

GPC/SEC 系列电子书

GPC/SEC 应用

关于聚合物、生物聚合物和蛋白质分析的重要事项



Agilent
InfinityLab

 **Agilent**
Trusted Answers

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及
更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 系列电子书 — GPC/SEC 应用

目录

关于本系列电子书	3
GPC/SEC 应用介绍	4
1.1. 产品注册和 REACH	5
1.2. 定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息	11
1.3. 使用体积排阻色谱进行蛋白质分析	16
1.4. 使用宽范围标准品进行校准	23
1.5. 高摩尔质量样品的分析技巧	29
1.6. 支化分析	33
1.7. GPC/SEC 滤膜分析	39
术语表	43

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 系列电子书 — GPC/SEC 应用

关于本系列电子书

在过去的 10 年里，GPC/SEC 窍门与技巧文章已在 LC/GC 数字杂志《The Column》上发表了 60 多期。这些窍门与技巧旨在为 GPC/SEC 用户的日常工作提供支持，帮助他们全面了解这一强大的技术。

为了方便用户快速了解已发表的所有主题，我们创建了这一系列的电子书。

这些电子书的主题涵盖：

- GPC/SEC 理论与背景
- GPC/SEC 色谱柱
- GPC/SEC 检测
- GPC/SEC 故障排除
- GPC/SEC 应用

每本电子书包含 5–8 篇不同的窍门与技巧文章，这些文章已更新了最新信息、示例和图表。

为了让 GPC/SEC 新用户获得持续的阅读体验，我们对内容进行了编辑，与原出版物存在一些差异。

但未对原版内容进行实质性修改。因此，出版物是独立的参考文献，用户可以只阅读感兴趣的专题出版物。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 系列电子书 — GPC/SEC 应用

GPC/SEC 应用介绍

GPC/SEC 是一种成熟的分离技术，适用于所有涉及传统聚合物材料、建筑材料、电子化学品、药物赋形剂、营养（水）胶体、生物治疗药物等物质的现代实验室。

GPC/SEC 的成功应用取决于多个方面：

- GPC/SEC 提供的结果允许直接通过色谱实验室预测产品性质和应用行为
- 它是一种通用技术，在研发、产品开发、质量保证和（在线、近线）生产控制领域都有应用
- 它是一种广为人知的成熟分离技术
- 在大分子色谱数据系统 (MCDS) 环境下，仪器和软件可以从简单的系统/应用扩展到具有可获得丰富信息的检测器的联用系统
- 它非常适合制药、食品、化妆品和相关行业的监管实验室，由成熟的合作伙伴提供经优化的硬件、软件、质量支持以及专业服务工程师，可覆盖整个系统生命周期，包括全面的确认服务

本 GPC/SEC 系列电子书的所有章节都详细介绍了各种有趣的 GPC/SEC 应用。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 系列电子书 — GPC/SEC 应用

1.1. 产品注册和 REACH

聚合物/大分子的一大优点是它们可被视为无毒物质，即使由毒性单体产生而来也是如此^[1]。由于聚合物的尺寸较大，且在聚合过程中活性官能团会发生反应，因此通常认为聚合物具有（生物）化学惰性。

然而，未反应的单体、低聚物、佐剂和添加剂仍然需要关注，因为在生产过程中往往会添加这些物质来提高可加工性、稳定性以及最终产品的质量。这些成分的浸出可能会导致严重的问题。

因此，注册机构要求对聚合物进行全面的表征，并提供详细的摩尔质量信息，对于某些产品，还需要进行可浸提物与可沥滤物研究。

传统上使用 GPC/SEC 测定聚合物产品的摩尔质量，这一结果至关重要，因为它会影响新产品的注册类别。

例如，摩尔质量决定了新产品是否属于“低关注度聚合物” (PLC) 类别，或者产品是否需要注册（如欧盟 REACH）。

因此，获得满足法规指南要求的详细、准确的摩尔质量数据是成功注册的关键。

REACH

REACH（化学品注册、评估、许可和限制）是一项于 2007 年 6 月 1 日生效的欧盟法规。它涉及化学品的生产及其对人体健康和环境的影响。在欧洲，根据 REACH 法规，所有聚合物均可免于注册和评估。

聚合物由以下三项标准定义：

- 分子必须分布于一定的分子量范围内
- 含有 3 个及以上单体单元的分子的重量的百分比应超过 50%（3M + 1 规则）
- 相同分子量的任何分子的重量的百分比不得超过 50%

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

全球范围内，与 REACH 类似的各种法规都采用这一定义，尽管针对不同结果的监管要求可能有所不同。例如，聚合物不是中国-REACH 的豁免对象。

参考经济合作与发展组织 (OECD) TG 118^[2]，确定一种物质是否符合聚合物定义的首选方法是 GPC/SEC。

如果产品的摩尔质量足够低，GPC/SEC 分离通常呈现如图 1 所示的低聚物谱图。通过将数据与至少一种已知标准物质进行叠加等方法，可以实现单个峰的鉴定。然后，可以根据摩尔质量和重量百分比对单个峰进行评估。此处的示例为多元醇的摩尔质量分布（满足标准 1）以及 8 个自动识别的单链峰（具有 1 至 8+ 个重复单元）。对于较高的摩尔质量（长链，8+ 个重复单元），GPC/SEC 的分离度不足以将其分离为单峰。这种行为在 GPC/SEC 中非常常见——摩尔质量越高，观察到的峰越宽。

表 1 显示了鉴定出的 8 种物质的结果，并与 REACH 聚合物定义标准进行了比较。

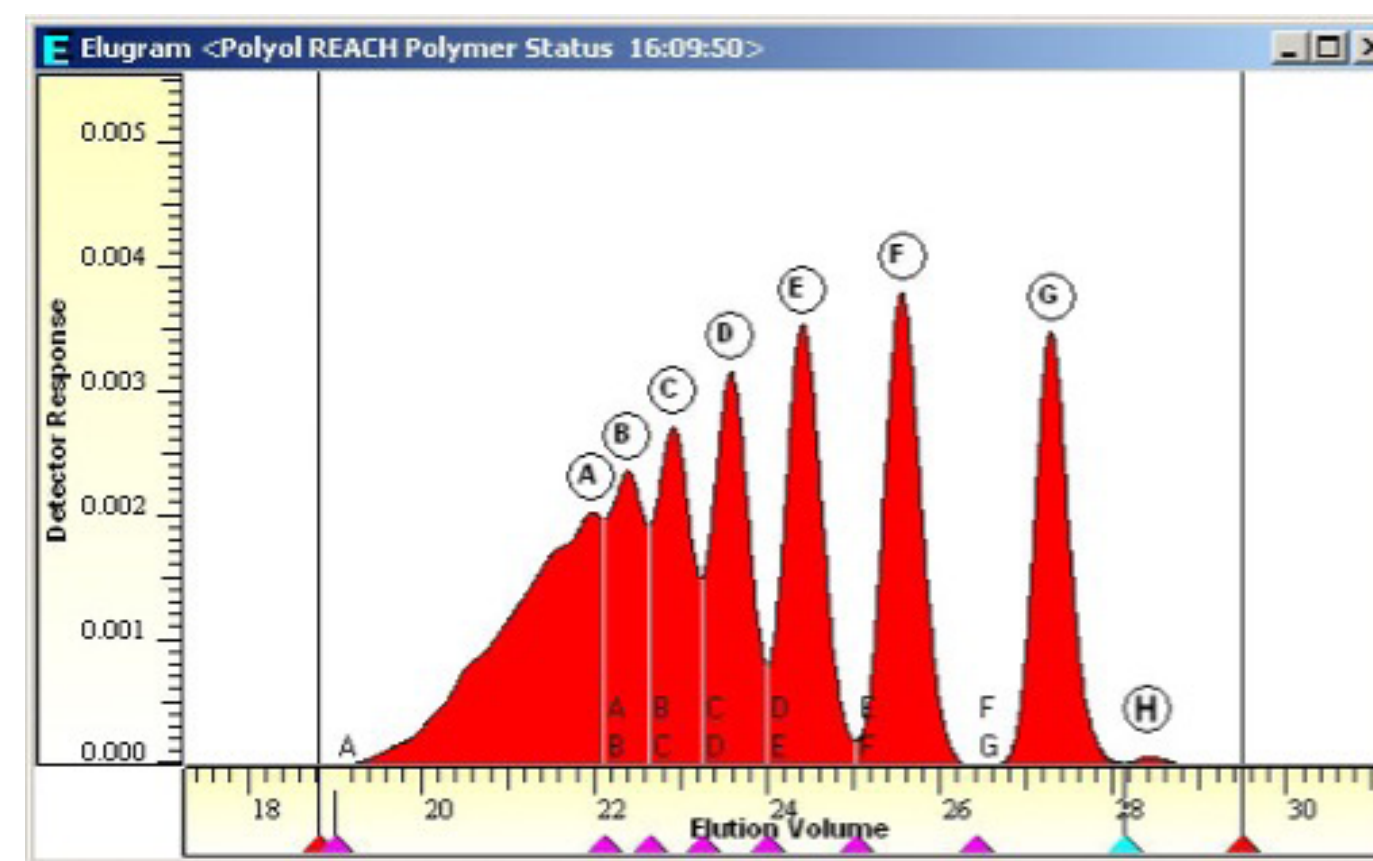


图 1. 多元醇的色谱图，自动识别出 8+ 种单链（具有 1 至 8+ 个重复单元）

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

多元醇示例	含量 [%]	摩尔质量 M_p [Da]*	备注	是否为聚合物?
峰 H	0.20	200	R-M,	是, 低于 $(3M + 1)$ 的
峰 G	13.4	490	R-M-M	分子不到 50%
峰 F	15.7	790	R-M-M-M	
峰 E	14.8	1090		是, 无单链 > 50%
峰 D	13.3	1400		
峰 C	11.0	1810		是, 摩尔质量分布
峰 B	9.30	2190		
峰 A	22.3	2550		

表 1. 图 1 中峰的摩尔质量和重量百分比结果表明, 根据 REACH 标准, 该产品为聚合物

* 聚苯乙烯当量

通过将 REACH 标准与 GPC/SEC 结果进行比较, 证明满足了所有三项 REACH 标准。因此, 根据 REACH 的定义, 该物质是聚合物。

低关注度聚合物

产品注册通常需要 M_w (重均分子量) 和低于所定义摩尔质量 (例如 500 或 1000 Da) 的质量分数。将产品归类为低关注度聚合物 (PLC) 需要这一信息。遗憾的是, 不同国家/地区对 PLCs 的定义可能不同, 需要采取的措施也不同, 但 GPC/SEC 都能够提供所需的信息。

除了每个完全分离的峰的峰面积百分比外, GPC/SEC 结果还包括摩尔质量分布, 使您能够确定 M_w 并推断出具体馏分。当有校准曲线时 (或者更准确地说, 当拥有每个洗脱体积的

摩尔质量信息), 可以从色谱图中获得摩尔质量分布^[3]。由于 GPC/SEC 分析中需要进行特殊的转换, 因此必须确保用于注册的结果来自真实的摩尔质量分布, 而非来自仅用摩尔质量代替洗脱体积的色谱图^[4]。

图 2 为具有宽摩尔质量分布的样品示例 (未分离为单峰), 图中显示了摩尔质量分布和摩尔质量平均值, 以及低于 500 Da 和高于 1000 Da 的分数。例如, 根据美国和中国的规定, 该样品的 M_w 高于 10000 Da, 低于 500 Da 的不到 2%, 低于 1000 Da 的不到 5%, 是一种低关注度聚合物。对于 M_w 介于 1000–10000 Da 的聚合物, 500 Da 以下的部分应低于 10%, 1000 Da 以下的部分应低于 25%。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

聚合物通常有一些例外情况，这些情况下一般不予豁免。阳离子或潜在阳离子聚合物、高分子量吸水聚合物以及降解、分解或解聚的聚合物不符合豁免条件。反应性基团也可能是一个问题，即使质量结果表明它是一种低关注度聚合物，也不能免于监管。

此外，产品注册可能还需要每个摩尔质量切片的质量分数（有时也被称为切片列表）。获得摩尔质量分布信息后，可以轻松创建切片列表。从切片列表中可以直接确定上文讨论的所需参数。

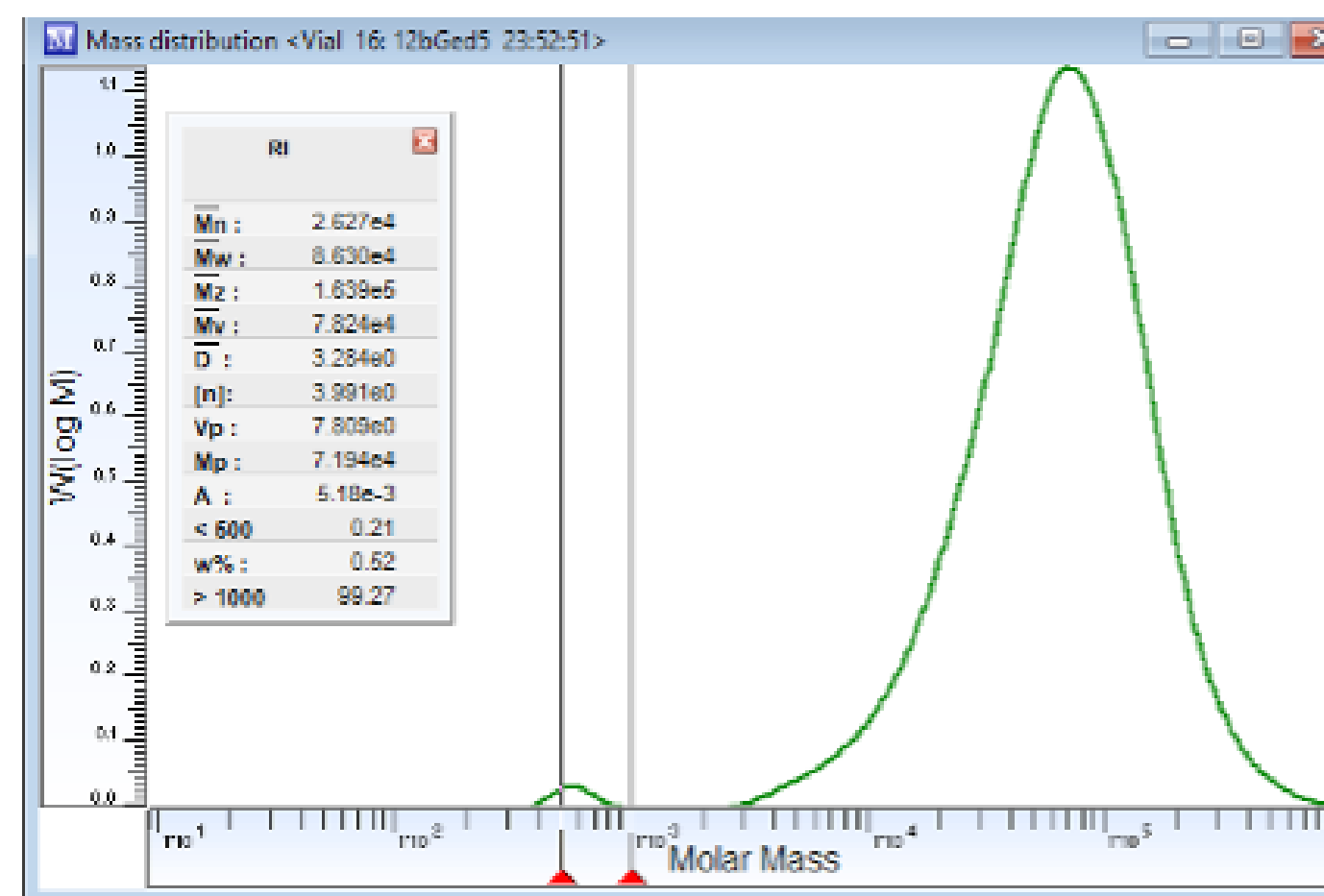


图 2. 摩尔质量分布以及用于确定产品是否为低关注度聚合物的设置

测量不确定度及分析参数的影响

为产品注册提供数据的分析科学家至少应反映 GPC/SEC 分析的两个重要部分。

首先，分析人员必须进行正确的校准。GPC/SEC 作为一种相对分析方法，通常需要使用标准物质或可以直接测量摩尔质量的其他检测器进行校准^[5]。在注册时，如果低摩尔质量部分尤其受到关注，那么质谱（如 ESI-MS 或 MALDI）对于没有化学匹配标准物质的产品而言是一种有价值的补充方法^[6]。如果有化学匹配标准物质，建议选择这些物质，而不是更通用的物质。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

要考察的第二部分是与校准存在一定关系的测量不确定度^[7]。原始数据的质量、分析条件和校准质量会对结果造成影响，测量不确定度有助于识别随机误差来源，改善数据质量。

图 3 所示为摩尔质量分布示例，其中低于 1000 Da 的部分略高于 5%。此时，数据审查特别重要，因为结果接近 PLC 分类的临界限值。更详细的分析表明，校准质量（本例中的低摩尔质量区域没有足够的数据点）和原始数据质量（本例中的检测器噪音）均为不确定度的主要来源，应加以改进，以获得更可靠的数据。尤其是在这种关键情况下，必须要有一种可靠、成熟且有据可查的方法，或许还需要其他方法和数据的支持，使公司能够做出正确的决策，并生成可靠、准确的数据。

总结

- 产品的摩尔质量决定了相应的注册类别。因此，GPC/SEC 数据对产品注册至关重要
- 仅掌握摩尔质量平均值通常是不够的。需要进行详细的分析，特别是在低摩尔质量区域

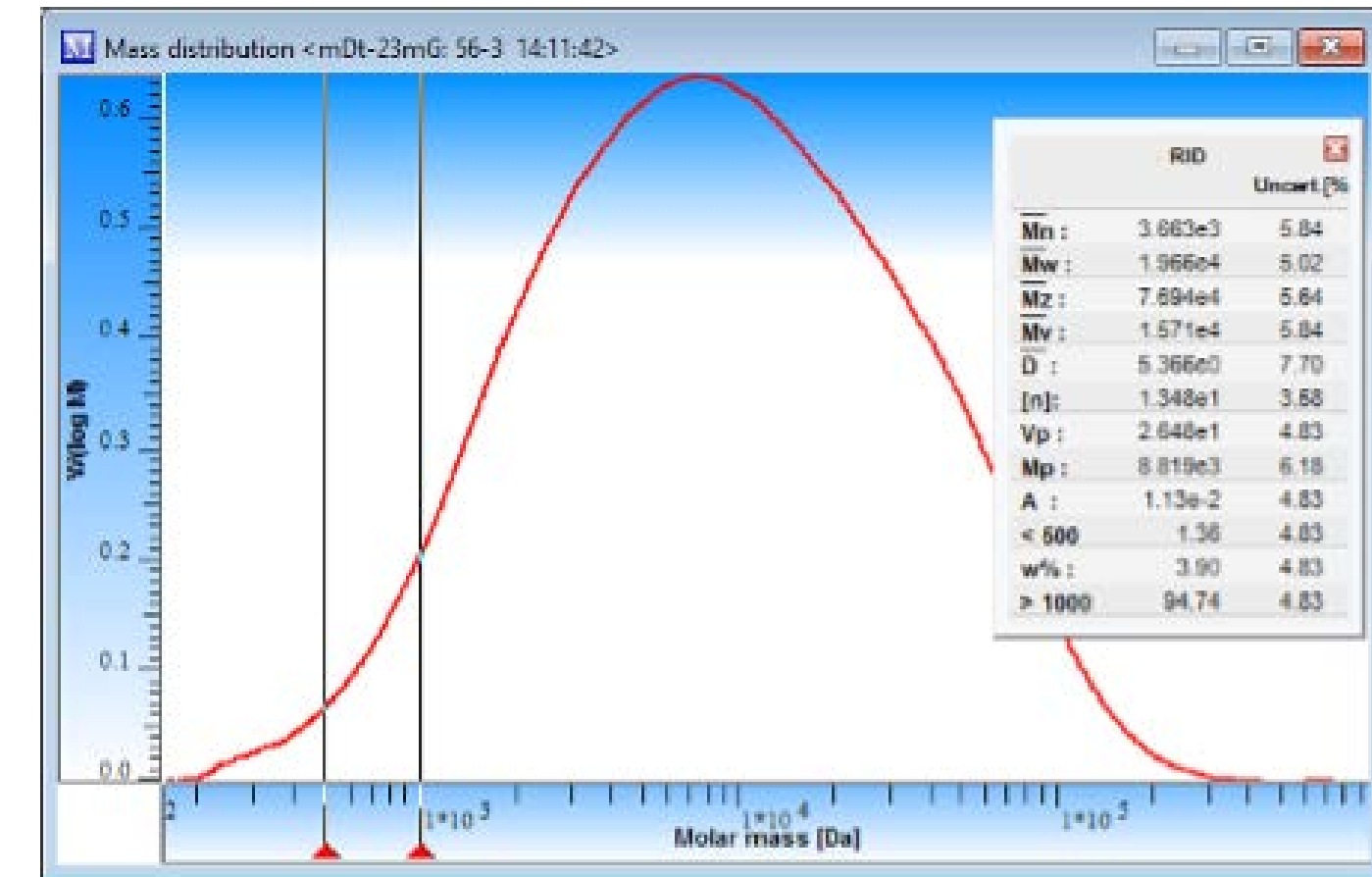


图 3. 不满足低关注度聚合物摩尔质量要求（低于 1000 Da 的部分高于 5%）的聚合物产品的摩尔质量分布测量结果

- 注册数据只能在 y 轴 $w(\log M)$ 得到正确转换的情况下，通过真实的摩尔质量分布获得。否则，各个馏分的结果可能是错误的
- 确定结果的不确定度对于确保提交的结果具有高质量非常重要

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及
更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

参考文献

1. https://echa.europa.eu/documents/10162/2324906/polymers_en.pdf/9a74545f-05be-4e10-8555-4d7cf051bbed
2. Test No.118: Determination of the Number-Average Molecular Weight and the Molecular Weight Distribution of Polymers Using Gel Permeation Chromatography. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section 1, Physical-Chemical Properties, **1996**
3. Kilz, P.; Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC From a Chromatogram to the Molar Mass Distribution. *The Column* **2014**, 10 (22)
4. Kilz, P.; Held, D. Qualification of GPC/GFC/SEC Data and Results, in: *Quantification in LC and GC*. Wiley, **2009**
5. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**
6. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC: Absolute or True Molar Masses for Macromolecules - Mass Spectrometry as a New Solution. *The Column* **2011**, 7 (6).
7. Kilz, P.; Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC Result Uncertainty - How Reliable Are Results? *The Column* **2012**, 8 (10), 14–20

窍门与技巧: GPC/SEC 产品注册和 REACH 原载于《The Column》2017年6月, 作者 Daniela Held。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 系列电子书 — GPC/SEC 应用

1.2. 定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

GPC/SEC 是一种液相色谱 (LC) 分离技术，根据分子在溶液中的体积来分离分子。分离发生在分离柱的填料孔内。较大的分子无法进入孔中，会首先洗脱，而较小的分子比较容易渗透到孔中，会较晚洗脱。

典型的 GPC/SEC 校准曲线（比较图 1），采用摩尔质量的对数与洗脱体积作图，很好地说明了这种行为，并有助于区分三个区域。

在区域 I，即进样和排阻极限之间的区域，所有物质均无法洗脱。在排阻极限处，各种分子（与它们的大小无关）在相同的体积下洗脱，因为它们太大，无法进入任何孔中，这之后可实现高效的体积分离 — 区域 II 开始。现在，这些分子可以进入一些较大的孔，而不能进入较小的孔。在这一区域，可以准确测定摩尔质量分布。区域 II 在总渗透极限处结束。在此极限处，溶液中的分子非常小，所有分子都能渗透进所有孔。这是区域 III 的开始，如需深入了解低摩尔质量馏分或添加剂，这是最需要关注的区域。

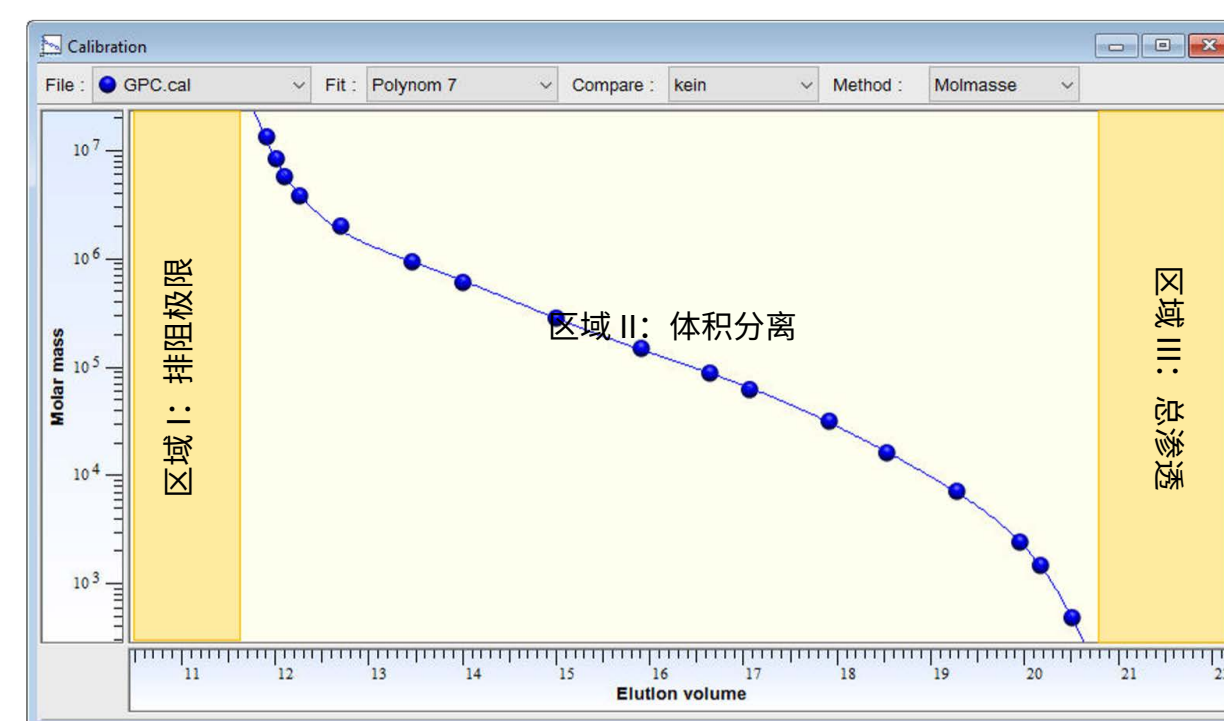


图 1. 包含三个不同区域的 GPC/SEC 校准曲线

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

理论上讲，如果分离的唯一驱动力是无相互作用的体积排阻，则无法从丁羟甲苯 (BHT) 或丙酮中分离出甲苯等分子。然而，实验中却经常观察到这一分离现象。

图 2 显示了使用具有中等摩尔质量分离范围的色谱柱得到的 BHT、甲苯和丙酮的叠加色谱图。可以看出，图中存在无法单独用分子体积差异来解释的（基线）分离。因此，该分离必定是由分析物与固定相之间的焓相互作用引起的，表明起作用的是混合模式机制。这意味着分子大小和分子与固定相之间的相互作用对洗脱行为都有影响。

虽然在通过 GPC/SEC 测定聚合物的摩尔质量时应极力避免相互作用，但这种混合分离是有利的，因为它可以鉴定甚至定量低摩尔物质。

鉴定

图 3 为 QC 样品的色谱图，具有一个宽聚合物峰并在低摩尔质量范围（高洗脱体积）和接近总渗透极限处洗脱出多个不同的峰。第一步是区分样品峰和典型系统峰。这可以通过测量空白样品来实现。空白是用与样品相同的方法处理过的纯流动相（理想情况下取自流动相瓶）。

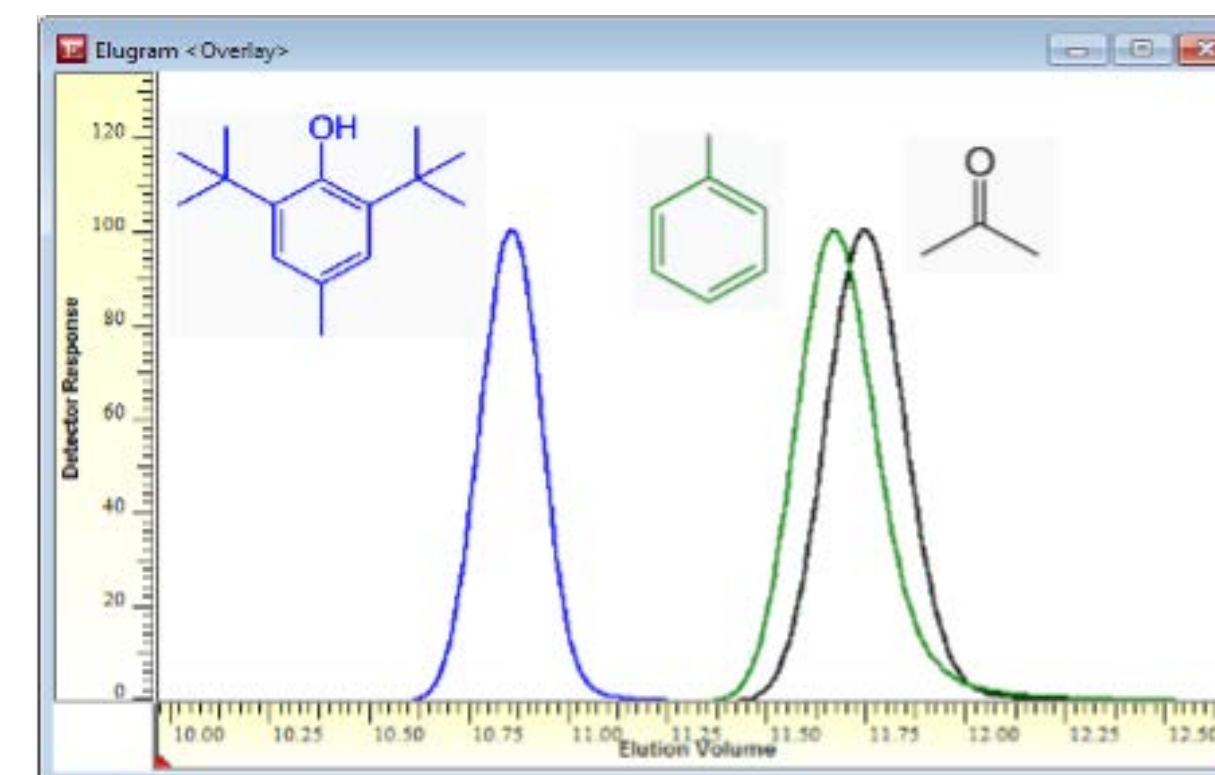


图 2. BHT（蓝色）、甲苯（绿色）和丙酮（黑色）的叠加图。尽管分子能进入所有孔内，但仍观察到分离（通过相互作用保留）

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及
更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

空白进样与样品的叠加图直接显示了哪些峰为系统峰。在图 3 的示例中，F 和 G 两个峰可确定为系统峰^[1]。峰 E 也不属于样品，该峰来自添加的内部流动标记物 BHT^[2]。样品本身包含一个长拖尾的聚合物峰（峰 A）。在拖尾区域，需要进一步表征三个峰（B、C、D）。

如何进行峰归属？

此时，可以应用多种策略。

如果存在疑似物（例如，已知生产过程中的离析物、残留单体、溶剂、引发剂或添加剂），并且可以获得纯物质，则可以对其进行处理并作为单独的样品进样。峰归属可以通过叠加色谱图或比较洗脱体积来完成。也可以向原始样品中加入疑似物，然后监测相应峰面积的增加情况。

然而，仅仅依靠峰位置来判断可能不够。可以通过先进的检测技术或收集馏分后进行离线表征，以此来进行验证。当缺少关于添加剂或污染物的信息时，也建议这样做。

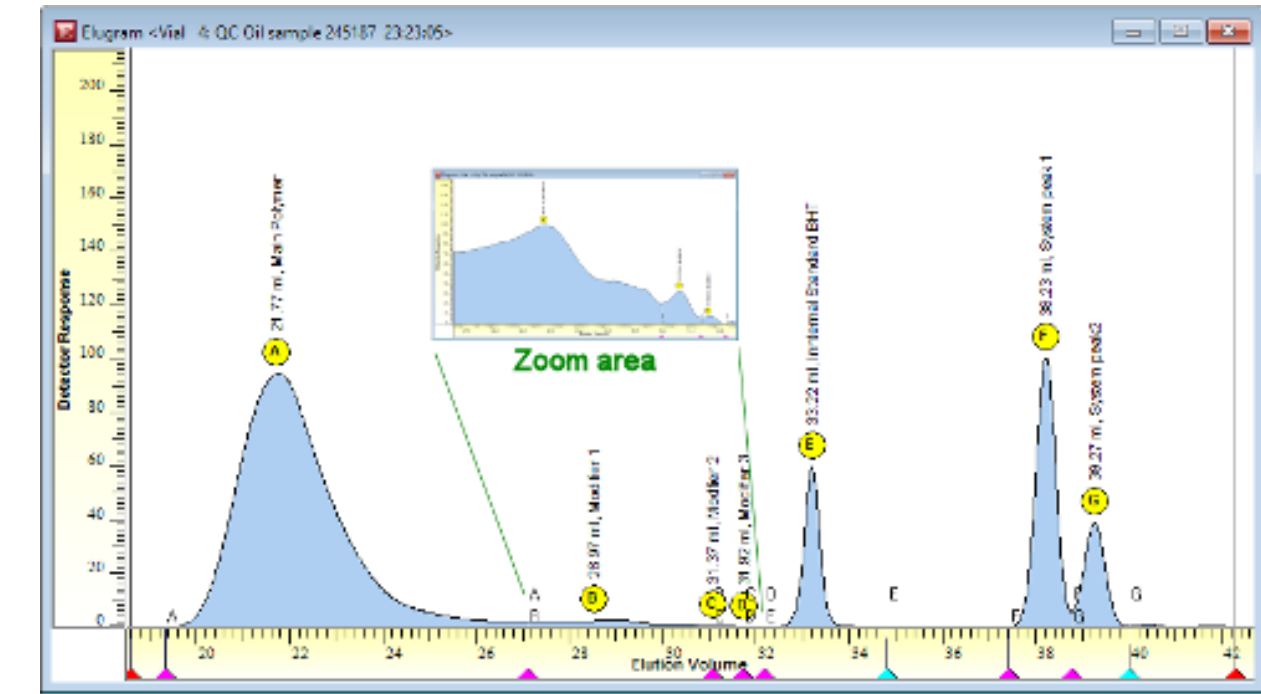


图 3. 油类样品的色谱图。峰 F 和 G 为系统峰。峰 E 为内部流动标记物 BHT。插图所示为低摩尔质量馏分的放大图，应对其中的峰 B、C 和 D 进行鉴定和定量

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

一种简单且经济有效的方法是使用额外的 UV 检测。

GPC/SEC 系统通常配备两种不同类型的浓度检测器，包括通用性更强的示差折光 (RI) 检测器和更具特异性的 UV 检测器 (DAD/PDA)。如果待测物质具有紫外活性，则可选择紫外波长对该物质进行特异性检测。如果 DAD/PDA 可用，谱图还可用于鉴定。

更复杂的工作则需要将 GPC/SEC 与在线质谱、NMR 或 FTIR 检测（针对少数溶剂）相结合^[3]。

一种实用的方法是分级分离和离线分析。GPC/SEC 是一种无损分析技术，因此可以收集馏分，然后采用光谱或分光光度技术对馏分进行离线表征。如果收集的馏分量不够，可重复进行分级分离。通过将分析柱替换为制备柱，可以将分析型 GPC/SEC 系统轻松升级为半制备型系统，从而实现更大的进样量。通过增加一个馏分收集器，可以轻松实现自动化。

连接 GPC/SEC 与 FTIR 的一种简单方法是使用在线收集模块。该 FTIR 接口作为系统的最后一个设备连接。当流出物离开色谱柱时，加热喷嘴会蒸发掉溶剂，非挥发性组分沉积在旋转锆盘上，从而实现不同组分的特异性分离。运行结束后，使用 FTIR 光谱仪对锆盘上的痕迹进行逐点分析。

MALDI 仪器也可以使用类似的方法。

馏分收集结合 FTIR 或 MALDI 都存在非挥发性添加剂的问题。例如，有时需要添加盐来确保正确的 GPC/SEC 分离。需要用挥发性盐代替^[4]。

定量分析

图 4 显示了高摩尔质量峰和三个低摩尔质量峰的结果。使用具有光散射检测功能的 GPC/SEC 测定聚合物峰的绝对摩尔质量分布。同时，单独使用 RI 检测器信号来确定相对峰面积（组成结果）。因此，只需一次运行即可全面表征样品。

在这样的设置中还可以进行定量分析。正如在 HPLC 分析中那样，可以轻松测定每个峰的面积百分比。还可以测定绝对浓度。完成峰归属后，可以进样分析已知浓度的纯物质，确定每个峰的 RI 检测器响应因子。

一旦获得了响应因子，就可以用它们来确定每个峰的浓度。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

请注意，该检测器校准不同于典型的 GPC/SEC 校准。检测器校准需要进样已知浓度的纯物质，而 GPC/SEC 校准则需要进样几种已知摩尔质量的标准品，以产生图 1 所示的校准曲线^[5]。

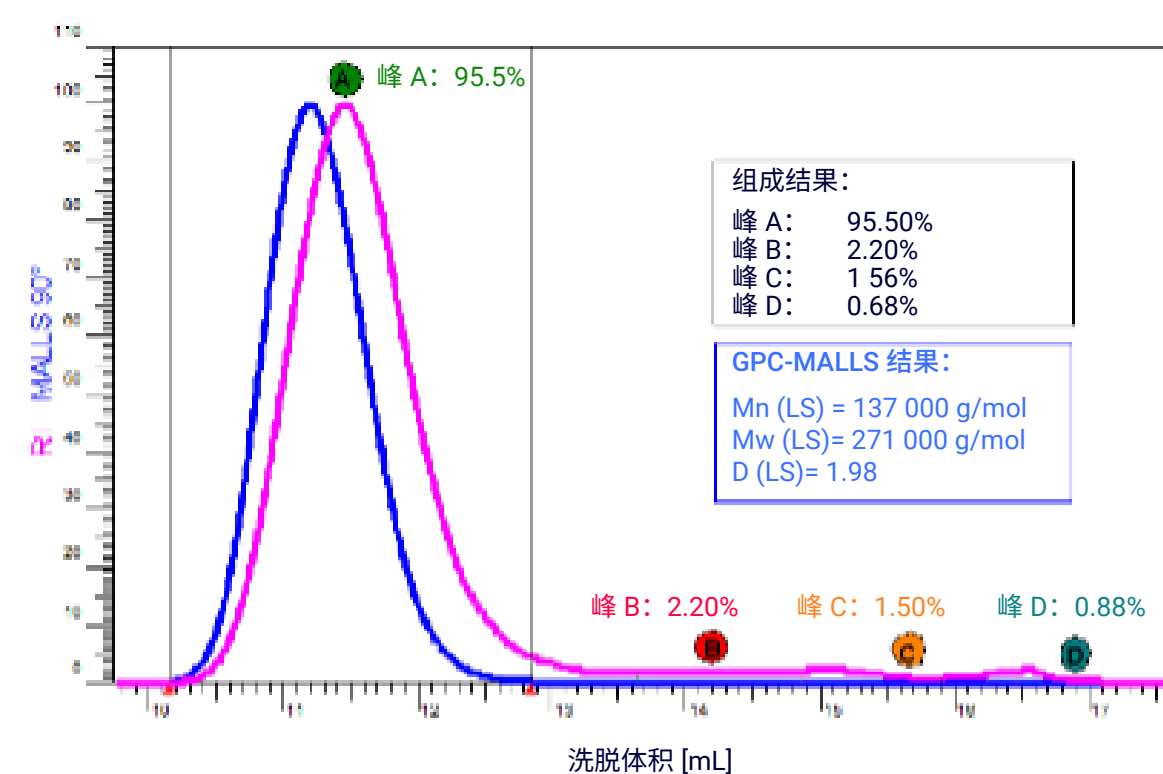


图 4. 峰 A 的绝对摩尔质量（具有光散射检测功能的 GPC/SEC）和鉴定出的四个峰的相对含量

参考文献

1. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC Peak Identification in GPC/SEC. *The Column* **2010**, 6 (22)
2. Held, D.; Radke, W. Tips & Tricks: GPC/SEC Flow Marker — An Easy Concept to Increase Reproducibility. *The Column* **2016**, 12 (6), 24–27
3. Pasch, H.; Kilz, P. Coupled Liquid Chromatographic Techniques in Molecular Characterization, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, **2006**
4. Held, D. Tips & Tricks: Evaporative Light Scattering Detection in GPC/SEC. *The Column* **2013**, 9, (18)
5. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**

总结

- GPC/SEC 是一种无损分级分离技术
- 可以同时获得两种不同类型的信息，即峰面积（如百分比）和摩尔质量分布
- 如果有来自生产/加工的信息提示，叠加有助于进行峰归属。分级分离后，可以采用 UV（光谱）、FTIR 或质谱等技术进行在线或离线检测，从而鉴定峰
- 检测器响应因子的测定类似于典型的 HPLC 分析。通过这些响应因子和测得的峰面积可以进行浓度测定

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 系列电子书 — GPC/SEC 应用

1.3. 使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

与合成大分子和许多生物聚合物相比，大多数蛋白质并不存在摩尔质量分布^[1]，而是具有均匀的摩尔质量。尽管如此，分级分离技术同样适用于蛋白质样品，因为可以鉴定或监测存在的聚集体。

传统上，体积排阻色谱可用于从单体或片段中分离稳定的聚集体，通过光散射或质谱等先进检测技术，还可以测定其摩尔质量和尺寸大小。

对于具有摩尔质量分布的蛋白质混合物（例如明胶），GPC/SEC 可以测定完整的摩尔质量分布，并提供各种与质量和安全相关的结果。

GPC/SEC 蛋白质分析的一个主要挑战是需要开发一种稳定的方法，可以消除与分离柱固定相之间的不良相互作用。

采用 GPC/SEC 分析蛋白质的优势和限制是什么？

GPC/SEC 的一个主要优势是，它是一种无损分离技术。它根据样品中大分子的尺寸对样品进行分离。在应用先进的检测技术（如质谱、光散射或粘度测定）分析样品之前，GPC/SEC 是降低样品复杂性的理想选择。与直接分析未进行分级分离的异质性样品相比，样品复杂性降低有助于简化数据评估和解析。使用两个或多个检测器的先进检测技术通常可用于在线方法。如果这种方法不可行，GPC/SEC 技术支持收集样品馏分用于进一步的离线表征。

在 GPC/SEC 中，可以在天然条件下分析溶液中的蛋白质，而无需变性，此时构象和蛋白质间相互作用得以完整保留，因此是一种理想的方法。因此，许多 GPC/SEC 分离保留了大分子的生物活性。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

然而，真正的 GPC/SEC 分离条件（即仅基于溶液中蛋白质的大小进行分离）可能难以实现。样品与固定相之间通常会发生相互作用，导致峰形不理想、保留时间不稳定和/或回收率降低。由于不同的蛋白质呈现不同的形状（如球状、杆状或柔性链状），它们在溶液中的体积通常与摩尔质量没有直接关系，因此需要使用更先进的检测方法来准确测定摩尔质量。

全面的蛋白质分析方法开发包括：

- 选择合适的色谱柱（或色谱柱组合），所选色谱柱应采用不会发生相互作用的合适固定相以及合适的填料粒径和孔隙率
- 调节流动相的 pH 和离子强度
- 为一系列样品选择理想的检测条件

评估样品中存在的所有组分和聚集体的色谱回收率也是一项基本要求。

方法开发中的难题

蛋白质需要在水溶液中进行分析，因此是水相 GPC/SEC 的一个子类。所有针对水相 GPC/SEC 分析的通用方法开发技巧也适用于蛋白质分析方法的开发。因此，本节仅讨论针对蛋白质分析的特定要求。

与合成聚合物或生物大分子相比，蛋白质的一个优点是尺寸通常较小，样品中分子的尺寸分布相对较窄。这样就可以使用装填小粒径填料的 GPC/SEC 色谱柱来提高效率。此外，窄分布还支持使用校准曲线非常平缓的色谱柱（在窄摩尔质量范围内具有高分离度）。因此，硅胶基 GPC/SEC 色谱柱是大多数蛋白质分析应用的首选。

从色谱分析的角度来说，蛋白质的一个缺点在于，它们具有许多官能团/带电基团，并且可能存在较大的疏水性片段或序列。由于这两个特征，很难开发出一种真正的 GPC/SEC 方法，即色谱柱固定相和蛋白质之间不存在（或仅存在非常小的）静电和疏水相互作用。相互作用会导致一定程度的吸附，从而使回收率降低（甚至完全吸附，无法检测到峰）、洗脱时间偏移或峰变形（如拖尾）。

为了避免或尽可能降低相互作用，需要调节 pH 值、离子强度/含盐量和潜在的有机改性剂含量。然而，加入的盐或改性剂的浓度是有限制的，因为它还会影响样品的溶解度。如果无法开发稳定的 GPC/SEC 方法，则需要考虑改变固定相（从硅胶色谱柱换为聚合物型色谱柱）。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

开发方法时首先在该蛋白质的等电点 (pI) 下对其进行分析是一个不错的选择。蛋白质的 pI 是指由构成蛋白质的不同氨基酸所产生的正负电荷平衡时的 pH 值。带正电荷的铵基和带负电荷的羧基都不占优势。对于每种蛋白质而言，理想的 GPC/SEC 方法是使用 pH 值与 pI 匹配的水溶液运行。

为了避免针对每种蛋白质都开发一种方法，流动相的 pH 应接近 pI，并添加额外的聚电解质、一价盐（如氯化钠或氯化钾）。电解质有助于屏蔽残余电荷，进一步降低蛋白质与固定相之间不利的相互作用。

另一个需要考虑的参数是蛋白质的疏水性。最重要的是蛋白质中不同 R 基团的极性。根据 R 基团的不同，氨基酸可

分为带电氨基酸、亲水性氨基酸或疏水性氨基酸。含有亮氨酸、丙氨酸和缬氨酸等多种氨基酸的蛋白质具有较强的疏水性，不能在含有丝氨酸、精氨酸或组氨酸等氨基酸的亲水性或带电蛋白质相同的条件下进行分析。

图 1 比较了离子强度对不同疏水性蛋白质色谱图的影响。糜蛋白酶原 A 等亲水性蛋白质应在高离子强度下测定。牛血清白蛋白 (BSA) 是一种既不疏水也不亲水的蛋白质，可以在高离子强度和低离子强度下测定。丙氨酸或取代丙氨酸等疏水性氨基酸应在低离子强度下进行分析。如果不根据蛋白质的极性来调节离子强度，分离就会失败。

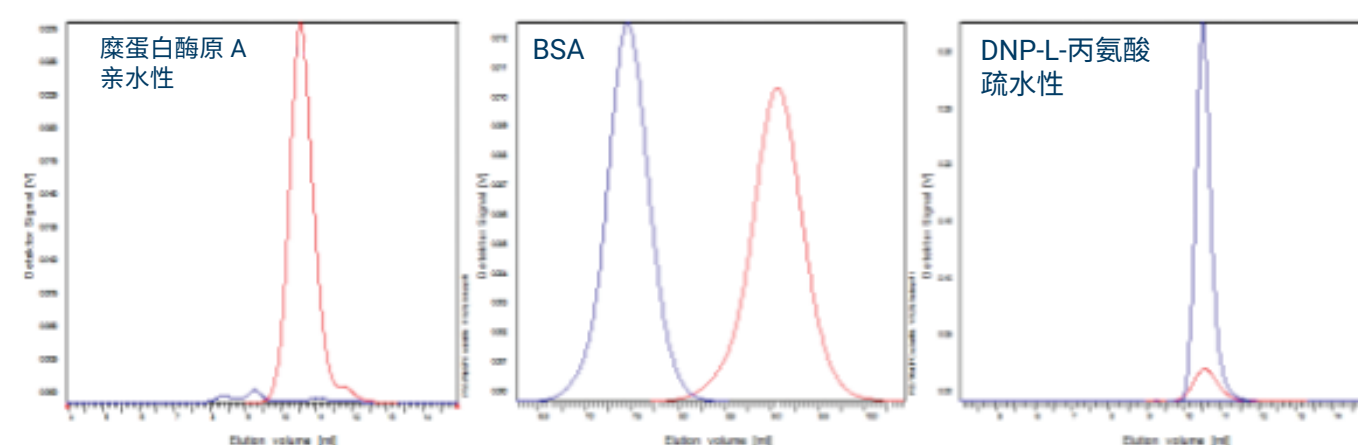


图 1. 不同疏水性的蛋白质/氨基酸的色谱图 (蓝色: 低离子强度, 红色: 高离子强度)

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

使用标准液相色谱设备和带有不锈钢可润湿组件的检测器流通池时，可能会出现意想不到的峰形（例如拖尾）。为了尽可能减少金属-蛋白质加合物或不利的蛋白质相互作用，应考虑使用生物惰性或生物兼容性色谱系统和色谱柱硬件。当需要使用苛刻的流动相条件（如极端 pH 值或高盐浓度）时，这类系统也具有优势。从操作上讲，使用杀菌剂或抑菌剂将有助于消除细菌污染。否则，几个小时内水性流动相中就会开始有藻类生长，并可能导致严重的问题。

检测选择

可以使用紫外检测器检测蛋白质。这非常方便，因为紫外检测器易于使用，并且可以在宽范围内提供线性响应、高灵敏度和稳定基线。每种紫外波长范围都有其优势。通常选择 280 nm 作为标准波长。使用近紫外或更长的波长 (380–315 nm) 可检测色氨酸等芳香族氨基酸。通过选择远紫外范围 (280–200 nm) 内的波长（如 220 nm，酰胺肽键在此波长下具有强吸收），可提供更高的灵敏度。

还有许多装置可以同时使用两种不同的波长来测量蛋白质浓度。这种双波长检测方法已被提议用于纯度研究，其中低波长为低丰度物质提供高灵敏度，而高波长则为主要物质（例如单体）提供更宽的线性范围^[2]。

为了克服基于尺寸大小的 GPC/SEC 分离的局限性，可以使用质谱 (MS) 或光散射 (LS) 检测直接测定摩尔质量。这两种方法应被视为互补技术，因为它们为完全不同的应用领域提供了解决方案。当需要获得低至中等摩尔质量范围内数量有限的各种物质的详细信息时，可以使用 MS。MS 是迄今为止最精确和准确的摩尔质量测定方法。然而，当样品复杂性和摩尔质量增加时，所得质谱图的复杂性使得几乎无法实现数据解析和结果分配。幸运的是，在这些情况下可以使用 LS，因为这种技术非常适用于分析多分散、高摩尔质量的样品。LS 的另一个优势在于，它对高摩尔质量物质非常敏感，即使在低浓度下也是如此。因此，相比于其他检测器，LS 通常能够以更高的灵敏度检测高阶聚集体。

从操作上讲，GPC/SEC 联用 MS 面临的挑战是所需流动相的组成。GPC/SEC 的流动相通常含有与 MS 不兼容的高浓度非挥发性盐，这会污染质谱仪并导致离子抑制问题。因此，与 LS 联用的方法更容易实现得多。LS 检测在溶液中进行，无需蒸发流动相，并可获得 MS 检测中因蛋白质电离和气化而不可逆地丢失的信息。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

市面上有许多 LS 检测器，它们的本质区别在于用于同时获取散射强度的角度数量不同^[3]。

大多数球状蛋白质的尺寸非常小，90° 光散射通常足以测量其摩尔质量。遗憾的是，采用单一角度无法测量其尺寸（回转半径）。要获得该信息需要使用多角度光散射检测 (MALS) 或其他技术，如动态光散射 (DLS，也称为 QUELS) 来测量流体动力学半径 (Rh)。

合成聚合物的 GPC/SEC 分析中最常用的检测器 — 示差折光检测器 (RI) 也可用于蛋白质分析。然而，RI 主要与 LS 检测器结合用于折射率增量 dn/dc 的在线测量。该参数与样品相关，对光散射结果的准确度影响非常大。此外，它还

取决于多项实验设置，包括 LS 检测器波长、溶剂等。然而，对于常规筛查，通常 0.185 mL/g 的平均 dn/dc 可用于许多蛋白质，但应注意， dn/dc 会因蛋白质类型的不同而存在显著差异^[4]。

此外，还可使用其他 GPC/SEC 检测器。例如，一些蛋白质可以用荧光检测器进行分析，以提高灵敏度和/或选择性。

在线粘度计的使用越来越普遍，例如用于区分变性和聚集。粘度计可以检测密度差异，帮助识别结构变化。因此，合成聚合物 GPC/SEC 分析中常用的多重检测方法在蛋白质分析中的应用也越来越广泛。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

结果如何?

图 2 显示了使用 UV-LS 研究蛋白质聚集获得的原始数据和结果。使用 UV 曲线结合光散射曲线进行分析可直接提供二聚体和单体的摩尔质量信息，而无需进行色谱柱校准。由于较小峰的摩尔质量约为较大峰的两倍，表明形成了二聚体。在本例中，通过分析 UV 曲线的峰面积还确定了二聚体的含量，约为 10%。

图 3 为在同一组色谱柱上分析全长单克隆抗体 (mAb) 和抗体片段获得的色谱图叠加图。红色曲线为全长抗体及其二聚体的紫外信号，蓝色曲线为抗体片段及其高阶聚集体的紫外信号。

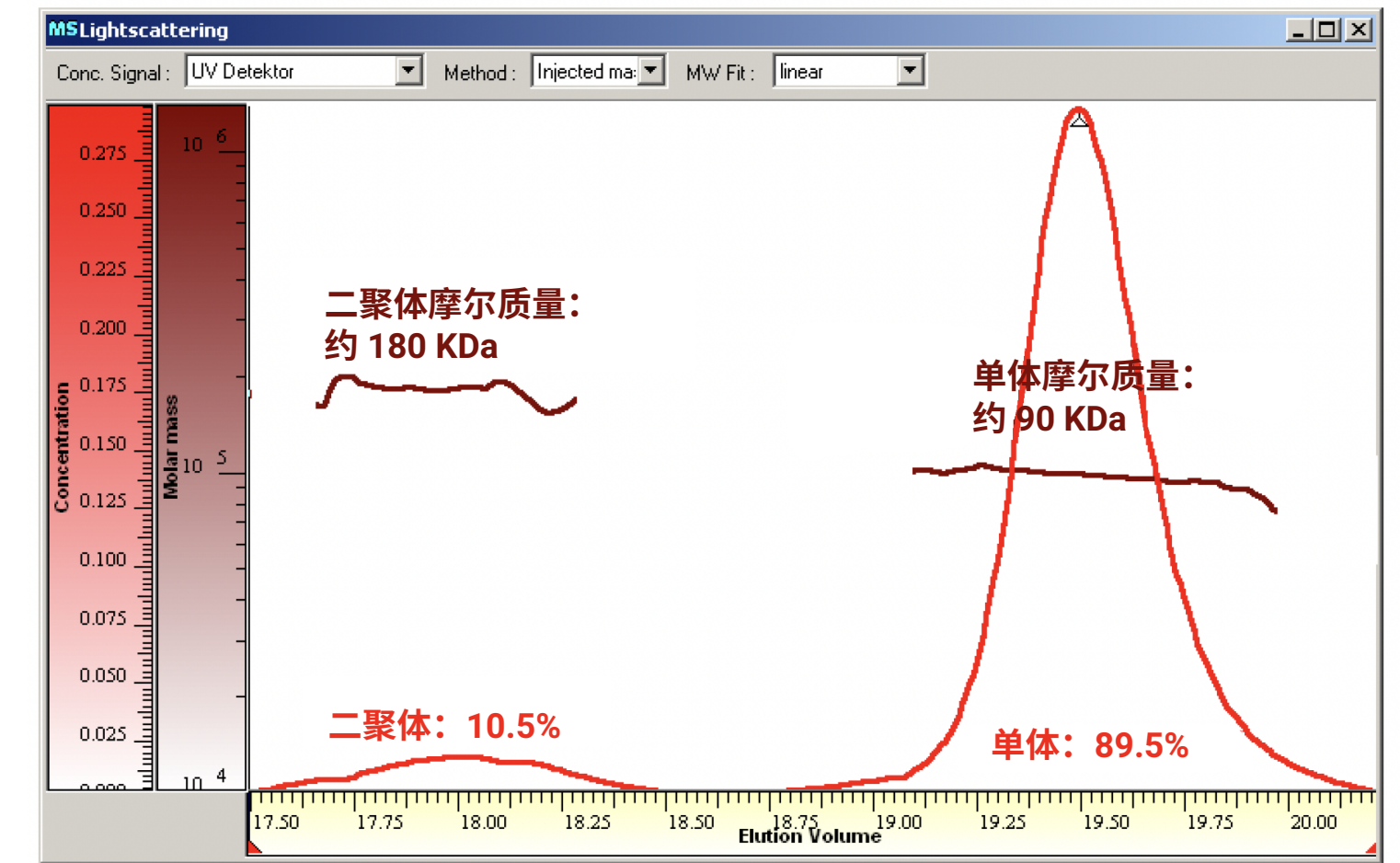


图 2. 使用 UV-LS 研究蛋白质聚集获得的原始数据和结果。红色曲线为单体和二聚体的浓度，深红色线为每个洗脱体积下在线测得的摩尔质量

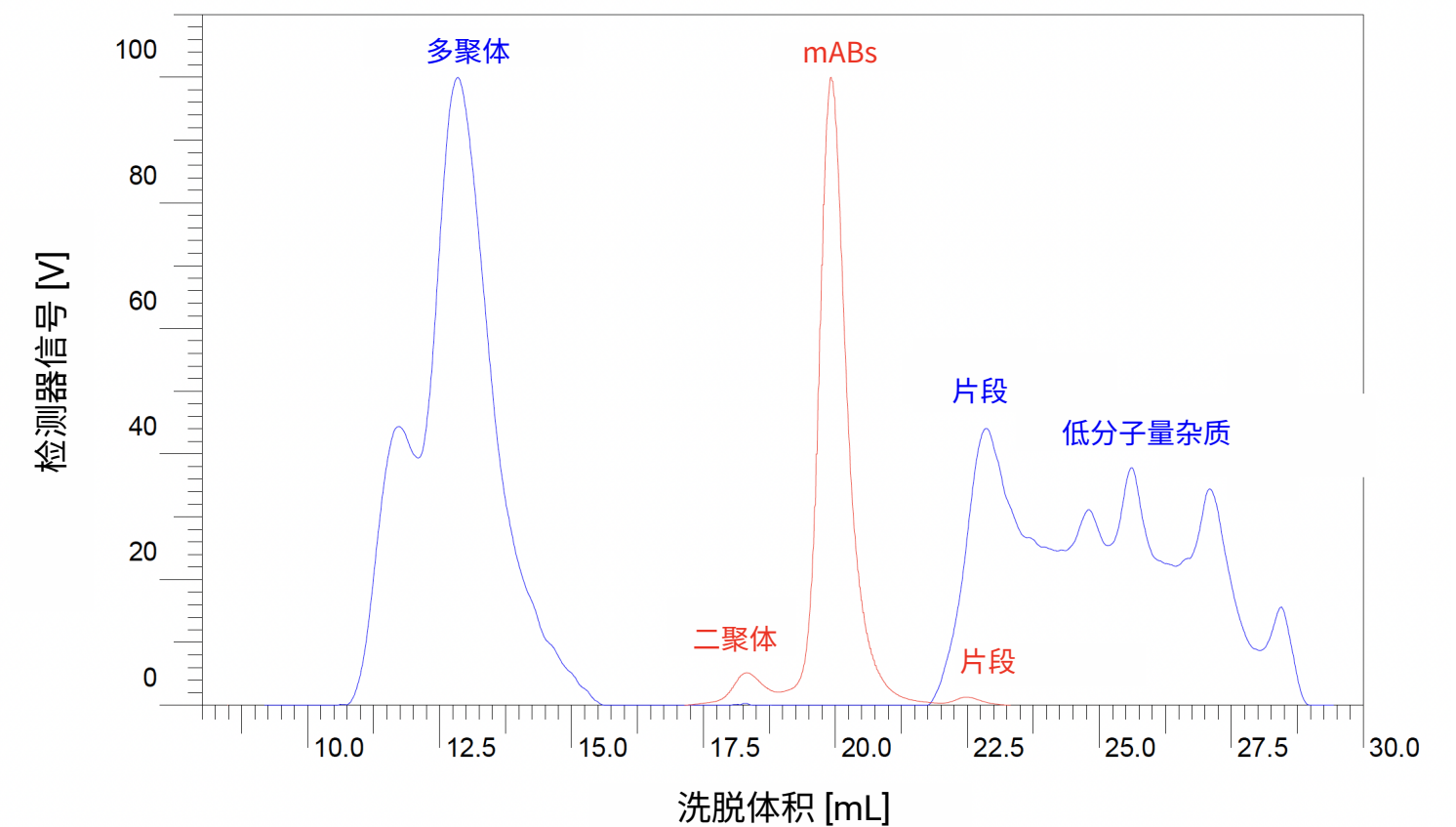


图 3. 在同一组色谱柱上获得的单克隆抗体 (mAb) (红色, 紫外曲线) 和片段 (蓝色, 紫外曲线) 的色谱图叠加图

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及
更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

图 4 为蛋白质的摩尔质量分布结果。在叠加图中，可以明确区分 3 种不同的明胶，并轻松确定摩尔质量平均值和摩尔质量分布。

总结

- GPC/SEC 是用于研究蛋白质聚集的强大技术。它可以在天然条件下根据蛋白质在溶液中的尺寸大小分离蛋白质
- 基于尺寸大小的分离条件通常需要对流动相的离子强度进行调整。方法开发还应包括回收率研究
- 先进的检测方法（MS 或 LS 作为补充技术）有助于克服 GPC/SEC 的局限性，直接测量摩尔质量
- 其他典型的 GPC/SEC 检测器（如 RI 或粘度计）可提供 dn/dc（LS 评估所需）或结构信息

参考文献

1. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC The Importance of Molar Mass Distributions. *The Column* **2007**
2. Bond, M. et al. Evaluation of a Dual-Wavelength Size Exclusion HPLC Method with Improved Sensitivity to Detect Protein Aggregates and Its Use to Better Characterize Degradation Pathways of an IgG1 Monoclonal Antibody. *J Pharm Sci.* **2010**, 99 (6), 2582–97
3. Held, D.; Kilz, P. Tips & Tricks: GPC/SEC How to Choose a Static Light-Scattering Technique for Molar Mass Determination. *The Column* **2009**
4. Zhao, H.; Brown, P.; Schuck, P. On the Distribution of Protein Refractive Index Increments. *Biophys J.* **2011**, 100 (9), 2309–17

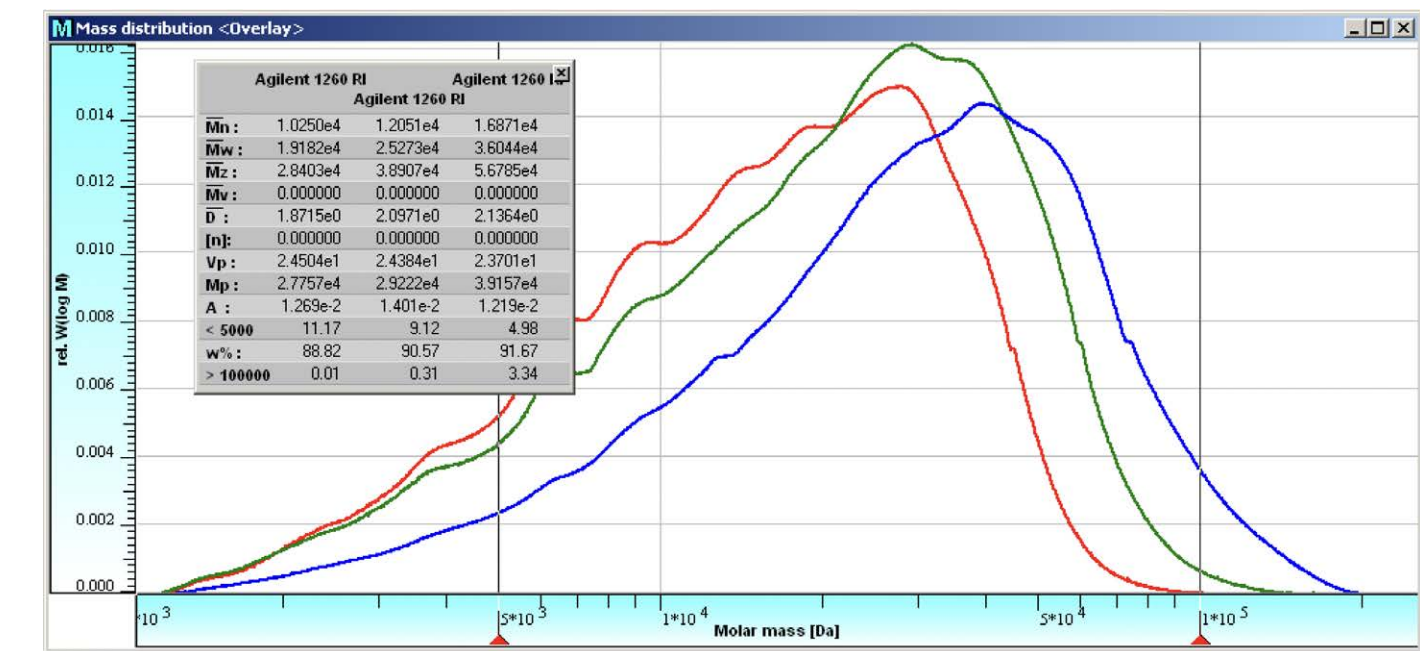


图 4. 3 种不同明胶的摩尔质量分布叠加图：silver 140 bloom（红色）、gold 180 bloom（绿色）、platinum 240 bloom（蓝色）

1.4. 使用宽范围标准品进行校准

对于聚合物材料，没有相同化学类型的窄分布摩尔质量标准品，仅使用浓度检测器无法获得可靠、真实的摩尔质量。然而，使用具有相同聚合物类型和宽摩尔质量分布的经过准确测量的样品，可以获得可靠、真实的摩尔质量。这种方法不需要额外的仪器，是成本更高的摩尔质量敏感型检测器（如在线光散射或在线粘度检测器）的一种经济有效的替代方案。

前言

凝胶渗透色谱/体积排阻色谱 (GPC/SEC) 是一种简单、可靠的方法，用于测定大分子的摩尔质量和摩尔质量分布 (MMD)。该方法的分离原理基于溶液中大分子的尺寸大小。大分子越大，越早从色谱柱中流出。

GPC/SEC 获得的主要结果是显示检测器信号随洗脱体积的变化的色谱图。为了获得摩尔质量分布，必须使用校准曲线对色谱图进行转换，该曲线将洗脱体积与洗脱的聚合物的摩尔质量进行了关联。这些校准曲线通常使用窄分布聚合物标准品建立。然而，具有相同摩尔质量但化学性质

不同的聚合物在溶液中的尺寸大小往往存在巨大差异。因此，只有当校准标准品的化学结构与样品的结构匹配时，才能获得正确的摩尔质量。

遗憾的是，对于许多重要的聚合物，如聚酰胺、聚酯或聚烯烃，目前尚无商品化的窄范围标准品。要获得真实摩尔质量，需要使用其他方法。使用摩尔质量敏感型检测器是一种选择。但它需要额外的昂贵仪器、更准确的样品前处理、更多的时间，以及更高水平的数据评估知识。尤其对于质量控制实验室而言，这些限制存在很大的影响。此时，往往需要快速、稳定且易于使用的校准方法。一种合适且更经济有效的解决方案是使用宽分布标准品。

使用宽分布样品进行校准 — 原理是什么？

对于窄分布聚合物，可以轻松鉴定并分配色谱图中的最大峰值。对于宽分布样品而言，情况并非如此。即使 M_p 值已知，也很难准确鉴定最大峰值，因为这取决于分离柱的分离度。因此，不建议通过简单地绘制最大峰值处的摩尔质量值与洗脱体积之间的关系图来生成校准曲线。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 中广泛认可的通用校准概念^[1] 导致使用窄分布校准品构建的校准曲线与分析物之间存在以下关系：

$$\log M_{\text{分析物}} = A + B \times \log M_{\text{校准标准品}}$$

这假设了校准标准品和分析物均在不与固定相发生相互作用的情况下流出。

参数 A 使校准曲线相对于窄分布校准标准品生成的校准曲线发生垂直方向的偏移，而参数 B 的变化则会改变校准曲线的斜率（比较图 1）。参数 A 和 B 与同一溶剂中分析物和校准品的马克-霍温克参数有关^[2-5]。由于参数 A 和 B 对校准曲线的影响，给定色谱图的计算 MMD 和摩尔质量平均值也会随着参数的变化而变化。

如表 1 所示，使用聚苯乙烯校准曲线（基础校准）和不同的 A 和 B 参数组合对宽分布聚乳酸 (PLA) 样品的两幅色谱图进行了评估。使用聚苯乙烯校准曲线导致真实摩尔质量值 (M_w 和 M_n) 被高估了约 2 倍。改变参数使摩尔质量值更接近其真实值。然而，对于不同的样品，需要同时改变这两个参数才能获得可靠的结果。在最后一行给出的经优化的 A 和 B 参数下，获得了与光散射参考值高度一致的结果。

表 1 还说明了如何根据色谱图和宽分布标准品的已知摩尔质量值确定参数 A 和 B。为了确定 A 和 B，需要系统地改变它们的数值，直到已知摩尔质量与使用基础校准从各自色谱图计算得到的摩尔质量完全一致。

幸运的是，在大多数现代 GPC/SEC 软件中，这种改变参数的操作可以自动完成。获得参数 A 和 B 的计算值后，就可以从基础校准中轻松推导出与分析物结构相同的未知样品的合适校准曲线。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

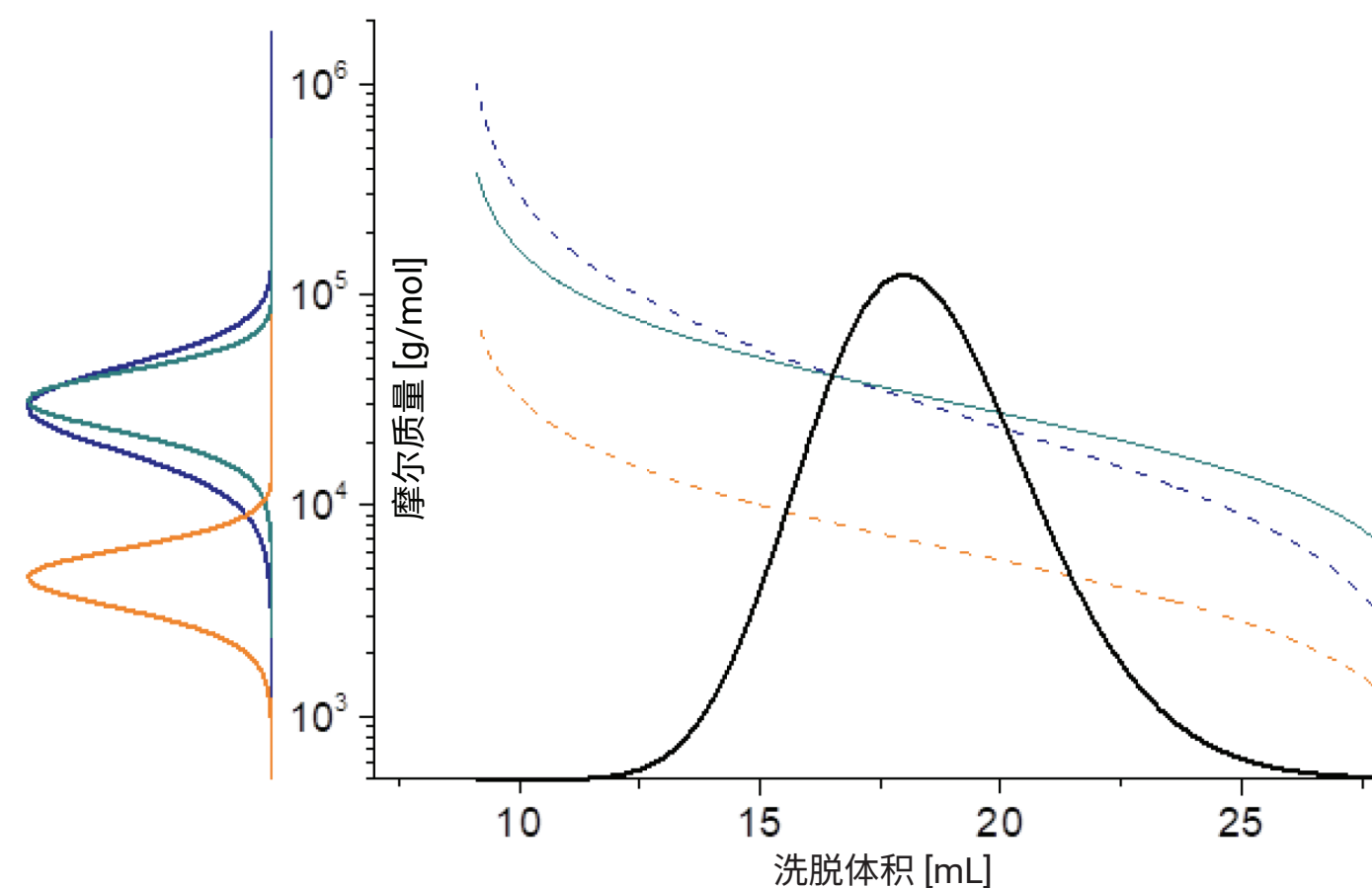


图 1. 参数 A 和 B 对校准曲线的影响，以及对分析物 MMD 的影响

- 蓝绿色：原始（基础）校准曲线及由此推导出的 MMD（左）
- 蓝色：通过改变参数 B（斜率），由蓝绿色曲线推导出的校准曲线和 MMD
- 橙色：通过改变参数 A（垂直偏移），由蓝色曲线推导出的校准曲线和 MMD

	PLA-样品 1 M_w [g/mol]	PLA-样品 2 M_w [g/mol]
光散射参考值	37000	500000
聚苯乙烯校准 ($A = B = 1$)	82300	1247000
$A = 0.5$; $B = 1$	35400	580000
$A = 0.5$; $B = 8$	3790	355000
来自软件的优化值 $A = 0.717$; $B = 0.957$	36950	500700

表 1. 参数 A 和 B 的变化对由聚苯乙烯校准曲线和宽分布 PLA 样品色谱图推导出的摩尔质量的影响

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

与其他宽分布标准品校准方法相比，前文所述的方法得益于基础校准揭示了色谱柱填料的孔径分布，从而揭示了校准曲线的真实形状（在大多数情况下为 S 形或非线性）、排阻体积以及基础校准曲线的分离极限。另一个优点是可以使用多个样品来创建校准曲线。这提高了准确度，并且能够覆盖更宽的摩尔质量范围，而无需外推。

使用宽范围标准品建立校准曲线的过程

为上述程序建立校准曲线需要：

1. 使用具有任意化学结构的窄分布标准品（如用于许多有机溶剂的聚苯乙烯或用于水溶液应用的普鲁兰多糖或 PEO/PEG）建立的常规校准曲线（基础校准）
2. 至少一个已知 M_w 和 M_n 且与待表征分析物具有相同化学结构的宽分布样品；如果使用两个及以上的宽分布样品，每个样品只需一个摩尔质量平均值（如 M_w 或 M_n ）即可

然后，程序非常简单：

- 在 GPC/SEC 系统上运行窄分布标准品和宽分布标准品
- 使用窄分布校准标准品的摩尔质量 (M_p) 和最大峰值建立基础校准^[6]
- 使用软件工具（例如 Agilent WinGPC 或 Agilent OpenLab CDS GPC/SEC）移动校准曲线并调整斜率，使校准为宽分布样品提供正确的结果。这意味着软件会使用宽分布标准品的色谱图并通过应用已知的摩尔质量平均值在内部确定优化的参数 A 和 B
- 保存新的校准曲线，以用于测定摩尔质量未知的样品的完整摩尔质量分布和真实摩尔质量平均值

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

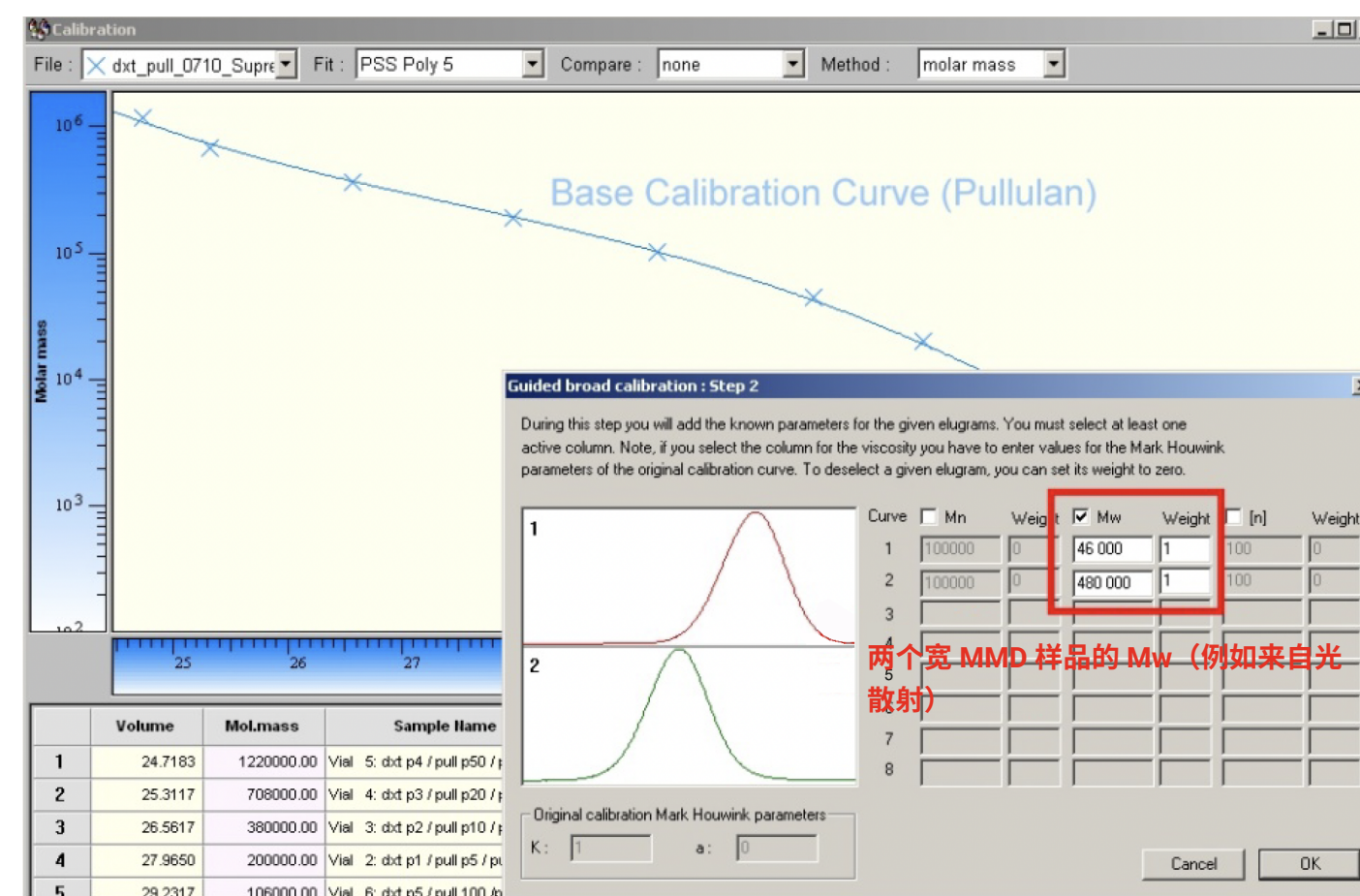


图 2. 基础校准和已知 M_w 的两个宽分布样品的色谱图。为了提高准确度和摩尔质量范围，可以使用多达 8 个不同的样品

图 2 显示了宽分布标准品的色谱图以及使用宽分布标准品校准所需的条件。为了提高校准的准确度，应使用多个宽分布标准品。如需覆盖更宽的摩尔质量范围，建议使用多个样品。

图 3 显示了常规/基础校准（蓝色）和测定 A 和 B 后得到的校准曲线（红色）的比较。该校准曲线随后用于评估未知样品，它为该类型的所有样品提供了真实的摩尔质量。

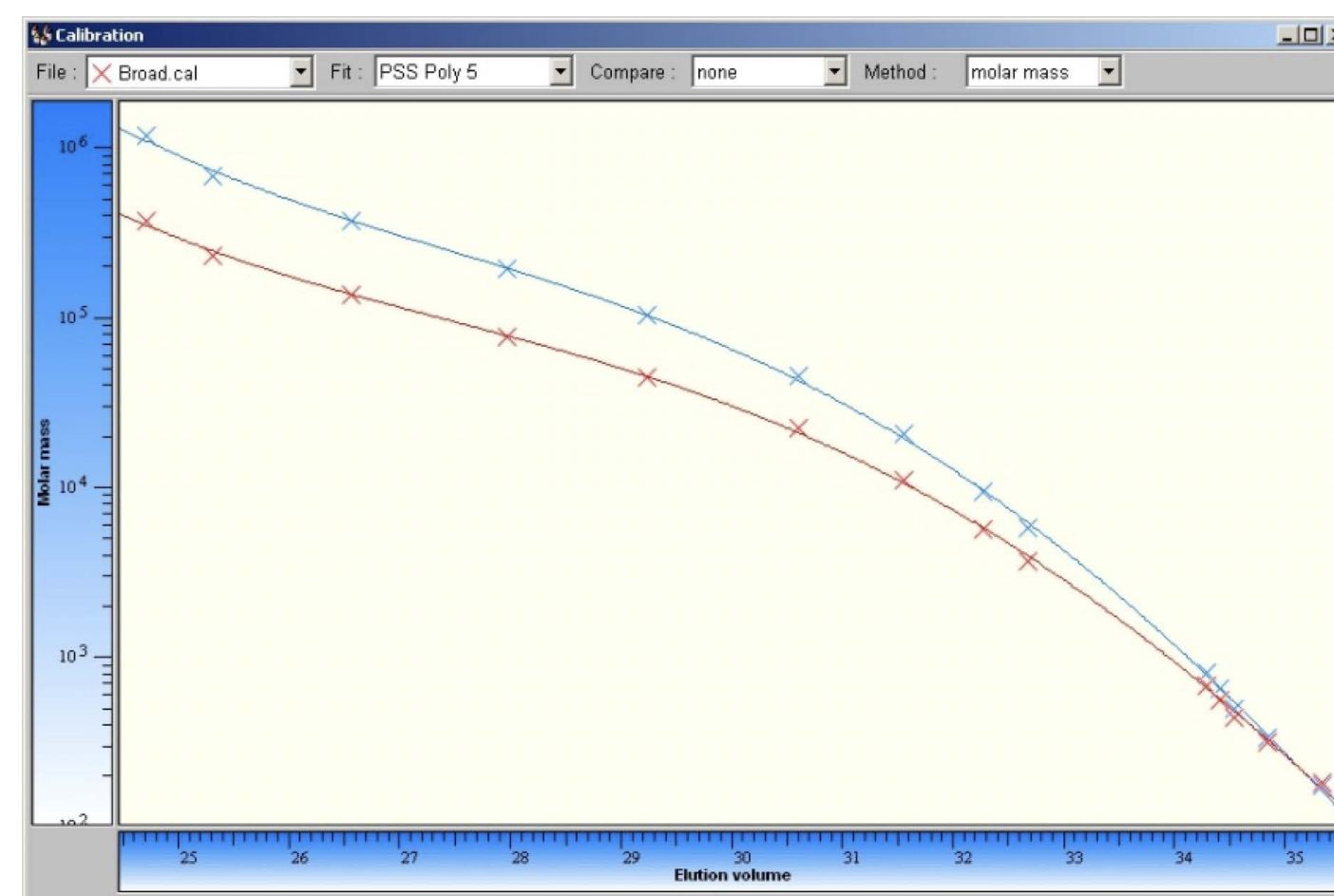


图 3. 比较普鲁兰多糖基础校准曲线（蓝色）与使用来自宽摩尔质量分布样品的优化 A 和 B 值的校准曲线（红色）

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

如何获取宽分布标准品

供应商提供的具有各种化学结构的宽分布标准品数量有限。如果宽分布标准品尚未商品化，样品检测实验室可以使用通过绝对检测技术获得的批量测量结果来确定真实摩尔质量值，例如通过光散射测量 M_w ，或通过 NMR 或渗透压测定法测量 M_n 。利用多重检测 GPC/SEC 进行在线测定也可以解决这一问题

参考文献

1. Grubisic, Z.; Rempp, P.; Benoît, H. A Universal Calibration for Gel Permeation Chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1967**, 5 (9), 753–759
2. Mori, S. Calibration of Size Exclusion Chromatography Columns for Determination of Polymer Molecular Weight Distribution. *Anal Chem* **1981**, 53, 1813–1818
3. Mahabadi, H.; O’Driscoll, K. A Gel Permeation Chromatography Calibration Method for a Broad Molecular Weight Distribution Polymer. *J Appl Polym Sci* **1977**, 21, 1283–1287
4. Weiss, A.; Cohn-Ginsberg, E. A Note on the Universal Calibration Curve for Gel Permeation Chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1969**, 7 (5), 379–381
5. Radke, W. Chromatography of Polymers, in: *Macromolecular Engineering*, Vol. 3. Wiley-VCH, **2007**, 1881–1936
6. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**

总结

- 对于质量控制实验室而言，使用宽分布标准品进行校准是一种快速且简便易用的方法，无需昂贵的先进检测技术
- 可以通过批量方法从合同分析实验室轻松获得具有宽摩尔质量分布和已知 M_w 和 M_n 值的标准品。这使得科学家可以在全球范围内进行准确的摩尔质量测定

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 系列电子书 — GPC/SEC 应用

1.5. 高摩尔质量样品的分析技巧

GPC/SEC 是一种可用于摩尔质量范围从几百到几百万道尔顿的各种样品的分析方法。虽然低摩尔质量样品的分析很简单，但数百万道尔顿范围内的高摩尔质量样品的分析则需要更加谨慎和更全面的了解。

样品前处理

大分子的分析需要耐心，对于高摩尔质量样品尤其如此。溶解大分子所需的时间较长，在最糟糕的情况下，可长达数周。溶解时间取决于许多参数，例如样品、溶剂、摩尔质量、多分散性、链化学性质、结晶度、组成和立体化学性质。根据经验，物质的摩尔质量越高，分布越窄，实现可重复的充分溶解所需的时间就越长。

加快聚合物溶解过程的方法并不多。不建议使用超声波设备，因为这很可能会导致样品降解。对于超高摩尔质量的样品，即使使用磁力搅拌棒也可能导致链断裂。因此，唯一的选择就是等待样品溶解成分离的单链。如果溶解过程

需要数周或数天，则应使用稳定溶剂。通常也建议将溶解容器放置在黑暗的环境中。最多只能偶尔轻轻地旋转溶解容器来帮助溶液混合均匀。

如果样品含有凝胶或颗粒，通常建议使用滤膜过滤样品溶液，但对于高摩尔质量样品需要特别注意。需要调整滤膜的孔径，避免样品降解。在可能的情况下，应避免过滤高摩尔质量样品溶液。

与低摩尔质量样品相比，还应降低高摩尔质量样品的浓度。高摩尔质量分子需要空间以扩展至其真实的流体力学体积，避免受到其他链的干扰。例如，可以在多种进样体积/浓度下，将相同质量的高摩尔质量物质进样至色谱柱组中进行分析。以两种方式为例，一种是在 1.0% w/v 下进样 10 μ L，另一种是在 0.1% w/v 下进样 100 μ L。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

对于第一种方式，由于高摩尔质量物质的溶液粘度非常高，并且如上所述，高摩尔质量分子无法实现其真实的流体力学体积，因此我们几乎不可能得到准确且可重现的摩尔质量值。在实际操作中，您可能会观察到样品峰洗脱的时间越来越晚（见图 1），或者从色谱柱中洗脱的峰更宽。

摩尔质量范围	浓度
100-10000	2 mg/mL (0.2%)
10000-1000000	1-2 mg/mL (0.1%-0.2%)
> 1000000	0.5 mg/mL 及以下 (0.05%)

样品浓度对洗脱体积的影响随摩尔质量的增加而增大。上表汇总了基于摩尔质量的样品浓度建议。这些建议适用于摩尔质量分布较窄的样品。对于多分散性较高（宽摩尔质量分布）的样品，可能需要使用更高的浓度。

图 1 比较了摩尔质量为 500000 Da 的标准物质与摩尔质量为 5000 Da 的标准物质的洗脱体积和峰形变化。从图中可以看出，对低摩尔质量样品的影响较小，而高摩尔质量样品的洗脱体积和峰形则发生了显著变化。

当使用窄分布摩尔质量标准品对 GPC/SEC 系统进行校准时，由于需要将样品的峰位置与参比标样的峰位置进行比较，此时洗脱体积的变化尤其成问题。峰形的变化（表明未实现分离）会影响所有校准，甚至是使用在线粘度计、光散射检测器或三重检测系统进行的校准。

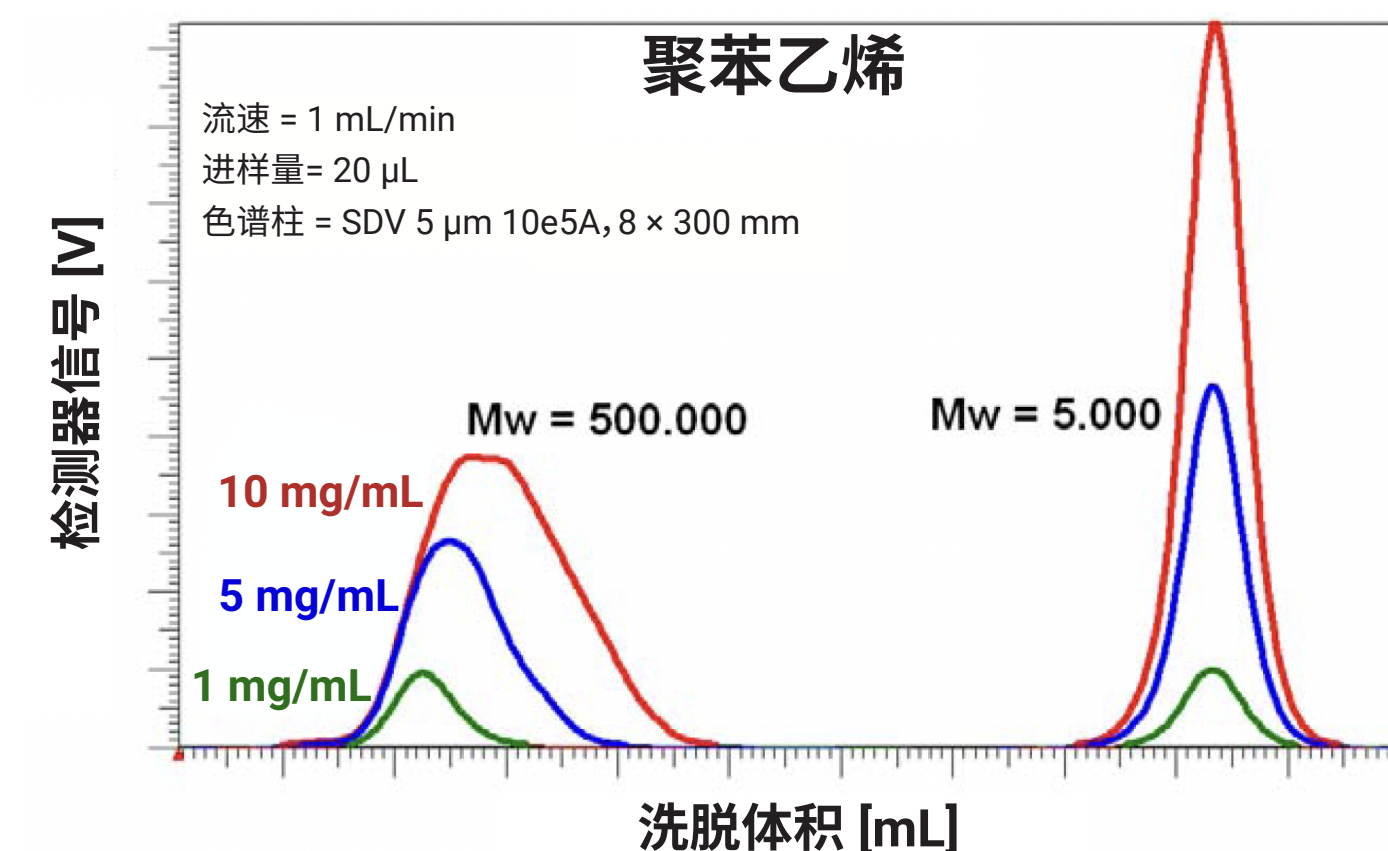


图 1. 两种聚苯乙烯在三种浓度下的色谱叠加图。浓度对 5000 Da 样品的影响较小，但对 500000 Da 样品的洗脱体积甚至峰形的影响较大

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

色谱条件

以下规则适用于使用 GPC/SEC 分析的所有样品：

- 高摩尔质量样品的分离需要大孔径分离柱
- 大粒径通常用于高分子量，以避免样品发生剪切降解

然而，对于摩尔质量为数百万道尔顿的样品，需要考虑其他的实验条件。

最重要的是要优化系统的流速。由于聚合物的扩散系数极低，流速过高会出现明显的峰展宽或意想不到的峰形。对于高摩尔质量样品，将流速降至 0.25 mL/min 或以下可获得更真实的峰形。另一个需要考虑的因素是剪切引起的聚合物长链伸展。

图 2 显示了在 0.5 mL/min 和 0.25 mL/min 下测量的高摩尔质量样品的叠加图。0.50 mL/min 条件下，曲线发生偏移，洗脱体积偏高，且峰形发生变化。

在线光散射检测器能够很好地发现不合适的色谱条件。由于通常需要使用这些检测器来克服缺乏可用的超高摩尔质量校准标准品的情况，因此许多仪器中已经配备了这些检测器。

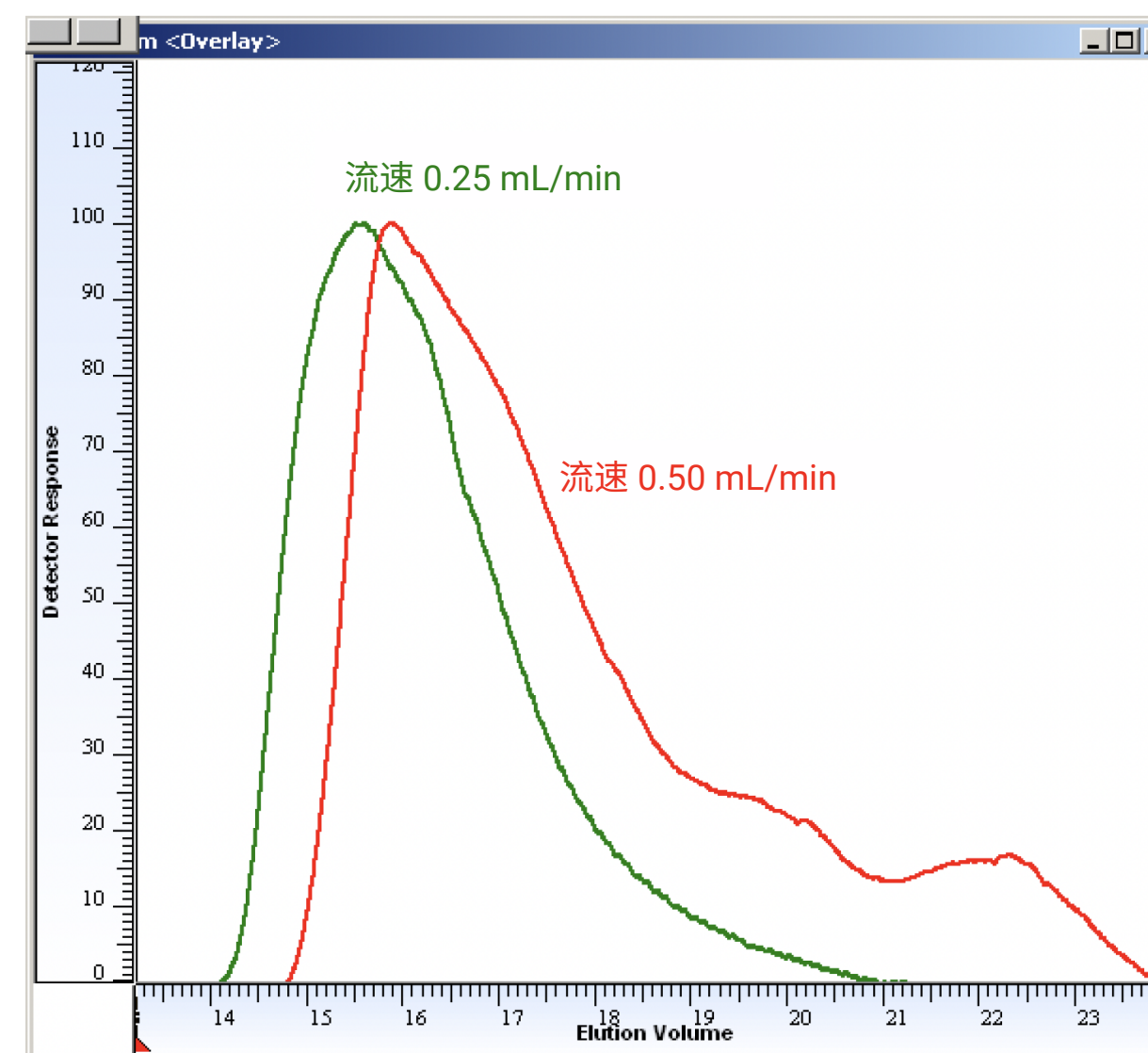


图 2. 在 0.5 mL/min (红色) 和 0.25 mL/min (绿色) 流速下获得的 3800000 Da 样品的叠加色谱图。将流速降至 0.1 mL/min 可进一步改善结果

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

色谱条件

图 3 显示了 0.5 mL/min 流速下，高摩尔质量样品的多角度光散射结果。在较宽的洗脱体积范围内，测得的摩尔质量基本保持不变。这是由于使用了不合适的色谱条件，导致分离效果不佳。

分析高摩尔质量样品时，其他实际考虑因素包括检出限和样品粘度：

- 由于需要使用低浓度，浓度检测器的信噪比往往较低。但与其增加样品浓度，不如增加注入的洗脱体积。这也将增加整体注入质量，从而改善信号。请注意，对于低摩尔质量，不建议这样做，在这种情况下最好增加浓度并进行小体积进样
- 如果使用自动进样器，并且由于高摩尔质量导致样品粘度较高，建议降低自动进样器进样针的抽吸速度。这样可以提高进样的重现性

高摩尔质量样品分析的良好操作规范

- 使用低浓度；必要时，增加进样量
- 要有耐心，确保有足够的时间让样品完全溶解
- 在可能的情况下，避免样品过滤。如果无法避免，则使用孔径合适的滤膜
- 使用低流速 (0.25–0.1 mL/min)，降低自动进样器进样针的抽吸速度
- 使用大粒径填料和大孔径色谱柱。如果色谱图中出现可疑的肩峰，请检查色谱柱的排阻极限

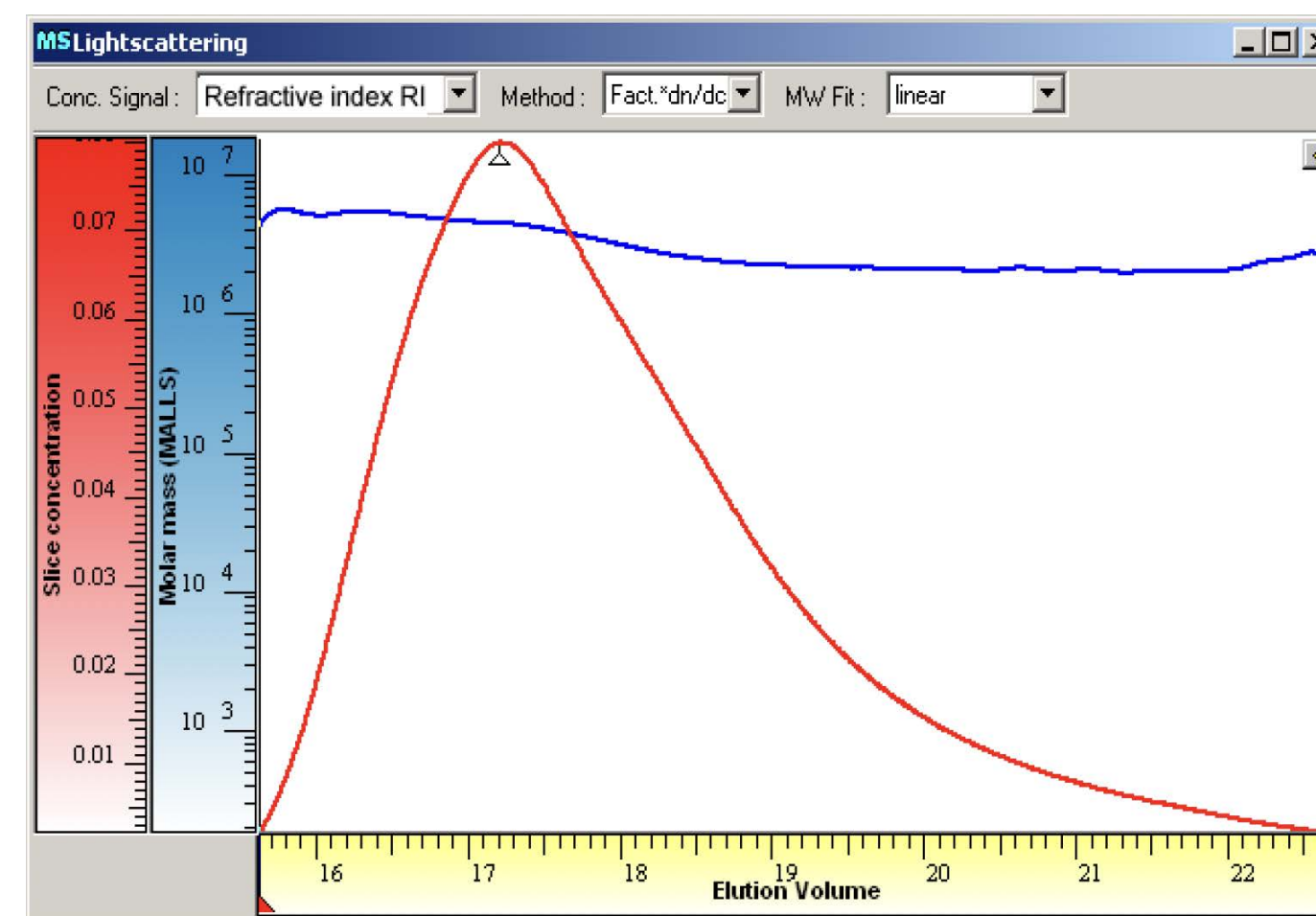


图 3. 在过高流速 (0.5 mL/min) 下运行的样品的切片浓度 (红色) 和在线测定的摩尔质量 (MALS, 蓝色)

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 系列电子书 — GPC/SEC 应用

1.6. 支化分析

聚合物材料的一个优点在于，可以通过调节许多参数来针对特定的应用改变其物理性质。除了组成、平均摩尔质量和摩尔质量分布宽度外，用于控制应用性能的另一个关键参数是支化度。色谱和先进的检测技术可以帮助表征支链分子。

支化至少需要一个支化点，该点可连接三条或更多条链。在合成过程中，支化可能是不利的副反应，也可能是有意引入以优化材料的物理性质。有不同的方法可以合成明确的结构，如星形或梳形聚合物。

支化聚合物在（熔融）粘度、玻璃化转变温度、体积热膨胀系数、溶解度等方面与线性聚合物存在显著差异。性质的变化取决于支化类型、支链长度、支化密度等参数。

复杂聚合物混合物的表征不仅包括摩尔质量分布，还包括支化分布，这是一项难度十足的挑战。根据支化类型的不同，可以使用各种检测和分离技术，以获得更深入的见解。

GPC/SEC 结合在线粘度测定^[1]（或不太适合的多角度光散射）可用于表征明确的结构（如星形或梳形聚合物）或研究长链支化。高温 GPC (HT-GPC) 结合红外 (IR) 检测可用于研究聚烯烃中的短链支化^[2]。

对于具有宽摩尔质量分布、支链和骨架的支化密度不同的聚合物样品，GPC/SEC 中基于尺寸大小的分离可能不足以使结构完全分离。因此，应使用聚合物相互作用色谱（例如梯度聚合物 HPLC、TGIC）或二维色谱等其他分离方法^[3]。

GPC/SEC-粘度测定

GPC/SEC 的局限性在于仅根据溶液中分子的大小进行分离。因此，对于支化样品而言，使用标准物质进行常规校准会低估支化样品的摩尔质量。针对这种情况可以使用摩尔质量敏感型检测器，如在线粘度计或光散射检测器。粘度计可用于结构分析和基于通用校准的摩尔质量测定。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

在线粘度计虽被归类为摩尔质量敏感型检测器，但其信号强度取决于粘度而不是摩尔质量。粘度计可以直接测量溶液中分子的密度。虽然这类仪器的这种配置（在大多数情况下也包括光散射检测器）非常普遍，但要了解其结果和局限性则需要更多的经验。

马克-霍温克曲线对于支化分析非常重要，该曲线使用特性粘度的对数（例如使用在线粘度计获得）相对于使用通用校准（或光散射检测）获得的摩尔质量的对数作图。马克-霍温克曲线的斜率 — 马克-霍温克指数 α 取决于溶液中分子的形状。如果特性粘度与摩尔质量无关（实心球体），则斜率为 0。而刚性棒状结构的马克-霍温克指数为 2。典型的无规则线团状聚合物的马克-霍温克指数为 0.5–0.8，具体取决于溶剂质量。

如果可以将生成的数据与具有相同化学结构和摩尔质量的线性链进行比较，则给定聚合物的支化分析将非常简单。图 1 显示了不同聚乙烯样品的马克-霍温克曲线。该曲线使用配备在线粘度计的 HT-GPC 仪器获得。

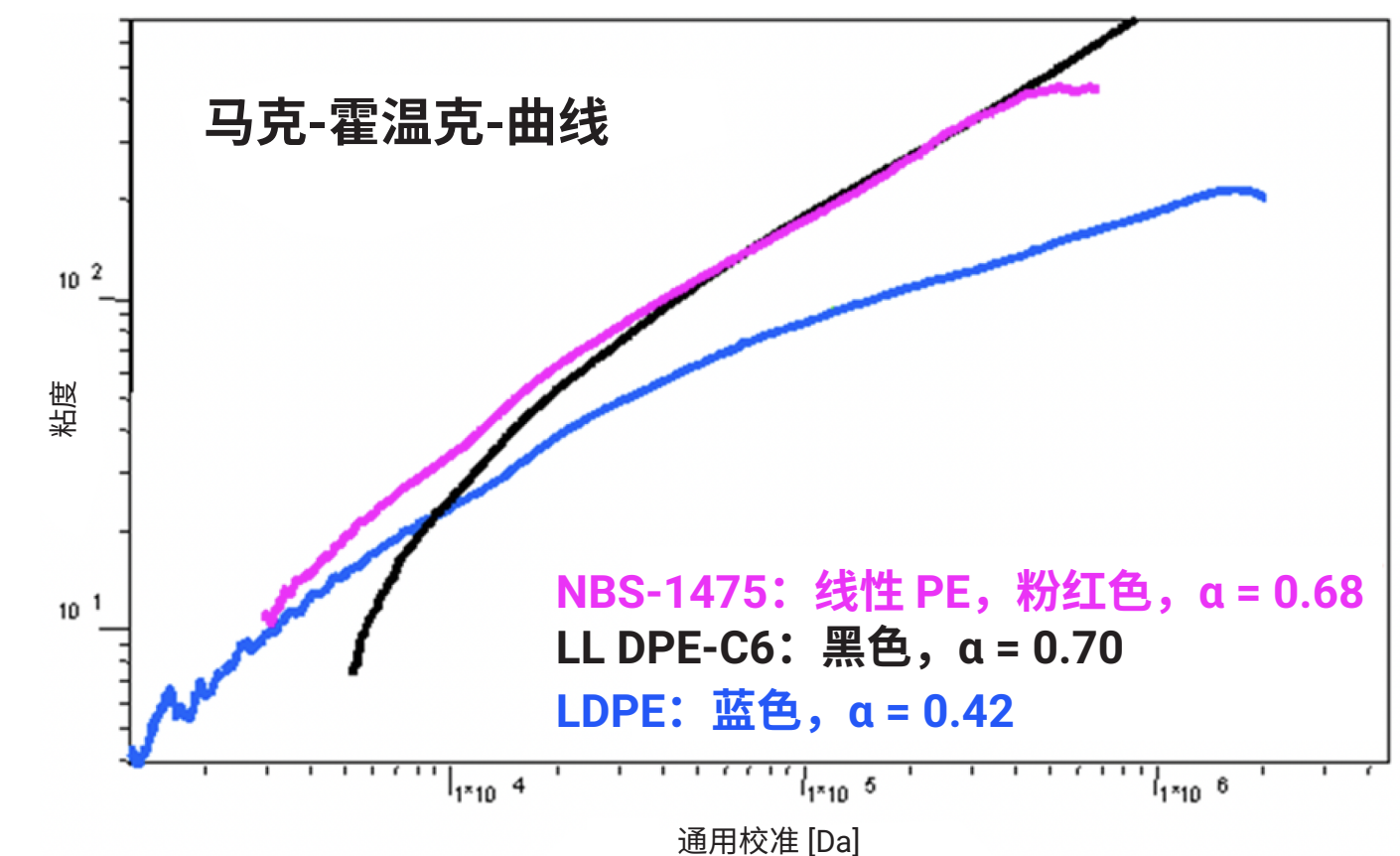


图 1. 三种不同样品的马克-霍温克曲线叠加图：线性 NBS-1475（粉红色），具有短链支化的线性低密度聚乙烯（LLDPE，黑色）和具有长链支化的低密度聚乙烯（LDPE，蓝色）

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

仅具有短链支化的线性低密度聚乙烯 (LLDPE) 的马克-霍温克曲线与线性样品的马克-霍温克曲线几乎重合，而包含长链支化的低密度聚乙烯 (LDPE) 的马克-霍温克曲线则明显偏离。在相同分子量下，与线性样品相比，LDPE 链的特性粘度明显更低。这是存在支链导致的。偏差随支化密度的增大而增大。通过将支化聚合物和线性聚合物的马克-霍温克曲线外推至共同的截距，可以检测出首次发生支化时的摩尔质量。通过取相同摩尔质量下支化聚合物和线性聚合物的特性粘度比值，可以确定收缩因子 g' ，由此可以推导出支链数量。

图 2 显示了星形聚合物聚（丙烯酸叔丁酯）(PtBuA) 的 GPC/SEC 粘度测定结果。星形聚合物由几个连接到中心核的臂（线性链）构成，是相对简单的支化聚合物。

星形聚合物采用先臂后核法 (arm-first) 合成。使用少量双官能团交联剂将窄摩尔质量分布的 PtBuA 前体臂偶联形成核。这意味着具有不同摩尔质量的两种星形聚合物的不同之处在于连接在核上的臂数量不同（长度大致相同）。

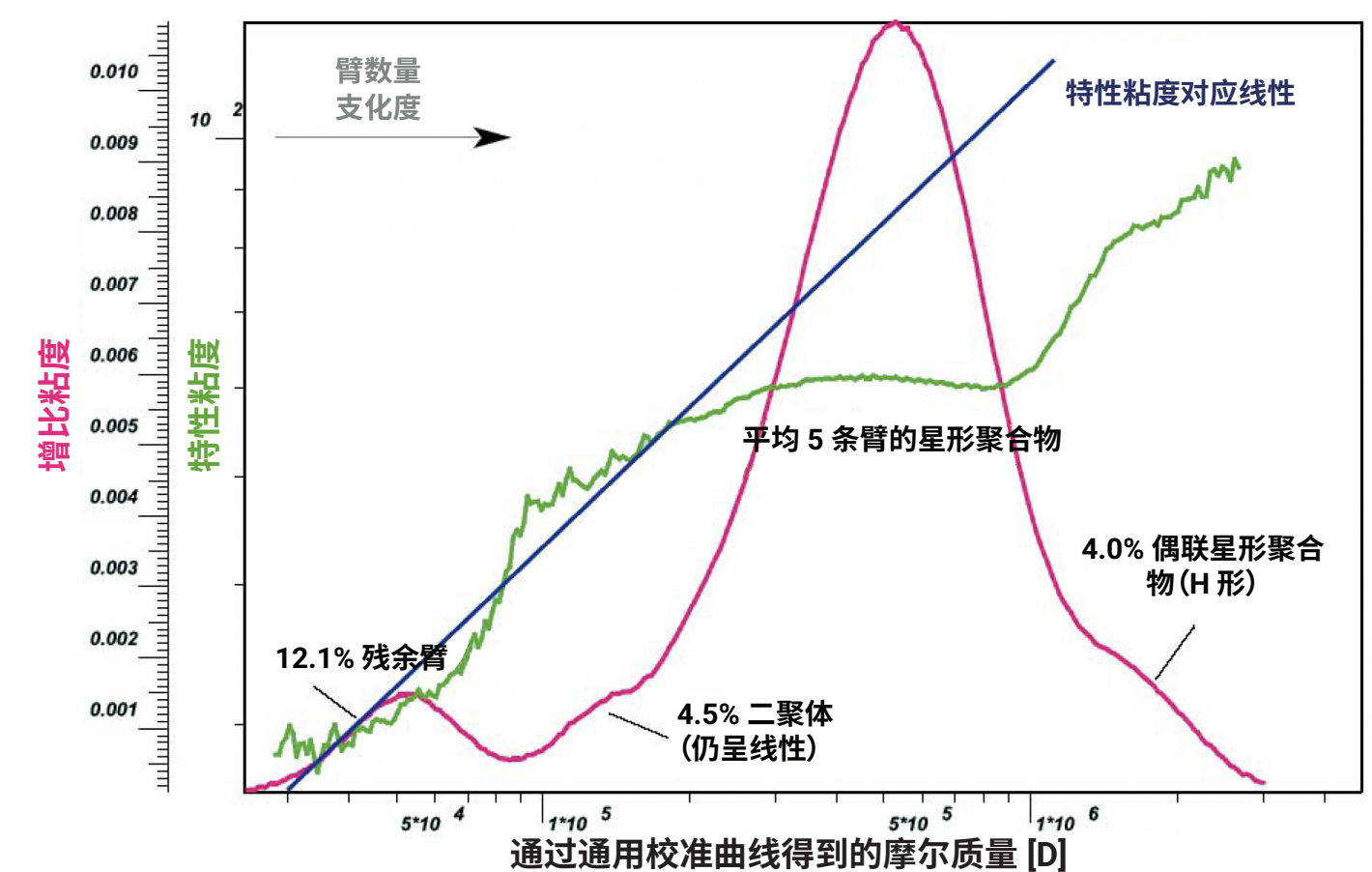


图 2. 先臂后核法星形聚合物的马克-霍温克曲线（通过结合臂来增加摩尔质量）。结构变化（无规则线团状到致密球体）体现在特性粘度的最大值上

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

马克-霍温克曲线揭示了特性粘度的最大值，在树枝状大分子中也观察到了这一点。从线性前体开始，偶联两条线性链形成仍然呈线性的分子，即二聚体。前体分子与核进一步反应，得到具有三臂及更多臂的星形聚合物。在此情况下，特性粘度随摩尔质量的增加被抵消，因为片段密度随支化结构臂数量的增加而增大，导致特性粘度降低。使用在线粘度计测量粘度，可以很好地监测分子结构的这种变化。值得注意的是，在最大峰值分子量的约两倍处，特性粘度突然发生变化。粘度的急剧增加很可能是由于两种星形聚合物通过一条臂发生偶联形成了 H 形分子。

与上述合成路线不同，星形聚合物也可以采用先核后臂法 (core first) 合成，如使用多官能团引发剂。在这种情况下，观察和结果会有所不同。由于星形聚合物摩尔质量的增加是由臂的伸长引起，因此不会发生结构变化。对于这类星形聚合物，马克-霍温克曲线应如图 3 所示。对于每种星形聚合物，在相同摩尔质量下，马克-霍温克曲线将向低粘度方向平行移动。通过分析将得到相同的马克-霍温克 α ，但马克-霍温克 K (截距) 减小。随着臂数量的增加，向更低特性粘度的移动也在增加。

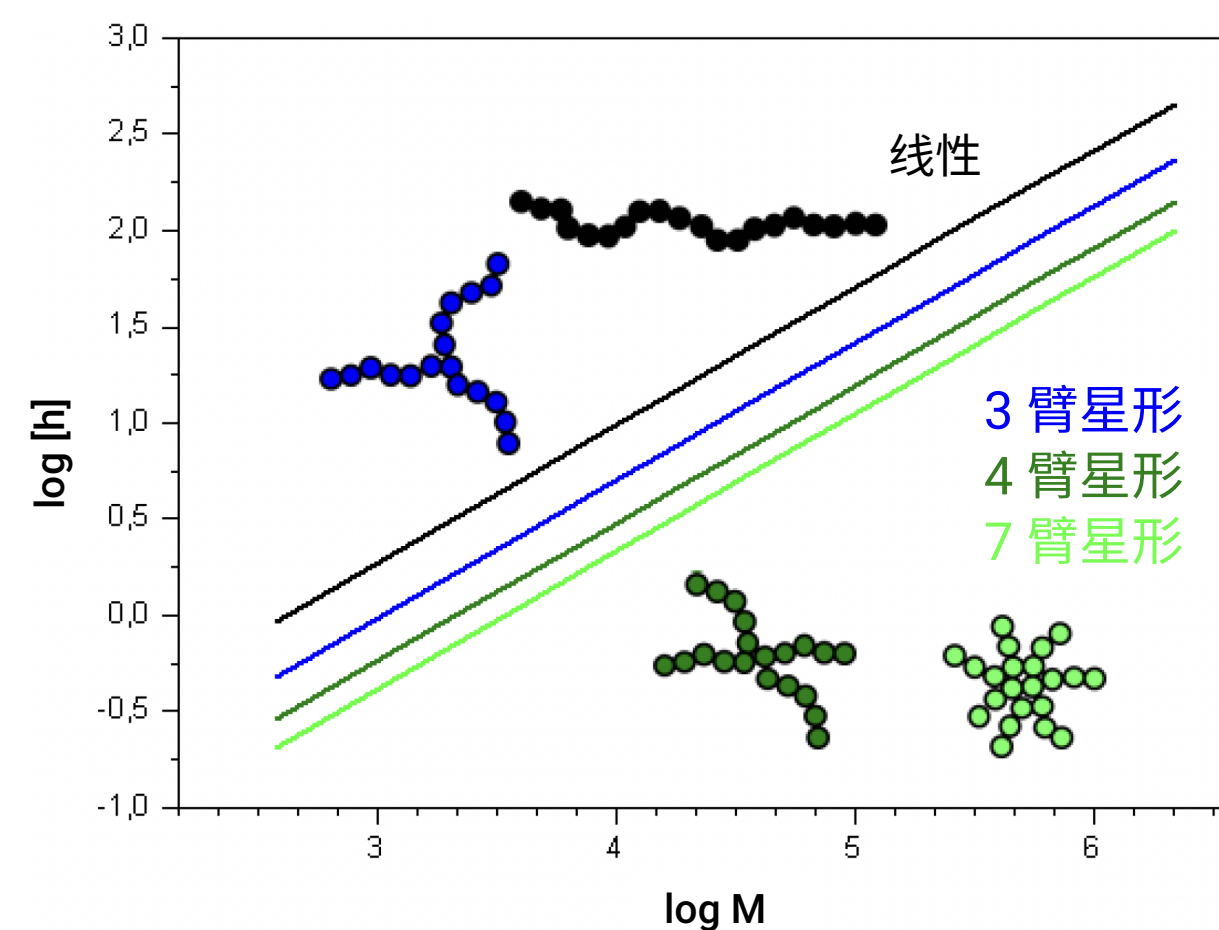


图 3. 通过先核后臂法合成的星形聚合物的马克-霍温克曲线示意图。臂从多官能团引发剂核开始，摩尔质量的增加是由于向臂中添加了单体单元

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

先进的分离技术

如前所述，GPC/SEC 技术的局限性在于其仅根据溶液中分子的大小进行分离。即使使用粘度计和光散射检测器等质量灵敏型检测器，也存在需要改变支化聚合物分析策略的情况。

在流体力学体积仅随摩尔质量略微增加的情况下（如先臂后核法合成的星形聚合物），基于尺寸大小进行分离的分离度有限。在这种情况下，可将聚合物相互作用色谱（IPC，根据化学组成进行分离）用作一种补充技术。图 4 显示了先臂后核法星形聚合物的梯度分离色谱图，即使对于臂数量较高的星形聚合物也具有高分离度。

如果样品除了具有结构异质性（例如存在支链和线性链）外，还具有宽摩尔质量分布，则共洗脱的风险增加。在这种情况下，与低摩尔质量的线性链具有相同的流体动力学尺寸的高摩尔质量支化分子在相同的保留体积下洗脱。因此，从色谱柱洗脱的馏分不能再被认为是单分散的。

当应用二维 (2D) 分离时，也许可以实现支化聚合物的全面表征。2D 结合两种独立的分离技术生成等值线图，也可用于定量不同的物质。图 5 为不同组成的线性和梳形分子成功分离的示例。

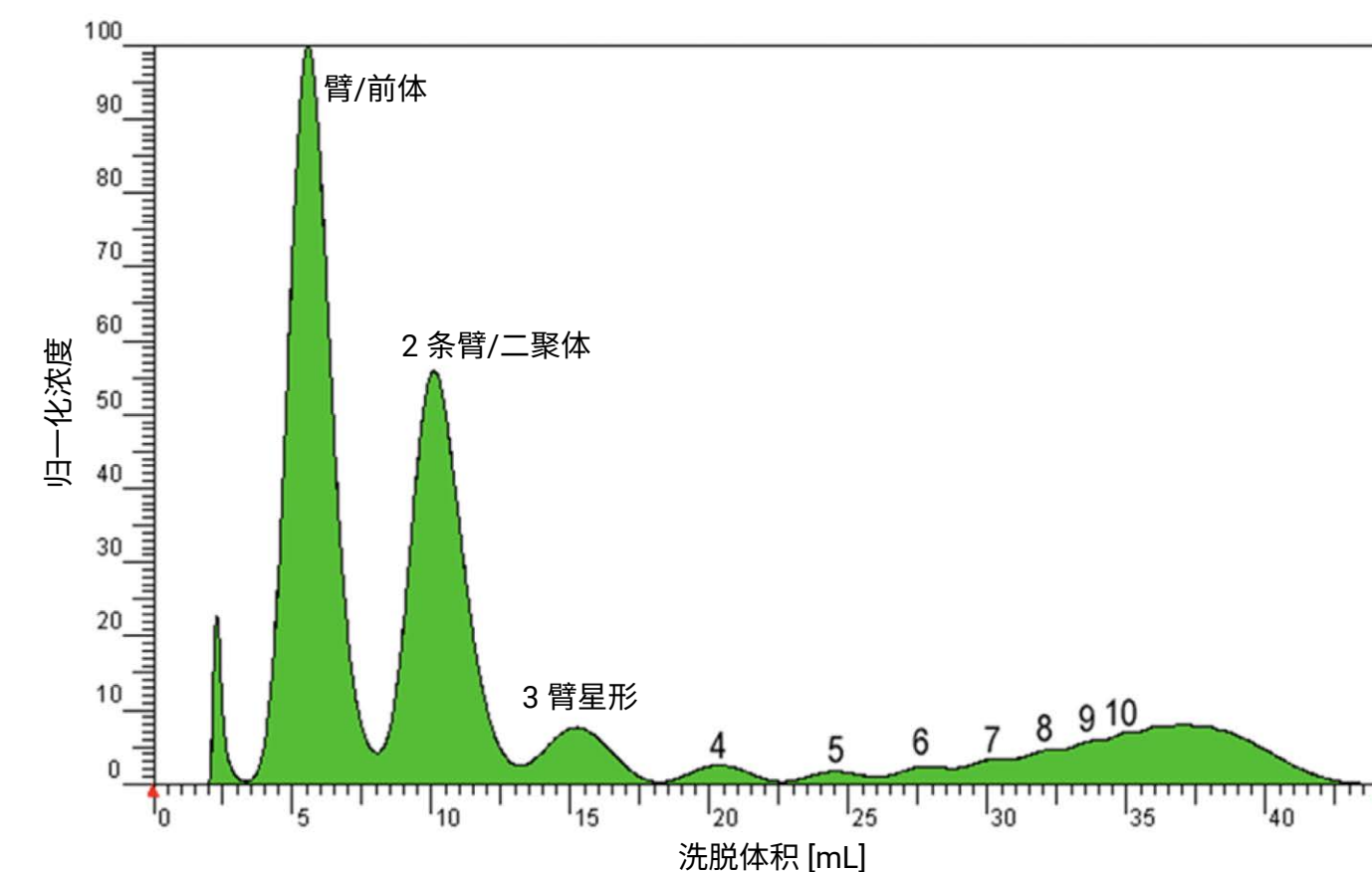


图 4. 通过聚合物相互作用色谱 (IPC) 分离星形支链聚合物

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

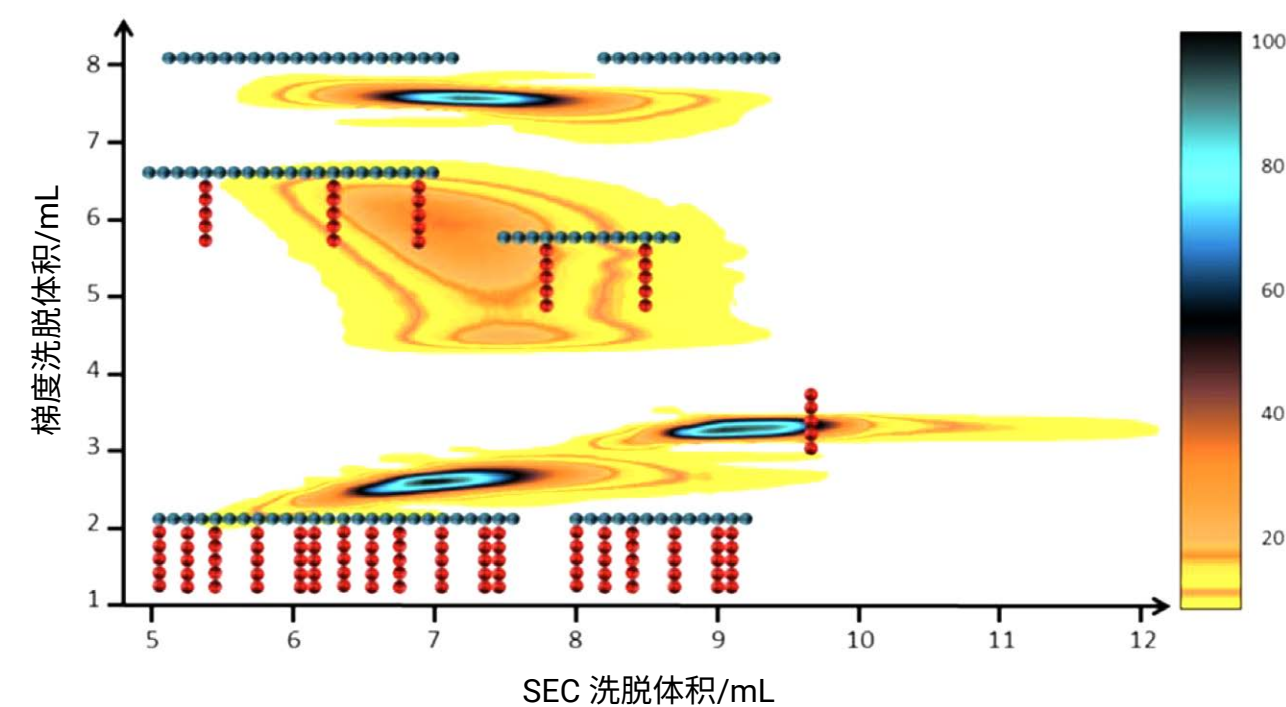


图 5. 通过聚合物相互作用色谱 (IPC) 分离星形支链聚合物

总结

- 支化可能是聚合过程中的副反应，也可能是有意引入以获得应用所需的特性
- 在线粘度计可提供分子密度信息，并能监测结构随摩尔质量的变化，从而帮助表征支化分子
- 具有长支链的聚乙烯可通过在线粘度计进行分析，而关于短支链的信息则可以通过 FTIR 检测获得
- 支化分子和线性分子的共洗脱是一个问题。在这种情况下，可以采用先进的分离技术或二维色谱

参考文献

1. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC Viscometry - A Versatile Tool for Structure Determination and More. *The Column* **2012**, 8 (2), 12–16
2. Montag, P. Tips & Tricks: GPC/SEC New Development in High-Temperature (HT) GPC/SEC. *The Column* **2008**
3. Gerber, J.; Radke, W. Topological Separation of Linear and Star-Shaped Polystyrenes by Offline 2D Chromatography. *Polymer* **2005**, 46, 9224–9229

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

GPC/SEC 系列电子书 — GPC/SEC 应用

1.7. GPC/SEC 滤膜分析

薄膜或盘式膜或膜过滤器由具有特定孔径和分布的多孔聚合物或无机材料制成。随着膜技术的发展，膜过滤领域迅速扩大，以应对各种应用，例如对污染物去除和水处理解决方案的需求不断增加，需要保留超过一定尺寸的颗粒和微生物，或者去除或估算溶液中的可溶性大分子。显然，出于质量控制和重现性要求，需要了解多孔膜材料的孔径大小和保留行为。

膜性能参数（如保留行为、孔径和摩尔质量截留值）可以使用标准色谱设备测定。这种膜表征方法涉及选择已知尺寸或分子量的标准物质，进行处理，然后过滤，最后进行 GPC/SEC 分析^[1]。

由于 GPC/SEC 是表征溶液中可溶性大分子并根据其尺寸差异进行分离的标准技术，因此可用于比较未过滤和过滤后的溶液，从而深入了解膜的过滤能力。

这种方法的一个优点是可以在实际操作条件下测试膜。如果必须考虑溶胀或非永久性孔隙率对膜质量的影响，这一点尤为重要。

标准物质的选择和处理

选择已知尺寸或分子量的标准物质配制储备液^[1]。根据过滤过程中使用的是有机溶剂还是水性溶剂，可以使用聚苯乙烯、葡聚糖或普鲁兰多糖。

如果标准物质具有宽摩尔质量/尺寸分布（多分散度指数 (PDI) 较高），那么一种标准物质便足以覆盖膜在湿润状态下的整个孔径范围。使用因合成过程获得高 PDI 的标准物质优于混合几个窄摩尔质量分布样品，因为前者宽摩尔质量分布更加平滑，并且价格更低。

选择标准物质的摩尔质量/尺寸范围的标准是，一部分标准物质被膜保留，另一部分则通过膜。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

然后将标准物质溶于相应的溶剂中，得到储备液。采用适当的过滤条件（切向流、反压等），通过测试膜过滤储备液。

比膜孔小的分子能够穿过膜进入滤液，而较大的分子将留在进样侧（保留物）。

同一储备液可用于多种膜的测试，便于质量控制或不同类型膜的比较。

样品 GPC/SEC 分析

通过对储备液、滤液和保留物（可选，一些方法不需要）的浓度曲线进行特定比较，可以了解重要的膜特性。使用标准 GPC/SEC 色谱系统对这些收集的样品进行分析，该系统包括一个等度泵、一个进样系统，最好还包括一个示差折光 (RI) 检测器，用于检测通过膜的量。

作为示例，图 1 显示了包含三种不同摩尔质量的葡聚糖标准品的储备液以及滤液的叠加色谱图。如果使用具有宽摩尔质量分布的葡聚糖，色谱图不会显示最大值和最小值，而是呈现稳定分布。

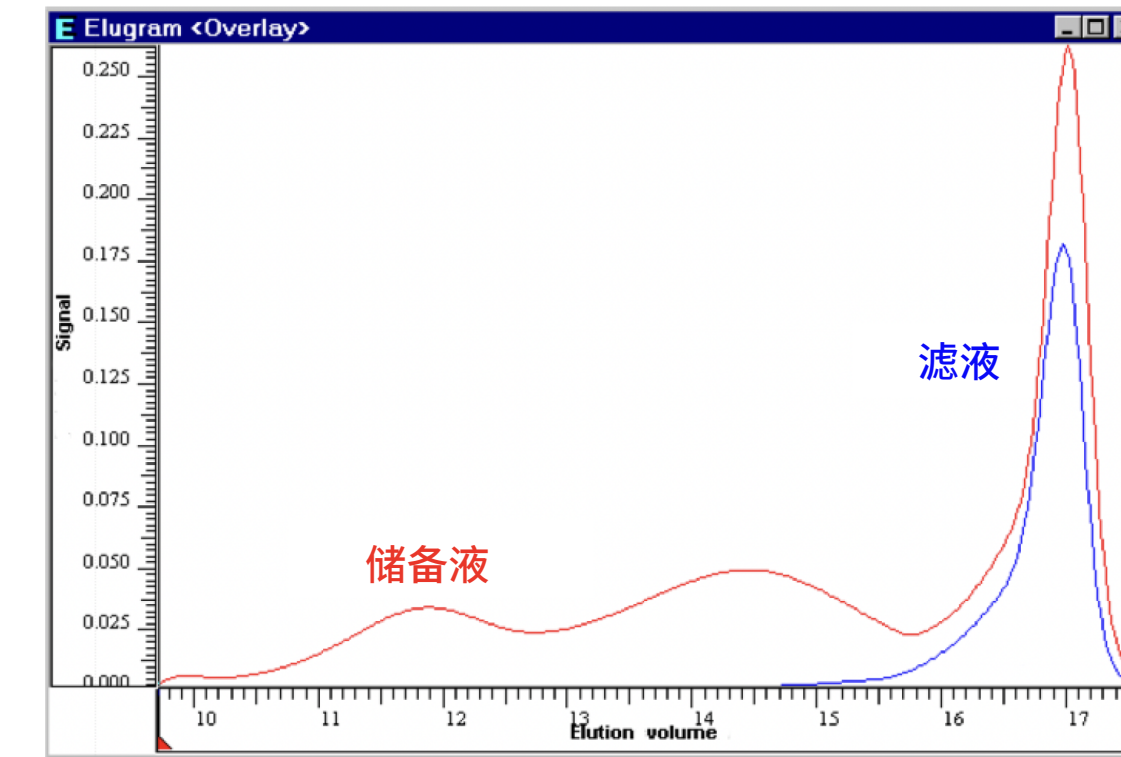


图 1. 包含三种不同摩尔质量的葡聚糖的储备液（红色）以及滤液（蓝色）的 GPC/SEC 叠加色谱图

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

通过叠加储备液和滤液的数据，可以清楚地看到，膜阻挡了大部分 GPC/SEC 中在低洗脱体积下洗脱的高摩尔质量/尺寸物质。一部分小分子被洗脱出来（比较约 17 mL 洗脱体积处的峰）。

在所有比较色谱图的情况下，可重现的洗脱至关重要。使用内标或流动标记物有助于在早期阶段发现任何重现性问题。使用流动标记物进行校正可以提高数据和结果质量^[2]。

结果和膜参数

下一步是定量并获得重要的膜参数，例如：

- 筛分曲线和保留效率
- 平均孔径和孔径分布
- 摩尔质量截留值
- 孔径选择性
- 孔隙通畅性

现在可以根据如图 1 所示的储备液和滤液的色谱图，生成筛分曲线。

使用以下公式，通过储备液 (cS)、滤液 (cF) 以及保留物 (cR)（并非所有应用都需要）计算筛分曲线值 (S)：

$$S = 1 - (cF/cS)$$

但是，其他文献中介绍的其他方法/公式也可以应用于这些数据。

可以通过一个序列对多种膜进行表征，并轻松比较它们的筛分曲线。

通过使用与储备液标准物质相同类型的标准品构建的常规校准曲线，可以测定筛分曲线摩尔质量^[3]。

此外，还可以估算膜的摩尔质量截留值。该摩尔质量值定义了给定样品量的保留比例。一般情况下，摩尔质量截留值为 90%。而其他保留参数则可用于解答特定的问题，或对不同的膜进行深入的比较。根据摩尔质量，还可以使用 R_g -M 关系计算孔径，具体参数可参考文献等。

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

图 2 显示了三种不同再生纤维素膜的结果，包括 90% 截留值结果和平均孔径。三种膜均表现出不同的过滤特性，即使微小的性能差异也可以通过叠加数据观察到。还可以计算膜的选择性 D 。通常情况下，这一参数在 25% 和 75% 保留比例下确定。在理想的选择性下，即当 $D = 1$ 时，仅一种尺寸的分子可以通过膜的孔。如果没有选择性，即选择性参数 $D = \infty$ ，则所有尺寸的分子都可以通过膜

总结

- 标准 GPC/SEC 设备可用于表征膜。此时，将过滤实验得到的储备液、滤液和保留物作为 GPC/SEC 样品进行分析
- 使用流动标记物可以提高数据质量
- 通过生成的 GPC/SEC 色谱图可以计算筛分曲线
- 通过校准曲线可以确定摩尔质量，通过 R_g - M 关系可以计算孔径

参考文献

1. Strathmann, H. Economic Assessment of Membrane Processes, in: *Separation and Purification Technology*. Marcel Dekker, **1992**
2. Held, D.; Radke, W. Tips & Tricks: GPC/SEC Flow Marker — An Easy Concept to Increase Reproducibility, *The Column* **2016**, 12 (6), 24–27
3. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**

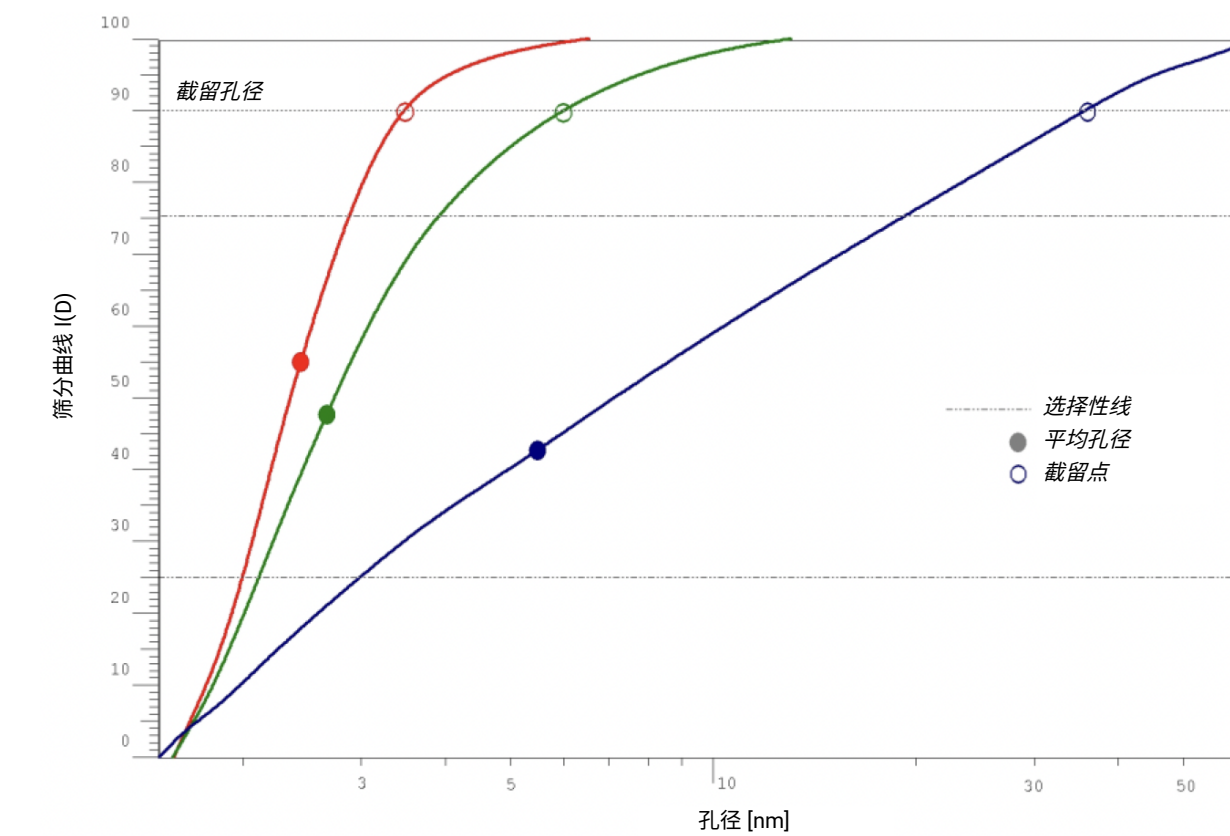


图 2. 由再生纤维素制成的三种不同平面膜的筛分曲线叠加图

术语表

BHT	丁羟甲苯	MALDI-TOF	基质辅助激光解吸/电离飞行时间
Da	道尔顿 (E g/mol)	NaN₃	叠氮化钠
DAD	二极管阵列检测器	QC	质量控制
DMAc	二甲基乙酰胺	PDI	多分散度指数 ($D = M_w/M_n$)
DMF	二甲基甲酰胺	PLA	聚乳酸
dn/dc	折射率增量	PLC	低关注度聚合物
ELSD	蒸发光散射检测器	PMMA	聚甲基丙烯酸甲酯
ESI-MS	电喷雾电离质谱	PS	聚苯乙烯
GPC	凝胶渗透色谱	R_g	回转半径
LAC	液相吸附色谱	REACH	化学品注册、评估、许可和限制
LC	液相色谱	RI	示差折光 (检测/检测器)
LiBr	溴化锂	SEC	体积排阻色谱
LiCl	氯化锂	溶剂	溶解溶质形成溶液的液体
LS	光散射	固定相	分离装置中用于分离物质的固相
MALS	多角度光散射	TCB	三氯苯
M_n	数均摩尔质量	THF	四氢呋喃
流动相	色谱系统中使用的液相	UV	紫外 (检测/检测器)
M_w	重均摩尔质量	Ve	洗脱体积
M_z	z 均摩尔质量		

目录

关于本系列电子书

GPC/SEC 应用介绍

产品注册和 REACH

定量分析并获得摩尔质量平均值及更多信息

使用体积排阻色谱进行蛋白质分析

使用宽范围标准品进行校准

高摩尔质量样品的分析技巧

支化分析

GPC/SEC 滤膜分析

术语表

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/gpc-sec

如需获取技术问题的答案和安捷伦社区的资源，
请访问：

community.agilent.com

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

DE11979303

本文中的信息、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，2023

2023年6月1日，中国出版

5994-5915ZH-CN

Agilent
InfinityLab

 **Agilent**
Trusted Answers

