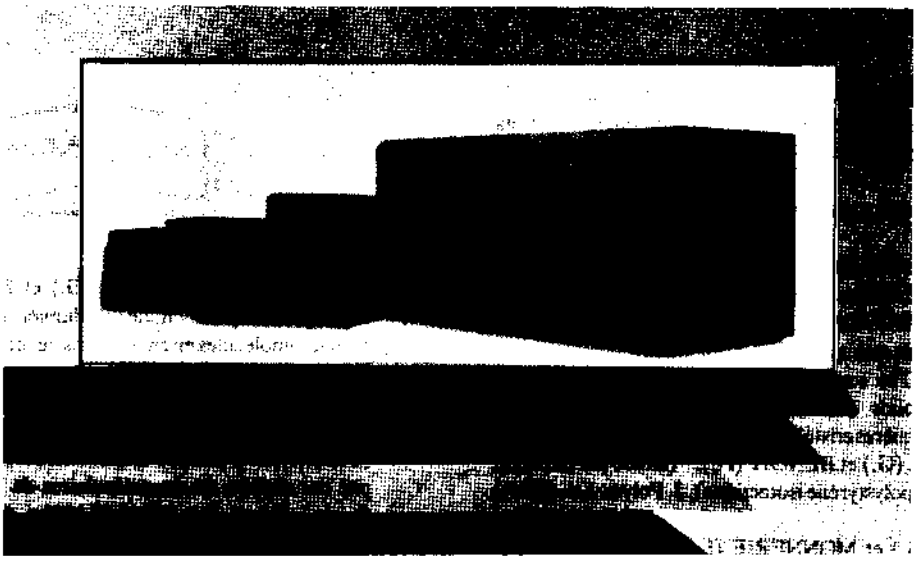


کروماتوگرافی ژل تراوایی

(Gel Permeation Chromatography)

از: مرکز تحقیقات مهندسی جهاد سازندگی

واژه‌های کلیدی:
اندازهٔ مولکولی، ژل تراوایی، زمان بازداری، حجم بازداری، آشکارساز

چکیده: ابتدا کروماتوگرافی به‌مفهوم عام و سپس کروماتوگرافی بر اساس اندازهٔ مولکولی (SEC) معرفی می‌گردد. مکانیسم جداسازی در ارتباط با پرکننده‌های ستون تشریح می‌گردد. همچنین حلال‌های شوینده مورد استفاده با پلیمرهای گوناگون ارائه می‌شوند. در ادامه به آشکارسازها اشاره می‌گردد و بالاخره کاربردهای کروماتوگرافی ژل تراوایی در ارتباط با جرمهای مولکولی کم و جرم مولکولی بالا و آنالیز توزیع اندازهٔ مولکولی و نحوهٔ عمل با پلیمرها مورد بحث قرار می‌گیرد.

مقدمه

ابتدا لازم است که شرح مختصری راجع به کروماتوگرافی مایع داده شود. کروماتوگرافی مایع یکی از انواع کروماتوگرافی است که به طور وسیعی در روشهای تجزیه‌ای بکار می‌رود. اعمال کروماتوگرافی به طور کلی می‌تواند به صورت زیر توصیف شود.

کروماتوگرافی اساساً یک روش فیزیکی جداسازی است و اجزایی که می‌باید جداسازی شوند بین دو فاز پخش می‌گردند. یکی از فازها ساکن و دیگری که از میان آن می‌گذرد فاز متحرک است. بسرهم کنشهای کروماتوگرافی که روی می‌دهد نتیجه یک سری اعمال جذب و دفع (سطحی) مکرر است که در طی انتقال اجزای نمونه ازروی فاز ساکن انجام می‌گیرد و جداسازی آنها مربوط به اختلاف ضریب تقسیم (توزیع) هر یک از اجزاء نمونه است. راههای زیادی برای تقسیم‌بندی کروماتوگرافی ستونی مایع وجود دارد. اگر این تقسیم‌بندی براساس نوع فاز ساکن و نحوه عمل جداسازی انجام شود، چهار شکل می‌توان منظور داشت:

۱ ــ کروماتوگرافی جذب‌سطحی *(Adsorption Chromatography)* فاز ساکن یک جاذب است و عمل جداسازی براساس مراحل جذب و دفع مکرر انجام می‌گیرد.

۲ ــ کروماتوگرافی تقسیمی*(Partition Chromatography)* عمل جداسازی به جذب بستگی ندارد، بلکه بیشتر به توزیع نمونه بین فاز ساکن و متحرک وابسته است و این نوع خود به دو قسمت فاز نرمال *(normal phase)* و فاز معکوس *(reverse Phase)* تقسیم می‌شود.

۳ ــ کروماتوگرافی تعویض یونی *(Ion-exchange Chromatography)*: فاز ساکن دارای سطحی از باریونی است که مخالف بار نمونه می‌باشد. این تکنیک تقریباً به طور انحصاری برای نمونه‌های

Key Words:
Molecular size, Gel permeation, Retention Time, Retention Volume, Detector

قابل یونش یا یونی به کار می‌رود.

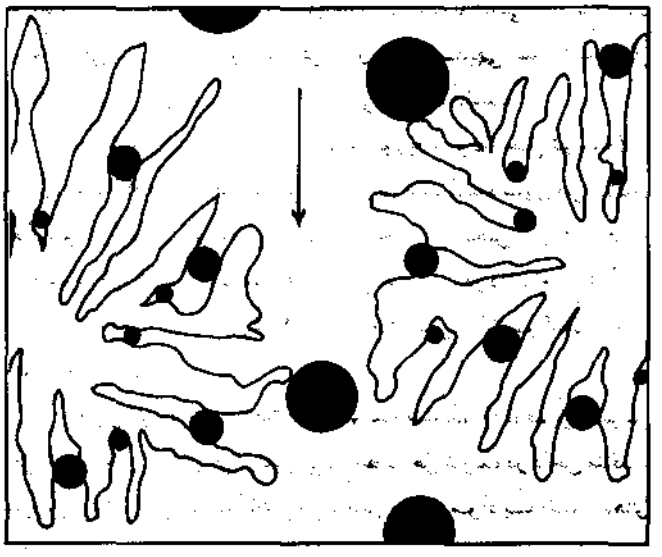
۴ ــ کروماتوگرافی براساس اندازه مولکولی، *(Size Exclusion Chromatography) SEC*: در این نوع کروماتوگرافی، ستون با موادی که خلل و فرج دقیقاً کنترل شده‌ای دارند پر می‌شود و نمونه به آسانی برطبق اختلاف در اندازه مولکولی غربال شده از ستون خارج می‌گردد.

از آنجا که بحث این مقاله در زمینه نوع چهارم کروماتوگرافی (*SEC*) است، لذا توضیحات را روی این بخش از کروماتوگرافی متمرکز می‌کنیم. در این نوع کروماتوگرافی اجزای یک نمونه براساس اندازه مولکولی شان از هم تفکیک می‌شوند. این تکنیک نشأت گرفته از جداسازی مواد زیست‌شناختی توسط فاز ساکن ژل مانندی بوده که شامل اتصالات سه بعدی دکستران با اپی کلروهیدرین است و در این حالت به آن کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (*GFC*) گفته می‌شود. یک جهش بزرگ در مسیر تکاملی این تکنیک، توسعه آن در جداسازی پلیمرهای محلول در حلالهای آلی بوده که توسط فاز ساکن از نوع پلی استیرن انجام می‌گرفته است. این روش را کروماتوگرافی ژل تراوایی می‌نامند (*GPC*). از آنجا که اساس این دو نوع تکنیک مشابه هم می‌باشند لذا آنها را زیر عنوان *SEC* نامگذاری می‌کنند که بحث اصلی این مقاله روی تکنیک *GPC* تمرکز یافته است.

دستگاه *GPC* در اصل شامل یک پمپ دقیق است که فاز متحرک (حلال) را با سرعت جریان ثابت و مشخصی از روی فاز ساکن (ستون) عبور می‌دهد. نمونه، بر سر راه فاز متحرک و قبل از ستون به دستگاه تزریق می‌شود و بعد از جداسازی در داخل ستون، وارد آشکار ساز می‌گردد. آن گاه توسط یک کامپیوتر، اطلاعات کمی و کیفی موردنظر به همراه کروماتوگرام روی تلویزیون آشکار می‌شود یا توسط ثبات روی کاغذ رسم می‌گردد. در زیر طرح کلی یک دستگاه *GPC* نشان داده شده است.

مکانیسم جداسازی در GPC

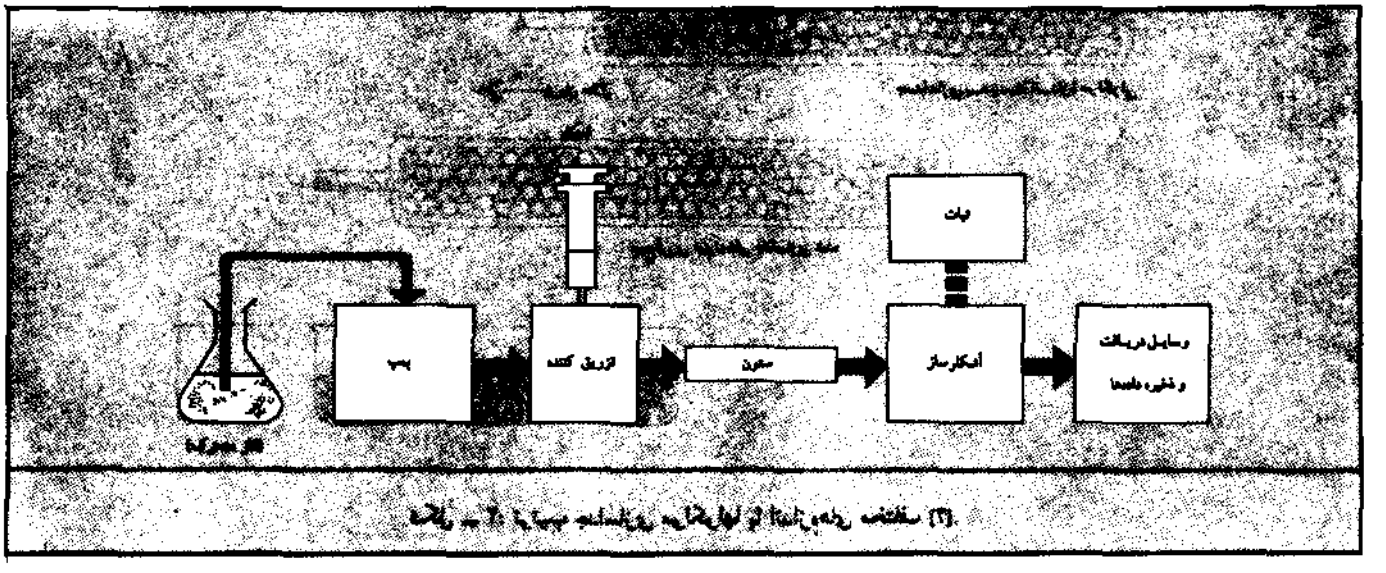
پرکننده‌های ستون در *GPC*، که فاز ساکن را تشکیل می‌دهند از بعضی جهات شبیه یک الک (غربال) مولکولی عمل می‌کنند. بدین ترتیب که مولکولهای کوچکتر از اندازهٔ منافذ پرکننده‌ها، وارد آنها می‌شود در حالی که مولکولهای با اندازه‌های بزرگتر از قطر منافذ، دفع می‌گردند. بدین ترتیب مولکولهای بزرگتر سریعتر از ستون خارج می‌شوند، در صورتی که مولکولهای کوچکتر مرتب در داخل و خارج حفره‌ها پخش و در نتیجه دیرتر از ستون خارج می‌گردند. شکل ــ ۱ این عمل را به طور شمایی نشان می‌دهد.



شکل ــ ۱: یک نمایش از برهم کنش بین مولکولهای پلیمر و ذرات فاز ساکن

این شکل نشان دهنده برهم کنش بین مولکولهای پلیمر و ذرات فاز ساکن است. ملاحظه می‌شود که چگونه مولکولهای کوچک به آسانی در داخل منافذ فاز ساکن نفوذ می‌کنند و در حالی که فاز متحرک (حلالها) از

«طرح کلی دستگاه GPC»



درون پرکننده‌های ستون عبور می‌کند مولکولهای کوچکتر نسبت به مولکولهای بزرگتر در منافذ بیشتری نفوذ می‌کنند لذا زمان بیشتری طول می‌کشد تا مولکولهای کوچکتر از ستون خارج شوند.

مولکولهای با اندازه‌های مختلف با سرعتهای متفاوتی از ستون شسته می‌شوند. ستون مواد با وزن مولکولی کم را بیشتر از مواد با وزن مولکولی زیاد، در خود نگه می‌دارد.

لذا در کروماتوگرام مولکولهای بزرگتر، پیکهای ابتدایی و مولکولهای کوچکتر، پیک‌های نهایی را با زمان بازداری (*Retention time*) بیشتر تشکیل می‌دهند (شکل ــ ۲). از آنجا که اندازه یک مولکول به جرم مولکولی آن مربوط می‌شود، لذا زمان بازداری یک پیک می‌تواند با تقریب نسبتاً خوبی نشان دهنده جرم مولکولی آن باشد. بدیهی است که شکل مولکول (خطی، کروی و...) نیز تاثیراتی خواهد داشت.

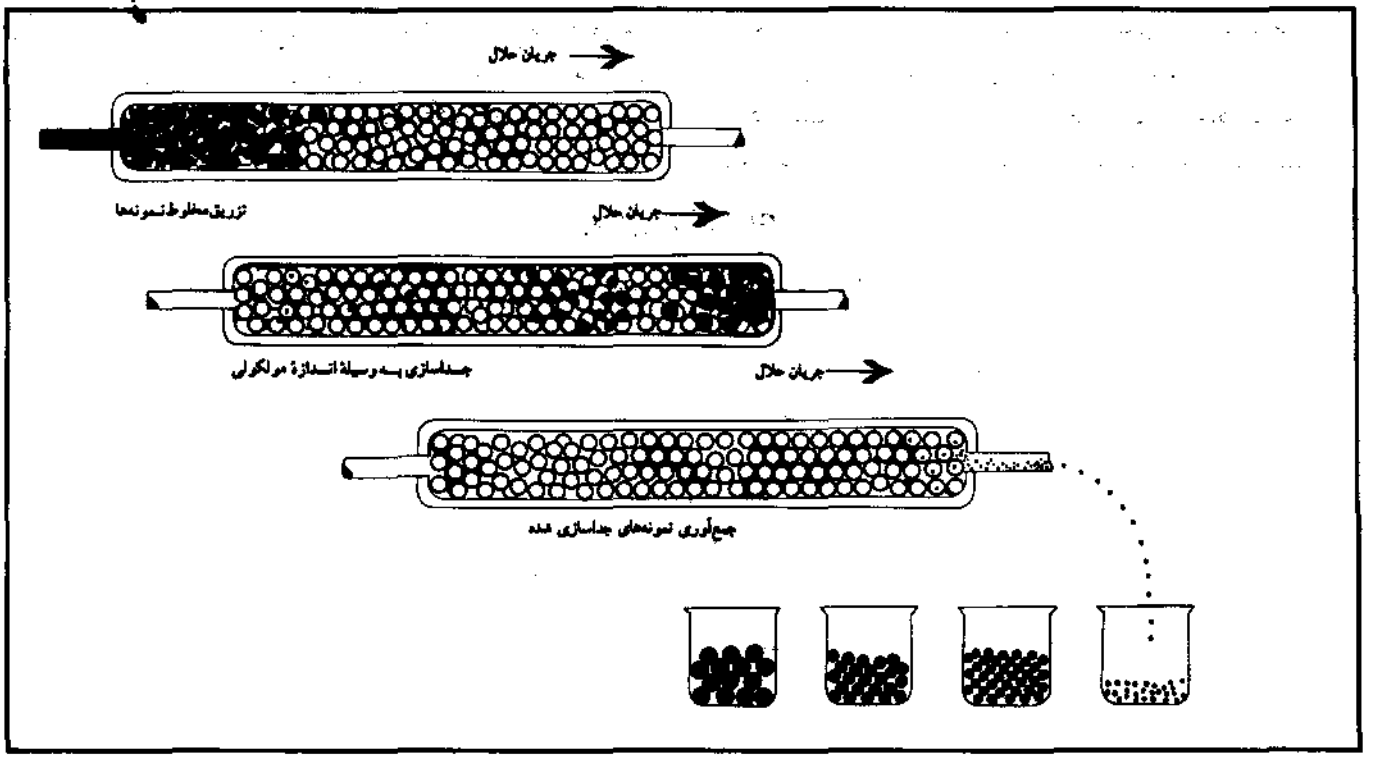
جداسازی در *GPC* نتیجهٔ اختلاف توزیع نمونه (حل شونده) در حلالی است که در فضاهای داخل و خارج منافذ پرکننده ستون می‌باشد. چگونگی توزیع حل شونده می‌تواند به وسیله ضریب پخش، K_{GPC} توضیح داده شود. K_{GPC} نسبت متوسط غلظت حل شونده را در داخل منافذ فاز ساکن به غلظت آن در داخل شکافها (فضاهای بین ذرات پرکننده ستون) نمایان می‌سازد.

بدلیل اثر (*Size-exclusion*) حجم تمام منافذ، (V_i)، قابل دسترس حل شونده‌های بزرگتر قرار نمی‌گیرد. غلظت حل شونده در داخل منافذ با افزایش اندازه حل شونده کاهش می‌یابد در نتیجه مواد با اندازه‌های مختلف برای خروج از ستون به همه حجم مایع (مایع داخل منافذ و شکافها) احتیاج ندارند ولی با کوچکتر شدن اندازه ذرات لزوم استفاده از مقدار بیشتری از حجم مایع برای خروج این ذرات از ستون ضرورت می‌یابد. همه حجم مایع برابر $V_0 + V_i$ می‌باشد که V_0 حجم فضای بین ذرات است. بنابراین حجم قابل دسترس هر نمونه به صورت $V_0 + K_{GPC} \times V_i$ اصلاح می‌شود. در نتیجه حجم بازداری برای هر پیک با استفاده از $V_R = V_0 + K_{GPC} \times V_i$ بدست می‌آید. معمولاً در *GPC* به علت ثابت بودن سرعت جریان فاز متحرک، به جای حجم بازداری از زمان بازداری (*RT*) برای تعیین اندازه مولکولی ذرات استفاده می‌کنند.

پرکننده‌های ستون

پرکننده‌های جدیدی که در کروماتوگرافی ژل مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل ژل‌های پلیمری سختی می‌باشند که منافذ معینی و کنترل شده‌ای دارند. معمولاً برای راحتی کار از حدود جرم مولکولی‌ای که پرکننده‌ها می‌توانند مورد تجزیه قرار دهند به جای اندازه حفره‌های آنها استفاده می‌شود. در جدول ۱ تعدادی از انواع پرکننده‌های ستون در کروماتوگرافی ژل همراه با محدوده کاربرد آنها، اندازه ذرات، ماکسیمم فشاری را که می‌توانند تحمل کنند و مهمتر از همه فاز متحرکی که برای هر نوع پرکننده می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد فهرست شده‌اند.

اشاره می‌شود مقادیر عددی برحسب انگستروم ($\AA$) که در ستون دوم جدول، کنار پرکننده ستون نوشته شده است مربوط به قطر سوراخها



شکل ــ ۲: ترتیب جداسازی مولکولها با اندازه‌های مختلف [7].

جدول ۱. انواع پرکننده‌های ستون و مشخصات آنها

نوع پرکننده	نوع ستون (نام تجارتی)	اندازه ذرات (Mm)	محدوده تفریق بهداسازی (MW)	ماکسیمم فشار تزریق (psi)	فاز متحرک	سازنده (شرکت)
پیوند عرضی کوپلیمراستیرن ودی وینیل بنزن	M-Styrdgel 10^6 A°	۱۰ ± ۱	10^7 ×۱ >— 10^5 × ۱	۳۰۰۰	حلالهای آلی به غیر از استن، الکل و سایر حلالهای خیلی قطبی	Waters
	10^5 A°		10^7 × ۱ — 10^4 × ۱	۲۰۰۰		
	10^4 A°		10^6 × ۲ — 10^3 × ۷	۳۰۰۰		
	10^3 A°		10^5 ×۴ — 10^2 ×۴	۳۰۰۰		
	500 A°		10^4 × ۸ — 10^2 × ۱	۳۰۰۰		
	100 A°		10^3 × ۳ — 10^2 × ۱	۲۰۰۰		
پیوند عرضی کوپلیمراستیرن ودی وینیل بنزن	Micropakbkg 1000 H	۹ ± ۱	10^3 × ۲ — 10^2 × ۱ <	مشخص نیست	حلالهای آلی بجز استن و سایر حلالهای خیلی قطبی	Varian
	G2000 H		10^4 × ۱ — 10^2 × ۱			
	G3000 H		10^4 × ۳ — 10^2 × ۱			
	G4000 H		10^5 ×۴ — 10^2 ×۵			
	G5000 H		10^6 × ۳ — 10^3 × ۵			
	G 6000 H		10^7 > — 10^4 × ۵			
	G7000 H		10^7 > — 10^5 × ۱			
	GMH		10^7 > — 10^2 × ۱			
پیوند عرضی کوپلیمراستیرن ودی وینیل بنزن	M-Spheragel 10^6 A°		10^6 × ۱ >	مشخص نیست	حلالهای آلی بجز استن و الکل و سایرحلالهای آلی خیلی قطبی	Altex Scientific
	10^5 A°		10^6 × ۵ — 10^5 × ۱			
	10^4 A°		10^5 × ۵ — 10^4 × ۱			
	10^3 A°		10^4 × ۵ — 10^3 × ۱			
	5×10^2 A°		۱۰۰۰۰ — ۵۰۰			
	10^2 A°		۵۰۰۰ — ۱۰۰			
	5×10 A°		< ۲۰۰۰			
کوپلیمروینیل استات	EM Gel Type OR PVA 500 2000	۶۳ — ۳۰	10^3 × ۱/۵ تا 10^3 × ۸ تا	۳۰۰-۶۰۰	حلالهای آلی شامل الکلها و استن	E. Merk
پرکننده‌های آلی حاوی گروه هیدروکسیل	TSK-Gel G-2000 SW 3000 SW	۱۰ ± ۲	10^4 × ۸ تا 10^6 × ۲ تا	مشخص نیست	حلالهای آبی	Varian
پلی اکریل آمید	Bio-Gel P-2	< ۲۸	10^3 × ۱/۸ — 10^2 × ۱ <	۲۰۰	حلالهای آلی و باقرها	Bio-Rad Laboratories
پلی ساکارید	Sephadex G25	۴۰ — ۱۰	10^3 × ۴ — 10^2 × ۱	۲۰۰	حلالهای آبی	Pharmacia Fine Chemicals

یا منافذ داخل ذرات پرکننده نیست زیرا ذره‌ای با قطر ۱۰ میکرون هرگز نمی‌تواند سوراخی در حدود $10A^{\circ}$ را درخود داشته باشد. این مقادیر عددی در واقع کوچکترین طول مولکول پلی‌استیرنی است (برحسب آنگستروم) که پس از عبور دادن آن از یک ستون *GPC* از داخل هیچ یک از منافذ ذرات عبور نکرده بلکه فقط از فواصل بین ذرات (شکافها) رد شده و از ستون خارج شده است.

فاز متحرک

مایع شوینده در کروماتوگرافی ژل باید تنها به عنوان یک حامل برای نمونه باشد و نباید با نمونه یا پرکننده‌های ستون برهم کنشی داشته باشد. حالت مطلوب این است که نمونه در فاز متحرک بسیار محلول باشد.

اگر نمونه به سختی حل شود ممکن است آثاری مانند جذب و پخش روی دهد و در تعیین مقدار وزن مولکولی به دست آمده مقداری خطا وارد شود. حلالی که با عنوان فاز متحرک برای هر نمونه‌ای در *GPC* مورد استفاده قرار می‌گیرد باید مشخصات زیر را داشته باشد:

۱ ــ حلال باید نمونه را کاملاً در خود حل کند.

۲ ــ حلال نباید اثر تخریبی روی هیچ یک از اجزای نمونه داشته باشد.

۳ ــ اگر از آشکارساز ضریب شکست به عنوان آشکارساز استفاده می‌شود، ضریب شکست حلال باید در حدود ۰/۰۵ واحد با ضریب شکست نمونه فرق داشته باشد. اگر از *UV* به عنوان آشکار ساز استفاده می‌شود، حلال باید بیش از ۱۰٪ از انرژی تابیده شده در آن طول موج را از خود عبور دهد.

نمونه‌های شامل ژلها کاملاً حل نمی‌شوند. گاهی یک پلیمر با جرم مولکولی پائین در حلال مورد استفاده حل می‌شود ولی پلیمرهای با جرم مولکولی بالا در آن حل نمی‌شوند. در جدول ۲ علامتهای *N*،*X* و *U* به ترتیب برای مناسب، نامناسب و تقریباً مناسب آمده است و *A* یعنی ممکن است جذب اتفاق بیافتد. *R* یعنی محلول است ولی اختلاف ضریب شکست کافی نیست. جای خالی نشان‌دهنده اینست که اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست.

آشکارسازها در GPC

ــ آشکارساز ضریب شکست، *RI* (*Refractive Index*)

شاید متداولترین نوع آشکارساز مورد استفاده در *GPC* آشکارساز ضریب شکست باشد. این آشکارساز بطور پیوسته اختلاف ضریب شکست بین فاز متحرک خالص و فاز متحرکی را که شامل نمونه است، اندازه‌گیری می‌کند. آشکارساز *RI* در هر زمان به اختلاف ضریب شکست بین حل‌شونده و فاز متحرک پاسخ می‌دهد به شرطی که این اختلاف بیش از ۰/۰۵ واحد ضریب شکست باشد.

در بازار سه نوع مختلف از آشکارساز *RI* موجود است:

۱ ــ آشکارساز *RI* از نوع انحرافی

۲ ــ آشکارساز *RI* از نوع تفاضلی

۳ ــ آشکارساز *RI* که بر اساس اصل تداخل امواج کار می‌کند.

ــ آشکارساز ماورای بنفش و مرئی *UV/Vis* (*Ultraviolet/Visible*)

آشکارساز ماورای بنفش و مرئی در عین ارزانی خیلی حساس است ولی کاربرد آن فقط به اجسامی محدود می‌شوند که در ناحیهٔ ماورای بنفش یا مرئی جذب داشته باشند یا با استفاده از معرفهای کمپلکس‌کنندهٔ مناسب ترکیبهای رنگی تولید کنند.

این آشکارساز اغلب در طول موجهای ثابت یا متغیر گسترهٔ ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر و ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر عمل می‌کند. واقع است که حلال نباید در طول موج انتخابی جذب داشته باشد.

۳ ــ آشکار ساز زیر قرمز، *IR* (*Infrared*) این آشکارساز برای شناسایی گروههای عاملی در ترکیبات آلی به کار می‌رود و بیشتر برای ترکیباتی مناسب است که آشکارسازهای *UV*, *RI* در مورد آنها کارساز نیستند.

۴ ــ آشکارسازهای دیگری نیز وجود دارند مانند آشکارساز فلوئورسانس و الکترو شیمیایی که در *GPC* کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

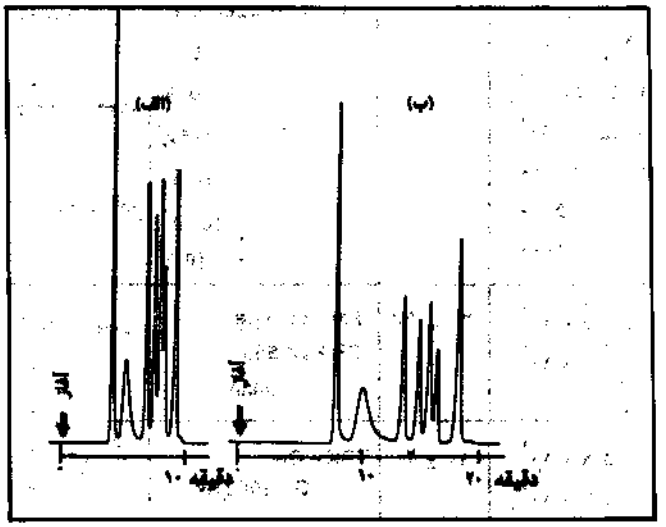
کاربردهای GPC

در اینجا دو نوع کاربرد مهم به طور جداگانه بحث می‌شوند:

۱ ــ جداسازی مواد با انواع جرمهای مولکولی کم.

GPC می‌تواند برای جداسازی ترکیبات به کار رود، حتی اگر تعیین جرم مولکولی مورد نظر نباشد. در حقیقت از این تکنیک می‌توان برای جداسازی مقدماتی دسته‌هایی از مولکولها با یک طیفی مشخص از جرم مولکولی استفاده کرد و آنگاه اجزای هر کدام از این دسته‌ها را توسط ستونهای ویژه دیگر جداسازی کرد.

جداسازی نمونه‌ها، به ویژه وقتی مولکولهایی با جرم مولکولی کمتر از ۲۰۰۰ داشته باشند می‌تواند توسط ژلهای سخت دی وینیل بنزن انجام گیرد. شکلهای ۳ و ۴ مثالهایی در این زمینه‌اند در حالت اول (شکل

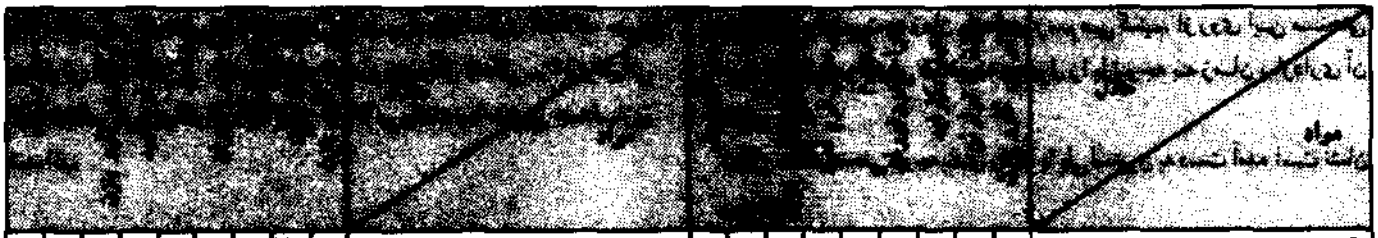


شکل ۳: جداسازی ترکیبات با وزن مولکولی کم به وسیله GPC
نوع ستون: 8mmID, Shodex A 802
طول ستون: در شکل الف، طول ستون 25 cm است و در شکل ب از دو ستون 25 cm استفاده شده است که به طور سری بسته شده‌اند [2].
یکها:

۱ ــ پلی استیرن (۴۰۰ ۲۰ = *MW*)
۲ ــ پلی استیرن (۱۰۰ ۲)
۳ ــ دی اکتیل فتالات (۳۹۰/۶)
۴ ــ دی بوتیل فتالات (۲۷۸/۳)
۵ ــ دی اتیل فتالات (۲۲۲/۲)
۶ ــ دی متیل فتالات (۱۹۴/۲)
۷ ــ بنزن (۷۸/۱۲).

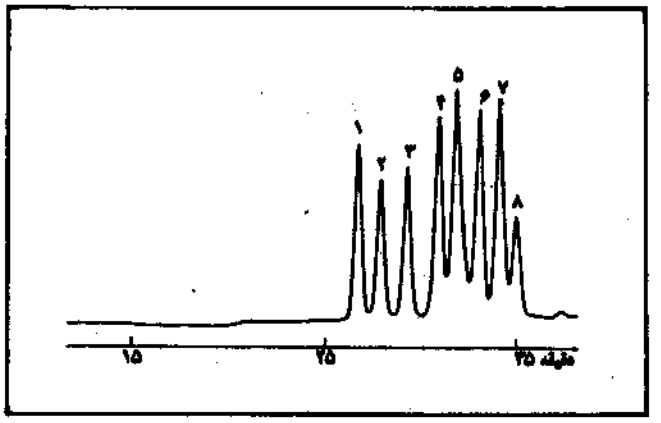
در جدول ۲ حلالهایی که در GPC برای انواع نمونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند فهرست شده است.

جدول ــ ۲: انواع حلالها در GPC [۱]



آکریلیکها		×		×		×															×		
لاستیک بوتادین آکریلو نیتریل		×				×	×														×		
رزینهای آلکید		×		×	×																×	N	
رزینهای آلکیل				×	×																	N	×
ضد اکسنده‌های پلیمری		×		×																		N	
آسفالت	×	×	×	×	×	×	×	N	×													N	
۱ ــ بوتن	×	×	N	U	N	×		N														N	×
لاستیک بوتیل	×	×		U		×		N															
کربو واکسها	×			U	×	×		U														N	×
سلولز استات				×		×																	
سلولز نیترات				×	A			N														N	
سیس پلی بوتادی‌ان	×	×		U		×		N														N	
دکسترانها								×														N	
دی الکیل فتالات	×	×				×		N														N	×
دی متیل پلی سیل اکسانها	×	×	×	U	U			N														N	
ابی کلرو هیدران				U																		×	
رزینهای ایوکسی(بدون پیوند عرضی)		×		×	×																U	N	
اتیل اکریلاتها	×	×		U		×			×													N	
پلیمر اتیلن پروپیلن	×							N														N	
اتیلن وینیل استات			U	U				N														N	
فورفوریل الکل	×			×	×																		×
پلی ایزو بوتیلن		×		×				N														N	
کوپلیمرهای پلی‌ایزوبوتیل		×		U				N														N	
پلی ایزوپرن		×						N															
پلی نوکلئور آروماتیکها	×	×	×	×	×	×	×	N															
پلی‌الها				×																		N	
پلی فنیلن اکسید																						N	
پلی پروپیلن								N															
پلی استیرن	×	×	×	×	×	×	×	N														N	
پلی سولفونها				×																		N	
پلی سولفون				×																		N	
پلی اورتان			×	U		×		N															
پلی (وینیل استات)	×			×		×																	
پلی (وینیل الکل)								×															

ـ ۳) پلیمرهای با جرم مولکولی بالا و استرهای فتالات می‌توانند به خوبی جداسازی شوند به طوری‌که حتی در یک مورد جداسازی اختلاف جرم مولکولی آنها کمتر از ۳۰ می‌باشد و در موردی دیگر (شکل ـ ۴) ترکیباتی که اختلاف جرم مولکولی آنها کمتر از ۱۴ می‌باشند به خوبی جداسازی شده‌اند.



شکل ـ ۴: جداسازی الکیل بنزنها به وسیله GPC.
نوع ستون: ۴ عدد Shodex A801/25cm x 8mm که به طور سری بسته شده‌اند.
فاز متحرک: تترا هیدروفوران (THF)
سرعت جریان: 1ml/min [2]
پیکها:

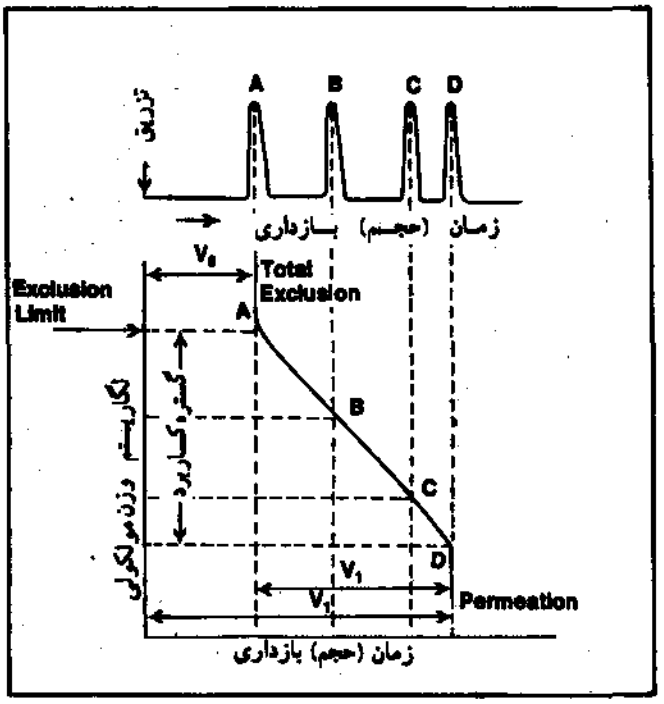
۱ ـ n دسیل بنزن (MW = ۲۱۸/۴).
۲ ـ n اکتیل بنزن (۱۹۰/۳)
۳ ـ n هگزیل بنزن (۱۶۲/۳)
۴ ـ n بوتیل بنزن (۱۳۴/۲)
۵ ـ n پروپیل بنزن (۱۲۰/۲)
۶ ـ اتیل بنزن (۱۰۶/۲)
۷ ـ تولوئن (۹۲/۱)
۸ ـ بنزن (۷۸/۱۲)

یکی از تکنیکهای موجود جهت بالا بردن قدرت تفکیک پیکها، افزایش طول ستون یا متصل کردن ستونها به طور سری به یکدیگر است که شکل ـ ۳ مبین این مطلب می‌باشد. همچنین تاثیر مشابهی را می‌توان با کاهش سرعت جریان فاز متحرک به دست آورد.

۲ ـ آنالیز توزیع اندازه مولکولی:

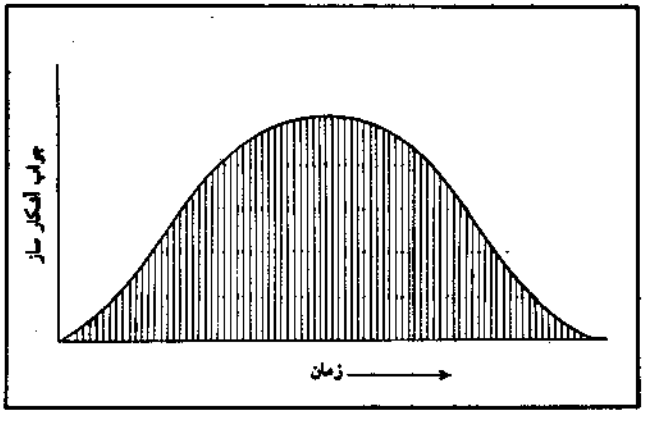
متداولترین کاربرد GPC کنترل کیفی پلیمرها با جرم مولکولی بالاست. داده‌های خام منحنی GPC منحنی توزیع اندازه مولکولی است. منحنی درجه‌بندی را می‌توان برای هر نوع ستون GPC به دست آورد. به این ترتیب که ابتدا نمونه‌هایی از پلی استیرن را با جرم مولکولی مشخص به طور جداگانه با دستگاه GPC آنالیز می‌کنیم و برای هر جرم مولکولی یک زمان بازداری مشخص به دست می‌آوریم آنگاه منحنی لگاریتم جرم مولکولی را نسبت به زمان بازداری رسم می‌کنیم. از روی این منحنی می‌توان وزن مولکولی هر نمونه مجهول را با توجه به زمان بازداری آن تعیین کرد.

شکل ـ ۵: منحنی درجه‌بندی را که با پلی‌استیرن به دست آمده است نشان می‌دهد.



شکل ـ ۵ چگونگی رسم منحنی درجه‌بندی

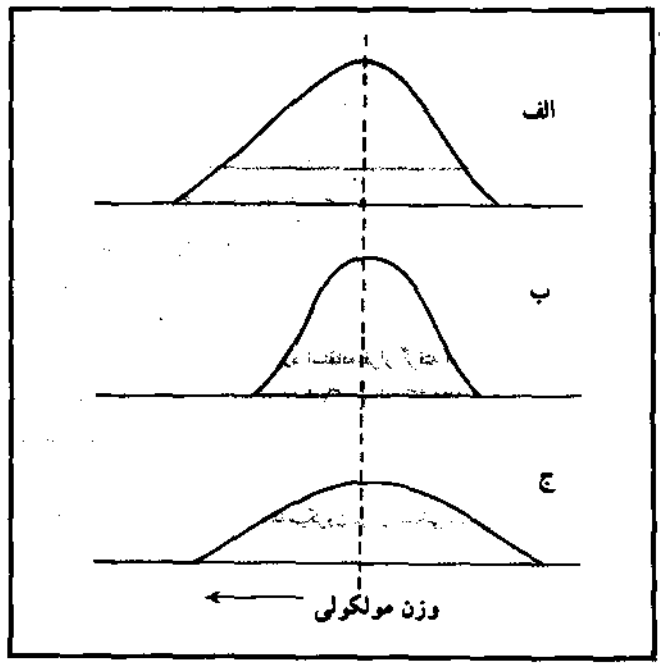
با درجه‌بندی کردن، داده‌های خام به منحنی توزیع وزن مولکولی و وزن مولکولی متوسط تبدیل می‌شوند. این کار با تقسیم منحنی توزیع (کروماتوگرام) به اجزاء یا قسمت‌هایی انجام می‌شود. همان‌طور که در شکل ـ ۶ ملاحظه می‌شود می‌توان با مقایسه زمان بازداری هر جزء با



شکل ـ ۶: کروماتوگرام Time – sliced size – exclusion جهت ارزیابی مشخصات نمونه.

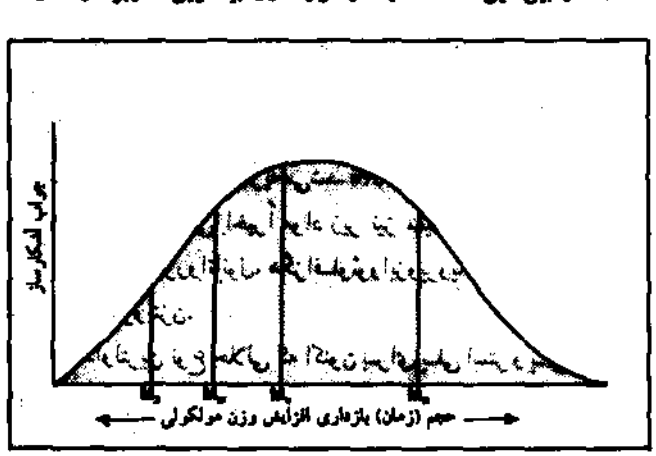
منحنی درجه‌بندی و خواندن جرم مولکولی مربوط، متوسط جرم مولکولی هر جزء را به دست آورد. با استفاده از این اطلاعات مقادیری را می‌توان محاسبه کرد که بهترین توصیف را درباره نمونه ارائه دهند.

در وهلهٔ اول به نظر می‌رسد که متوسط وزن مولکولی مقدار با اهمیتی باشد، ولی چنین نیست. شکل ــ ۷ سه منحنی توزیع مربوط به سه نمونه را نشان می‌دهد که جرم مولکولی متوسط هر سه یکسان است. ولی از شکل چنان برمی‌آید که مشخصات آنها باید کاملاً با هم فرق داشته باشد. نمونه الف دارای توزیع جرم مولکولی وسیعتری (پهنتری) از ب می‌باشد. جهت ارزیابی عملی نمونه‌ها احتیاج به پارامترهایی است که این خصوصیات را تشریح کنند.



شکل ــ ۷: مقایسه سه منحنی توزیع وزن مولکولی

در این بخش به‌طور خلاصه اصطلاح‌هایی ویژه به همراه کاربرد آنها ارائه می‌گردد. که هر یک مبین قسمتی از منحنی توزیع می‌باشد (شکل ــ ۸). در بین این اصطلاحها دو مورد اول بیشترین کاربرد را دارند:



شکل ــ ۸: مقایسه مقادیر گوناگون وزن مولکولی

وزن مولکولی متوسط عددی، $\overline{M}_n$

وزن مولکولی متوسط عددی اولین قسمت منحنی است و از آن برای تعیین انعطاف‌پذیری، چسبناکی و غیره استفاده می‌شود که مربوط به مقدار نسبی مواد با جرم مولکولی پایین است. مقدار $\overline{M}_n$ از فرمول زیر محاسبه می‌شود.

$$\overline{M}_n = \frac{\sum NiMi}{\sum Ni} = \frac{\sum Wi}{\sum Wi/Mi}$$

که W_i و N_i به ترتیب وزن و تعداد مولکولهاست، M_i جرم مولکولی است.

و $\overline{M}_n$ در GPC از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^{N} Hi}{\sum_{i=1}^{N} (Hi/Mi)}$$

که H_i ارتفاع منحنی GPC در i امین افزایش حجم بازداری و M_i وزن مولکولی ماده شستشو شده در i امین حجم بازداری است.

وزن مولکولی متوسط وزنی، $\overline{M}_w$

وزن مولکولی متوسط وزنی دومین قسمت منحنی را شامل می‌شود و این قسمت ارزیابی دقیقی از مقدار نسبی مواد با جرم مولکولی بالاتر را ارائه می‌دهد، که در خواص فیزیکی پلیمر سهیم‌اند. مقدار $\overline{M}_w$ از رابطهٔ زیر به دست می‌آید.

$$\overline{M}_w = \frac{\sum NiMi^2}{\sum NiMi} = \frac{\sum WiMi}{\sum Wi}$$

و در GPC از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{N} (HiMi)}{\sum_{i=1}^{N} Hi}$$

وزن مولکولی متوسط Z، $\overline{M}_z$

$\overline{M}_z$ سومین قسمت منحنی است و از آن برای تشخیص حضور مواد با وزن مولکولی بسیار بالا در فرآورده استفاده می‌شود $\overline{M}_z$ غالباً در تعیین دوام و شکنندگی محصول اهمیت دارد و از معادله زیر به دست می‌آید:

$$\overline{M}_z = \frac{\sum Mi^3 Ni}{\sum NiMi^2}$$

و در GPC از این معادله به دست می‌آید:

$$\overline{M}_z = \frac{\sum_{i=1}^{N} Hi\,(Mi)^2}{\sum (HiMi)}$$

وزن مولکولی متوسط ویسکوزیته، M_v:

$\overline{M}_v$ چهارمین قسمت منحنی است و ویسکوزیته متوسط ماده را به وزن مولکولی آن ارتباط می‌دهد. و با استفاده از منحنی GPC می‌توان مقدار آن را به دست آورد:

$$\overline{M}_v = \left[\frac{\sum_{i=1}^{N} Hi\,(Mi)^{\alpha}}{\sum Hi}\right]^{1/\alpha}$$

α یکی از پارامترهای (*Mark–Houwink*) است که مقدار آن در جدولهای مربوط برای هر پلیمر آمده است. مثلاً مقدار α برای پلی‌استیرنی که جرم مولکولی آن بزرگتر از ۳۰۰۰ باشد ۰/۷۰۶ است. در صورتی که حلال *THF* (تترا هیدروفوران) و دما $25\ ^{\circ}C$ باشد.

پارامتر مهم دیگر نسبت $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ است که بیانگر «پلی مولکولاریته» (*polydispersity*) و «ناهمگنی» (*inhomogeneity*) نمونه است. هرچه منحنی توزیع تیزتر باشد، این نسبت کوچکتر است. برای پلیمرهای همگن مقدار $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ برابر یک خواهد شد.

برای پلیمرهای با منحنی توزیع مولکولی خیلی باریک این مقدار حدود ۱/۰۵ الی ۱/۲ است. در حالی که برای پلیمرهای تجارتی این نسبت ممکن است به ۱۰ نیز برسد.

GPC پلیمرها

در این قسمت آنالیز چند نوع پلیمر با روش *GPC* به اختصار تشریح می‌گردد:

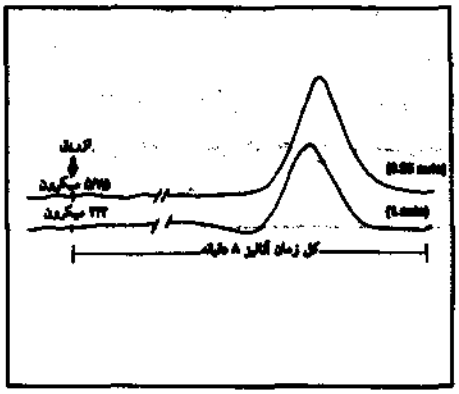
الف: پلی اولفینها

در *GPC* پلی اولفینها به مشکلاتی برخورد می‌کنیم که ناشی از انحلال‌پذیری آنها است. پلی اتیلنهای جامد (*PE*)، پلی پروپیلنها (*PP*) و پلی اتیلن وینیل استات (*PEVA*) جامد که دارای وزن مولکولی زیاد باشند و بسیاری از پلیمرهای دیگر به‌صورت بلور می‌باشند.

همزمان با افزایش زنجیرهای جانبی، درجه تبلور کاهش می‌یابد. برای بسیاری از این پلیمرها در دمای اتاق حلال مشخصی وجود ندارد. معمولاً لازم است که پلیمر را تا نزدیک نقطه ذوب حرارت داد (در درون حلال) تا به این وسیله نیروهای پیوند تبلور قبل از تجزیه شکسته شوند. مثلاً *PE*، *PP*، *PEVA* پلیمرهایی هستند که از طریق *GPC* و با استفاده از ۱، ۲ و ۴ تری‌کلروبنزن (*TCB*) یا اورتودی کلروبنزن (*ODCB*) در دمای $150\ ^{\circ}C$ ــ $130\ ^{\circ}C$ آنالیز می‌شوند. محلول نمونه باید در حالی که داغ است تزریق شود و گرنه پلیمر رسوب می‌کند و موجب مسدود شدن درب محل تزریق یا لایه‌های خمیری داخل ستون می‌شود.

با اینکه آنالیز از طریق *GPC* در دمای پیش گفته امکان‌پذیر است ولی به ناچار محدودیتهای فنی مشخصی وجود دارد. برای مثال اگر چه از ژلهای آلی به دلیل متورم شدن در حلالهای داغ، می‌توان به عنوان پرکنندهٔ ستون استفاده کرد، ولی اگر ستون خنک شود، ژل نیز منقبض می‌گردد و این انقباض در انتها منجر به تغییرات فاز ساکن شده، و درجه تفکیک را کاهش می‌دهد.

پر کننده‌های سخت از قبیل سیلیکا از مشکلات ناشی از تورم برخوردار نیستند. لکن گاهی باعث جذب پلی اولفینها می‌شوند و مکانیسم جداسازی در *GPC* را تحت تاثیر قرار می‌دهند. چنین اشکالاتی را می‌توان با استفاده از پرکننده‌های سیلانیزه شده (*Silanized*) یا با اصلاح فاز متحرک جهت خنثی کردن نواحی فعال پر کننده‌های ستون، برطرف کرد. شکل ــ ۹ نمایانگر کوپلیمر *EVA* بر روی ستونهای متخلخل سیلیکاست. در این آنالیز از *Carbowax-200* ۱٪ به عنوان اصلاح کننده در *ODCB* (ارتودی کلرو بنزن) استفاده شده است. بدون وجود اصلاح کننده حلال، *EVA* از این ستونها شسته نمی‌شود.



شکل ــ ۹: کروماتوگرام پلی (اتیلن / کوپلیمر وینیل استات) که در دمای بالا به دست آمده است [1].

نوع ستون:

ستونهای Duponts 1000A، 500A

100A که به طور سری بسته شده‌اند مورد استفاده قرار گرفته است.

حلال: ارتو دی‌کلروبنزن شامل ۱٪ Carbowax در دمای $135\ ^{\circ}C$ است.

سرعت جریان: 2ml/min

آشکارساز:

مادون قرمز (IR) ۰/۲۵ AUFS در ۵/۷۵ میکرون برای منحنی بالایی و ۰/۱AUFS در ۳/۴ میکرون برای منحنی پایینی.

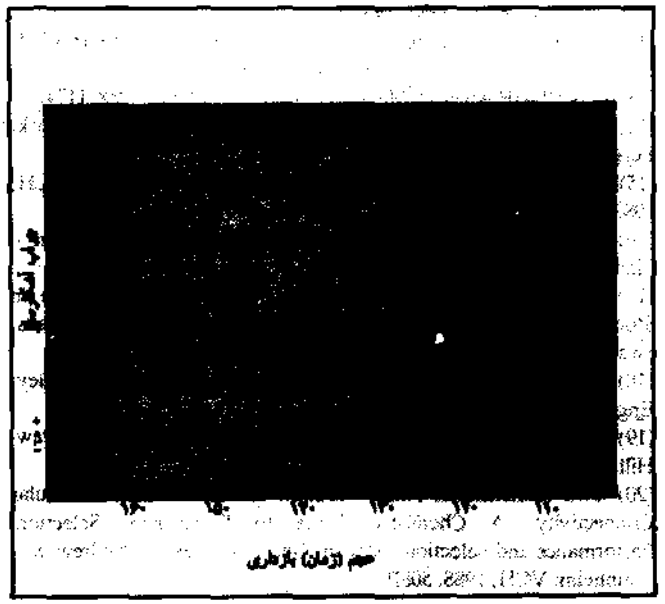
ب ــ پلی‌آمیدها و پلی‌استرها

بسیاری از پلی‌آمیدها و پلی‌استرها از نظر تجارتی به عنوان الیاف، فیلمها و رزینهای قالب‌گیری کاربرد دارند. برجسته‌ترین این مواد عبارت‌اند از: نایلون ۶۶ [پلی ـ (هگزامتیل آدیپ آمید)]، نایلون ۶ (پلی‌کاپرولاکتام) *PET* (پلی اتیلن ترفتالات). این پلیمرها که به شدت متبلور و قطبی هستند در تعداد محدودی از حلالها حل می‌شوند، یعنی حلالهایی که ساختار بلوری پلیمر را درهم می‌شکنند. در گذشته از *m* ـ کروزول فنول / آب، فنول / اتانول، α ـ کلروفنول، بنزیل الکل (جوشان) و فرمیک اسید در روشهای تجزیه می‌شد. *m* ـ کروزول بیش از همه در *GPC* کاربرد داشته است ولی اخیراً مواد زیر نیز مفید واقع شده‌اند:

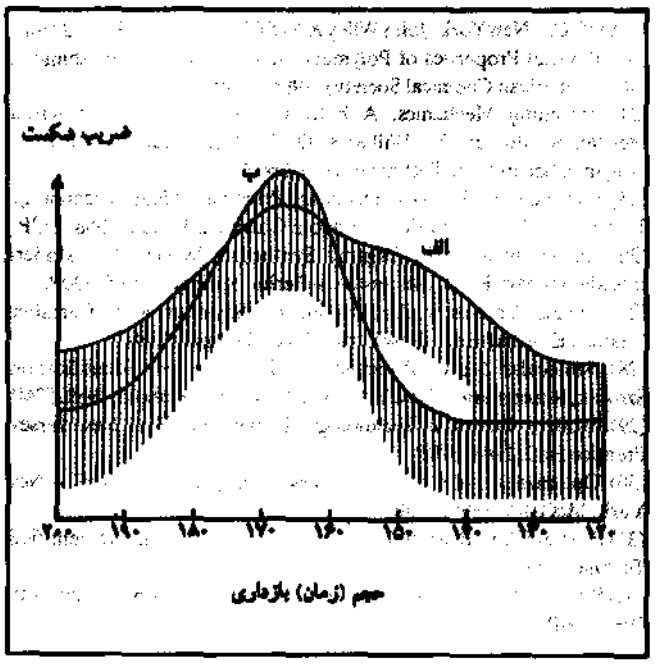
تری فلوئوروواتانول، هگزافلوئوایزوپروپانول (*HFIP*) و تری کلرواتان / نیتروبنزن.

متداولترین نوع حلالی که اکنون برای پلی استر و پلی آمید در *GPC* به کار می‌رود عبارت از *m*- کروزول و *HFIP* است. از تصویر زیر معلوم می‌شود که *GPC* به راحتی می‌تواند اختلاف زیاد در *MWD* را بین یک نمونه پلیمری (پلی استر) که به طور سنتزی به دست آمده (الف) و

همان پلیمر را در شرایطی که درون حلال تا نزدیک نقطه ذوب حرارت دیده است (ب) نشان دهد.

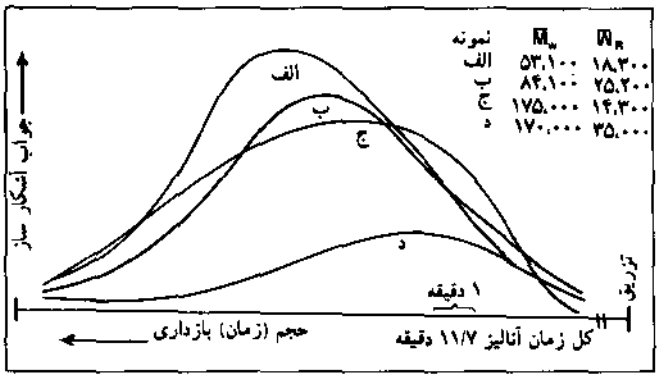


شکل ــ ۱۰: نمونه‌ای از کروماتوگرام نایلون ۶۶ در حلال m ــ کروزول



شکل ــ ۱۱: نشان می‌دهد که نایلون ۶۶ در حلال m ــ کروزول در GPC منحنیهایی به دست می‌دهد که تقارن پیش‌بینی شده را دارند [1].

کروماتوگرافی پلی اتیلن‌هایی که *MWD* و *MW* متعدد دارند را می‌توان بر روی همان ستونها انجام داد در این کروماتوگرافی از *ODCB* اصلاح نشده استفاده می‌شود (شکل ــ ۱۱). بهتر است که بدون حضور اصلاح کننده کار شود، زیرا حضور آن موجب زمینه پر از نوفه می‌شود و مراحل بعدی شناسایی (*IR*) را تحت تأثیر قرار می‌دهد.



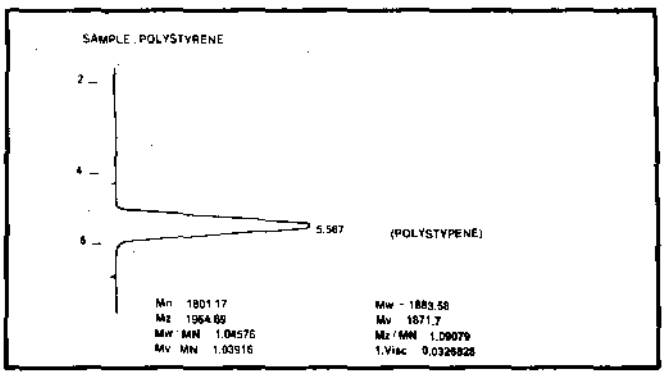
شکل ــ ۱۲: کروماتوگرامهای پلی‌اتیلنهای زنجیری در دماهای بالا [1].

نوع ستون: سه ستون *DupontSE* ۱۰۰۰۰ *A°*، ۵۰۰۰ *A°*، ۱۰۰۰ *A°* که به طور سری بسته شده‌اند مورد استفاده قرار گرفته است. سرعت جریان: *۱/۳ml/min*

حلال: ارتودی کلروبنزن در ۱۳۵°C آشکار ساز: مادون قرمز (*IR*) *AUFS(IR)* ۰/۰۲۵ در ۳/۴۰ میکرون

نمونه‌ای از تجزیه انجام شده توسط دستگاه *GPC* مرکز تحقیقات مهندسی جهاد سازندگی در زیر ارائه می‌شود.

در این تجزیه ابتدا پیکهای سه نمونه استاندارد از پلی‌استیرن با جرمهای مولکولی مشخص توسط دستگاه گرفته شده و سپس نمونه پلیمری مجهول در دستگاه تزریق شده است آن گاه توسط کامپیوتر مربوطه و برنامه کامپیوتری *GPC* اطلاعات زیر محاسبه و چاپ شده است.



بدین وسیله از آقایان حامد صالحی و علی پایین شهری که در تهیه این مقاله اهتمام ورزیده‌اند تشکر می‌شود.

REFERENCES

[1] Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography
M. W. Yau, J. J. Kirkland, D. D. Bly (1979)

[2] Practical Liquid Chromatography
R. W. yosi, L. S.Ehre, R. D.Conlon (Perkin-Elemer) (1980)

[3] Liquid Chromatography Review: Size-Exclusion Chromatography Dupont Instrumlnt Products Division, 1977

[4] H-l. Browning, Or., and-J. R. Overion: Polym. Prepr., 18, 237, (1977)

[5] M. A, Du Dley, J.Appl. Polym. Sci., 16, 493 (1972)

[6] E. E. Droti, in Chromatographic Science Series, Vol. 8, Liquid Chromatography of Polymers and related Materials, J. Cozes, Ed., Deker, New York, 1977, P. 41.

[7] waters. مقالات شرکت