|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 83.040.10 |
| CCS | B 72 |

|  |
| --- |
| NY |

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—XXXX

天然生胶 平均分子量和分子量分布的测定 凝胶渗透色谱法

Rubber，raw natural — Determination of average molecular mass and molecular- mass distribution by gel permeation chromatography (GPC)

(ISO 16564:2004,MOD)

（本草案完成时间：2024年8月25日）

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

中华人民共和国农业农村部  发布

目次

[前言 II](#_Toc176938342)

[1 范围 1](#_Toc176938343)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc176938344)

[3 术语和定义 1](#_Toc176938345)

[4 原理 1](#_Toc176938346)

[5 试剂和材料 1](#_Toc176938347)

[6 仪器 2](#_Toc176938348)

[7 试验步骤 2](#_Toc176938349)

[8 校正 3](#_Toc176938350)

[9 结果表示 4](#_Toc176938351)

[10 精密度 4](#_Toc176938352)

[11 试验报告 4](#_Toc176938353)

[附录A（资料性） 以环己烷为溶剂和聚异戊二烯标准样品进行天然橡胶的体积排阻色谱法分析 6](#_Toc176938354)

[附录B（资料性） 精密度 7](#_Toc176938355)

[参考文献 8](#_Toc176938356)

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件使用修改采用ISO 16564:2004《天然生胶 用体积排阻色谱法测定平均分子量和分子量分布》及其修改单ISO 16564:2004/Amd.1:2006。

本文件与ISO 16564:2004相比在结构上有调整，具体章条编号如下：

1. 增加了“规范性引用文件”和“术语和定义”两章（见第2章、第3章），其后各章编号按顺序调整；
2. 增加了附录B；
3. 第10章和附录B对应ISO 16564:2004/Amd.1:2006。

本文件与ISO 16564:2004和ISO 16564:2004/Amd.1:2006的技术差异及其原因如下：

1. 增加了试剂2,6-二叔丁基对甲酚（见5.1），以适应我国对化学试剂的规定；
2. 更改了聚苯乙烯标准样品的要求（见5.3），有利于校正曲线的重新绘制；
3. 将“0.01 g”改为“0.1 g”，将“10 cm3”改为“30 mL”（见7.4.1），有利于仪器的响应；
4. 增加了规范性引用文件GB/T 37498（见7.4.3），以适应我国对天然生胶凝胶含量的测定；
5. 增加了拟合线的相关系数（见8.3）,有利于判断是否每个标准样品校正点都落在拟合线上；
6. 更改了校正曲线（见8.3）,有利于数据的准确性；
7. 增加了保留时间的有效性（见9.1），以明确结果的有效性。

本文件做了下列编辑性改动：

1. 增加了试剂的CAS号（见第5章），以更好地满足GB/T 20001.4—2015的规定；
2. 将BHT的作用由段更改为注（见5.2，ISO 16564:2004的3.1）；
3. 更改了体积单位（见6.1.3、6.3、7.2、7.4、8.2、A.2、A.3、A.4，ISO 16564:2004的4.1.3、4.3、4.4、5.2、5.4.1、6.1、6.2、A.2、A.3、A.4），以适应我国对体积单位的规定；
4. 第10章纳入了修改单的内容并更新了精密度数据（见第10章，ISO 16564:2004/Amd.1:2006），以符合试验方法精密度的规定；
5. 将ISO/TR 9272更改为ISO 19983（见附录C、参考文献，ISO 16564:2004/Amd.1:2006），因ISO/TR 9272已被废止。

请注意本文件的某些内容有可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部农垦局提出。

本文件由农业农村部热带作物及制品标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国热带农业科学院农产品加工研究所、中国石油天然气股份有限公司石油化工研究院、中国热带农业科学院橡胶研究所。

本文件主要起草人：彭文凤、张福全、廖禄生、卢光、李一民、李玉攀、宋景清、杨芳、曾霞。

天然生胶 平均分子量和分子量分布的测定 凝胶渗透色谱法

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

* 1. 范围

本文件描述了溶解于四氢呋喃的天然生胶平均分子量和分子量分布的测定方法。使用一组聚苯乙烯标准样品进行校正（即本方法是一种相对的方法）。

本文件包括一种供选择的方法，以环己烷为溶剂并使用一组聚异戊二烯标准样品进行校正（资料性附录）。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 37498 天然生胶 技术分级橡胶（TSR）凝胶含量的测定

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 原理

室温下将干燥的天然生胶溶于四氢呋喃。过滤溶液以除去“凝胶”（轻度交联的橡胶）和其它不溶物质。滤液使用凝胶渗透色谱法测定分子量[1]。根据色谱图可以计算出数均分子量（*M*n）、重均分子量（*M*w）和多分散性的值（*M*w/*M*n）。

* 1. 试剂和材料
		1. 2,6-二叔丁基对甲酚（BHT，CAS 128-37-0）

质量分数不应低于99.5 %。

* + 1. 四氢呋喃（THF，CAS 109-99-9）

分析纯或色谱纯，质量分数不应低于99.0 %。

建议以色谱纯四氢呋喃为溶剂。

如果以分析纯四氢呋喃为溶剂，则应加入0.5%（相对于分析纯四氢呋喃质量百分数）2,6-二叔丁基对甲酚（5.1）作抗氧剂。

1. BHT保留性强并起到指示色谱图终点的作用。BHT能使试验期间小幅变化得到更正，同时在色谱柱条件发生剧烈变化时，也能起指示作用。

使用前，溶剂应使用聚四氟乙烯(PTFE)膜过滤器（6.2）过滤。

* + 1. 聚苯乙烯（CAS 9003-53-6）标准样品

重均分子质量（*M*w）在2×103～2×107范围内。所用标准样品宜包含受测样品的整个分子质量范围。合适的一组聚苯乙烯标准样品示例见表1。

1. 聚苯乙烯标准样品

| 样品号 | *M*p | *M*w*/M*n | 样品号 | *M*p | *M*w*/M*n |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 1.616×107 | 1.07 | 8 | 4.736×105 | 1.02 |
| 2 | 1.162×107 | 1.07 | 9 | 2.805×105 | 1.02 |
| 3 | 6.870×106 | 1.09 | 10 | 1.394×105 | 1.03 |
| 4 | 3.039×106 | 1.05 | 11 | 7.480×104 | 1.02 |
| 5 | 2.189×106 | 1.03 | 12 | 2.877×104 | 1.02 |
| 6 | 1.390×106 | 1.04 | 13 | 1.044×104 | 1.03 |
| 7 | 7.810×105 | 1.02 | 14 | 3.090×103 | 1.04 |

* 1. 仪器
		1. 凝胶渗透色谱仪：合适的配备了6.1.1至6.1.7中规定组件的高效液相色谱仪。
			1. 溶剂瓶/储液瓶/溶剂储存器/流动相瓶，体积足够大以容纳足量的溶剂（见5.2）。一次完整的分析约需3 L的溶剂。在试验期间补充溶剂会导致溶入的空气及溶解杂质发生量的改变，从而导致折光指数发生较大的变化。一旦加入新的溶剂，需要很长时间才能获得稳定的基线。
			2. 自动在线脱气系统，避免流动相产生气泡并确保进液量稳定。
			3. 温控泵/单元泵，保证在适当温度下具有足够的溶剂进样速度。例如，35 ℃下进样速度为1.0 mL/min。
			4. 注射器。
			5. 色谱柱：天然橡胶用凝胶色谱柱，通常填装具有一系列孔径的交联聚苯乙烯凝胶刚性微球（用苯乙烯—二乙烯基苯制备）。选用不同的色谱柱，可以测定的分子量范围从2×103至大于1012。只要在测定范围内能分离不同分子量的聚合物且不受所用溶剂的不良影响，也可使用其他色谱柱填充物。安装色谱柱到色谱仪时，应确保样品首先经过最大孔径的色谱柱淋洗，最后才经过最小孔径的色谱柱淋洗。
			6. 示差折光检测器（或其他类型检测器），对所使用浓度的天然橡胶有充分的响应。
			7. 数据处理单元，用于计算所需的分子量和分子量分布。
		2. 聚四氟乙烯（PTFE）膜过滤器,孔径0.45 µm～1 µm，根据所用的色谱柱和实验室设备情况选用实际的孔径。
		3. 注射器，容量100 µL和200 µL（或更大容量）。
		4. 涡旋振荡器。
		5. 自动进样器，带有小瓶（最好使用棕色瓶）。
1. 可使用带有关联软件的自动进样器进样。
	1. 试验步骤
		1. 溶剂制备

溶剂通过聚四氟乙烯（PTFE）膜过滤器（6.2）过滤，然后在真空下脱气30 min，并应在测试前12小时完成。

* + 1. GPC色谱仪的准备

选用合适的色谱柱，宜以0.6 mL/min的溶剂流速对色谱仪进行调节，直到获得稳定的基线。色谱柱应恒温在室温10 ℃以上（30 ℃～45 ℃）。溶剂瓶应备有足够完成一次分析所用的溶剂，溶剂脱气后应在惰性气体下储存。

1. 0.6 mL/min流速仅为推荐流速,实际应用流速可依据色谱柱允许的最大流速而定。
	* 1. 数据处理单元的准备

数据处理单元（6.1.7）将检测器输出转换成数字信号，使检测通常按1 Hz至5 Hz的频率进行。如果有必要降低噪音，可将测试进行组合，以使每一测定的时间片段为1 s到2 s。

* + 1. 样品溶液的制备和注入
			1. 取0.1g左右干燥样品，加入容积为30 mL的螺口小瓶（最好为棕色）中，然后加入30 mL溶剂（5.2）。
			2. 室温下用涡旋振荡器（6.5）振动螺口瓶1 min，然后在37 ℃下保温24 h。

样品溶液应遮光保存。保温过程中可以用物品遮住螺口瓶，或者直接使用棕色瓶。

* + - 1. 用聚四氟乙烯（PTFE）膜过滤器（6.2）过滤溶液，再用注射器（6.3）吸取滤出液或将滤出液引入自动进样瓶中。

按GB/T 37498测量凝胶含量，当样品“凝胶”含量大于30 %时，应增加过滤次数。

* + - 1. 注入样品溶液并按正常的方式进行样品测定。
	1. 校正
		1. 将聚苯乙烯标准样品(5.3)溶解于事先制备好的溶剂（5.2）中，配成浓度为0.1g/L的溶液，供校正用。所用标准样品应包含受测样品的整个分子量范围。

将聚苯乙烯标准样品(5.3)在溶剂（5.2）中溶解过夜，避免振荡。振荡将降低分子量，并且增加峰宽。

* + 1. 每个标准样品均进行三次测定，每次注入量100 µL，读取峰的保留时间。取三个保留时间的平均值作为每个标准的保留时间*t*R。
		2. 用每个聚苯乙烯标准样品(5.3)的保留时间对分子量作图。一组聚苯乙烯标准样品的典型分子量校正曲线如图1所示。拟合线的相关系数应大于0.9990。如果达不到，应对引起不良校正的标准样品重复校正步骤。
		3. 色谱仪的软件使用校正曲线计算待测样品的参数。



 说明：

X— 保留时间，*t*R(min)

Y— log*M*w

1. 一组聚苯乙烯标准样品的典型校正曲线



说明：

X—保留时间，*t*R(min)

Y—示差折光检测器响应信号，mV

1. GPC色谱图示例
	1. 结果表示
		1. 如果试样溶液中BHT的保留时间与校正过程（见第8章）聚苯乙烯标准样品中的BHT保留时间相比，在±15 s范围内，则结果是理想的。如果达不到，重复第8章步骤，重新绘制聚苯乙烯标准样品的典型分子质量校正曲线。
		2. 对于每个样品溶液，都可从色谱仪自动获取如下参数：
2. 重均分子量（*M*w）；
3. 数均分子量（*M*n）；
4. z均分子量（*M*z）；
5. 多分散性（*M*w*/M*n*）；*
6. 峰值分子量（*M*p）。

此外，也可得到分子量分数对保留时间的示意图。

* + 1. 图2为天然生胶样品的色谱图。
	1. 精密度

见附录B。

* 1. 试验报告

试验报告应包括以下内容：

1. 本文件编号；
2. 识别样品所需的全部细节；
3. 所用检测器类型；
4. 试验的日期和地点；
5. 分子量分布图；
6. 试验结果及其表示单位，特别是：

重均分子质量（*M*w）；

数均分子质量（*M*n）；

多分散性（*M*w/*M*n）。

1. 所用过滤膜的孔径；
2. 试验期间出现的异常现象；
3. 不包括在本文件或引用文件中的任何操作，以及其它任何被视为可选的操作。
4.
5. （资料性）
以环己烷为溶剂和聚异戊二烯标准样品进行天然橡胶的体积排阻色谱法分析
	1. 总则

对于不是经常进行试验的实验室和/或使用四氢呋喃时碰到水分问题时，建议使用本方法。

* 1. 试验步骤

将样品溶于环己烷中（HPLC纯），按每30 mL溶剂加入120 mg的2,6-二叔丁基甲基苯酚（BHT）对溶液进行稳定，BHT在试验中也起到内标物的作用。将溶液在30 ℃下停放14天，每天缓慢搅拌1小时。

* 1. 仪器

仪器由常规的凝胶渗透色谱系统组成，包括脱气机、泵系统、进样器、色谱柱、色谱柱温箱和检测器。

室温下，天然橡胶溶液会阻塞凝胶渗透色谱仪的色谱柱，因此有必要使用色谱柱温箱进行加热。使用环己烷时，色谱柱温箱的温度必须为65 ℃，以避免由于环己烷溶剂非常低的极性造成的吸附现象。

为了分离聚异戊二烯长链，建议使用20 µm孔径的色谱柱。因为天然橡胶分子量分布非常宽（103～1012），色谱柱需具有相当大的分离范围。

由于环己烷无需稳定，可以使用220 nm的紫外检测，这样就比折光率检测更灵敏。建议样品浓度在0.2 mg/mL左右，以克服黏度效应和避免橡胶大分子受到过度的剪切作用。也可在检测系统中安装光散射检测器或黏度计以获得额外的支化信息—这一项重要的天然橡胶参数。

* 1. 校正

以环己烷为溶剂时，需用聚异戊二烯标准进行校正。

1. 因为使用聚异戊二烯标准进行校正会导致分子量的高估（大约为原值的2倍），因此有必要进行普适校正或使用合成聚异戊二烯或天然聚异戊二烯的Mark-Houwink系数进行分子量转换。

聚异戊二烯标准完全溶解后，在17 ℃下以35000 g的离心力将溶液离心1 h。通过称量干燥后的离心残渣确定凝胶量。

将离心后的溶液稀释至0.2 mg/mL，静置24 h，然后用孔径1 µm的一次性玻璃纤维过滤器过滤以除去微凝胶，再注入色谱柱。

1. （资料性）
精密度
	1. 总则

2023年按ISO 19983的6.7.1中方法A组织了实验室间试验方案（ITP），评估了1型精密度。

有3家国内实验室参与了ITP的试验工作。ITP采用2种天然生胶（样品1、样品2）。这些实验室在两日一组试验的每日进行了三次重复测定。每一试验日相隔一周。

* 1. 精密度结果

表B.1列出了精密度结果。采用ISO 19983所述的离群值剔除程序获得这些结果。

1. 重复性：在正常和正确地操作本试验方法下，用标称相同材料的样品得到的两次试验平均值之差，平均每20次不多于1次超过表B.1所列的日内重复性。
2. 日间重复性：在正常和正确地操作本试验方法下，用标称相同材料的样品得到的两次试验平均值之差，平均每20次不多于1次超过表B.1所列的日间重复性。
3. 再现性：在正常和正确地操作本试验方法下，用标称相同材料的样品在两个实验室得到的两次独立测定的试验平均值之差，平均每20次不多于1次超过表A.1所列的再现性。
	1. 天然生胶重均分子量测定精密度数据

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **材料** | **平均值** | **实验室内，日内** | **实验室内， 日间** | **实验室间** | **实验室数量** |
| ***s*r** | ***r*** | **(*r*)** | ***s*rD** | ***r*D** | **(*r*D)** | ***s*R** | ***R*** | **(*R*)** |
| 样品1 | 2120094 | 11435 | 32360 | 2 | 13577 | 38422 | 2 | 92357 | 261370 | 12 | 3 |
| 样品2 | 2228324 | 14239 | 40298 | 2 | 15870 | 44913 | 2 | 33162 | 93848 | 4 | 3 |
| *s*r——实验室内标准差；*r* ——重复性（以测定单位表示）；（*r*）——相对重复性（以百分数表示）；*s*rD——日间重复性标准差；*r*D——日间重复性（以测定单位表示）；(*r*D)——相对日间重复性（以百分数表示）；*s*R——实验室间标准差；*R*——再现性（以测定单位表示）；（*R*）——相对再现性（以百分数表示）。 |

参考文献

[1] BONFILS, F.: GPC/SEC of natural rubber, *Encyclopedia of chromatography*, Ed. J. Cazes, Dekker, p.541 (2001)

[2] ISO 19983 Rubber — Determination of precision of test methods

