

相对时间法计算凝胶渗透色谱测试大分子分子量和分子量分布

于亚萌,谷春秀*,鲍尹聪

(北京联合大学生物化学工程学院,生物质废弃物资源化利用北京市重点实验室,北京 100023)

摘要:在凝胶渗透色谱(GPC)对大分子的分子量和分子量分布的测试中,本研究利用小分子乙二醇在系统中出峰时间恒定的现象,采用乙二醇的出峰时间作为标识物,将 GPC 的色谱图转化为相对时间,再以相对时间建立校正曲线,作为计算分子量和分子量分布的依据。此方法解决了在测试色谱图的记录、校准曲线的建立和分子量的计算中以实际时间来表示和计算分子量时,由于 GPC 泵的重复性不稳定、色谱柱柱效的下降、仪器更换过不同的色谱柱等因素造成的使校正曲线出现偏差、分子量计算结果出现误差等问题。

关键词:凝胶渗透色谱;相对时间;标准曲线

引言

凝胶渗透色谱^[1](GPC)在测试生物大分子蛋白质、多糖和聚合物分子量和分子量分布中有着广泛的应用。

通常在分子量和分子量分布的测试中,校正曲线要在一个时间段内连续使用,不做标定。但是在这一个较长的时间段内,由于 GPC 仪器的重复性的不稳定、色谱柱柱效的下降、仪器更换过不同的色谱柱等,都会使校正曲线出现偏差^[2],造成分子量计算结果出现误差。

我们设想以 GPC 色谱柱渗透极限的概念为基础^[1],不论泵的流速微小变化和管路的替换,乙二醇和样品在系统中相对出峰时间恒定。本研究采用乙二醇作标识物,以乙二醇的出峰时间作为相对时间的转换点,将 GPC 的色谱图转化为相对时间,再以相对时间建立校正曲线,进行样品的分子量和分子量分布的计算。

我们用同一样品,在泵的不同流速下用以模拟系统的偏差,此时峰位发生变化,经过转换,用相对时间方法,修正系统误差。简化工作量,保持分子量计算的准确性。

1 实验部分

1.1 实验仪器和试剂

仪器:WATERS1515 泵、2414 示差检测器、7725i 进样器、SHODEX SB-804HQ 色谱柱(日本昭和电工株式会社)、北京龙智达 GPC 工作站。

试剂:SHODEX P82 葡聚糖标准品(日本昭和电工株式会社)、乙二醇($C_2H_6O_2$,北京北化精细化学产品有限责任公司,AR)、纯净水。

1.2 色谱条件

流动相:纯水;流速:1.0mL/min;柱温箱温度:35℃;检测器温度:35℃。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2016.011.006

收稿:2016-05-30;修回:2016-09-18;

基金项目:北京市自然科学基金(2152013)、北京市教委及自然科学基金委重点课题(KZ201411417038),863 计划课题(2014AA022002,2015AA020200),国家国际合作课题(2014DFA61040,2015DFA60170),北京市教委能力提升计划课题和北京市大学生科技创新项目(201511417XJ053)资助

作者简介:于亚萌(1995—),女,本科在读;

* 通讯联系人:谷春秀(1971—),女,硕士研究生,高校教师,高级实验师,分析检验高级技师,从事生物材料、高分子材料表征、食品检验教学及研究工作。E-mail:2543774093@qq.com.

1.3 色谱柱性能以及仪器的重复性测试

连续进 3 针 0.5%乙二醇样品。保留时间的误差在 0.068%。色谱柱性能以及仪器的重复性测试均符合本实验指标。

1.4 标准曲线的制作

称取不同分子量的葡聚糖标准品各 10mg(其峰位分子量分别为 642000、337000、194000、107000、47100、21100、9600、6100),分别加入 1mL 水溶液溶解过夜,制成 10mg/mL 的标准溶液。进样后把相应谱图制作成标准曲线。

1.5 相对时间转化

选择 0.5%乙二醇溶液的保留时间作为相对时间标准点,将建立的绝对时间下的 8 个谱图转化为标准时间,并且建立标准时间的标准曲线。

转换公式为:

$$TR_i = \frac{T_i}{T_0}$$

(1)

式中:TR_i为转换后的相对时间,T_i为色谱图的标准时间,即原标准色谱图的时间,T₀为乙二醇的峰位时间。

1.6 样品计算

以葡聚糖标准品 P-50、P-100 作为未知分子量的样品进行分子量的计算,并且分别调整泵的流速为 0.95mL/min、1.00mL/min、1.05mL/min,以模拟出现偏差后的情况,并且在三种流速下分别进 P-50、P-100 和 0.5%乙二醇溶液,以 0.5%乙二醇溶液的保留时间作为相对时间标准点,对不同流速下的 P-50、P-100 进行相对时间转换,把其绝对时间下的保留时间转换为标准时间,并对 P-50、P-100 标准品进行分子量及分子量分布的标定。实验数据见表 1。

表 1 峰位分子量对保留时间
Table 1 The peak position of molecular weight and retention time

样品	M _p	绝对时间/min	相对时间
P-5	5.79×10 ³	9.075	0.820
P-10	1.02×10 ⁴	8.787	0.794
P-20	2.13×10 ⁴	8.356	0.755
P-50	4.69×10 ⁴	7.806	0.705
P-100	1.02×10 ⁵	7.190	0.649
P-200	1.91×10 ⁵	6.702	0.605
P-400	3.55×10 ⁵	6.260	0.565
P-800	6.28×10 ⁵	5.900	0.533
EG	—	11.078	1

2 实验结果与讨论

2.1 标准曲线

绝对时间的校正曲线为:

$$\ln(Mni) = 21.3874 - 5.71947 \times Ti + 0.71701 \times Ti^2 - 0.03314 \times Ti^3$$

(2)

该方程式的相关系数为 0.999。

相对时间的校正曲线为:

$$Ln(Mni) = 22.70019 - 69.31994 \times Ti + 96.9136 \times Ti^2 - 49.44466 \times Ti^3$$

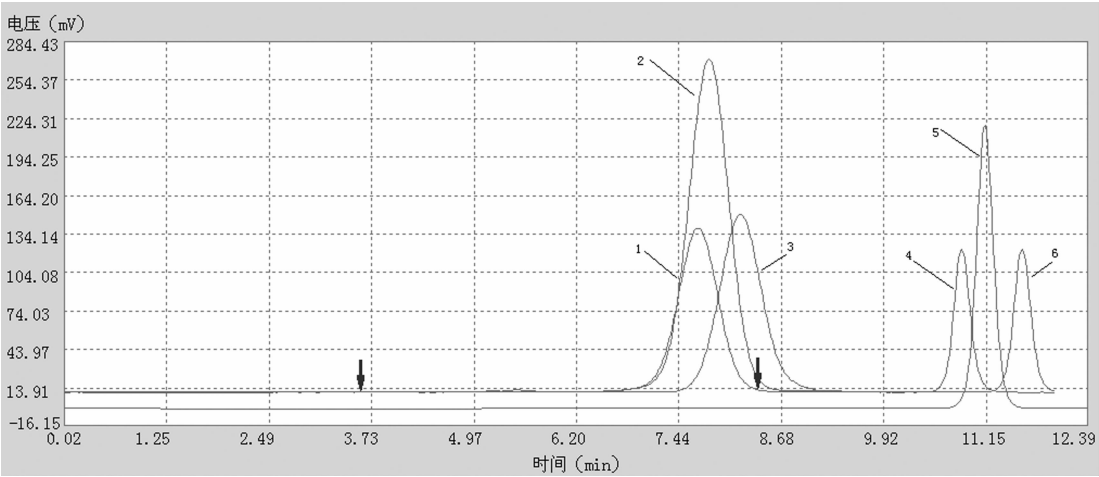
(3)

该方程式的相关系数为 0.999。

以上两条校正曲线均满足凝胶渗透色谱法的基本要求。

2.2 样品测定结果

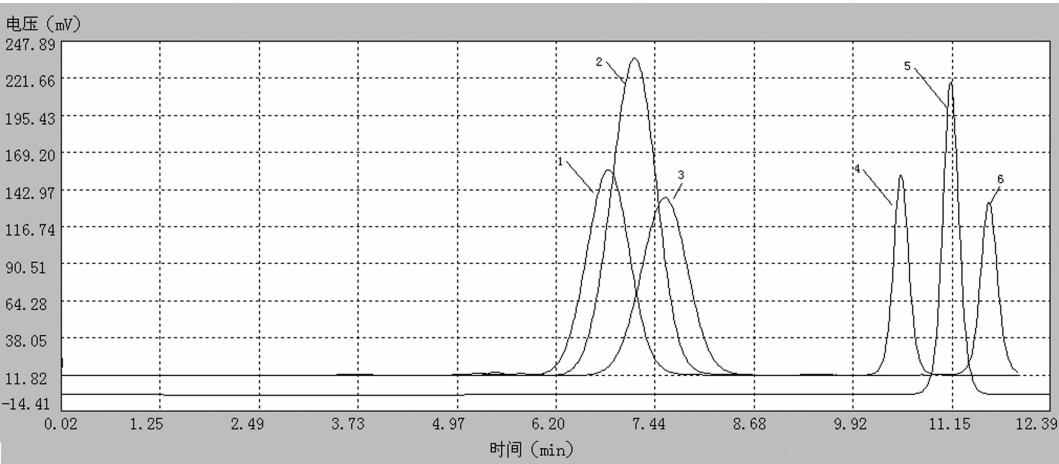
我们用三种不同的流速 0.95mL/min、1.00mL/min、1.05mL/min，模拟色谱峰位的变化情况。图 1 是样品 P-50 图 2 是 P-100。



1 为 1.05mL/min 下的 P-50、2 为 1.0mL/min 下的 P-50、3 为 0.95mL/min 下的 P-50、4 为 1.05mL/min 下的乙二醇、5 为 1.0mL/min 下的乙二醇、6 为 0.95mL/min 下的乙二醇

图 1 P-50 在三种不同流速下的谱图叠加

Figure 1 Chart adding of P-50 under three different flow velocity



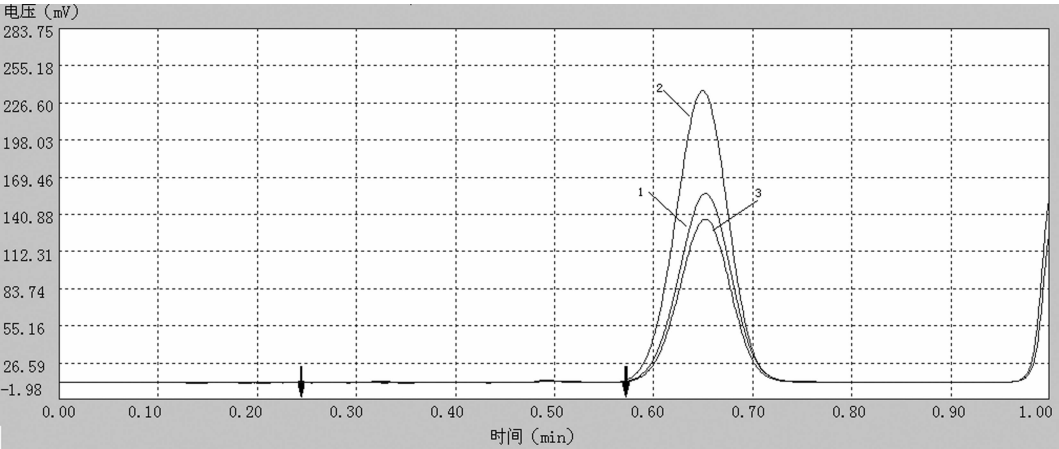
1 为 1.05mL/min 下的 P-100、2 为 1.0mL/min 下的 P-100、3 为 0.95mL/min 下的 P-100、4 为 1.05mL/min 下的乙二醇、5 为 1.0mL/min 下的乙二醇、6 为 0.95mL/min 下的乙二醇

图 2 P-100 在三种不同流速下的谱图叠加

Figure 2 Chart adding of P-100 under three different flow velocity

如图可见，当样品因流速变小而出峰时间延后时，乙二醇的出峰时间也跟随样品延后，但样品相对于乙二醇的出峰时间没有发生变化，反之亦然。

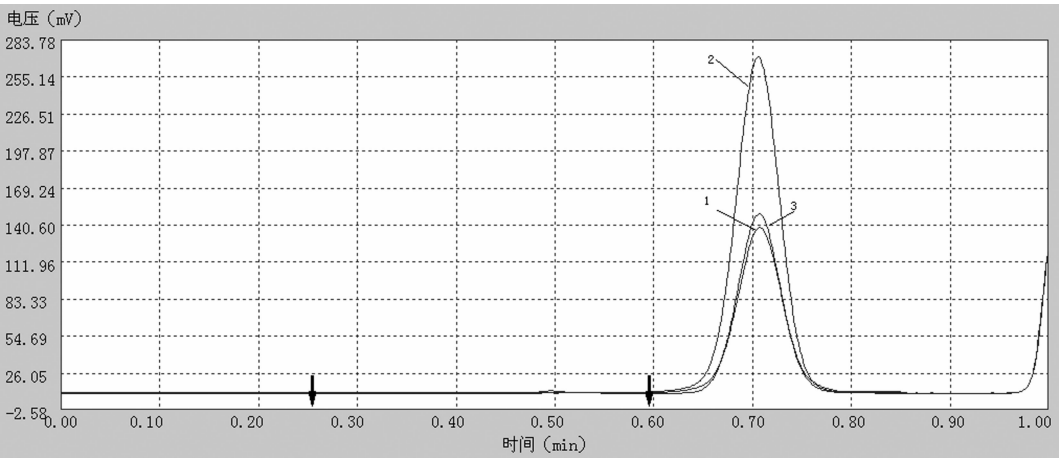
在 0.95mL/min、1.0mL/min、1.05mL/min 三种流速的情况下以 P-50、P-100 保留时间的标准时间做谱图叠加所得到的结果见图 3、图 4。



1 为 1.05mL/min 下的 P-50、2 为 1.0mL/min 下的 P-50、3 为 0.95mL/min 下的 P-50

图 3 转换后 P-50 的在三种不同流速下的谱图叠加

Figure 3 Chart adding of P-50 under three types of different flow velocity after transformation



1 为 1.05mL/min 下的 P-100、2 为 1.0mL/min 下的 P-100、3 为 0.95mL/min 下的 P-100

图 4 转换后 P-100 的在三种不同流速下的谱图叠加

Figure 4 Chart adding of P-100 under three types of different flow velocity after transformation

从上图可以看出,经过转化后,保留时间已经完全一致。

2.3 误差分析

2.3.1 绝对时间标准曲线误差分析 以绝对时间下标准曲线算出的 P-50、P-100 与标准品给定的重均分子量、数均分子量和峰位分子量^[4]进行比对,其误差结果见表 2。

表 2 绝对时间下建立的标准曲线计算出的 P-50、P-100 分子量与标准品给定分子量的对比

Table 2 The comparison of the molecular weight of P-50 and P-100 calculated by standard curve established under the absolute time and the standard's molecular weight

项目	P-50				P-100			
	M_n	M_w	M_p	D	M_n	M_w	M_p	D
说明书	4.55×10^4	4.88×10^4	4.71×10^4	1.07	10.00×10^4	11.30×10^4	10.70×10^4	1.13
标准时间	4.46×10^4	4.97×10^4	4.66×10^4	1.11	9.91×10^4	11.20×10^4	10.30×10^4	1.13
相对误差	0.09×10^4	0.09×10^4	0.05×10^4	—	0.09×10^4	0.10×10^4	0.40×10^4	—
绝对误差	1.98%	1.84%	1.06%	—	0.90%	0.88%	3.74%	—

由表 2 可知,由传统方法建立的校准曲线计算出的样品的分子量误差都在允许范围之内。系统正常。

2.3.2 绝对时间与相对时间误差分析 传统方法和不同色谱条件下转化后的分子量的计算结果见表 3。

表 3 样品 P-50 分子量的误差分析
Table 3 The error analysis of sample P-50

样品		$M_n \times 10^4$			$M_w \times 10^4$			$M_p \times 10^4$		
		计算值	绝对误差	相对误差	计算值	绝对误差	相对误差	计算值	绝对误差	相对误差
P50	传统方法	4.46	0.09	2.06%	4.97	0.07	1.48%	4.66	0.02	0.54%
P50	1.0mL/min 相对时间	4.48	0.11	2.52%	4.99	0.09	1.89%	4.69	0.06	1.19%
P50	0.95mL/min 相对时间	4.22	0.15	3.43%	4.74	0.16	3.22%	4.60	0.04	0.76%
P50	1.05mL/min 相对时间	4.32	0.05	1.14%	4.89	0.01	0.15%	4.59	0.04	0.97%
	平均	4.37	0.10	2.29%	4.90	0.08	1.68%	4.64	0.04	0.86%

表 4 样品 P-100 分子量的误差分析
Table 4 The error analysis of sample P-100

样品		$M_n \times 10^4$			$M_w \times 10^4$			$M_p \times 10^4$		
		计算值	绝对误差	相对误差	计算值	绝对误差	相对误差	计算值	绝对误差	相对误差
P100	传统方法	9.91	0.21	2.14%	11.20	0.05	0.45%	10.30	0.20	1.94%
P100	1.0mL/min 相对时间	9.9	0.20	2.05%	11.10	0.05	0.45%	10.20	0.10	0.98%
P100	0.95mL/min 相对时间	9.51	0.19	1.97%	11.00	0.15	1.36%	9.90	0.20	2.02%
P100	1.05mL/min 相对时间	9.47	0.23	2.40%	11.30	0.15	1.33%	10.00	0.10	1.00%
	平均	9.70	0.21	2.14%	11.15	0.10	0.90%	10.10	0.15	1.49%

从上两个表可看出,以在相对时间下建立的标准曲线计算出的标准品结果误差均在范围内,达到研究预期。

3 结论

本项目以 GPC 色谱柱渗透极限的概念为基础,使用了相对时间转化的方法,利用小分子乙二醇在系统中示峰时间恒定的现象,以乙二醇的保留时间作为相对时间标准点,将标准品和样品的绝对保留时间转化为标准时间,并用标准时间制作的标准曲线对样品的分子量和分子量分布进行标定。

转化为标准时间后样品的的保留时间谱图并没有因泵流速的改变而受到很大影响,所以此方法可以减小用来标定仪器和色谱柱的时间,不必再以经验来判断校正曲线的合理性,同时减少标准品的使用量和重新标定 GPC 的校正曲线的工作量,以提高其性能和经济效益,具有一定的可行性。

参考文献：

[1] 施良和,凝胶色谱法. 科学出版社. 1980. 11.
[2] 谷春秀,高展,于志勇. 高分子通报,2012,8;132~133.
[3] 于志勇. 高分子通报,2009,1;75~76.
[4] SHODEX OHpak 系列:SB-804 HQ 色谱柱使用说明书.

The New Method of Calculating the Molecular Weight and Distribution of Macromolecules in GPC Test by Using Relative Time Method

YU Ya-meng, GU Chun-xiu* , BAO Yin-cong

(College of Biochemical Engineering of Beijing Union University, Beijing Key Laboratory of Biomass Waste Resource Utilization, Beijing 100023, China)

Abstract:In the test of the macromolecular weight and molecular weight distribution by Gel permeation chromatography (GPC),according to the phenomenon that the micromolecule ethylene glycol’s peak time is constant in the system,this research used ethylene glycol’s peak time as a marker. The chromatographs under the relative time are used to establish a calibration curve which istransformed from those under the absolute time. This project solves the problems caused by the repeatability of GPC instrument ‘s instability, the declination of chromatographic column efficiency and the replacement of chromatographic column in the records of chromatogram,the establishment of calibration curve and the calculation of molecular weight under the real time.

Key words:Gel permeation chromatography; Relative time; Calibration curve