凝胶渗透色谱仪及其使用

鲁红

(仲恺农业工程学院 化学与化工学院, 广州, 510225)

摘要 对凝胶渗透色谱(GPC)仪的基本概念、原理、数据处理、校正方法及应用情况作了介绍,对用户合理使用 GPC 仪具有参考意义。

关键词 凝胶渗透色谱 分子量 分子量分布

凝胶渗透色谱(Gel Permeation Chromatography, GPC)也称为体积排除色谱或尺寸排除色谱(Size Exclusion Chromatography, SEC),是液相色谱的一个分支,是高聚物表征的重要方法之一。由于 GPC 仪可以同时测定高聚物分子量及其分子量分布的情况而受到用户的青睐,但笔者在工作中发现由于很多测试用户对 GPC 仪器的原理及数据处理方法缺乏了解,导致实验技术人员与测试用户之间产生不必要的误会,甚至使测试用户由于对实验数据缺乏正确认识而无法达到实验目的。本文对 GPC 仪的原理、数据处理方法、应用情况作一介绍,使用户根据自身的实际情况合理使用 GPC 仪器。

1 基本概念

1.1 高聚物的平均分子量

合成聚合物都是以单体为原料经过聚合反应而制得的,每个聚合物分子都是由数目很大的单体分子加成或缩合而成,所以合成聚合物的分子量比单体要大百倍、千倍甚至上万倍,而且生成的聚合物的分子量是不均一的,也就是说每个聚合物分子可以由不同数目的单体分子聚合而成,所以各聚合物的分子量是不相等的,这种现象叫做聚合物的分子量的不均一性或分散性。对这样一个多分散的体系来说,我们要表征它的分子量就需要用统计的方法,求出试样分子量的平均值和分子量分布。由于应用统计方法的不同,即使对同一个试样,也可以有许多不同种类的平均分子量,几种最常用的平均分子量为: M_n (数均分子量); M_w (重均分子量); M_z (Z 均分子量); M_{z+1} (Z+1 均分子量); M_p (峰位分子量);

M_η (粘均分子量)。一般情况下,多分散样品的平均分子量有以下次序: $M_z > M_w > M_\eta > M_n$ 。

1.2 高聚物多分散性的表征

相对分子量分布(多分散性指数)对聚合物的性质有重要影响,经典的测定方法可分为两类:一类是直接法,需要把试样先分离为不同分子量的级分,然后测定各级分的分子量和相对含量;另一类是间接法,例如超离心沉降速度法,是在离心力场下测定高分子溶液的沉降系数分布,然后从沉降系数与分子量的关系得到分子量分布。超离心沉降速度法由于仪器条件的限制,应用不能得到普及,因此凝胶色谱出现以前,通常采用的方法还是分级法,用逐步沉淀或逐步溶解的方法对试样按分子量进行分级。由于不同聚合度的合成高分子的基本化学结构是相同的,高聚物试样实际上是一个基本化学结构相同而聚合度不同的分子混合物,这样一个分子混合物的分离问题是比较困难的。分级法的分离基础是基于不同分子量的高分子在不同温度下或在溶剂-沉淀剂体系中的溶解度不同,因此分相过程是一个平衡过程,要求较长的平衡时间。整个分离过程需要多次平衡,所以一般测定一个试样的分子量分布需时一个月左右,这样长的实验时间使这类方法在生产实际中无法真正应用。分子量分布测定上的困难大大阻碍了对分子量分布与聚合过程、加工性能和使用性能间关系的深入了解。1964 年凝胶色谱的出现才改变了这种局面, GPC 的应用改善了测试条件,并提供了可以同时测定聚合物的相对分子质量及其分布的方法,使其成为测定高分子相对分子质量及其分布最常用、快速和有效的技术。

基金项目:仲恺农业工程学院教育教学改革研究基金项目(G2092732)

© 1994-2011 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>
作者简介:鲁红,女,1971 年出生,硕士,实验师,研究方向:高分子材料、仪器分析。E-mail:lhfdlx@163.com

在 GPC 测试中,样品间分子量分布宽度的比较,最直接的方法是将实验所得到的分子量分布曲线作对比。分子量分布曲线有两种形式:

用累积重量分布对分子量作图的曲线叫做积分分布曲线即:

$$I(M) = \int_0^M W(M) dM$$

用重量分数 W 对分子量作图的曲线叫做微分分布曲线即:

$$dI(M)/dM = W(M)$$

还有一种更一般化且最常用的方法就是分布宽度指数 D (分散度),即:分布宽度指数 D (分散度) = M_w/M_n 。

2 凝胶渗透色谱

2.1 凝胶渗透色谱(GPC)的意义

高聚物的分子量及其分布是高聚物最基本的参数之一。高聚物的许多性质,例如冲击强度、模量、拉伸强度、耐热、耐腐蚀性都与高聚物的分子量和分子量分布有关。在相对分子质量分布(多分散性指数)成为人们关注的热点后,由于经典方法在测定聚合物的相对分子量时不能同时测定聚合物的相对分子质量分布而 GPC 改善了测试条件,可以同时测定聚合物的相对分子质量及其分布情况,故 1964 年 GPC 出现后获得了飞速的发展和广泛的应用。

2.2 分离原理

GPC/SEC 的分离机理比较复杂,目前有体积排除理论、扩散理论和构象熵理论等几种解释,其中最具有影响力的是体积排除理论^[1]。GPC/SEC 的固定相是表面和内部有着各种各样、大小不同的孔洞和通道的微球,可由交联度很高的聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、葡萄糖和琼脂糖的凝胶以及多孔硅胶、多孔玻璃等来制备。当被分析的聚合物试样随着溶剂引入柱子后,由于浓度的差别,所用溶质分子都力图向填料内部孔洞渗透。较小的分子除了能进入较大的孔外,还能进入较小的孔;较大的分子就只能进入较大的孔;而比最大的孔还要大的分子就只能停留在填料颗粒之间的空隙中。随着溶剂洗提过程的进行,经过多次渗透—扩散平衡,最大的聚合物分子从载体的粒间首先流出,依次流出的是尺寸较小的分子,最小的分子最后被洗提出来,从而达到依高分子体积进行分离的目的,得出高分子尺寸大小随保留

时间(或保留体积 V_R 、淋出体积 V_e)变化的曲线,即分子量分布的色谱图。高分子在溶液中的体积决定于相对分子量、高分子链的柔顺性、支化、溶剂和温度,当高分子链的结构、溶剂和温度确定后,高分子的体积主要依赖于相对分子量。基于上述理论, GPC/SEC 的每根色谱柱都是有极限的,即:排阻极限和渗透极限。排阻极限是指不能进入凝胶颗粒孔穴内部的最小分子的分子量,所有大于排阻极限的分子都不能进入凝胶颗粒内部,直接从凝胶颗粒外流出,不但达不到分离的目的还有堵塞凝胶孔的可能;渗透极限是指能够完全进入凝胶颗粒孔穴内部的最大分子的分子量,如果两种分子都能全部进入凝胶颗粒孔穴内部,即使它们的大小有差别,也不会有好的分离效果。所以,在使用 GPC/SEC 测定相对分子量时,必须首先选择好与聚合物相对分子量范围相配的色谱柱。对一般色谱分辨率和分离效率的评定指标,在凝胶渗透色谱中也被沿用。

2.3 GPC 柱的填料

GPC 是以有机溶剂(氯仿, THF, DMF 等)为流动相,与之相匹配的填料是疏水性的,其分离对象一般是油溶性的高分子物质,填料的粒度及粒度分布、孔径或孔径分布以及孔容是基本参数。根据凝胶的材料来源可以把它们分为有机和无机凝胶两大类^[1,2]。

2.3.1 有机凝胶

交联聚苯乙烯是一种应用很广的有机凝胶,它是苯乙烯和二乙烯苯的共聚物,一般以悬浮聚合或分散聚合方式制成苯乙烯-乙烯基苯多孔微球,以致孔剂制出所需孔径和孔容。这类凝胶的特点是孔径分布比较宽,分子量分离范围比较大,且柱效高。主要用于非极性有机溶剂,丙酮、乙醇一类极性溶剂不能应用。在有机溶剂中,有机凝胶通常都处于溶胀状态对不同的溶剂溶胀因子各不相同,因此不能在柱中直接更换溶剂,进样时也不能带进大量不良溶剂和空气。

2.3.2 无机凝胶

在无机基质材料中最重要最基本的是硅胶,多孔硅胶的特点是化学惰性、热稳定性和机械强度高,使用寿命长,可在柱中直接更换溶剂。以硅胶为基质的无机凝胶的最大问题是其表面残余硅羟基所导致的“二级效应”,它会使 GPC 谱图复杂化。为解决这一问题,通常通过与小分子硅烷化试剂的作用,尽

可能地将表面残余的硅羟基加以覆盖。由于多孔硅胶的机械强度很高,因此在交联聚苯乙烯凝胶之后,细粒度的多孔硅胶已经发展成为一种很好的高速、高效凝胶色谱填料。

多孔玻璃是一类和多孔硅胶很相似的无机凝胶,它是碱性硼硅酸盐玻璃经高温分相,再用酸洗去碱性可溶相的产物。它的优点是可以做到孔径分布很窄,对某一分子量范围的分离特别有效,选择性强;孔性结构好有利于试样分子的传质过程。缺点是质脆易碎,柱子装填不紧,柱效低。

2.4 流动相

做 GPC 检测时首先要考虑被测样品的溶解情况,以此确定流动相,还要考虑柱子的测试范围,应使被测物分子量落在柱子的分子量-淋出曲线线性部分之内,若柱子范围太窄则可考虑将不同规格的柱子串联使用。对于适用于 GPC 仪器的每一根柱子都会配有详细的使用说明,使用之前应认真阅读,严格遵从,特别值得注意的是严禁超压(超流量),否则会降低柱效、损毁柱子。如 Shim-pack GPC-800 系列柱,对于填充溶剂为 THF 型或者氯仿型能使用其他的洗提液如甲苯、亚甲基氯化物替换,而对填充溶剂为 DMF 型的 GPC 柱,流动相不能被其他洗提液替代。通常流动相溶剂类型的改变应当在流速不超过 0.5 mL/min 时候进行,且对于同一根柱最好只使用单一类型的溶剂,频繁的改变流动相类型会缩短柱的寿命,而 GPC 仪器柱的价格昂贵,通常上万元一根。流动相溶剂最好是色谱级,否则需用孔径为 0.2~0.45 μm 的膜过滤。

2.5 检测器

测试样在色谱柱中被按分子尺寸大小分离后,只要在柱的出口处安置一个检测器检测经分离后各组分的浓度,就可以得到试样的色谱峰图,如果需要测定高聚物的分子量分布,在色谱柱出口处应放置两个检测器,一个检测浓度,一个检测分子量。两个检测器的讯号同时输入记录仪可以得到反映分子量分布的色谱图。浓度检测器最常用的是示差折光检测器和紫外吸收检测器。但是分子量检测器由于要求有较高灵敏度、较大的检测范围以及瞬时的响应,在很长一段时期没有现成的检测器可以满足这样的要求,故商品化的 GPC 仪通常用相对分子量检测器,例如淋出体积指示器或自动粘度计。采用淋出体积指示器来作分子量的相对检测是基于在给定量

谱柱中,组分的淋出体积和它们的分子量有依赖关系,只要用已知分子量的标准试样来标定色谱柱的这类依赖关系后,就可以从淋出体积计算分子量,此法虽然达到了简易可行的目的,但是随之而来的是实验工作量增加以及数据处理方法上存在困难。近年来用小角激光散射仪(LALLS)作分子量检测器得到了比较好的结果,GPC-LALLS 检测仪已经商品化,但是仪器设备比较复杂和昂贵,还没有广泛应用。

2.6 GPC 系统与常规 HPLC 系统的区别

检测器: GPC 系统标配示差折光检测器,常规 HPLC 有多种检测器可选;梯度: GPC 系统是等度系统,并且用并联泵,常规 HPLC 可以是等度或者梯度;管路: GPC 系统采用全不锈钢流路,常规 HPLC 用 PEEK 或者不锈钢流路;自动进样器针密封: GPC 系统采用 Vespel 针密封,适用 THF、氯仿、DMF 等,常规 HPLC 用 PEEK 针密封。

2.7 GPC 仪的数据处理

由于 GPC/SEC 的分离机理是按照分子尺寸的大小进行分离的,不考虑溶质和载体之间的吸附效应,也不考虑溶质在流动相和固定相之间的分配效应,其淋出体积(自试样进柱到被淋洗出来所接收到的淋洗液总体积)仅由溶质分子尺寸和载体的孔洞尺寸决定,与分子量只是间接的关系。不同的高分子,虽然分子量相同,但分子体积并不一定相同。例如,线形 PE 和支化 PE,虽然有相同的分子量,但分子尺寸后者比前者小。因此,在同一根柱子和相同的测试条件下,不同的高分子试样由于分子链形态不同,所得到的分子量-淋出体积校正曲线并不重合^[3]。为此,在测定某种聚合物的分子量分布时,都需要有这种聚合物的单分散(或窄分布)试样所求得的专用的校正曲线,而单分散(或窄分布)试样不容易得到,只有很少的高聚物能制得窄分布的标准试样,这给测试工作带来极大的不便。对此通常采用能够制得窄分布标准样的聚合物聚苯乙烯(PS,溶于各种有机溶剂)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA,溶于有机溶剂)、聚环氧乙烷(PEO,也叫聚氧化乙烯,溶于水)、聚乙二醇(PEG,溶于水)代替,因此用 GPC 采得实验数据后要对数据进行校正处理,才能得到尽可能真实的相对分子量。

2.7.1 窄分布标样校正法

选用与被测样品同类型的窄分布($d \leq 1.1$)标

样,先用其他方法精确测定其平均相对分子质量,然后与被测样品在同样的条件下进行 GPC 分析。要有 5 个以上的不同分子量的单分散标样来制作校正曲线,如果被测样品与标样结构完全一样,则结果不需再修正,如果样品结构与标样结构不一样,但样品是单链结构,则可以用 QF 因子比(分析样单位链长分子量与标样单位链长分子量之比)来修正结果,如果样品结构与标样结构不一样,并且样品带有支链,则无法使用窄分布标样校正法。因单位链长分子量的计算需要知道键长键角等微观构相参数,大大限制了此方法的实用性。

2.7.2 普适校正法

根据 Einstein 粘度定律, $[\eta]M\eta$ 可视为高分子的流体力学体积。大量实验证明,各种不同的高聚物通过同一根色谱柱所得的 $\lg[\eta]M\eta$ 与保留体积 V_R 的关系几乎在同一直线上。因此 $[\eta]M\eta$ 是 GPC/SEC 的一个普适标定参数,即两种单分散高聚物在溶液中具有相同的流体力学体积,如下式所示:

$$[\eta]_1 M_1 = [\eta]_2 M_2 \quad (1)$$

式中下标 1 为标样参数,2 为样品参数。

根据 Mark-Houwink 方程:

$$[\eta] = KM^{\alpha} \quad (2)$$

已知由标样得出的标定线:

$$\ln M = A - BV_e \quad (3)$$

可推出待测试样的普适校正方程:

$$\lg M_2 = \frac{1 + \alpha_1}{1 + \alpha_2} (A - BV_e) + \frac{1}{1 + \alpha_2} \lg \frac{K_1}{K_2} \quad (4)$$

通过普适校正及“切割法”将 GPC/SEC 谱图的 $V_{e,i}$ (或 $V_{R,i}$) 换算为对应的分子量 M_i , 由计算机处理可得到各种相对分子量与相对分子量分布的信息。此法的优点是只要用一种高聚物(一般用窄分布聚苯乙烯)作标准曲线就可以测定其他类型的聚合物,样品结构可以与标样不一样,并且可以有支链,但先决条件是两种高聚物的 K 和 α 值必须已知,且是在同一种溶剂和相同温度下的 K 和 α 。通常 K 和 α 值可由文献查得,但仍有很多高分子的 K 、 α 都是未知的,这也限制了普适校正法的适用范围。而应注意的是,有的高聚物并不符合 Mark-Houwink 方程^[4]。

2.7.3 渐进试差法(宽分布标样校正法)

这种方法不需要窄分布样品,其标样可为 1~3 个不同相对分子质量的宽分布标样(平均相对分子

质量精确测量, M_w 和 M_n 为已知),采用数学处理方法可得到渐进试差法的校正曲线。

分子量-淋出体积校正曲线为:

$$\ln M = A - B \cdot V \quad (5)$$

将标样色谱峰分成若干个切片,则:

$$M_i = \exp(A - B \cdot V_i) \quad (6)$$

根据定义,有:

$$M_w = \frac{\sum H_i M_i}{\sum H_i} \quad (7)$$

$$M_n = \frac{\sum H_i}{\sum H_i (H_i M_i)} \quad (8)$$

将公式(6)代入公式(7)和(8),则:

$$M_w = \frac{[H_i \cdot \exp(A - B \cdot V_i)]}{\sum H_i} \quad (9)$$

$$M_n = \frac{H_i}{\sum [H_i / \exp(A - B \cdot V_i)]} \quad (10)$$

标样的 M_w 和 M_n 已知,将 H_i , V_i 代入,软件自动算出 A 、 B 值。

选择了合适的校正方法后,在相同的测试条件下做一系列 GPC 标准图谱,对应不同相对分子质量样品的保留时间,以 $\lg M$ 对 t 作图,所得曲线即为校正曲线,通过校正曲线,就能从 GPC 谱图上计算各种所需相对分子量与相对分子量分布的信息。可见实验数据的可靠性在很大程度上决定于校正曲线、标样分子量数值以及数据处理方法的可靠性。

3 其它应用

3.1 在药物、化工原料等质量检测中的应用

药物通常由不同尺寸的组分构成。从理论上讲,对于一个给定品牌的药物,在一定色谱条件下,其 GPC 谱图犹如人的指纹一样具有特征性。通过比较两个样品 GPC 谱图的异同,可确定它们是否属同一品牌^[5]。同样道理 GPC 可用于化工原料的质量检测,此时无需计算出原料的相对分子量及分子量分布,直接由合格品与新进原料的 GPC 色谱图对比即可准确判断,此法简单、方便,对于控制终端产品的质量稳定性具有重要意义。

3.2 在农药残留分析前处理中的应用

农药残留分析是对复杂基质中的痕量组分进行分析,其过程主要包括样品前处理和测定两部分。

样品前处理过程的难点是要将多种农药痕量组分同时提取,并有效地去除杂质,同时又要保持较高的回收率,并且直接关系到农药残留分析的准确度和灵敏度。GPC由于其自身的特点在农药残留分析前处理中起到了重要的作用,能把农药残留物从各种复杂基质中分离出来。GPC技术作为一种样品前处理的手段,在国外应用已较普通,这方面的研究报告也很多^[6-8]。

总之,GPC在用于测定高聚物分子量及其分子量分布的情况时要注意选择合适的数据处理方法,GPC还可用于农药残留分析的前处理、药物、化工原料等方面的质量检测,用户应根据实际情况合理使用GPC。

参考文献

1 施良和. 凝胶色谱法. 北京:科学出版社,1980:35-40,

123

- 2 刘国诠,余兆楼. 色谱柱技术. 北京:化学工业出版社,2001:228-229
- 3 金日光,华幼卿. 高分子物理. 第三版. 北京:化学工业出版社,2007:127
- 4 张俐娜,薛奇,莫志深,等. 高分子物理近代研究方法. 第二版. 湖北:武汉大学出版社,2006:47
- 5 王庆国,蔡力行,龚晓钟. 深圳大学学报(理工版),2001,18(2):39-42
- 6 王敏,叶非. 农药科学与管理,2008,29(6):9-13
- 7 刘咏梅,王志华,储晓刚. 分析测试学报,2005,24(2):123-127
- 8 张伟国,高金山,陈姗姗等. 分析化学,2005,33(10):1442-1445

收稿日期:2009-11-29

Gel permeation chromatograph and its applications. Lu Hong (Department of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou, 510225)

The basic concept, principles, data processing, calibration methods and applications of gel permeation chromatograph are described. The contents of this paper is helpful for users to properly use their instruments.