

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ им. А.Н.НЕСМЕЯНОВА.
НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ПО ФИЗИКЕ И
ХИМИИ ПОЛИМЕРОВ

**ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ПОЛИМЕРОВ**

Задача спецпрактикума

Благодатских И.В.

МОСКВА 2010

Оглавление

1. ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ ПОЛИМЕРОВ
 - 1.1 Движущие силы и режимы хроматографии полимеров
 - 1.2. Характеристики хроматографического пика. Концепция теоретических тарелок.
 - 1.3 Основы метода эксклюзионной (гель-проникающей) хроматографии
2. ПРОВЕДЕНИЕ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ ПО АНАЛИЗУ ММР ПОЛИМЕРА МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩЕЙ ХРОМАТОГРАФИИ
3. ЛИТЕРАТУРА

1. ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ ПОЛИМЕРОВ.

1.1 Движущие силы и режимы хроматографии полимеров.

Хроматография - метод разделения веществ путем распределения между двумя фазами, одна из которых подвижна, а другая неподвижна. Роль подвижной фазы в жидкостной хроматографии играет жидкость (элюент), движущаяся в каналах между частицами вдоль колонки, заполненной пористым материалом (см. рис. 1).

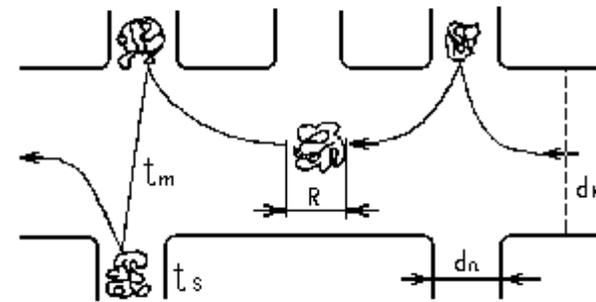


Рис. 1. Движение макромолекулы в хроматографической колонке: d_k - размер каналов между частицами неподвижной фазы; d_n - размер пор; R - размер макромолекулы; t_s - время, проведенное макромолекулой в поре, t_m - в подвижной фазе.

Неподвижной фазой являются поры сорбента, заполненные жидкостью. Средняя скорость передвижения этой фазы вдоль оси колонки равна нулю. Анализируемое вещество перемещается вдоль оси колонки, двигаясь вместе с подвижной фазой и время от времени делая остановки при попадании в неподвижную фазу. Этот процесс иллюстрирует рис.1, где схематически изображено скачкообразное движение макромолекулы с размером R по каналам с размером d , соответствующим размеру частиц. Молекулы делают остановки в щелевидных порах, размер которых по порядку величины соответствует размеру макромолекул. Время между последовательными остановками может быть записано как:

$$t \sim t_s + t_m + t_k, \quad (1)$$

где t_s - время пребывания молекулы в неподвижной фазе, $t_m \sim \frac{d^2}{D}$ - время, проведенное молекулой в подвижной фазе (D - коэффициент поперечной диффузии, t_k - время перехода из подвижной фазы в неподвижную и обратно).

Обычно в процессах высокоэффективной жидкостной хроматографии (High Performance Liquid Chromatography в англоязычной литературе) в ее аналитическом варианте это время t_k много меньше первых двух и его можно опустить в формуле (1). Если число остановок при движении по колонке достаточно велико, то и общее время движения макромолекулы по колонке достаточно велико, по сравнению с характерным временем установления равновесия. В этом случае для определения вероятности нахождения макромолекулы в единице объема неподвижной фазы по отношению к подвижной фазе (или коэффициента распределения K_d равного отношению концентраций в данных фазах) можно использовать методы равновесной термодинамики. А именно, коэффициент распределения будет определяться свободной энергией перехода макромолекулы из подвижной фазы в неподвижную:

$$K_d = \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) = \exp\left(\frac{T\Delta S - \Delta H}{RT}\right) \quad (2)$$

Для цепи, состоящей из N сегментов,

$$K_d = \exp(-N\Delta\mu), \quad (3)$$

где $\Delta\mu$ - изменение химического потенциала сегмента.

Коэффициент распределения в хроматографии является фундаментальным понятием и определяется следующим образом:

$$K_d = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0} \quad (4)$$

где V_R - объем с которым выходит из колонки данное вещество, V_0 - объем подвижной фазы, определяемый по выходу наиболее крупных макромолекул не попадающих в поры, V_t - объем элюирования веществ, выходящих вместе с фронтом растворителя.

Из (3) сразу можно видеть, что в зависимости от знака ΔG , макромолекулы ведут себя различным образом при попадании в пору (см.рис.2) :

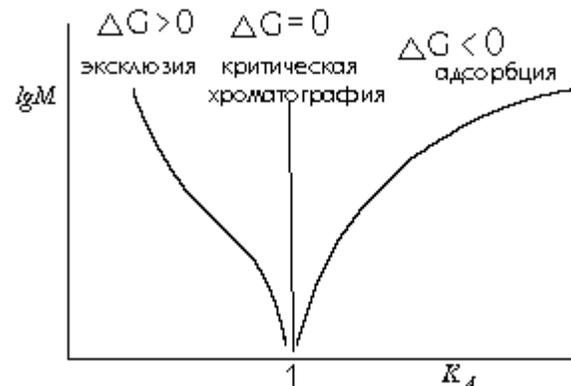


Рис. 2.

если $\Delta G > 0$, то K_d стремится к 0 с ростом длины макромолекулы (при этом уменьшается и объем элюирования). Это соответствует эксклюзионному режиму хроматографии. При $\Delta G < 0$ K_d экспоненциально растет с ростом ММ и это соответствует адсорбционному режиму хроматографии. Таким образом, оба режима хроматографии могут рассматриваться в рамках единого механизма и, более того, плавно меняя энергию взаимодействия сегмента с поверхностью сорбента за счет состава растворителя или температуры, можно обратимо переходить от одного режима к другому.

Экспериментально это было впервые показано в работе Тенникова и др. [1]. Точка (для данной пары полимер - сорбент - это состав растворителя и температура), соответствующая равенству $\Delta G = 0$, при которой происходит компенсация энтропийных потерь и энергетического выигрыша при каждом соударении сегмента макромолекулы со стенкой поры называется критической точкой адсорбции или критическими условиями хроматографии. Как видим, в этих условиях не происходит деления по ММ и это обстоятельство является предпосылкой для использования режима критической хроматографии для исследования разных типов молекулярной неоднородности полимеров, таких как число функциональных групп на концах цепи, состав блоксополимеров, топология

(наличие разветвленных или циклических макромолекул). Этот хроматографический метод является относительно новым и некоторые наиболее интересные результаты его применения можно найти, например, в работах [2,3,4].

Режим хроматографии, соответствующий условию $\Delta G < 0$ широко применяется для разделения низкомолекулярных соединений и называется, в зависимости от химической природы функциональных групп на поверхности сорбента, адсорбционной, нормальнофазной, обращеннофазной, ион-парной и т.д. хроматографией. Для полимеров его применение ограничено областью слабых взаимодействий вблизи критических условий и областью олигомерных макромолекул, т.к. с ростом длины цепи мы переходим к практически необратимой адсорбции макромолекулы на колонке.

Наиболее важным для полимеров является режим эксклюзионной хроматографии или, как его еще называют, геле-проникающей хроматографии. Этот режим более подробно будет рассмотрен в следующем разделе, а сейчас мы перейдем к описанию некоторых важнейших хроматографических характеристик.

1.2. Характеристики хроматографического пика. Концепция теоретических тарелок.

После прохождения через хроматографическую колонку узкой зоны какого-либо монодисперсного вещества, на выходе мы получаем расширенную зону в виде пика приблизительно гауссова по форме (в случае хорошо упакованной колонки и правильно выбранной скорости хроматографии). Причины расширения пика лежат в различных диффузионных процессах, сопровождающих движение молекул вдоль колонки (см. например, соотношение (1)). Наиболее важные характеристики пика - объем элюирования или V_R или объем удерживания (относится к центру пика) и дисперсия пика, т.е. второй центральный момент (см.рис.3):

$$\sigma^2 = \int_{-\infty}^{\infty} h(V - V_R)^2 dV. \quad (5)$$

Справедливы следующие соотношения между величинами,

показанными на рис.3:

$$\sigma = 0,43W_{1/2} = \frac{W_b}{4}. \quad (6)$$

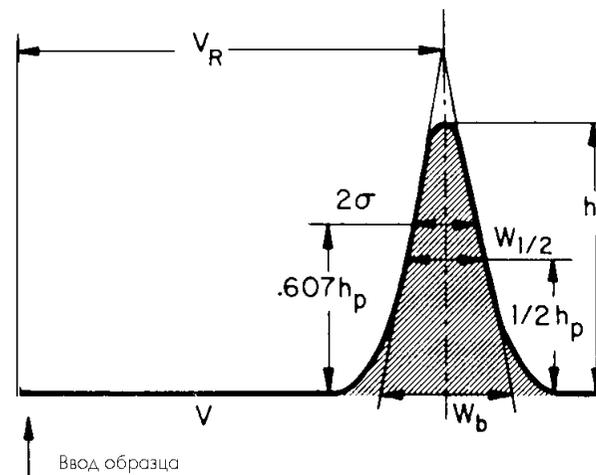


Рис. 3. Модель гауссова пика. Параметры уширения пика.

Часто все эти величины выражаются в единицах времени, тогда говорят о времени удерживания и т.д., однако, в этом случае скорость потока элюента должна быть строго фиксирована.

Существует простая феноменологическая теория описания относительного вклада расширения зоны в хроматографическое разделение. Это - теория тарелок. Хроматографическая колонка мысленно делится на ряд последовательных зон, в каждой из которых достигается полное равновесие между растворенным веществом в подвижной и неподвижной фазе. Физическую основу этого подхода составляет скачкообразное движение, описанное в начале первого раздела, и число теоретических тарелок в колонке связано с числом остановок при попадании в неподвижную фазу за время движения данного вещества по колонке. Чем больше это число, тем больше число теоретических тарелок и тем выше эффективность колонки.

Число теоретических тарелок определяется следующим образом:

$$N = \frac{V_R^2}{\sigma^2} = 5,54 \left(\frac{V_R}{W_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{V_R}{W_b} \right)^2. \quad (7)$$

Поскольку эта величина меняется при изменении объема элюирования, правильно для характеристики эффективности колонки использовать неудариваемое вещество, выходящее при $K_d=1$.

1.3. Основы метода эксклюзионной (гель-проникающей) хроматографии.

Эксклюзионная хроматография (Size Exclusion Chromatography, SEC) или гель-проникающая хроматография (ГПХ, Gel Permeation Chromatography, GPC) реализуется, когда поведение макромолекул в порах определяется энтропийной составляющей свободной энергии, а энергетическая составляющая мала по сравнению с ней. В этом случае, коэффициент распределения будет экспоненциально зависеть от соотношения размера макромолекулы и размера пор. Скейлинговая теория [5] предсказывает следующие закономерности для случая пор соизмеримых с размером макромолекулы

$$K_d \sim A \exp \left[- \left(\frac{R}{D} \right)^\alpha \right], \quad (8)$$

где $R \approx aN^{1/2}$ - характерный радиус идеальной цепи или $R \approx aN^{3/5}$ для цепи с объемным взаимодействием, D - диаметр пор, α - показатель степени от 4/3 до 2 в зависимости от принятой модели пор (щель, капилляр, полоса) и модели цепи (идеальная или неидеальная).

Таким образом, поведение макромолекул в условиях эксклюзионной хроматографии определяется размером цепи. Размер макромолекулы определяется ее химическим строением, числом звеньев в цепи (или молекулярной массой), топологией (например, размер разветвленной макромолекулы

или макроцикла уменьшается по сравнению с линейной макромолекулой того же химического строения). Кроме того, размер гибких макромолекул в определенной степени зависит от использованного растворителя благодаря эффекту исключенного объема.

Тем не менее, метод ГПХ получил широкое распространение в лабораторной практике как метод разделения по молекулярным массам, определения средних молекулярных масс и молекулярно-массовых распределений (ММР). Развитие метода началось с середины 50-х годов, когда были созданы первые широкопористые органические сорбенты для высокоэффективной гель-проникающей хроматографии. Как можно видеть из соотношений (8), метод не является абсолютным для определения молекулярных масс, но требует соответствующей калибровки по стандартным (желательно, узкодисперсным) образцам с известной ММ, связывающей объем (или время) удерживания с ММ.

Рисунок 4 иллюстрирует калибровочные кривые для полистирола в терминах $\lg M - V_R$ на полужестких органических сорбентах фирмы Waters (Microstiyragel) с различным размером пор.

Для анализа какого-либо полимера по молекулярным массам необходимо подобрать колонку с подходящим размером пор или серию колонок с разными порами или воспользоваться колонкой со смесью сорбентов с разными порами (колонка Linear в приведенном примере). Разумеется, чтобы использовать метод ГПХ для анализа ММР необходимо обеспечить **условия реализации эксклюзионного механизма** разделения, не осложненного эффектами взаимодействия как средних, так и концевых звеньев цепи. Речь идет об адсорбционном взаимодействии из неполярного растворителя или обращено-фазном взаимодействии неполярных фрагментов цепи при хроматографии гидрофильных полимеров в водной среде. Кроме того, водорастворимые полимеры, содержащие ионизированные группы, способны к сильным электростатическим взаимодействиям и требуют особенно тщательного подбора условий хроматографии. Подбор условий включает в себя выбор подходящих по химическому строению для конкретного анализа сорбента и растворителя (элюента).

Рекомендации можно найти в руководствах фирм-производителей хроматографического оборудования, а также в справочниках и монографиях (см., напр. [6 - 9]),

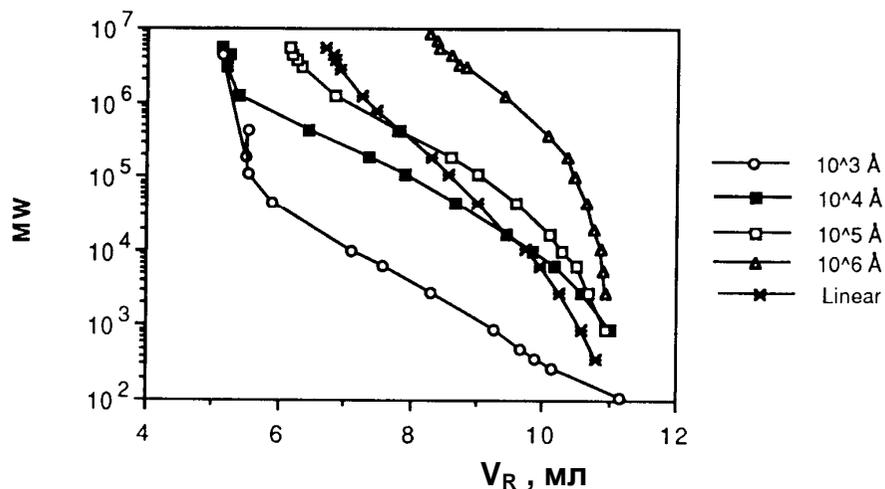


Рис. 4. Калибровочные кривые для колонок μ Styragel. На рисунке указана фирменная маркировка колонок величиной, характеризующей размер пор сорбента, которая равна длине вытянутой цепи полистирола, исключенной по стерическим причинам из пор.

Хроматографическая колонка является сердцем жидкостного хроматографа. В **состав хроматографа** входит, кроме того, ряд необходимых дополнительных устройств: 1) система подачи элюента (насос), обеспечивающая стабильный поток, 2) система ввода пробы без остановки потока (инжектор или автосамплер), 3) детектор - устройство, обеспечивающее формирование сигнала пропорционального концентрации вещества на выходе из колонки (детекторы бывают различного типа, наиболее популярны в гель-проникающей хроматографии рефрактометрические и спектрофотометрические детекторы), и 4) системы сбора и обработки данных на базе персонального компьютера. В современных хроматографах часто управление работой всех частей хроматографа также производится посредством управляющей программы, объединенной с системой обработки данных.

Хроматограмма полимера, полученная в условиях эксклюзионной хроматографии $F(V)$ является отражением функции его молекулярно-массового распределения $W(M)$. В силу закона сохранения вещества :

$$F(V)dV = W(M)dM \quad (9)$$

Для перехода от хроматограммы к функции ММР необходимо иметь калибровочную функцию $V = f(M)$, тогда искомая функция будет

$$W(M) = F(f(M)) \left| \frac{df(M)}{dM} \right| \quad (10)$$

Эти соотношения записаны без учета приборного уширения (ПУ). Реальная хроматограмма является результатом разделения образца по ММ при движении по колонке и одновременном перемешивании полимергомологов за счет размывания зон. Поэтому функцию $F(W)$ в соотношении (9) следует понимать как хроматограмму "исправленную" на ПУ. Эта функция является решением интегрального уравнения Фредгольма I рода. Известно достаточно много способов коррекции на ПУ. См., например, [6,7].

Однако, в современных высокоэффективных хроматографических системах в большинстве случаев вклад ПУ в хроматограмму невелик по сравнению с ММР и им можно пренебречь.

Важнейшей процедурой является **калибровка хроматографа** по ММ исследуемого полимера. При наличии соответствующих узкодисперсных стандартов с разными ММ, определяют для них объемы элюирования (V_R или V_e) и строят калибровочную зависимость подобную той, что показана на рис.4. Обычно калибровочное соотношение ищут в форме (11):

$$\lg M = \sum_{i=0}^n C_i V_e^i \quad (11)$$

Наиболее часто применяются полиномы первой или третьей степени. Полиномы нечетных степеней (3, 5, 7) наиболее точно описывают характерную форму калибровочных кривых с верхним и нижним пределами по ММ. Наборы узкодисперсных стандартов существуют для таких полимеров как полистирол, полиизопрен, полиметилметакрилат,

полиэтиленоксид, декстраны и некоторые другие. Можно воспользоваться, кроме того, методом **универсальной калибровки**, впервые введенным в практику Бенуа и сотрудниками [10].

Метод основан на том обстоятельстве, что гидродинамический объем макромолекул пропорционален произведению характеристической вязкости на молекулярную массу полимера и может быть использован как функция элюирующего объема в качестве универсального параметра для разных полимеров. Тогда мы строим универсальное калибровочное соотношение (12),

$$\lg([\eta]M) = \sum_{i=0}^n B_i V_e^i, \quad (12)$$

пользуясь набором каких-либо стандартов и известным соотношением Марка-Куна-Хаувинка (13):

$$[\eta] = KM^a. \quad (13)$$

Для перехода от соотношения вида (12) к калибровочной зависимости (11) для исследуемого полимера достаточно воспользоваться соответствующим ему соотношением Марка-Куна-Хаувинка, после чего получим (14):

$$\lg M = \frac{\sum_{i=0}^n B_i V_e^i - \lg K_1}{1 + a_1}. \quad (14)$$

В результате из данных гель-проникающей хроматографии можно найти средние молекулярные массы разной степени усреднения, которые, по определению, представляют собой следующие величины:

$$\overline{M}_n = \frac{\int_0^{\infty} W(M) dM}{\int_0^{\infty} W(M) \cdot \frac{1}{M} dM} - \text{среднечисленная ММ,}$$

$$\overline{M}_w = \frac{\int_0^{\infty} W(M) M dM}{\int_0^{\infty} W(M) dM} - \text{среднемассовая ММ,}$$

$$\overline{M}_z = \frac{\int_0^{\infty} W(M) M^2 dM}{\int_0^{\infty} W(M) M dM} - z\text{-средняя ММ.}$$

Отношения ММ разной степени усреднения характеризуют статистическую ширину ММР. Наиболее часто применяют отношение M_w/M_n , которое называют индексом полидисперсности.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ ПО АНАЛИЗУ ММР ПОЛИМЕРА МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩЕЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Цель работы:

Познакомиться с работой жидкостного хроматографа, методикой проведения хроматографического эксперимента, методикой калибровки хроматографа по узкодисперсным полимерным стандартам и расчета средних молекулярных масс.

Оборудование:

1) Жидкостной хроматограф, состоящий из насоса, инжектора, термостата колонок, колонки с полимерным сорбентом и системы обработки данных на базе персонального компьютера.

2) Набор узкодисперсных стандартов с разными ММ (полистирольных или полиэтиленоксидных).

3) Исследуемый образец с неизвестными молекулярными массами.

Порядок работы:

1) Приготовление раствора смеси стандартов.

- 2) Получение хроматограммы стандартов и определение их объемов удерживания (V_c).
- 3) Построение калибровочной зависимости в виде (11).
- 4) Приготовление раствора исследуемого полимера.
- 5) Получение хроматограммы исследуемого полимера.
- 6) Расчет средних ММ образца.

На рисунке 5 представлен типичный пример хроматограммы полимерного образца, подготовленный для расчета средних ММ, а именно, проведена базовая линия, определяющая начало и конец хроматограммы, и затем хроматограмма разбита на равные доли вдоль оси времени, так называемые слайсы.

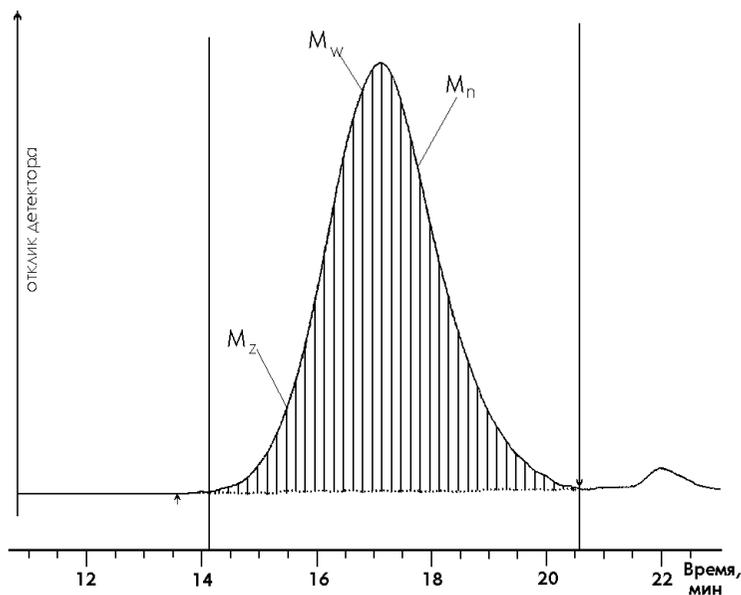


Рис. 5.

Для каждого слайса определяется его площадь A_i и молекулярная масса, соответствующая его середине, вычисляется из калибровочной зависимости. Затем вычисляются средние молекулярные массы:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i A_i}{\sum_i \left(\frac{A_i}{M_i} \right)},$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i A_i M_i}{\sum_i A_i},$$

$$\overline{M}_z = \frac{\sum_i A_i M_i^2}{\sum_i A_i M_i}.$$

3. ЛИТЕРАТУРА

1. М.Б.Тенников, П.П.Нефедов, М.А.Лазарева, С.Я.Френкель, О едином механизме жидкостной хроматографии макромолекул на пористых сорбентах, *Высокомолек. соед.*, А, 1977, т.19, N.3, с.657-660.
2. С.Г.Энтелис, В.В.Евреин, А.И.Кузаев, Реакционноспособные олигомеры, М: Химия, 1985.
3. Т.М.Зими́на, Е.Е.Кевер, Е.Ю.Меленевская, В.Н.Згонник, Б.Г.Беленький, Об экспериментальной проверке концепции хроматографической "невидимости" в критической хроматографии блоксополимеров, *Высокомолек. соед.*, А, 1991, т.33, N6, с.1340-1353.
4. И.В.Благодатских, А.В.Горшков, Исследование адсорбционных свойств кольцевых макромолекул в критической области, *Высокомолек. соед.*, А, 1997, т.39, N6, с.1681-1689.
5. А.М.Скворцов, А.А.Горбунов, Скейлинговая теория хроматографии линейных и кольцевых макромолекул, *Высокомолек. соед.*, А, т.28, N8, с.1686-1691.
6. Б.Г.Беленький, Л.З.Виленчик, Хроматография полимеров, М: Химия, 1978.
7. W.W.Yau, J.J.Kirkland, D.D.Bly, *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography*, New York: John Wiley & Sons, 1979.
8. Е.Л.Стыскин, Л.Б.Ициксон, Е.Б.Браудо. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. Москва. 1986.
9. Chi Wu, Ed. *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*, N-Y: Academic Press.
10. Z.Grubisic, R.Rempp, H.Benoir, *J. Polym. Sci.*, B, 1967, v.5, p.753.