

## СОРБЦИЯ И ХРОМАТОГРАФИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ

*Г. В. Самсонов*

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	1410
II. Элюентная хроматография . . . . .	1411
III. Фронтальная хроматография . . . . .	1413
IV. Новые хроматографические методы . . . . .	1416
V. Полиэлектролиты . . . . .	1418
VI. Сорбция белков ионообменными смолами . . . . .	1419

### I. ВВЕДЕНИЕ

Значительные успехи, достигнутые в последнее время в области сорбционных и хроматографических методов разделения, выделения и очистки низкомолекулярных веществ, вызвали серию работ по фракционированию высокомолекулярных соединений на основе этих методов, а также по созданию хроматографических методов анализа состава смесей полимеров. Прогресс методов сорбции и хроматографии в применении к полимерам связан, с одной стороны, с развитием теории и лабораторной техники хроматографических процессов, позволяющих разделять смеси весьма близких по свойствам веществ, и с другой, — с синтезом специфических полимерных сорбентов, главным образом ионообменных смол, регулирование структуры которых осуществляется в процессе их изготовления. Особенно важным здесь оказалось получение сшитых полимерных сорбентов, обладающих большой внутримолекулярной пористостью и способных поглощать в больших количествах ионы высокомолекулярных веществ.

В то же время развитие сорбционных и хроматографических методов разделения и анализа полимеров встретило ряд трудностей, не игравших решающей роли в работах с низкомолекулярными веществами. Прежде всего, существенной помехой здесь явилась малая скорость установления сорбционного равновесия. Если при поглощении низкомолекулярных веществ уменьшение размера зерен сорбента и создания условий обострения границ хроматографических зон позволило успешно бороться с кинетическим размыванием зон веществ в сорбционной колонке, то в случае высокомолекулярных веществ резкие границы хроматографических зон оказываются значительно труднее реализуемыми. Вторым обстоятельством, затруднявшим развитие сорбционных методов в этой области, была сложная зависимость сорбционной емкости от молекулярного веса поглощаемых веществ. Здесь наблюдается и повышение сорбируемости с ростом молекулярного веса в системе полимергомологов сравнительно небольшого молекулярного веса и уменьшение емкости сорбции с ростом молекулярного веса у полимеров значительного молекулярного веса<sup>1-5</sup>. С одной стороны, проявляется обычное возрастание сорбируемости в соответствии с правилом Траубе, а с другой, — уменьшение сорбируемости в связи с тем, что молекулы большого размера не могут проникать в поры сорбента. Последнее явление, правда, удастся в ряде случаев использовать как по-

ложительное — для разделения полимеров по молекулярным весам на основе принципа молекулярных сит.

Зависимость емкости сорбции полимеров от состава растворителя, контактируемого с сорбентом, была изучена для ряда объектов<sup>4, 6, 7</sup>. Так, полистирол сорбируется активированным углем с большей емкостью из сравнительно «плохого» растворителя — метилэтилкетона, чем из более «хорошего» — толуола<sup>7</sup>. Добавление очень «плохого» растворителя — метанола к метилэтилкетону улучшает сорбируемость полистирола<sup>4</sup>. Это явление можно сопоставить с ранее наблюдавшимся Тизелиусом аналогичным влиянием растворимости на емкость сорбции вещества<sup>8</sup>.

Скорость сорбции полимеров существенно зависит от их молекулярного веса. В ряде исследований Юрженко с сотрудниками<sup>9-10</sup> показано, что низкомолекулярные полиизопропилен, полистирол и бутадиевстирольный каучук сорбируются на саже значительно быстрее, чем высокомолекулярные образцы тех же полимеров. При сорбции нефракционированного полимера наблюдается возрастание характеристической вязкости в растворе, окружающем сорбент, что означает избирательное поглощение низкомолекулярной фракции<sup>9, 10</sup>. В результате малой скорости сорбции высокомолекулярной фракции бутадиевстирольного каучука сажей наблюдалось очень интересное явление. Начиная с определенного момента, общая емкость сорбции не менялась, в то время как вязкость раствора падала<sup>11</sup>. Это явление было объяснено замещением низкомолекулярных компонентов на сорбенте высокомолекулярными. Состав растворителя влияет не только на равновесную емкость сорбции, но и на кинетику сорбции. При переходе от «плохих» растворителей к «хорошим» время, необходимое для насыщения сорбента полимером, возрастает<sup>9</sup>.

## II. ЭЛЮЭНТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Наиболее распространенным вариантом хроматографического метода является элюэнтная хроматография, заключающаяся в сорбции смеси веществ в верхней части колонки и вымывании этих компонентов определенным растворителем или раствором. В таком процессе каждый компонент перемещается вдоль колонки, многократно сорбируясь и десорбируясь. При этом скорость перемещения вещества зависит от его сорбируемости — она обратно пропорциональна коэффициенту адсорбции<sup>12</sup>. В результате подобного перемещения компоненты смеси разделяются и выходят из колонки в виде чистых фракций отдельных веществ или смешанных, еще не разделившихся фракций. Если процесс протекает с растворами низкой концентрации, то концентрация в зоне каждого вещества падает прямо пропорционально квадратному корню от времени, а ширина зоны (область, которую занимает каждая зона в колонке) возрастает по тому же закону. При этом степень размывания зон зависит от скорости установления сорбционного равновесия. При малой скорости сорбции, наблюдаемой в случае полимеров, следовало ожидать значительного размывания зон веществ.

Тем не менее, в ряде случаев, начиная с работы Марка и Саито<sup>13</sup>, оказалось возможным осуществить хроматографическое разделение полимеров по молекулярным весам. На колонке с активированным углем, находящимся в смеси с целитом<sup>7</sup> удалось элюировать толуолом низкомолекулярный полистирол ( $M=10^4$ ). Тетралин же элюирует как низкомолекулярную фракцию полистирола, выходящую из колонки в начале процесса, так и высокомолекулярную фракцию ( $M=10^6$ ). Наиболее удачно фракционирование осуществляется при последовательном применении в качестве элюентов ряда смесей толуола и тетралина

с соотношением указанных растворителей 3:1, 1:1 и 1:3 (рис. 1). Наблюдающееся здесь, а также в других исследованиях<sup>14-16</sup> возрастание молекулярного веса по колонке снизу вверх противоречит падению емкости сорбции как функции увеличения молекулярного веса<sup>3, 4</sup>, приведенной в соответствие с теорией хроматографии<sup>12</sup>, согласно которой

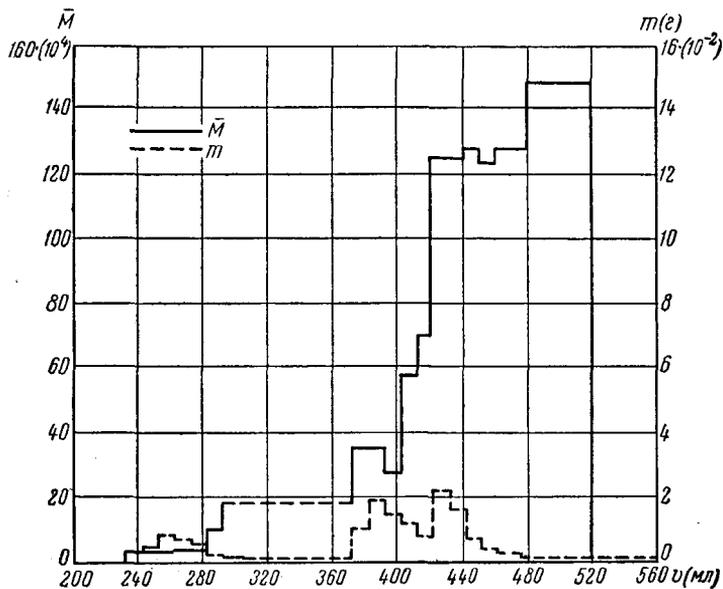


Рис. 1. Хроматографическое фракционирование полистирола на колонке с активированным углем. Элюирующий раствор: смесь толуола и тетралина в соотношении 3:1; 1:1 и 1:3  
 $\bar{M}$  — средний молекулярный вес полимера во фракции;  $m$  — количество полимера во фракции ( $g$ );  $v$  — объем протекшего раствора (мл)

менее сорбирующиеся компоненты движутся по колонке первыми. Эти разноречивые данные могут быть отнесены за счет различных законов сорбции полимеров, а также могут быть объяснены определением сорбируемости в отдельных опытах на различных этапах установления сорбционного равновесия<sup>16</sup> или же, наконец, влиянием дополнительных факторов в хроматографическом процессе, таких как выпадение полимера в колонке в осадок<sup>7</sup>.

Вымывание растворителем различных типов сорбированных полимеров с колонки может привести к их полному разделению. На колонке с активированным углем полностью разделены полихлорвинил и поливинилацетат<sup>17</sup>. При использовании в качестве элюирующего агента изобутилкетона первым появляется на выходе из колонки полихлорвинил и лишь по истечении значительного времени — поливинилацетат.

Иной вариант хроматографического метода — хроматография на бумаге. Для того, чтобы разделить каучуки на основе этого метода, пришлось прибегнуть к специальной обработке фильтровальной хроматографической бумаги 5%-ным раствором метилтрихлорсилоксана в бензоле<sup>18</sup>. Полученная таким образом гидрофобная бумага удерживала в порах бензол вместо обычного растворителя для хроматографии на бумаге — воды. В качестве подвижного растворителя применялся циклогексанон. На подобной хроматограмме разделены каучуки из гвайюллы и синтетический бутадиенстирольный каучук. Последний перемещается с большей скоростью. Этот метод использован также для изучения изменения свойств каучуков при вальцевании. Хроматографи-

ческое фракционирование на бумаге полихлорвинила и поливинилацетата осуществлялось обычным методом без гидрофобизации<sup>17</sup>. Подвижным растворителем здесь служил изобутилкетон. В то время как полихлорвинил движется в этой системе вместе с фронтом растворителя, пятно поливинилацетата неподвижно. Возможно, что решающую роль в этом процессе играет сорбция полимеров на бумаге.

Фракционирование стереоизомеров низкомолекулярных веществ методами хроматографии основано на использовании сорбентов, способных к оптически вращению. Аналогично этому принципу Натта с сотрудниками<sup>19</sup> использовали в качестве сорбентов высокомолекулярный изотактический нерастворимый полипропилен для фракционирования растворимого полипропилена на фракции по степени стереорегулярности. В этих опытах было установлено, что молекулы, обладающие большой стереоспецифичностью и образующие высококристаллические образцы полимеров, прочно связываются с подобным сорбентом. Низкокристаллические компоненты сравнительно легко элюируются изопропиловым эфиром. Исходя из стереоблочного полипропилена с 22% кристалличности, в этих опытах были получены образцы с кристалличностью от 2,5 до 30%. Фракционирование на подобном сорбенте происходит преимущественно по степени стереорегулярности и в меньшей степени по молекулярным весам. Хроматографический процесс удобнее всего проводить в колонке, содержащей силикагель с нанесенным на него высокомолекулярным полипропиленом.

### III. ФРОНТАЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Ввиду затруднений, возникающих при десорбции сорбированных полимеров, Клэссон предложил и разработал фронтальный хроматографический метод анализа молекулярно-вещового распределения полимеров<sup>2</sup>. Фронтальный метод в хроматографии, разработанный тем же автором совместно с Тизелиусом<sup>20-21</sup>, представляет собой процесс непрерывного фильтрования многокомпонентного раствора через столбик сорбента в колонке. Ввиду различной сорбируемости компонентов, каждый из них появляется на выходе из колонки во вполне определенное время, после прохождения через колонку определенного объема раствора. Последняя величина является важной характеристикой, определяющей динамические сорбционные свойства каждого компонента. Отнесенная к колонке, содержащей 1 г сорбента, она называется объемом удерживания. Следует отметить, что эта величина является характеристикой, постоянной для компонента и сорбента при низкой концентрации вещества в исходном растворе.

Скорость движения границы хроматографической зоны вещества в колонке легко может быть рассчитана, исходя из уравнения материального баланса для вещества в колонке<sup>12</sup>.

$$\frac{\partial c}{\partial x} + \alpha \frac{\partial c}{\partial v} + \frac{\partial m}{\partial v} = 0 \quad (1)$$

где  $c$  — концентрация вещества в определенном сечении колонки;  $x$  — расстояние от верхней точки колонки;  $v$  — объем протекшего через колонку раствора;  $\alpha$  — объем пор в колонке высотой 1 см и сечением 1 см<sup>2</sup>;  $m$  — количество поглощенного сорбентом вещества, в определенном сечении колонки, отнесенное к количеству сорбента, заполняющему единицу высоты колонки.

Исходя из уравнения (1), скорость перемещения вдоль колонки точки с постоянной концентрацией вещества определяется уравнением:

$$\left(\frac{\partial x}{\partial v}\right)_c = \frac{1}{\alpha + \frac{\partial m}{\partial c}} \quad (2)$$

если существует определенная изотерма сорбции вещества:

$$m = f(c) \quad (3)$$

Теория хроматографии показывает, что в случае выпуклой от оси концентрации изотермы сорбции (изотерма типа Лэнгмюра или Френдлиха) при фильтровании раствора вещества через колонку образуется резкая граница переднего фронта этого вещества. Иначе говоря, в момент появления на выходе из колонки вещества, его концентрация резко возрастает до концентрации в исходном растворе. Скорость перемещения обостренного переднего фронта, как можно показать, исходя из уравнения (1), определяется уравнением:

$$\left. \frac{\partial x}{\partial v} \right|_{\text{фр.}} = \frac{1}{\alpha + m/c} \quad (4)$$

Все эти соотношения, справедливые для однокомпонентной системы, резко усложняются для растворов, содержащих ряд веществ. При наличии полимергомологов в растворе законы движения компонентов вдоль колонки определяются системой уравнений типа (1):

$$\frac{\partial f_{\omega}}{\partial x} + \alpha \frac{\partial f_{\omega}}{\partial v} + \frac{\partial m_{\omega}}{\partial v} = 0, \quad (5)$$

составленных для всех полимергомологов с молекулярными весами от  $M$  до  $M \pm dM$ , где  $f_{\omega}(M)dM$  — концентрация для каждого полимергомолога. Уравнение изотермы сорбции, согласно Лэнгмюру, для каждого подобного компонента имеет вид:

$$m_{\omega}(M) = \frac{k(M)f_{\omega}(M)}{1 + \int_0^{\infty} l(M)f_{\omega}(M)dM} \quad (6)$$

где  $k$  и  $l$  — константы, зависящие от свойств молекул полимера и сорбента.

В общем виде решение задачи о движении системы полимергомолов по колонке представляется затруднительным. Однако для низких концентраций растворов уравнение изотермы сорбции упрощается и становится линейным:

$$m_{\omega}(M) = k(M)f_{\omega}(M) \quad (7)$$

В соответствии с тем, что количество каждого сорбированного полимергомолога здесь зависит только от его концентрации, появляется возможность, как это было продемонстрировано для ряда аналогичных случаев<sup>12</sup>, решать каждое уравнение материального баланса (5) отдельно. При этом для линейных изотерм адсорбции скорость движения переднего фронта и скорость движения точки с постоянной концентрацией совпадают:

$$\left. \frac{\partial x}{\partial v} \right|_{\text{фр.}} = \left( \frac{\partial x}{\partial v} \right)_c = \frac{1}{\alpha + m_{\omega}(M)/f_{\omega}(M)} \quad (8)$$

Таким образом, все полимергомологи движутся вдоль колонки со скоростью, зависящей только от свойств данной фракции полимеров и свойств сорбента, независимо от их концентрации и общей концентрации полимера в растворе. В этих условиях концентрация каждого компонента в колонке возрастает от нуля до предельной концентрации, равной концентрации этих веществ в исходном растворе.

Таким образом, при прохождении через колонку объема раствора  $v$  все компоненты, для которых удерживаемый объем ( $v_0$ ) меньше  $v$ , оказываются в фильтрате; при этом в каждый данный момент времени на выходе из колонки появляется смесь, содержащая все вышедшие из колонки компоненты с концентрацией, равной их концентрации в исходном растворе. Это означает, что имеет место чрезвычайно простое соотношение между распределением по молекулярным весам в полимере и диаграммой фронтального анализа.

Если рассматривать полимеры, не содержащие низкомолекулярных фракций, то, как было отмечено<sup>2,3</sup>, с ростом молекулярного веса сорбируемость должна падать. Можно рассматривать теорию фракционирования и для веществ с обратной зависимостью емкости сорбции от молекулярного веса. В соответствии с уравнением (8) скорость перемещения фронта, таким образом, должна быть тем больше, чем больше молекулярный вес,  $a$ , следовательно, должна существовать антибатная зависимость между объемом удерживания полимергомолога  $v_0$  и его молекулярным весом:

$$M = \gamma(v_0) \quad (9)$$

Уравнение выходной кривой фронтального процесса может быть определено в виде:

$$\frac{C}{C_0} = \psi(v_0), \quad (10)$$

где  $C$  — концентрация полимера на выходе из колонки;  $C_0$  — концентрация полимера в исходном растворе.

Из соображений, высказанных выше, следует, что  $\psi(v_0)$  представляет собой весовую долю веществ, имеющих молекулярный вес, больший чем  $M$  ( $M$  — однозначно связано с  $v_0$ ). И, следовательно, существует функция:

$$F(M) = 1 - \psi(v_0) = 1 - \frac{C}{C_0}, \quad (11)$$

которая представляет собой весовую долю всех полимергомологов с молекулярным весом, равным или меньшим  $M$ .

Для изучения молекулярно-весового распределения, таким образом, необходимо определить вид фронтальной выходной кривой  $\psi(v_0)$  и нанести на график зависимости  $f_w - v_0$ , где  $f_w = \partial F(M) / \partial v$ . Как уже отмечалось, изложенные соображения справедливы лишь для растворов низкой концентрации, в связи с чем выходные кривые, полученные на опыте, необходимо экстраполировать к нулевой концентрации. По предложению Клэссона, это осуществляется экстраполяцией по прямым линиям, пересекающим выходные кривые в характерных для них точках. По каждой такой прямой экстраполяция отрезков проводится к нулевой концентрации. На этом основании Клэссон получил ряд кривых, характеризующих молекулярно-весовые распределения в полимерах. Три подобного типа кривых для различных образцов полиметилметакрилата приведены на рис. 2. Следует отметить, что зависимость  $f_w - v_0$  является на этих кривых вполне определенной, в то время как зависимость  $v_0 - M$  весьма приближенная, так как цена деления оси абсцисс в характеристиках молекулярных весов должна определяться в независимых опытах на фракционированных образцах (зависимость  $v_0 - M$ ). Тем не менее, полученные кривые, независимо от изучения функции  $v_0 - M$ , дают ценную информацию о наличии максимумов на кривой молекулярно-весовых распределений (ввиду антибатности зависимости  $v_0 - M$ ), а также для сопоставления образцов одного и того

же типа полимеров. По-видимому, более существенным недостатком предположенного метода является равновесный характер закономерностей, вытекающих из теории хроматографии. Малая скорость сорбции

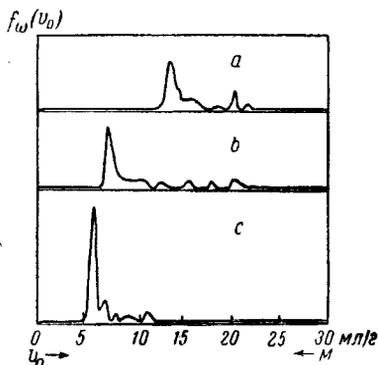


Рис. 2. Исследование распределения по молекулярным весам в полиметилметакрилате методом фронтального сорбционного анализа: *a* — полимер получен с перекисью бензоила; *b* и *c* — коммерческие образцы;  $v_0$  — объем пропущенного раствора (объемы задержки);  $M$  — молекулярный вес;  $f_\omega(v_0)$  — функция распределения по молекулярным весам

высокомолекулярных веществ может существенно исказить сорбционную картину и привести к ошибочной трактовке данных. Малая скорость фильтрации раствора через колонку в подобных опытах совершенно необходима.

#### IV. НОВЫЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Для усиления разделяющей способности хроматографических методов в смесях полимеров были использованы новые приемы, разработанные в последнее время. Один из них — метод подвижного градиента емкости или градиентного элюирования предложен Хартеком, Альмом и Тизелиусом<sup>22–24</sup> и теоретически изучен Жуховицким с сотрудниками<sup>25</sup>. Процесс градиентного элюирования состоит в вымывании веществ из сорбционной колонки раствором непрерывно меняющегося состава. Постепенная замена растворителя или раствора осуществляется таким образом, что сорбционная емкость для каждого вещества в колонке непрерывно падает со временем для каждого сечения колонки. Для описания этого процесса уже недостаточно пользоваться одним лишь уравнением материального баланса (1). Здесь необходимо рассмотреть систему уравнений:

$$-\frac{\partial c}{\partial x} = \alpha \frac{\partial c}{\partial v} + \frac{\partial m}{\partial v}; \quad m = \varphi(c, \rho) \quad (12)$$

где  $\rho$  — параметр, определяющий емкость сорбции для определенной концентрации веществ при перемене состава раствора.

Решение системы этих уравнений приводит к выводу, что зона каждого компонента должна сжиматься в очень узкую полосу. Таким образом, введение метода подвижного градиента емкости в элютивную хроматографию позволяет резко улучшить условия разделения веществ.

На этом принципе Вильямс осуществил разделение двух фракций нейлона с молекулярным весом 150 000 и 350 000 на колонке из целита<sup>26</sup>. Градиентное элюирование проводилось при помощи непрерывно возрастающего по концентрации раствора муравьиной кислоты. Первой элюировалась низкомолекулярная фракция (в процессе хроматографии, впрочем, имел место гидролиз полимера). Еще более успешной оказалась работа того же автора по фракционированию полисилоксанов на активированном угле с использованием того же принципа<sup>27</sup>. Полиметилсилоксан в этих опытах был разделен на ряд фракций, среди которых первые, выпадающие из колонки, содержали низкомолекулярные компоненты. Непрерывное возрастание молекулярных весов силоксана в процессе хроматографического разделения наблюдалось

при использовании системы растворителей с увеличивающейся растворяющей способностью (метиловый спирт — этиловый спирт — этиловый эфир).

Для того, чтобы равновесный и кинетический факторы при сорбции полимеров действовали в одном направлении, Мулд и Синж<sup>28</sup> предложили метод электрокинетической ультрафильтрации, идея которого заключается в перемещении смеси полимерных веществ в блоке пористой структуры, например, под действием электроосмоса. В этих условиях и равновесные и кинетические факторы вызывают преимущественное перемещение низкомолекулярных фракций. Этим способом разделены по молекулярным весам полисахариды на коллоидной мембране.

Значительные успехи в области фракционирования полимеров были достигнуты благодаря применению нового хроматографического метода — осадочной хроматографии, ранее разработанного применительно к низкомолекулярным веществам<sup>29</sup>. Использование этого метода для разделения полимергомологов основано на хорошо известном примере фракционирования полимеров по принципу осаждения добавлением к раствору «плохого» и «хорошего» растворителей. Успешная реализация фракционирования полимеров путем осаждения и растворения в виде колоночного хроматографического процесса является заслугой Вильямса и ряда других исследователей<sup>26, 30–33</sup>. Процесс сводится к перемещению вдоль колонки, заполненной измельченным материалом, раствора полимера, который следует из верхнего — более теплого слоя сорбента к нижнему, — более холодному. В процессе подобного перемещения насыщенный раствор, находящийся в равновесии с осадком в верхней части колонки, попадает в ниже расположенный, более холодный слой. В случае положительного температурного коэффициента растворимости при этом происходит выпадение осадка. Подобное перемещение вещества вдоль колонки является аналогией обычного сорбционного хроматографического процесса с той лишь разницей, что вместо многократных актов сорбции — десорбции здесь идут процессы выпадения и растворения вещества. Если процесс протекает без изменений состава растворителя, а температура падает линейно с длиной колонки, то уравнение материального баланса для каждого сечения колонки может быть записано в виде:

$$-\frac{dc}{dx} = \left(\frac{\partial m}{\partial v}\right)_x \quad K \frac{dt}{dt} = \left(\frac{\partial m}{\partial v}\right)_x \quad (13)$$

где  $t$  — температура,  $K$  — константа, определяющая градиент температуры вдоль колонки,  $m$  — количество вещества в осадке, а остальные величины те же, что и в уравнении (1). Исходя из уравнения (13), получаем:

$$\left(\frac{\partial x}{\partial v}\right)_m = -K \frac{dc/dt}{(dm/dt)_v} \quad (14)$$

Таким образом, скорость перемещения зоны определяется температурным коэффициентом растворимости и характером распределения вещества вдоль колонки.

В реальных, уже осуществленных процессах фракционирования по методу осадочной хроматографии, помимо градиента температуры применяется еще и градиентное элюирование на основе введения в колонку раствора переменного состава, начиная от «плохого» растворителя с постепенным введением «хорошего». Хроматографическая установка, действующая на таком принципе, представлена на рис. 3. Колонка здесь заполняется взвесью стеклянного порошка в «плохом» растворителе. Основная часть колонки  $A$  помещается в алюминиевый кожух  $B$ , верхняя часть которого нагревается при помощи нагревателя  $C$ , в то время как нижняя охлаждается водой (холодильник  $D$ ). Таким образом процесс

протекает в условиях постоянного градиента температуры в колонке. Элюирующая смесь переменного состава поступает в верхнюю часть колонки из смесителя *E*, заполненного в начальный период «плохим» растворителем. Поступающий в смеситель «хороший» растворитель непрерывно меняет состав растворителя, поступающего в колонку.

Результаты фракционирования образца полистирола с молекулярным весом 108 000 по описанному здесь методу представлены на рис. 4.

В качестве растворителей использовались этиловый спирт и метилэтилкетон. Приведенные вдоль кривой численные значения вяз-

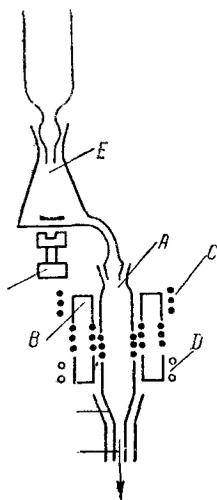


Рис. 3. Установка для фракционирования полимеров методом осадочной хроматографии

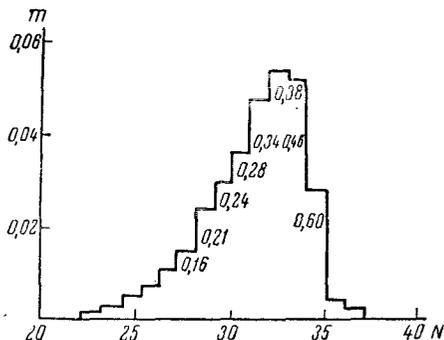


Рис. 4. Фракционирование полистирола методом осадочной хроматографии  
*N* — номер фракции; *m* — количество вещества во фракции. Числа на графике — удельная вязкость по фракциям (в 0,5%-ном растворе в толуоле)

кости полимера по фракциям показывают, что молекулярный вес полистирола непрерывно возрастает по мере выхода раствора из колонки.

Метод осадочной хроматографии позволяет разделять по молекулярным весам весьма узкие фракции полимергомологов<sup>33</sup>, что демонстрирует его большую перспективность.

## V. ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТЫ

Преимущество ионообменных методов сорбции полимеров перед сорбционными, основанными на ван-дер-ваальсовом взаимодействии между сорбентом и сорбатом, состоит, с одной стороны, в существовании большого числа синтезированных ионообменных смол, обладающих самыми разнообразными свойствами, а с другой, определяется возможностью заранее предопределять сорбционную способность полиэлектролитов, связанную с образованием электровалентной связи между определенными группами полимеров и определенными группами сорбентов. Синтез ионообменных смол, обладающих значительной внутримолекулярной пористостью, позволил создать сорбенты, поглощающие большие количества полиэлектролитов. Для того чтобы получать подобные сорбирующие материалы, их синтез осуществляется с очень малыми количествами сшивающего агента, например дивинилбензола, являющегося наиболее распространенным веществом для связывания линейных полимерных молекул в трехмерные структуры. Варьируя степень сшитости ионита, можно создавать сорбенты, способные поглощать ионы малых размеров и не способные поглощать, ионы больших размеров. На этом принципе — принципе «молекулярных» или «ионитовых» сит удается разделить по молекулярным весам различные ионизированные

вещества. Наиболее простая задача здесь — отделение полиэлектролитов от низкомолекулярных ионов. Например, на амберлите IR-4В прекрасно сорбируется галактуроновая кислота, но не сорбируется полигалактуроновая<sup>34</sup>. Подобными же свойствами обладают полиманнуроновая (альгиновая) кислота и ее мономер. Продукты энзиматического гидролиза полигалактуроновой кислоты обладают тем большей способностью поглощаться амберлитом IR-4В, чем глубже проходит гидролиз. На том же сорбенте аналогичные закономерности были продемонстрированы и по отношению к фосфорной и полиметафосфорным кислотам. Столь определенные зависимости, полученные для системы мономер — полимер, оказываются значительно менее выраженными в случае полимергомологов — линейных полиэлектролитов (полисульфостирола<sup>35</sup>), хотя и здесь на системе колонн было осуществлено их фракционирование.

Новый принцип разделения ионизированных и не ионизированных веществ — ионное исключение<sup>36</sup>, основанный на преимущественной способности неионизированных веществ по сравнению с ионизированными проникать в зерна набухшего ионита был использован для разделения слабых и сильных полиэлектролитов<sup>37</sup>. По этому принципу в сульфитных щелоках разделены лигносульфонные и слабые поликислоты. Дополнительное применение метода молекулярных сит позволило к тому же фракционировать эту систему на низкомолекулярные и высокомолекулярные полиэлектролиты.

## VI СОРБЦИЯ БЕЛКОВ ИОНООБМЕННЫМИ СМОЛАМИ

Среди растворимых полиэлектролитов особое место занимают биологически активные полимеры — белки и нуклеиновые кислоты. В течение уже длительного времени сорбционные методы с успехом применяются для очистки и разделения этих классов соединений, особенно белков и ферментов. Многочисленные работы, выполненные в этой области, весьма подробно изложены в ряде статей и книг, особенно в обзорах Цитгла<sup>38</sup>, Мура и Штейна<sup>39</sup>. В первой из этих статей приведены результаты исследования статистики и динамики сорбции белков как на минеральных, так и на органических сорбентах. Во второй — детально изложены работы в области колоночной хроматографии. Наконец, применению хроматографических методов к разделению и анализу белков и нуклеиновых кислот посвящена обзорная статья Собера и Петерсона<sup>40</sup>. Считая излишним дублировать описание работ в указанных областях и принимая во внимание, что полученные в течение последних двух лет дополнительные результаты укладываются в ту же систему исследований, мы отсылаем читателей к указанным обзорам. В то же время работы последних лет в области механизма и законов сорбции белков ионообменными смолами не представлены в этих статьях, что вызывает необходимость их изложения.

Сорбция белков ионообменными смолами определяется двумя основными факторами, первым из которых является размер поглощенных ионов, а вторым — одновременное существование разнородных типов межмолекулярного взаимодействия, например кулоновского притяжения и отталкивания в результате одновременного существования положительных и отрицательных зарядов в белках.

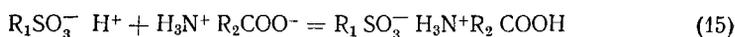
Принцип молекулярных сит в применении к белкам позволяет разделять высокомолекулярные и низкомолекулярные белки. На ионообменных сульфосмолах с коэффициентом набухания около четырех можно сорбировать с большой емкостью инсулин, белок с молекулярным весом 12 000<sup>41</sup>. В этих же условиях белки сыворотки крови поглощаются с очень небольшой емкостью. Синтез более сшитых (менее набухаю-

щих) сульфосмол открывает возможность для сорбционного разделения полипептидов и белков, а также олигополипептидов различного молекулярного веса<sup>42</sup>.

Фракционирование белков на сульфосмолах в водородной форме по принципу молекулярных сит должно осуществляться при 2—5° во избежание каталитического гидролиза пептидной связи. Денатурационные явления здесь, как правило, отсутствуют — десорбированный инсулин, например, сохраняет свою биологическую активность. Изготовление сульфосмол с коэффициентами набухания 6—12 привело к созданию сорбентов, поглощающих альбумин и глобулин сыворотки крови уже в заметных количествах, достигающих 10—20 мг/г.

Однако установление сорбционного равновесия на смолах обычного зернения здесь достигается очень медленно — в течение ряда дней и даже недель. Существенное увеличение емкости сорбции белков сульфокатионитами и резкое сокращение времени установления равновесия достигается при значительном измельчении сорбентов — до диаметра менее 0,05 мм<sup>43</sup>. Значительная группа белков поглощается в этих условиях граммом сорбента в количестве, превышающем 100 мг/г. Сопоставление сорбируемости различных белков, а также влияние среды на сорбционные характеристики не могут быть описаны при помощи обычного ионообменного механизма. В то же время разработка теории сорбции диполярных ионов — аминокислот<sup>44</sup> позволила дать объяснение многочисленным неожиданным экспериментальным фактам, наблюдающимся при сорбции белков, с единой точки зрения.

Аминокислоты и низкомолекулярные пептиды проявляют ряд сорбционных свойств, существование которых в случае поглощения ионов, несущих один или несколько одноименных зарядов, полностью исключено. Так, например, диполярные ионы (аминокислоты) поглощаются сульфосмолами в водородной форме с емкостью, превышающей примерно в сто раз их сорбируемость теми же смолами в солевой форме. Ввиду того, что константа обмена ионов водорода с ионами натрия на сульфосмолах близка к единице, подобное явление сорбции, наблюдаемое у аминокислот, не может быть причислено к явлению ионного обмена. Этот, а также большое количество других фактов позволили рассматривать сорбцию диполярных ионов — аминокислот по следующему механизму:



Поглощаемые диполярные ионы на сульфокатионитах в водородной форме превращаются, следовательно, в катионы. При наличии нейтрального раствора вокруг сорбента это может быть объяснено лишь как большой сорбционный эффект, вызывающий резкое изменение свойств сорбируемого иона. Процесс десорбции аминокислот растворами минеральных кислот представляет собой обычный процесс ионного обмена, так как в сорбированном состоянии и в растворе аминокислота находится при такой постановке опыта в виде катионов. Сорбция аминокислоты на сульфокатионите в солевой (например натриевой) форме не может протекать по уравнению (15). Следовательно, на солевой форме смол в сорбированном состоянии должен находиться не катион аминокислоты, а цвиттерион (диполярный ион). В соответствии с этим емкость сорбции низкомолекулярных цвиттерионов сульфосмолами оказывается ничтожно малой — здесь проявляется, наряду с электростатическим притяжением, отталкивание в результате наличия одноименных зарядов на сорбенте и сорбате.

Емкость сорбции цвиттерионов на сульфокатионитах в солевой форме может быть существенно увеличена, если тем или иным способом уменьшить эффективность отталкивающего действия отрицательного

заряда карбоксильной группы. С этой целью можно либо уменьшить степень ионизации карбоксильных групп при переходе от водных к водно-ацетоновым растворам, либо увеличить ионную силу раствора и создать экранирующую сферу вокруг ионизированной группировки, либо, наконец, увеличить расстояние между аминными и карбоксильными группировками при переходе от аминокислот к полипептидам<sup>44</sup>. В последнем случае сорбированный ион без труда может быть ориентирован таким образом на сорбенте, чтобы эффект отталкивания был уменьшен. Все изложенные соображения позволяют оценить сорбционные емкости белков на солевых и водородных формах сульфосмол как следствия расстояния между аминными и карбоксильными группами сорбированных белков. Цвиттерионы с близко расположенными группами разнозарядного типа ( $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$ ) должны сорбироваться преимущественно на смолах в водородной форме и не сорбироваться или сорбироваться с малой емкостью на смолах в солевой (натриевой) форме.

При наличии далеко расположенных группировок (или при подавляющем количестве положительных зарядов) сорбция белков должна протекать как на солевой, так и на водородной форме смол. Приведенные в таблице данные показывают, что белки могут быть отнесены как к первому, так и ко второму классу веществ<sup>43</sup>.

Следует полагать, что биологически активные белки должны относиться преимущественно ко второму классу веществ, сорбирующихся на солевых формах смол. Действительно, кулоновское притяжение при взаимодействии с другими белковыми молекулами при малой ионной силе раствора может быть только у подобных белков. Если же одна из взаимодействующих белковых молекул обладает близко расположенными группами, несущими положительный и отрицательный заряд, то взаимное притяжение возможно лишь при вполне определенной топографии функциональных групп у второй макромолекулы.

Сорбция белков ионообменными сульфосмолами в солевой форме может быть существенно усилена при повышении ионной силы раствора (рис. 5). Тем не менее, в этих условиях емкость сорбции белков мала.

Другой способ повышения сорбируемости белков на Na-сульфосмоле состоит в применении водно-ацетоновых растворов<sup>43</sup>.

Карбоксильные катиониты сорбируют белки в соответствии с несколькими иными закономерностями. Как цвиттерионы многие из них не сорбируются на солевых формах карбоксильных катионитов<sup>45</sup>, и большинство сорбируется с малой емкостью. В то же время белки могут быть сорбированы в больших количествах особыми типами Н-карбок-

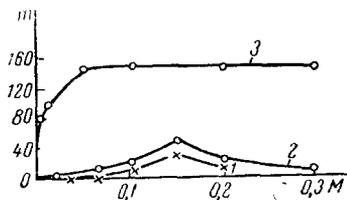


Рис. 5. Сорбция белков сульфосмолей СБС в натриевой форме из растворов, содержащих NaCl

$m$  — количество сорбированного белка в мг/г смолы;  $M$  — молярная концентрация NaCl.  
1 — сывороточный альбумин;  
2 —  $\gamma$ -глобулин; 3 — инсулин.

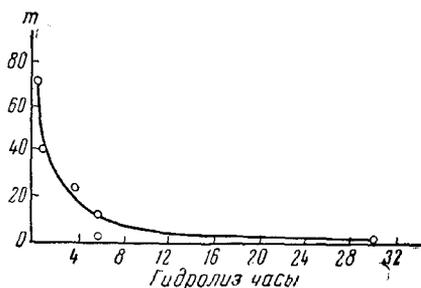


Рис. 6. Зависимость емкости сорбции продуктов гидролиза сывороточного глобулина от степени гидролиза  
 $m$  — емкость сорбции, выраженная в мг-экв по азоту поглощенных продуктов гидролиза  
(карбоксильный катионит КМТ в Н-форме)

## Емкость сорбции белков сульфокатионита СБС

Белок	Емкость сорбции белка в мг/г		Белок	Емкость сорбции белка в мг/г	
	Н-форма смолы	На-форма смолы		Н-форма смолы	На-форма смолы
γ-Глобулин	171	0	Адренокортикотропный		
Сывороточный альбумин	145	0	гормон	117	63
Овальбумин	96	0	Многен	47	26
Инсулин	125	30	Химотрипептоген	90	105

сильных смол, способными сильно набухать, будучи в водородной форме. Таким катионитом оказалась смола КМТ, синтезированная с малым количеством сшивающего агента. Однако в этом явлении обнаружились дополнительные осложнения, не наблюдавшиеся при сорбции белков сульфосмолами. Так, было показано, что аминокислоты не сорбируются той же смолой КМТ в водородной форме, которая сорбирует белки. По мере гидролиза белков (рис. 6) емкость сорбции полученных полипептидов уменьшается. Здесь проявляется обратная закономерность по сравнению с явлением молекулярных сит — с ростом молекулярного веса полипептидов емкость сорбции не уменьшается, а растет. Есть основания полагать, что это связано с образованием водородных связей между пептидными группами полипептидов и функциональными группами сорбента<sup>45</sup>.

## ЛИТЕРАТУРА

1. J. Claesson, S. Claesson, Arkiv Kemi Min. Geol. **19a**, № 5 (1944).
2. S. Claesson, там же. **26**, № 24 (1949).
3. S. Claesson, Discuss. Faraday Soc., **7**, 321 (1949).
4. J. E. Hobden, H. H. G. Jellinek, J. Polym. Soc., **11**, 365 (1953).
5. H. L. Frisch, M. J. Hellman, J. S. Lundberg, **38**, 441 (1959).
6. J. M. Kolthoff, R. G. Gutmacher, A. Kahn, J. phys. chem., **55**, 1240 (1951).
7. Si Yung Yen, H. L. Frisch, J. Polym. Sci., **27**, 149 (1958).
8. A. Tiselius, Arkiv Kemi. Min. Geol., **26**, № 1, 1 (1948).
9. А. И. Юрженко, И. И. Малеев, ДАН, **103**, 1057 (1955).
10. А. И. Юрженко, И. И. Малеев, J. polym. Sci., **31**, 304 (1958).
11. J. M. Kolthoff, R. G. Gutmacher, J. phys. Chem., **56**, 740 (1952).
12. С. Е. Бреслер, Г. В. Самсонов, Усп. химии, **24**, 935 (1955).
13. Mark Saifu, Monatsh., **68**, 229 (1936).
14. G. Cajell Rubber chem. and Techn., **12**, 762 (1939).
15. J. Landler, C. r., **225**, 234 (1947).
16. H. L. Frisch, M. J. Hellman, J. L. Landberg, J. polym. Sci., **38**, 441 (1959).
17. N. J. Longford, D. J. Vagghan, Nature, **184**, 116 (1959).
18. Th. F. Vanigan, Science, **117**, 249 (1953).
19. G. Natta, M. Pegoraro, M. Peraldo, Ricerca Scientifica, **28**, 1473 (1958).
20. A. Tiselius, Arkiv Kemi. Min. Geol., **B14**, № 32 (1941); **A16**, № 18 (1943).
21. С. Клессон, Сб. Хроматография, ИЛ, 1949, стр. 53.
22. P. Harteck, K. Suhr, Angew. chem., **56**, 120 (1943).
23. R. S. Alm, R. J. P. Williams, A. Tiselius, Acta chem. scand., **6**, 826 (1952).
24. R. S. Alm, там же. **6**, 1186 (1952).
25. А. А. Жуховицкий и другие, ДАН, **77**, 435 (1951); **88**, 859 (1953); **92**, 987 (1953); **94**, 77 (1954).
26. R. J. P. Williams, Analyst., **77**, 905 (1952).
27. D. W. Bannister, C. I. G. Phillips, R. J. P. Williams, R. J. P. Williams, Analyst. Chem., **26**, 1451 (1954).
28. D. I. Mould, R. L. M. Syuge, Analyst., **77**, 964 (1952).
29. Т. Б. Гапон и Ф. Н. Гапон, ДАН **60**, 401 (1948).
30. C. A. Baker, R. J. P. Williams, J. Chem. Soc., **1956**, 2352.
31. S. R. Caplan, J. polym. Sci., **35**, 409 (1959).
32. N. Schneider, L. Holmes, C. Misal, J. Leonti, **37**, 551 (1959).
33. N. Schneider, L. Holmes, там же. **38**, 552 (1959).
34. H. Deul, J. Solmes, L. Auvas-Weisz, Helv. chim. Acta, **33**, 2171 (1950).
35. N. Hartler, Acta chem. Scand., **11**, 1162 (1957).
36. Р. Уитон, В. Бауман, Ионообменные смолы в медицине и биологии, **1956**, стр. 130.

37. N. Hartler, *Acta chem. scand.*, **11**, 1169 (1957).
38. Ch. A. Zittle, *Adv. in enzymology*, **14**, 319 (1953).
39. S. Moore, N. H. Stein, *Adv. in protein chem.*, **11**, 191 (1956).
40. H. A. Sober, E. A. Peterson, *Jou. Exchange in organic and biochemistry*. Ed. C. Calmon, T. R. E. Kressman, N. Y., 1957, стр. 318.
41. Г. В. Самсонов, М. Д. Фаддеева, *Биохимия*, **21**, 403 (1956).
42. K. Narita, S. Fujiwara, Sh. Murasawa, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **31**, 38 (1958).
43. Г. В. Самсонов, Р. Б. Пономарева, *Биохимия*, **24**, 63 (1959).
44. Г. В. Самсонов, И. П. Кузнецова, *ДАН*, **115**, 351 (1957).
45. Г. В. Самсонов, Ю. Б. Болтакс, И. П. Кузнецова, А. П. Башкович, Р. Б. Пономарева, *Колл. журн.*, **21**, 471 (1959).
46. Г. В. Самсонов, В. В. Веденеева, А. А. Селезнева, *ДАН*, **125**, 591 (1959).

Ин-т высокомолекулярных соединений  
АН СССР

---