

GPC 操作步骤

1. 操作前准备

1.1. 标样及样品的配制

1.1.1. 在分析前一天称好一定重量的标样和样品，置于样品瓶中，加入流动相，室温放置 12-24 小时。通常将 2 个相差大的分子量标样配在一起。一般校准曲线有 8 个不同分子量，总共 4 个标样。

1.1.2. 使用前缓慢水平摇动样品瓶，使样品浓度均匀，且瓶壁无气泡。

提示：配制标样应该严格按照标样的说明书来操作。严禁超声和加热。标样的浓度应该选在合适的范围，通常根据分子量来确定。标样的有效期请参考说明书。

1.2. 流动相的准备

1.2.1. 使用色谱纯级溶剂和超纯水来配制流动相。0.45um 滤膜过滤后，超声脱气。

提示：超声 15min，恢复到室温后才可使用。

2. 分析操作步骤

2.1. 开机及平衡过程

2.1.1. 打开空调，使室内温度保持在 25℃左右。

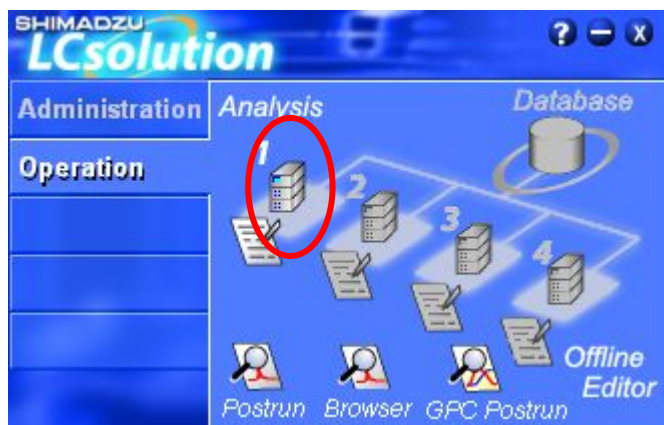
2.1.2. 打开电脑及仪器（包括输液泵 LC-20AD、自动进样器 SIL-20A、检测器 RID-10A、柱温箱 CTO-20A）。

提示：在打开仪器的时候，通常控制器最后开。如果控制器装在输液泵内部，则该输液泵最后开。

2.1.3. 运行 LCsolution。



双击电脑桌面 ，打开 LCsolution 程序，点击第一个图标。



Login 窗口点击 OK，无密码。

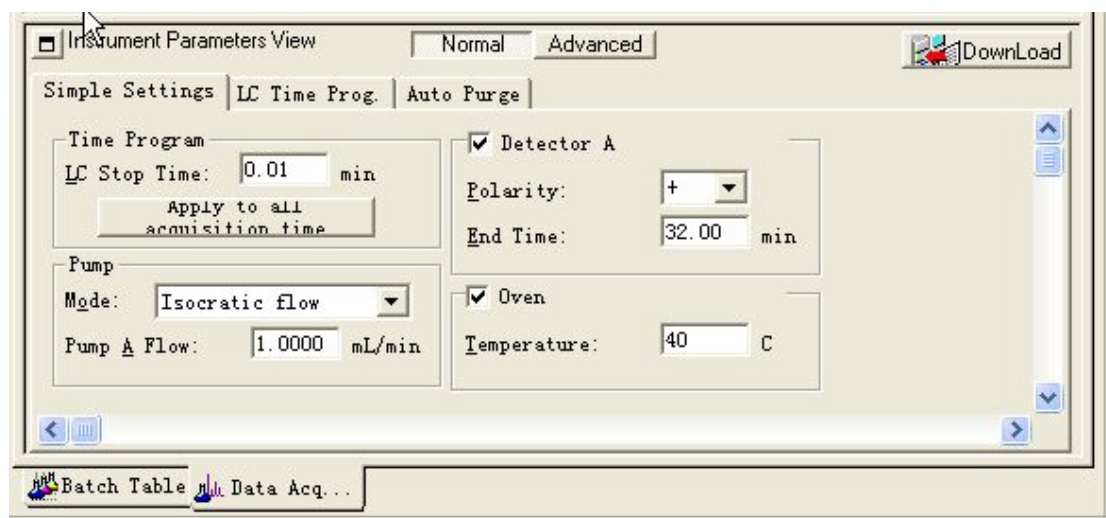


2.1.4. 点击“Instrument Parameters View”中“Normal”，设定方法参数。

仪器参数窗口设定方法参数：

- ✧ 流动相流速（pump a flow）：1ml/min
- ✧ 测定时间（time）：大于溶剂峰出峰时间 2-3min
- ✧ 柱温（oven temperature）：40℃（与检测器温度相同）

选中 Advanced 窗口，pump，pressure：max：8mPa（参照柱子说明书，两根柱子串联则相加）



点击 Download 按钮，出现对话框选择是，将参数下载到仪器。

提示：“Instrument Parameters View”中“Advanced”为各设备的运行参数，参考相关说明书制定。

- 2.1.5. 输液泵排气：逆时针拧开 LC-20AD 排液阀，按 purge 按钮，3min 后自动结束，顺时针拧紧排气阀。

提示：排液阀拧开不要超过 180 度，否则反而容易在 purge 时引入气泡。

- 2.1.6. 进样器冲洗：按自动进样器上 purge 按钮，25min 后自动结束；

提示：自动进样器清洗液使用与流动相相同溶剂，但是去除了添加的盐和酸等物质。

- 2.1.7. 平衡 GPC 柱：待 2.1.5 结束后，按（Instrument On/Off）使仪器按照方法参数开始运转，一般 60min 左右基线可以走平。

提示：可以与 2.1.6 步同时进行。

- 2.1.8. 示差检测器平衡

- 2.1.8.1. 按 R flow on/off 键冲洗参比池。



- 2.1.8.2. 20min 后，按 R flow on/off 键停止冲洗，反复点击 3-4 次以消除池内气泡。

- 2.1.8.3. 调零，等基线平稳后检查 balance 值，如果大于 50，就进行光路平衡，如果小于

50，不必进行。



- 2.1.8.4. 在仪器监视窗口查看检测器能量应处于 6000 和 9000 之间，否则在面板上调节电压使之坐落在该范围内。

提示：2.1.8 可以在 2.1.7 步流动相彻底置换色谱柱中溶液后开始进行。

- 2.1.9. 待基线基本稳定，按 Zeros Detector A 键调零。



2.2. 分析操作过程

- 2.2.1. 放入样品瓶，记录放置孔号。

提示：样品架应推倒底，瓶垫应该白色朝上。

- 2.2.2. 编辑批处理表



- 2.2.2.1. 右侧助手栏点击“Batch processing”

- 2.2.2.2. New;

- 2.2.2.3. 输入第一个样品进样器孔号（Vial#），右键 fill detail;

- 2.2.2.4. 跳出窗口中依次填入行数（由第 1 行到第 6 行）、第一个样品孔号（2）与重复次数（1 次）；点击“OK”；



- 2.2.2.5. 依次输入 sample name（样品名）、sample ID（样品编号）；
- 2.2.2.6. method file 列中输入方法文件（*.lcm 文件），左键选定列，右键单击，选择 fill down 向下填充；
- 2.2.2.7. 确定数据文件保存地址及名称；
- 2.2.2.8. 输入进样体积：50 μ l-100 μ l（标样浓度高则进样量少，低则进样量多；所有的标准品和代测样品应该采用相同的进样体积）；
- 2.2.2.9. 保存批处理文件。


- 2.2.3. 运行批处理表。点击 Batch start 按钮，开始进样。

提示：测试过程中可按助手栏中“Pause”暂停，插入样品后保存批处理表，按 restart；也可按“Stop”停止，对话框弹出选择“停止这一针分析”和“停止这个样品表的分析”。


提示：手动进样器点击 single start 进行单次进样。

2.3. 分析完冲洗及关机过程

2.3.1. 第二天将会再次使用

- 2.3.1.1. 点击仪器控制栏图标，停止温控。
- 2.3.1.2. 使流动相以 0.5mL/min 流速流入填充柱，直至柱温冷却至室温；
- 2.3.1.3. 点击“instrument on/off” 
- 2.3.1.4. 依次关闭程序、电脑和仪器。

2.3.2. 仪器长时间不用

- 2.3.2.1. 点击仪器控制栏图标，停止温控。
- 2.3.2.2. 换上保存溶剂，以 0.5mL/min 流速流入填充柱，时间为 3-4 倍方法时间，直至柱温冷却至室温；
- 2.3.2.3. 点击“instrument on/off” 
- 2.3.2.4. 将填充柱从仪器上拆下，两端用堵头堵住，放置在包装盒中。
- 2.3.2.5. 依次关闭程序、电脑和仪器。

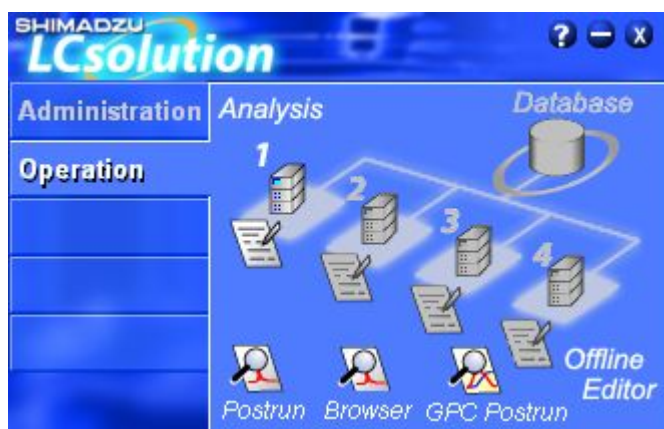
提示：柱子的使用和保藏应该按照柱子使用说明书来操作。更换溶剂时注意缓冲盐不要析出和溶剂之间的互溶性。

3. 分子量计算过程

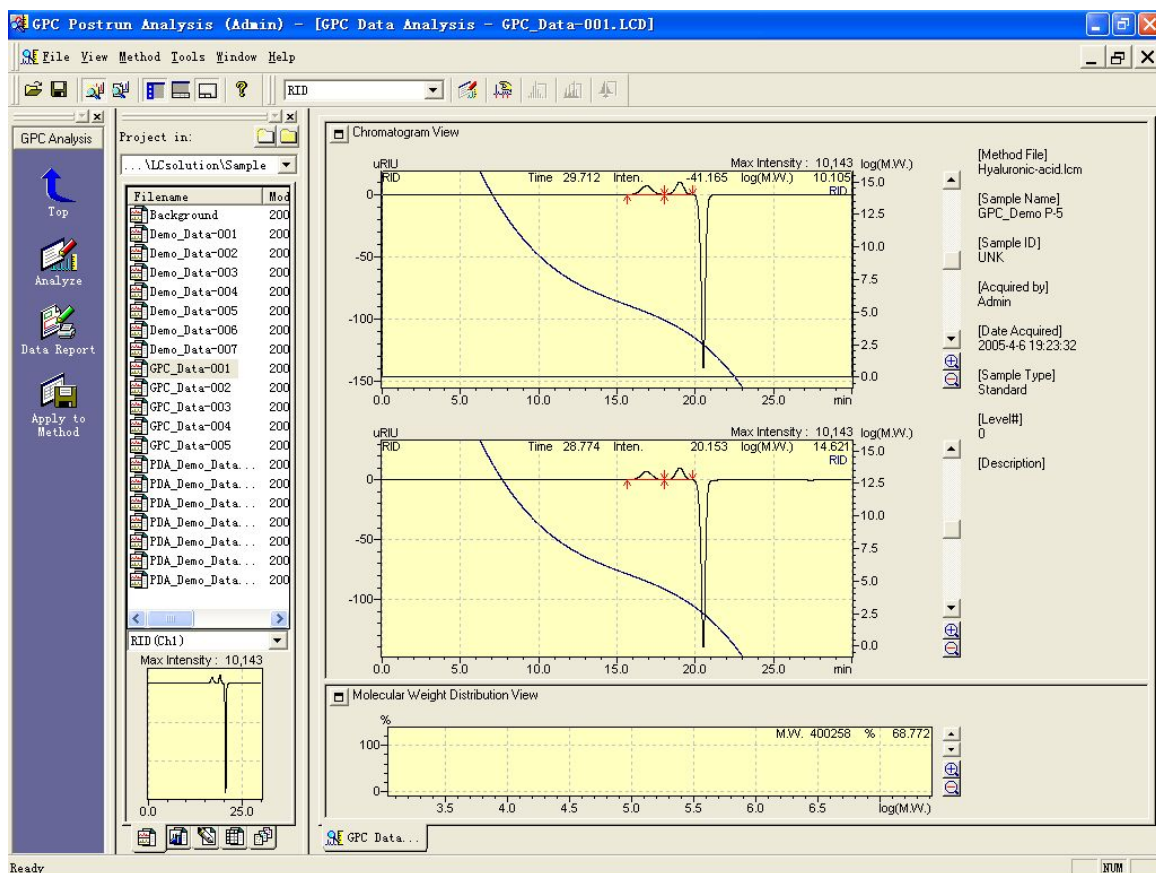
以 sample 目录下的演示文件为例介绍分子量校正曲线制作及操作过程。

3.1. 校正曲线制作

首先双击桌面LCsolution图标，单击GPC Postrun，打开GPC Postrun Analysis窗口。所有的操作均在该窗口中进行。



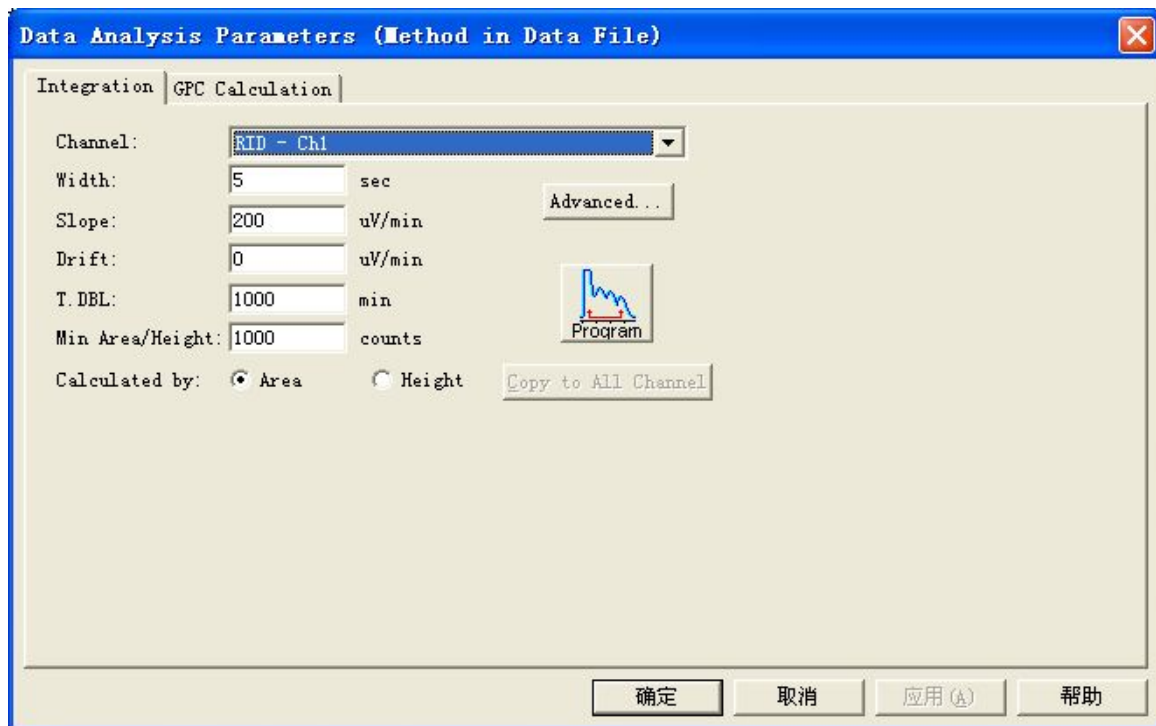
1. 双击数据资源管理器窗口GPC_Data-001文件，打开GPC标准品数据文件。
(001, 002, 003, 004均为分子量标准品数据文件，每个标准品数据文件中含有两个不同分子量的标准品，因此有两个峰。005为未知品数据文件)



2. 单击工具栏Data Analysis Parameters图标



出现Data Analysis Parameters窗口，使用如图所示的积分参数。



单击Data Analysis Parameters窗口中的Program图标。



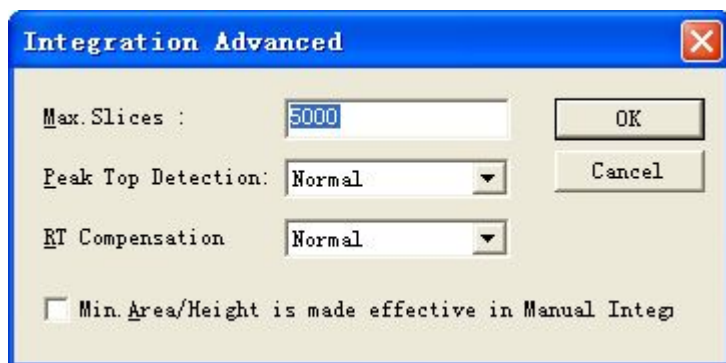
设定积分时间程序，确保只有标准品的峰被积分出来。通常将溶剂峰开始时间20min输入Time列，在Command列中选择Integration Off，这样溶剂峰就不被积分。设好后单击OK按钮。



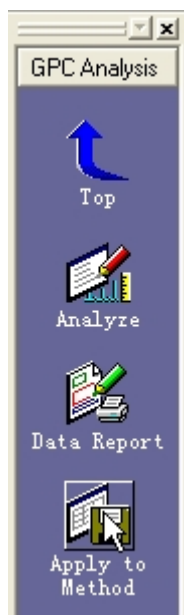
单击Data Analysis Parameters窗口的Advanced按钮。



设定Max.Slices为5000，单击OK按钮。单击确定。



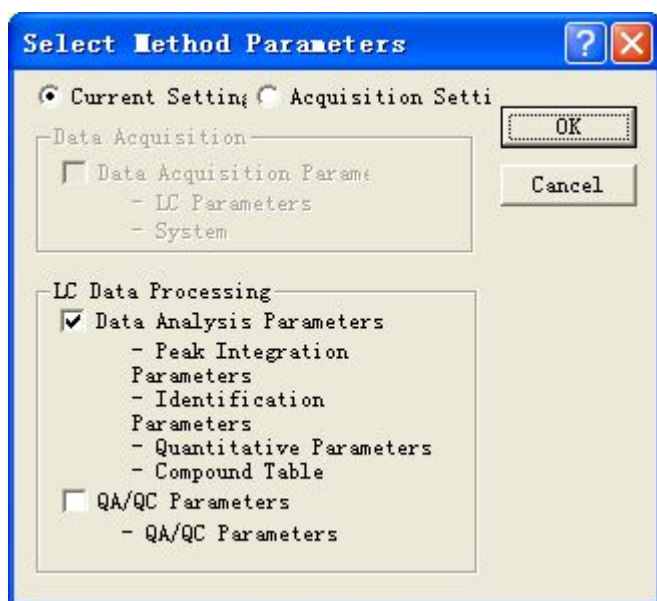
3. 单击助手栏Apply to Method按钮。



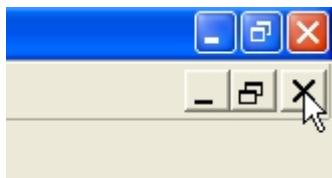
给方法文件取个名字GPC_test，单击保存按钮。



出现Select Method Parameters窗口，直接单击OK按钮。



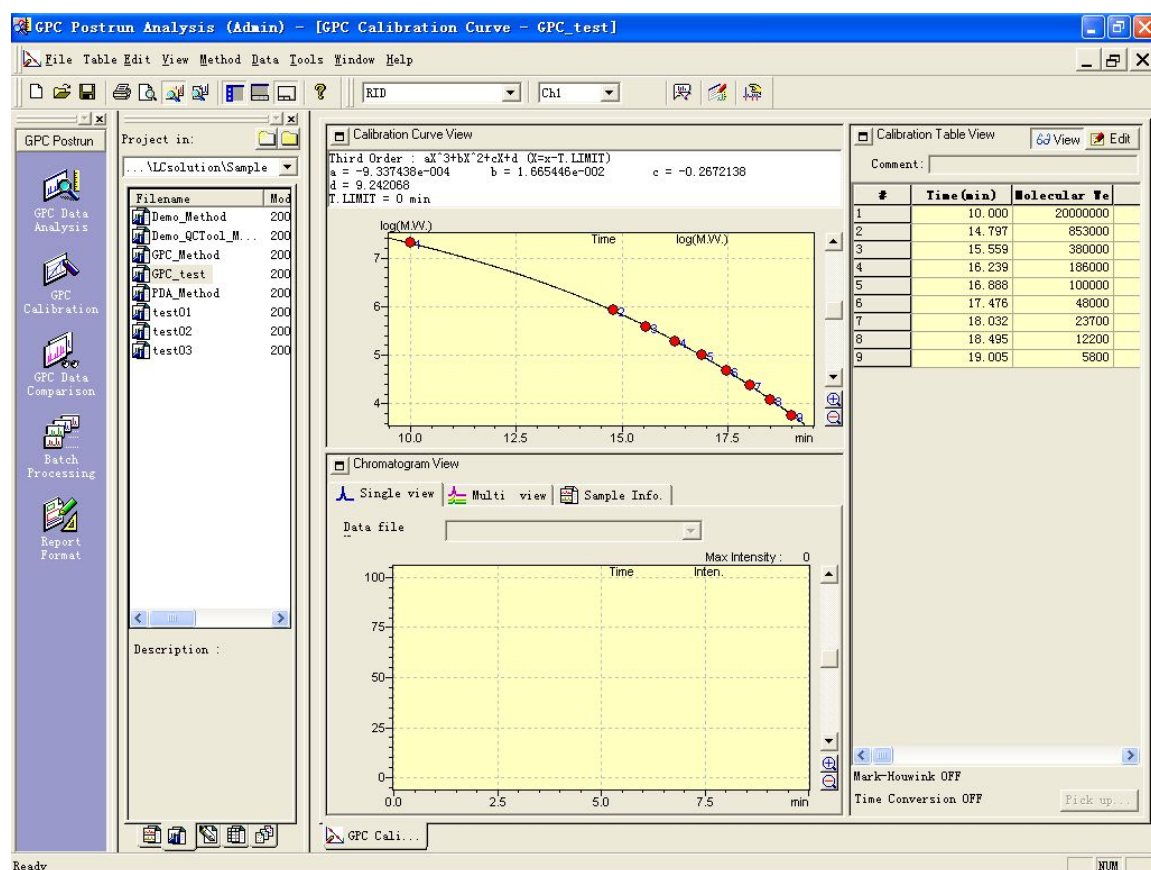
单击如图所示的按钮，关闭GPC_Data-001数据文件。提示是否保存数据文件，选择是。



4. 单击数据资源管理器窗口Method标签，显示方法文件。



双击刚才保存的GPC_test方法文件，出现方法文件编辑窗口。



- 窗口中显示了以前的分子量校准曲线信息，先将以前的信息清除掉。(如果没有以前的信息，跳过这一步) 单击校准表查看窗口Edit按钮，切换到编辑模式。

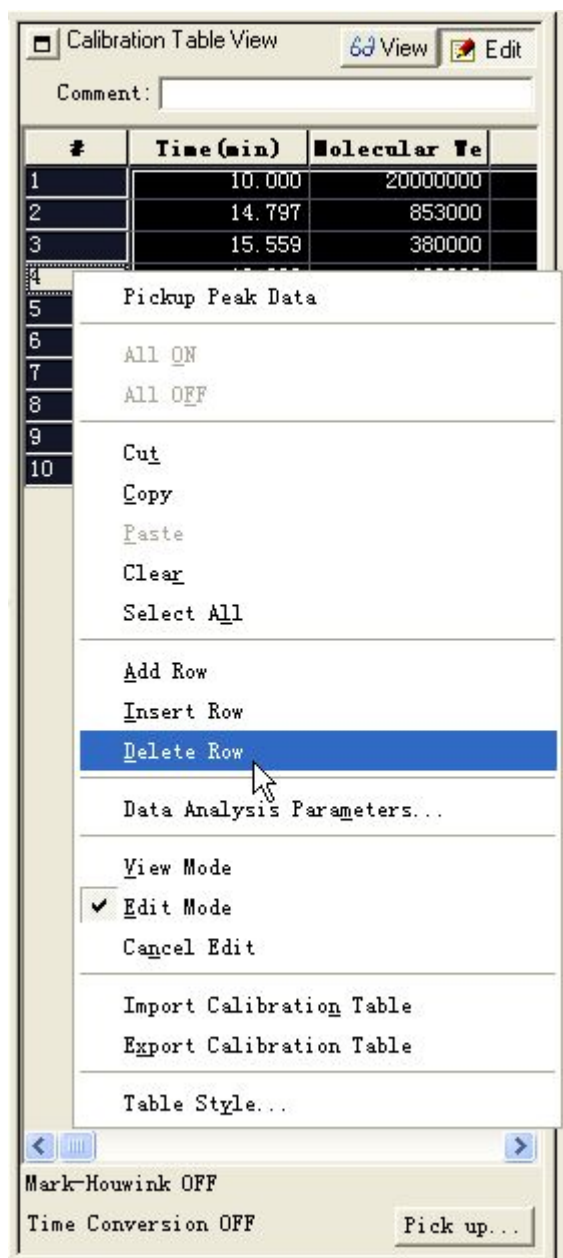
Calibration Table View

Comment:

Edit Mode

#	Time (min)	Molecular We
1	10.000	20000000
2	14.797	853000
3	15.559	380000
4	16.239	186000
5	16.888	100000
6	17.476	48000
7	18.032	23700
8	18.495	12200
9	19.005	5800

选中所有列，鼠标右键单击，选择Delete Row，删除所有行。



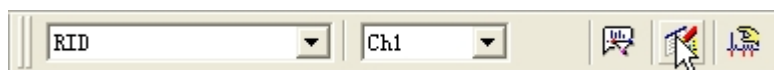
单击View按钮，切换到查看模式。



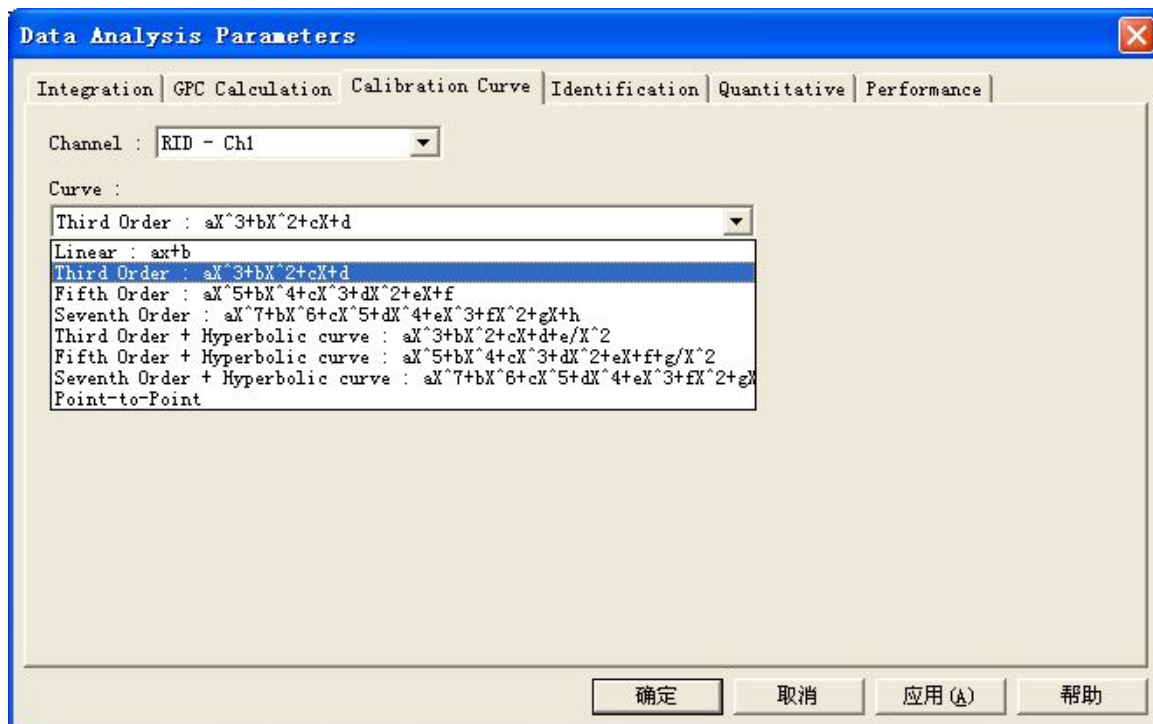
出现对话框，直接单击确定。这样就将以前的信息清除掉了。



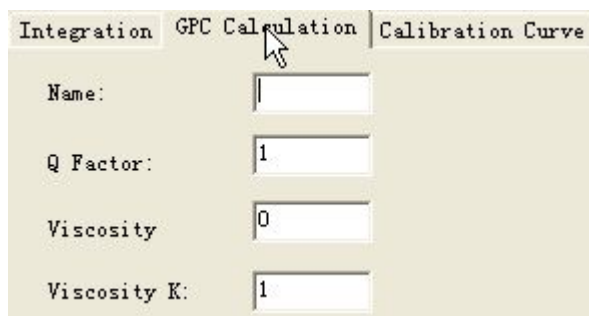
6. 单击工具栏Data Analysis Parameters图标。



出现数据分析参数编辑窗口，选择Curve类型为三次方曲线。

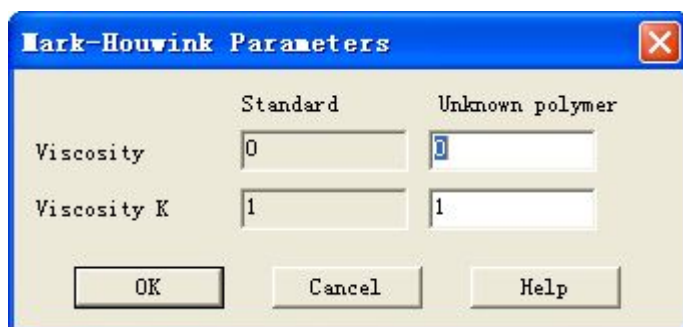
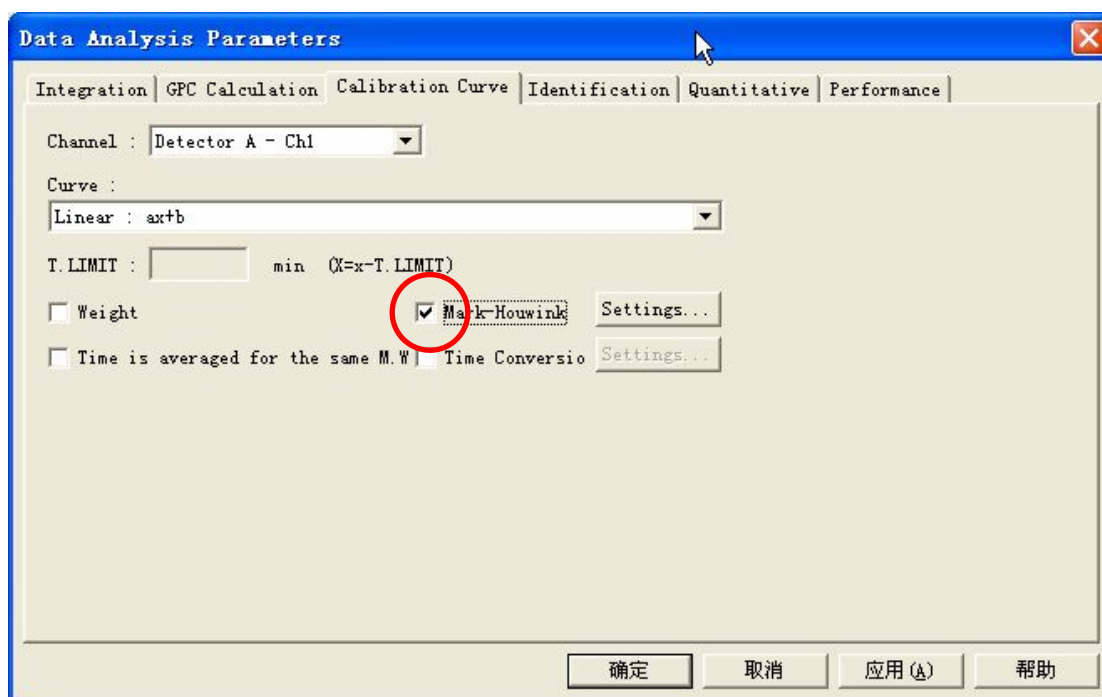


单击GPC Calculation标签。

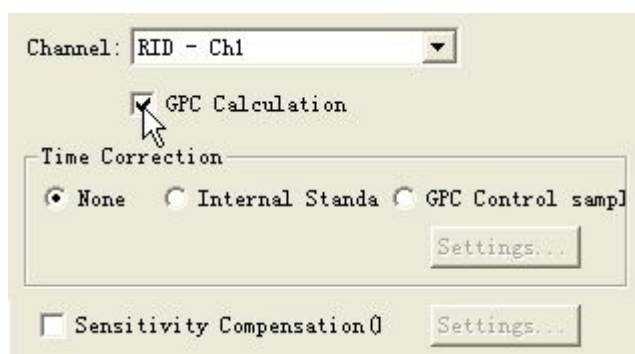


采用窄分布校正法时，在上图Q Factor一栏输入RQF值(Q因子比)。

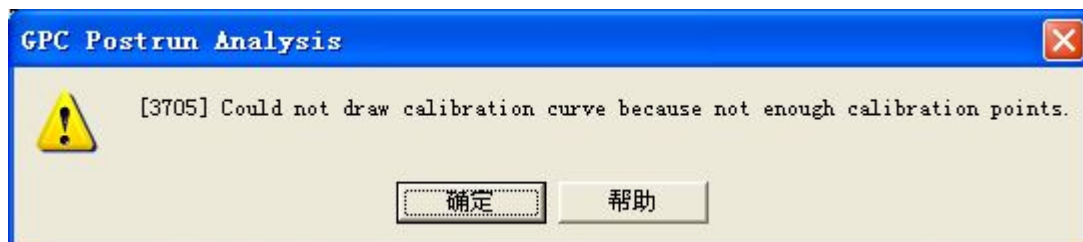
采用普适校正法时，在上图Viscosity栏中输入标样的 α 和K值。并点击Calibration Curve标签，选中Mark-Houwink，点击settings，输入样品的 α 和K值。



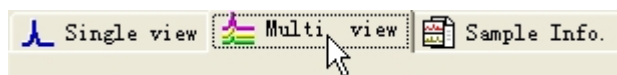
将GPC Calculation选项打勾。单击确定。



出现窗口，直接单击确定。



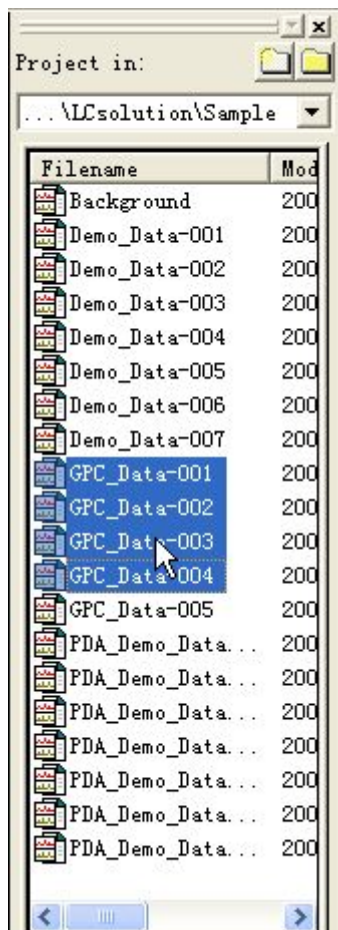
7. 单击Chromatogram View窗口的Multi view标签，切换到显示多色谱图界面。



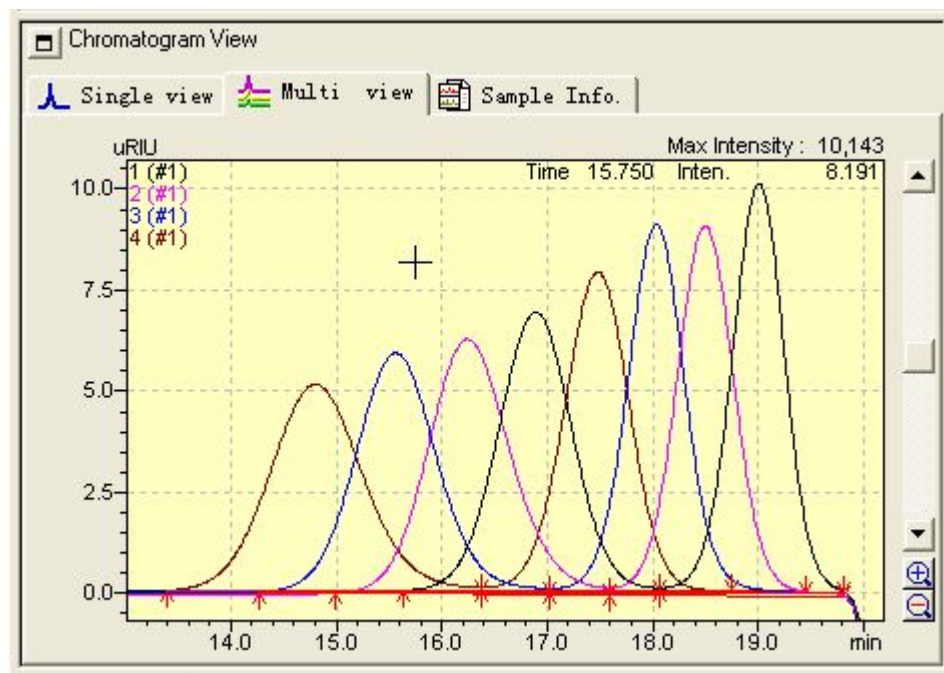
单击Data Explorer窗口的Data标签，显示所有的数据文件。



选中001-004这四个数据文件。



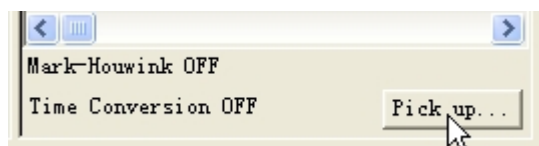
将选中的四个数据文件拖到Multi View窗口中，同时显示四个色谱图的八个峰。



8. 单击校准表查看窗口的Edit按钮，切换到编辑模式。



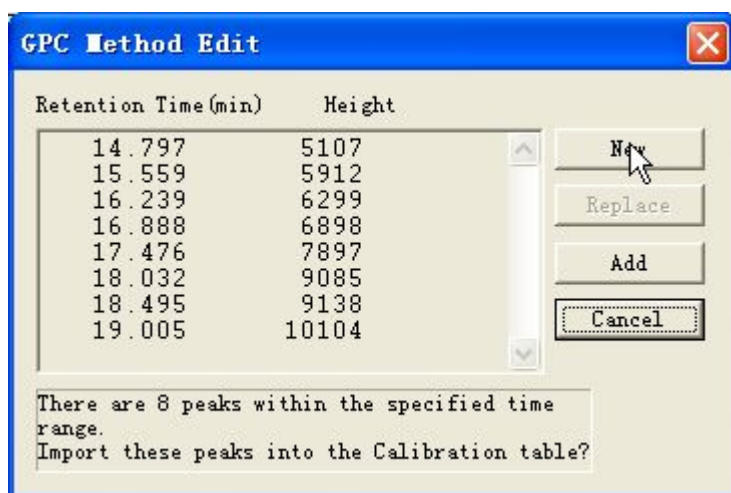
单击校准表查看窗口右下角的Pick up按钮。



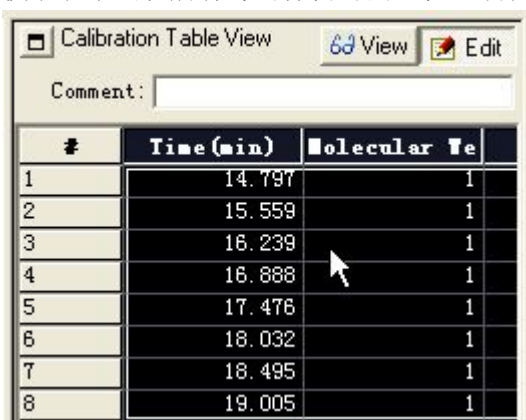
出现GPC Method Edit窗口，单击All peaks按钮选择所有积分出来的峰。



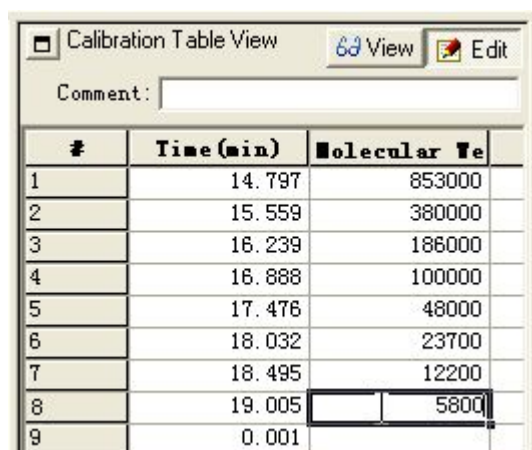
单击New按钮，新建校准表。



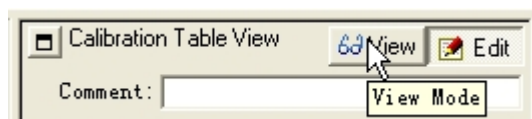
校准表中出现所有峰的保留时间，检查确认是否正确。



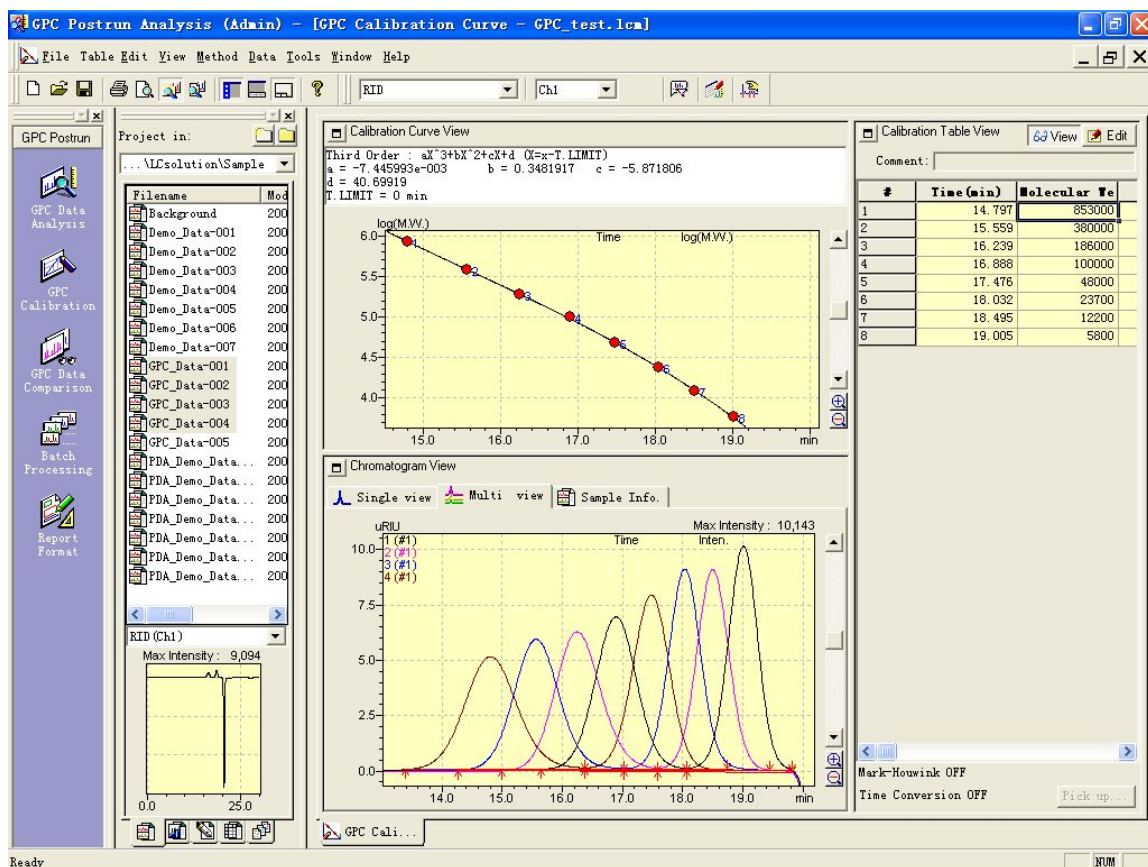
输入各个峰所对应的分子量。



单击View按钮。



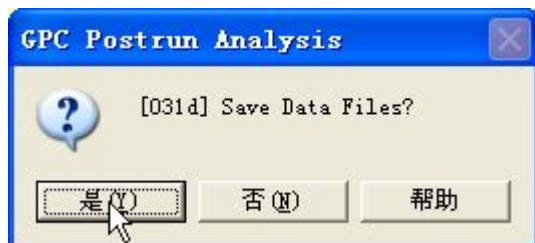
Calibration Curve View出现制作好的校准曲线图谱和方程。



9. 单击工具栏Save按钮，保存方法文件。



出现对话框，单击是。



3.2. 样品平均分子量计算

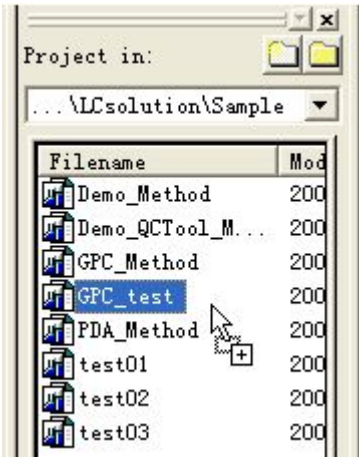
1. 双击打开未知品数据文件GPC_Data-005。



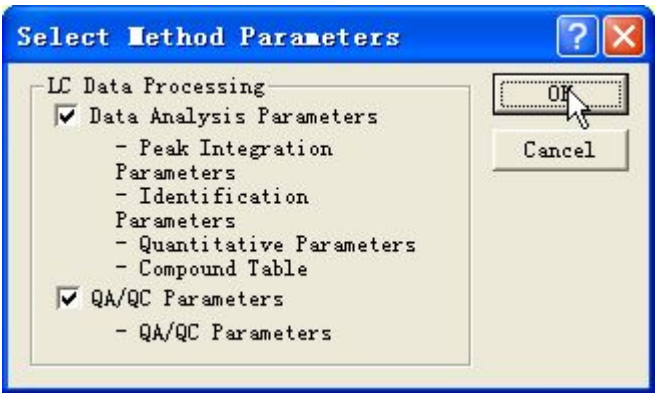
单击Method标签。



将刚才保存的GPC_test方法拖到右边的色谱图窗口中，加载方法参数。



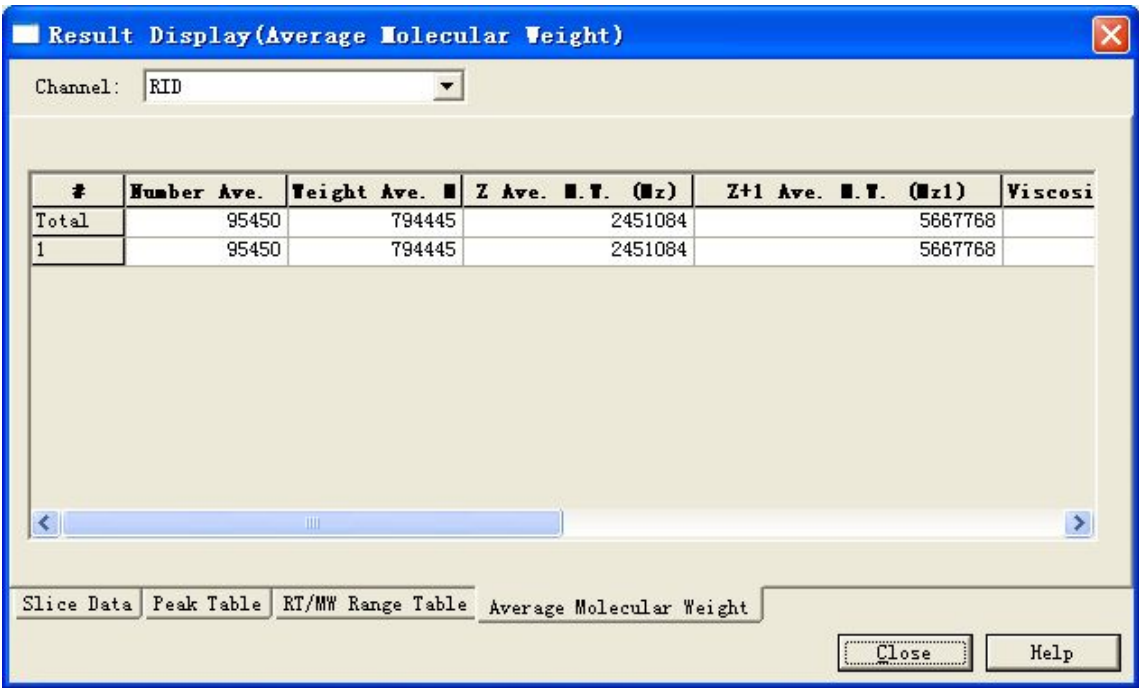
出现选择方法参数对话框，直接单击OK。



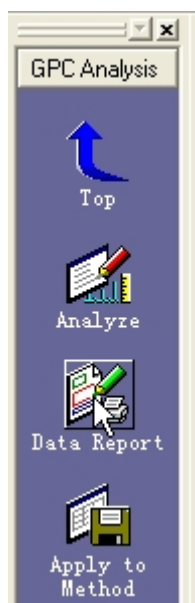
2. 单击工具栏Molecular Weight Distribution按钮。



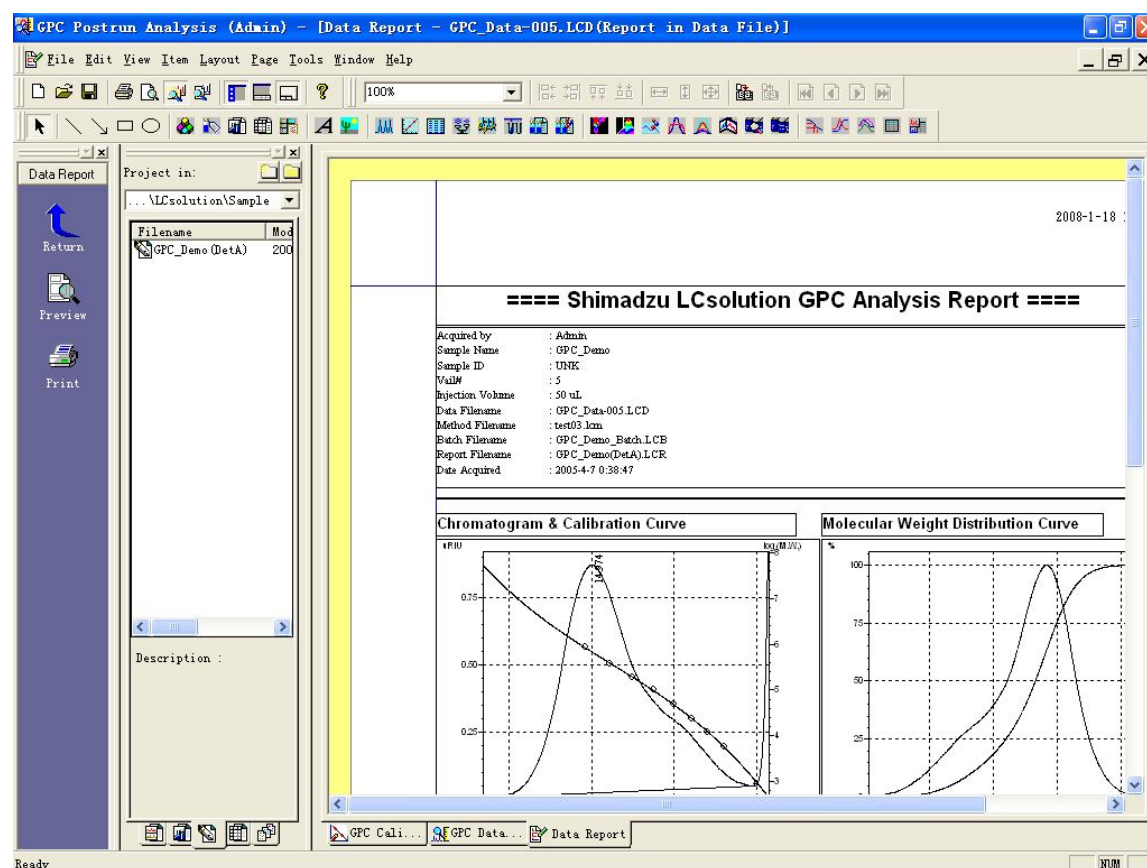
查看分子量计算结果。



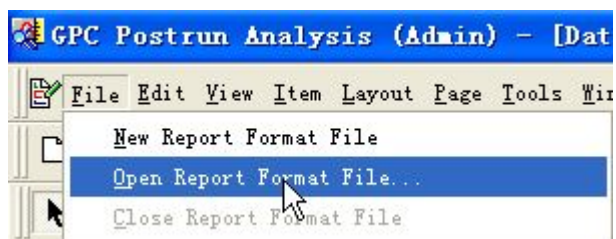
3. 单击助手栏Data Report按钮查看数据文件中的报告。



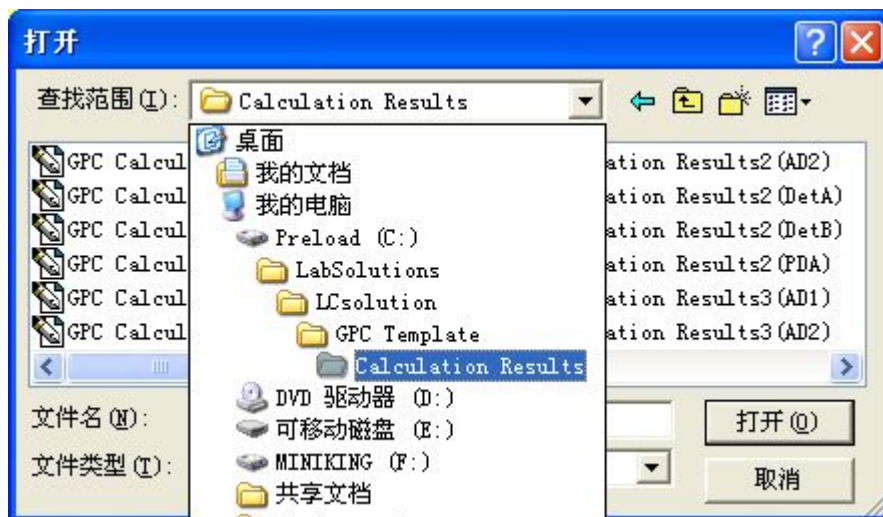
显示包含在数据文件中的报告。



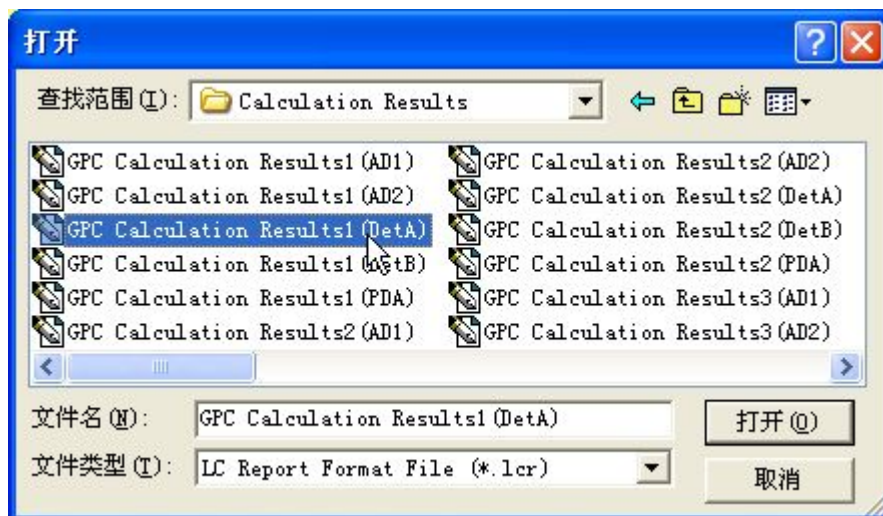
单击File菜单，打开报告格式文件，可以修改报告格式。



选择Calculation Results目录。(该目录中存放的都是针对单个GPC数据文件的报告模板)



选择如图所示的报告格式文件。(共有四种不同格式的报告格式文件可供选择)



单击助手栏Preview按钮。



在打印前预览报告。单击打印按钮，就可以打印出报告。

