

УДК 541.64+543.544

Жидкостная хроматография полимеров: настоящее и будущее

Е. Брун

ЕФИМ БРУН (Yefim Brun) — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник Главного исследовательского центра фирмы «Дюпон» (США). Область научных интересов: полимерная химия, теория и практика жидкостной хроматографии, приборы для хроматографии.

DuPont Central Research and Development Wilmington, DE, USA Yefim.Brun@usa.dupont.com

Введение

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является мощным средством исследования и количественного анализа синтетических и природных полимеров. Метод позволяет проводить фракционирование их по молекулярным массам, химическому составу, функциональным группам и т.д. ВЭЖХ применяется также для выделения и очистки биополимеров и анализа добавок в композитах на основе полимеров.

В ВЭЖХ процесс распределения компонентов пробы между подвижной и стационарной фазами происходит в растворе внутри хроматографической колонки, заполненной пористыми частицами органического происхождения (синтетические смолы, такие как полистирол-дивинилбензол или на основе акриловых мономеров) или неорганических сорбентов (обычно на основе силикагеля). Такая среда оказывает высокое гидравлическое сопротивление потоку жидкости (подвижной фазе), прокачиваемой через колонку механическим насосом.

В зависимости от цели конкретной аналитической задачи может применяться метод изократического элюирования (постоянный состав подвижной фазы) или метод градиентного элюирования (переменный состав подвижной фазы), причем второй вариант значительно расширяет возможности жидкостной хроматографии.

Метод фракционирования по Байкеру—Вильямсу, предложенный в середине 1950-х годов, основан на использовании одновременно температурного градиента и градиента состава элюента, что обеспечивает разделение полимеров по их растворимости за счет многократного проведения процесса растворение—осаждение. Этот метод, усовершенствованный за последние 20 лет, под названием «высокоэффективная осадительная жидкостная хроматография» (ВЭОЖХ) при-

меняется до сих пор для фракционирования синтетических сополимеров и полимерных композитов.

Достижения в области жидкостной хроматографии в 1970-х годах (приборное оформление, способы приготовления колонок, а также лучшее понимание механизма разделения) оказали стимулирующее влияние на развитие хроматографических методов разделения полимеров. Так, новый метод — гель-проникающая хроматография (гель-фильтрационная хроматография в случае водных элюентов) стала первым методом определения молекулярно-массового распределения синтетических и природных полимеров. Наряду с традиционными типами ВЭЖХ (обращенно-фазная, ионообменная, гидрофобного взаимодействия и аффинная хроматография) этот метод вошел в практику анализа белков и других биополимеров.

В течение двух последующих десятилетий нормально-фазный и обращенно-фазный варианты жидкостной хроматографии привлекают значительное внимание как методы разделения синтетических полимеров и полимерных композитов. Двухмерная ВЭЖХ-техника (называемая также хроматографическим кросс-фракционированием) в последние годы используется для получения наиболее полной характеристики полимеров. Поскольку в данном варианте обычно комбинируются различные методы хроматографического разделения, то это позволяет определять распределение и по молекулярным массам, и по химическому составу.

Приборы для ВЭЖХ

Любой современный прибор для ВЭЖХ состоит из системы подачи элюента, устройства ввода пробы, колонки (или колонок) для разделения пробы, детектора(ов) для обнаружения разделенных компонентов и системы сбора и

* Перевод с английского докт. хим. наук А.А. Курганова.

обработки данных. Для успешного разделения необходима система контроля и поддержания температуры колонок и других частей хроматографической системы.

Система подачи элюента

Для получения правильных и надежных результатов система подачи элюента должна обеспечивать точный и воспроизводимый поток элюента через хроматографическую колонку. Наиболее популярны сегодня двухплунжерные поршневые насосы, снабженные запирающей клапанной коробкой и системой уплотнения. Такие насосы в аналитическом варианте способны подавать жидкость с объемной скоростью от 100 мкл/мин до 10 мл/мин. Микрошприцевые насосы для микрокапиллярной хроматографии могут воспроизводимо подавать жидкость с объемной скоростью от 1 мкл/мин, тогда как для препаративной хроматографии требуется поток в 50 мл/мин и более. Градиентная система подачи элюента позволяет подавать более чем один растворитель и менять состав элюента в ходе анализа. Смешивание растворителей может осуществляться при высоком или низком давлении. В первом случае смешивание растворителей происходит перед инжектором. Это требует применения двух насосов высокого давления. Во втором случае смешивание осуществляется до насоса и для подачи элюента достаточно одного насоса.

Современные насосы обеспечивают точную и воспроизводимую по потоку и составу подачу элюента, что достигается за счет введения в насос электронных систем контроля за движением поршня. Сложный, программно-управляемый механизм подает жидкость без пульсаций, компенсирует изменения вязкости и автоматически проводит дегазацию элюента, увеличивая тем самым эффективность работы всей хроматографической системы при изократическом и градиентном элюировании [1].

На точность подачи и стабильность нулевой линии влияет качество растворителей, поэтому в любом коммерческом ВЭЖХ-приборе обязательно предусмотрено фильтрование элюента в системе насоса и дегазация растворителя. Точность подачи элюента — важный параметр для гель-проникающей хроматографии, где любое несоответствие в подаче элюента может вызвать значительную погрешность в определении молекулярной массы и молекулярно-массового распределения.

Ввод пробы

Чтобы уменьшить дисперсию и размывание пиков, раствор пробы должен вводиться в хроматографическую колонку в форме резко ограниченной зоны с минимальным нарушением потока элюента. Обычно для ввода пробы используется двухпозиционный шестиходовой кран в

обычном или автоматическом варианте, как, например, в автодозаторах. В общем стремятся вводить пробы как можно меньшего объема, границы которого определяются размерами колонки и чувствительностью детекторов, а также механизмом разделения. Дополнительный фактор — концентрация определяемого вещества в растворе, которая в случае анализа полимеров высокой молекулярной массы должна быть очень небольшой, чтобы снизить вязкость раствора и избежать межмолекулярных взаимодействий. Объем вводимой пробы в гель-проникающей хроматографии обычно намного выше (от 0,1 до 1,5 мл), чем во многих других видах ВЭЖХ полимеров, что связано с заметно большей емкостью используемых колонок. Масса вводимой пробы также играет важную роль в гель-проникающей хроматографии, особенно при сочетании с масс-чувствительным детектором. По этой причине для ввода пробы обычно используется инжектор с петлей фиксированного объема.

Колонки и стационарные фазы

Как известно, рабочие параметры хроматографической колонки и характеристики разделения (емкость, селективность, эффективность разделения, разрешение) зависят от размеров колонки и, что еще более важно, от природы сорбента. Обычно в практике аналитической ВЭЖХ использует заполненные колонки длиной 15 см и внутренним диаметром 3—4 мм. В гель-проникающей хроматографии применяются колонки большего размера, 30 см × 8 мм, которые соединяются в серию из трех и более колонок, чтобы достичь необходимой величины разрешения.

В качестве сорбентов для ВЭЖХ применяются пористые сферические микрочастицы диаметром от 3 до 10 мкм. В гель-проникающей хроматографии при разделении полимеров сверхвысокой молекулярной массы ($M > 10^6$ дальтон), для которых возможно разрушение макромолекул вследствие разрыва цепей, применяются также частицы большего диаметра, 20 мкм и более. Эффективность заполненных хроматографических колонок возрастает с уменьшением размера частиц сорбента, но при этом увеличивается гидравлическое сопротивление колонки, которое для коммерческих приборов не должно превышать 27 МПа. Для нового поколения хроматографов сверхвысокого давления, работоспособных до ~700 МПа, потенциально пригодны сорбенты с размером частиц в 1 мкм и ниже. Силикагелевые сорбенты могут выдержать такое давление, что, однако, нельзя сказать о полимерных сорбентах.

Решающую роль в ВЭЖХ играет пористость сорбентов, так как удерживание и, следовательно, разделение происходит на поверхности пор. Обычно в хроматографии применяются сорбенты со средним размером пор от 6 до 100 нм, в то время

как разделение макромолекул по размерам может происходить в порах, имеющих размеры от 1 нм до 1 мкм. Химическая структура поверхности сорбента определяет термодинамическое «окружение» анализируемого вещества в поверхностном слое (стационарной фазе) и таким образом определяет механизм удерживания. Гибкие макромолекулы полимеров, приближаясь к внутренней поверхности твердой частицы сорбента, меняют свою пространственную конфигурацию вследствие стерических взаимодействий, и этот процесс играет важную роль в любом варианте хроматографии полимеров. Такое взаимодействие ограничивает флуктуационное движение макромолекулы, понижает ее конформационную энтропию и фактически уменьшает удерживание. В гель-проникающей хроматографии, где применяются сорбенты с инертной поверхностью и размеры макромолекул сравнимы с диаметром пор, стерические взаимодействия превалируют и разделение происходит по размерам молекул. Во всех других вариантах хроматографии полимеров реализуются также имеющие энтальпийную природу специфические взаимодействия макромолекул с функциональными группами на поверхности сорбента. По этой причине все эти методы объединяют под названием «хроматография взаимодействия полимеров». Используется также название «адсорбционная хроматография полимеров», поскольку размер макромолекул обычно намного превосходит размер функциональных групп, участвующих во взаимодействии, и удерживание осуществляется по адсорбционному механизму.

Нестерические взаимодействия в процессе адсорбционной хроматографии полимеров определяются как химической структурой анализируемого вещества, так и природой стационарной и подвижной фаз. В нормально- или обращенно-фазной ВЭЖХ фактором, обеспечивающим разделение, является полярность фаз. В нормально-фазной ВЭЖХ применяют полярные стационарные фазы (например, силикагель с полярными силанольными группами) и менее полярные элюенты. Соответственно, чем выше полярность анализируемого вещества, тем сильнее его удерживание на нормально-фазной колонке, а увеличение полярности подвижной фазы вызывает снижение удерживания пробы. Противоположная картина наблюдается в обращенно-фазной ВЭЖХ, где используются неполярная стационарная фаза и полярный элюент. Здесь уменьшение полярности подвижной фазы приводит к снижению удерживания пробы.

В современной обращенно-фазной хроматографии широко используются химически привитые стационарные фазы, в которых функциональные группы (алкил-, фенил-, циано- и аминогруппы) химически связаны с поверхностью силикагеля. Такие стационарные фазы применя-

ются для разделения биомолекул в хроматографии гидрофобного взаимодействия. Между гидрофобной частью молекулы белков и неполярными фрагментами структуры стационарной фазы возникают слабые неионные взаимодействия, которые имеют энтальпийную природу и высокочувствительны к концентрации соли в водном элюенте, представляющем собой водный буферный раствор высокой ионной силы.

В ионообменной хроматографии, в которой заряженные молекулы, такие как белки, разделяются по величине их электрического заряда, применяются стационарные фазы с ионными группами, и механизм удерживания включает электростатическое притяжение противоположно заряженных ионов на поверхности сорбента. Здесь в качестве сорбентов особенно широко применяются полимеры на основе акрилатных мономеров вследствие их устойчивости в широком интервале рН (от 1 до 13); для сравнения: силикагель устойчив при рН от 2 до 8.

Детекторы

Разделенные макромолекулы регистрируются одним или несколькими детекторами, сигнал которых пропорционален количеству анализируемого вещества. Зафиксированное изменение сигнала во времени представляет собой хроматограмму — набор хроматографических пиков, разделенных базовой линией.

Наиболее важными характеристиками любого детектора являются чувствительность (отношение высоты пика к концентрации определяемого вещества в пробе), отношение сигнал/шум, а также линейный динамический диапазон.

Наибольшее распространение в ВЭЖХ синтетических полимеров и биополимеров получил УФ-фотометрический детектор, способный измерять изменение интенсивности светового потока на выбранных длинах волн (в диапазоне 190—350 нм для УФ-детекторов и в диапазоне 190—700 нм для УФ/ВИД-детекторов). В случае анализа белков измерения обычно проводят в области поглощения света пептидной связью (210—220 нм) и в области поглощения света тирозином и триптофаном (~280 нм). Многие синтетические полимеры содержат хромофорные группы, что также обеспечивает селективность их определения фотометрами. УФ-детекторы, работающие на переменной длине волны, и детекторы с диодной матрицей имеют то преимущество, что детектирование может проводиться одновременно на нескольких длинах волн. Детектор с фотодиодной матрицей позволяет также получать одновременно полный УФ-спектр для любой точки хроматограммы, что может помочь в идентификации пиков на хроматограмме.

Из других селективных детекторов, используемых в ВЭЖХ полимеров, следует отметить

флуоресцентный и ИК-фурье-фотометры. Например, флуоресцентный детектор обладает очень высокой чувствительностью, а также селективностью по отношению к белкам, содержащим остатки тирозина и триптофана, которые обладают собственной флуоресценцией. Оба типа детекторов совместимы только с определенными подвижными фазами. Хорошей альтернативой этим детекторам может послужить испарительный интерфейс, позволяющий использовать ИК-фурье-спектрометр, не связанный с ВЭЖХ-системой [2]. В таком интерфейсе элюент распределяется (испаряется) по поверхности германиевого диска, который затем может быть перенесен в любой ИК-фурье-спектрометр для получения полной спектроскопической информации о любом пике на хроматограмме. Тот же принцип используется при детектировании пробы масс-спектрометром с лазерной десорбцией из матрицы, который невозможно связать с ВЭЖХ-системой каким-либо иным способом [3].

Из универсальных детекторов, которые применяются в ВЭЖХ полимеров, отметим дифференциальный рефрактометр. Он используется только при изократическом элюировании, главным образом в гель-проникающей хроматографии. Действие этого детектора основано на измерении индекса рефракции элюента, который изменяется при появлении в нем определяемого вещества. При сочетании этого детектора с каким-либо селективным детектором, например УФ-фотометром, можно получить информацию о химическом составе разделенных фракций полимера. Все более популярным становится испарительный детектор по светорассеянию. Он пригоден при градиентном элюировании полимеров и композитов с использованием неводных растворителей [2]. Работа детектора обеспечивается следующим образом. Элюент распыляется и растворитель испаряется из образовавшихся капель. Из каждой капли, содержащей нелетучий материал, образуется частица, рассеивающая свет, когда она пересекает световой поток. Важно, что этот детектор, в отличие от УФ-фотометра, позволяет детектировать алифатические полимеры, не имеющие хромофорных групп. Кроме того, при работе с ним можно использовать практически любую подвижную фазу, не содержащую нелетучих буферных добавок. Вместе с тем детектор по светорассеянию не пригоден для количественных определений, поскольку зависимость сигнала этого детектора от концентрации вещества нелинейная. К тому же аналитический сигнал подвержен влиянию многочисленных факторов, таких как химическая природа пробы, включая ее молекулярную массу и химический состав, вязкость элюента и его поверхностное натяжение, условия проведе-

ния измерений. Сочетание детектора по светорассеянию с другими типами детекторов в ряде случаев может помочь избежать этих осложнений.

Последние годы все более популярными в гель-проникающей хроматографии синтетических и природных полимеров становятся так называемые масс-чувствительные детекторы, к которым относятся капиллярный вискозиметр и различные статические фотометры светорассеяния [4, 5]. Соединение одного или двух таких детекторов с концентрационным детектором (обычно с рефрактометром) позволяет получать ценную информацию, в частности о массе и молекулярно-массовом распределении, архитектуре макромолекул, их пространственной конформации в разбавленных растворах и т.д.

Очень эффективно сочетание с жидкостным хроматографом квадрупольного масс-спектрометра — одинарного или тройного квадруполья. Системы жидкостный хроматограф (ЖХ)—масс-спектрометр(МС) и ЖХ—МС—МС получили особенно широкое распространение при исследовании белков. При этом в анализе биополимеров и некоторых ионных синтетических полимеров используются методы мягкой ионизации, такие как электрораспыление и лазерная десорбция из матрицы [6]. Соединение жидкостного хроматографа с масс-спектрометром требует обычно очень малых потоков (менее 10 мкл/мин) и, как следствие, капиллярных колонок и соответствующего оборудования, или же необходимо проводить разделение потока. Миниатюризация разделения до уровня «лаборатория на чипах» с наноколонками дополнительно улучшает совместимость колоночной хроматографии с масс-спектрометрией.

Известны исследования по применению для целей детектирования в ВЭЖХ и других спектроскопических методов, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса и спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. Применение спектроскопии внутреннего отражения для изучения молекулярного взаимодействия на границе фаз помогло исследователям понять механизм удерживания и подтвердить и даже расширить данные, полученные хроматографическими методами.

Обработка данных

Для идентификации пиков и количественного определения концентрации анализируемого вещества в ВЭЖХ традиционно применяются такие методы и приемы обработки данных, как соотнесение времен удерживания, интегрирование площади пиков, метод градуировочного графика и др. При использовании детектора с фотодиодной матрицей или масс-спектрометрического детектора требуется дополнительная математическая обработка данных для расшифров-

ки УФ- и масс-спектров и соотношения их с библиотеками спектров [7]. Большинство коммерческих хроматографических программ содержит подпрограммы, которые могут быть использованы в хроматографии белков и ДНК. Получить характеристику других природных и всех синтетических полимеров — более сложная задача, поскольку требуется расчет распределения различных молекулярных параметров, как например, молекулярной массы, химического состава, частоты разветвления, функциональности концевых групп и т.д. Для этого в свою очередь необходимо проведение дополнительных процедур (калибровка колонки, расчет статистических моментов распределения и т.д.) [4]. В случае двухмерного хроматографического кросс-фракционирования полимеров требуется построение кривых двухмерного распределения с тем, чтобы можно было охарактеризовать гетерогенность сополимеров [8].

Механизм удерживания и типы разделений

Изократическое элюирование. Наиболее популярным видом изократического разделения полимеров является гель-проникающая хроматография. В этом процессе разделение достигается за счет стерического взаимодействия между макромолекулами и поверхностью пор сорбента. Среднее время нахождения макромолекулы внутри пор в течение хроматографического процесса зависит от размера макромолекул. Меньшие по размеру макромолекулы более эффективно проникают в малые поры и соответственно используют большую долю общего объема пор. Вследствие этого объем элюирования меньших по размеру молекул оказывается больше, чем объем элюирования больших молекул. В гель-проникающей хроматографии разделение осуществляется в объеме пор $V_p = V_T - V_0$, где V_T — объем жидкой фазы внутри колонки; V_0 — объем свободного пространства между частицами.

Самым маленьким молекулам, которые могут проникать в любые поры, соответствует самый большой объем удерживания V_R и этот объем равен V_T , а самые большие молекулы, которые исключаются из всех пор, элюируются в самом малом объеме $V_R = V_0$ (который называют исключенным объемом колонки).

Из вышесказанного следует, что для процесса гель-проникающей хроматографии существует два критических параметра, влияющих на разделение: общий объем пор частиц сорбента V_p и внутренний диаметр пор. Объем пор определяет область времен удерживания, в которой происходит разделение, а диаметр пор прямо коррелирует с размером макромолекул, разделение которых возможно. По этой причине разрешение в любой области молекулярных масс улучшается с

ростом объема пор соответствующего размера. В зависимости от цели разделения могут использоваться сорбенты как с узким распределением пор (колонка с сорбентом, имеющим поры одного размера), так и с очень широким распределением пор (колонки со смешанным сорбентом). Как правило, на практике используются несколько соединенных между собой колонок, что позволяет увеличить эффективность разделения (число теоретических тарелок). Кроме того, подбором сорбентов различной пористости разделяющую способность хроматографической системы можно адаптировать к молекулярно-массовому распределению.

В противоположность гель-проникающей хроматографии, где любые нестерические эффекты не желательны и подавляются, в адсорбционной хроматографии полимеров слабые нестерические адсорбционные взаимодействия между анализируемым веществом и стационарной фазой играют основную роль и, как результат, объем удерживания V_R малых молекул всегда превышает объем жидкой фазы в колонке V_T . Наилучшим образом различие между гель-проникающим и адсорбционным типами разделения полимеров демонстрирует так называемая молекулярно-массовая градуировочная кривая — зависимость $\lg M$ от V (рис. 1). Серию полистиролов низкой полидисперсности с относительными молекулярными массами от нескольких сотен до миллиона разделяли методом обращенно-фазной хроматографии (сорбент—силикагель с химически привитыми октадецильными группами) с

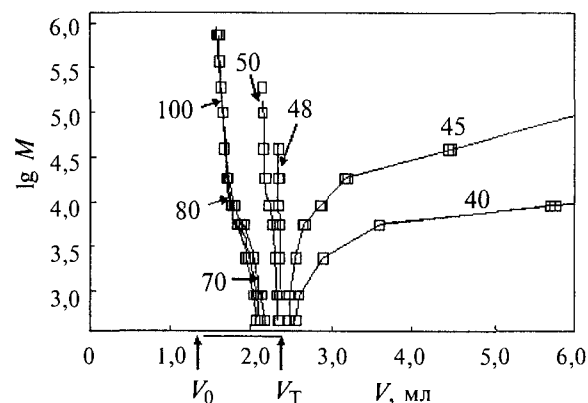


Рис. 1. Градуировочная кривая, показывающая переход от механизма гель-проникающей хроматографии к адсорбционной хроматографии при изократическом элюировании образцов полистирола низкой полидисперсности.

Колонка: Nova-Pak C18 (Waters Corporation, USA), подвижная фаза: смесь MeCN/ТГФ (числа на рисунке показывают содержание ТГФ в % об.), расход 1 мл/мин, испарительный детектор по светорассеянию, модель 500 (Alltech Corporation, USA)

использованием элюентов, состоящих из ацетонитрила и тетрагидрофурана (MeCN/ТГФ) в различных соотношениях. Тетрагидрофуран менее полярен, чем ацетонитрил (параметры полярности 4,0 и 5,8, соответственно). Чистый тетрагидрофуран полностью подавляет неполярные взаимодействия между полистиролом и алкильными цепями на силикагеле, в результате осуществляется обычный процесс гель-проникающей хроматографии: время элюирования возрастает с уменьшением молекулярной массы и все разделение происходит в пределах объема пор V_R . Стерические взаимодействия превалируют, пока содержание ацетонитрила в подвижной фазе не достигнет ~50%. После чего порядок удерживания полностью обращается и реализуется адсорбционный тип разделения, когда объем удерживания V_R превышает объем жидкой фазы V_T . При содержании тетрагидрофурана 45% и ниже, удерживание резко возрастает с увеличением молекулярной массы и становится настолько чувствительным к составу элюента, что высокомолекулярная фракция практически необратимо удерживается колонкой. По этой причине разделение высокомолекулярных полимеров методом адсорбционной хроматографии проводят в градиентном режиме.

Следует особо отметить эффект, возникающий при содержании тетрагидрофурана 48%. В этой точке удерживание становится полностью независимым от молекулярной массы полимера и все фракции элюируются в объеме жидкой фазы V_T . В этой переходной точке, называемой критической точкой адсорбции, энтропийный фактор исключения макромолекул из пор полностью компенсируется энтальпией адсорбционного взаимодействия. Хотя оба эти типа взаимодействий сильно зависят от молекулярной массы, но их взаимная компенсация приводит к удерживанию, которое в критической точке адсорбции становится полностью независимым от молекулярной массы. Этот эффект позволяет использовать для фракционирования полимеров иные типы изократического разделения. Так, благодаря тому, что молекулярные цепи полимера становятся как бы «невидимыми», появляется возможность эффективного разделения теломеров по их концевым группам [8]. Тот же принцип используется для изократического разделения некоторых блоксополимеров [8].

Изократическое разделение в критической точке адсорбции требует очень тщательного контроля хроматографических условий, таких как качество стационарной фазы, состав и температура подвижной фазы, ввиду очень высокой чувствительности параметров удерживания к этим свойствам, особенно при разделении полимеров высокой молекулярной массы. Другое ограниче-

ние этого метода связано с динамическими эффектами. Поскольку эффективность разделения по этому методу зависит от способности всех макромолекул проникать во все поры (как в случае молекул растворителя), то низкие коэффициенты диффузии и стерические затруднения при наличии больших макромолекул и узких пор слишком сильно увеличивают время достижения равновесия. Поэтому изократическое разделение в критической точке адсорбции может быть реализовано только когда внутренний диаметр пор превышает размер макромолекул в растворе.

Градиентное элюирование. При градиентном элюировании элюирующая сила подвижной фазы постепенно возрастает в ходе хроматографического процесса, что обеспечивает элюирование сильно удерживаемых компонентов. Это особенно важно при разделении полимеров высокой молекулярной массы, которые в противном случае, т.е. в условиях адсорбционной хроматографии, практически необратимо удерживаются в колонке. Градиент может быть создан путем изменения состава элюента, его ионной силы или pH и даже температуры. На принципе солевого градиента основано разделение белков в хроматографии гидрофобного взаимодействия и ионообменной хроматографии. В ходе разделения концентрация соли в первом случае понижается, во втором — возрастает.

Типичный пример градиентного обращенно-фазного разделения синтетических полимеров демонстрирует рис. 2. Увеличение элюирующей силы элюента ТГФ/MeCN достигается путем линейного возрастания концентрации менее полярного тетрагидрофурана. Продолжительность процесса разделения всех полистиролов составляет 8 мин. Элюирование низкомолекулярных проб (молекулярная масса ниже 10000 дальтон) происходит по адсорбционному механизму при низком содержании тетрагидрофурана в подвижной фазе и сильно зависит от молекулярной массы полистиролов. Высокое разрешение олигомеров полистирола позволяет различить фракции полистиролов, имеющие практически одинаковые объемы элюирования, совпадающие с объемом элюента при достижении критической точки адсорбции (48% тетрагидрофурана).

Положение о том, что градиентное элюирование высокомолекулярных фракций полимеров происходит в критической точке адсорбции, было выдвинуто относительно недавно [9, 10]. На этом основана методика градиентного разделения сополимеров и композитов по химическому составу: каждая композиционно однородная фракция сополимера или композита элюируется в своей собственной критической точке адсорбции, независимо от молекулярной массы.

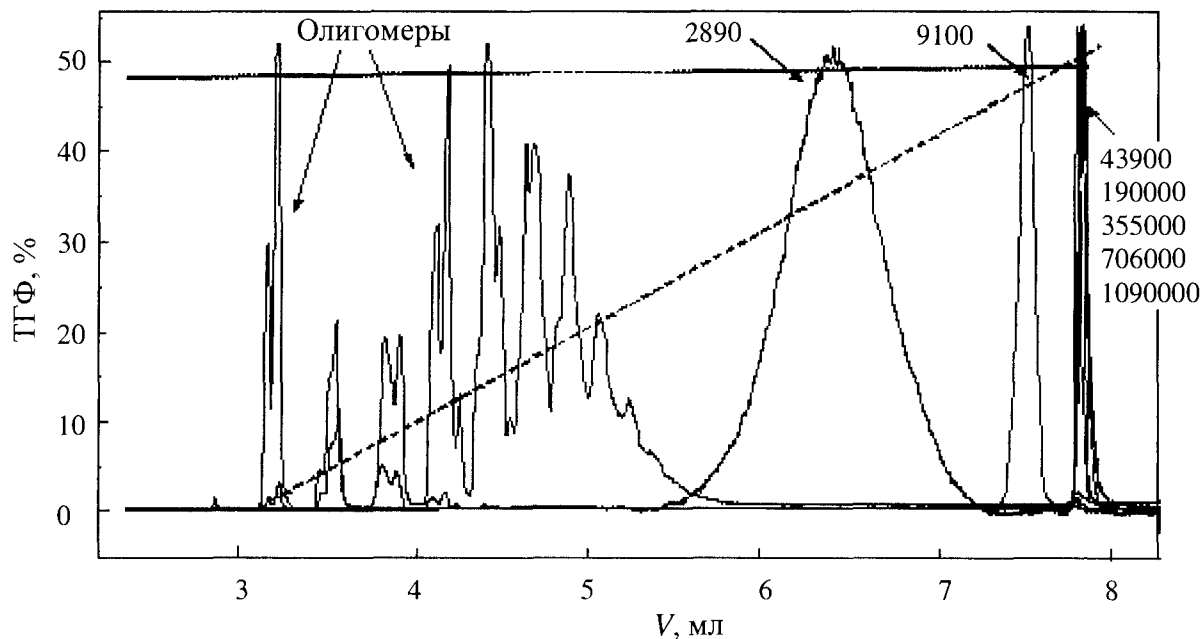


Рис. 2. Хроматограмма образцов полистиролов, полученная методом градиентного элюирования.

Образцы, хроматографическая система и условия те же, что на рис. 1, градиент состава элюента: от 100% MeCN к 100% ТГФ за 10 мин (пунктирная линия). Числа на рисунке показывают молекулярную массу полимерных фракций

В целом градиентное элюирование — более универсальная техника разделения полимеров, чем изократическое элюирование в критической точке адсорбции. Размеры пор сорбента и его частиц и динамические эффекты не вызывают столь значительных ограничений при градиентном элюировании. Макромолекулам не нужно проникать в весь объем пор, и элюирование в критической точке адсорбции может быть достигнуто, даже если их размер превосходит диаметр пор. Градиентное элюирование позволяет осаждать полимерные фракции на входе в колонку, если подвижной фазой в начале градиента является плохой для данного полимера растворитель. Это довольно обычная ситуация, поскольку «окно растворимости» для многих полимеров относительно узкое и элюент со слабой элюирующей силой обладает низким термодинамическим качеством (по отношению к полимеру). Это справедливо и в отношении некоторых белков (мембранные белки или коллаген), которые могут осаждаться на промежуточной стадии градиентного разделения. Однако элюирование различных компонентов полимера еще подчиняется закономерностям хроматографического разделения, описанным в предыдущем разделе, поскольку все фракции полимера растворяются и затем сорбируются на колонке в процессе разделения. Только в том случае, когда макромолекулы элюируются сразу после растворения без ка-

ких-либо адсорбционных взаимодействий, как в высокоэффективной распределительной жидкофазной хроматографии, разделение осуществляется исключительно на основе растворимости полимера. При этом удерживание сильно зависит от молекулярной массы и концентрации компонентов в пробе [11].

Многомерная хроматография. В некоторых случаях разделение в рамках одного механизма не является достаточным для полного анализа биологического или синтетического полимера. Тогда прибегают к соединению двух и более колонок, работающих на разных принципах разделения, — прием, который широко используется в многомерной хроматографии полимеров. Эта техника разделения позволяет упростить сложную смесь, перед тем как она поступит на спектроскопическое детектирование. При очистке белков особенно часто комбинируют ионообменную или гель-проникающую варианты хроматографии с обращенно-фазной хроматографией [12]. Градиентное или изократическое элюирование в критической точке адсорбции с предварительной или последующей гель-проникающей хроматографией часто применяется при перекрестном фракционировании синтетических полимеров [13]. Подходящим способом для получения реальной двухмерной характеристики сополимера или полимера с функциональными группами является адсорбционная хроматография в каче-

стве первой ступени разделения, поскольку в этом случае полимер можно фракционировать по химическому составу или структурным различиям вне зависимости от молекулярной массы. Размер макромолекул в каждой гомогенной по составу фракции, полученной на первой ступени разделения, прямо коррелирует с молекулярной массой, и последующее проведение гель-проникающей хроматографии всех полученных фракций может завершить процесс кросс-фракционирования.

Сочетание двух типов разделения полимеров может быть реализовано с использованием как разных хроматографических систем, так и в одной хроматографической системе. В первом случае фракции полимера из одной системы переносятся в другую вручную, а во втором случае — автоматически, когда элюент из первого прибора протекает через кран-дозатор во второй прибор. В наиболее сложных автоматических двумерных системах устанавливают два шестиходовых крана или восьми- или даже десятиходовых крана [12]. Две петли для сбора фракций позволяют собирать их непрерывно без потерь. Точная координация потоков последовательных хроматографических ступеней является важным условием успешной работы любой автоматической системы. Так, при хроматографическом кросс-фракционировании время сбора одной ВЭЖХ-фракции совпадает с продолжительностью анализа этой фракции методом гель-проникающей хроматографии [8].

Теория хроматографии полимеров

Термодинамика процесса разделения. Основное положение любой теории хроматографии состоит в том, что удерживание определяется термодинамическими факторами. Подвижная и стационарная фазы интерпретируются как истинно термодинамические фазы с объемами V_M и V_S , соответственно. Объем удерживания зависит от коэффициента распределения K анализируемого вещества между двумя фазами:

$$V_R = V_M + K \cdot V_S$$

Все энтальпийные и энтропийные взаимодействия между макромолекулами и хроматографической сорбирующей поверхностью происходят в стационарной фазе. Если размер макромолекул в растворе сравним с внутренним диаметром пор, то полный объем пор представляет объем стационарной фазы, $V_P = V_S$, а объем подвижной фазы равен объему межгранульного пространства, $V_M = V_0$. Эта корреляция не всегда справедлива в случае градиентного разделения белков, когда размер пор сорбентов обычно намного превосходит размер компактных макромолекул,

и тогда объем подвижной фазы дается полным объемом жидкой фазы в колонке

$$V_T = V_0 + V_P.$$

Задача термодинамической теории — установить связь коэффициента распределения K (или изменение свободной энергии сорбции) с параметрами, описывающими свойства макромолекул (конфигурация, конформация, молекулярная масса, химический состав, форма молекулы и т.д.), и с условиями разделения (температура, геометрия пор, состав подвижной фазы и т.д.). Все эти параметры определяют энергию многоатомного взаимодействия макромолекулы с поверхностью и, таким образом, влияют на удерживание.

Создание универсальной термодинамической модели хроматографического разделения белков и других биополимеров маловероятно (по крайней мере сейчас) из-за сложности химического и пространственного строения этих макромолекул, которые могут быть подвержены различным конформационным переходам в процессе разделения. Даже для малых пептидов, состоящих из 5—15 аминокислот, которые, как предполагают, существуют в растворе в виде статистического клубка, тип аминокислоты и ее положение в цепи играют исключительно важную роль в удерживании пептида.

Тем не менее полуколичественный подход, примененный к специфическим типам разделения, часто позволяет понять механизм разделения и влияние условий разделения, таких, как тип соли и ее концентрация, температура, тип сорбента, тип органического модификатора и рН. Примерами могут служить теории сольвофобных [14] и селективных [15] взаимодействий, которые были применены к описанию процесса разделения белков методом хроматографии гидрофобного взаимодействия и обращенно-фазной хроматографии [16].

По отношению к синтетическим полимерам уже простая статистическая модель гибких полимерных цепей позволяет в большинстве случаев провести количественное описание хроматографического процесса [17]. Теория, которая вначале была разработана применительно к гель-проникающей хроматографии, дает для коэффициента распределения K макромолекулы, внедряющейся в щелевые или цилиндрические поры и взаимодействующей с их стенками, простое аналитическое выражение. Это выражение содержит терм, учитывающий размеры макромолекулы и поры, и энергетический терм, учитывающий нестерические взаимодействия между макромолекулой и стационарной фазой. В зависимости от типа подвижной фазы конкуренция между стерическими (отталкивание) и

нестерическими (притяжение) взаимодействиями может приводить или к разделению по размерам макромолекул, $K < 1$, или по величине их адсорбции, $K > 1$, тогда как промежуточное значение, $K = 1$, указывает на разделение в критических условиях, где два типа взаимодействий взаимно балансируют друг друга (см. рис. 1).

Современная модель градиентного элюирования [18] предполагает, что перемещение пробы при градиентном элюировании осуществляется тем же образом, как и при изократическом. Следовательно, имея зависимость коэффициента распределения от состава элюента, который меняется в ходе процесса, можно рассчитать градиентный объем элюирования для градиентов различного наклона и формы, используя хорошо известное интегральное уравнение материального баланса [19]. Результаты таких расчетов в приложении к градиентному разделению серии полимергомологов объясняют особенности хроматограммы, представленной на рис. 2.

Равным образом объединение молекулярно-статистической теории разбавленных растворов полимеров в ограниченной (пористой) среде с классической теорией хроматографии дает ценные результаты, позволяющие лучше понять механизм процесса хроматографии полимеров [9, 10]. Распространение этой концепции на сополимеры и стационарные фазы с гетерогенной поверхностью (что фактически имеет место для большинства, если не для всех сорбентов) [20] значительно улучшило надежность теории разделения сложных полимерных композиций.

Динамические эффекты. Величина разрешения хроматографической системы в большей степени зависит также от динамических (кинетических) факторов. Динамические эффекты приводят к расширению хроматографических пиков, так что пики даже индивидуальных соединений, как например, белков, имеют конечную ширину. Для полидисперсных полимеров уширение пика скрыто обычно общим распределением полимера по фракциям, но оно может приводить к ошибочным результатам, если не будет сделана коррекция, учитывающая динамический эффект [4].

Основной вклад в уширение пика вносит диффузия в застойные зоны подвижной фазы, т.е. кинетические затруднения, возникающие при проникновении макромолекул в поры сорбента. Молекулярная диффузия — это единственный путь для макромолекул достигнуть внутренней поверхности пор, тогда как перемещение в межгранульном пространстве определяется конвекционным механизмом. Эффект уширения хроматографической полосы имеет тенденцию к

снижению, когда уменьшается отношение характеристических времен этих двух процессов

$$t_D = L^2/D$$

$$t_0 = V_0/F$$

где L — средняя длина пор; D — коэффициент диффузии вещества; V_0 — объем подвижной фазы в колонке; F — объемная скорость потока подвижной фазы.

Коэффициент диффузии макромолекул быстро уменьшается с ростом молекулярной массы, и как результат уширение пика становится более значительным. Так как длина поры обычно сравнима с размером частицы сорбента (исключение составляют перфузионные сорбенты, которые содержат очень широкие транспортные поры и очень неглубокие диффузионные поры, они применяются главным образом в препаративной хроматографии [21]), то для уменьшения этого влияния в хроматографии биообъектов обычно используют мелкие пористые частицы размером 2—5 мкм с тем, чтобы глубина застойной зоны не была слишком большой [22]. Для градиентной хроматографии синтетических полимеров внутренняя поверхность пор не играет столь важной роли, поскольку разделение происходит обычно на входе в поры, что значительно уменьшает динамический эффект.

Приложения жидкостной хроматографии полимеров

Разделение биообъектов. Разработка широкопористых химически модифицированных сорбентов оказала сильное стимулирующее влияние на распространение жидкостной хроматографии биополимеров в биохимии и биологии [23]. Тем не менее несколько факторов должны учитываться при выборе оптимального типа разделения для решения конкретной аналитической задачи.

Наиболее популярный метод разделения белков — обращенно-фазная хроматография ввиду исключительно высокой селективности и разрешения. Но часто для разделения белков более предпочтительной оказывается хроматография гидрофобного взаимодействия, поскольку она не оказывает сильного влияния на конформацию молекул. Кроме того, многие белки денатурируют в кислотах и органических растворителях, а также при контакте с алкильными цепями неподвижной фазы, что является обычным следствием обращенно-фазного разделения [24]. Конформационные переходы могут вызвать дополнительные хроматографические проблемы, такие как уширение пика, множественные пики, низкий выход разделяемого компонента и другие проблемы, если время конформационных пре-

вращений сопоставимо со временем пребывания вещества в колонке [25].

Хроматография гидрофобного взаимодействия и ионообменная хроматография преимущественно используются в анализе белков, нуклеиновых кислот и других биологических макромолекул, когда важно сохранить трехмерную структуру и не допустить ее разрушения в процессе разделения [26].

Гель-проникающая хроматография применяется для предварительной очистки сложных биологических матриц при разделении белков. Эта техника лучше всего подходит для определения степени однородности какого-либо препарата, в котором белки являются единственным высокомолекулярным составляющим. Разделение по размерам может использоваться также для обнаружения димеров и более крупных ассоциатов исходного белка. Применение статического детектора по светорассеянию в сочетании с хроматографическим разделением очень популярно для изучения агрегации белков. Гель-проникающая хроматография применяется также для анализа углеводов. Например, анализ состава олигосахаридов в различных сиропах проводится методом гель-проникающей хроматографии на специально для этой цели полученных катионообменных смолах (сульфированные полистирол-дивинилбензолные сорбенты) [4].

После установления строения генома человека (в основном электрофоретическими методами) биохимики обратились к изучению состава белков клетки — так называемого протеомика. Термин «протеомика» был предложен с тем, чтобы подчеркнуть полную комплементарность белков клетки. Определение состава белков клетки требует описания нахождения, концентрации и агрегации каждого из белков [27]. Для этих целей пригодна многомерная ВЭЖХ с автоматическим переключением колонок, которая может значительно дополнить традиционные методы разделения белков, такие как двумерный (2D) гель-электрофорез (этот метод обычно включает много ручных операций и мало пригоден для высокопроизводительных анализов).

Разделение синтетических полимеров. Гель-проникающая хроматография остается основным методом изучения молекулярно-массового распределения. Почти все типы синтетических полимеров и сополимеров могут быть проанализированы этим методом с применением органических или водных элюентов и различных сорбентов.

Растворимость полимера является одним из важнейших факторов при оптимизации условий разделения. Среди полимеров, растворимых при комнатной температуре в обычных органических растворителях (тетрагидрофуран, хлороформ, толуол, дихлорэтан и метилэтилкетон), можно

отметить полистирол, полибутадиен и полиизопрен, полиакрилаты и полиметакрилаты, поливинилацетат, поликарбонаты, поливиниловые эфиры, поливинилхлорид. Некоторые полимеры, такие как полиамиды и полиалкилтерефталаты, растворяются при комнатной температуре только во фторированных спиртах — трифторэтаноле или гексафторизопропанол (отметим, что это очень дорогостоящие растворители). Применение узких колонок уменьшенных размеров (внутренний диаметр 4,6 мм) позволяет снизить объемную скорость потока и, следовательно, расход элюента, не увеличивая продолжительность разделения. Для поливинилового спирта, полиуретанов и многих других полярных полимеров хорошими растворителями являются N,N-диметилформамид, N,N-диметилацетамид и диметилсульфоксид. В этом случае обычно необходимо добавление солей (хлорида лития или бромида лития), чтобы подавить так называемый полиэлектролитный эффект, который хорошо известен в гель-проникающей хроматографии с водными элюентами [4].

Некоторые коммерчески важные полимеры, такие как полиэтилен и полипропилен, не растворимы при комнатной температуре ни в одном растворителе. Они растворяются в дихлорбензоле или 1,2,4-трихлорбензоле при температуре выше 110 °С, и гель-проникающая хроматография этих полимеров проводится при повышенных температурах (130 °С и выше) с применением специальных интегрированных хроматографических систем, таких как Alliance GPC2000™ фирмы «Waters Corporation» (Milford, USA) или PL 220 фирмы «Polymer Labs» (Church Stretton, UK). Эти системы способны осуществлять все этапы хроматографии полимеров, включая ввод пробы, разделение и детектирование, при повышенных температурах.

В практике анализа многих полиолефинов разветвленного строения стало общепринятым сочетание масс-чувствительного детектора с системой для гель-проникающей хроматографии. Такая многодетекторная система заметно улучшает точность и надежность измерения молекулярных масс, позволяет определять частоту разветвлений и другие структурные характеристики сложных нелинейных полимеров [4, 28].

В последние годы возрос интерес к адсорбционной хроматографии полимеров как к методу, дополняющему гель-проникающую хроматографию, для исследования синтетических полимеров и композиций. Принципиальную разницу между этими двумя методами показывают хроматограммы, приведенные на рис. 3 и 4. Три полимера с близкими средними молекулярными массами, а также три эквимольные композиции на основе этих полимеров, были проанализированы

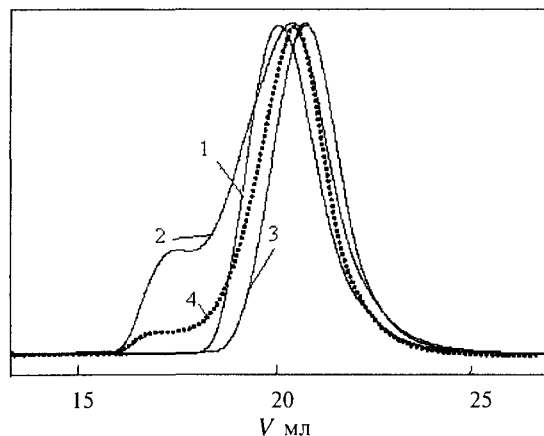


Рис. 3. Хроматограмма полистирола и его сополимеров, полученная методом гель-проникающей хроматографии:

1 — полистирол, 2 — статистический сополимер стирола и бутадиена, 3 — статистический сополимер стирола и акрилонитрила, 4 — их эквимольная смесь

Колонка 3 HR Styragel (Waters), подвижная фаза тетрагидрофуран, объемная скорость 1 мл/мин, детектор рефрактометр, модель 2410 (Waters)

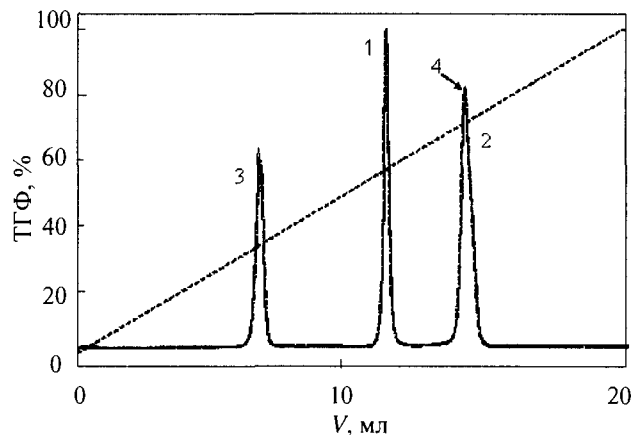


Рис. 4. Хроматограмма образцов полистирола и его сополимеров, полученная методом градиентного обращенно-фазного элюирования.

Образцы те же, что на рис 3

Колонка SymmetryShield C8 (Waters), подвижная фаза градиент от 100% MeCN к 100% ТГФ за 20 мин (прерывистая линия), расход 1 мл/мин, испарительный детектор по светорассеянию, модель 500 (Alltech)

методами изократической гель-проникающей хроматографии и градиентной обращенно-фазной хроматографии. В первом случае (см рис 3) хроматограмма дает информацию только о молекулярной массе образцов, тогда как второй метод (см рис 4) позволяет обнаружить индивидуальные составы, тем самым установить химический состав композиции. Многие статистические сополимеры, блок- и графтсополимеры и композиты были фракционированы по их химическому составу градиентной хроматографией на нормально- и обращенно-фазных колонках практически без каких-либо ограничений по молекулярным массам полимеров [8, 10, 13, 29–32]. С другой стороны, некоторые авторы [8] сообщают об изократическом разделении блоксополимеров в критической точке адсорбции, когда разделение было ограничено молекулярными массами олигомеров. Многие публикации последнего времени посвящены двумерным типам разделений для характеристики полимеров, когда разделение, не зависящее от молекулярной массы, реализуется в критической точке адсорбции как первой ступени полного разделения [8, 33, 34].

Заключение

Высокоэффективная жидкостная хроматография полимеров известна почти 30 лет и совместно с техникой дериватизации является основным методом в практике аналитических разделений

Она остается непревзойденной по потенциалу различать, очищать и характеризовать макромолекулы, которые могут растворяться в каком-нибудь растворителе. Гель-проникающая хроматография — важная область ВЭЖХ полимеров, она является предпочтительным методом определения молекулярных масс и молекулярно-массовых распределений для синтетических и природных полимеров. Этот метод незаменим в любой полимерной лаборатории, занимающейся определением соотношения «структурные свойства—переработка полимера», с целью создания новых материалов и улучшения свойств существующих. Более того, измерения по методу гель-проникающей хроматографии необходимы для обеспечения качества материалов, для производственного контроля и наблюдения кинетики полимеризации.

Адсорбционный вариант хроматографии полимеров значительно расширяет возможности ВЭЖХ для изучения сложных полимерных композиций, сополимеров и полимерных добавок. Определение распределения по химическому составу, а также некоторых других параметров становится доступным из результатов градиентного разделения. Сочетание различных типов разделений с применением автоматического переключения колонок позволяет получить еще более полную характеристику полимера.

ВЭЖХ остается основным методом анализа большинства классов биообъектов, включая белки, углеводы и нуклеиновые кислоты. Развитие

ВЭЖХ полимеров имеет особое значение для биохимии и биотехнологии, где разделение и очистка биополимеров — чрезвычайно важные, необходимые операции. Успех любого из проектов в области науки о жизни, таких как протеомика, в значительной степени обусловлен возможностью использования лучшего, что имеется в методах ВЭЖХ.

Наиболее значимые современные достижения ВЭЖХ полимеров связаны с системами детектирования, основанными на принципах рассеяния света, вискозиметрии и лазерной десорбции/ионизации из матрицы в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией. Через несколько лет ЯМР-спектроскопия может стать главным методом детектирования при анализе синтетических и биополимеров. Миниатюризация аппаратного оформления процесса разделения позволит еще лучше приспособить эти детекторы для сочетания с хроматографическими системами.

Кратко суммируя вышеизложенное, можно сказать, что, несмотря на солидный возраст, высокоэффективная жидкостная хроматография полимеров остается «рабочей лошадкой» биотехнологии и химической промышленности, являясь одновременно плодотворной областью для будущих исследований и усовершенствований.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Li J B, Morawski J LC/GC, 1998, v 16, p 468
- 2 Cheung P C, Balke S T, Schunk T C In Chromatographic Characterization of Polymers Hyphenated and Multidimensional Techniques Eds T Provder, H G Barth, M W Urban, ACS, Washington DC, 1995
- 3 Dwyer J L In Chromatography of Polymers Hyphenated and Multidimensional Techniques Ed T Provder ACS Symposium Series 731, Washington DC, 1999
- 4 Mori S, Barth H G Size Exclusion Chromatography, Berlin Springer, 1999, ch 8
- 5 Brun Y J Liq Chrom & Rel Technol, 1998, v 21, p 1979—2015
- 6 Carr S A, Hemling M E, Bean M F, Roberts G D Anal Chem, 1991, v 63, p 2802
- 7 Weston A, Brown P R HPLC and CE Principles and Practice San Diego Academic Press, CA, 1997, p 220
- 8 Pasch H, Trathnigg B HPLC of Polymers Berlin Springer, 1998, ch 7
- 9 Brun Y J Liq Chrom & Rel Technol, 1999, v 22, p 3067—3090
- 10 Brun Y, Alden P J Chromatogr A, 2002, v 966, p 25—40
- 11 Armstrong D W, Boehm R E J Chromatogr Sci, 1984, v 22, p 378
- 12 Cortes H J, Rothman L D In Multidimensional Chromatography Techniques and Applications Ed H J Cortes Chromatographic Science Series, 50, N Y Marcel Dekker, Inc, 1990
- 13 Glockner G Gradient HPLC of Copolymers and Chromatographic Cross-Fractionation Berlin Springer, 1991, p 148
- 14 Poole C F, Poole S K Chromatography Today N Y Elsevier, 1991
- 15 Wu S L, Benedek K, Karger B L J Chromatogr, 1986, v 359, p 3
- 16 Aguilar M I, Hearn M T W In HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides Ed M T W Hearn N Y VCH Publishers, 1991
- 17 Gorbunov A A, Skvortsov A M Adv Colloid and Interface Sci, 1995, v 62, p 31—108
- 18 Jandera J, Churacek J Gradient Elution in Column Liquid Chromatography—Theory and Practice Amsterdam Elsevier, 1985
- 19 Snyder L R, Stadalus M A In High-Performance Liquid Chromatography Advances and Perspective, v 4 Ed C Horvath Orlando Academic Press, Inc, 1986, p 195
- 20 Brun Y J Liq Chrom & Rel Technol, 1999, v 22, p 3027—3065
- 21 Afeyan N B, Gordon N B, Mazsaroff I e a J Chromatogr, 1990, v 519, p 1
- 22 Cunico R L, Gooding K M, Wehr T Basic HPLC and CE of Biomolecules, Bay Bioanalytical Laboratory, Richmond, CA, 1998, p 23
- 23 Gooding K M, Regnier F E HPLC of Biological Macromolecules Methods and Applications N Y Dekker, 1990
- 24 Regnier F E Science, 1987, v 238, p 319
- 25 Sadana A Bioseparation of Proteins Unfolding/Folding and Validations San Diego Academic Press, CA, 1998, ch 5
- 26 Hearn M T W In Handbook of Bioseparations, v 2 Ed S Ahuja San Diego Academic Press, 2000
- 27 Proteome Research New Frontier in Functional Genomics Eds M R Wilkins, K I Williams, R D Appel, D F Hochstrasser N Y Springer-Verlag, 1997
- 28 Brun Y, Gorenstein M V, Hay N J Liq Chrom & Rel Technol, 2000, v 23, p 2615—2639
- 29 Mori S In Chromatographic Characterization of Polymers Hyphenated and Multidimensional Techniques Eds T Provder, H G Barth, M W Urban ACS, Washington DC, 1995
- 30 Chunk T C J Chromatogr A, 1993, v 656, p 591—615
- 31 Teramachi S In Chromatography of Polymers, Macromol Symp Ed D Berek 1996, v 110, p 217
- 32 Sato H, Ogino K, Darwint T, Kiyokawa I In Chromatography of Polymers, Macromol Symp Ed D Berek 1996, v 110, p 217
- 33 Kilz P, Kruger R-P, Much H, Schulz G In Chromatographic Characterization of Polymers Hyphenated and Multidimensional Techniques Eds T Provder, H G Barth, M W Urban ACS, Washington DC, 1995
- 34 Trathnigg B, Kollroser M, Parth M, Roblreiter S In Chromatography of Polymers Hyphenated and Multidimensional Techniques Ed T Provder ACS, Washington DC, 1999