

实现更环保的 GPC/SEC 分析

摘要

凝胶渗透色谱/体积排阻色谱 (GPC/SEC) 作为一种液相色谱 (LC) 技术，需要使用流动相。人们越来越意识到需要更具可持续性（更环保）的解决方案，这使得对环境与健康友好的溶剂和溶液成为关注的焦点。

众所周知的绿色化学十二条原则^[1] 中有三条是液相色谱法的核心要求：防止生成废弃物，使用更安全的溶剂和助剂以及使用可再生原料。目前许多科学家关心的问题是如何在分析实验室中实施这些原则。

本白皮书介绍了来自可再生资源的危害较小的替代溶剂，可成功应用于大分子的体积排阻分离。此外，我们还为 GPC/SEC 用户提供了多种选择，用于建立符合绿色化学十二条原则的解决方案。

前言

GPC/SEC 是一种成熟的液相色谱技术，用于表征溶液中的大分子^[2]。典型的 GPC/SEC 系统包括：

- 一个等度泵，用于输送流动相
- 一个进样系统（手动或自动），用于引入溶解于流动相中的样品
- 一根或多根装填大孔填料固定相的分离柱
- 一个或多个检测器

在扩散受控的过程中，溶解的大分子通过其在大孔径固定相孔隙中不同的流体动力学体积实现分离。比固定相颗粒孔隙大的分子被排阻在孔隙外，留在流动的洗脱液中，并首先从色谱柱中洗脱出来。比孔隙小的分子能够在孔内外扩散，尺寸越小越晚洗脱。必须避免样品与固定相的相互作用。

水性流动相和有机流动相在 GPC/SEC 中均有使用。有机流动相对环境和人体健康的影响是其面临的一大挑战。

此外，GPC/SEC 的分离质量取决于可用的孔体积，这进一步增加了复杂性。传统上，GPC/SEC 使用大内径长色谱柱。通常将色谱柱组合在一起形成色谱柱组，从而提高分离度或扩展摩尔质量分离范围^[3]。因此，GPC/SEC 通常是一种分析速度慢且溶剂消耗量大的方法。

图 1 为在长 300 mm、内径 8 mm 的 GPC/SEC 分析柱上进行分离获得的典型色谱图。每次进样大约需要 15 mL 溶剂。

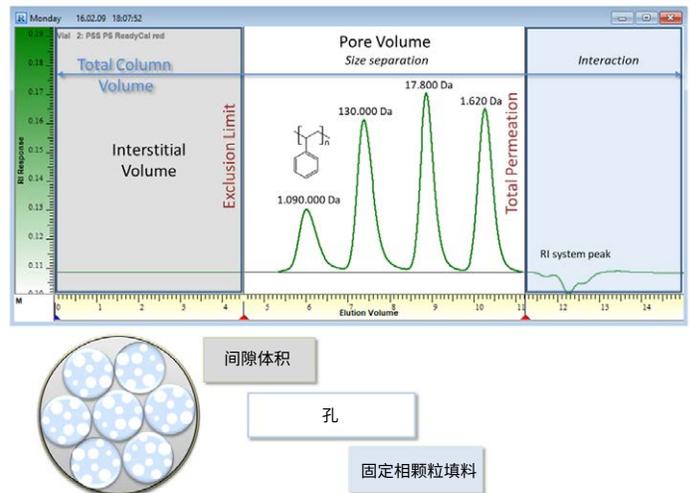


图 1. 内径 8 mm、长 300 mm 的典型 GPC/SEC 分析柱的总色谱柱体积、间隙体积和孔体积图示

鉴于上述挑战，通过换用绿色化学解决方案来降低该技术的负面影响，符合 GPC/SEC 用户的利益。在所谓的绿色化学十二条原则^[1]中，有三条特别适用于液相色谱法：

- **防止**：“防止生成废弃物总好过生成废弃物之后再处理或净化。”
- **使用更安全的溶剂和助剂**：“应尽可能避免使用助剂（如溶剂、分离剂等），即使使用也应为无害助剂。”
- **使用可再生原料**：“在技术上和经济上可行的情况下，应使用可再生原料，不使用可耗竭原料。”

更环保的流动相

大多数典型的有机 GPC/SEC 溶剂，如四氢呋喃 (THF)、三氯甲烷、甲苯或二甲基甲酰胺/二甲基乙酰胺 (DMF/DMAc)，都会对健康和环境造成严重的危害。

其中许多洗脱液都有至少满足绿色化学十二条原则之一的替代品。典型的有机溶剂及其可能的替代品汇总于表 1。

表 1. 有机 GPC/SEC 溶剂及其替代品的示例总结

流动相	可能的替代品	备注
THF	环戊基甲醚	生成的过氧化物较少
	2-甲基-THF	能够从可再生原料中获得
THF、甲苯和二氯甲烷/三氯甲烷	乳酸乙酯	无重大健康风险
	乙酸乙酯	健康风险较低
DMF、DMAc	DMSO	无重大健康风险，但能促进渗透

使用以下标准对这些替代品在 GPC/SEC 分离中的适用性进行了更详细的评估：

- 这些替代品是否与典型的 GPC/SEC 固定相兼容？
- 流动相能否在预防性可持续（可行）的条件（如压力、温度）下使用？
- 是否存在适用的 GPC/SEC 校准标样，它们是否可用于校准？
- 是否存在适用的检测方法？

用 2-甲基-THF 代替 THF

在许多应用中，可以使用 2-甲基-THF 代替 THF，这是一种从可再生资源中获得的溶剂。Agilent SDV 色谱柱（聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物填料）与 2-甲基-THF 完全兼容。

但与 THF 相比，2-甲基-THF 具有一定的局限性：

当 2-甲基-THF 与 UV-Vis 检测器一起使用时，所使用的波长必须高于 230 nm。该值略高于 THF 阈值（通常为 212 nm）。

此外，使用 2-甲基-THF 时无法测定 PEG/PEO。虽然 PEG/PEO 在加热时可溶，但在冷却至室温时就会重新析出。

用乙酸乙酯代替 THF、甲苯和二氯甲烷/三氯甲烷

乙酸乙酯是一种颇具前景的溶剂，它满足上文提到的多项标准，但也存在一些使用限制。乙酸乙酯适用于 SDV 色谱柱，是各种聚合物分析的良好溶剂，如聚苯乙烯 (PS) 及其衍生物、聚(甲基)丙烯酸酯和聚二甲基硅氧烷 (PDMS)。

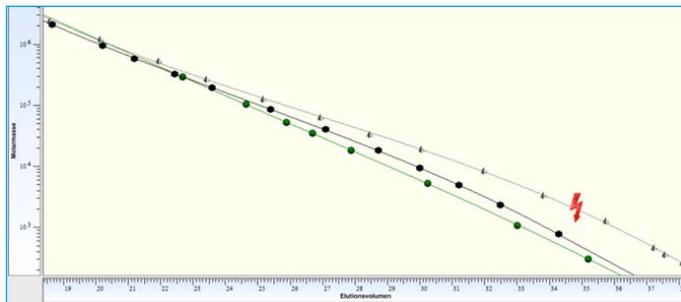


图 2. WinGPC 软件中不同校准曲线的叠加图 (PS: 灰色; PMMA: 黑色; PDMS: 绿色)，使用乙酸乙酯进行检测，流速 1 mL/min、室温、样品浓度 0.5-1 mg/mL、进样量 20 μ L 并采用 RI 检测

然而，所有的可溶性聚合物都无法实现无相互作用的色谱分析和单纯的体积分离。PS 及其衍生物表现为延迟洗脱，并且可能不仅仅是按体积来分离的。因此，乙酸乙酯不能用于这些聚合物的分析。

另一方面，使用乙酸乙酯可以按体积轻松分离聚丙烯酸酯和聚甲基丙烯酸酯。因此，对于这些分析物，乙酸乙酯是一种潜在的替代溶剂，而且健康风险较小。

PDMS 标准物质在乙酸乙酯中还表现出典型的 GPC/SEC 行为。由于在使用示差折光检测器时，PDMS 必须在甲苯或三氯甲烷中进行常规色谱分析才能被检测到，因此乙酸乙酯是一种可能的替代品。在图 2 中，将不同聚合物类型的校准曲线进行了叠加。可以明显地看到 PS 的问题。

用 DMSO 代替 DMF/DMAc

对于中等极性、粘性洗脱液（如 DMF 或 DMAc），DMSO 是一种健康风险极低的替代溶剂。但需要注意的是，DMSO 是一种促渗剂，溶解后的物质可以轻松突破人体皮肤屏障进入体内。

由于 DMSO 的粘度相对较高（甚至高于 DMF/DMAc），因此建议在更高的温度（通常为 60–80 °C）下使用。通过提高温度来降低溶剂粘度，可以降低反压，提高分离度。目前，在此极性范围内尚未发现粘度更低的替代溶剂。因此，没有一种替代溶剂可以在室温下使用，以满足低能耗的绿色化学要求。尽管如此，DMSO 仍是 DMF 或 DMAc 的理想替代溶剂。

预防措施：小尺寸色谱柱

与其他色谱技术相比，GPC/SEC 的分离度有限。GPC/SEC 色谱柱特性和实验参数对分离度的影响较为复杂。色谱柱填料粒径、填料质量等诸多因素会影响传质过程，从而影响分离度^[4]。

传统上使用长 300 mm、内径约为 8 mm 的 GPC/SEC 色谱柱。如图 1 所示，这些色谱柱每次进样所需的溶剂量约为 15 mL。为了达到 ISO 13885 等标准要求的分离度，将色谱柱组合为色谱柱组使用。这种方法的缺点是溶剂消耗量和废弃物随色谱柱数量线性增加。色谱柱组通常由两到三根分析柱组成，因此每次进样需要 30–45 mL 流动相。

使用小尺寸色谱柱，如内径 0.46 mm 或更小，长 150 mm、250 mm 或更短的色谱柱，可以显著减少溶剂消耗。然而，色谱柱直径减小的情况下塔板数也减少^[5]。分离度也随着柱长的减小而降低。

因此，在尝试替换现有应用的色谱柱时，至少应在一定程度上补偿由此导致的分离度降低。例如，可以使用小粒径填料。小粒径填料可以减小间隙体积，从而提高分离度。需要强调的是，这种方法需要优化硬件，尽量减少死体积，并使用小体积检测器流通池^[4]。

小粒径填料的缺点是压力会随着粒径的减小而增大。当使用较小的粒径时，尤其对于较大的分子，一个潜在的威胁是剪切降解。根据目前的科学研究，低至 3 μm 的小粒径可应用于低粘性溶剂中的低聚物以及蛋白质。使用具有更小孔隙率的筛板的小粒径色谱柱能否测量更高的摩尔质量或更刚性的结构，且不存在断链的危险和色谱伪峰，目前尚在研究之中。

图 3 比较了使用 5 μm 填料的 8 × 300 mm SDV 分析柱和使用 3 μm 填料的 4.6 × 250 mm 半微量色谱柱的色谱图。分析条件（进样质量、流速等）和仪器（RI 检测器）已设置为推荐的标准条件。

表 2. 半微量和分析型 GPC/SEC 柱的比较

分析类型	典型色谱柱尺寸 (mm)	理想操作流速 (mL/min)	分析时间/色谱柱 (min)	洗脱液消耗量/色谱柱 (mL)
半微量	4.6 × 250	0.33	10	3.5
分析型	8 × 300	1.00	12.5	12.5

图 3 使用基于时间的坐标轴，以便轻松、直观地比较色谱图。插图显示了消耗的溶剂，表明可以节省大量溶剂，同时分离度略有提高。

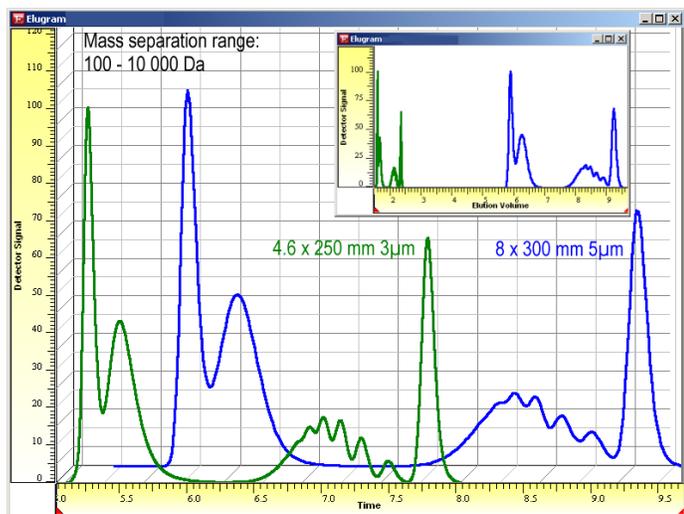


图 3. 通过使用 5 µm 填料的 SDV 分析柱（蓝色）和使用 3 µm 填料的半微量色谱柱（绿色）获得的两幅色谱图的叠加。为了便于直观比较，大图显示了获得色谱图所需的时间。插图显示了所需的溶剂量，其中半微量色谱柱所需的量明显更少

预防措施：交替进样

防止生成废弃物并节省溶剂的另一个措施是使用基于数据采集的软件功能，该功能可缩短进样之间由色谱柱间隙体积引起的冗余时间。

图 1 介绍了 GPC/SEC 色谱柱的间隙体积，在进样前通常由纯溶剂填充。在样品分析周期中，通常首先从色谱柱中排空溶剂，然后才会出现最早洗脱的成分。当洗脱化合物出现时，纯溶剂又重新填充间隙体积。

填充聚合物凝胶固定相的典型 GPC/SEC 色谱柱的间隙体积约为 30%。对于长 300 mm、直径 8 mm 的分析柱，该体积对应于 5 mL 流动相。纯溶剂填充间隙体积以及从间隙体积中排出溶剂不会影响分离；它只会消耗时间和溶剂。因此，如果软件包含一种功能，能够在上一个样品完全洗脱之前注入下一个样品，则可以节省时间和溶剂。

图 4 展示了如何实现该功能^[6]，并显示了包含连续两次进样的 Agilent WinGPC 原始数据窗口（以及此处不考虑的另一次进样）。每次进样都有进样标记，即底部的蓝色三角形和顶部的样品名称。在“样品瓶 5：样品 3”的系统峰洗脱之前，下一个样品“样品瓶 6：样品 4”已进样（约 23 mL）。“样品瓶 5：样品 3”的数据评估不受第二次进样影响；基线限值（比较两个红色三角形）和积分限值仍可按国家/地区和国际 GPC 标准（如 ISO 13885）^[7] 的要求设置。

绿色和红色区域分别表示“样品瓶 5：样品 3”和“样品瓶 6：样品 4”所需的总体积。在本例中，每次进样可以节省大约 8 mL 流动相。还可以进一步节省溶剂，因为有足够的基线面积来适当设置基线限值。

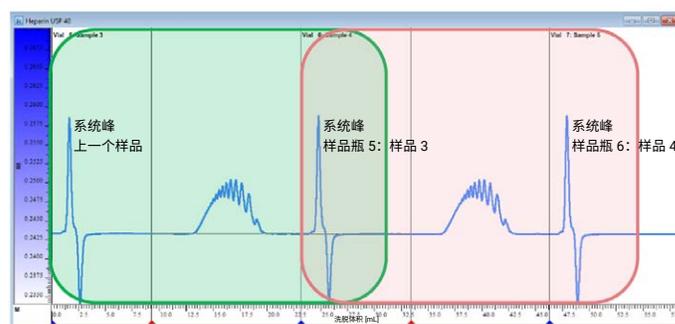


图 4. 交替进样：“样品瓶 6：样品 4”在“样品瓶 5：样品 3”完全洗脱之前进样。显示的洗脱体积适用于“样品瓶 5：样品 3”。该软件功能可以节省约 30% 的溶剂

交替进样（图 4）功能可应用于所有类型的色谱柱，不受柱长和直径的影响。我们只需缩短进样间隔即可。分离度和分析条件（如流速或色谱柱载样量）不受影响。

结论

科学家可以通过多种方式来确保其 GPC/SEC 分析符合绿色化学原则，从而降低对环境和健康的影响。这些指导原则有助于避免生成废弃物，并使用更安全的溶剂和助剂以及可再生原料。本白皮书展示了遵循这些原则的策略，提出了用于 GPC/SEC 的替代溶剂、小尺寸色谱柱和交替进样功能，这些都可以减少或防止有害废弃物的产生。

参考文献

1. Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York; **1998**
2. Striegel, A. M. *et al.* *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.; **2009**
3. 安捷伦 GPC/SEC 色谱柱电子书, **2018**
4. Resolution Increase in GPC/SEC/GFC by Decreasing Particle Size and Increasing the Number of Columns (通过减小粒径和增加色谱柱数量提高 GPC/SEC/GFC 的分离度), *安捷伦科技公司白皮书*, **2015**
5. Franklin, E. G.; Kahler, T. W. Effects of Column Inner Diameter and Packed Bed Heterogeneities on Chromatographic Performance. *LCGC North America* **2016**, 34(6)
6. Preventing Waste with Overlapping Injection (通过交替进样防止产生废弃物), *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5994-5948EN, **2023** 年 4 月 28 日 (原出版日期 **2005** 年)
7. ISO 13885: Gel Permeation Chromatography (GPC) (**2020**)-1: THF, 2-DMAc

查找当地的安捷伦客户中心:

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

www.agilent.com

DE53067451

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, 2023
2023 年 5 月 24 日, 中国出版
5994-5933ZH-CN