показано, что в условиях критической для ПБМА ТСХ (КТСХ) БС хроматографируются по механизму эксклюзионной ТСХ (ЭТСХ) ПС-блока (при этом ПБМА-блок БС является хроматографически невидимым). Найдены условия КТСХ для ПС, когда БС хроматографируется по механизму ЭТСХ ПБМА компонента (при этом ПС-блок БС является хроматографически невидимым). Методом ЭТСХ оценивали ММ БС, а условиях КТСХ (ПБМА) – ЭТСХ (ПС) и КТСХ (ПС) – ЭТСХ (ПБМА) определяли ММ ПС- и ПБМА-блоков. Рассчитанные составы исследованных БС хорошо соответствовали данным из расчета кинетики сополимеризации и микроколоночной эксклюзионной хроматографии.

Молекулярно-массовое распределение и композиционная неоднородность (КН) блок-сополимеров (БС) являются их важнейшими характеристиками, раскрывающими механизм синтеза и позволяющими прогнозировать их свойства.

Вопросу анализа КН блок-сополимеров посвящено значительное число исследований с использованием классических и хроматографических методов фракционирования, обобщенные в работах [1–3].

При наличии сложной гетерогенности (по ММР и КН) единственный способ надежного анализа БС основан на перекрестном фракционировании [1]. При узком распределении по составу ММР БС может быть достаточно точно определено и с использованием одномерного фракционирования, например с помощью двухдетекторной эксклюзионной хроматографии (с непрерывным определением состава фракций) [4].

Наиболее эффективно хроматографическое перекрестное фракционирование БС можно осуществить с использованием хроматографии в критических условиях (КХ), представляющей наиболее селективный вариант хроматографии полимеров. На основе современных представлений теории критических явлений при адсорбции макромолекул на пористых адсорбентах в последние годы разработана теория жидкостной хроматографии полимеров, показывающая, что эксклюзионная (ЭХ) и адсорбционная (АХ) хроматография разделяются критической точкой, в которой при коэффициенте распределения $K_d=1$ происходит фазовый переход первого рода и макромолекулы из адсорбированного состояния переходят в раствор при крайне незначительном изменении элюента или температуры [5–8]. Теоретически показано [9, 10], что существуют условия КХ, при которых гетерополимеры (сополимеры, функциональные олигомеры) могут разделяться только по размерам (ММ) одного из компонентов макромолекулы, в то время как второй компонент, находясь в критических условиях, представляет хроматографическую «невидимку», когда его K_d не зависит от ММ. Применительно к БС КХ может быть использована для разделения по размерам ММ одного из блоков (хроматографически «видимого»). Полученные фракции могут быть охарактеризованы по ММР с помощью других хроматографических методов, например ЭХ, что позволяет получить полную картину гетерогенности БС (ММР и КН).

Рассмотрим некоторые теоретические аспекты хроматографии БС. Состав двухблочного сополимера АВ охарактеризуем долей компонента А

$$\xi_A = \frac{N_A}{N_A + N_B}, \quad (1)$$

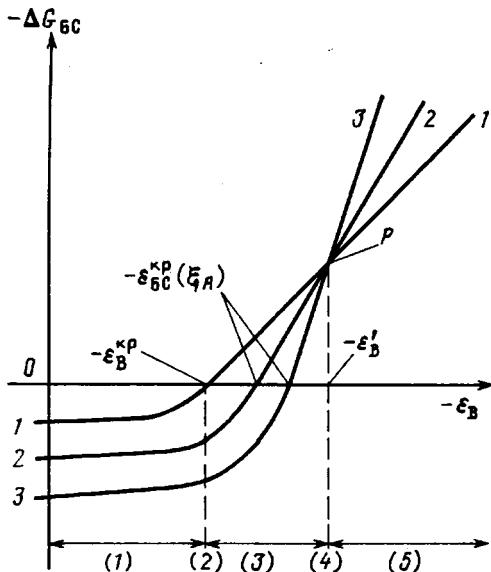


Рис. 1. Зависимость изменения энергии Гиббса адсорбции БС ($-\Delta G_{BC}$) от энергии взаимодействия с поверхностью адсорбента сегмента блока В ($-\varepsilon_B$). $\xi=0$ (1), 0,1 (2), 0,2 (3)

где N – число звеньев. Положим, что звенья типа В – «липкие», т. е. адсорбируются на поверхности пор, а звенья типа А адсорбционно неактивны и, следовательно, находятся в объеме пор. Теория показывает, что при заданной энергии взаимодействия сегментов БС с адсорбирующими поверхностью $-\varepsilon_A$ и $-\varepsilon_B$ в единицах kT , где k – постоянная Больцмана, а T – температура (К), существует критический состав БС ξ_A^{kp} , при котором все цепи с $\xi_A < \xi_A^{kp}$ находятся в растворе (подвижной фазе). При этом изменение гиббсовой энергии БС (в единицах kT) $-\Delta G_{BC}=0$. Коэффициент распределения макромолекулы в этих условиях $K_d=\exp(-\Delta G)=1$. Результатом изменения $-\Delta G$ при хроматографии является хроматографическая подвижность R_f

$$R_f = \frac{1}{1 + (V_p/V_o) \exp(-\Delta G)}, \quad (2)$$

где V_p и V_o – объемы порового и межчастичного пространства сорбента.

На рис. 1 представлена зависимость энергии Гиббса $-\Delta G_{BC}$ адсорбции БС с блоками В одинакового размера ($M_B=\text{const}$) от энергии взаимодействия (в единицах kT) с поверхностью сегментов более «липкого» блока В ($-\varepsilon_B > -\varepsilon_A$). БС различаются по составу ξ_A (размеру блока А). Кривая $\xi_A=0$ соответствует гомополимеру В, а кривые $\xi_A=0,1$ и $\xi_A=0,2$ соответствуют БС, у которых ММ блока А составляет 10 и 20% ММ блока В. При увеличении $-\varepsilon_B$ (путем уменьшении содержания вытеснителя в элюенте) можно выделить следующие сменяющие друг друга режимы хроматографии (обозначены на рисунке цифрами в скобках):

1. Эксклюзионная хроматография БС ($-\varepsilon_B < -\varepsilon_B^{kp}$) с эксклюзионным разделением БС по размеру макромолекулы (пропорциональном $M_{BC}=M_A+M_B$).

2. Критическая хроматография по блоку В ($-\varepsilon_B = -\varepsilon_B^{kp}$) с эксклюзионным разделением БС по размеру (ММ) блока А (блок В – «хроматографическая невидимка»)¹.

3. Докритическая хроматография по блоку А ($-\varepsilon_B^{kp} < -\varepsilon_B < -\varepsilon_B'$), где $-\varepsilon_B'$ – энергия, соответствующая составу элюента, критического для блока А ($-\varepsilon_A = -\varepsilon_A^{kp}$). При этом происходит адсорбционное разделение по длине блока В при наличии эксклюзионного эффекта для блока А (с увеличением M_A $-\Delta G_{BC}$ уменьшается, а R_f БС увеличивается).

4. Критическая хроматография по блоку А ($-\varepsilon_A = -\varepsilon_A^{kp}$ при $-\varepsilon_B > -\varepsilon_B^{kp}$). При этом кривые БС с разными ξ_A пересекаются в точке P , где может происходить только адсорбционное разделение по длине блока В (блок А – «хроматографическая невидимка»).

5. Околокритическая хроматография по блоку А ($-\varepsilon_A > -\varepsilon_A^{kp}$, $-\varepsilon_B \gg -\varepsilon_B^{kp}$). При этом происходит разделение по длине блоков А и В (с увеличением M_A $-\Delta G_{BC}$ увеличивается и R_f БС уменьшается).

Как видно из рис. 1, если изменять $-\varepsilon_B$ от $-\varepsilon_B = +\infty$ до $-\varepsilon_B^{kp}$ (увеличивая содержание вытеснителя в элюенте), произойдет постепенная десорбция БС в точке, где $-\Delta G_{BC}(\xi_A) = 0$ ($K_d = 1$), с постепенно увеличивающимся содержанием «липкого»

¹ Можно было бы также выделить режимы докритической и околокритической ТСХ по блоку В (вокруг точки (2): $-\varepsilon_B = -\varepsilon_B^{kp}$), но они не представляют аналитического интереса.

**Молекулярные массы БС, ПС-предшественников БС, ПБМА,
и также ПС и ПБМА-блоков БС**

Метод определения	Молекулярная масса $M \cdot 10^{-3}$										
	блок-сополимеров					ПС-предшественники БС			ПБМА		
	БС-31	БС-21	БС-53	БС-41	БС-52	ПС-30	ПС-50	ПС-20	1	2	3
Из условий полимеризации	130	95	75	65	27	64,5 *	13,5 *	80 *	20	80	200
TCX	127	97	78	69	30	66	15	83	24	81	250
ПС-блок из условий полимеризации	64,5	80	13,5	5	13,5						
TCX	60	85	11	5	11						
ПБМА-блок из условий полимеризации	64,5	15	60	60	13,5						
TCX	60	13	60	60	13						

* Определено методом микроколоночной эксклюзионной хроматографии.

блока В (уменьшением ξ_0). В последнюю очередь десорбируется (в точке $-\varepsilon_B = -\varepsilon_{B^{kp}}$) гомополимер В. Селективность этого процесса будет расти с уменьшением размера пор адсорбента [9, 10].

Цель настоящей работы — экспериментальная реализация в ТСХ всех названных режимов хроматографии и применение этих вариантов ТСХ для определения полидисперсности блок-сополимеров ПС — ПБМА.

БС ПС — ПБМА типа АВ получены методом последовательной анионной полимеризации в цельнопаянной вакуумной системе (10^{-6} мм рт. ст.) [11—13]. ПС-предшественники БС синтезированы в условиях, позволяющих получить линейные узко-дисперсные гомополимеры [11]. После завершения полимеризации ПС (до сополимеризации с БМА) из реакционной системы отбирали пробы, которые представляли реперные образцы ПС-блоков каждого БС. По условиям синтеза в БС возможно наличие гомо-ПС за счет реакции «живущих» цепей ПС с возможными примесями во втором мономере (БМА), но не должен содержаться гомополимер метакрилового мономера (ПБМА).

Молекулярные массы ПС-предшественников БС определяли методом микроколоночной эксклюзионной хроматографии (МЭХ) [14].

В таблице приведены молекулярные массы ПС-предшественников БС, ПБМА и БС по данным МЭХ, ТСХ и рассчитанные из условий сополимеризации.

ТСХ проводили, используя готовые пластиинки на стеклянной подложке с силикагелем КСКГ (диаметр пор 120 Å, фракция 5—20 мкм) [15], и силиказолем в качестве связующего (СССР) или приготовленные вручную по той же технологии [15] пластиинки с силикагелем Lichrospher Si-300 (диаметр пор 300 Å, фракция 10 мкм) фирмы «Merck» (ФРГ). Перед хроматографией пластиинки для удаления пылинок промывали в хромовой смеси, после чего тщательно отмывали в проточной воде и активировали 30 мин при 120°. Пробы наносили из растворов (с концентрацией 5 мг/мл) ПС в CCl_4 , ПБМА и БС в $CHCl_3$ в количестве 2—3 мкг (ПС и ПБМА) и 3—5 мкг (БС).

Пластиину с нанесенными образцами насыщали в парах элюента в течение 1 ч и затем хроматографировали восходящим способом в соответствующем элюенте, высушивали в термостате при 160° в течение 15—20 мин и детектировали, опрыскивая из пульверизатора 3,3%-ным раствором $KMnO_4$ в концентрированной H_2SO_4 с последующим нагреванием при 180° в течение 15—20 мин. Зоны полимеров наблюдали в виде черных пятен на белом фоне.

В работе использовали ПС-стандарты фирмы «Waters» (США).

Эксклюзионная ТСХ. Оценка ММ блок-сополимеров, ПС-предшественников БС и ПБМА методом ЭТСХ. По данным ЭТСХ в МЭК были построены калибровочные зависимости R_p от $lg M$ для ПС-стандартов на силикагелях с диаметром пор 120 Å (Si-120) и 300 Å (Si-300). Эти зависимости линейны на силикагеле Si-120 в диапазоне $M=5 \cdot 10^3 - 50 \cdot 10^3$ (предел исключения $50 \cdot 10^3$), а на силикагеле Si-300 в диапазоне $M=50 \cdot 10^3 - 500 \cdot 10^3$ (предел исключения $500 \cdot 10^3$). Используя указанные зависимости, с помощью ЭТСХ определяли ММ блок-сополимеров, ПС-предшественников БС и ПБМА. Полученные результаты представлены в таблице. Видно, что ММ блок-сополимеров, полученные с помощью ЭТСХ, рассчитанные из условий полимеризации и данных МЭХ, хорошо совпадают.

Критическая ТСХ для ПБМА — эксклюзионная ТСХ для ПС (КТСХ (ПБМА) — ЭТСХ (ПС)). На пластиинках с силикагелями Si-120 и Si-300 найдены условия (состав элюента) КТСХ ПБМА, при которых образцы ПС хроматографируются в режиме ЭТСХ. В найденном режиме КТСХ (ПБМА) — ЭТСХ (ПС) хроматографировали две пары БС с близкой молекулярной массой ПС-блоков, но различающиеся по ММ ПБМА-блоков. Из рис. 2, а видно, что на силикагеле Si-120 ПБМА разной ММ (пять-

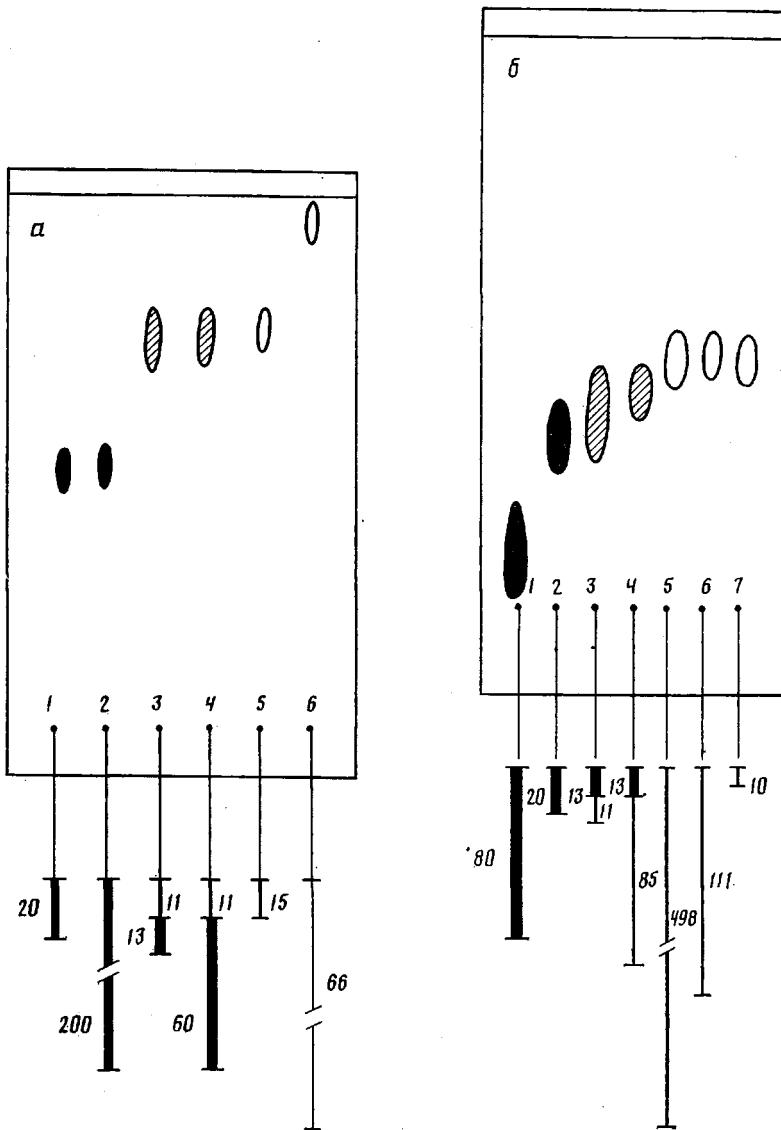


Рис. 2а, б

на 1 и 2) имеют одинаковые R_f , соответствующие $K_d=1$ (доказательство условий КТСХ для ПБМА); при этом БС (пятна 3 и 4) с одинаковой молекулярной массой ПС-блока ($13,5 \cdot 10^3$) и разной ММ ПБМА-блоков ($13,5 \cdot 10^3$ и $60 \cdot 10^3$) имеют одинаковые R_f ($K_d < 1$), соответствующие молекулярные массы ПС-предшественника (пятно 5) с $M = 13,5 \cdot 10^3$. Эти результаты были подтверждены при КТСХ (ПБМА) – ЭТСХ (ПС) на силикагеле Si-300, где БС с молекулярной массой ПС-блоков $64,5 \cdot 10^3$ и $80 \cdot 10^3$ и ММ ПБМА-блоков $64,5 \cdot 10^3$ и $15 \cdot 10^3$ имеют R_f , соответствующие R_f ПС-предшественников с $M = 64,5 \cdot 10^3$ и $80 \cdot 10^3$. Описанные эксперименты показали, что в условиях КТСХ (ПБМА) – ЭТСХ (ПС) молекулярная масса ПБМА-блока не влияет на хроматографическое поведение БС, которые хроматографируются в режиме, аналогичном ЭТСХ ПС, соответствующих ММ их ПС-блоков. ММ ПС-блоков БС, определенные в условиях КТСХ (ПБМА) – ЭТСХ (ПС), приведены в таблице.

Критическая ТСХ для ПС, адсорбционная ТСХ (АТСХ) для ПБМА. Режим КТСХ (ПС) – АТСХ (ПБМА) для БС с одинаковой молекулярной массой ПБМА-блоков соответствует точке 4 на рис. 1. Однако в условиях КТСХ для ПС на силикагеле даже у относительно низкомолекулярных ПБМА $K_d \gg 1$ и зоны ПБМА остаются на старте. В этих условиях невозможно хроматографически различать БС с разной ММ ПБМА-блоков. Добавляя в элюент пиридин, который имеет сильнейшее средство к силанольному гидроксилу, можно осуществить динамическое модифицирование силикагеля, превращающее его в аналог фенил-силикагеля, средство которого к ПС, как показано в работе [3], превышает средство к ПБМА. Варьируя количество пиридина, можно осуществить условия КТСХ (ПС) – АТСХ (ПБМА), а также при меньшем содержании – докритической ТСХ (ДКТСХ), а при большем содержании – оклокритической ТСХ (ОКТСХ) для ПС при АТСХ для ПБМА (состояния 3, 4, 5).

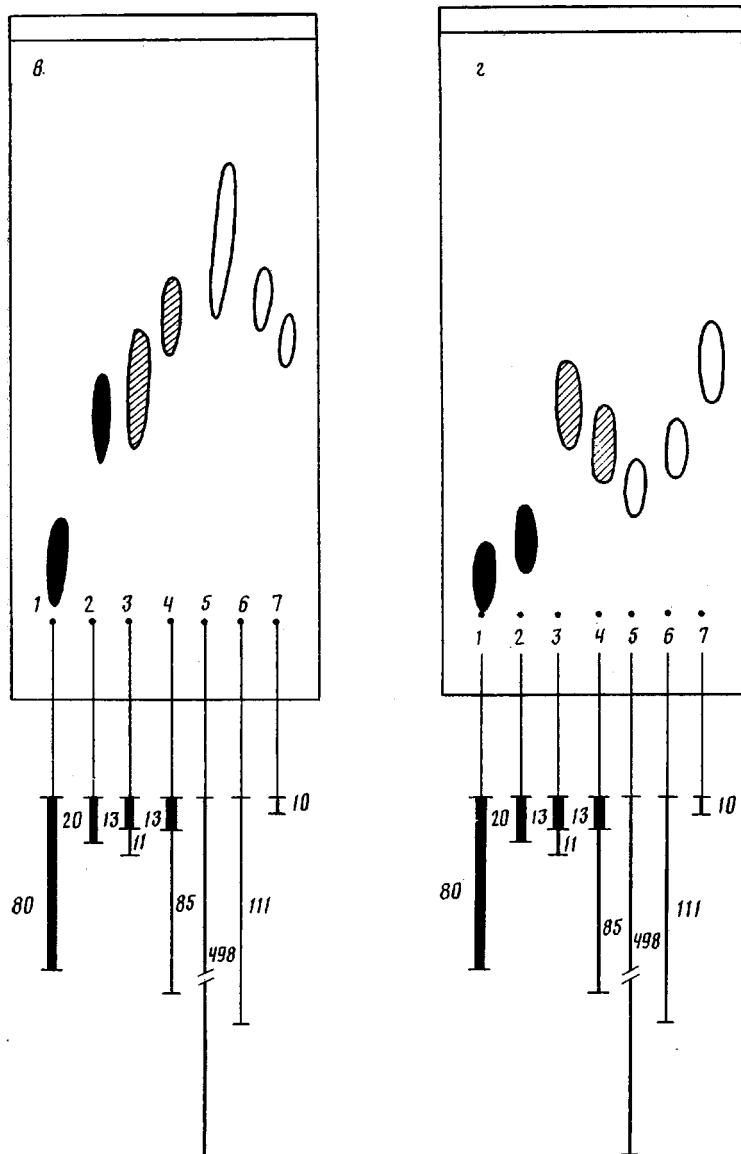


Рис. 2_{е, г}

на рис. 1). И наконец, добавляя в элюент еще большее количество пиридина, можно полностью инвертировать хроматограмму, реализуя режим КТСХ (ПС) – ЭТСХ (ПБМА).

Режим КТСХ (ПС) – АТСХ (ПБМА), ДКТСХ (ПС) – АТСХ (ПБМА), ОКТСХ (ПС) – АТСХ (ПБМА). На рис. 2, б–г показаны хроматограммы, соответствующие режимам КТСХ (ПС) – АТСХ (ПБМА), ДКТСХ (ПС) – АТСХ (ПБМА), ОКТСХ (ПС) – АТСХ (ПБМА), что легко определяется по взаимному расположению хроматографических зон ПС и БС с ПБ-блоками различной ММ. На рис. 2, б зоны ПС разной ММ находятся на одном уровне (КТСХ ПС). В этих условиях БС с ПС-блоками разной ММ и ПБМА-блоками одной ММ также находятся на одном уровне (имеют одинаковые R_f). На рис. 2, г у ПС-зон R_f возрастает в соответствии с увеличением ММ (ДКТСХ ПС), при этом БС с ПС-блоком большей ММ расположен выше (имеет больший R_f). На рис. 2, е с увеличением ММ уменьшается R_f ПС, так как растет адсорбция на силикагеле (ОКТСХ ПС), соответственно и R_f БС ($M_{\text{ПБМА}} = \text{const}$) чувствует величину ПС-блока: с увеличением его ММ R_f уменьшается.

Критическая ТСХ для ПС – эксклюзионная ТСХ для ПБМА, КТСХ (ПС) – ЭТСХ (ПБМА). На рис. 2, д показана ТСХ блок-сополимеров в условиях КТСХ (ПС) – ЭТСХ (ПБМА). Видно, что ПС-1 и ПС-2 с разной ММ движутся на одном уровне (доказательство КТСХ для ПС). Пары БС: 3, 4 и 5, 6 с близкой ММ ПБМА-блоков (соответственно $13,5 \cdot 10^3$, $15 \cdot 10^3$ и $64,5 \cdot 10^3$, $60 \cdot 10^3$), но разной молекулярной массой ПС-блоков имеют одинаковые (попарно) R_f , определяемые ММ ПБМА-блоков, как это видно из их сопоставления с R_f ПБМА с $M=20 \cdot 10^3$ и $80 \cdot 10^3$. Таким образом,

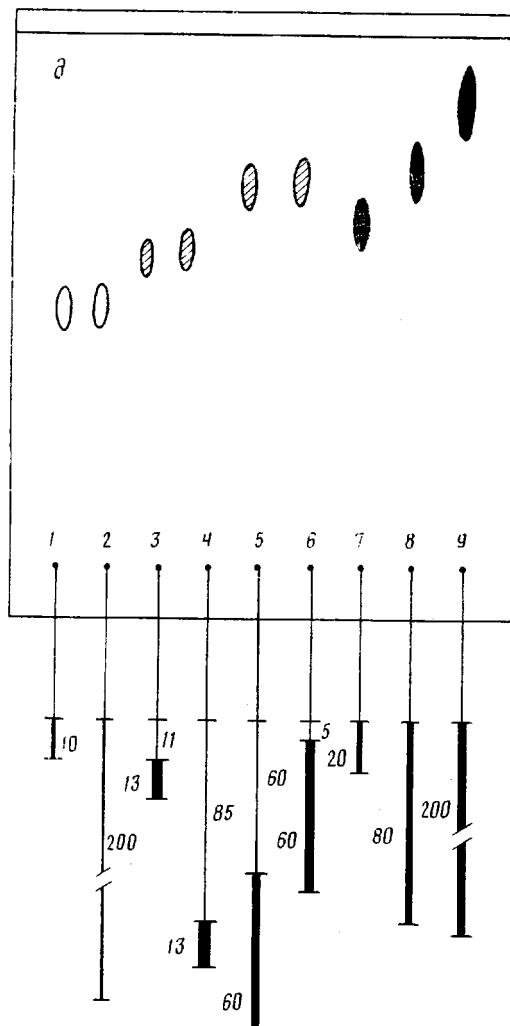


Рис. 2. Различные виды ТСХ гомополимеров и блок-сополимеров на силикагеле-
Si-120 (а-е) и Si-300 (д). Элюент: циклогексан – толуол – МЭК – пиридин в соот-
ношении 9 : 1 : 2,3 : 0 (а); 9 : 0,4 : 1,8 : 1 (б); 9 : 0,4 : 1,7 : 1 (в); 9 : 0,4 : 1,3 : 1,2 (г);
9 : 0,4 : 0,4 : 4 (д). а: КТСХ(ПБМА) – ЭТСХ(ПС); 1, 2 – ПБМА с $M=20\ 000$ (1) и
 $2 \cdot 10^{-5}$ (2); 3 – БС-52, 4 – БС-53, 5 – ПС-50, 6 – ПС-30. б-е: АТСХ(ПБМА) и различ-
ные типы ТСХ для ПС: КТСХ (6), ДКТСХ (в) и ОКТСХ (г); объекты: ПБМА
с $M=80\ 000$ (1) и $20\ 000$ (2); 3 – БС-52, 4 – БС-21; 5–7 – ПС с $M \cdot 10^{-3}=498$ (5),
111 (6) и 10 (7). д: КТСХ(ПС) – ЭТСХ(ПБМА); 1, 2 – ПС с $M \cdot 10^{-3}=10$ (1) и 200
(2); 3 – БС-52, 4 – БС-24, 5 – БС-31, 6 – БС-41; 7–9 – ПБМА с $M \cdot 10^{-3}=20$ (7), 80 (8)
и 200 (9). Схематически изображены гомополимеры и БС в виде зон: светлые –
ПС, темные – ПБМА, заштрихованные – БС, а также их состав в виде линий,
длина которых соответствует ММ полимеров (цифры указывают $M \cdot 10^{-3}$ полимеров
и блоков БС по данным ТСХ): тонкие линии – ПС, утолщенные – ПБМА

здесь реализованы условия КТСХ (ПС) – ЭТСХ (ПБМА), где ПС-блок БС является хроматографически невидимым и сопоставление с ЭТСХ ПБМА позволяет оценить ММ ПБМА-блока.

Приведенные в таблице значения ММ исследованных БС, их ПС- и ПБМА-блоков по данным ТСХ показывают, что они хорошо согласуются между собой и с данными, полученными из условий полимеризации и МЭХ.

В ряде случаев БС негомогенны и содержат примеси гомополимеров. Их можно отделить в условиях докритической ТСХ, где примеси более «липкого» гомополимера сильнее адсорбированы, чем БС (имеют R_s , меньшие R_f БС). Примеси гомополимеров можно отделить от БС, используя ступенчатую ТСХ [16]. Мы отделяли ПС от БС с помощью ЭТСХ на сухой пластине в хлороформе. В выбранных условиях полимеризации исследованные нами БС не содержали примеси гомо-ПБМА. В случае необходимости ПБМА можно отделить от БС с помощью осадительной ТСХ, используя соответствующий растворитель.

Дальнейшее развитие этой работы связано с количественным определением композиционной неоднородности БС разного типа на основе механизмов КТСХ(Б_A) –

\exists TCX(Б_В) и КTCX(Б_В) — \exists TCX(Б_В) с применением техники двумерной TCX. Можно полагать, что разработанный метод анализа БС является универсальным, а механизм реализации указанных режимов путем нормально-фазной и обращенно-фазной (при динамической модификации силикагеля) TCX осуществляется достаточно легко.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мягченков В. А., Френкель С. Я. Композиционная неоднородность сополимеров. Л., 1988. 247 с.
2. Mori S. // J. Appl. Polymer Sci. 1989. V. 38. № 1. P. 95.
3. Glöckner G., Müller A. H. E. // 1989. V. 38. № 9. P. 1761.
4. Красиков В. Д., Несторов В. В., Беленький Б. Г., Згонник В. П., Ерусалимский Б. Л. // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31. № 1. С. 204.
5. Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Теников М. Б., Виленчик Л. З. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 231. № 5. С. 1147.
6. Теников М. Б., Нефедов П. П., Лазарева М. А., Френкель С. Я. // Высокомолек. соед. А. 1977. Т. 19. № 3. С. 657.
7. Скворцов А. М., Беленький Б. Г., Ганкина З. С., Теников М. Б. // Высокомолек. соед. А. 1978. Т. 20. № 3. С. 678.
8. Горбунов А. А., Скворцов А. М. // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 28. № 10. С. 2170.
9. Горбунов А. А., Скворцов А. М. // Высокомолек. соед. А. 1979. Т. 21. № 2. С. 339.
10. Горбунов А. А., Скворцов А. М. // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 4. С. 895.
11. Еремина М. А., Эренбург В. Н., Згонник В. Н., Меленевская Е. Ю., Левенгаген Е. П., Пальчик Р. И. // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 6. С. 1308.
12. Müller M. N., Resent E. // Advances in Anionic Polymerization. 1987. Р. 205.
13. Müller A. H. E. // Makromolek. Chem. 1981. В. 182. № 10. S. 2863.
14. Беленький Б. Г., Белло М. С., Кевер Е. Е., Королева Е. М. // Синтез, структура и свойства полимеров. Л., 1989. С. 253.
15. Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Литвинова Л. С., Ефимова И. И., Васьковский В. Е., Хотимченко С. В., Дикарев В. П. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 1. С. 244.
16. Gankina E. S., Efimova I. I., Kever J. J., Belen'kii B. G. // Talanta. 1987. V. 34. № 1. P. 167.

Институт аналитического приборостроения АН СССР

Поступила в редакцию
14.03.91

B. G. Belen'kii, E. S. Gankina, V. N. Zgonnik,
I. I. Malakhova, Ye. Yu. Melenevskaya

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY OF BLOCK COPOLYMERS: MECHANISM OF SEPARATION, DETERMINATION OF POLYMOLECULARITY

Summary

Regularities of separation of block copolymers of the AB type consisting of PS and poly-*tert*-butyl methacrylate (PBMA) have been studied by the TLC method. In conditions being critical for PBMA the chromatography proceeds following the mechanism of exclusion TLC (ETLC) for the PS block (PBMA block is chromatographically invisible). The analogous conditions for ETLC of the PBMA block (PS block is chromatographically invisible) are found. MM of block copolymers are evaluated using ETLC, and in conditions corresponding to critical ones MM of particular blocks are determined. The calculated compositions of block copolymers under study coincide with those obtained from the kinetics of copolymerization and microcolumn exclusion chromatography.