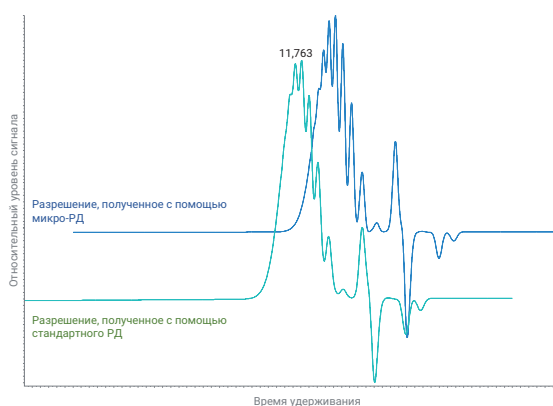


Усовершенствованная ГПХ на системе Agilent 1290 Infinity II Micro RID

Максимальный пробопоток при минимальном
расходе растворителя с лучшим в своем классе
разрешением.



Автор

Эдгар Негеле (Edgar Naegele)
Agilent Technologies, Inc.

Аннотация

В методическом обзоре описаны преимущества использования системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II Micro Refractive Index Detector (RID) для ГПХ. Микрорефрактометр позволяет использовать колонки с уменьшенными внутренними диаметрами, такими как 4,6 и 2,1 мм. В то время как система допускает эксплуатацию наиболее часто используемых колонок с внутренним диаметром 7,5 мм, применение колонок с уменьшенными внутренними диаметрами приведет к повышению разрешения, сокращению времени анализа и снижению расхода растворителя при аналогичных или даже лучших показателях разделения полимеров.

Введение

Обычные стандартные методики ГПХ основаны на использовании длинных колонок большего внутреннего диаметра (например, 75 мм) с разделениями, проводимыми при более высоких скоростях потока, таких как 1 мл/мин или выше. В результате наблюдается высокий расход дорогих растворителей, таких как ТГФ. Для устранения этого недостатка в современных методиках ГПХ используются колонки той же длины с меньшими внутренним диаметром, 4,6 или даже 2,1 мм, которые могут эксплуатироваться при низких скоростях потока. Для того чтобы добиться достаточной точности для скорости потока, нужны современные насосы УВЭЖХ. Способность этих насосов работать при очень высоком давлении может быть полезной для фаз колонок на основе силикагелевого наполнителя, позволяя сочетать эти фазы в различной последовательности. Современные материалы неподвижной фазы для ГПХ также приспособлены для высоких значений скоростей потока. Для поддержания нужного разрешения требуются детекторы с очень низкими мертвыми объемами ячейки.

В данном обзоре продемонстрированы преимущества применения системы Agilent 1290 Infinity II для ГПХ. Градиентный насос Agilent 1290 Infinity II может обеспечить очень низкие скорости потока с максимальной воспроизводимостью, необходимой для точного определения молекулярных масс. Микрорефрактометр обеспечивает возможность использования колонок для ГПХ с уменьшенным внутренним диаметром менее 2,1 мм при сохранении максимального разрешения. Данное сочетание обеспечивает более высокое разрешение, меньшее время анализа и более низкий расход растворителя при эквивалентной или более высокой эффективности разделения в сравнении с классическими методиками ГПХ, которые могут быть реализованы с помощью аналогичной конфигурации системы.

Экспериментальная часть

Системы гель-проникающей/эксклюзионной хроматографии Agilent 1290 Infinity II

- Насос Agilent 1290 Infinity II High-Speed Pump (G7120A)
- Автосамплер Agilent 1290 Infinity II Vialsampler (G7129B)
- Термостат колонок Agilent 1260 Infinity II (G7116A);
- Микрорефрактометр Agilent 1290 Infinity II (G7162B) или
- Рефрактометр Agilent 1260 Infinity II (G7162A)

Программное обеспечение

- Agilent OpenLab v2.3 и расширение для ГПХ (G7860AA)

Метод

Параметр	Значение
Растворитель	ТГФ, изократический, канал В
Скорости потока	0,06, 0,3, 0,6, 1,0 мл/мин
Время элюирования	22, 11 или 7 минут
Температура колонки	35 °С, 2 последовательно соединенные колонки с капиллярами 75 мкм (длина 105 мм)
Объем ввода	20 мкл, 4 мкл
Рефрактометрический детектор	Температура оптического блока: 35 °С Скорость обработки данных: 18 Гц Полярность сигнала: положительный

Колонки

- Agilent PLgel MiniMixE, 250 × 4,6 мм, 3 мкм (PL1510-5300)
- Agilent PLgel MixedE, 300 × 7,5 мм, 3 мкм (PL1110-6300)
- Agilent InfinityLab OligoPore, 250 × 2,1 мм (PL1913-5520)

Калибровка

Agilent EasiVial, PS-L 2 мл (PL2010-0401):

- **Красный флакон** (Мр: 47 190, 9960, 2980, 580 г/моль)
- **Зеленый флакон** (Мр: 30 230, 7640, 1840, 370 г/моль)
- **Желтый флакон** (Мр: 18340, 4900, 935, 162 г/моль)

Пробы

- Полистирол 580
- Полистирол 1320
- Эпоксидная смола (Epikote)

Химические реактивы и растворители

- ТГФ, тетрагидрофуран ≥ 99,9% не содержит ингибиторов, CHROMASOLV Plus для ВЭЖХ, Honeywell Riedel-de Haën (Зельце, Германия)

Результаты и их обсуждение

В качестве начального эксперимента были проведены измерения калибровочных проб полистирола на обычных стандартных колонках для ГПХ/ЭХ (7,5 × 300 мм) при скорости потока 1 мл/мин с использованием микрорефрактометра и стандартного рефрактометра. Конечное разделение смеси с одной калибровкой (виала с красной крышкой с низкомолекулярными соединениями для калибровки, см. экспериментальную часть), полученное на микрорефрактометре, показано на рис. 1. Хроматограмма демонстрирует четкое разделение всех компонентов с частичным растворением низкомолекулярных компонентов, а также входящие в состав пробы олигомеры полистирола. Аналогичные результаты были получены с помощью стандартного рефрактометра (данные не показаны). Различие между микрорефрактометром и стандартным рефрактометром заключается в объеме их ячеек — 2 и 8 мкл соответственно. При обычных стандартных условиях ГПХ/ЭХ, большом внутреннем диаметре колонки и высоких скоростях потоков это отличие не оказывает никакого влияния на разрешение. Для подтверждения идентичности результатов для обоих детекторов определяли молекулярную массу (M_p , M_n , M_w и PD) низкомолекулярного полистирола (M_p 1320) (рис. 2). Было продемонстрировано, что разрешение для обоих детекторов было идентичным, а информация о молекулярном весе — сопоставимой.

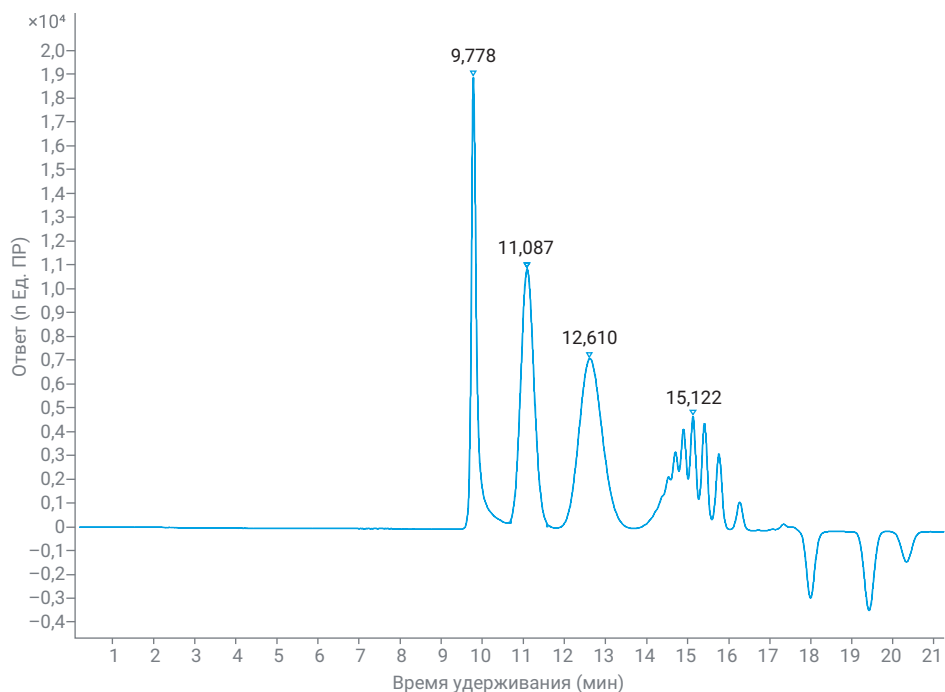


Рис. 1. Разделение смеси низкомолекулярных полистиролов (виала с красной крышкой с низкомолекулярными соединениями для калибровки, см. экспериментальную часть) на колонке Agilent PLgel (две 300 × 7,5 мм, 3 мкм) при скорости потока 1 мл/мин ТГФ с детектированием с помощью микрорефрактометра Agilent 1290 Infinity II

Наборы результатов	ВУ (мин)	M_p (г/моль)	M_n (г/моль)	M_w (г/моль)	ПД
Стандартный рефрактометр для ГПХ	13,805	1 314	1 048	1 265	1,21
Микро-рефрактометр для ГПХ	13,740	1 345	1 065	1 254	1,18

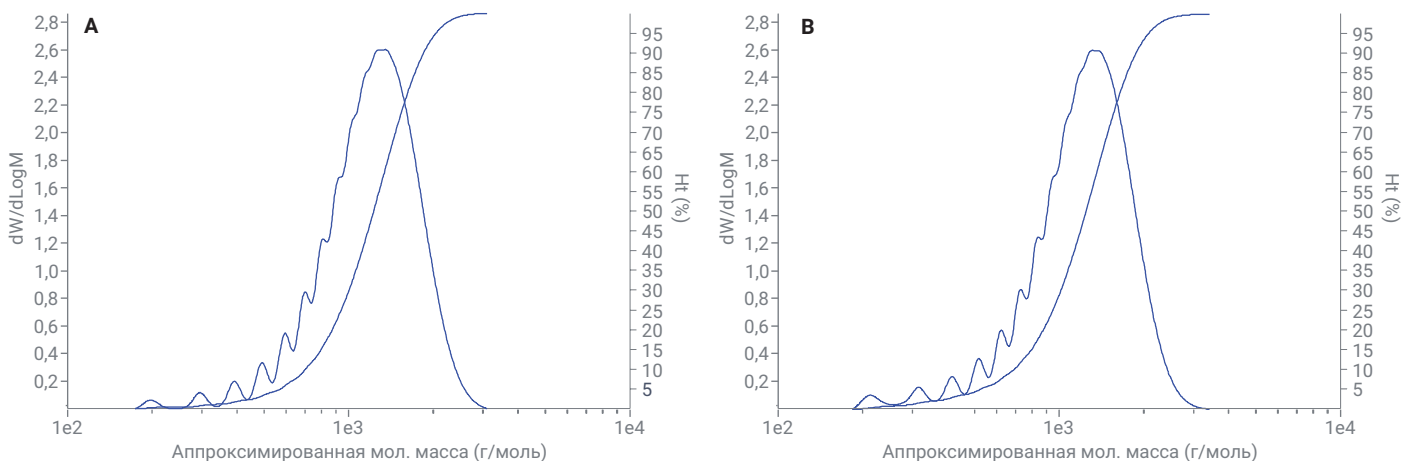


Рис. 2. Определение молекулярной массы низкомолекулярного полистирола с помощью микрорефрактометра Agilent 1290 Infinity II (А) и стандартного рефрактометра Agilent 1260 Infinity II (В) на колонке Agilent PLgel (две 300 × 7,5 мм, 3 мкм) при скорости потока 1 мл/мин ТГФ (M_n : среднечисленный молекулярный вес, M_w : средневесовой молекулярный вес, M_p : молекулярный вес при максимуме пика, ПД: коэффициент полидисперсности)

Недостатком использования обычных стандартных условий ГПХ/ЭХ является сопутствующий большой расход растворителя, составляющий 1 мл/мин или выше. Такая скорость потока приводит к образованию большого количества вредного отработанного растворителя, а также влечет за собой высокие расходы на растворитель и утилизацию отходов. Для устранения этого недостатка была проведена серия экспериментов при различных скоростях потоков с использованием колонок 4,6 мм с целью демонстрации сопоставимости результатов. Исходная скорость потока была рассчитана по нисходящей на основании стандартных условий для получения времен удерживания, сопоставимых с таковыми для калибровочных стандартов. Далее скорость потока была увеличена для повышения пробопотока.

На рис. 3 показано сопоставление результатов, полученных с различными скоростями потока при сниженном расходе растворителя или повышенном пробопотоке с помощью микро-РД. Например, при скорости потока 0,3 мл/мин на колонке 4,6 мм было получено время анализа, аналогичное наблюдаемому при описанных стандартных условиях. Разрешение низкомолекулярных соединений в калибровочной смеси (виала с красной крышкой с низкомолекулярными соединениями для калибровки, см. экспериментальную часть) имеет аналогичное качество (рис. 3А1 и 3А2). Для повышения пробопотока скорость потока была повышена до 0,6 мл/мин (рис. 3В1 и 3В2) и 1,0 мл/мин (рис. 3С1 и 3С2).

Повышение до 0,6 мл/мин удвоило, таким образом, предполагаемый пробопоток при аналогичном разрешении для низкомолекулярных соединений. Дальнейшее повышение скорости потока до 1 мл/мин увеличило пробопоток приблизительно в три раза по сравнению с исходными условиями. Разрешение низкомолекулярных соединений было все еще высоким, но слегка сниженным в сравнении с высокомолекулярными соединениями (более низкое время удерживания, рис. 3С1 и 3С2). Расход растворителя в расчете на пробу сократился приблизительно до 30% для всех случаев (табл. 1) в сравнении со стандартными условиями на колонке 7,5 мм.

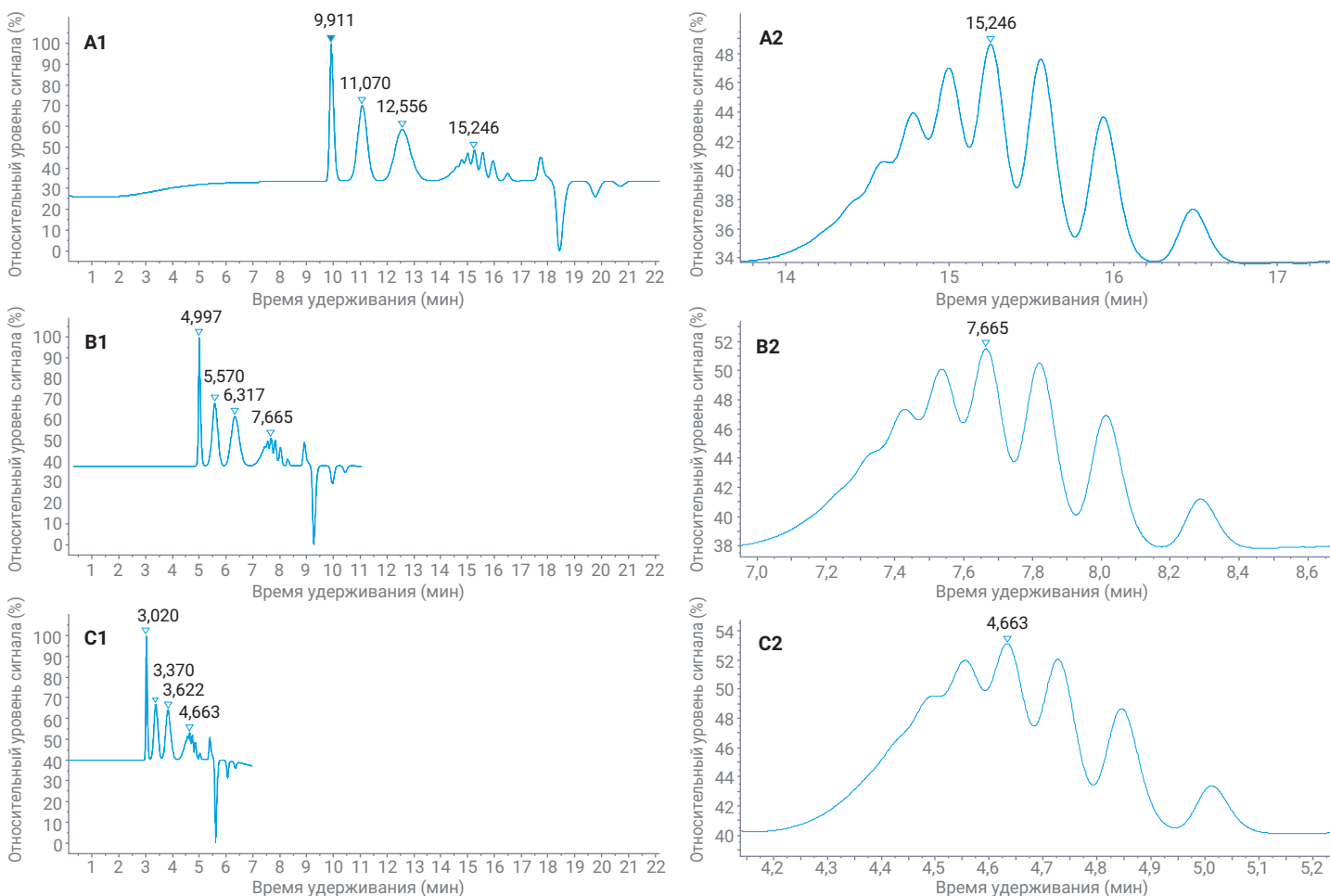


Рис. 3. Сравнение разделения смеси низкомолекулярных полистиролов на колонке Agilent PLgel (две 250 x 4,6 мм, 3 мкм) при разных скоростях потока (А) 0,3, (В) 0,6, (С) 1,0 мл/мин ТГФ) и детектировании с помощью микрорефрактометра Agilent 1290 Infinity II

Для подтверждения идентичности результатов молекулярных масс, которые могут быть получены при различных скоростях потока определяли молекулярную массу (M_r , M_w , M_n и PD) эпоксидной смолы (рис. 4). Все распределения молекулярных масс (рис. 4А, 4В и 4С) продемонстрировали высокое разрешение, несмотря на деградацию некоторого количества крупных олигомеров при высокой скорости потока. Тем не менее результаты рассчитанных молекулярных масс являются почти идентичными (Табл. на рис. 4).

Табл. 1. Сравнение расхода растворителя в расчете на одну пробу и проботока методики на колонке с меньшим внутренним диаметром (две 250 × 4,6 мм при 0,3, 0,6 и 1,0 мл/мин) с соответствующими показателями для стандартной методики*

Скорость потока (мл/мин)	Время анализа (мин)	Расход растворителя на пробу (%)*	Коэффициент проботока*
0,3	22	30,0	1
0,6	11	30,0	2
1,0	7	31,8	3

* В сравнении со стандартной методикой, 1 мл/мин, время анализа 22 минуты, см. рис. 1

Скорость потока (мл/мин)	ВУ (мин)	M_r (г/моль)	M_n (г/моль)	M_w (г/моль)	ПД
0,3	11,678	7 261	2 614	6 415	2,45
0,6	5,876	7 278	2 638	6 340	2,40
1,0	3,544	7 297	2 606	6 238	2,39

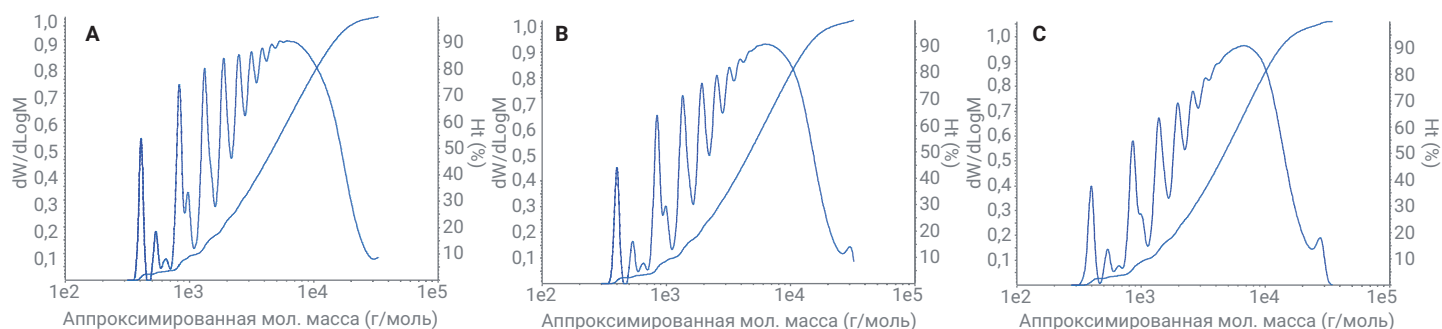


Рис. 4. Сравнение молекулярной массы эпоксидной смолы на колонке Agilent PLgel (две 250 × 4,6 мм, 3 мкм) при разных скоростях потока (А) 0,3, В) 0,6, С) 1,0 мл/мин ТГФ) и детектирования с помощью микро-РД Agilent 1290 Infinity II (M_n : среднечисленный молекулярный вес, M_w : средневесовой молекулярный вес, M_r : молекулярный вес при максимуме пика, PD: коэффициент полидисперсности)

Применение микрорефрактометра в системе гель-проникающей хроматографии Agilent 1290 Infinity II позволяет использовать микроколонок для ГПХ/ЭХ с внутренним диаметром 2,1 мм. Расчет падений применяемой скорости потока, начиная с показанной ранее колонки с 4,6 мм до колонки 2,1 мм, привел к получению результата скорости потока 60 мкл/мин. Градиентный насос Agilent 1290 Infinity II делает возможным достижение необходимой точности скорости потока для поддержания времен удерживания по сравнению с колонками с более высоким внутренним диаметром. Другим преимуществом является меньший дисперсионный объем ячейки микрорефрактометра (2 мкл) по сравнению со стандартным рефрактометром (8 мкл), что обеспечивает повышенное разрешение для низкомолекулярных олигомеров (рис. 5).

Выводы

В данном обзоре продемонстрировано использование системы Agilent 1290 Infinity II в сочетании с микрорефрактометром для классических и микро-ГПХ-методик. Показано, что разделение полимерных смесей при обычных стандартных условиях ГПХ с помощью колонок с большим внутренним диаметром и при высоких скоростях потока эквивалентно таковым, полученным при помощи стандартного рефрактометра. Кроме того, можно использовать колонки меньших внутренних диаметров для снижения расхода растворителя в расчете на одну пробу и повышения пробопотока. Применение микро колонок позволяет использовать методики микро-ГПХ при очень низких скоростях потока в микролитровом диапазоне благодаря сопоставимым результатам измерений молекулярных масс и повышенному разрешению с помощью микрорефрактометра 1290 Infinity II.

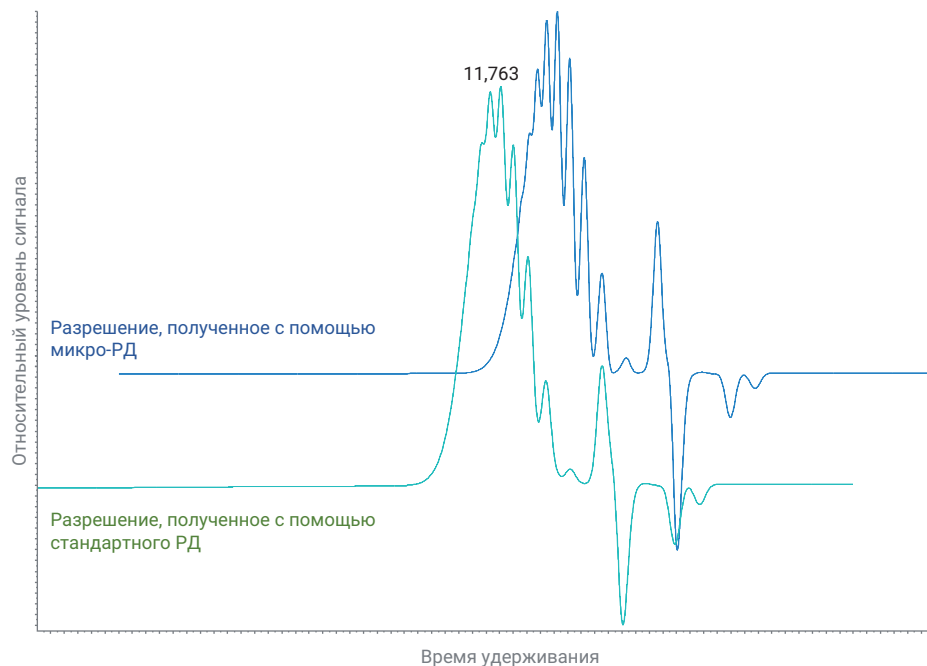


Рис. 5. Сравнение разрешений стандартного рефрактометра и микрорефрактометра для низкомолекулярного ПС 580 (две колонки Agilent OligoPore, 250 × 2,1 мм, скорость потока 60 мкл/мин). Вследствие использования режима многоуровневого дисплея шкала времени удерживания не показана

www.agilent.com/chem

Данная информация может быть изменена без уведомления.

© Agilent Technologies, Inc., 2019
Напечатано в США 1 августа 2019 г.
5994-1089RU