

# GPC/SEC 分步方法开发

## 技术概述

### 作者

Adam Bivens  
安捷伦科技公司

### 摘要

安捷伦针对采用 GPC/SEC 进行测量的许多不同应用和样品提供了全套解决方案。稳健的方法与合理的产品选择有助于最大程度提高通量并减小数据误差，从而直接影响实验室的预算。从初步化合物鉴定到色谱柱生命周期管理，本技术概述评述了方法开发的每一个步骤。

### 前言

凝胶渗透色谱 (GPC) 也称为体积排阻色谱 (SEC) 或凝胶过滤色谱 (GFC)，是测定样品分子量分布的主要方法。

GPC 色谱柱填充具有明确孔径和大孔容的多孔小球。进样后，小分子漂移到孔中，而大分子被排除在外并被溶剂冲走。这种分离机制使分析物按照从大到小的顺序洗脱。

精确的方法开发对于确保数据一致无误且同时最大程度减少开发每次分析所花费的时间很有必要。



**Agilent Technologies**

## 入门指南

### 鉴定化合物

化学鉴定结果通常提供于产品文档或安全数据表中。

如果对于目标样品一无所知，可采用光谱方法对其进行鉴定。图 1 示出 Agilent 4300 便携式 FTIR 如何能够轻松实现聚合物的鉴定。



图 1. Agilent 4300 便携式 FTIR 能够轻松鉴定聚合物

### 确定潜在的溶剂-温度-相化学组合

购买色谱柱前，请参阅 *GPC/SEC 的聚合物-溶剂参考表* (5991-6802CHCN) [1] 以确定适合您应用的固定相和溶剂。

### 确定分子量 (MW) 范围

样品的 MW 范围对于色谱柱的选择至关重要。

#### 聚合物

- MW 范围通常列于生产文件中。可采用光散射、流变学和滴定等离线技术估测 MW
- 如果仅提供单一的平均 MW 值，则可以使用平均 MW 的 10 倍作为上限，使用平均 MW 的 0.01 倍作为下限

#### 添加剂、预聚物和增塑剂

- 大多数非聚合物型添加剂的 MW 低于 1500 Da。预聚物和高分子量添加剂的 MW 通常低于 10 kDa

#### 样品净化

- 在质谱中，大分子在离子化过程中碎裂并引起干扰。准确的 MW 限值因离子化技术而不同
- 在农药检测中，为消除脂肪、蜡质及其他大分子的干扰，EPA 3640A 方法使用 390 Da 作为 MW 上限
- 如需了解更多信息，可参见 5991-5321EN [2]

## 仪器检查

### 温度

- 确认样品在其经过系统时所处于的所有温度下均可溶解（假定暴露的毛细管处于室温下）
- 对于需要高温以保持溶剂化的样品，Agilent PL-220 高温 GPC/SEC 系统 (G7820A) 提供了从溶出到检测的温度控制

### 压力

- 确认系统压力未超出用户手册中规定的泵或色谱柱的限值

## 检测器

### 示差折光 (RI) 检测器

- 在 GPC 中最常用
- 提供通用检测，但是灵敏度相比于 UV-Vis 较低
- 响应与样品和溶剂之间的折射率差值成正比

### 紫外-可见光 (UV-Vis) 检测器

- 常用的灵敏检测器
- 需要样品上的发色团和非干扰性溶剂

### 蒸发光散射检测器 (ELSD)

- 灵敏度高于 RI
- 提供通用检测
- 灵敏度和响应随挥发性样品迅速下降

### 三重检测 (折射率、光散射和粘度测量相结合)

- 对于表征复杂样品、非线性/支化聚合物、接枝聚合物和共聚物很有必要
- 在线测量折射率、固有粘度和支链化程度

如需了解更多信息，请参阅：多检测器凝胶渗透色谱指南 (5990-7196CHCN) [3]

## 扩散

- 扩散限制了系统能够实现的最大效率和速度
- 高扩散系统将具有较长的运行时间和较低的分度度，并且无法仅仅通过更换更高效的色谱柱来改善
- 常见的扩散源包括毛细管、色谱柱、接头、流通池、进样环和系统死体积
- 在高扩散和低扩散系统上均可采用一些步骤来改善性能。请参阅 *Instrument Setup for Fast GPC* (快速 GPC 的仪器设置) (5991-7191EN) [4]

## 方法开发

### 色谱柱选择

从 GPC/SEC 的聚合物-溶剂参考表 (5991-6802CHCN) 中为您的应用选择合适的色谱柱固定相和溶剂 [1]。根据产品样本中的 MW 范围确定能够分离化合物的所有色谱柱。

为确定具有最佳性能的色谱柱，需要对柱效和校准曲线进行比较。

色谱柱应尽早洗脱分子量最大的化合物，尽可能迟地洗脱分子量最小的化合物，从而最大程度提高分离度。MW 范围应涵盖目标 MW 范围并且尽可能不过量。不重要的区域可超出 MW 范围，但是色谱峰将严重变形。

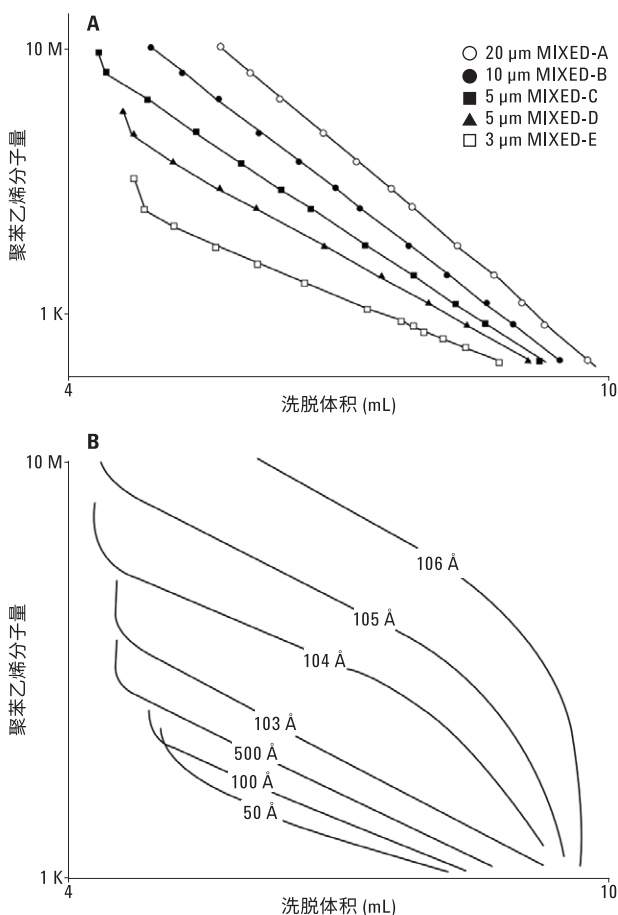


图 2. PLgel MIXED 及各种孔径色谱柱的校准曲线

如果最终要在具有更出色的分离和更高的柱效之间进行选择，则首选更出色的分离。柱效更易于随系统扩散或色谱柱性能下降而发生损失，而良好的分离只受系统中色谱柱总长度的影响。

## 条件

### 溶剂

关于最常用的溶剂体系的指南可参见 *GPC/SEC 的聚合物-溶剂参考表* (5991-6802CHCN) [1]。

- 在分析未表征的化合物时，确认这些化合物与基质不存在相互作用十分重要
- 应将计算得到的 MW 与通过分离方法（如光散射、滴定或粘度检测）得到的值进行比较

存在相互作用的另一个迹象是峰顺序与 MW 不直接相关，例如色谱峰洗脱超出色谱柱的 MW 下限（如图 3 所示），或者已知的低分子量化合物在已知高分子量化合物之后洗脱时。

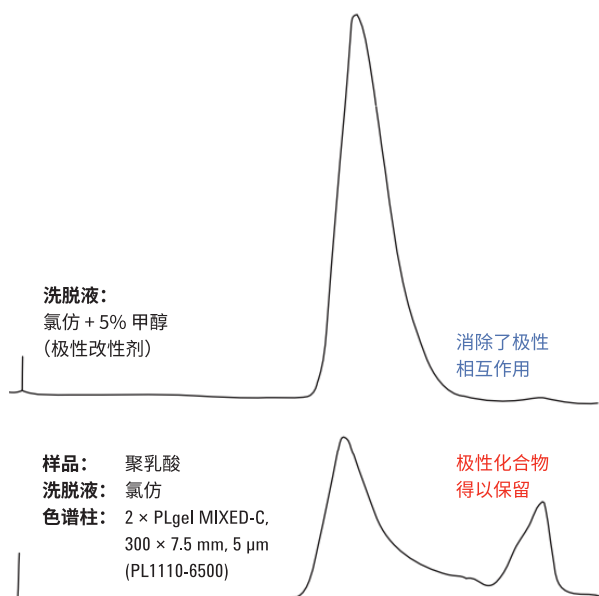


图 3. 向洗脱液中加入 5% 甲醇，消除了下方色谱图中的极性相互作用

### 温度

提高柱温，即使提高 5–10 °C，对 GPC 都非常有利，因为这样能够减小粘度并提高柱效、降低反压和加快流速。

### 流速

在 GPC 中，必须根据样品对流速进行优化。溶剂粘度与效率之间的关系（van Deemter 曲线）随粒径和样品 MW 而变化。

较大的分子需要大粒径色谱柱，并且在较慢的流速下能够实现更出色的分离 (SI-01745) [5]。较小的分子最适合在小粒径颗粒上分离，这样具有更高的柱效，并且在较高流速下运行得最好 (5990-8332EN) [6]。

通过在不同流速下重复进样 MW 标准品来优化流速。最佳流速是最接近目标 MW 的标准峰最窄且分离度最出色时所用的流速。(SI-01745) [5]。

最终，采用较高总流速的宽直径色谱柱将在高扩散系统上提供更优异的效率 and 分离度。该策略与 Agilent PL Rapide 色谱柱结合使用可最大程度提高高扩散系统的性能 [4]。

### 进样量

即使在低浓度下，长聚合物链仍可显著增加溶剂的粘度。样品浓度应保持尽可能低。应当对多种进样量和浓度进行测试，以确定最大程度提高信号且不改变 MW 测量的条件。如需了解更多详情，请参见 *GPC/SEC Column User Guide* (GPC/SEC 色谱柱用户指南) (5991-3792EN) [7]。

### 软件参数

从峰积分中排除色谱峰的前部或尾部可能导致  $M_n$ 、 $M_z$  和 MW 的计算值出现显著变异，这些计算值来源于对总峰形的统计分析。不一致的值对于预测聚合物的理化特性用处不大。

在峰的前部或尾部缺失，或者峰具有异常峰形（例如双峰）时，直接叠加计算得到的 MW 分布是识别样品之间差异的最佳途径。

## 所需的维护

### 监控色谱柱状态

**校准：**必须用标准品定期校准色谱柱，以获得准确的 MW 值。GPC/SEC 中的误差可呈指数级放大，因此 1% 的保留时间不准确度可轻松导致所测 MW 偏移 10%。

泵漂移、色谱柱老化、新毛细管、重新装配的接头和新色谱柱连接均可导致保留时间偏移。在数据采集前后进行系统校准可消除这些误差。如需了解更多信息，请参阅：

- *Calibrating GPC Columns, A Guide to Best Practice* (GPC 色谱柱校正 — 最佳实践指南) (5991-2720EN) [8]
- *安捷伦标准品产品样本* (5990-7996CHCN) [9]

**流速标记物：**为标记运行结束，将甲苯、BHT、丙酮或乙二醇等小分子加入到所有样品中作为流速标记物。来自标记物的窄峰（图 4，峰 6）可用于测量柱效并发现对于宽样品峰不明显的性能下降、拖尾和保留时间偏移。

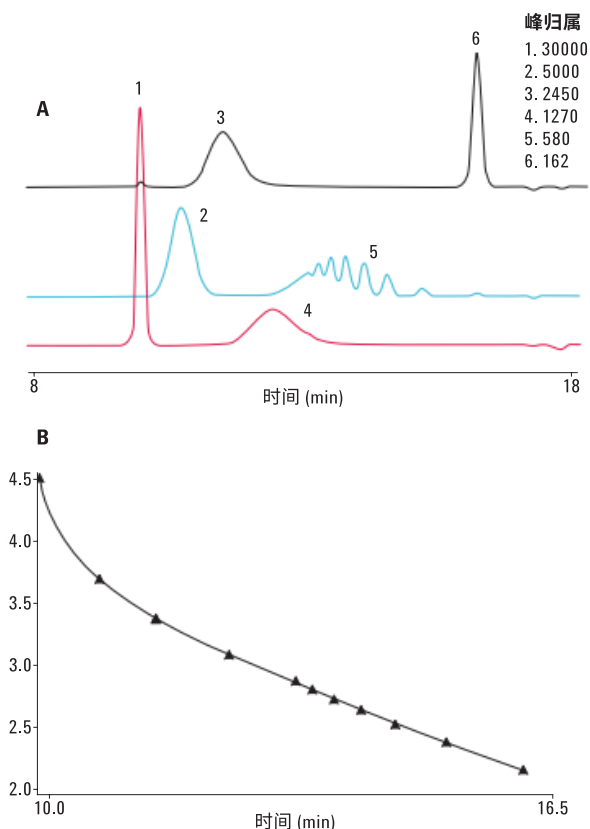


图 4. 小孔径色谱柱的校准

## 故障排除

安捷伦 GPC/SEC 色谱柱树立了耐用性和使用寿命的标杆，但是最终仍不免发生性能下降。

一些故障模式是 GPC/SEC 所特有的，熟悉这些故障模式使研究人员能够避免产生不准确的数据：

- **大孔塌陷** — 流动的溶剂慢慢压碎最大的孔，使大分子无法再得到分离
  - **迹象：**无法分离高分子量标准品。在色谱图开始处，最大的分子一次全部洗脱，并呈现为色谱峰或肩峰
  - **解决方案：**定期校准以追踪孔塌陷情况，并更换色谱柱以提高数据质量
- **柱床性能下降** — 颗粒在使用中慢慢粉碎，孔径分布发生偏移，且总体分离度和柱效降低
  - **迹象：**柱效下降，且最高分子量与最低分子量的校准标样之间的分离度降低
  - **解决方案：**通过定期校准和使用流速标记物来追踪分离度和柱效下降情况。在柱效降至低于可接受水平（通常为原始值的 80%）时，更换色谱柱
- **化学腐蚀** — 反应性化合物会改变颗粒表面并导致分析物粘连。常见腐蚀来源包括残留的氧化剂、自由基引发剂、反应性预聚物（如酰氯）和溶剂降解产物
  - **迹象：**随着时间推移，相同的样品保留时间变长，并且色谱峰开始分叉或拖尾
  - **解决方案：**进样前，对任何强酸或强碱进行中和，采用 BHT 使残留的氧化剂和自由基引发剂去活，并用醇类破坏任何较强的亲核试剂和亲电试剂

## 结论

完备的 GPC/SEC 方法使分析人员能够最大程度提高其实验室的通量和效率，同时避免延迟和错误。

安捷伦很荣幸提供一套完善的、行业领先的 GPC/SEC 分析解决方案以及针对任何分析开发最佳方法所需的专业知识。

## 参考文献

1. Adam Bivens. *GPC/SEC 的聚合物-溶剂参考表*；技术概述，安捷伦科技公司出版号 5991-6802CHCN，**2016**
2. Catherine Jones, Praveen Kutty, Alan Brookes. *An Automated System for the Routine Clean-up of Environmental Samples Prior to Instrument Analysis*（在仪器分析之前对环境样品进行常规净化的自动化系统）；应用简报，安捷伦科技公司出版号 5991-5321EN，**2014**
3. *多检测器凝胶渗透色谱指南*；安捷伦科技公司出版号 5990-7196CHCN，**2012**
4. Adam Bivens. *Instrument Setup for Fast GPC*（快速 GPC 的仪器设置）；技术概述，安捷伦科技公司出版号 5991-7191EN，**2016**
5. *Plate Height vs Flow Rate - Effect of Molecular Weight*（峰高与流速 — 分子量的影响）；技术概述，安捷伦科技公司出版号 SI-01745，**2010**

## 更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

**800-820-3278, 400-820-3278（手机用户）**

联系我们：

**LSCA-China\_800@agilent.com**

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016  
2016 年 8 月 25 日，中国出版  
5991-7272CHCN



**Agilent Technologies**