

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

Благодатских И.В

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПОЛИМЕРОВ

Методическое пособие к
задаче спецпрактикума

МОСКВА, 2010

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ ПОЛИМЕРОВ	3
<i>1.1 Движущие силы и режимы хроматографии полимеров</i>	<i>3</i>
<i>1.2. Характеристики хроматографического пика. Понятие теоретической тарелки</i>	<i>5</i>
<i>1.3. Основы метода эксклюзионной (гель-проникающей) хроматографии</i>	<i>6</i>
2. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ К ИССЛЕДОВАНИЮ ПРОЦЕССА СИНТЕЗА ПОЛИМЕРОВ	13
3. ПРОВЕДЕНИЕ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ ПО АНАЛИЗУ ММР ПОЛИМЕРА МЕТОДОМ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	18
4. ЛИТЕРАТУРА	19

1. ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ ПОЛИМЕРОВ

1.1 Движущие силы и режимы хроматографии полимеров.

Прежде, чем приступить к выполнению практической работы по анализу полимера хроматографическим методом, познакомимся очень кратко с идеями, лежащими в основе этих методов, основными понятиями хроматографии, и принципами работы хроматографа.

Хроматография – это 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).

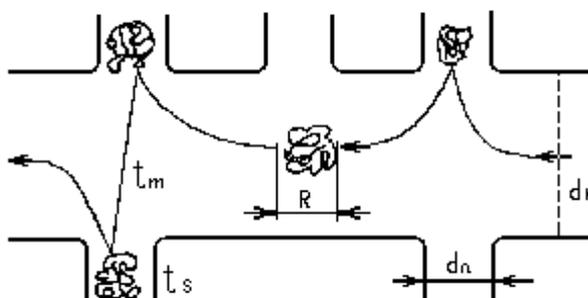


Рис. 1. Движение макромолекулы в хроматографической колонке: d_k - размер каналов между частицами неподвижной фазы; d_n - размер пор; R - размер макромолекулы; t_s - время, проведенное макромолекулой в поре, t_m - в подвижной фазе (из работы [1]).

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_k , 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 или ВЭЖХ (High Performance Liquid Chromatography или HPLC 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 при переходе из подвижной в неподвижную фазу.

Коэффициент распределения в хроматографии 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, следовательно $V_t - V_0 = V_i$ равно поровому объему или объему неподвижной фазы.

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

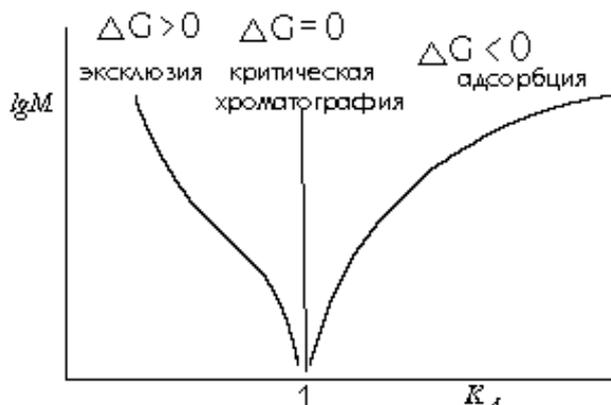


Рис. 2. Иллюстрация перехода через критическую точку адсорбции.

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. [4]. 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 особых видов молекулярной неоднородности полимеров, таких как число и тип аномальных звеньев, в том числе, функциональных групп на концах цепи, анализ различий в топологии: макромолекул (линейные, кольцевые,

звездообразные), по длине одного из блоков в блоксополимере. Этот хроматографический метод является относительно новым. Развитие теории и практики критической хроматографии связано, прежде всего, с работами российских исследователей в 70 – 90-х годах прошлого столетия (см., например, [1, 3– 9], а также [10, 11]. Несколько примеров применения разных режимов хроматографии к исследованию полимеров мы приведем в разделе 2.

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, и, соответственно, типа взаимодействия сорбент–сорбат, 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 практически важным для полимеров является режим эксклюзионной хроматографии, который позволяет разделить макромолекулы по их размеру. Этот режим более подробно будет рассмотрен в разделе 1.3, а сейчас мы перейдем к краткому описанию некоторых важных хроматографических характеристик.

1.2. Характеристики хроматографического пика. Понятие теоретической тарелки.

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:

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

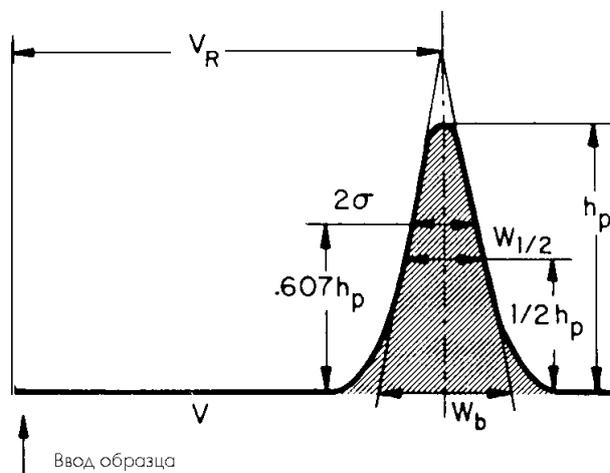


Рис. 3. Модель гауссова пика. Параметры уширения пика.

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 постоянна.

Существует простая феноменологическая теория описания относительного вклада расширения зоны в хроматографическое разделение [2, 3]. 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 неударживаемое вещество, выходящее при $K_d=1$. Основной характеристикой колонки является высота, эквивалентная теоретической тарелке $H=L/N$. Было показано, что эта величина лимитируется размером зерна сорбента. Минимально возможная величина равна удвоенному радиусу частиц сорбента $H=2d$ (в набухшем состоянии для набухающих сорбентов). Отметим, что уменьшение размера зерна сорбента приводит к повышению гидродинамического сопротивления колонки, т.е. к необходимости повышать рабочее давление в хроматографе. В настоящее время в системах высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) применяют сферические сорбенты с диаметром 3 – 10 мкм.

Увеличение эффективности хроматографической колонки (или серии колонок) является одной из предпосылок увеличения разрешения (т.е. разделения веществ на отдельные пики) наряду с селективностью колонок. Количественно разделение двух веществ описывается равенством

$$R_s = \frac{2(V_{R1} - V_{R2})}{(W_{b1} + W_{b2})} = \frac{2(t_{R1} - t_{R2})}{(w_{b1} + w_{b2})},$$

где t_R – время удерживания, w_b – ширина пика по базовой линии в терминах времени. Числитель в приведенном выражении отражает влияние селективности, знаменатель – влияние эффективности колонки.

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

Эксклюзионная хроматография (Size Exclusion Chromatography, SEC) реализуется, когда поведение макромолекул в порах определяется энтропийной составляющей свободной энергии, а энергетическая составляющая пренебрежимо мала по сравнению с ней. В этом случае коэффициент распределения будет экспоненциально зависеть от соотношения размера макромолекулы и размера пор. Скейлинговая теория [4] 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 в некоторой степени уменьшается по сравнению с линейной макромолекулой того же химического строения и той же ММ). Кроме того, размер гибких макромолекул в определенной степени зависит от использованного растворителя благодаря эффекту исключенного объема.

Тем не менее, метод 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 разделения водорастворимых полимеров и биополимеров [12]. Для этого варианта хроматографии возникло название «гель-фильтрация (gel-filtration)». С середины 60-х годов появились органические сорбенты на основе стирола для работы в органических растворителях [13], и появилось название «гель-проникающая хроматография, ГПХ (Gel Permeation Chromatography, GPC)». Оба эти термина не вполне адекватно отражают механизм разделения, однако в силу исторической традиции их продолжают использовать наряду с термином эксклюзионная хроматография.

Как можно видеть из соотношений (8), метод не является абсолютным для определения молекулярных масс, но требует соответствующей калибровки, связывающей объем элюента, протекший с начала опыта (или соответствующее ему время) с молекулярной массой.

Рисунок 4 иллюстрирует калибровочные кривые для полистирола в терминах $\lg M - V_R$ на полужестких органических сорбентах фирмы Waters (Microstyrigel) 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 срединных, 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. [2, 14 – 16]).

Сорбенты для анализа относительно гидрофобных полимеров, растворимых в органических растворителях, как правило, представляют собой полимерные сферические пористые частицы размером 5 – 10 мкм. На рынке имеется большой выбор сорбентов и готовых колонок от разных фирм. По химическому строению большинство сорбентов представляет собой сетчатые полимеры на основе стирола и дивинилбензола. Колонки для высокоэффективной эксклюзионной хроматографии пакуют фирмы-производители в растворителе, предназначенном для дальнейшего использования, храниться колонки должны в присутствии растворителя герметически закрытыми. Правила по

взаимозаменяемости растворителей и рекомендации по применению можно найти в руководствах производителей и справочной литературе [15, 16].

Для высокоэффективной эксклюзионной хроматографии водорастворимых полимеров применяются сорбенты на основе сшитых полимеров гидроксипропилметакрилата или глицидилметакрилата в гидролизованной форме, сорбенты на основе поливинилового спирта. Эти сорбенты имеют высокую механическую прочность наряду с высоким поровым объемом. Применяют также сорбенты на основе силикагеля с химически модифицированной поверхностью пор.

Рисунок 5 иллюстрирует структуру макропористого сорбента для эксклюзионной хроматографии.

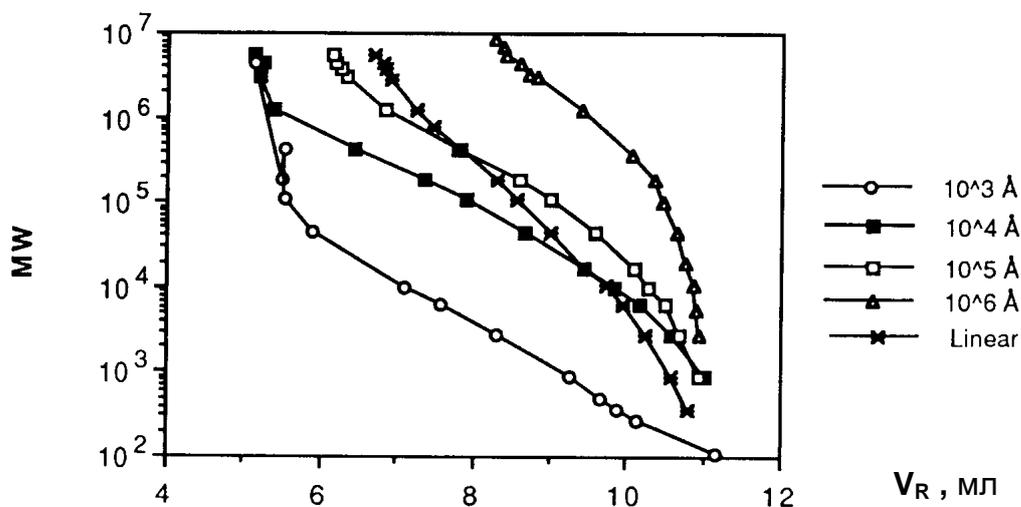


Рис. 4. Калибровочные кривые для колонок μ Styragel (Waters) с разным размером пор. В качестве характеристики размера пор принята величина, равная длине вытянутой цепи полистирола, исключенной по стерическим причинам из пор.

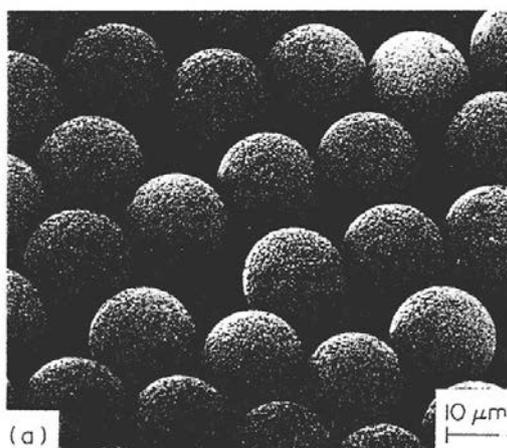


Рис. 5. Электронная микрофотография макропористого полимерного сорбента.

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, в последнее время в хроматографии получили распространение также испаряющие лазерные детекторы рассеяния света (ELLS);

4) системы сбора и обработки данных на базе персонального компьютера. В современных хроматографах часто управление работой всех частей прибора также производится посредством управляющей программы, объединенной с системой обработки данных.

Схема современного жидкостного хроматографа, включающая перечисленные выше составные части изображена на рис. 6.

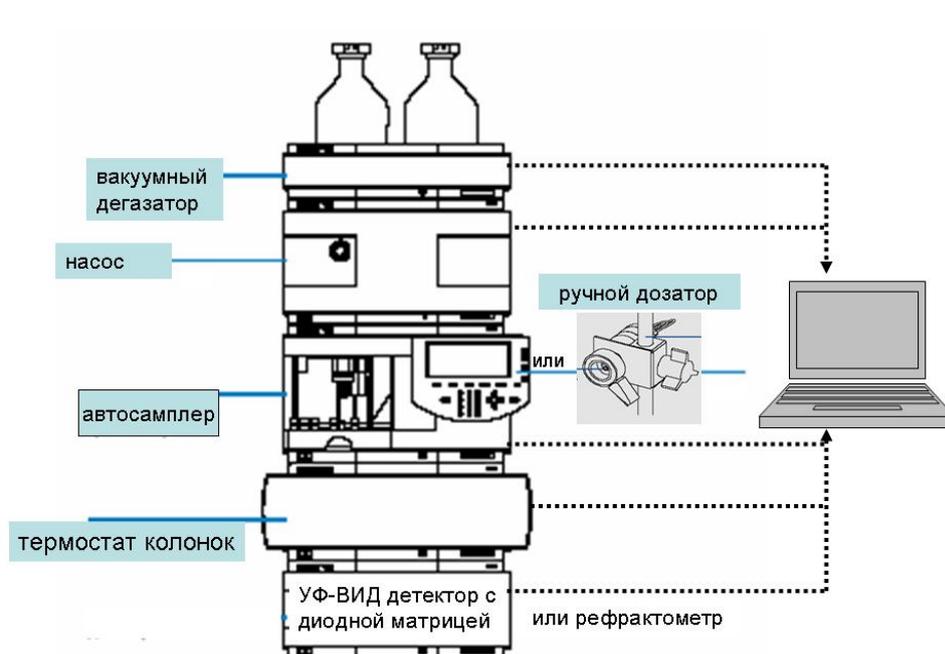


Рис. 6. Схема жидкостного хроматографа.

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

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

Эти соотношения записаны без учета приборного уширения. Реальная хроматограмма является результатом разделения образца по ММ при движении по колонке и одновременном перемешивании полимергомологов за счет размывания зон. Поэтому функцию $F(V)$ в соотношении (9) следует понимать как хроматограмму “исправленную” на приборное уширение Эта функция является решением интегрального уравнения Фредгольма I рода. В литературе описаны различные варианты коррекции на приборное уширение (см., например, [2, 14, 16]). Однако они сопряжены с решением сложной экспериментальной задачи точной оценки функции приборного уширения, а также с возможностью появления осцилляций в исправленной хроматограмме. Следует отметить, однако, что в современных ВЭЖХ системах в большинстве случаев вклад

приборного уширения в хроматограмму невелик по сравнению с ММР. Погрешность в определении средних ММ из данных ГПХ лежит в этом случае в пределах погрешности определения средних ММ абсолютными методами (5 – 10%). Поэтому в большинстве случаев приборное уширение не учитывают. Необходимый уровень разрешения пиков можно обеспечить надлежащим подбором колонок, соответствующих по размеру пор размеру исследуемых образцов.

Важнейшей процедурой обработки данных хроматографии является **калибровка хроматографа** по ММ исследуемого полимера. Для калибровки используют стандартные узкодисперсные образцы с известной ММ. Времени (t_R) или объему (V_R или V_e), соответствующему максимуму пика узкодисперсного образца, ставится в соответствие его молекулярная масса. В случае логарифмически-нормального распределения, характерного для узкодисперсных стандартов, ММ в пике соответствует $M_p = (M_w M_n)^{1/2}$ [2]. В настоящее время фирмы-производители предлагают довольно широкий спектр наборов узкодисперсных стандартов для различных полимеров. (Растворимые в органических растворителях: полистирол, поли(α -метил)стирол, полиметилметакрилат, полибутадиен поливинилпиридин; водорастворимые: декстран, пуллулан, полистиролсульфонат, полиэтиленоксид, полиакриловая и полиметакриловая кислоты.) Наиболее популярные дешевые и высококачественные стандарты – полистирольные. Разработан также ряд методик калибровки по широким образцам с известным молекулярно-массовым распределением или известным молекулярным массам разной степени усреднения (см., например, [2, 14]).

На рисунке 7 приведен пример хроматограммы смеси полистирольных стандартов, используемых для калибровки. Из этих хроматограмм находят объемы элюирования 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.

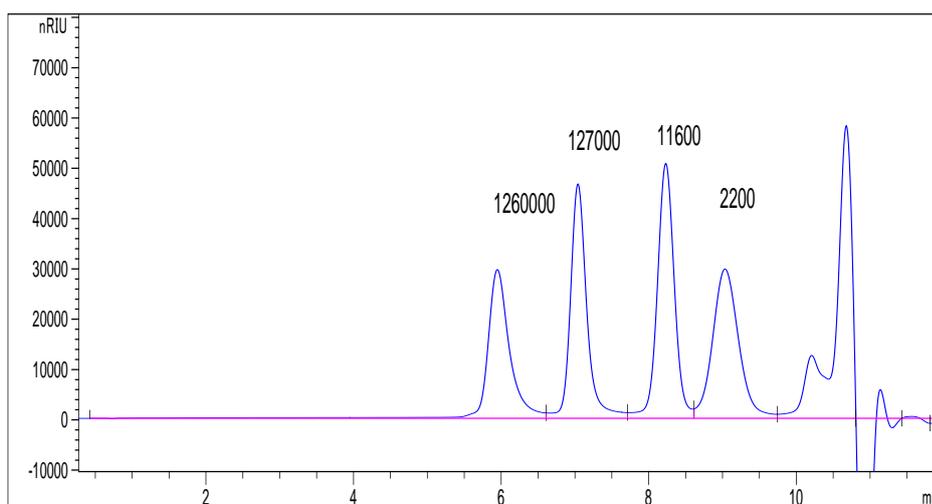


Рис.7. Пример разделения полистирольных стандартов на колонке PL-gel mixC (над пиками показана ММ).

Наборы узкодисперсных стандартов существуют, однако, не для всех полимеров. В случае отсутствия узкодисперсных стандартов можно воспользоваться, методом **универсальной калибровки**, впервые введенным в практику Бенуа и сотрудниками [17].

Как мы видели из соотношения (8), величиной, определяющей поведение макромолекулы в режиме эксклюзионной хроматографии, является размер макромолекулы. Поэтому гидродинамический размер может быть использован в качестве универсального параметра для полимеров разной структуры как функция элюирующего объема. Метод Бенуа основан на том обстоятельстве, что гидродинамический объем макромолекул пропорционален произведению характеристической вязкости на молекулярную массу. 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 с коэффициентами K_1 и a_1 , 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 эксклюзионной хроматографии можно найти средние молекулярные массы разной степени усреднения, которые, по определению, представляют собой следующие величины:

$$\overline{M}_n = \frac{\int_0^{\infty} W(M) dM}{\int_0^{\infty} W(M) \cdot \frac{1}{M} dM} - \text{среднечисленная ММ}, \quad (15)$$

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

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

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

При расчете средних ММ из хроматограмм интегралы в формулах (15) заменяют на сумму конечного числа виртуальных фракций и используют соотношения (10) и (11).

На рисунке 8 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.

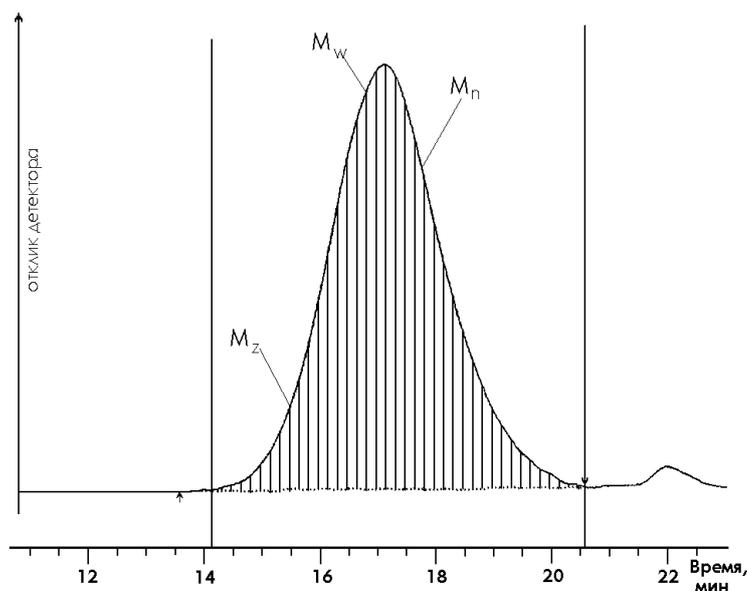


Рис. 8. Пример обработки хроматограммы для расчета средних ММ.

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

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i A_i}{\sum_i \left(\frac{A_i}{M_i} \right)}, \quad \overline{M}_w = \frac{\sum_i A_i M_i}{\sum_i A_i}, \quad \overline{M}_z = \frac{\sum_i A_i M_i^2}{\sum_i A_i M_i} \quad (16)$$

1.4. Калибровка хроматографа с использованием дополнительных масс-чувствительных детекторов.

Применение дополнительных детекторов, чувствительных к «качеству» вещества, т.е. к его молекулярной массе или размеру в серии с детектором, чувствительным к количеству вещества, позволяет определить соответствующие средние (среднечисловые, средневесовые и т.д.) характеристики и функции их распределения для полимерного образца без предварительной калибровки по известным стандартам. Таким образом, установка для эксклюзионной хроматографии, соединенная с проточным лазерным фотометром рассеяния света, дает возможность определить абсолютные значения средних ММ и ММР (для линейного гомополимера).

Очень кратко суть дела можно описать следующим образом [17]. В каждой точке хроматограммы (т.е. в малом объеме, протекающем через кювету за время измерения) фотометр рассеяния света дает сигнал пропорциональный величине рассеяния от сильно разбавленного раствора практически монодисперсного полимера (по крайней мере, в случае линейного гомополимера). Этот сигнал пропорционален концентрации вещества и его ММ, а также зависит от размера макромолекулы и угла рассеяния по отношению к направлению падения светового луча:

$$R(\vartheta, c) \approx KcMP(\vartheta, R_g^2). \quad (17)$$

Существуют два основных типа проточных фотометров: малоугловые (LALLS), где измерение рассеяния проводится под углом 4 – 7 градусов. В этом случае угловой фактор рассеяния $P(\theta, R_g) \approx 1$, и выражение (17), соответственно, упростится. Второй тип – многоугловые фотометры (MALLS), где измерение осуществляется одновременно под

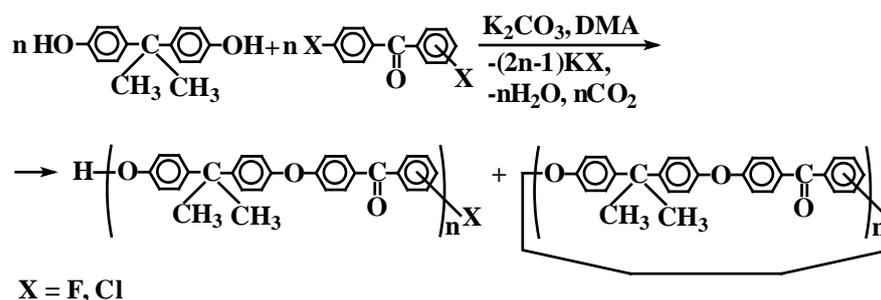
несколькими углами. В этом случае можно получить в каждой точке хроматограммы угловую зависимость величины рассеяния, из которой при экстраполяции к нулевому углу снова исключается угловой фактор рассеяния и одновременно появляется возможность определить радиус инерции макромолекул в данной точке хроматограммы.

Значение концентрации в соответствующей точке хроматограммы V_i мы можем получить из хроматограммы концентрационного детектора. Таким образом, из соотношения (17) в каждой точке хроматограммы будет определена молекулярная масса, которую остается подставить в обычные соотношения для расчета средних ММ и ММР образца. При этом, в качестве результата хроматографии широкодисперсного образца будет получена также калибровочная зависимость, т.е. соотношение между молекулярной массой и объемом элюирования, в том диапазоне V и M , где расположена хроматограмма.

В настоящее время существуют малоугловые, двух-, трехугловые и многоугловые детекторы рассеяния света. Существуют также фотометры, позволяющие одновременно измерять неупругое (динамическое) рассеяние и получать абсолютные значения гидродинамического радиуса молекул. Наиболее крупным поставщиком такого оборудования является фирма Wyatt Technology Inc.

2. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ К ИССЛЕДОВАНИЮ ПРОЦЕССА СИНТЕЗА ПОЛИМЕРОВ

Рассмотрим один пример применения жидкостной хроматографии в ее разных режимах для изучения особенностей синтеза ароматического полиэфиркетона по приведенной ниже схеме:



Отметим в скобках, что условия синтеза не являются вполне гомогенными. А именно, образование одного из мономеров, дикалиевого фенолята бисфенола, происходит *in situ* с участием малорастворимой твердой соли K_2CO_3 , что может наложить определенные особенности на ход реакции. Из общих закономерностей поликонденсации известно, что продукты линейной поликонденсации могут обладать следующими типами молекулярной неоднородности: распределением по молекулярной массе (ММР), распределением по типу функциональности (РТФ), т.е. по содержанию макромолекул с разными концевыми группами, а также распределением между линейными и циклическими молекулами разного размера.

Нас интересуют следующие вопросы [19]: 1) Как изменяются средние ММ и ММР полимера в ходе синтеза.

2) Как изменяется распределение РТФ (фракцию с двумя концевыми группами галогена будем называть 0-функциональной, с одной ОН-группой – функциональность будет равна 1, и с двумя ОН-группами – функциональность 2).

3) Сколько и какого размера циклических молекул образуется при синтезе (соответствует ли это количеству условию конформационного равновесия между линейными цепями и циклами).

Методом *эксклюзионной хроматографии* мы увидим (рис. 9) изменение в средних размерах макромолекул и их ММР по ходу синтеза. Отсюда мы получим, например кривую M_w от времени (рис.10).

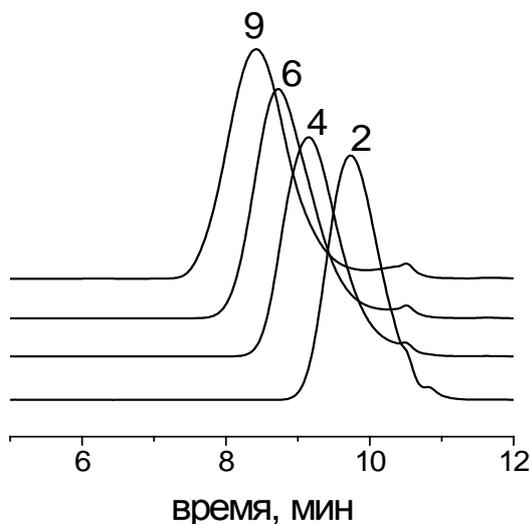


Рис. 9. Изменения эксклюзионных хроматограмм от времени синтеза ПАЭК (U-styragel Linear, хлороформ). Над хроматограммами показано время синтеза в часах.

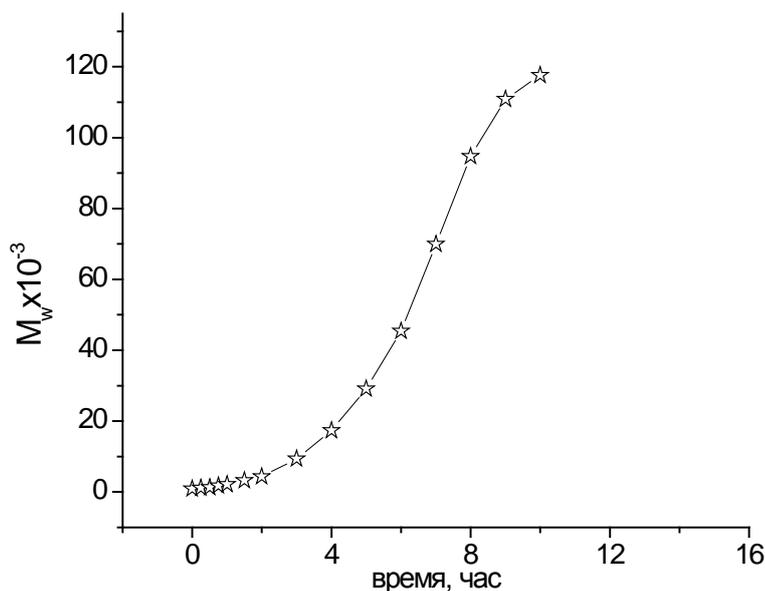


Рис. 10. Изменение M_w от времени синтеза ПАЭК.

Сильное отклонение кривой роста ММ от линейности на начальной стадии поликонденсации может быть связано с неэквивалентным содержанием мономеров в реакционной зоне. Это предположение мы проверим, проанализировав РТФ продуктов реакции и его изменение с помощью *хроматографии в критических условиях*. На рисунке 11 показаны критические хроматограммы. Соотношение площадей под пиками разной функциональности свидетельствует о преобладании бесфункциональной фракции над бифункциональной и последовательном приближении соотношения этих фракций к равному.

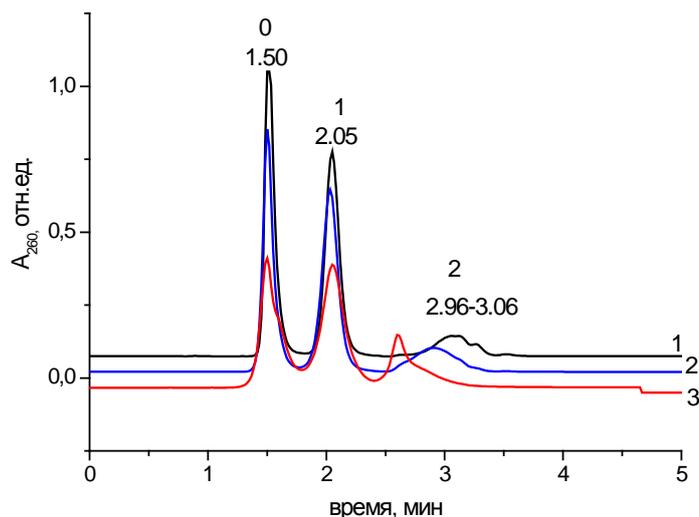


Рис.11. Критические хроматограммы проб, отобранных при синтезе ПАЭК: 0.5 ч (1), 1 ч (2), 2 ч(3). Колонка Resolve-silica, метиленхлорид – 2-пропанол (0.88%) Над пиками показаны времена удерживания и функциональность.

Теперь обратим внимание на форму эксклюзионных хроматограмм на рисунке 9. Мы видим, что по мере перемещения максимума пика в сторону меньших времен (соответственно, больших ММ), низкомолекулярный край хроматограммы практически не сдвигается. Это явление отражает накопление фракции циклических олигомеров наряду с ростом линейных цепей. Состав олигомерной части ММР можно проанализировать более подробно, используя эксклюзионную колонку с относительно узкими порами, в которой большие молекулы практически не разделяясь выходят со свободным объемом V_0 . Пример такой хроматограммы – на рисунке 12.

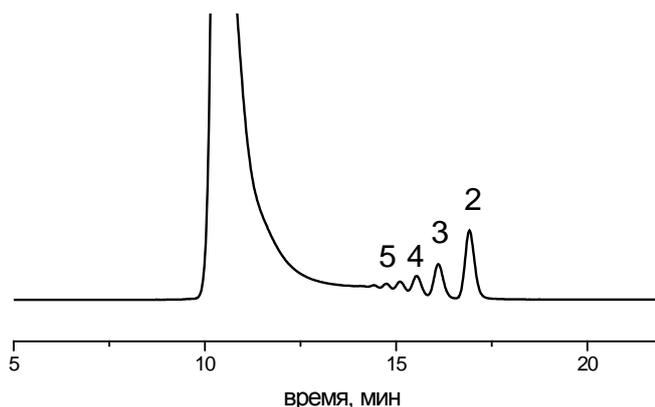


Рис.12. Эксклюзионная хроматограмма ПАЭК на узкопористых колонках U-styragel 500 и 1000. На хроматограмме отмечено число звеньев в цикле.

Мы видим, что пик, соответствующий циклическому димеру на рис.12 разделяется до базовой линии, его относительная площадь (т.е. его содержание в образце) может быть проанализирована количественно. Этого, однако, нельзя сказать о более

высокомолекулярных циклах. Сложность заключается в том, что в полимере содержатся в небольшом количестве линейные олигомеры, по размеру приблизительно совпадающие с циклами. Поэтому для количественного анализа циклической части полимера необходимо дополнить исследование применением *адсорбционного* режима. В этом режиме можно достичь очень высокого разрешения по отношению к олигомерным молекулам всех видов (линейных с разными концевыми группами и циклических). Подобрав необходимые модели и фракции для идентификации пиков, мы можем с высокой точностью определить относительное содержание в полимерном образце циклов разного размера, как показано на рисунке 13. Затем, пронормировав на уже известное нам содержание циклического димера, получим распределение по размеру циклов. В результате мы пришли к заключению, что распределение по размеру циклов в исследованных ПАЭК и их содержание по отношению к линейной фракции соответствует термодинамическому равновесию цикл-цепь. Таким образом, мы решили поставленные в начале данного раздела задачи.

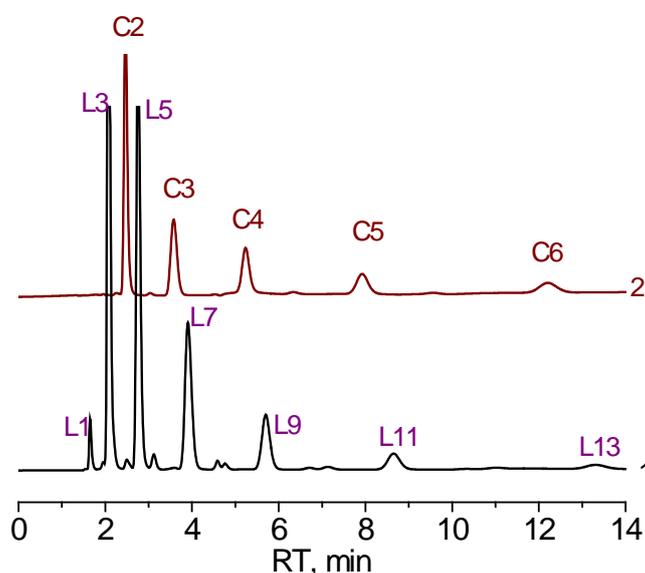


Рис.13. Адсорбционные хроматограммы линейных (1) и циклических олигомеров (2) из образца ПАЭК.

Вспомним теперь, что в разделе 1.1 мы говорили о возможности разделения макромолекул по топологии, в частности, линейных и циклических макромолекул одинакового размера. Попытаемся применить метод критической хроматографии к разделению линейных и циклических молекул ПАЭК. На рисунке 14 показан результат хроматографии в критических условиях. Мы видим, что разделение линейных бесфункциональных молекул и циклических олигомеров недостаточно селективно для аналитических целей. Причиной является сохранение зависимости коэффициента распределения K_d циклических молекул от их размера. Характерные для поликонденсации степени полимеризации циклических молекул недостаточно велики для существенного увеличения K_d . В этом случае оптимальным является сочетание эксклюзионной и адсорбционной хроматографии.

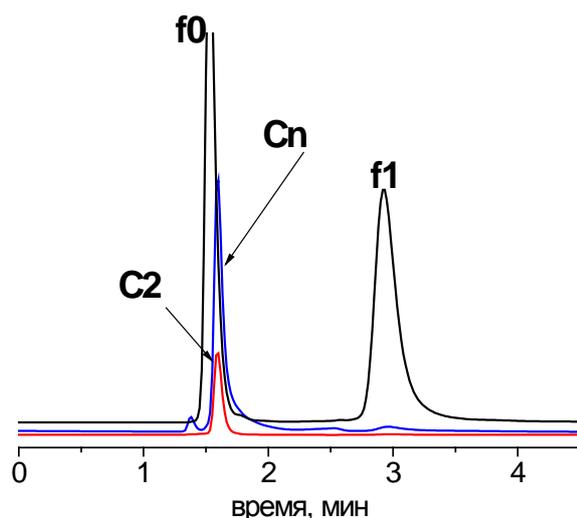


Рис. 14. Критические хроматограммы линейных олигомеров ПАЭК (над пиками показана функциональность), циклической фракции $n=2$ (кривая C2), и смешанной циклической фракции Cn (смесь макроциклов $n=2 - 7$).

Другая ситуация наблюдается при разделении больших циклических макромолекул, содержащих десятки статистических сегментов, от линейных аналогов. В этом случае применение адсорбционной хроматографии практически невозможно из-за практически необратимой адсорбции. Наиболее селективным методом разделения таких молекул является критическая хроматография. Наилучшее разрешение достигнуто при использовании колонки с размерами пор, приблизительно соответствующими размеру макромолекул. На рисунке 15 показан пример разделения циклического полистирола ($M_w=25000$) от линейного аналога с той же ММ [8].

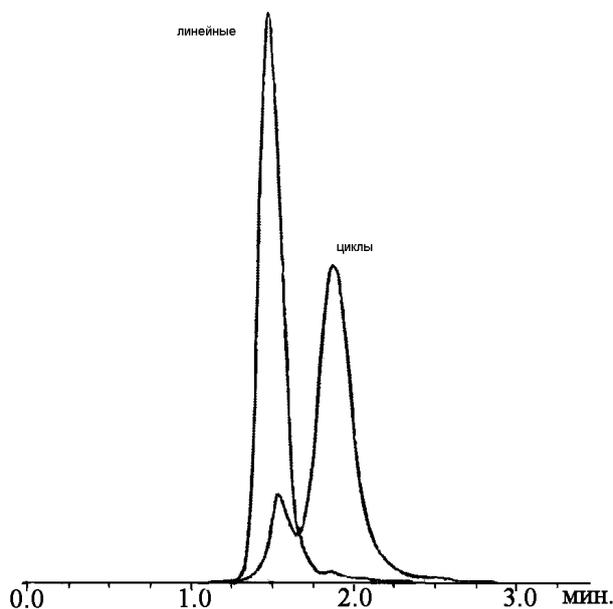


Рис. 14. Разделение линейного и циклического полистирола, содержащего примесь линейных макромолекул, в критических условиях. Колонка Resolve-silica, элюент циклогексан – ТГФ (15%).

3. ПРОВЕДЕНИЕ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ ПО АНАЛИЗУ ММР ПОЛИМЕРА МЕТОДОМ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Цель работы:

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

Оборудование:

- 1) Жидкостной хроматограф фирмы Agilent, состоящий из насоса, инжектора, термостата колонок, колонки с полимерным сорбентом линейного типа (на основе полистирола для гидрофобного полимера или на основе поливинилового спирта для гидрофильного полимера) и системы управления и обработки данных на базе персонального компьютера.
- 2) Набор узкодисперсных стандартов с разными ММ (полистирольных или полиэтиленоксидных).
- 3) Исследуемый образец с неизвестными молекулярными массами.
- 4) Растворитель для приготовления образцов и проведения хроматографии.
- 5) Флаконы объемом 3 мл.
- 6) Аналитические весы.
- 7) Стекланные пористые фильтры №4.

Порядок работы:

- 1) Приготовление раствора смеси 4-х стандартов разной ММ (примерно 1 000 000, 100 000, 10 000, 1 000) с концентрацией 1 мг/мл каждого.
- 2) Получение хроматограммы стандартов и определение их объемов удерживания (V_e) как показано на рис. 3.
- 3) Построение калибровочной зависимости в виде (11).
- 4) Приготовление раствора исследуемого полидисперсного полимера концентрации 2 мг/мл и фильтрование.
- 5) Получение хроматограммы исследуемого полимера.
- 6) Подготовка хроматограммы как показано на рис. 5 и расчет средних ММ образца по формулам (16).

4. ЛИТЕРАТУРА

1. С.Г.Энтелис, В.В.Евреинов, А.И.Кузаев, Реакционноспособные олигомеры, М: Химия, 1985.
2. П.П.Нефедов, П.Н.Лавренко, Транспортные методы в аналитической химии полимеров, Л.:Химия, 1979.
3. W.W.Yau, J.J.Kirkland, D.D.Bly, Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, New York: John Wiley & Sons, 1979
4. М.Б.Тенников, П.П.Нефедов, М.А.Лазарева, С.Я.Френкель, Высокомолек. соед, А, 1977, т.19, N.3, с.657-660.
5. Горбунов А.А., Скворцов А.М., Высокомолек. соед. А, 1986, Т.28, № 10, С.2170–2176.
6. А.М.Скворцов, А.А.Горбунов, Высокомолек. соед., А, 1986, т.28, N8, с.1686-1691.
7. Т.М.Зиминая, Е.Е.Кевер, Е.Ю.Меленевская, В.Н.Згонник, Б.Г.Беленький, Высокомолек. соед., А, 1991, т.33, №6, с.1340-1353.
8. И.В.Благодатских, А.В.Горшков, Высокомолек. соед., А, 1997, т.39, N6, с.1681-1689.
9. Горшков А.В., Роздина И.Г., Филатова Н.Н., Евреинов В.В., Высокомолек. соед. А, 2006, Т.48, №4, С.657–663.
10. Harald Pasch, Phys. Chem. Chem. Phys., 1999, V.1, P. 3879–3890.
11. Bernd Trathnigg, Christina Rappel, Sandra Fraydl and Alexei Gorbunov, J. Chromatogr. A, 2005, V. 1085, No.1, P.253–261.
12. J. Porath, P Flodin, Nature, 1959, V.183, P.1657.
13. J.C.Moore, J Polym. Sci. , A 1964, V.2, P.835.
- 14.Б.Г.Беленький, Л.З.Виленчик, Хроматография полимеров, М: Химия, 1978.
- 15.Е.Л.Стыскин, Л.Б.Ициксон, Е.Б.Браудо. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М: 1986.
16. Chi Wu, Ed. Column Handbook for Size Exclusion Chromatography, N-Y: Academic Press.
17. Z.Grubisic, R.Rempp, H.Benoir, J. Polym. Sci. B, 1967, v.5, p.753.
18. P.J.Wyatt, Analitica Chimica Acta, 1993, v.272, p.1.
19. Благодатских И.В., , Дис....докт. хим.наук, М. ИНЭОС РАН, 2008.