

高性能 GPC 色谱柱的原理和应用： 低聚物分析用 TSKgel H_{XL} 型 色谱柱

目录

1. 简介	1
2. GPC 分离原理	1
3. TSKgel H _{XL} 型色谱柱	2
4. 选择色谱柱	3
5. 串联色谱柱	5
6. 流速的影响	8
7. 温度的影响	9
8. 样品大小的影响	10
9. 应用实例	10
10. 结论	16



1. 简介

高效液相色谱法根据分离模式可分为四类：凝胶渗透*（GPC，通常称为尺寸排阻色谱法或 SEC）、吸附（液固色谱法：LSC）、分配（液液色谱法：LLC）和离子交换（IEC）色谱法。以上四种模式中，GPC 是唯一一种不需要在填料和样品之间使用物理相互作用的模式。相反，GPC 的特点是根据样品的分子大小进行分离。从 GPC 获得的大部分数据都与样品的大小（分子量）有关，因此，该过程非常适合分析未知分子。

GPC 的另一个优点是分析过程简单，无需像其他模式一样评估流动相的组分。

目前，GPC 不仅可在分析和过程控制中用于分析低分子量物质、低聚物以及聚合物，还可用于复杂样品的预处理程序和制备分离等。

本报告将就 GPC 的用法进行介绍，并会着重说明 TSKgel HXL 系列高性能色谱柱的特性。利用该特性，可将常规 GPC 色谱柱的分析时间缩短一半。

- * 广义来说，GPC 可以指使用有机溶剂或水溶液作为流动相的过程。近来，使用水溶性流动相的方法已被单独归类为凝胶过滤色谱法（GFC）。

2. GPC 分离原理

我们采用校准曲线来评估 GPC 所用色谱柱的分离性能。图 1 显示了校准曲线并用图形表现了样品在色谱柱中的分离过程。GPC 中所用的填料上拥有无数个大小从几十埃到几千埃的小孔，样品分子可以自由进入这些小孔。

如图 1.1 示例所示，色谱柱中注入了三种不同分子量的化合物。分子尺寸大于填料孔径的物质（A）在填料外的流动相中直接流经色谱柱进行洗脱（总排阻体积： V_0 ）。分子尺寸小于填料孔径的分子（C）由于会扩散到填料的小孔中，洗脱会更慢（ V_i ）。

样品大小不同，其能进入的小孔的百分比也不同。图 1.1 中显示的是大小介于（A）到（C）之间的样品（B）。样品 B 会在（A）和（B）之间的某个时间点从色谱柱中洗脱出来。使用适当的检测器监测色谱柱中的洗脱物，即可得到色谱图，如图 1.2 所示。横轴表示洗脱时间或洗脱体积。在 GPC 中，最大的样品总是最先洗脱，因此可以通过比较洗脱体积估算分子量。使用样品洗脱体积（时间）相对于样品分子量的对数进行作图即可构建出校准曲线，如图 1.3 所示。校准曲线包括两个部分：一部分通常由斜率相对较陡的两条线构成，另一部分则为一条斜率较低的线。

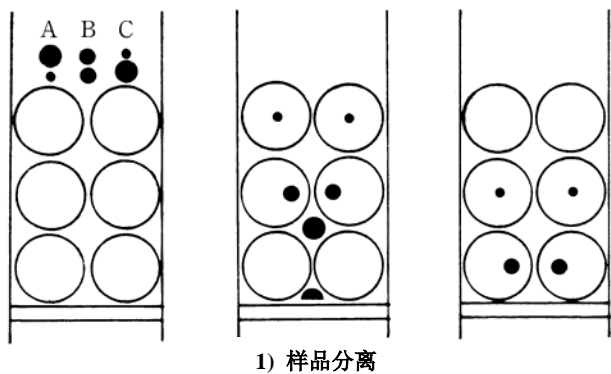
化合物的分离质量可以通过校准曲线的斜率来确定。斜率越平缓，分离效果越好。

校准曲线的（a）部分说明化合物在总排阻体积 V_0 处被洗脱。发生这种情况说明该组分的尺寸大于填料的孔径。可以渗透到孔中的最高分子量称为排阻极限。

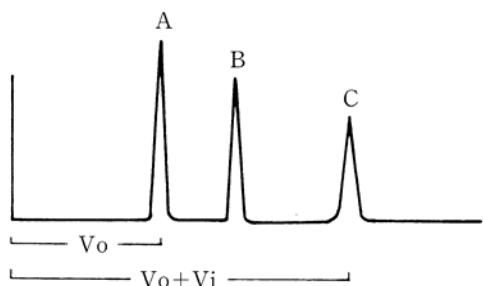
在（c）部分（也称为总夹杂物体积）中，最小的分子已完全进入孔中。实际上，有效的分离仅发生在（b）部分。因此，所选填料（色谱柱）的孔径或排阻极限必须与样品组分大小相匹配。

值得注意的是，校准曲线的纵轴是分子量的对数，因此分离并非基于分子量之间的差异，而是基于分子量之间的比率（ $\log M_2 - \log M_1 = \log M_2 / M_1$ ）。此外，校准曲线会根据分析中所用校准标准品的化学组分而变化。因此，为了准确测量样品的分子量，标准品必须与分析样品的组分具有相同或相似的特性。

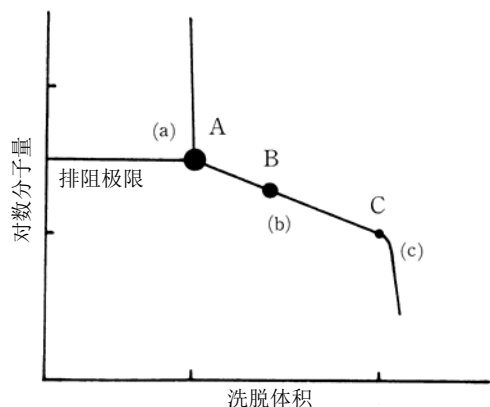
图 2 所示为使用 TSKgel G2000HXL 色谱柱分析正链烷烃、脂肪酸、脂肪醇后构建的校准曲线示例。脂肪酸和正链烷烃按照相同的曲线洗脱，但是，对于脂肪醇，随着分子量的降低，洗脱表现出轻微的延迟。



1) 样品分离

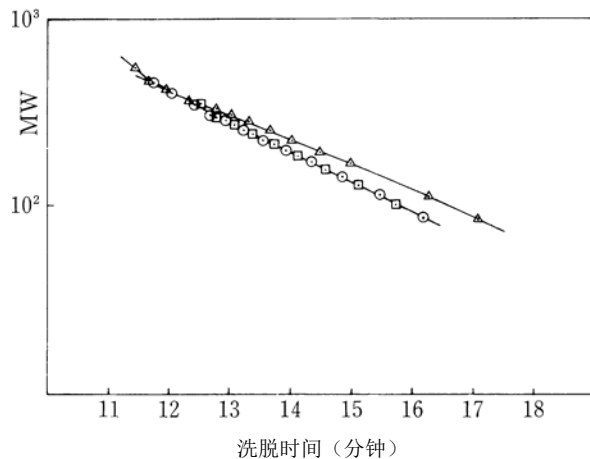


2) 色谱图



3) 校准曲线

图 1 GPC 分离原理



- 脂肪酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$
- △— 脂肪醇 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{OH}$
- 正链烷烃 $\text{C}_n\text{H}_2(n+1)$

图 2 正链烷烃、脂肪酸、脂肪醇的校准曲线

色谱柱: TSKgel G2000HXL
 (7.8 mm ID x 30 cm) x 2
 溶剂: THF
 流速: 1.0 mL/min

3. TSKgel HXL 型色谱柱

TSKgel HXL 型色谱柱的基质是苯乙烯-二乙烯基苯共聚物, 与 TSKgel H 型色谱柱所用基质类似。表 1 列出了 TSKgel HXL 型色谱柱的 9 种等级。与常规 H 型色谱柱相比, HXL 色谱柱的理论塔板数大大增加。特别是在需要高性能的低分子量等级中, 理论塔板数增加了两倍。因此, 色谱柱的长度降到了 30 cm, 仅为常规 60 cm 色谱柱的一半, 大大降低了分析时间和溶剂消耗量。此类色谱柱的另一个优势是理论塔板数更多, 所以其峰的展宽更小, 峰高更高, 从而提高了检测的灵敏度。

通常, 采用聚苯乙烯标准品校准 TSKgel HXL 型色谱柱。得到的校准曲线不仅用于分析聚苯乙烯聚合物样品, 也用于分析许多其他组分的聚合物, 这些聚合物对应的窄分布标准样品往往不易获得。

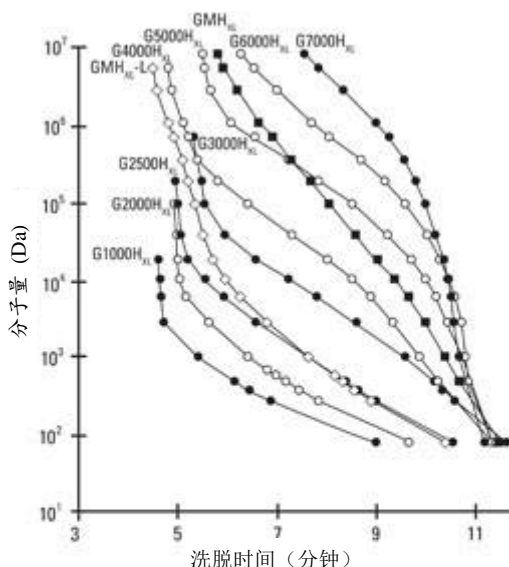
四氢呋喃 (THF) 是最常用的流动相, 但如果目标是制备分离, 氯仿则更为合适。因为加热时, THF 会形成爆炸性聚合物。如果待分析的样品无法溶解于以上任何一种溶剂中, 请使用 DMF 或间甲酚/氯仿之类的溶剂。

表 1 TSK-GEL H_{XL} 色谱柱

名称	排阻极限	理论塔板数
TSKgel G1000H _{XL}	1×10^3	16,000TP/30 cm
TSKgel G2000H _{XL}	1×10^4	16,000
TSKgel G2500H _{XL}	2×10^4	16,000
TSKgel G3000H _{XL}	6×10^4	16,000
TSKgel G4000H _{XL}	4×10^5	16,000
TSKgel G5000H _{XL}	4×10^6	14,000
TSKgel G6000H _{XL}	4×10^7 (估值)	14,000
TSKgel G7000H _{XL}	4×10^8 (估值)	14,000
TSKgel GMH _{XL}	4×10^8 (估值)	14,000
TSKgel GMH _{XL} -HT	4×10^8 (估值)	5,500

4. 选择色谱柱

请根据校准曲线选择色谱柱等级。图 3 显示了不同等级色谱柱的校准曲线。



色谱柱尺寸: 7.8 mm x 30 cm
 样品: 聚苯乙烯标准品
 流动相: THF
 流速: 1.0 mL/min
 温度: 25°C
 检测器: UV@254 nm

图 3 TSKgel H_{XL} 校准曲线

混合床 TSKgel GMH_{XL} 色谱柱的用途是分析聚合物的分子量分布。混合床色谱柱在较宽的分子量范围内都能够实现线性关系，因此，校准曲线的斜率也比单一孔径色谱柱的斜率更陡。如果目标是获得最佳的分离效果，混合床色谱柱就不是首选方案。

如果可以估计分析样品的分子量，则可以直接根据校准曲线选择对应的孔径等级。如果已知样品的分子量在 100 到 100,000 道尔顿之间，则可以使用 TSKgel G4000H_{XL} 和 TSKgel G2000H_{XL} 色谱柱的串联系统分析样品。如果样品的分子量完全未知，请选择混合床 TSKgel GMH_{XL} 色谱柱执行分析。

为了展现使用不同等级的色谱柱进行分析时分离的变化情况，我们使用了从 TSKgel G1000H_{XL} 到 TSKgel G4000H_{XL} 的不同等级的色谱柱针对典型环氧树脂

(Epikote 1004) 进行了分析，得到的色谱图如图 4 所示。在 TSKgel G1000H_{XL} 色谱柱得到的色谱图中，大多数组分均在排阻极限处洗脱，尽管该等级色谱柱无法准确显示分子量的分布情况，但如果是针对制备分离或分析聚苯乙烯换算分子量不高于 800 的低聚物（洗脱时间≥10 分钟）时，可以使用该色谱柱。该色谱柱可在存在聚合物的情况下分析低聚物的含量，方便了高分子量区域的批量测定，缩短了分析时间。

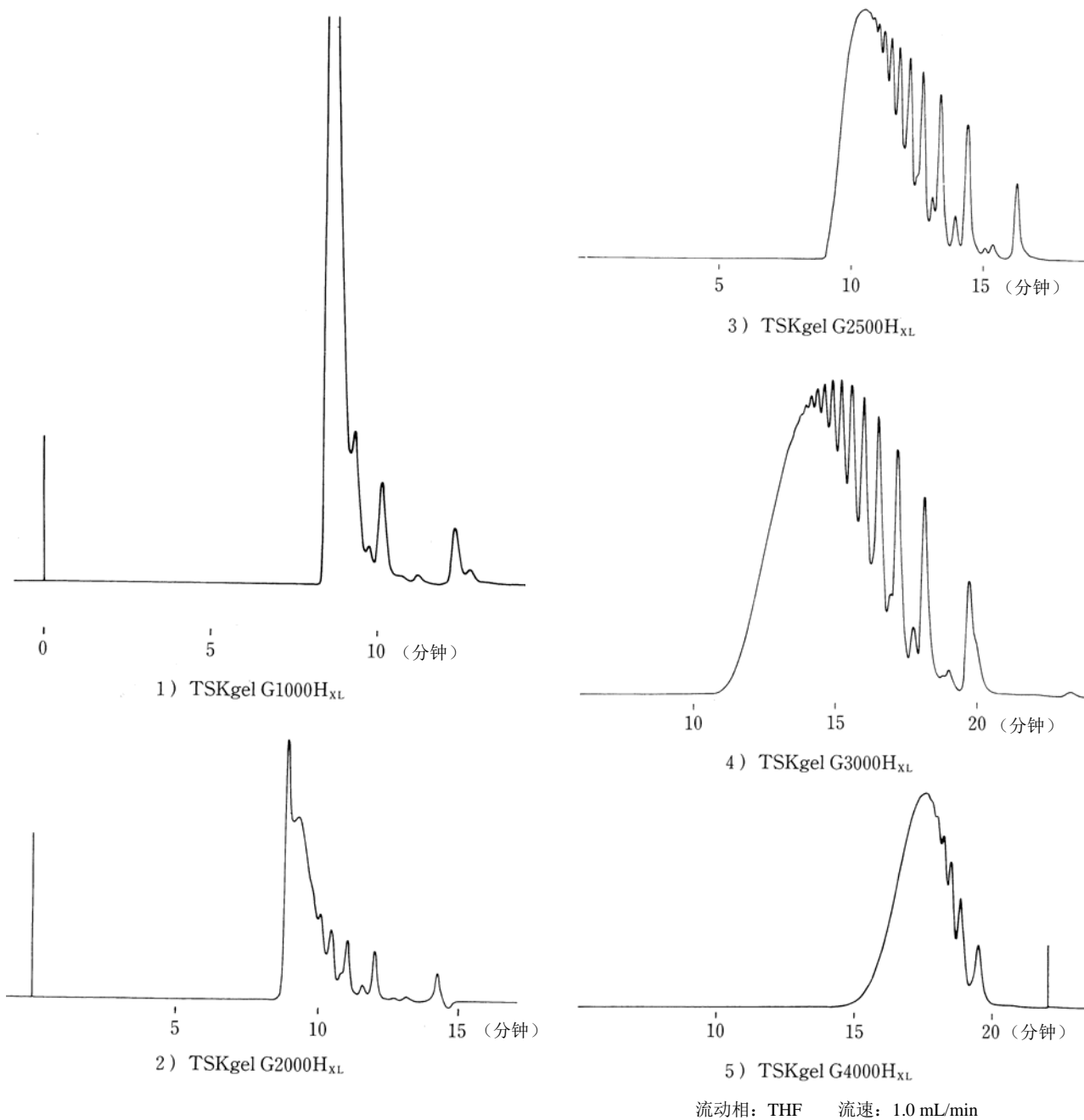


图 4 使用 TSKgel G1000H_{XL} 到 TSKgel G4000H_{XL} 色谱柱分离 Epikote 1004

尽管 TSKgel G2000HXL 比 TSKgel G1000HXL 分离出的峰更多, 某些组分仍然被排阻了, 但在聚苯乙烯换算分子量 800 至 1,000 的范围内, 分离情况有所改善。

实际上, 使用 TSKgel G2500HXL 色谱柱, 能够得到完整的分子量分布。但是, 高分子量范围内的峰形表明存在分子量高于色谱柱排阻极限的组分。聚苯乙烯换算分子量在 2,000 至 10,000 之间的分离性能得到了改善; 但是, 从 TSKgel G2500HXL 色谱柱最后洗脱的组分的分离度却降低了 (MW≈250)。

TSKgel G3000HXL 色谱柱的峰数最多, 是用于获得完整分子量分布的首选色谱柱。此外, 未观察到排阻的聚合物组分 (由 TSKgel G2500HXL 色谱图预测) 的峰。

使用 TSKgel G4000HXL 色谱柱时, 聚苯乙烯换算分子量为 1,000 及以下的组分其洗脱体积等于或接近于夹杂物体积。显然, 该等级色谱柱填料的孔径对于样品而言太大。

从以上讨论可以看出, 即使是相同样品, 如果色谱柱的等级差异很大, 色谱图也会非常不同, 而且如果选择了错误的色谱柱, 将无法获得准确的数据。

各等级的数据重点可以从校准曲线中估算出来。TSKgel G1000HXL 至 TSKgel G4000HXL 等级色谱柱的校准曲线如图 3 所示。使用 TSKgel G1000HXL 时, 洗脱 10.5 mL 后斜率变缓, 且分子量 600 及以下的组分得到了较好的分离。TSKgel G2000HXL 则适用于分离分子量不高于 1,000 的化合物。在低分子量范围内, TSKgel G1000HXL 的校准曲线斜率低于 TSKgel G2000HXL, 因此, TSKgel G1000HXL 更适合分离低分子量组分。使用 TSKgel G2500HXL 时, 其校准曲线斜率较平缓, 可延伸至 3,000 分子量, 稍高于 TSKgel G2000HXL 的斜率。TSKgel G2500HXL 的色谱图在分子量部分分离较好, 但低分子量的分离效果却不如 TSKgel G2000HXL。TSKgel G3000HXL 的校准曲线在 1,500 至 10,500 的分子量范围内斜率逐渐变化。从色谱图看, 其高分子量侧的分离度优于 TSKgel G2500HXL, 但低分子量的分离度不佳。TSKgel G4000HXL 的最佳分子量范围是 10,000 至 200,000。对于分子量范围在 200 至 30,000 的样品, 分析结果存在着明显差异, 对该范围内的聚合物间的分离不够充分。

如上所述, 在 GPC 中, 校准曲线提供了关键信息, 因此, 进行样品分析时, 请务必查看校准曲线。

5. 串联色谱柱

在 GPC 分析中, 常会需要串联多根色谱柱。原因如下:

- (1) 提高分离效果, 或
- (2) 扩大可分离的分子量范围

液相色谱中的样品组分的分离性能用以下等式 (1) 表示。

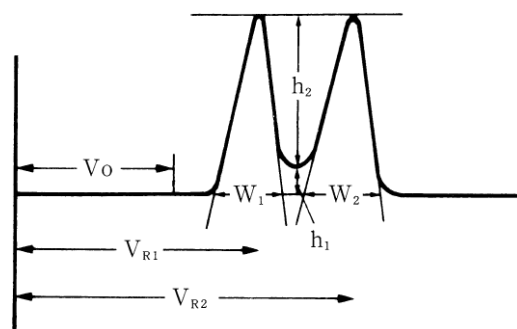
$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k'}{k' + 1} \right) \dots \dots \dots (1)$$

在等式 1 中, R 表示两个组分之间的分离度。R 值越高, 分离性能越好。N 是理论塔板数, α 是选择性, k' 是保留因子, 可分别通过等式 (2) 和等式 (3) 计算。

$$\alpha = \frac{V_{R2} - V_0}{V_{R1} - V_0} \dots \dots \dots (2)$$

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \dots \dots \dots (3)$$

(有关 V_R 和 V_0 , 请参见图 5)



$$R = \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{W_1 + W_2} \dots \dots \dots (4)$$

或

$$\frac{h_2}{h_1 + h_2} \times 100 \dots \dots \dots (5)$$

在等式 (4) 中, 该值随分离性能的提高而增加; 在等式 (5) 中, 100 % 表示实现完全分离。

图 5 分离度的计算方法

如“GPC 分离原理”部分所述，由于样品组分在理想的 GPC 中不会与填料发生相互作用，因此分离度 (R) 由理论塔板数和校准曲线的斜率决定。

使用 GPC 分离样品组分 S1 和 S2 时， α 和 k' 是常数，与色谱柱长度无关。如果色谱柱的长度加倍，则 V_R 和 V_0 也会加倍。因此，等式 (1) 变为

$$R = K \sqrt{N} \dots\dots\dots (6) \text{ K: 常数}$$

增加理论塔板数最简单的方法是增加色谱柱的长度。

图 6 显示的是，使用一到四根 TSKgel G2000H_{XL} 色谱柱分析邻苯二甲酸酯等所得到的色谱图。随着柱长的增加，理论塔板数成比例增加（用苯测量），分离度也随之提高。

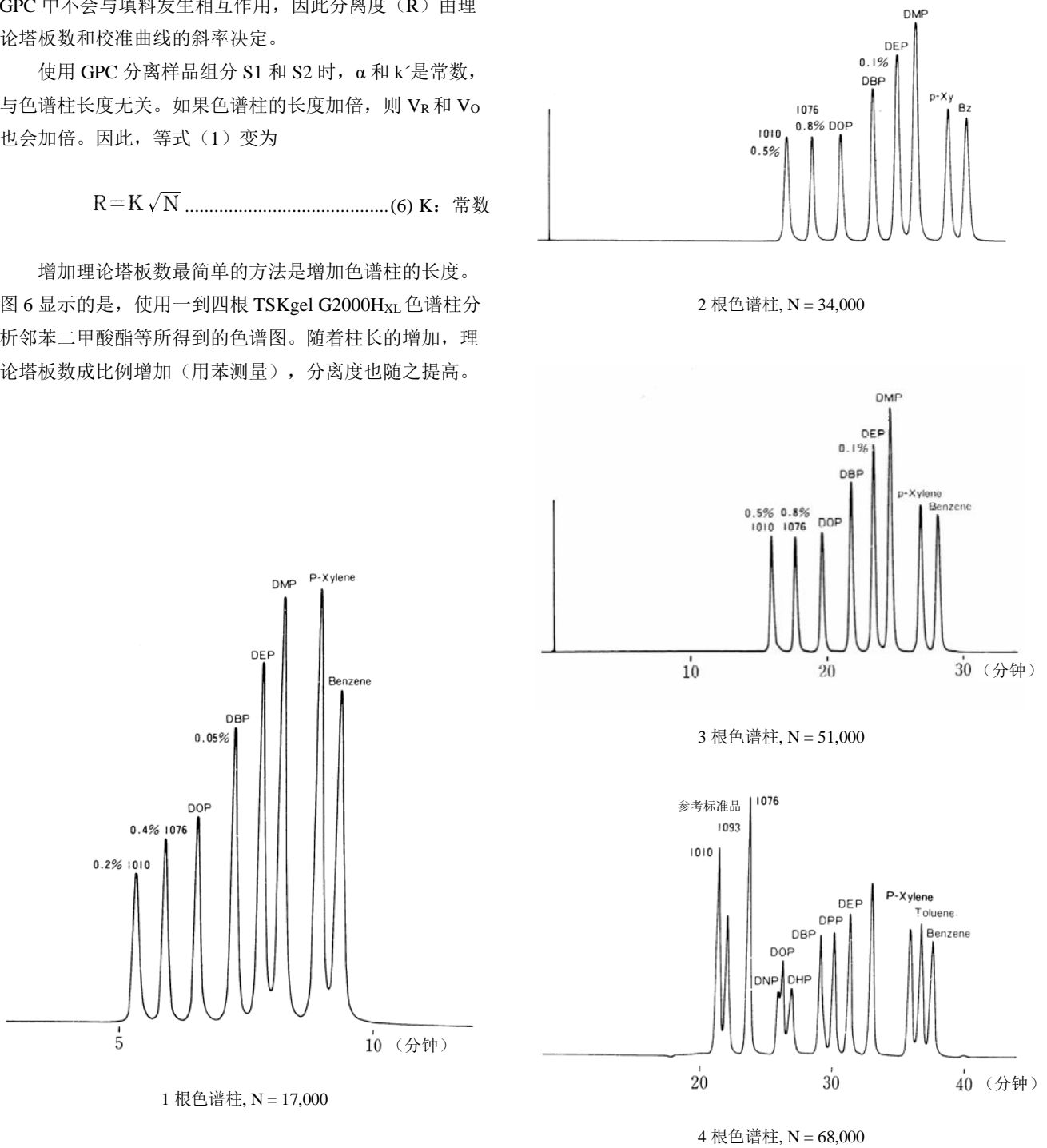


图 6 使用 TSKgel G2000H_{XL} 分离邻苯二甲酸酯

图 7 显示的是将 DEP 和 DMP* 的分离度 (R) 相对于理论塔板数的平方根 (\sqrt{N}) 作图的结果。从图 7 中可以明显看出, R 与理论塔板数的平方根 \sqrt{N} 之间存在线性关系, 因为 R 按平方根 \sqrt{N} 成比例增加。通常在 GPC 中, 理论塔板数表示为每根色谱柱理论塔板数的总和。因此, 当需要改善样品组分的分离效果时, 可以根据目标分离度利用平方根 \sqrt{N} 计算所需的色谱柱数量。

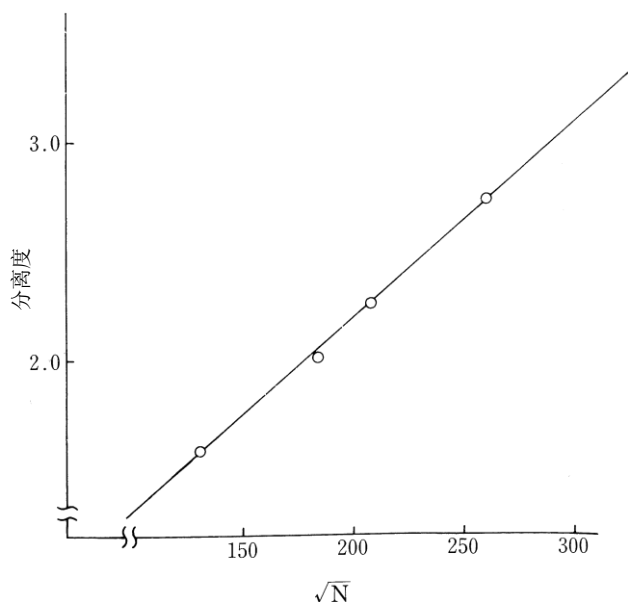


图 7 理论塔板数对 DEP-DMP 分离度的影响

其次, 如果使用单一等级 (孔径) 的色谱柱无法进行分离或仅能够在较窄的分子量范围内实现分离, 建议串联多根不同等级的色谱柱。不同等级色谱柱串联组成的系统的校准曲线可通过每根色谱柱各自的校准曲线计算出来。如表 2 所示为串联两根 TSKgel G2000H_{XL} 色谱柱和两根 TSKgel G3000H_{XL} 色谱柱的示例。表中表示 TSKgel G2000H_{XL} 和 TSKgel G3000H_{XL} 的列标题下, 显示了各个色谱柱的洗脱体积。G2H+G3H_{XL} (cal) 列对应的数值表示两根 TSKgel G2000H_{XL} 色谱柱与两根 TSKgel G3000H_{XL} 色谱柱组合时, 其洗脱体积的计算值。G2H+G3H_{XL} (obs) 列对应的数值表示两根 TSKgel G2000H_{XL} 色谱柱与两根 TSKgel G3000H_{XL} 色谱柱组合时, 其洗脱体积的实际测量值。生成的校准曲线如图 8 所示。实线表示计算值; 图上的点表示实际测量值。计算值和测量值非常吻合。需要组合不同等级的色谱柱时, 如果知道各个色谱柱的校准曲线, 则可以通过计算得出任何色谱柱系统的校准曲线。

表 2 校准曲线的计算方法

分子量	G2H _{XL}	G3H _{XL}	G2H+3H _{XL} (cal)	G2H+3H _{XL} (obs)
6200	9.0 (mL)	13.9 (mL)	22.9 (mL)	22.9 (mL)
2800	9.8	15.6	25.4	25.2
682	12.1	18.3	30.4	30.4
578	12.5	18.6	31.1	31.0
474	12.9	18.9	31.8	31.8
370	13.5	19.3	32.8	32.8
266	14.4	19.9	34.3	34.3
162	15.8	20.7	36.5	36.4

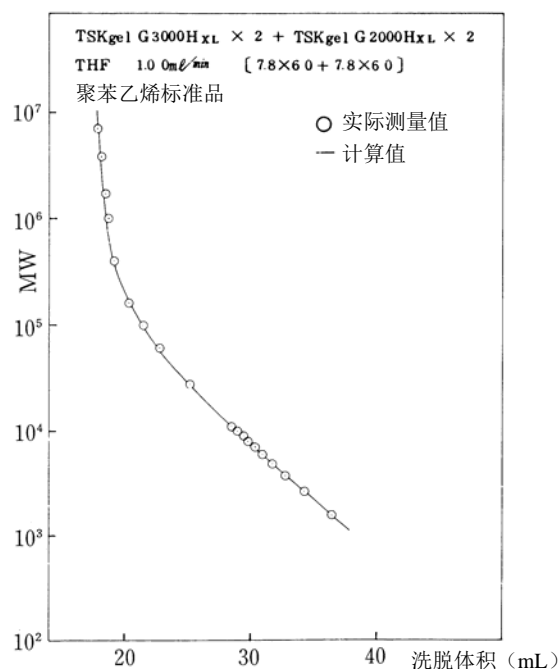


图 8 TSKgel G2000H_{XL}+TSKgel G3000H_{XL} 的校准曲线

6. 流速的影响

众所周知，在高效液相色谱中，柱效和样品分离度随流动相的流速而变化。图 9 显示了使用 TSKgel 2000H_{XL} 在不同的 THF 流速下对聚苯乙烯低聚物 A-500 的分析结果。表 3 表示的是聚合度 (n) 为 5-4 和 4-3 的组分的分离度* 的计算值。

表 3 流速引起的分离度变化

流速	0.26 (mL/min)	0.50	1.00
R ₅₋₄	86 (%)	83	81
R ₄₋₃	94 (%)	92	90

*使用图 5 (1) 中所示的方法计算

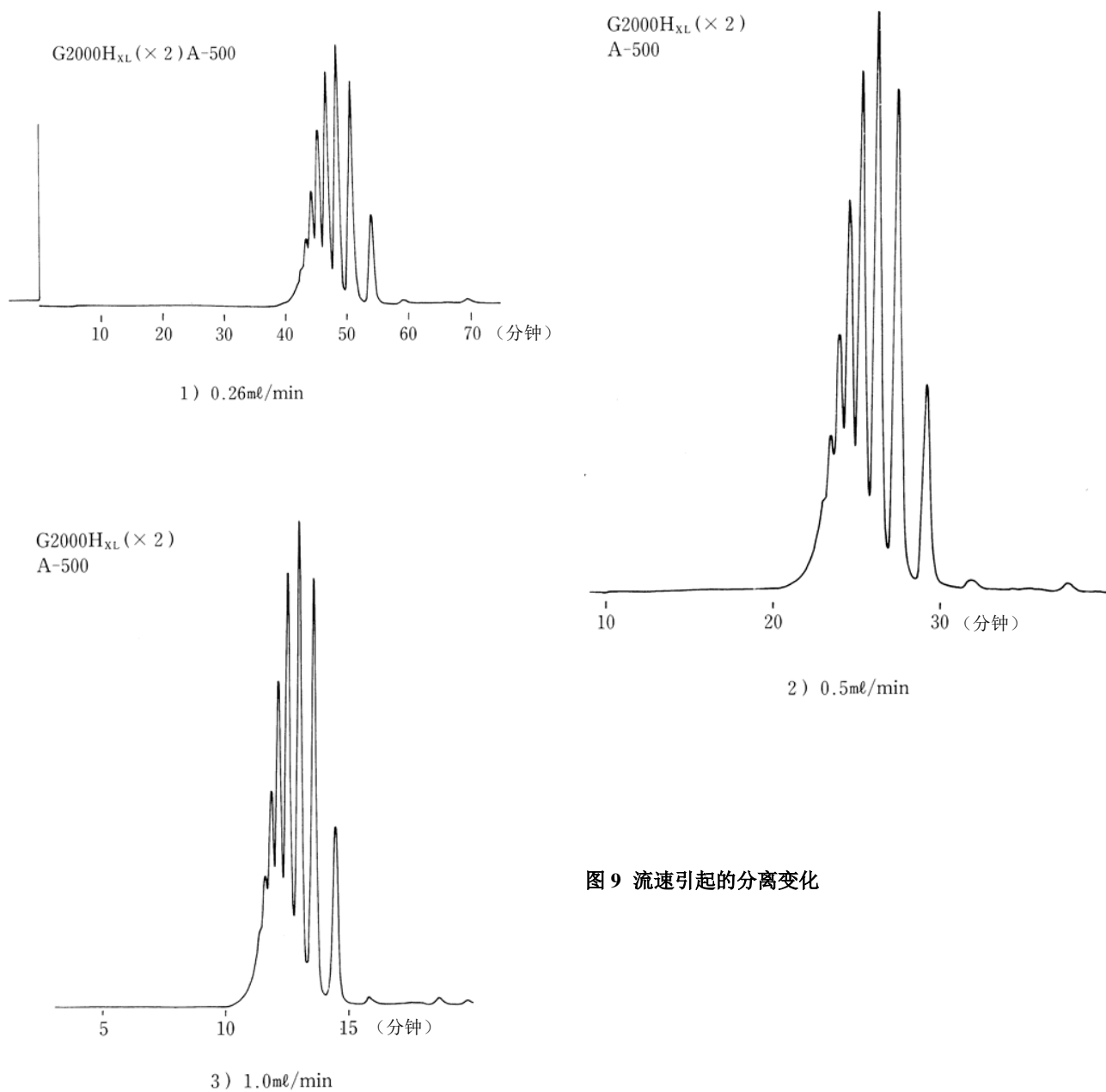


图 9 流速引起的分离变化

即使以 0.26 mL/min 的流速进行分离, 与 1.0 mL/min 相比, 分离效果也未见明显改善。由于 TSKgel H_{XL} 型色谱柱中填料的粒径较小, 因此流速的影响相较于常规色谱柱要更小, 特别是对于低分子量化合物的影响更是微乎其微。相反, 随着流速的降低, 分析时间延长了。图 10 显示了使用四根 TSKgel G2000H_{XL} 色谱柱分析 A-500 时的结果。图 10 中的分析时间与图 9 中的分析时间大致相同。从色谱图中可以明显看出, 测量时间相同时, 如果使用的色谱柱更多, 可显著提高分离度 (R₅₋₄ 和 R₄₋₃ 分别提高了 95% 和 98%)。

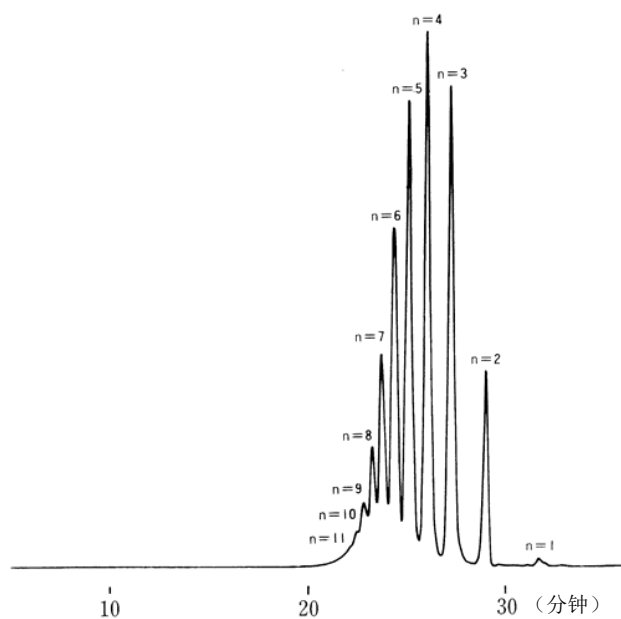


图 10 使用四根 G2000H_{XL} 色谱柱分离 A-500

流动相: THF

流速: 1.0 mL/min

7. 温度的影响

通常在 GPC 中, 柱温升高时, 峰会变得更尖锐, 分离度也会提高。这是因为, 流动相的粘度随着温度的升高而降低, 加速了样品的扩散。图 11 显示的是, 在室温和 40°C 的条件下分别分析聚苯乙烯 500 时获得的色谱图。表 4 列出了各个峰分离度的计算结果。如图 11 和表 4 所示, 低分子量组分的分离几乎不受温度影响, 但在 40°C 时, 高分子量组分的分离度略有提高。分析高分子量的物质时, 提高柱温可获得更好的结果。

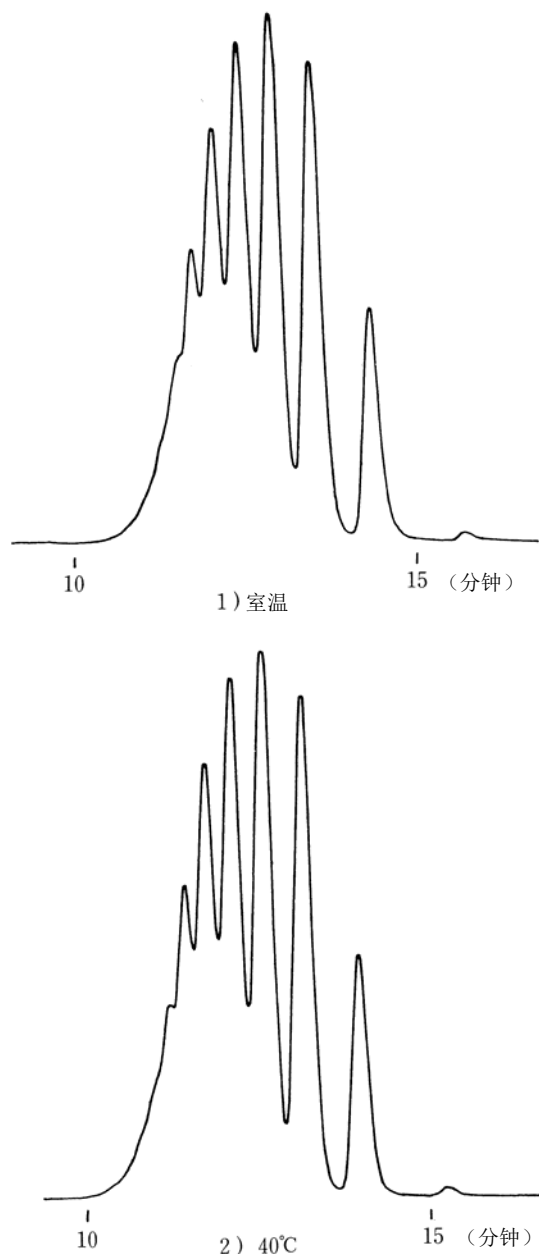


图 11 柱温对分离的影响

色谱柱: G2000H_{XL}

溶剂: THF

流速: 1.0 mL/min

样品: 聚苯乙烯 A500

表 4 柱温对分离度的影响

柱温	R ₃₋₂	R ₄₋₃	R ₅₋₄	R ₅₋₆	R ₆₋₇
室温	98 (%)	86	64	44	28
40°C	98 (%)	87	65	46	32

8. 样品大小的影响

除分析外，制备规模分离也是 GPC 的另一项常见应用。当需要大量样品组分进行深入研究时，可选择大型制备柱，如果是只需要少量样品，则标准分析柱更合用。

制备分离时，选择合适的进样体积和样品质量很重要。通常，增加样品进样体积可能会由于过载而导致峰变形。高性能色谱柱由于其峰体积更窄，过载现象也更明显。质量过载是另一个值得注意的问题。图 12 显示的是，使用 TSKgel G2000H_{XL} 分析苯和 Irganox 1010 时，理论塔板的等效高度（H 或 HETP）与样品质量之间的关系。样品质量（通常称为样品负载）的变化会引起 H 变化，这种变化取决于样品的分子量。分子量越高，H 越容易受到样品质量增加的影响。样品进样量主要由分离组分的洗脱位置决定，虽说一般没有具体数值，但可以肯定的是，使用 TSKgel G2000H_{XL} 可以对样品质量为 1 到数毫克的样品进行制备分离。

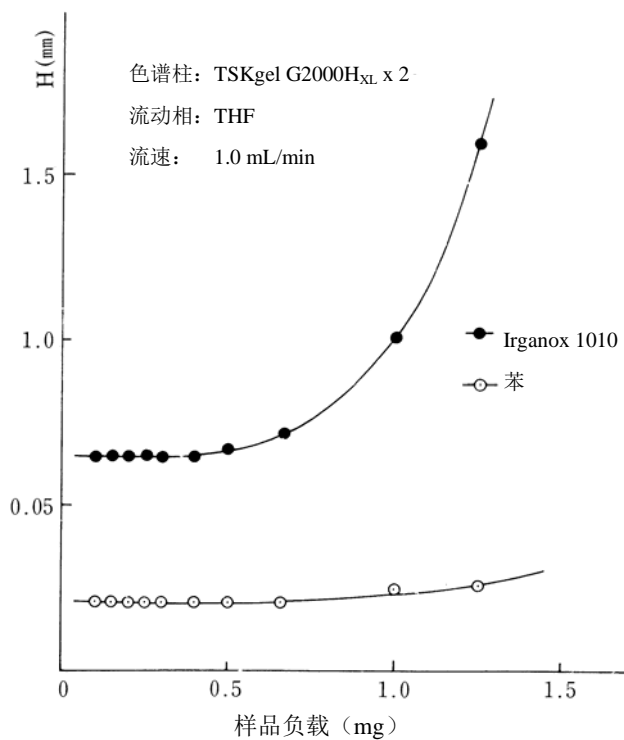


图 12 理论塔板数与样品质量之间的关系

9. 应用实例

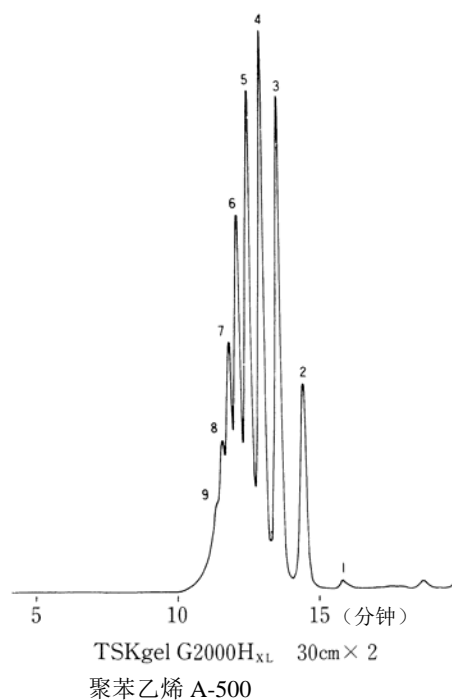
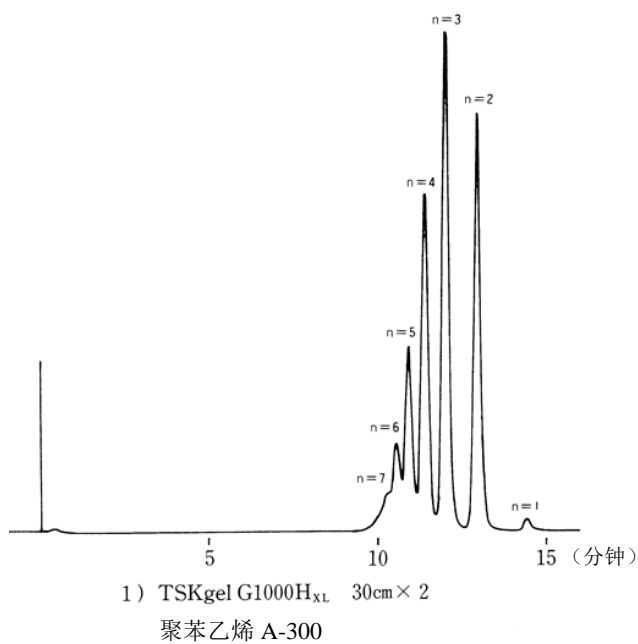


图 13 使用 TSKgel H_{XL} 型色谱柱分离聚苯乙烯低聚物

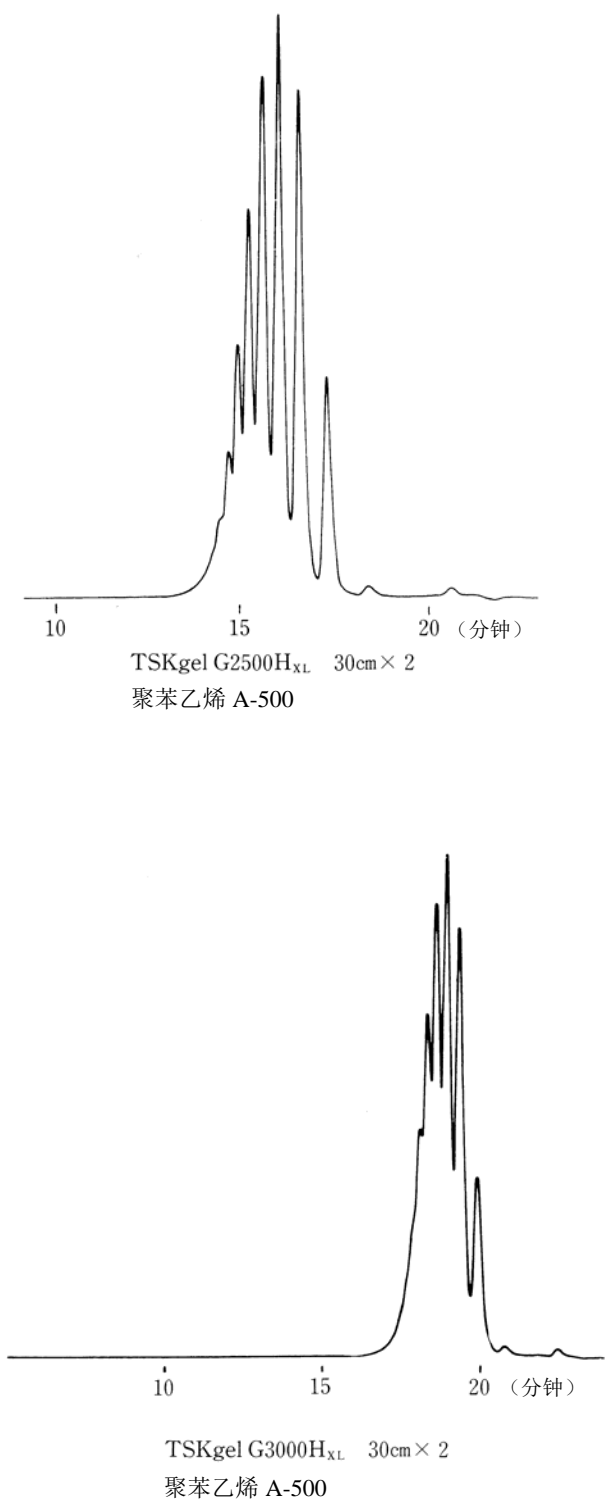


图 13 (续) 使用 TSKgel H_{XL} 型色谱柱分离聚苯乙烯低聚物

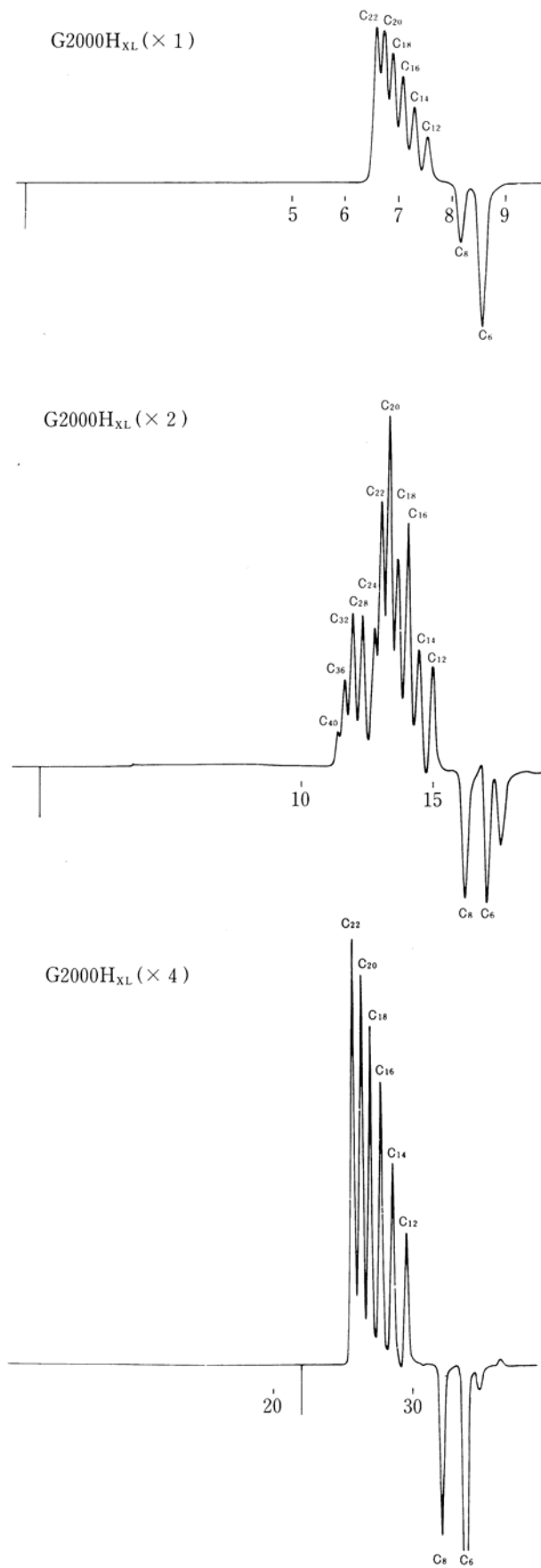


图 14 正链烷烃的分离

色谱柱: G2000H_{XL}

流动相: THF

流速: 10 mL/min

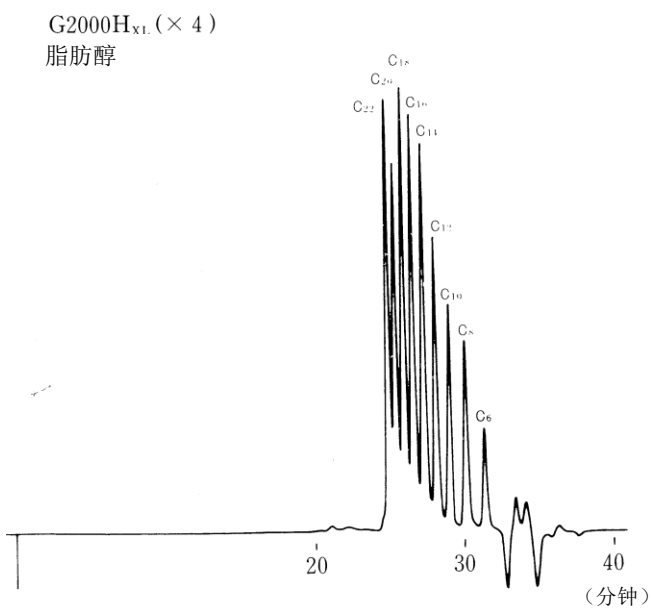
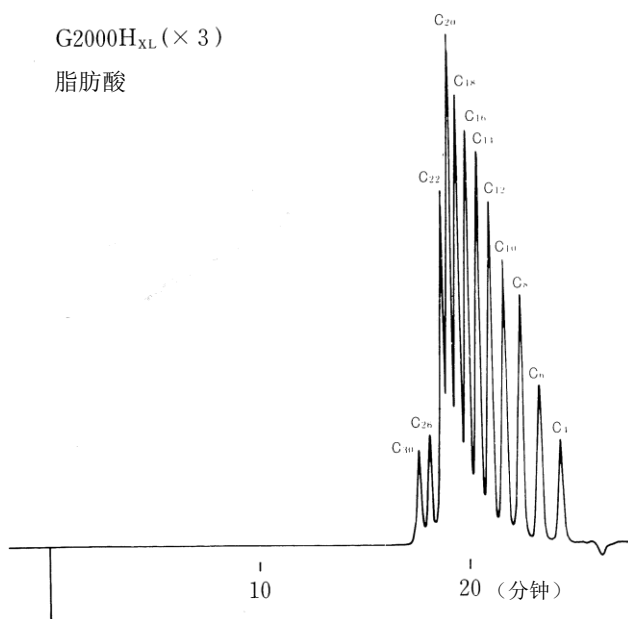
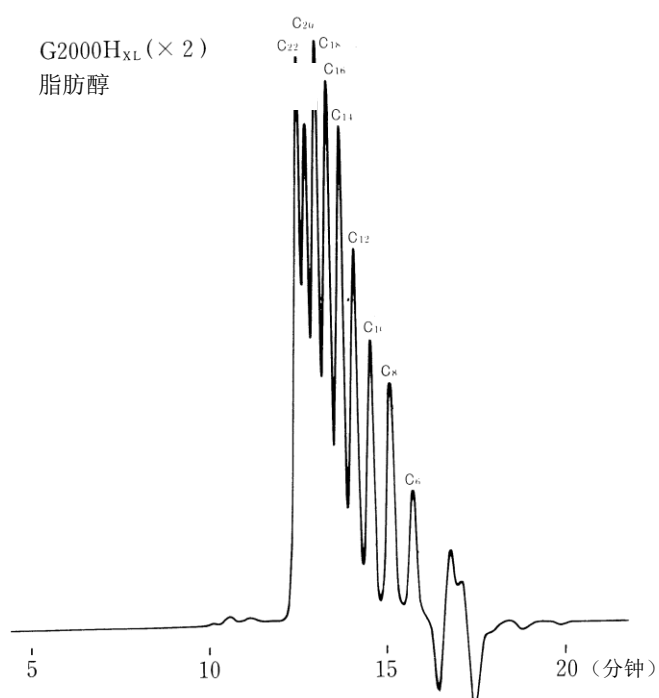
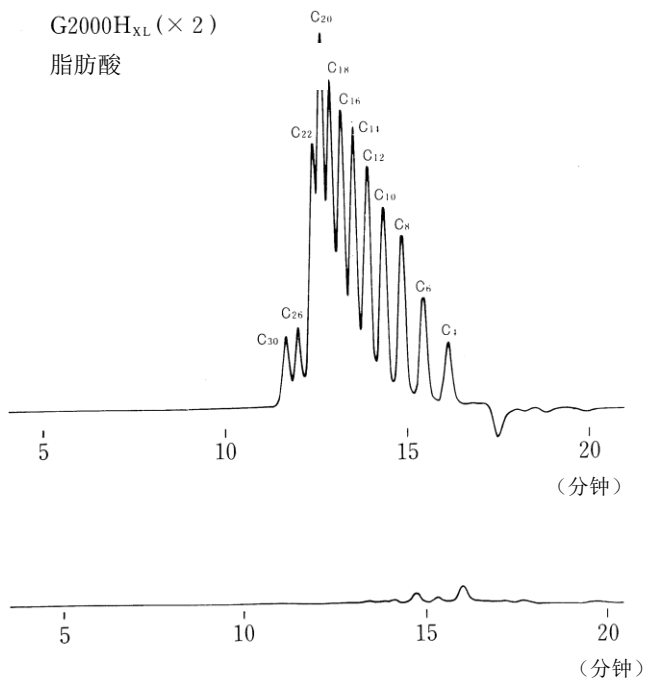


图 15 脂肪酸的分离

图 16 脂肪醇的分离

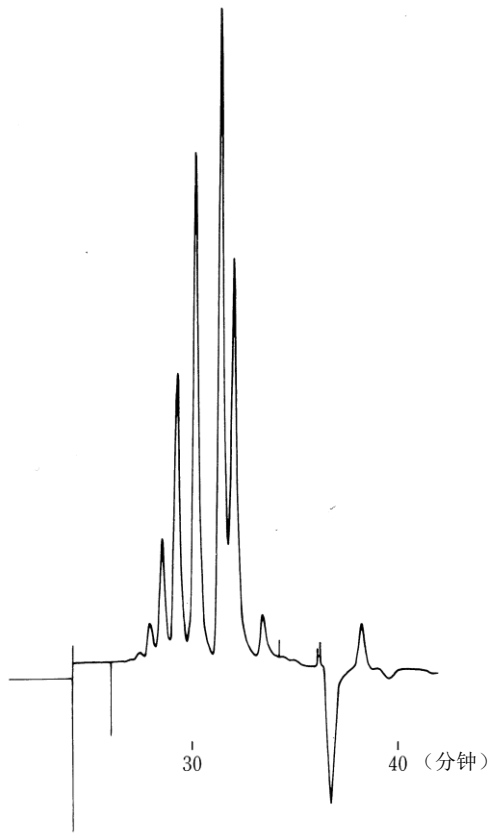


图 17 聚乙二醇的分离

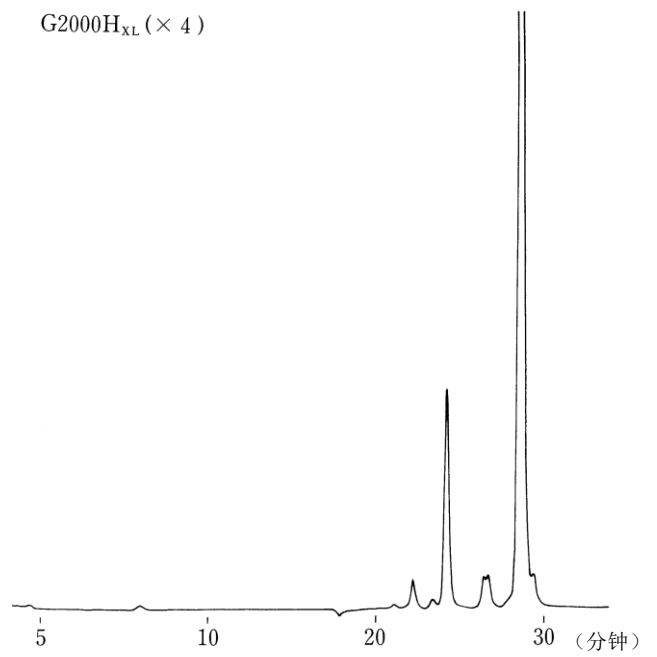
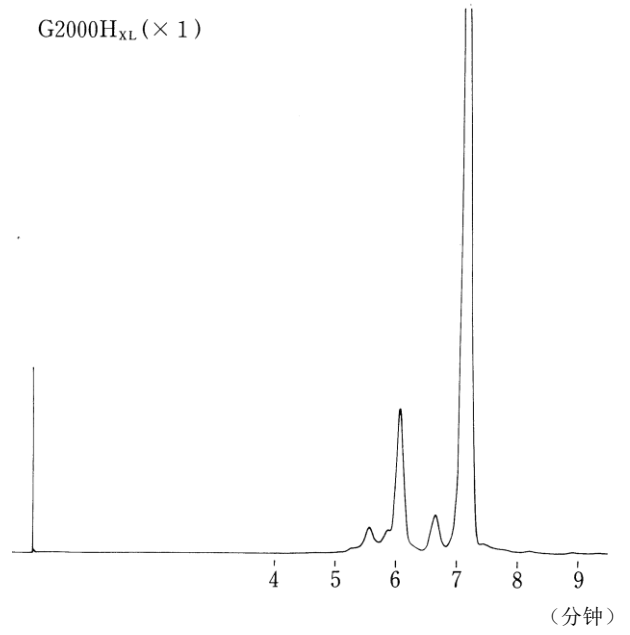
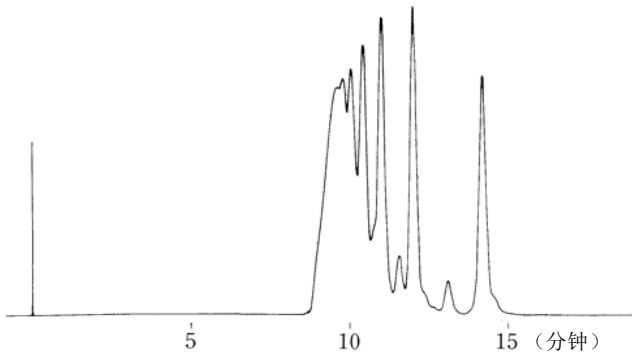
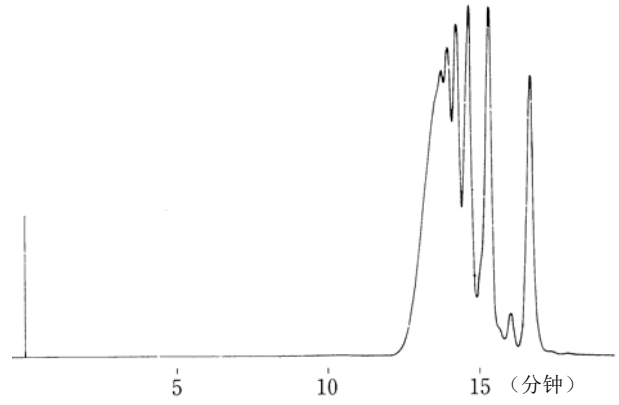


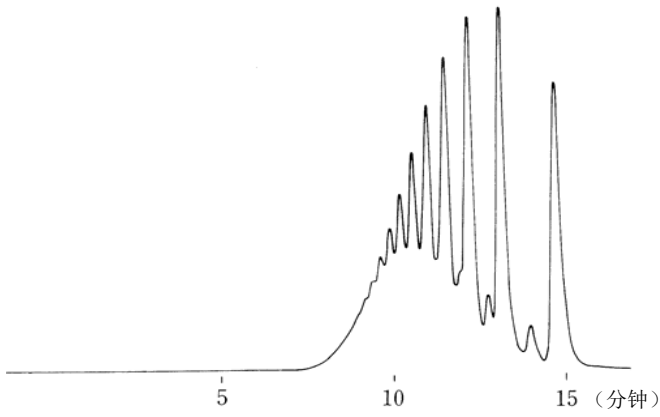
图 18 Epikote 828 的分离



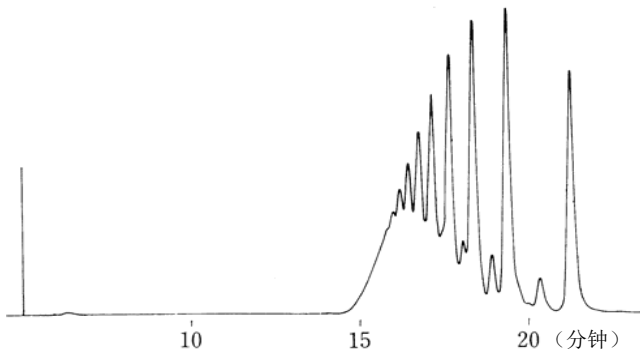
(1) G2000H_{XL}: 2 根色谱柱



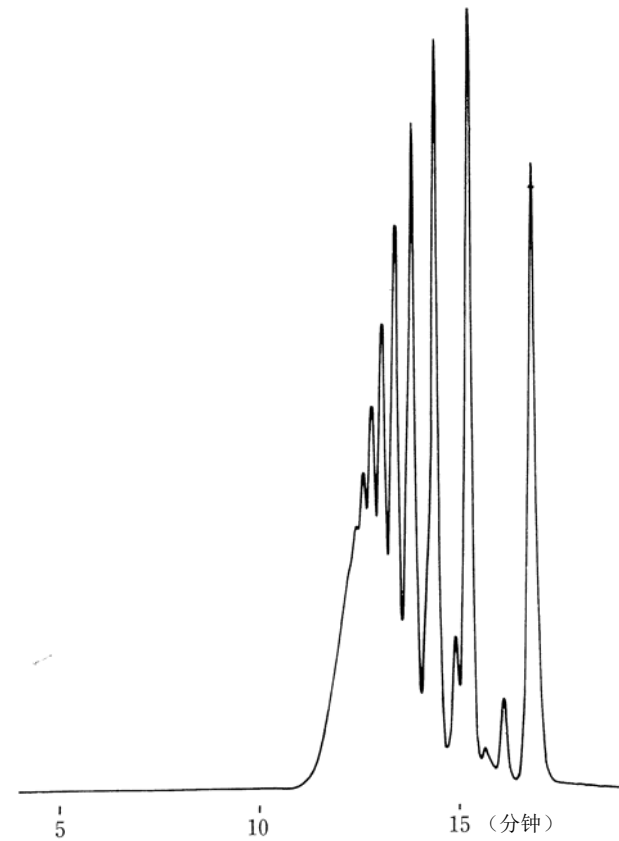
(5) TSKgel G4000H_{XL}+TSKgel G2000H_{XL}



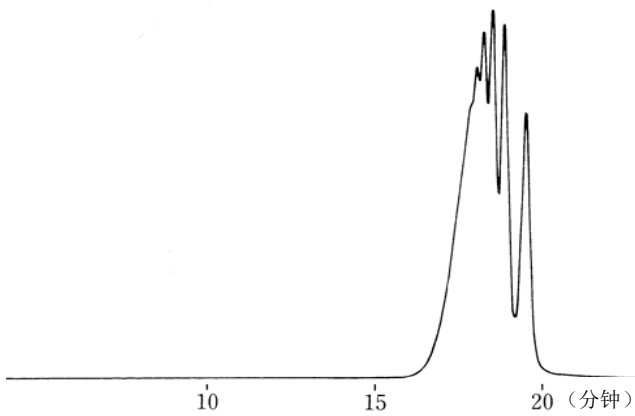
(2) G2500H_{XL}: 2 根色谱柱



(3) G3000H_{XL}: 2 根色谱柱



(6) TSKgel G4000H_{XL}+TSKgel G3000H_{XL}+
TSKgel G2500H_{XL}+TSKgel G3000H_{XL}



(4) G4000H_{XL}: 2 根色谱柱

图 19 Epikote 1001 的分离

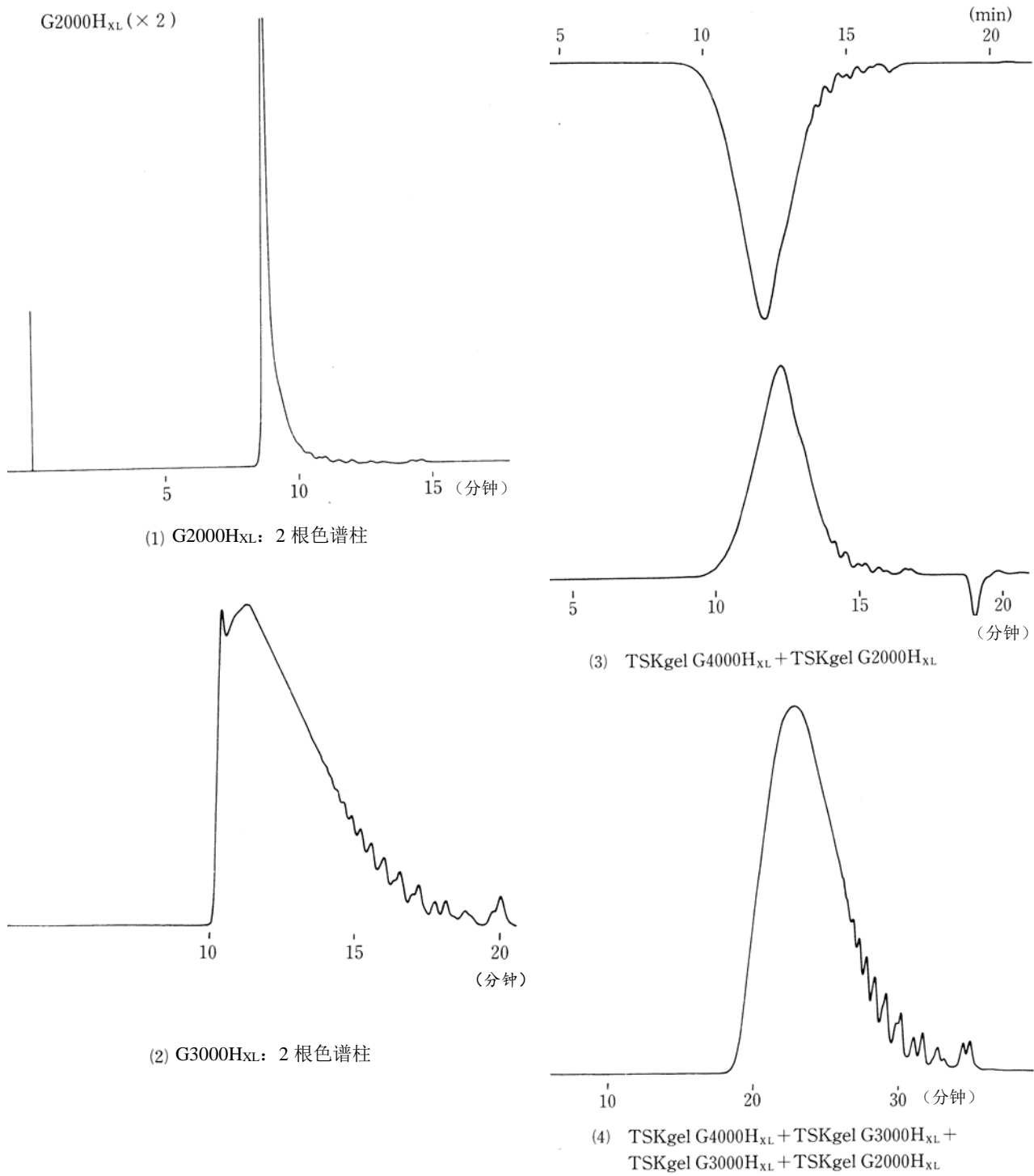


图 20 Epikote 1009 的分离

10. 结论

总的来说，使用常规 GPC 进行分析时花费的时间要远超过于使用反相或正相 HPLC 进行分离时的时间。针对这一点，TSKgel H_{XL} 型色谱柱进行了重大改进，相比使用常规 GPC 色谱柱，分析时间大大缩短。使用 TSKgel H_{XL} 型色谱柱具有许多优点，主要包括分析时间减半，分析性能提高，溶剂消耗量和处理成本降低等。高性能 GPC 与 TSKgel H_{XL} 型色谱柱的组合使用有望得到广泛应用，因为该色谱柱技术完美地解决了三个关键的分析需求：易用、快速、灵敏。