

基于比折光指数增量、仪器校正曲线相关系数及理论塔板数的凝胶色谱仪检定

李思*

(云南省计量测试技术研究院, 昆明 650228)

摘要: **目的** 为顺利完成凝胶色谱仪计量检定, 在检定前将仪器各项参数进行调试。**方法** 本次实验选用葡聚糖标准物质, 用凝胶色谱仪的示差检测器测量了该物质的比折光指数增量 (dn/dc), 用葡聚糖系列标准溶液标定了仪器校正曲线的相关系数 (r), 测定了仪器的理论塔板数 (N), 并依据测试结果进行了仪器的检定。

结果 通过对仪器性能的几个主要技术指标的测试、调试, 确定仪器性能良好, 仪器经检定合格。**结论** 凝胶色谱仪检定前若仪器处于良好的工作状态, 可有效避免检定过程中不出峰, 峰分离度不理想, 测量重复性差等问题, 提高检定效率。

关键词: 凝胶色谱仪检定; 比折光指数增量; 仪器校正曲线相关系数; 理论塔板数

0 引言

相对分子质量(分子量)是高分子化合物最重要的特性量值。测量分子量广泛应用于生物医药行业聚合物、生物聚合物、蛋白质和纳米颗粒分析^[1-2]。凝胶色谱仪是一种尺寸排阻法液相色谱仪(SEC-size exclusion chromatography), 能准确分析出溶液中大分子和纳米颗粒的分子量、大小和浓度, 是生物医药行业必备的大型仪器^[3-7]。凝胶色谱仪的原理是当高聚物的溶液以一定流速流经色谱柱(色谱柱为多孔物质填料填充色谱柱)时, 高聚物溶液随即按分子尺寸从大到小顺序分离, 再通过检测器检测出样品的信号值。被测样品的分子量和分子量分布通过仪器谱图即可得到。凝胶色谱仪的构造通常由溶剂贮槽、溶剂泵系统、进样器、色谱柱、检测器(示差检测器必备)、废液回收装置、数据处理系统等部分组成。凝胶色谱仪的检定项目包括柱箱温度稳定性、泵流量稳定性、检测器基线噪声、检测器基线漂移、仪器测量最大允许误差和仪器测量重复性等技术指标。

本文研究了凝胶色谱仪在检定前需要进行的一系列调试准备, 包括测定比折光指数增量(dn/dc)、标定仪器校正曲线相关系数(r)及测定理论塔板数(N)等, 并依据测试调试结果进行了仪器计量检定, 为仪器检定前期准备提供了实验及数据参考。

1 材料与方法

1.1 仪器参数调试

1.1.1 比折光指数增量(dn/dc)的测定

dn/dc 又称作“比折光指数增量”, 它衡量了聚合物溶液的折光指数对溶质浓度的响应变化。聚合物的 dn/dc 值较高时, 能将更多的光散射。因此, 只要了解聚合物的 dn/dc 特性, 就可以利用光散射的数据来估算出其分子量。 dn/dc 会随着波长的变化而变动, 因此测定 dn/dc 的时候需要确保使用的波长与其一致。本次实验选取葡聚糖标准物质 [标准物质编号 GBW (E) 050006], 以纯水为溶质, 将其配制为 1 mg/mL 葡聚糖溶液, 再用移液器做一系列的稀释, 将葡聚糖溶液配制成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的 5 个不同浓度的溶液。为保证样品纯净且不含颗粒物, 将配制好的系列溶液通过 0.02 mm 的过滤器过滤杂质, 然后把它们逐一注入到凝胶色谱仪的示差检测器中, 注意不能带入气泡。之后仪器自动采集相关数据, 软件程序根据 Optilab(dn)的信号强度及溶液浓度(dc)来计算得到对应的 dn/dc 值。

1.1.2 仪器校正曲线(r)的标定

相关系数是一种用来表示变量之间关联程度的统计指标, 通常通过计算两个变量的离差进行。离差是指变量与其平均值之间的差异; 相关系数则是通过计算这两个离差的乘积来反映变量间

*通信作者: 李思, 硕士, 高级工程师, 一级注册计量师, 研究方向为理化计量技术、理化设备检验检测方法研究、节能检测技术、碳计量等。E-mail: 912178173@qq.com

的关联性。为确保仪器处于良好的线性状态，样品测试前应进行仪器校正曲线标定。本次实验选用了 7.8 mm I.D×30 cm 的填充色谱柱。在分离范围内，选择 6 种不同重均分子量大小的标准物质葡聚糖 [GBW(E) 050004、GBW(E) 050005、GBW(E) 050006、GBW(E) 050007、GBW(E) 050008、GBW(E) 050009]，用纯水作为溶剂配制成浓度为 1.0 mg/mL 的葡聚糖溶液，将这 6 种不同重均分子量大小的葡聚糖溶液依次注入色谱柱，得到这 6 种标准物质的凝胶色谱谱图。

1.1.3 理论塔板数(N)的测定

根据塔板理论推导出的理论塔板数，其本质上是对色谱柱进行了类似于分馏塔的模拟处理。在此过程中，每个塔板都代表着一种分配状态，即待分离成分与固定相和流动相之间的动态平衡关系。当不同分子量的样品随流动相一起向前推进时，塔板会一层层分离出不同的分子量，直至最后从色谱柱中流出并在检测器处得到识别。理论塔板数的值可以作为评价色谱柱分离效率的关键指标，常使用符号 N 来标记。一般来说，较大的 N 值意味着对目标化合物的分离效果更佳。然而， N 的大小受到多种因素的影响，如填料类型、颗粒大小、粒径分布、填充方式、柱长度、内部直径、流动相种类及其速度，以及测试用的试剂特性等。此外，理论塔板数是评估色谱柱分离效率的重要参考数据，它能体现色谱柱对于样本分析所需的分离能力及匹配程度，相当于匹配了多少个分馏塔，常用于确定色谱柱是否符合样品测定的分离能力。在凝胶渗透色谱法或尺寸排阻法中，理论塔板数是一个关键指标，一个高的理论塔板数意味着色谱柱具有更好的分离能力，能够提供更高的分辨率和更好的分离效果。理论塔板数的测定对于优化色谱分离条件，提高分离效率具有重要意义。实际应用中通过优化流动相、流速和色谱柱的温度等，可以提升理论塔板数，进而增强分离效果。定期对色谱柱进行维护和再生也是保持高理论塔板数的重要措施。

理论塔板数的计算可以通过多种方法进行，其中常用的方法是使用峰的保留时间(t)和半高峰宽($W_{1/2}$)来计算。本次实验对凝胶色谱仪的三个检测器(十八角度激光散射检测器、示差检测器、紫外检测器)进行了理论塔板数的测定。

1.2 仪器检定

本次检定选取了美国 WYATT 公司生产的型号为 DAWN HELEOS-II 的具有三个检测器(示差检测器、紫外检测器、十八角度激光光散射检测器)的凝胶色谱仪。

2 结果与分析

2.1 仪器参数调试的结果

2.1.1 比折光指数增量(dn/dc)的测定结果

图 1 为手动注入示差检测器不同浓度葡聚糖信号图谱，图

2 为依据信号强度和溶液浓度绘制的标准曲线，仪器自动计算 dn/dc 值为 0.1347。

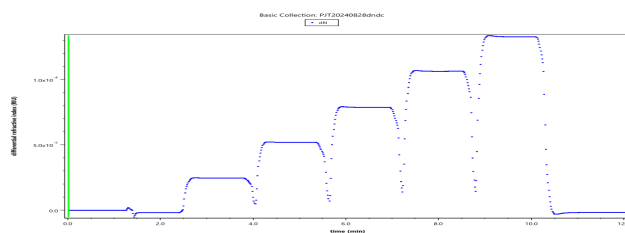


图 1 不同浓度葡聚糖溶液信号图谱

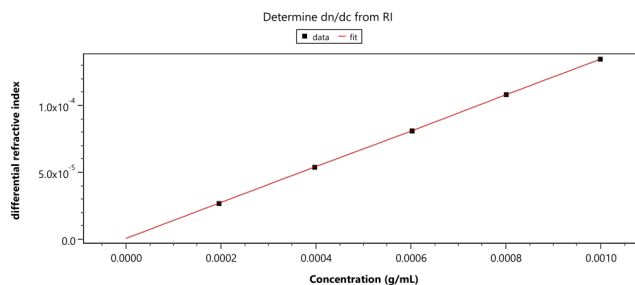


图 2 葡聚糖浓度、强度线性回归图

2.1.2 仪器校正曲线(r)的标定结果

如图 3 所示，谱图中横坐标为保留时间，纵坐标为葡聚糖溶液的浓度。然后，以葡聚糖的分子量的对数与对应溶液出峰的保留时间作图，得到葡聚糖标准物质的校正曲线，如图 4 所示。得到仪器的校正曲线相关系数 $r=0.982$ ，大于 0.98，符合要求。

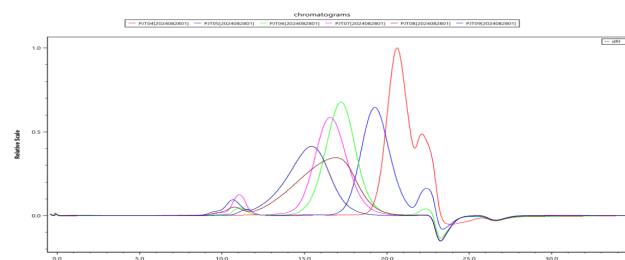


图 3 不同分子量的葡聚糖色谱图

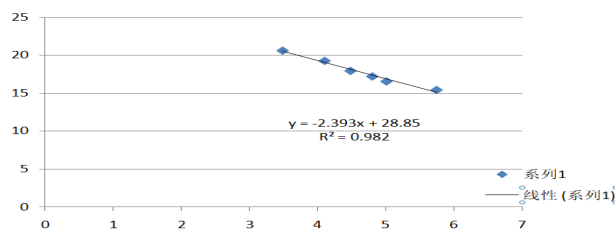


图 4 仪器校正曲线

2.1.3 理论塔板数(N)的测定结果

实验中选取 2 mg/mL 的氯化钠溶液为样品，纯水做流动相，注入色谱柱，得到色谱图，根据公式 $N = 16 \times \left(\frac{V_T}{W}\right)^2 \times \frac{1}{l}$ 计算色谱柱的理论塔板数，理论塔板数应大于 $1.2 \times 10^4/m$ 。十八角度激光散射检测器、示差检测器、紫外检测器色谱柱理论塔

板数测定图见图 5，选取十八角度激光散射检测器色谱图，由色谱图计算得：

$$N = 16 \times \left(\frac{V_T}{W} \right)^2 \times \frac{1}{l} = 16 \times \left(\frac{21.616}{21.895 - 21.137} \right)^2 \times \frac{1}{0.3} = 4.3 \times 10^4 / \text{m}$$

符合要求。

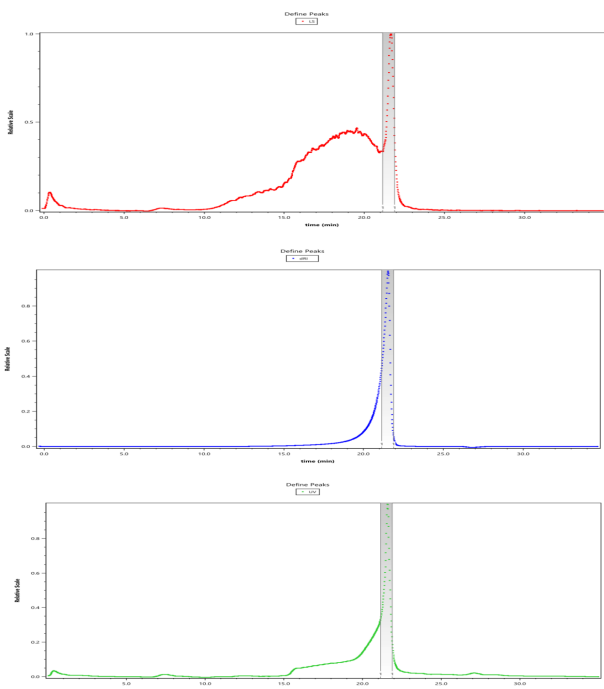


图 5 十八角度激光散射检测器、示差检测器、紫外检测器色谱柱理论塔板数测定图

通过对比折光指数增量 (dn/dc) 测量、仪器校正曲线相关系数 (r) 的标定及理论塔板数 (N) 的测定，确定了凝胶色谱仪性能良好，可以开始下一步的仪器检定。

2.2 仪器检定

2.2.1 柱温箱温度稳定性

将仪器柱温设定为 40℃，测温仪放置于柱温箱内，待仪器温度稳定后，每隔 10 min 记录一次测温仪读数，连续测量 7 次，最大值减最小值即为温度稳定性，不超过 1.0℃ 即为合格。测量列及结果见表 1。

表 1 柱温箱温度稳定性测量数据及结果

测量次数	1	2	3	4	5	6	7	温度稳定性
测量值(°C)	40.1	40.2	40.2	40.3	40.3	40.3	40.2	0.2

2.2.2 泵流量稳定性

设置泵的流速至 0.5 mL/min，开启设备并使其达到稳定的

压力状态，选取一只称量好的洁净容量瓶，在流动相出口处收集流动相，收集 5 min，称量收集后的质量，用收集前、后的质量差除以时间得到泵流速，重复测量 3 次，通过公式 $S_v = \frac{v_{\max} - v_{\min}}{\bar{v}} \times 100\%$ 计算得到泵流量稳定性，不超过 1.0% 即为合格。本次实验使用的流动相为水，泵流量稳定性测量数据及结果见表 2。

表 2 泵流量稳定性测量数据及结果

测量次数	收集前质量 (g)	收集后质量 (g)	计时时间 (min)	泵流量 (g/min)	泵流量稳定性
1	35.4233	37.9986	5	0.5151	
2	37.9986	40.5611	5	0.5125	0.9%
3	40.5611	43.1465	5	0.5171	

2.2.3 检测器的基线噪声和基线漂移

(1) 基线噪声

以水为流动相，泵流速设定为 0.5 mL/min，启动检测器，仪器稳定后，走 30 min 基线，选取基线中噪声最大峰 - 峰值 X_1 ，除以检测器的测量满量程 X ，即为基线噪声。合格限为示差检测器小于 0.1% FS，紫外检测器小于 1.0% FS，激光光散射检测器小于 0.3% FS。

(2) 基线漂移

在 30 min 内，选择基线中偏离起始点的最大值 X_2 ，按公式

$$N_d = \frac{X_2}{X \times t} \times 100\%$$

计算基线漂移，式中 X 为的测量满量程， t 为记录基线的时间，0.5 h。合格限为示差检测器小于 1.0% FS/h，紫外检测器小于 4.0% FS/h，激光光散射检测器小于 1.0% FS/h。

图 6 为示差、紫外、十八角度激光光散射三个检测器的基线图，放大基线图，用标尺测量信号值，得到基线噪声和基线漂移测量结果见表 3。

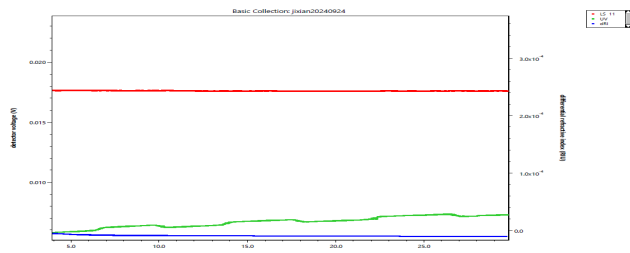


图 6 检测器基线图

表 3 基线噪声和基线漂移测量结果

检测器类型	基线噪声			基线漂移				
	峰值 1	峰值 2	满量程	基线噪声	起始点	最大差值点	满量程	基线漂移
示差	0.01785	0.01786	0.025	0.04% FS	0.01770	0.01778	0.025	0.6% FS/h
紫外	0.00175	0.00182	0.025	0.3% FS	0.0017	0.0021	0.025	3.2% FS/h
激光光散射	0.00144	0.00147	0.025	0.1% FS	0.0017	0.0016	0.025	0.8% FS/h

2.2.4 仪器测量最大允许误差和测量重复性

本次检定选取重均分子量 MW 标准值为 6.33×10^4 g/mol 的葡聚糖标准物质 [GBW(E) 050006]，以纯水为溶剂，配制成 1 mg/mL 的葡聚糖溶液，经 0.02 mm 滤膜过滤后，注入色谱柱，设置仪器运行 30 min，得到色谱图，积分后得到标准物质葡聚糖的重均分子量，重复测量 3 次，按公式

$$\Delta \bar{M}_w = \frac{\bar{M}_w - \bar{M}_{w\text{标}}}{\bar{M}_{w\text{标}}} \times 100\%$$

计算仪器测量误差，误差限为水流动相 $\pm 25\%$ ；用三次重均分子量的测量结果，按公式

$$\delta = \frac{\bar{M}_{w\text{max}} - \bar{M}_{w\text{min}}}{\bar{M}_w} \times 100\%$$

计算重复性，误差限 $\pm 5.0\%$ 。仪器图谱见图 7，测量和计算结果见表 4。

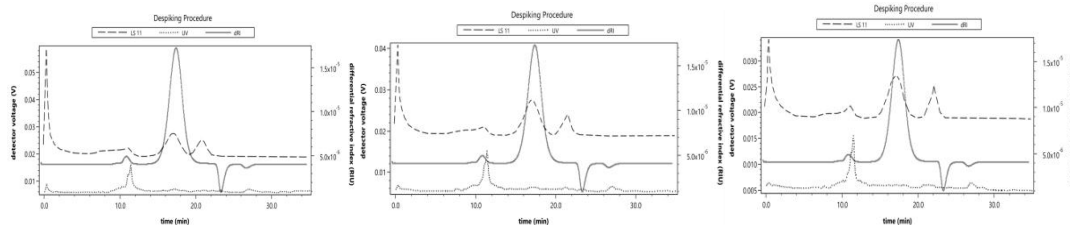


图 7 仪器测量最大允许误差和测量重复性图谱

表 4 仪器测量最大允许误差和测量重复性数据及结果

测量次数	1	2	3	平均值	仪器测量 误差	测量 重复性
测量值 (g/mol)	6.559×10^4	6.400×10^4	6.484×10^4	6.481×10^4	2.4%	2.5%

2.2.5 仪器检定结果处理

仪器外观及开机检查：合格。柱箱温度稳定性： $0.2^\circ\text{C} \leq 1.0^\circ\text{C}$ ，合格。泵流量稳定性： $0.9\% \leq 1.0\%$ ，合格。检测器基线噪声：示差检测器 $0.04\% \text{ FS} < 0.1\% \text{ FS}$ ，紫外检测器 $0.3\% \text{ FS} < 1.0\% \text{ FS}$ ，激光光散射检测器 $0.1\% \text{ FS} < 0.3\% \text{ FS}$ ；检测器基线漂移：示差检测器 $0.6 \text{ FS/h} < 1.0\% \text{ FS/h}$ ，紫外检测器 $3.2 \text{ FS/h} < 4.0\% \text{ FS/h}$ ，激光光散射检测器 $0.8 \text{ FS/h} < 1.0\% \text{ FS/h}$ ，合格。仪器测量误差：2.4%，符合水流动相 $\text{MPE} \pm 25\%$ 的要求，合格。仪器测量重复性：2.5%，符合 $\pm 5.0\%$ 的要求，合格。

3 讨论与结论

仪器检定应以仪器处于良好的工作状态为前提，因此在检定前需将凝胶色谱仪进行各项参数调试测试^[8-9]。实验用凝胶色谱仪的示差检测器测定了葡聚糖标准物质的比折光指数增量 $\text{dn/dc} = 0.1347$ ，检定中将这个实测数值输入软件程序带入计算重均分子量^[10]。实验对仪器的校正曲线进行了标定，校正曲线相关系数，说明仪器峰分离准确度可靠。实验还测定了色谱柱的理论塔板数 $N = 4.3 \times 10^4/\text{m}$ ，大于 $1.2 \times 10^4/\text{m}$ ，表明仪器色谱柱柱效具有较高的分离能力。在仪器各项指标调试测试完毕，对仪器进行了计量检定，结果合格。仪器检定前测定比折光指数增量 (dn/dc)、用实测值带入软件计算比查阅参考资料或根据经验值带入计算更为准确可靠。标定仪器校正曲线相关系数 (r) 及测定理论塔板数 (N) 来明确仪器检测器、柱效性能良好，这也是仪器检定前需要完成的工作。因此，基于比折光指数增量 (dn/dc)、仪器校正曲线相关系数 (r) 及理论塔板数 (N) 的凝胶色谱仪检定，可有效避免仪器在计量检定过程中不出峰，峰分离

度不理想，测量重复性不理想等问题，并提高计量检定效率。在计量检定的过程中选择客户常用的重均分子量数值的标准物质做仪器示值误差及测量重复性的被测样品，对于客户来说具有重要意义，其可有效反映客户在日常工作中该分子量测量的偏差及分离度。同时，客户可依据检定结果及时对日常测量结果做出正确的修正。

参考文献

- [1] 国家质量监督检验检疫总局. 凝胶色谱仪检定规程: JIG 342—2014[S]. 北京: 国家质检总局, 2014.
- [2] 祁欣, 高慧芳. JIG 342—2014《凝胶色谱仪检定规程》解读[J]. 中国计量, 2014, (09): 117-119.
- [3] 朱宝杰, 赵静, 李绍平. 基于比折光指数增量值(dn/dc)的多糖HPSEC-RID定量分析[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(07): 934-937.
- [4] 王丽霞. 不同脱乙酰度壳聚糖的制备及其聚集行为研究[J]. 化学工业与工程, 2010, 27(03): 205-209.
- [5] 宋卫德, 许美玲, 王志宏, 等. 离子色谱法同时测定啤酒中 23 种糖、糖醇及醇[J]. 中国酿造, 2020, 39(06): 209-213.
- [6] 梁柏俊, 陈谷峰, 刘能盛, 等. 凝胶渗透色谱在聚合物材料分析中的应用[J]. 高分子通报, 2019, (04): 21-26.
- [7] 王明君, 姚善涓. 小角激光光散射法测定纤维素硫酸钠的分子量[J]. 过程工程学报, 2009, 19(06): 1159-1163.
- [8] 戴洪宇. 色谱仪自动检定系统的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2009.
- [9] 吴晓惠, 黄彬磊, 吴成新, 等. 液相色谱仪—电雾式检测器的校准[J]. 化学分析计量, 2019, 28(02): 118-121.
- [10] 杨小雨, 刘正辉, 李刚华, 等. 高效液相体积排阻色谱法测定稻米支链淀粉链长的相对分子量分布[J]. 中国农业科学, 2013, 46(16): 3488-3495.