

GPC 色谱柱校准

最佳实践指南

The Measure of Confidence



基础导论

Andrew Coffey 和 Richard Harmer, 安捷伦科技有限公司, Church Stretton, UK

前言

使用窄分子量分布的标准品校准 GPC/SEC 色谱柱组是一种测量样品分子量分布常见的成熟技术。然而，分析人员有时未能充分利用这项技术，或未能从中获得最佳收益。本文介绍了 GPC 色谱柱校准的最佳实践，确保在任何实验室均能获得出色的结果。将以下信息融入标准操作规程中，在将校准曲线视为方法开发的一部分时，每位分析人员均可最大程度从中受益。

重新思考如何使用以及多长时间使用一次 **GPC 应用标准品可显著改善**结果的整体质量，包括：

- 提高重现性
- 提高分离度，以获得更高的准确度
- 尽早发现问题
- 缩短故障排除和系统停机时间
- 对系统进行统计学显著性分析



Agilent Technologies

表 1. GPC/SEC 溶剂和匹配的校准标样

| 洗脱液类型 | 溶剂 | 标准品 |
|--------------------|--------------------------------|------------------------|
| 有机洗脱液 | 四氢呋喃 (THF)、氯仿、甲苯 | 聚苯乙烯 (或聚甲基丙烯酸甲酯) |
| 极性有机洗脱液或有机洗脱液/水混合物 | 二甲基甲酰胺 (DMF)、N-甲基-2-吡咯烷酮 (NMP) | 聚乙二醇/聚环氧乙烷 (或聚甲基丙烯酸甲酯) |
| 水相洗脱液 | 水 | 聚乙二醇/聚环氧乙烷 |

使用哪种标准品?

校准标样的选择取决于所使用的溶剂。有多种标准品可供选择，但适用范围广并涵盖了大部分应用的标准品通常有 4 种，如表 1 所示。

对分析较宽分子量范围的色谱柱组，可选择含 0.2 g 的 10 种不同分子量标准品的预包装校准试剂盒。如果分析的分子量范围较窄，分析人员可选择处于色谱柱运行极限附近的单一标准品。为了实现性价比最大化，可购买 1、5、和 10 g 量的单一分子量标准品。

无论分子量标准品以何种规格提供，在选购时应选择分子量多分散性尽可能窄的标准品。1.10 的多分散指数 (D) 应是最低要求。如果使用了多分散性较宽的标准品，重现性将会降低，因为每次进样间的 M_p 没那么明确。

如何对标准品进行前处理?

对校准标样进行正确的前处理十分重要，可以避免产生假峰、得到错误的校准曲线，以及发生过过滤器和色谱柱滤芯堵塞。

标准品应始终与流动相采用相同的溶剂溶解，这种溶剂应为高纯度等级，通常经过 0.2-0.45 μm 过滤头过滤。如果标准品完全溶解，则无需再进行过滤。同时避免对标准溶液进行涡旋、超声或振荡。所有这些高剪切力的操作将不可避免地导致峰形、保留时间和分子量发生变化。

标准溶液的浓度也是重要因素。浓度过高会使样品粘度过大，从而导致组分传质降低和谱带展宽；而浓度过低则会导致信噪比太低而无法实现可重现的积分。在某种程度上，粘度效应甚至能改变单一标准品的保留时间。图 1 展示了使用不同浓度标准品的粘度效应。考虑到粘度会随分子量浓度发生变化，所有聚合物溶液的最佳浓度取决于所用标准品/样品的分子量 (表 2)。

表 2. 标准品分子量和相应浓度

| 分子量 (g/mol) | 浓度 (重量/体积) |
|-------------|------------|
| < 5000 | < 1.0 |
| 5000-25000 | < 0.5 |
| 200-400000 | < 0.25 |
| 200-2000000 | < 0.20 |
| 10000000 | < 0.05 |

样品溶解度是一个复杂的问题，因此，不能仅凭在溶剂中看不到标准品就判定它已完全溶于溶液。仅在呈无规则线团状的聚合物链内外的溶剂达到平衡时，才可得到真实的样品溶解度。直到这时，特定标准品的流体力学体积才呈现动态，而保留时间和分子量的重现性也同样呈现动态。高分子量标准品需要更长的时间才能完全溶解，某些溶剂/标准品对可能还需要一定的温度助溶。通过加热帮助标准品溶解时，请务必将温度保持在溶剂沸点 10 °C 以下，并确保不发生热降解（表现为拖尾峰形）。

为降低浓度效应，可选用预称重的预处理试剂盒，如 Agilent EasiVial 或 EasiCal 系列。



条件

色谱柱: PLgel 10 μ m MIXED-B, 7.5 \times 300 mm
(部件号 PL1110-6100)

标准品: 聚苯乙烯

洗脱液: THF

流速: 1.0 mL/min

检测器: UV

图示说明:

1. 850000

2. 1130000

3. 170000

4. 34500

5. 5100

6. 580

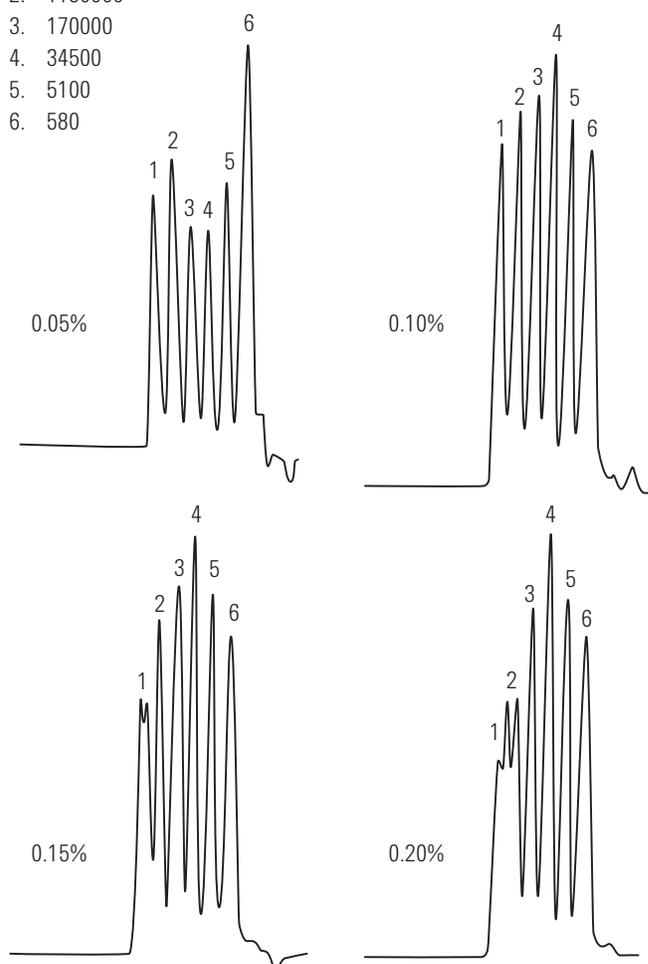


图 1. 标准品分子量和相应浓度

需要多少标准品才能成功实现校准?

通常需要 10 到 12 个数据点构建校准曲线。该普遍采纳的数据点数量足以进行准确的多项式回归，同时还能限制生成标准曲线所需的时间。标准品浓度应涵盖整个色谱柱组的分离范围，以减少分子量计算过程中的外推误差。通过全范围校准色谱柱，校准样品与未知样品随时间的重现性将会得到提高。如果选定色谱柱在整个分子量范围无法校准，建议使用具有线性扩展范围的色谱柱，如 PLgel MIXED。所有 GPC 软件能够在线性回归外推时提供更好的重现性。建议选择的标准品至少包括未知物的全范围分子量分布。

为了节省 12 个数据点所需的分析时间，分子量标准品通常以混标形式（含 3 到 4 种标准品）进样。为确保在混合物前处理时获得最佳重现结果，建议尽可能实现所有组分的基线分离。这样可以避免人为谱带展宽造成的保留时间漂移。为了帮助实现这一结果，建议混合物中单一分子量标准品之间相差 10 倍。为简化这一过程，安捷伦提供了两种形式的含多种标准品和分子量范围的预制分子量标准混合物：

- EasiVial 是为有机和水相 GPC/SEC 提供准确色谱柱校准最快速和最便捷的方法。预处理试剂盒中包括 3 个以不同颜色标记的 2 或 4 mL 自动进样器样品瓶，每个样品瓶内含有 4 种准确称量的聚合物标准品形成的混合物，只需进样 3 次即可获得包含 12 个数据点的校准曲线
- 用于有机溶剂的 EasiCal 系统由两组不同的刮片组成，各包含 10 个可分拆的刮片，每片固化了 5 种聚合物标准品的混合物。浸入流动相时，PTFE 刮片顶端的聚合物薄膜（约 5 mg）迅速溶解，得到两种 GPC/SEC 校准溶液

新标准品应多久配制一次?

标准品通常在原始包装状态下是最稳定的，一旦经过配制后就容易发生降解，紫外线和温度还会加快这种降解。最佳实践方案是每周配制一次新的标准品。建议对 PEO 和 PEG 冷藏储存，但应在使用前取出放置到室温。

如何利用分子量标准品优化液相色谱系统?

GPC 分子量标准品具有较窄的分子量多分散性，因此将其用于检查 GPC 仪器的运行状况时，分析人员能够进行多种统计测量，例如：

- 每个分子量数量级的特定分离度
- 分离度因子
- 塔板数
- 峰对称性
- 谱带展宽（死体积效应）

即使在样品组分析前后进行简单的校准叠加也能提高结果的可靠性，并能立即通知分析人员系统提供的结果是否一致。将所有测量加入 SOP 后，将会显著改善测定结果随时间的相对标准偏差，分析人员可以决定何时更换色谱柱或安排电话服务以缩短仪器停机时间。

计算整个分子量区域内每个分子量数量级的特定分离度

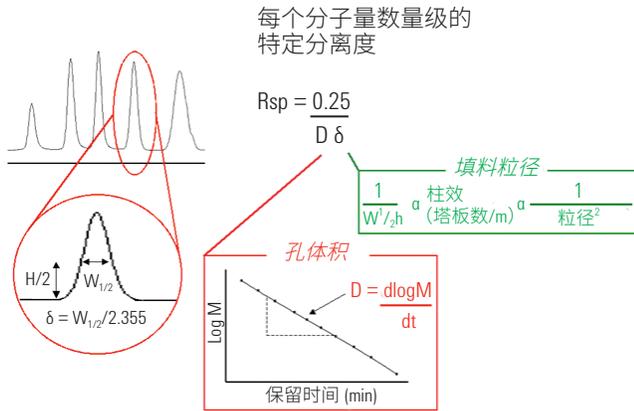


图 2. 计算所有分子量区域每个分子量数量级的特定分离度

计算分离度因子

$$R_s = \frac{2(V_1 - V_2)}{W_1 + W_2}$$

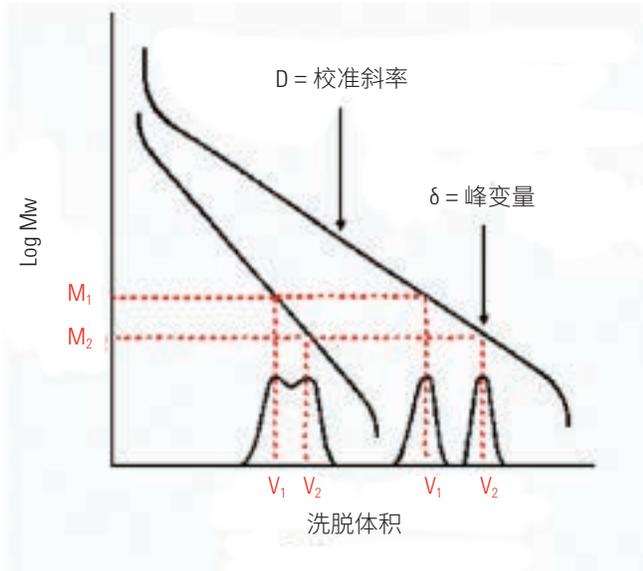


图 3. 计算分离度因子

计算塔板数

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

其中 N 是理论塔板数， t_R 是保留时间， w_h 是半峰宽。

计算峰对称性

$$\text{对称性} = W_1 / W_2$$

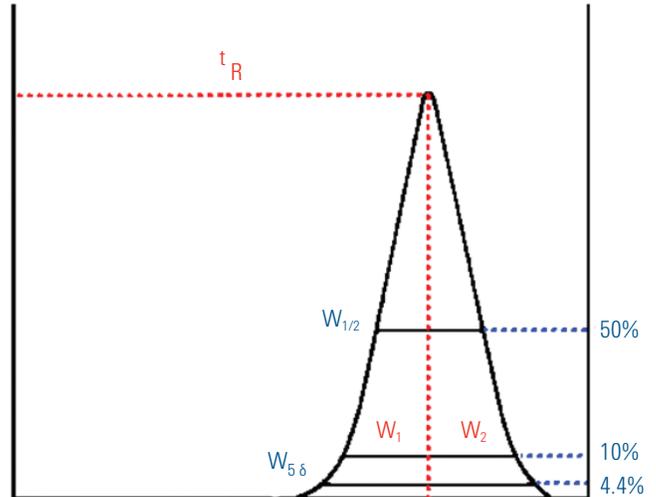


图 4. 计算峰对称性

测量谱带展宽

$$H = Au^{1/3} + B/u + Cu$$

其中 H 和柱效成正比，Au 是排阻峰的宽度，Cu 是全渗透峰的宽度，B/u 是纵向扩散或谱带展宽。

液相色谱系统的哪些组件会产生死体积，从而导致谱带展宽？

系统从进样器到检测器的所有部件都会产生死体积。常见来源包括样品定量环或进样器转子、色谱柱接头、检测器管路和检测器流通池。

减少死体积

首先应确保接头和管路尽可能短，内径尽可能窄。检查它们是否与配套部件正确匹配。需要特别注意色谱柱接头是否正确组装，因为其规格可能因供应商不同而有差别。

其次，尽可能使用最小体积的样品定量环。样品定量环不可部分填充，例如，不可在 100 μL 样品定量环中注入 20 μL 溶液。图 5 为大口径管线和小口径管线的使用对比。窄极管线的优势非常明显。

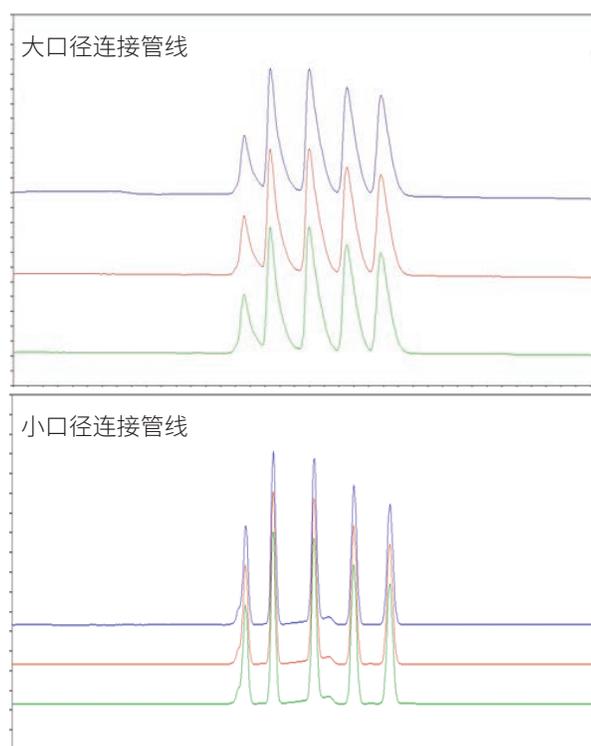


图 5. 与大口径管线相比，小口径管线能够改善 GPC/SEC 峰形

提高分离度还有哪些方法？

还可通过改变多种因素进一步提高分离度，例如升高柱温、使用填料粒径较小的色谱柱、改变流速，以及增加色谱柱组的色谱柱数量。

升高柱温

柱温通常取决于溶剂、样品和色谱柱类型。升高柱温通常会使流动相粘度降低。这有助于提高分离度，或者可以串联更多色谱柱。最高操作温度取决于洗脱液沸点、样品稳定性以及包括色谱柱稳定性在内的其他参数。

减小填料粒径

采用填料粒径较小的色谱柱可得到更高的效率，而这取决于待分析样品的分子量。当分子量增大时，使用粒径非常小的填料时会出现剪切现象。

改变流速

最佳流速因色谱柱填料粒径而异，如图 6 所示。

条件

色谱柱： PL Rapide M, 10 \times 100 mm (部件号 PL1013-2500)
标准品： EasiCal PS-1 聚苯乙烯标准品 (部件号 PL2010-0505)
洗脱液： THF
流速： 多种流速
检测器： UV, 254 nm

图示说明：

1. 7500000
2. 850000
3. 150000
4. 30000
5. 3000

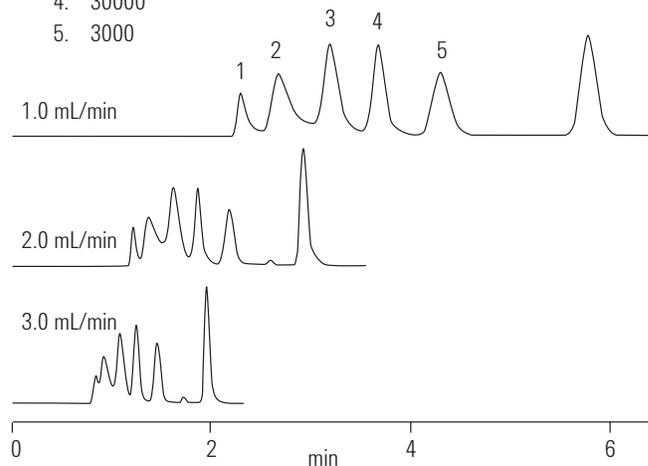


图 6. 根据色谱柱填料粒径谨慎选择最佳流速

增加更多色谱柱

如图 7 所示，可以增加串联的色谱柱数量，但色谱柱数量会受到压力的限制。在评价最合适的色谱柱组时，表 3 可作为开始阶段的参考。

表 3. 填料粒径及其相应的 GPC/SEC 色谱柱数量

| 填料粒径 (μm) | GPC/SEC 色谱柱数量 |
|-----------|---------------|
| 3 | 1-2 |
| 5 | 2-3 |
| 8-10 | 2-4 |
| 20 | 3-4 |

条件

色谱柱: PLgel
标准品: EasiCal PS-1
洗脱液: THF (含稳定剂)
流速: 1 mL/min
检测器: UV

Mp 值

| 第 1 次进样 | 第 2 次进样 |
|------------|------------|
| 1. 7500000 | 6. 2560000 |
| 2. 841700 | 7. 320000 |
| 3. 148000 | 8. 59500 |
| 4. 28500 | 9. 10850 |
| 5. 2930 | 10. 580 |

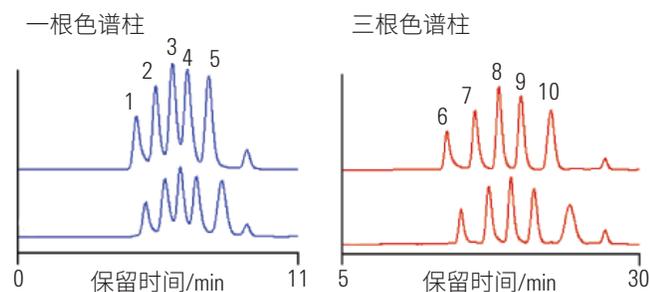


图 7. 增加 Agilent PLgel 色谱柱的数量能够改善基线分离度和峰高

应多久校准一次?

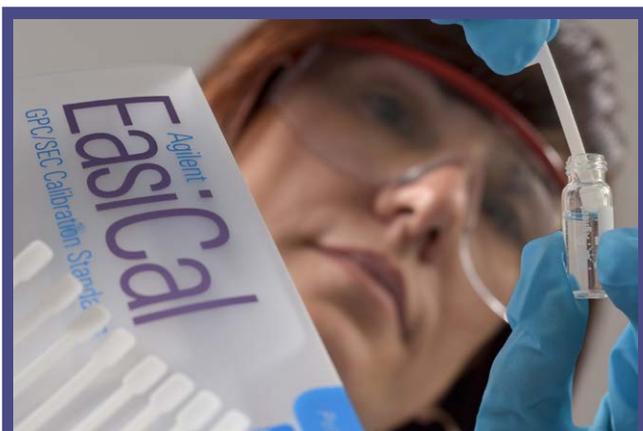
校准频率具有主观性。连续工作状态下建议每天进行校准，而使用内部验证的情况下，应至少每周校准一次。任何时候当系统组件进行了更换或者洗脱液发生了变化，都有必要进行重新校准。然而，为保证最佳性能，建议对每个色谱柱组进行括号式校准。这一操作可显著提高所采集数据的可靠性。

切记液相色谱系统的寿命有限，很多组件的性能会随时间衰退。过滤器堵塞、单向阀堵塞、进样器密封垫泄漏以及接头泄漏或堵塞等仪器故障会影响校准，进而影响样品运行的结果。此外，任何色谱柱性能的下降（如滤头堵塞或部分堵塞，或导致性能随使用时间降低的污染物积聚）都会造成重大影响。频繁校准可以快速轻松地找到这些问题，便于立即采取预防措施。

结论

GPC/SEC 是详细获知聚合物分子量分布的唯一成熟方法。另外，有必要适当关注色谱柱定期校准，以便从仪器和色谱柱中获得最佳结果。

在 ISO 9001:2000 质量标准体系保证下，安捷伦聚合物标准品是实现准确可靠的 GPC/SEC 色谱柱校准的最佳标准物质。我们具有独特特征的高度表征均聚物的附加应用可以作为研究和分析方法开发的模型聚合物。



如需了解关于安捷伦校准标样的更多信息，并找到适合您应用的最佳标准品，请参见《GPC/SEC 标准品产品指南》(5990-7996CHCN)。

如需获取副本并查看其他有用信息，请访问：

www.agilent.com/chem/GPCresources

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/GPCresources

查找当地的安捷伦客户服务中心：

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

安捷伦作为您值得信赖的全方位合作伙伴，将为您提供：

- 引领业界超过 35 年的聚合物 GPC/SEC 表征和分离解决方案
- 业内领先的色谱柱和校准标样的完整产品系列
- 全系列的仪器和软件支持，实现准确的聚合物分析
- 每天 24 小时、每周 7 天的不间断技术支持
- 无可比拟的全球物流系统，确保重要备件准时交货



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，2015

2015 年 4 月 30 日，中国出版

5991-2720CHCN

