

高效水相尺寸排阻色谱 半微量色谱柱：TSKgel® SuperMultiporePW 系列和 TSKgel SuperOligoPW

目录

1. 简介	1
2. TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱	1
3. TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的基本特性	2
3-1. 孔特性	3
3-2. 分离度	4
3-3. 流速对理论塔板高度 (HETP) 的影响	6
3-4. 温度对理论塔板数的影响	6
3-5. 样品进样量的影响	7
3-6. 样品浓度的影响	8
3-7. 色谱柱温度的影响	9
3-8. 各种分离条件对校准曲线的影响	10
3-9. 色谱图异常	12
4. 各种分离条件对色谱图的影响	13
4-1. 流动相的盐浓度	13
4-2. 柱温	14
4-3. 流动相中有机溶剂浓度	14
4-4. 流动相 pH	15
5. TSKgel SuperMultiporePW 系列的应用	16
6. TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的基本特性和应用	19
7. 总结	22



1. 简介

尺寸排阻色谱 (SEC) 用于检测水溶和非水溶性合成和天然聚合物的分子量和分子量分布。由于该分析方法操作简便, 重复性好, 在化学、食品、生物科学及制药领域, 被全世界的科研人员和分析技术人员所广泛使用。

通常在 SEC 色谱应用中, 由于色谱柱填料自身的特性, 不同级别的色谱柱得到的拟合校准曲线和实际校准曲线间存在差异。因此, 当将不同级别的色谱柱串联使用时, 会观察到色谱图异常现象。由于样品的分子量是通过由聚合物标准品得到的色谱柱校准曲线计算而得到, 这种偏差将会影响 SEC 测定分子量的准确性。

为解决这类问题, TOSOH 公司先后开发出 Multipore 技术的有机相尺寸排阻色谱柱: TSKgel MultiporeH_{XL}-M^{1,2} 和 TSKgel SuperMultiporeHZ 系列³。该色谱柱的填料具有单分散的粒径, 每个填料颗粒上孔径分布非常宽。其中 TSKgel SuperMultiporeHZ 是粒径较小的高效半微量色谱柱。这些产品一经问世, 就得到广大客户的高度认可。

最近 TOSOH 采用新的合成技术, 开发出与 TSKgel MultiporeH_{XL}-M 和 TSKgel SuperMultiporeHZ 色谱填料类似的, 粒径均一, 孔径分布较宽的, 用于水相 SEC 方法的新型填料。并将这种填料装填的色谱柱产品推向市场。

本报告详细介绍了新的 TSKgel SuperMultiporePW 系列半微量水相尺寸排阻色谱柱和用于低聚物分离的 TSKgel SuperOligoPW 半微量水相尺寸排阻色谱的基本特性及其应用。

2. TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱

传统的尺寸排阻色谱分析中, 使用串联的多根不同孔径填料的色谱柱, 或使用改善孔特性 (分子量分离范围和校准曲线线性) 的混合床色谱柱, 通过调整不同孔径色谱填料的配比, 得到优化的分子量分离范围。但是对于一些样品, 上述方法会导致的校准曲线上出现拐点或色谱图出现异常。因此, 分子量结果的准确度和精度均不理想。

为解决这类问题, TOSOH 已经推出了用于有机溶剂的 TSKgel MultiporeH_{XL}-M 和 TSKgel SuperMultiporeHZ 两个系列的尺寸排阻色谱柱, 并获得市场的广泛好评。

基于全新的合成技术, TOSOH 开发出 TSKgel SuperMultiporePW 系列水相半微量尺寸排阻色谱柱, 由于该色谱柱产品采用了粒径均一的小粒径填料, 在一半的分析时间内, 可获得与常规 TSKgel PW_{XL} 水相尺寸排阻色谱柱同样的分离效果, 并且减少了溶剂的消耗量。

针对低聚物样品, 还开发出 TSKgel SuperOligoPW 半微量水相尺寸排阻色谱柱。该色谱柱产品对于低聚物和小分子聚合物具有出色的分离性能。

3. TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的基本特性

TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的基本特性见表 1 和表 2，其特点见表 3。The TSKgel SuperMultiporePW 系列包括三款粒径和

分子量分离范围不同的色谱柱。可以根据聚合物样品的分子量范围选择合适的色谱柱。TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的填料粒径和分子量排阻范围都较小，更适用于低聚物样品的分离。

表 1 TSKgel SuperMultiporePW 和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的物理特性

	SuperMultiporePW-N	SuperMultiporePW-M	SuperMultiporePW-H	SuperOligoPW
填料基质	聚甲基丙烯酸甲酯	聚甲基丙烯酸甲酯	聚甲基丙烯酸甲酯	聚甲基丙烯酸甲酯
粒径	4 μm	5 μm	8 μm	3 μm
分子量排阻极限 (PEO, PEG/H ₂ O)	120,000	1,000,000	10,000,000*	6,000
分子量分离范围 (PEO/H ₂ O, PEG/H ₂ O)	300 ~ 50,000	500 ~ 1,000,000	1,000 ~ 10,000,000	100 ~ 3,000
色谱柱理论塔板数	16,000 TP/15 cm	12,000 TP/15 cm	7,000 TP/15 cm	16,000 TP/15 cm
色谱柱尺寸	6.0 mm ID x 15 cm	6.0 mm ID x 15 cm	6.0 mm ID x 15 cm	6.0 mm ID x 15 cm
保护柱尺寸	4.6 mm ID x 3.5 cm	4.6 mm ID x 3.5 cm	4.6 mm ID x 3.5 cm	4.6 mm ID x 3.5 cm

*估算值

PEO: 聚环氧乙烷

PEG: 聚乙二醇

表 2 TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的技术参数

产品名称	理论塔板数 (TP/色谱柱) (保证值)	不对称因子	色谱柱尺寸 (内径 ID, mm x 长度, cm)	粒径 (μm)
TSKgel SuperMultiporePW-N	16,000 TP/15 cm	0.7 ~ 1.6	6.0 x 15	4
TSKgel SuperMultiporePW-M	12,000 TP/15 cm	0.7 ~ 1.6	6.0 x 15	5
TSKgel SuperMultiporePW-H	7,000 TP/15 cm	0.7 ~ 1.6	6.0 x 15	8
TSKgel SuperOligoPW	16,000 TP/15 cm	0.7 ~ 1.6	6.0 x 15	3

分离条件

色谱柱尺寸:	6.0 mm ID x 15 cm	检测器:	RI (微量流通池)
流动相:	H ₂ O	样品:	乙二醇, 5 g/L
流速:	0.6 mL/min	进样量:	2 μL
温度:	25°C		

表 3 TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的特点

特点	优点
1) 多孔径填料 (每个填料颗粒上均具有较宽的孔径分布)	<ul style="list-style-type: none"> 校准曲线线性良好 待测样品的色谱图不会出现异常 → 分子量数据的准确度和再现性提高
2) 填料粒径更细 (单分散粒径)	<ul style="list-style-type: none"> 能够减少分离时间, 分离性能高 → 在一半的分析时间内获得与常规色谱柱 (30 cm) 相当的分度
3) 半微量色谱柱	<ul style="list-style-type: none"> 在高流速条件下也能保证稳定的分度 色谱柱性能的稳定性得以提高 溶剂消耗量减少 → 溶剂消耗量是常规色谱柱 (30cm) 的 1/3。
4) 采用亲水性较高的聚合物基质	<ul style="list-style-type: none"> 适用于广泛的样品类型

3-1. 孔特性

图 1 是根据聚环氧乙烷 (PEO)、聚乙二醇 (PEG) 和乙二醇 (EG) 标准品得到的 TSKgel SuperMultiporePW 系列和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的校准曲线。

这些色谱柱可测定的分子量分离范围如下：

TSKgel SuperMultiporePW-N: 50,000~300g/mol;

TSKgel SuperMultiporePW-M: 1,000,000~500g/mol

TSKgel SuperMultiporePW-H: 10,000,000~1,000g/mol

TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱在其测定的分子量

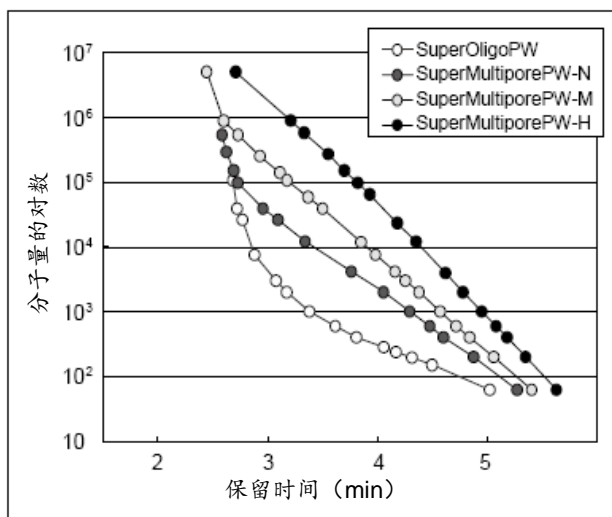


图 1 TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的校准曲线

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱 (6.0 mm ID x 15 cm)
 流动相: H₂O
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 室温
 进样量: 20 μL
 样品: PEO、PEG、EG 标准品

分离范围内的校准曲线具有良好的线性。TSKgel SuperOligoPW 的分子量分离范围为 3,000~100g/mol。

图 2 对 TSKgel SuperMultiporePW-M 的校准曲线与具有不同孔径的常规色谱柱的组合 (TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL}) 的校准曲线进行了对比 (色谱柱尺寸相同)。从图中可以看出, TSKgel SuperMultiporePW-M 的校准曲线的线性 (相关系数) 优于常规色谱柱组合的校准曲线。

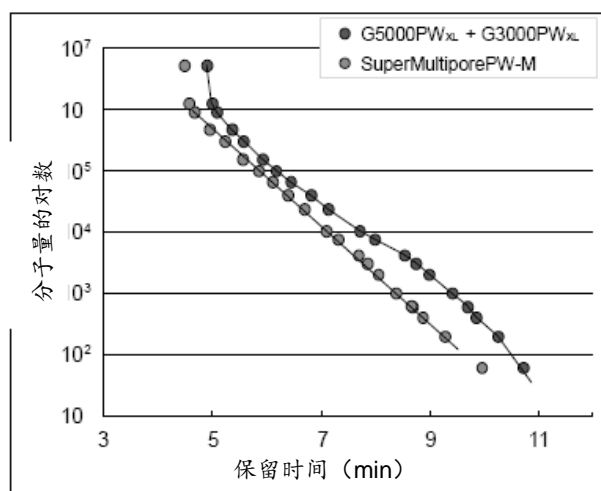


图 2 TSKgel SuperMultiporePW-M 和 TSKgel PW_{XL} 色谱柱的校准曲线

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-M 和 TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL} (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 流动相: H₂O
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 室温
 进样量: 20 μL
 样品: PEO、PEG、EG 标准品

3-2. 分离度

用于低聚物分离的 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱使用的填料粒径为 3 μm ，因此具有常规的 TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱 2 倍的理论塔板数（相对单位长度）。如图 3 所示，TSKgel SuperOligoPW 在一半的分析时间内达到与常规色谱柱相当的分度。

TSKgel SuperMultiporePW-N 采用粒径为 4 μm 的填料，理论塔板数是常规的 TSKgel G3000PW_{XL} 色谱柱的 2 倍。在两种色谱柱上得到的 PEO 和 PEG 混合物的色谱图见图 4。如图所示，在一半的分析时间内，TSKgel SuperMultiporePW-N 达到与 TSKgel G3000PW_{XL} 相当的

分离度。

TSKgel SuperMultiporePW-M 采用的填料的粒径为 5 μm 。如图 5 所示，与具有不同孔径的常规色谱柱的组合（TSKgel G5000PW_{XL}+G3000PW_{XL}）相比，前者在一半的分析时间内得到相当的分度。

图 6 是 TSKgel SuperMultiporePW-H 色谱柱和常规混合床色谱柱 TSKgel GMPW_{XL} 上 PEO 和 PEG 混合物色谱图。TSKgel SuperMultiporePW-H 在一半的分析时间内达到相当的分度。

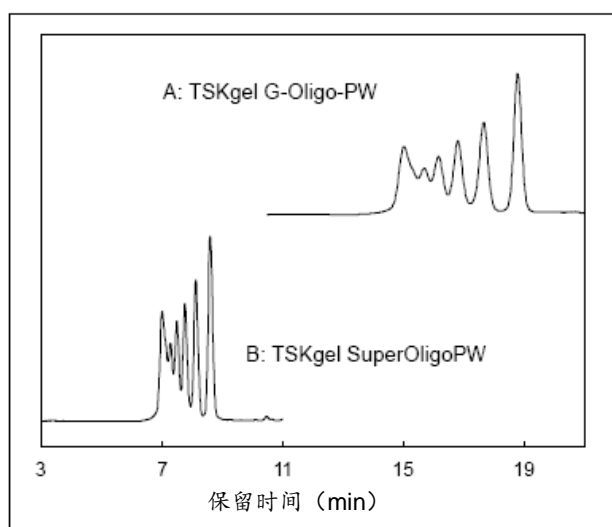


图 3 β 环糊精水解产品在 TSKgel SuperOligoPW 和 TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱上的分离

色谱柱: A: TSKgel G-Oligo-PW
(7.8 mm ID x 30 cm x 2)
B: TSKgel SuperOligoPW
(6.0 mm ID x 15 cm x 2)

流动相: H₂O

流速: A: 1.0 mL/min
B: 0.6 mL/min

检测器: RI

温度: 25°C

进样量: A: 100 μL
B: 20 μL

样品: β 环糊精水解产物, 20 g/L

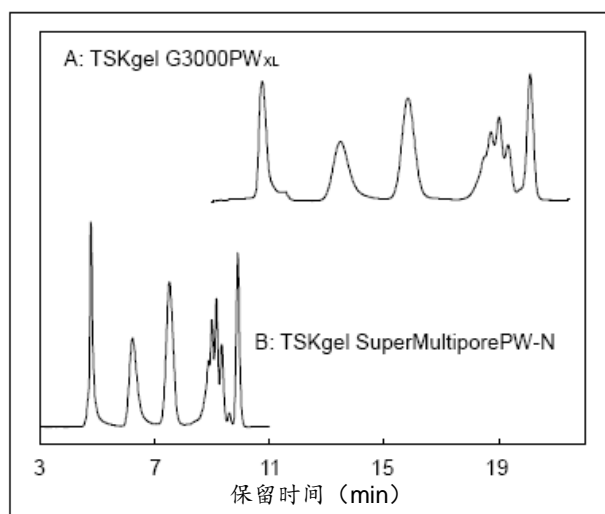


图 4 PEO 混合物在 TSKgel SuperMultiporePW-N 和 TSKgel G3000PW_{XL} 色谱柱上的分离

色谱柱: A: TSKgel G3000PW_{XL}
(7.8 mm ID x 30 cm x 2)
B: TSKgel SuperMultiporePW-N
(6.0 mm ID x 15 cm x 2)

流动相: H₂O

流速: A: 1.0 mL/min
B: 0.6 mL/min

检测器: RI

温度: 25°C

进样量: A: 100 μL
B: 20 μL

样品: PEO 和 PEG 标准品

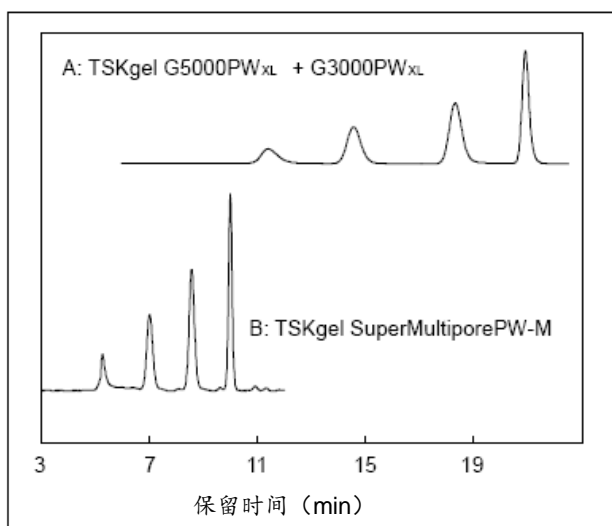


图 5 PEO 混合物在 TSKgel SuperMultiporePW-M and TSKgel PW_{XL} 色谱柱上的分离

色谱柱: A: TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL}
 (7.8 mm ID x 30 cm x 2)
 B: TSKgel SuperMultiporePW-M
 (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 流动相: H₂O
 流速: A: 1.0 mL/min
 B: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 25°C
 进样量: A: 100 μL
 B: 20 μL
 样品: PEO 和 PEG 标准品

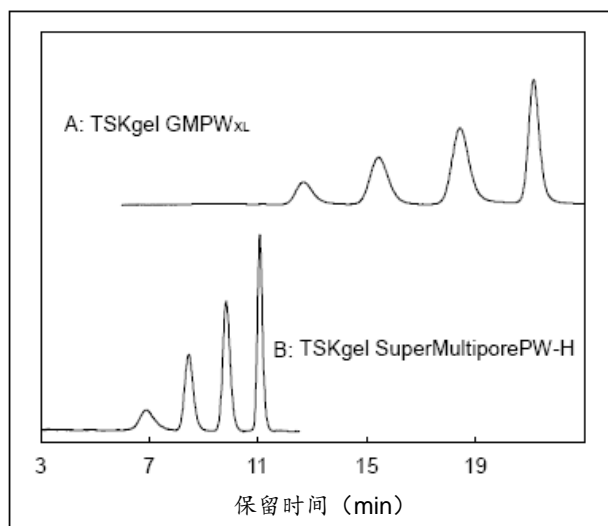


图 6 PEO 混合物在 TSKgel SuperMultiporePW-H and TSKgel GMPW_{XL} 色谱柱上的分离

色谱柱: A: TSKgel GMPW_{XL}
 (7.8 mm ID x 30 cm x 2)
 B: TSKgel SuperMultiporePW-H
 (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 流动相: H₂O
 流速: A: 1.0 mL/min
 B: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 25°C
 进样量: A: 100 μL
 B: 20 μL
 样品: PEO 和 PEG 标准品

3-3. 流速对理论塔板高度 (HETP) 的影响

在 TSKgel SuperOligoPW (粒径: 3 μ m) 和 TSKgel SuperMultiporePW-N、SuperMultiporePW-M、SuperMultiporePW-H (粒径分别为 4、5、8 μ m) 上使用小分子量样品乙二醇 (EG) 验证流速对理论塔板高度 (HETP) 的影响。分析结果见图 7, 这些色谱柱的最佳流速 (HETP 最小) 范围为 0.5~0.6 mL/min。流速如果超出该范围, 随着流速增加, HETP 逐渐增大, 而柱效下降。

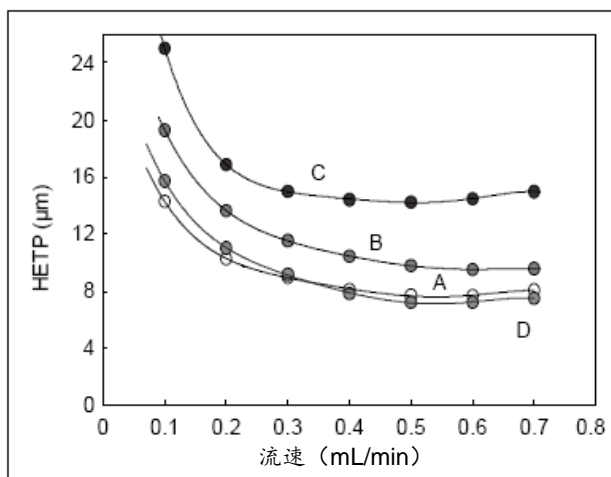


图 7 TSKgel SuperMultiporePW 和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱 HETP 和流速的关系

色谱柱: A: TSKgel SuperMultiporePW-N (6.0 mm ID x 15 cm)
 B: TSKgel SuperMultiporePW-M (6.0 mm ID x 15 cm)
 C: TSKgel SuperMultiporePW-H (6.0 mm ID x 15 cm)
 D: TSKgel SuperOligoPW (6.0 mm ID x 15 cm)

流动相: H₂O
 流速: 0.10 ~ 0.70 mL/min
 检测器: RI
 温度: 25°C
 进样量: 2 μ L
 样品: EG 标准品, 5 g/L

3-4. 温度对理论塔板数的影响

使用小分子量的聚合物样品乙二醇 (EG) 在 TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱上, 考察分析温度对理论塔板数的影响 (图 8)。

对于 TSKgel SuperMultiporePW-N、-M 和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱, 温度上升, 理论塔板数则下降。对于填料粒径最大的 TSKgel SuperMultiporePW-H 色谱柱, 其理论塔板数随温度变化很小, 因此温度对色谱柱影响不大。

尽管如此, 对于大分子量聚合物样品, 在实际分析中还是采用较高的温度条件, 通过提高样品的扩散速度, 降低流动相粘度, 来降低操作压力。(具有温度依赖性的样品除外)

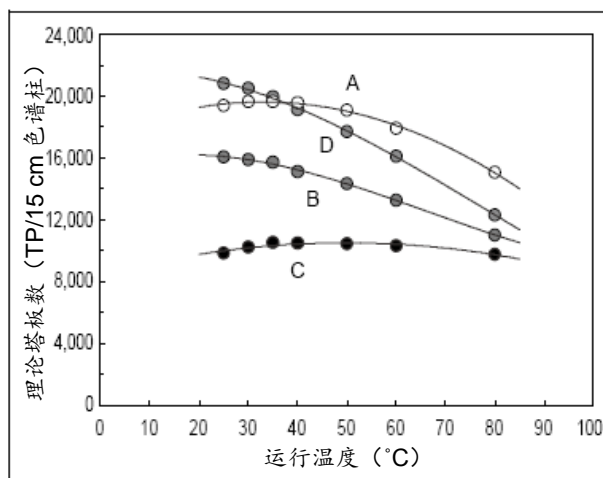


图 8 TSKgel SuperMultiporePW 和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱 HETP 和温度的关系

色谱柱: A: TSKgel SuperMultiporePW-N (6.0 mm ID x 15 cm)
 B: TSKgel SuperMultiporePW-M (6.0 mm ID x 15 cm)
 C: TSKgel SuperMultiporePW-H (6.0 mm ID x 15 cm)
 D: TSKgel SuperOligoPW (6.0 mm ID x 15 cm)

流动相: H₂O
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 25 ~ 80°C
 进样量: 2 μ L
 样品: EG 标准品, 5 g/L

3-5. 进样量的影响

我们知道,进样量对分离度和分子量分布数据具有重大的影响。一般而言,最大的样品进样量随着色谱柱尺寸(体积)或填料粒径的变小而减小。

图 9 显示了使用 TSKgel SuperMultiporePW 系列和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱,进样量对小分子量样品(EG)分离的影响。TSKgel SuperMultiporePW 系列和 TSKgel SuperOligoPW 半微量色谱柱填料粒径较小。如图所示,每根色谱柱的最大进样量约为 20 μ L。

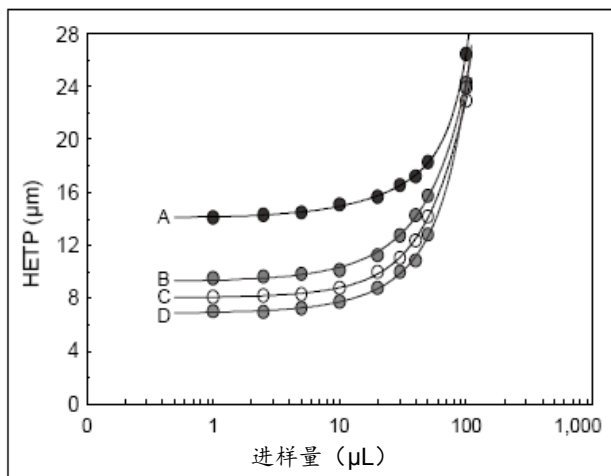


图 9 TSKgel SuperMultiporePW 和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱 HETP 和进样量的关系

色谱柱: A: TSKgel SuperMultiporePW-N
(6.0 mm ID x 15 cm)
B: TSKgel SuperMultiporePW-M
(6.0 mm ID x 15 cm)
C: TSKgel SuperMultiporePW-H
(6.0 mm ID x 15 cm)
D: TSKgel SuperOligoPW
(6.0 mm ID x 15 cm)

流动相: H₂O
流速: 0.6 mL/min
检测器: RI
温度: 25°C
进样量: 1 ~ 100 μ L
样品: EG 标准品, 5 g/L

3-6. 样品浓度的影响

进样量的差异与波动会影响样品的保留时间（保留体积），导致分子量测定的差异和分离的下降。在超过最大进样量的条件下，该影响更加明显。另外，即使未超过最大进样量，分析条件（分析流速、温度、分子量和样品分布）、填料特性或色谱柱都可能会造成如前所述的不利影响。

即使其它分析条件经过优化，当样品浓度增大时，保留时间（保留体积）也会变长（变大）。该现象称为浓度效应，当填料粒径变小或样品的分子量增大时，这种现象就会变得

更加明显。

在 TSKgel SuperMultiporePW-H 上得到的不同浓度的聚丙烯酰胺（分子量约为 300,000g/mol）的色谱图和重均分子量（ M_w ）见图 10 和图 11。由于样品浓度低（0.1-1.6 g/L），重均分子量（ M_w ）没有明显变化。

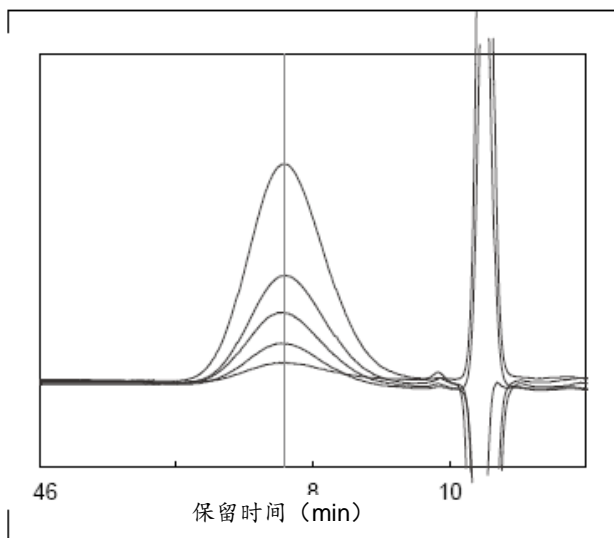


图 10 TSKgel SuperMultiporePW-H 上浓度对聚丙烯酰胺的影响

色谱柱： TSKgel SuperMultiporePW-H
(6.0 mm ID x 15 cm x2)
流动相： H₂O
流速： 0.6 mL/min
检测器： RI
温度： 25°C
进样量： 30 μ L
浓度： 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 g/L
样品： 聚丙烯酰胺

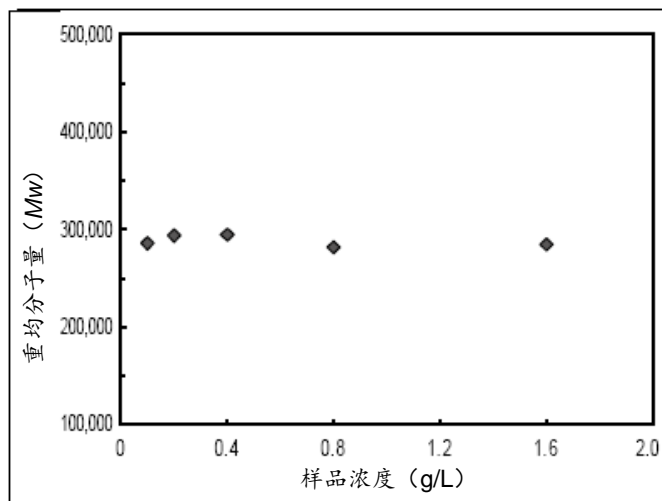


图 11 TSKgel SuperMultiporePW-H 上浓度对聚丙烯酰胺重均分子量的影响

色谱柱： TSKgel SuperMultiporePW-H
(6.0 mm ID x 15 cm x2)
流动相： H₂O
流速： 0.6 mL/min
检测器： RI
温度： 25°C
进样量： 30 μ L
浓度： 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 g/L
样品： 聚丙烯酰胺

3-7. 色谱柱温度的影响

图 12 中是在 TSKgel SuperMultiporePW-M 和其他公司的混合床色谱柱上，温度对 PEO/PEG 的校准曲线的影响。对于其它公司的产品，样品洗脱随着温度的升高而变慢（或全被吸附，不能洗脱）。因此很难创建校准曲线。可以

预见，在实际分析中，待测样品的洗脱也会受到影响，导致无法正常地按照尺寸排阻色谱对样品进行分离。

相反，对于 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱，温度对样品洗脱的影响极小。经实验确认，样品与填料之间的相互作用是很弱的。

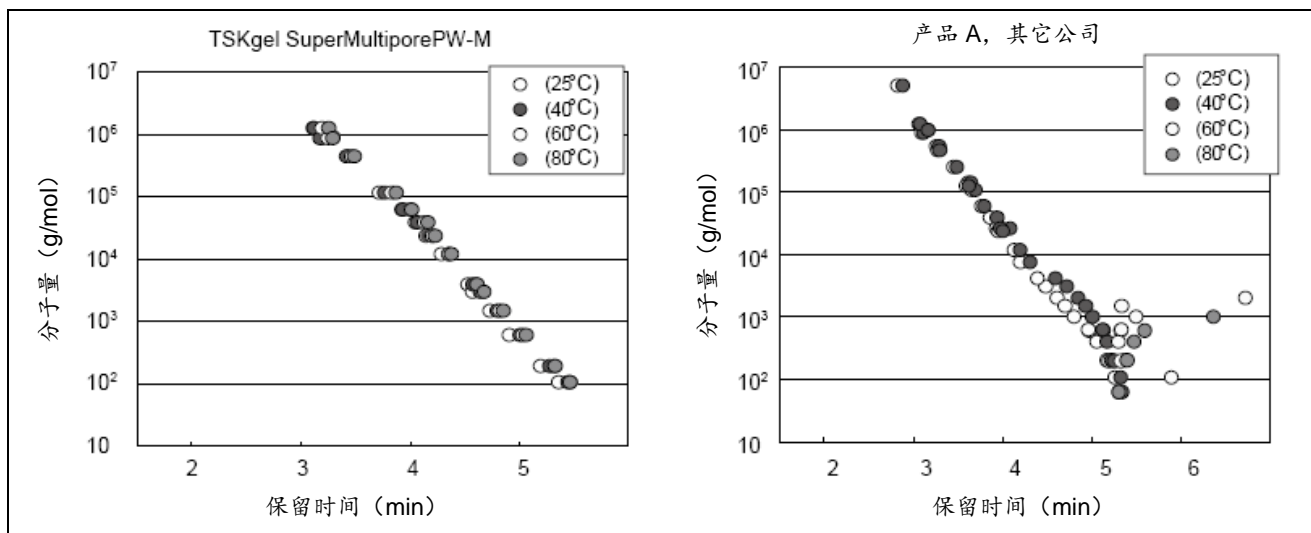


图 12 在 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱和竞争厂家的色谱柱上温度对校准曲线的影响

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-M 和其它公司的产品 A (6.0 mm ID x 15 cm x 2)

流动相: H₂O

流速: 0.6 mL/min

检测器: RI

温度: 25°C, 40°C, 60°C, 80°C

进样量: 20 μL

样品: PEO、PEG 和 EG 标准品, 5 g/L

3-8. 各种分离条件对校准曲线的影响

图 13 ~ 图 17 是不同洗脱条件下在 TSKgel SuperMultiporePW 系列和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱上得到的 PEO/PEG 的校准曲线。

如图所示，盐浓度的差异、色谱柱温度、pH、流动相中有机溶剂的浓度和流动相中缓冲盐的类型对 PEO/PEG 洗脱时间的影响很小。尽管校准曲线有所改变，但其线性受到的影响不大。

多糖标准品在水相中得到的校准曲线见图 18。对于 TSKgel SuperMultiporePW 系列的每根色谱柱，可在其分子量分离范围内得到线性程度高的校准曲线。

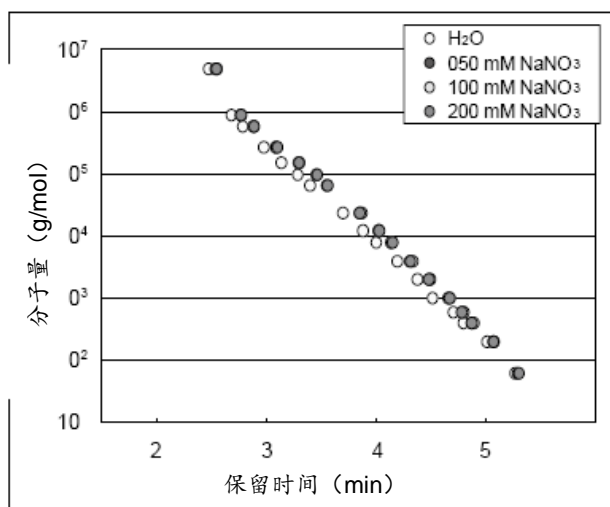


图 13 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱的校准曲线（盐浓度的影响）

色谱柱：TSKgel SuperMultiporePW-M (6.0 mm ID x 15 cm)
 流动相：H₂O; 50、100、200 mmol/L NaNO₃
 流速：0.6 mL/min
 检测器：RI
 温度：40°C
 进样量：20 μL
 样品：PEO、PEG 和 EG 标准品

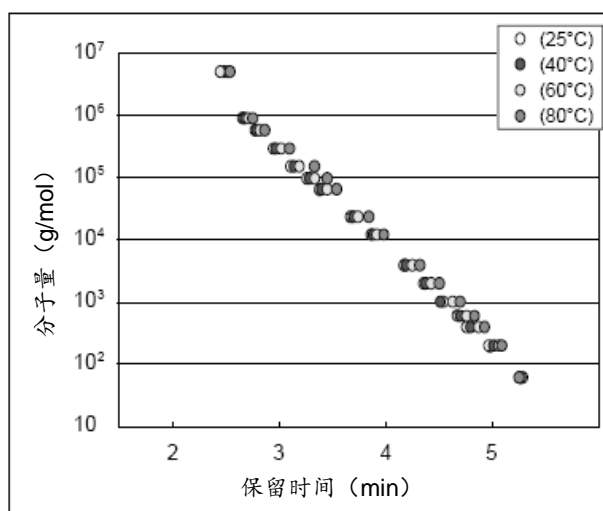


图 14 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱的校准曲线（温度的影响）

色谱柱：TSKgel SuperMultiporePW-M (6.0 mm ID x 15 cm)
 流动相：H₂O
 流速：0.6 mL/min
 检测器：RI
 温度：25°C、40°C、60°C、80°C
 进样量：20 μL
 样品：PEO、PEG 和 EG 标准品

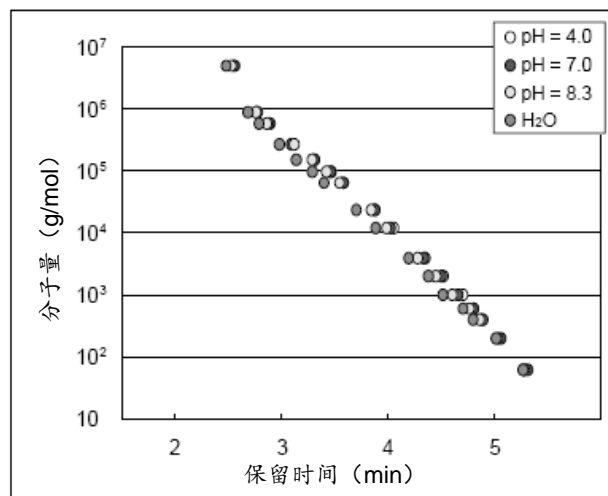


图 15 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱的校准曲线（pH 的影响）

色谱柱：TSKgel SuperMultiporePW-M (6.0 mm ID x 15 cm)
 流动相：100 mmol/L 醋酸盐缓冲液
 流速：0.6 mL/min
 检测器：RI
 温度：40°C
 进样量：20 μL
 样品：PEO、PEG 和 EG 标准品

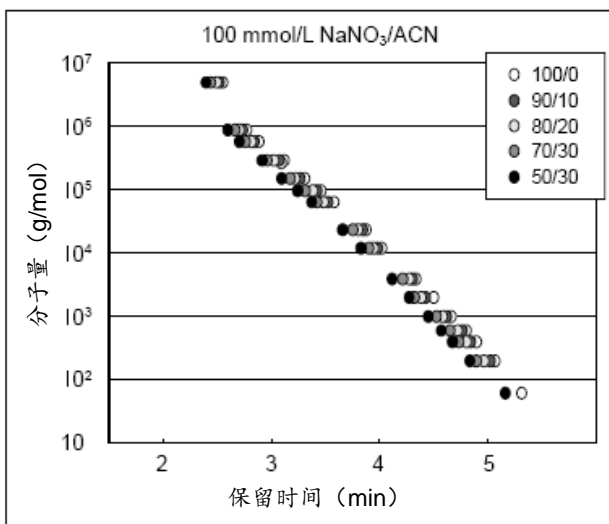


图 16 TSKgel SuperMultiporePW-M
色谱柱的校准曲线 (乙腈浓度的影响)

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-M
(6.0 mm ID x 15 cm)
流动相: 100 mmol/L NaNO₃/ACN
流速: 0.6 mL/min
检测器: RI
温度: 40°C
进样量: 20 μL
样品: PEO、PEG 和 EG 标准品

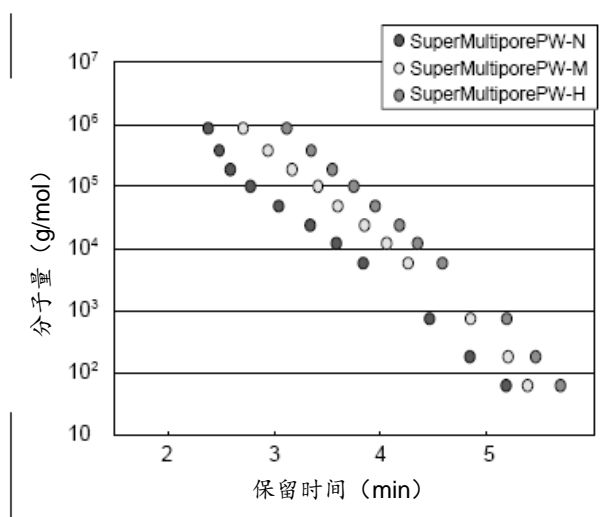


图 18 TSKgel SuperMultiporePW 系列
色谱柱的校准曲线 (多糖/H₂O)

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW series
(6.0 mm ID x 15 cm)
流动相: H₂O
流速: 0.6 mL/min
检测器: RI
温度: 25°C
进样量: 20 μL
样品: 多糖标准品

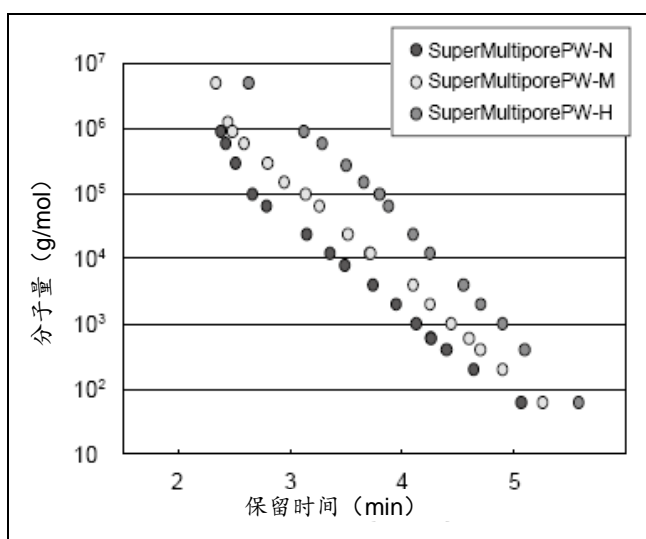


图 17 TSKgel SuperMultiporePW 系列
色谱柱的校准曲线 (碳酸盐缓冲液)

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW series
(6.0 mm ID x 15 cm)
流动相: 100 mmol/L 碳酸盐缓冲液
(pH=10.6)
流速: 0.6 mL/min
检测器: RI
温度: 25°C
进样量: 20 μL
样品: PEO、PEG 和 EG 标准品

3-9. 色谱图异常

通常在尺寸排阻色谱分析中,经常将含有不同粒径和孔径填料的不同级别的色谱柱串联使用,或使用色谱柱中含有不同孔径填料的混合床色谱柱。在实际应用中,对于某些样品,这类色谱柱可能会出现色谱峰形异常。然而采用含有多孔填料的 TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱,就不会出现这种现象。其原因在于 TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱的孔特性(孔结构),这正是该系列色谱柱最突出的特点。

图 19 和图 20 分别是在 TSKgel SuperMultiporePW-M 和在 TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL} 色谱柱组合上得到的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和葡聚糖的色谱图。对于 PVP, TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL} 色谱柱组合在其色谱图上出现拐点,而 TSKgel SuperMultiporePW-M 的色谱图中未出现该现象。对于葡聚糖样品,在 TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL} 色谱柱组合上,在特定的洗脱时间(约 6.5 min)出现色谱峰异常。而使用 TSKgel SuperMultiporePW-M 分析时,未观察到这个现象。

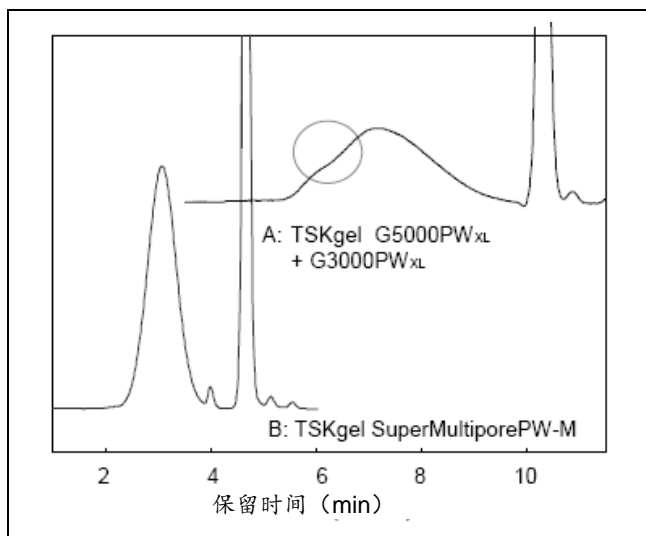


图 19 聚乙烯吡咯烷酮在 TSKgel SuperMultiporePW-M 和 TSKgel PW_{XL} 色谱柱上的分离

色谱柱: A: TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL}
(7.8 mm ID x 30 cm)
B: TSKgel SuperMultiporePW-M
(6.0 mm ID x 15 cm)

流动相: 100 mmol/L NaNO₃

流速: A: 1.0 mL/min
B: 0.6 mL/min

检测器: RI

温度: 25°C

进样量: A: 100 μL
B: 20 μL

样品: 聚乙烯吡咯烷酮, 3 g/L

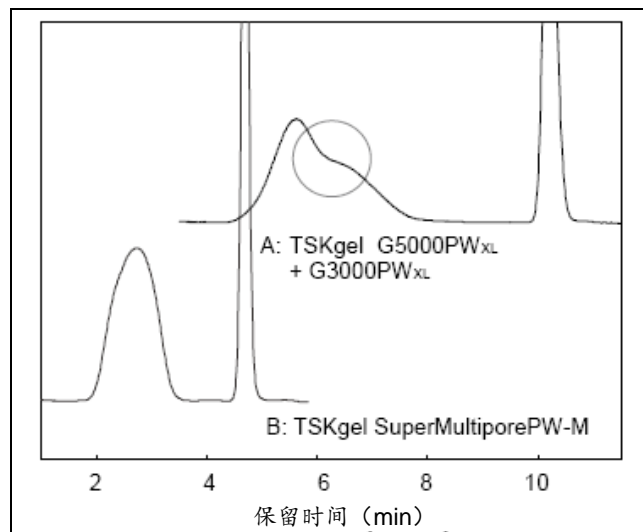


图 20 葡聚糖在 TSKgel SuperMultiporePW-M 和 TSKgel PW_{XL} 色谱柱上的分离

色谱柱: A: TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL}
(7.8 mm ID x 30 cm)
B: TSKgel SuperMultiporePW-M
(6.0 mm ID x 15 cm)

流动相: 100 mmol/L NaNO₃

流速: A: 1.0 mL/min
B: 0.6 mL/min

检测器: RI

温度: 25°C

进样量: A: 100 μL
B: 20 μL

样品: 葡聚糖, 3 g/L

4. 各种分离条件对色谱图的影响

4-1. 流动相的盐浓度

使用 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱在不同浓度硝酸钠 (NaNO₃) 的盐溶液中得到聚乙烯吡咯烷酮和葡聚糖的色谱图见图 21 和图 22。从图中看出, 在各自的条件下都能得到理想的色谱图, 但分子量结果略有差异。这是由于样品分子大小随流动相盐浓度的改变而有所不同。

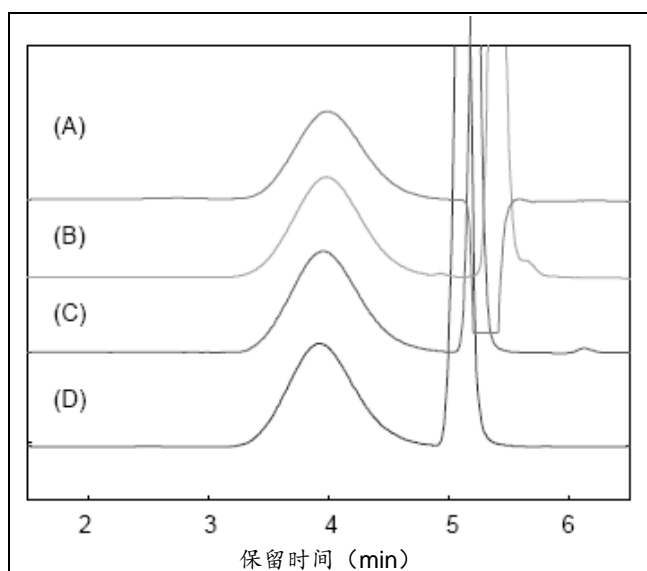


图 21 SKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱中盐浓度对聚乙烯吡咯烷酮色谱图和分子量的影响

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-M (6.0 mm ID x 15 cm)
 流动相: 25、50、100、200 mmol/L NaNO₃
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 40°C
 进样量: 20 μL
 样品: 聚乙烯吡咯烷酮, 3 g/L

	NaNO ₃ 浓度 (mmol/L)	分子量 (g/Mol)
(A)	200	19,000
(B)	100	19,000
(C)	50	21,000
(D)	25	22,000

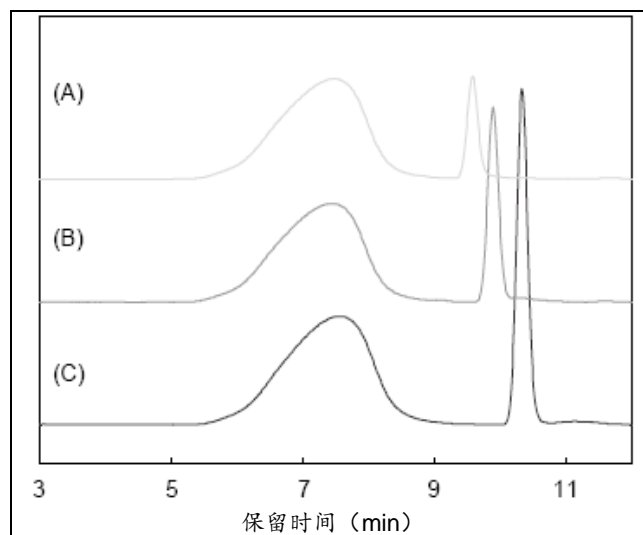


图 22 SKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱中盐浓度对葡聚糖色谱图和分子量的影响

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-M (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 流动相: 25、50、100、200 mmol/L NaNO₃
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 40°C
 进样量: 20 μL
 样品: 葡聚糖, 3 g/L

	NaNO ₃ 浓度 (mmol/L)	分子量 (g/Mol)
(A)	100	92,000
(B)	50	91,000
(C)	25	90,000

4-2. 柱温

温度对 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱测定聚乙烯吡咯烷酮时色谱图和重均分子量 (M_w) 的影响见图 23。

在 25 ~ 60°C 的温度范围内, 重均分子量 (M_w) 或色谱图没有明显的变化。

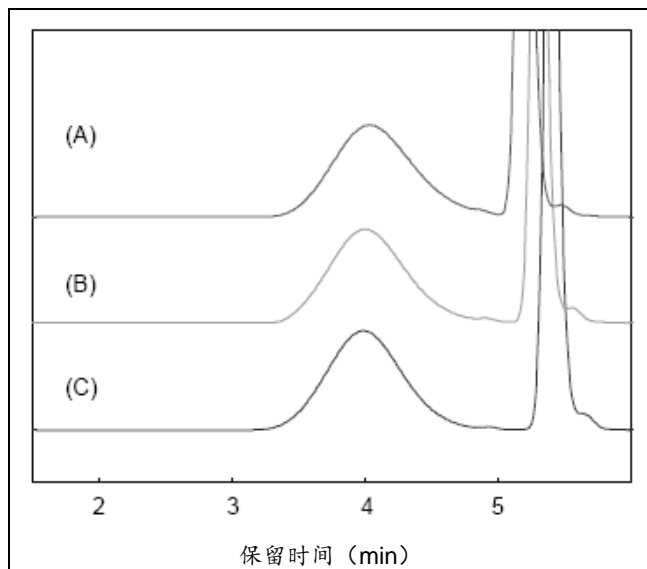


图 23 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱中温度对聚乙烯吡咯烷酮色谱图和分子量的影响

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-M
(6.0 mm ID x 15 cm)
流动相: 100 mmol/L NaNO₃
流速: 0.6 mL/min
检测器: RI
温度: 25、40、60°C
进样量: 20 μL
样品: 聚乙烯吡咯烷酮, 3 g/L

	温度 (°C)	M_w (g/Mol)
(A)	60	20,000
(B)	40	19,000
(C)	25	19,000

4-3. 流动相中有机溶剂浓度

TSKgel SuperMultiporePW-H 和 TSKgel GMPW_{XL} 色谱柱上, 流动相中有机溶剂的浓度对 PVP 分离的影响见图 24 和图 25。

如图所示, 对 TSKgel SuperMultiporePW-H 色谱柱, 有机溶剂浓度的影响可以忽略不计。而对常规的 TSKgel GMPW_{XL} 色谱柱, 在有机溶剂浓度为 0 或 50% 的条件下, 样品与填料之间的相互作用会增大。其结果是样品洗脱延迟, 重均分子量变小。

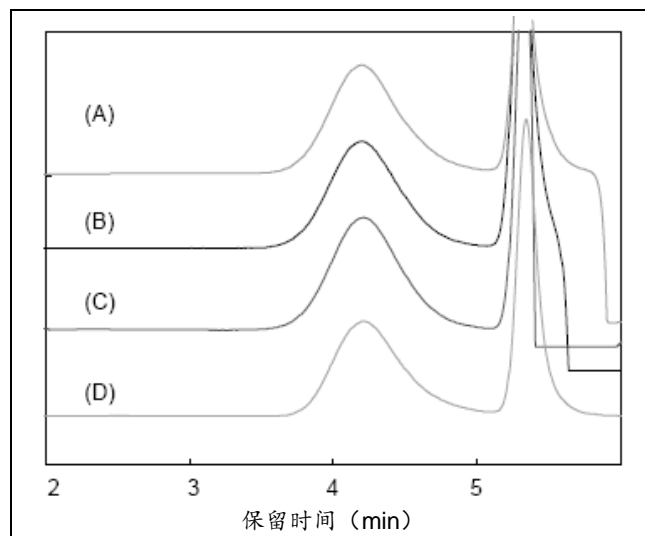


图 24 TSKgel SuperMultiporePW-H 色谱柱中有机溶剂(乙腈)浓度对聚乙烯吡咯烷酮色谱图和分子量的影响

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-H
(6.0 mm ID x 15 cm)
流动相: 100 mmol/L NaNO₃/ACN
流速: 0.6 mL/min
检测器: RI
温度: 40°C
进样量: 20 μL
样品: 聚乙烯吡咯烷酮, 3 g/L

	100 mmol/L NaNO ₃ /ACN	M_w (g/Mol)
(A)	70/30	24,000
(B)	80/20	20,000
(C)	90/10	20,000
(D)	100/0	19,000

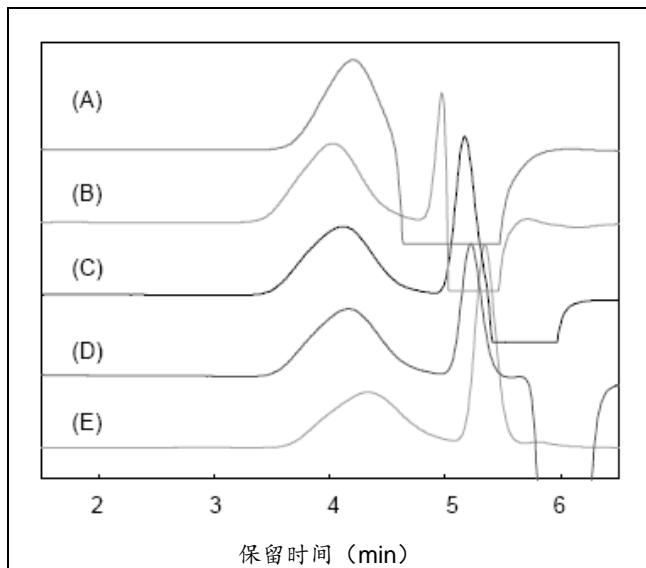


图 25 SKgel GMPW_{XL} 色谱柱中有机溶剂（乙腈）浓度对聚乙烯吡咯烷酮色谱图和分子量的影响

色谱柱: TSKgel GMPW_{XL} (6.0 mm ID x 15 cm)
 流动相: 100 mmol/L NaNO₃/ACN
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 40°C
 进样量: 20 μL
 样品: 聚乙烯吡咯烷酮, 3 g/L

	100 mmol/L NaNO ₃ /ACN	M _w (g/Mol)
(A)	50/50	15,000
(B)	70/30	23,000
(C)	80/20	21,000
(D)	90/10	20,000
(E)	100/0	13,000

4-4. 流动相 pH

TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱在各种 pH 条件下, 对聚乙烯吡咯烷酮的分离结果见图 26。聚合物样品的峰顶点的保留时间和峰形会因 pH 改变而有所不同。造成这些差异的原因是因 pH 的改变造成的填料表面特性的变化。样品的分子量也会随着填料与样品之间的相互作用的不同而变化。

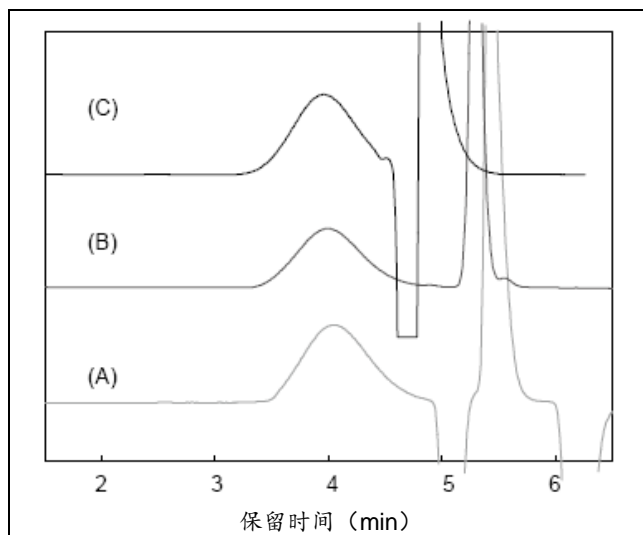


图 26 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱中 pH 对聚乙烯吡咯烷酮色谱图和分子量的影响

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-M (6.0 mm ID x 15 cm)
 流动相: 100 mmol/L 醋酸盐缓冲液
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 40°C
 进样量: 20 μL
 样品: 聚乙烯吡咯烷酮, 3 g/L

	pH	M _w (g/Mol)
(A)	4.0	17,000
(B)	7.0	19,000
(C)	8.3	22,000

5. TSKgel SuperMultiporePW 系列的应用

图 27 是在 100 mmol/L NaNO₃ 的流动相条件下, 使用 TSKgel SuperMultiporePW-H 以及常规色谱柱 (TSKgel GMPW_{XL} 和其他公司的色谱柱) 分离聚乙烯吡咯烷酮的色谱图和重均分子量。在 TSKgel SuperMultiporePW-H 上能得到理想的色谱图和分子量结果。相比之下, 对于 TSKgel GMPW_{XL} 色谱柱, 由于样品与填料相互作用的影响导致了样品洗脱的延迟, 计算得到的分子量结果偏小。对于其他公司的色谱柱, 虽然计算得到的分子量结果并没有偏小, 但是能观察到色谱图异常。

使用 TSKgel SuperMultiporePW-M 和常规色谱柱 (TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL}) 在 100 mmol/L NaNO₃ 的流动相条件下, 对各种聚合物进行分离, 得到的色谱图和重均分子量见图 28。对于常规色谱柱 (TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL}), 样品与填料的相互作用会导致洗脱延迟, 计算得到的分子量结果偏小。对某些样品, 还会出现色谱图异常。

表 4 表示以图 28 的方法分离的样品的重均分子量数据的再现性。在 TSKgel SuperMultiporePW-M 上得到的重均分子量数据的再现性 (同日) 确实优于常规色谱柱。

使用 TSKgel SuperMultiporePW-H 色谱柱, 在 100 mmol/L NaNO₃ 流动相条件下分离各种聚合物, 得到的色谱图和重均分子量见图 29。

与图 28 中显示的 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱的分离结果相似, 在 TSKgel SuperMultiporePW-H 上也能得到令人满意的各种聚合物的色谱图和分子量结果。

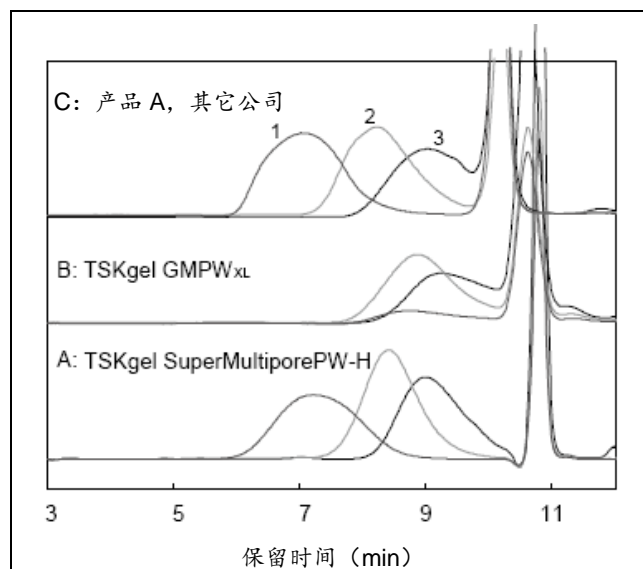


图 27 在 TSKgel SuperMultiporePW-H 色谱柱和目前的色谱柱上得到的聚乙烯吡咯烷酮的色谱图和分子量

色谱柱: A: TSKgel SuperMultiporePW-H (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 B: TSKgel GMPW_{XL} (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 C: 产品 A, 其它公司 (6.0 mm ID x 15 cm x 2)

流动相: 100 mmol/L NaNO₃
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 40°C
 进样量: 20 μL
 样品: 聚乙烯吡咯烷酮, 3 g/L

	Mw (g/mol)		
	(A)	(B)	(C)
1. PVP (K-15)	6,500	2,600	4,500
2. PVP (K-30)	25,000	5,200	21,000
3. PVP (K-90)	340,000	5,000	300,000

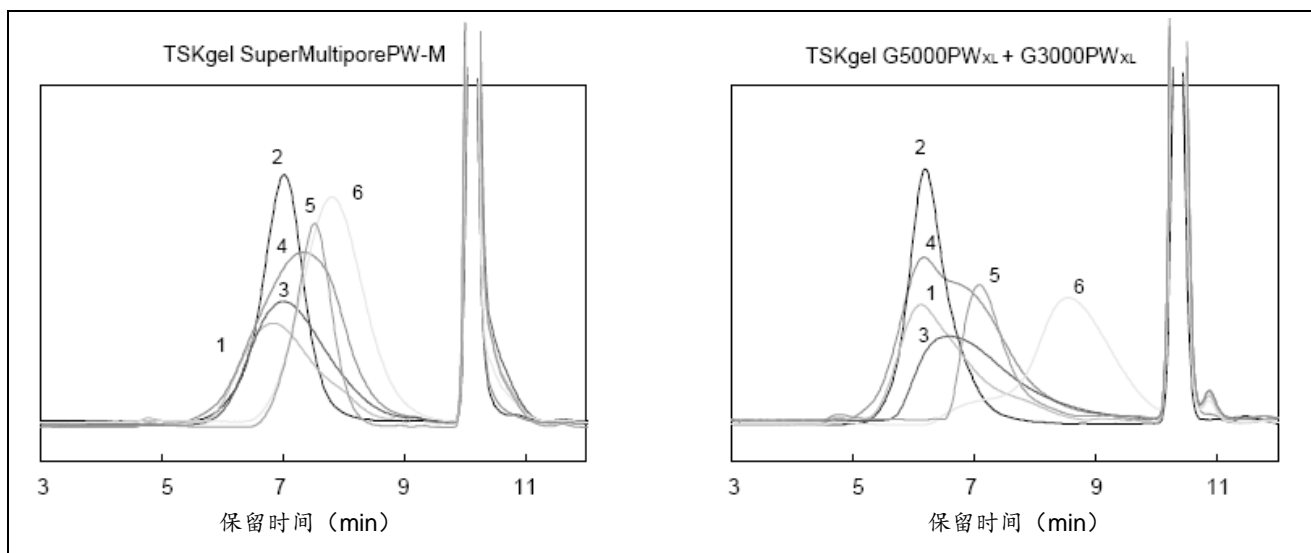


图 28 在 TSKgel SuperMultiporePW-M 色谱柱和 TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL} 色谱柱上得到的各种聚合物的色谱图和分子量

色谱柱: (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 流动相: 100 mmol/L NaNO₃
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 40°C
 进样量: 20 μL
 样品: 聚乙烯吡咯烷酮, 3 g/L

	Mw (g/mol)	
	SuperMultiporePW-M	G5000PW _{XL} + G3000PW _{XL}
1. 羧甲基纤维素	134,000	115,000
2. 阿拉伯胶	126,000	125,000
3. 羟丙纤维素	108,000	55,000
4. 葡聚糖	105,000	105,000
5. 硫酸软骨素钠	48,000	28,000
6. 聚乙烯吡咯烷酮 (k-30)	26,000	9,300

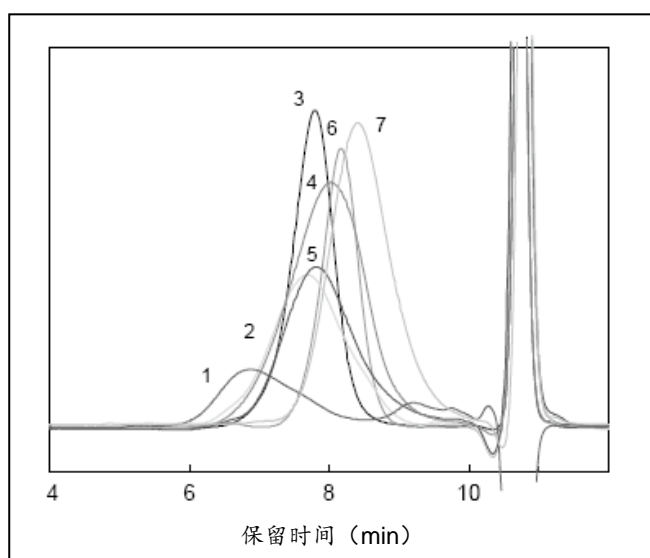


图 29 在 TSKgel SuperMultiporePW-H 上得到的各种聚合物的色谱图和重均分子量

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-H
 (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 流动相: 100 mmol/L NaNO₃
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 40°C
 进样量: 20 μL
 样品: 聚乙烯吡咯烷酮, 3 g/L

	Mw (g/mol)
1. 葡聚糖 (200)	470,000
2. 羧甲基纤维素	150,000
3. 阿拉伯胶	103,000
4. 葡聚糖 (EH-7114)	95,000
5. 羟丙纤维素	91,000
6. 硫酸软骨素钠	41,000
7. 聚乙烯吡咯烷酮 (k-30)	29,000

表 4 在 TSKgel SuperMultiporePW-M 和常规色谱柱上各种样品重均分子量的再现性 (同日分析)

	硫酸软骨素钠		阿拉伯胶		羧甲基纤维素	
	平均值	相对标准偏差 (%)	平均值	相对标准偏差 (%)	平均值	相对标准偏差 (%)
TSKgel SuperMultiporePW-M	48,000	0.49	126,000	0.35	134,000	0.67
TSKgel PW _{XL} 系列 (TSKgel G5000PW _{XL} + G3000PW _{XL})	34,600	1.89	125,000	0.57	115,000	1.05

分离条件

色谱柱: TSKgel SuperMultiporePW-M
 (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL}
 (7.8 mm ID x 30 cm x 2)
 流动相: 100 mmol/L NaNO₃
 流速: 0.6 mL/min (TSKgel SuperMultiporePW-M)
 1.0 mL/min (TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL})
 温度: 40°C
 检测器: RI
 进样量: 20 µL (TSKgel SuperMultiporePW-M)
 100 µL (TSKgel G5000PW_{XL} + G3000PW_{XL})

6. TSKgel SuperOligoPW 色谱柱的基本特性和应用

聚乙二醇 (PEG200) 在 TSKgel SuperOligoPW 和一根常规色谱柱 (TSKgel G-Oligo-PW) 上进行了分离。得到的色谱图见图 30。如图所示, TSKgel SuperOligoPW 色谱柱在一半的时间内达到了与常规色谱柱相当的分度度。

在 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱和常规色谱柱 (TSKgel G-Oligo-PW) 上分离麦芽五糖降解产物、麦芽低聚糖和纤维低聚糖得到的色谱图分别见图 31、图 32、图 33。如图所示, 对每一个样品, TSKgel SuperOligoPW 色谱柱

在一半的分析时间内即可达到常规色谱柱相当的分度度。

在 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱上采用各种色谱柱温度 (25、40、60、80、95°C) 对麦芽低聚糖进行分离见图 34。经证实, 当温度升高时, 样品的洗脱速度更快, 分离度更高。对于高聚物样品, 分离度的提高更加明显。

使用 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱分离醇类样品, 在条件优化后得到的色谱图见图 35。需要注意的是, 在此条件下, 样品洗脱是按照疏水作用色谱 (HIC) 而不是尺寸排阻色谱 (SEC) 进行的。

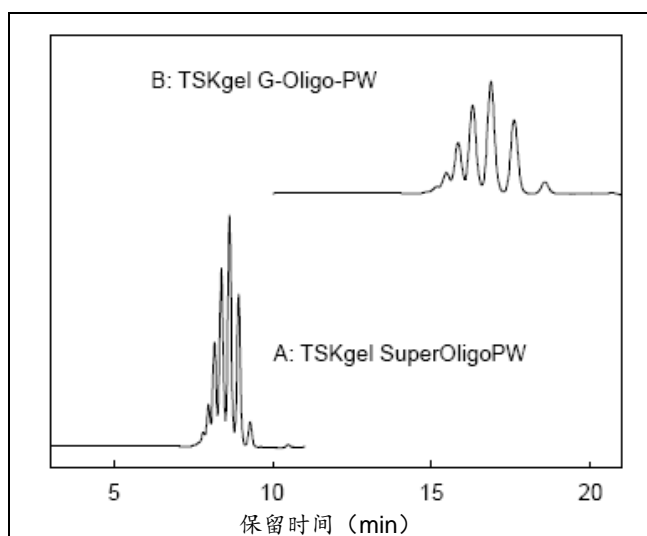


图 30 在 TSKgel SuperOligoPW 和 TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱上得到的聚乙二醇色谱图

色谱柱: A: TSKgel SuperOligoPW (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
B: TSKgel G-Oligo-PW (7.8 mm ID x 30 cm x 2)
流动相: H₂O
流速: A: 0.6 mL/min
B: 1.0 mL/min
检测器: RI
温度: 40°C
进样量: A: 20 μL
B: 100 μL
样品: PEG 200 标准品

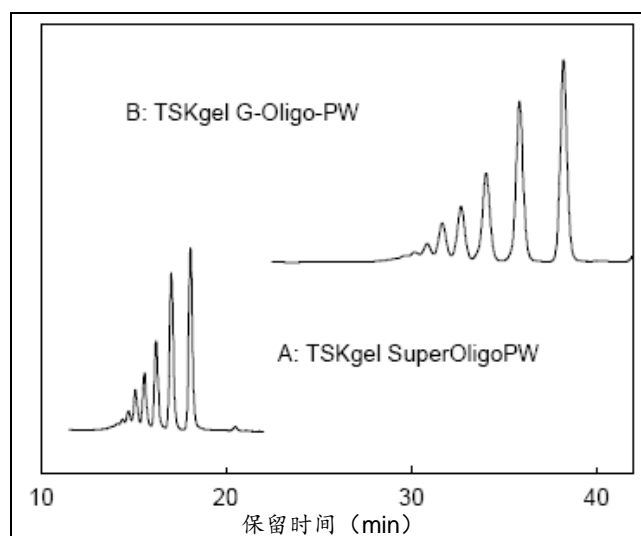


图 31 在 SuperOligoPW 和 TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱上得到的麦芽五糖的色谱图

色谱柱: A: TSKgel SuperOligoPW (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
B: TSKgel G-Oligo-PW (7.8 mm ID x 30 cm x 2)
流动相: H₂O
流速: A: 0.6 mL/min
B: 1.0 mL/min
检测器: RI
温度: 25°C
进样量: A: 10 μL
B: 50 μL
样品: 麦芽五糖降解产物

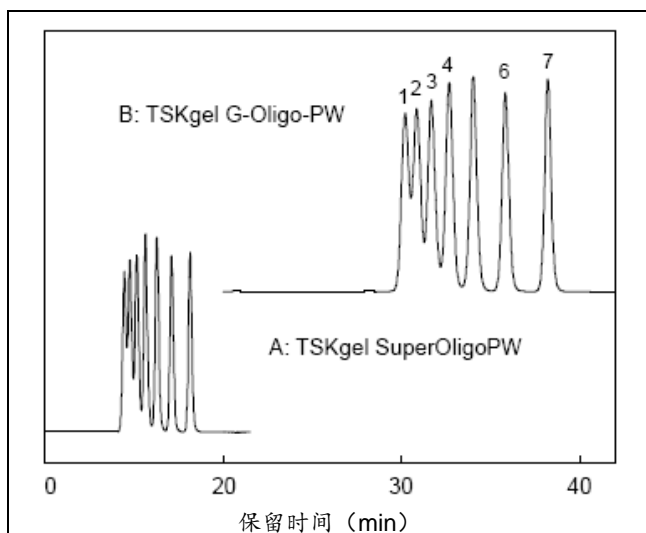


图 32 在 SuperOligoPW 和 TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱上得到的麦芽低聚糖的色谱图

色谱柱: A: TSKgel SuperOligoPW
(6.0 mm ID x 15 cm x 4)
B: TSKgel G-Oligo-PW
(7.8 mm ID x 30 cm x 4)

流动相: H₂O

流速: A: 0.6 mL/min
B: 1.0 mL/min

检测器: RI

温度: 25°C

进样量: A: 10 μL
B: 50 μL

样品: 1. 麦芽七糖
2. 麦芽六糖
3. 麦芽五糖
4. 麦芽四糖
5. 麦芽三糖
6. 麦芽糖
7. 葡萄糖

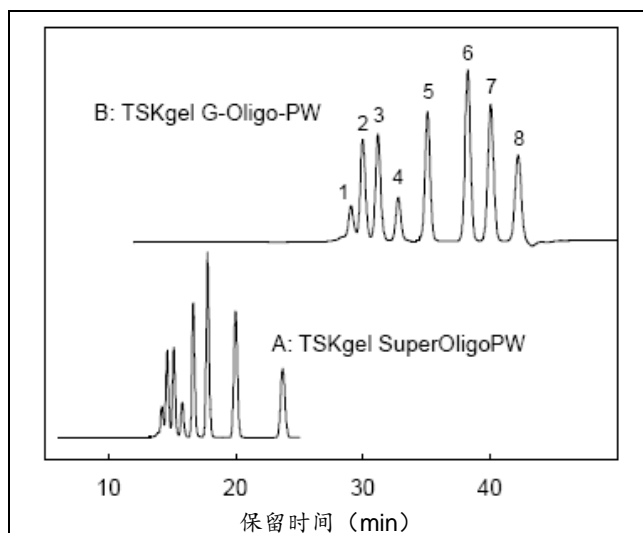


图 33 在 SuperOligoPW 和 TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱上得到的纤维低聚糖的色谱图

色谱柱: A: TSKgel SuperOligoPW
(6.0 mm ID x 15 cm x 4)
B: TSKgel G-Oligo-PW
(7.8 mm ID x 30 cm x 4)

流动相: H₂O

流速: A: 0.3 mL/min
B: 0.5 mL/min

检测器: RI

温度: 55°C

进样量: A: 5 μL
B: 20 μL

样品: 1. 纤维六糖
2. 纤维五糖
3. 纤维四糖
4. 纤维三糖
5. 纤维二糖
6. 葡萄糖
7. 乙二醇
8. 乙醇

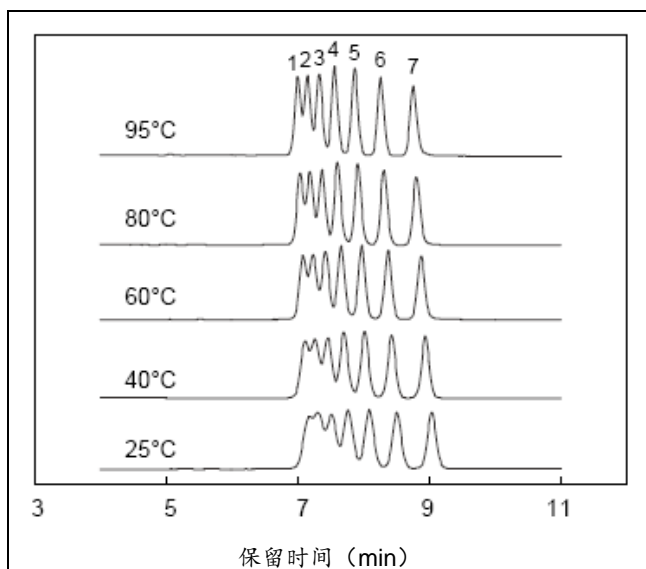


图 34 在 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱上温度对麦芽低聚糖色谱图的影响

色谱柱: TSKgel SuperOligoPW
 (6.0 mm ID x 15 cm x 2)
 流动相: H₂O
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 25, 40, 60, 80, 95°C
 进样量: 10 μL
 样品: 1.麦芽七糖
 2.麦芽六糖
 3.麦芽五糖
 4.麦芽四糖
 5.麦芽三糖
 6.麦芽糖
 7.葡萄糖

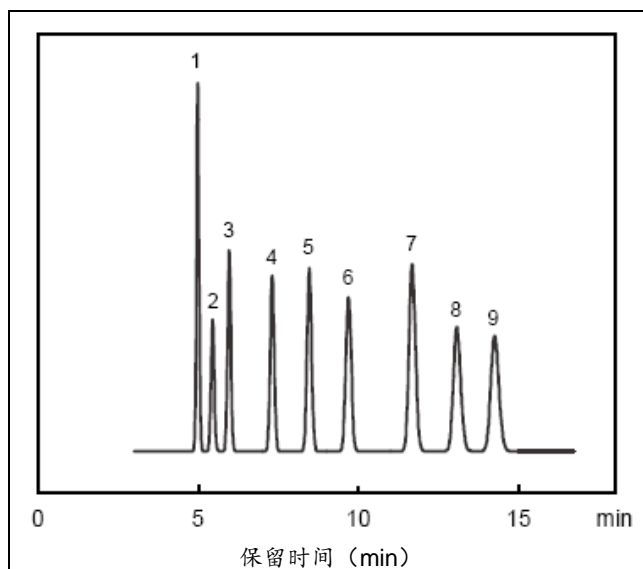


图 35 在 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱上得到的醇类色谱图

色谱柱: TSKgel SuperOligoPW
 (6.0 mm ID x 15 cm)
 流动相: H₂O
 流速: 0.6 mL/min
 检测器: RI
 温度: 80°C
 进样量: 2 μL
 样品: 1.乙二醇
 2.甲醇
 3.乙醇
 4.丙醇
 5.2-丁醇
 6.正丁醇
 7.2-戊醇
 8.异戊醇
 9.正戊醇

7. 总结

TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱是采用新型的多孔填料填充的高效半微量水相尺寸排阻色谱柱。与不同孔径色谱柱串联得到的色谱柱组合或混合床色谱柱相比，TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱能得到理想的色谱图。从本报告中可以看到，使用 TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱，得到的分子量结果，具有良好的准确度和再现性。

在色谱填料方面，采用新的合成技术，开发并制造出粒径均一，孔径分布较宽的小粒径填料，在保证良好的分离度前提下，可以实现高效分析。

针对低聚物样品设计开发的 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱，在一半的分析时间内可以达到同常规色谱柱相当的分离度。

TSKgel SuperMultiporePW 系列色谱柱和 TSKgel SuperOligoPW 色谱柱由于采用小粒径填料，减小了色谱柱尺寸，从而减少了溶剂的消耗量。在实际应用中，建议与半微量尺寸排阻系统——EcoSEC[®]凝胶渗透色谱仪配合使用。该系统具有优良的流量精度和基线稳定性。

参考文献

- 1.M.Nagata, T.Kato, H.Furutani, J.Liq.Chrom & Rel.Technol., 21 (10) 1471-1484 (1998)
- 2.TOSOH Research & Technology Review Vol.41 (1997), Development of Multipore-type GPC columns: TSKgel MutiporeH series
- 3.Tosoh Separation Report Nos.103, 105: TSKgel SuperMultiporeHZ Series: a High Performance SEC Semi-micro Column with Wide Pore Size Distribution