

Viscotek系列专题

- 高分子和分子量

Mw, Mn, Mz, PD

R_g , R_h , $\ln V$, dn/dc

高分子/蛋白质结构, 构象, 缔合,
共聚物组成

○ ○ ○



宁辉

Hui.ning@malvern.com.cn

Malvern Instrument

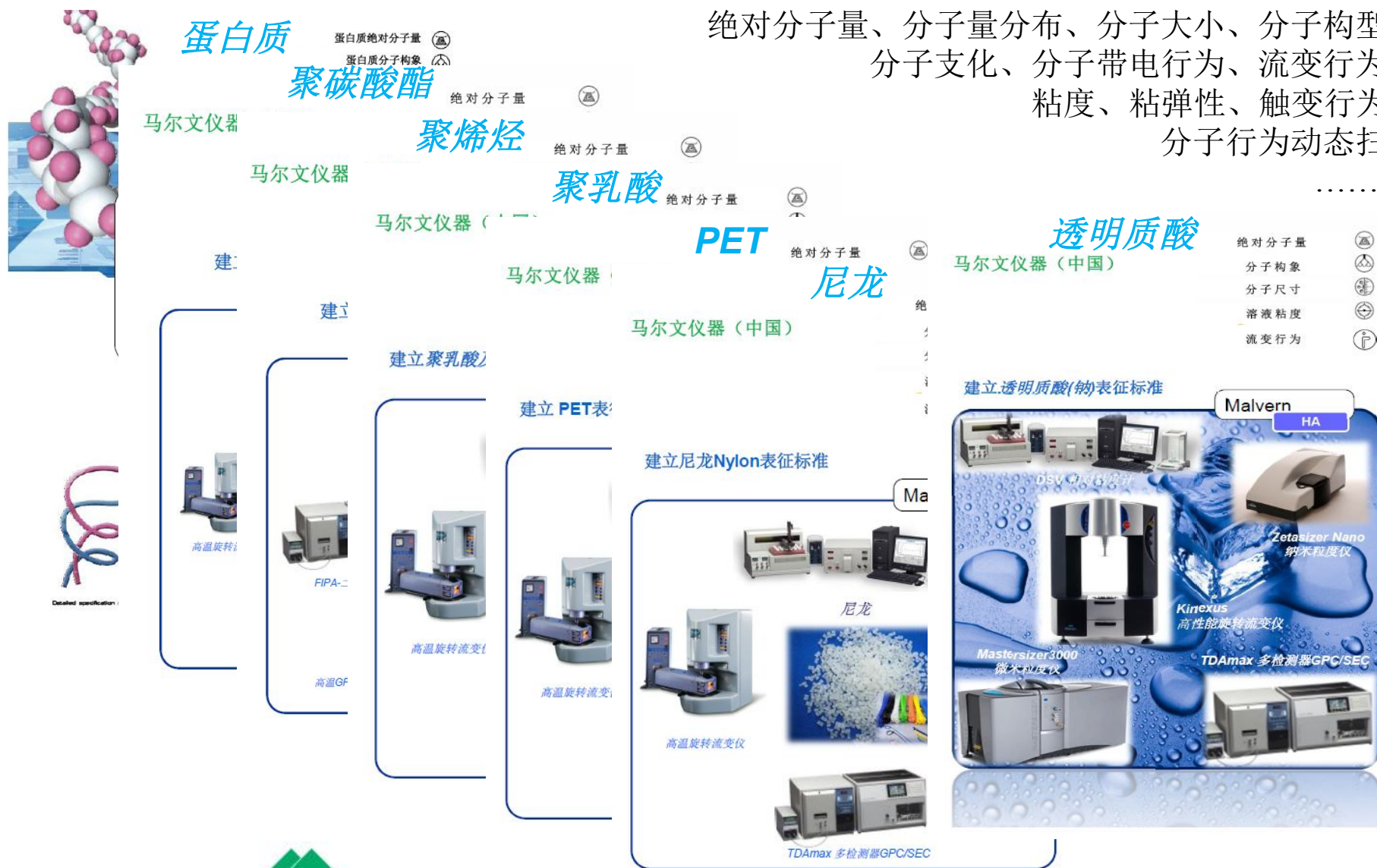


随着公司发展，马尔文仪器不断推出创新技术和杰出的检测系统。目前马尔文公司产品覆盖颗粒粒度表征，颗粒和表面电位表征，颗粒形貌表征，大分子分子量及其分布表征，流体行为表征等等领域。主要产品包括：

- Zetasizer Nano系列纳米粒度/zeta电位仪（动/静态光散射、电泳光散射）
- Mastersizer系列激光粒度仪（激光衍射法）
- Viscotek 多检测器凝胶渗透色谱GPC/SEC
- Viscotek DSV 毛细管电子相对粘度计
- Kinexus、Bolin系列 旋转、毛细管流变仪
- G3、FIPA（干/湿法图像分析仪）

马尔文先进检测技术综合解决方案

绝对分子量、分子量分布、分子大小、分子构型、
分子支化、分子带电行为、流变行为、
粘度、粘弹性、触变行为
分子行为动态扫描



Viscotech, a Malvern Company



Viscotech Headquarters, Houston, Texas

Viscotech 总部, 休斯顿

Malvern 总部, 英国

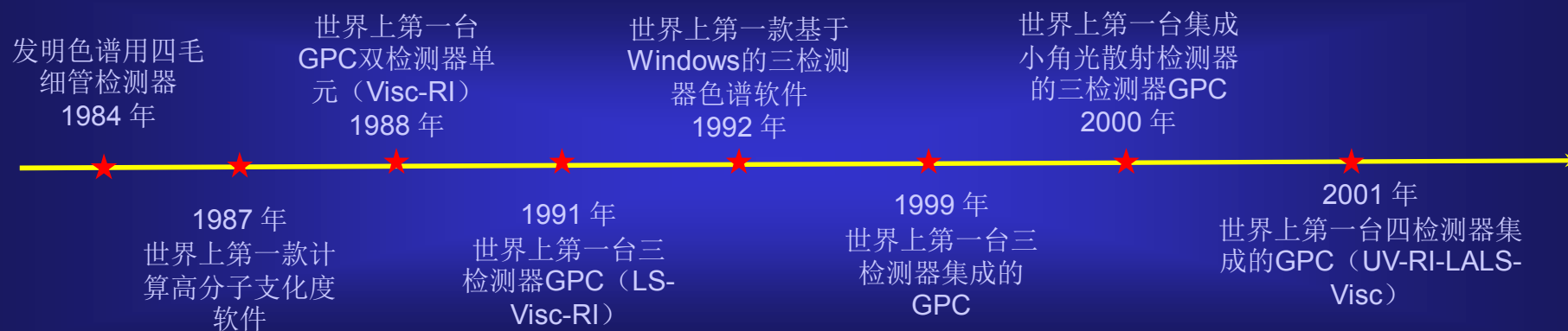


Viscotech, a Malvern Company



Viscotech Headquarters, Houston, Texas

Viscotech 总部,
Houston, Texas



Viscotek（马尔文公司）提供：

在中国：

400免费售后电话、2 个大型应用实验室（SH BJ）

6个办事处 (SH BJ GZ CD WH X'A)、2 0 个应用和售后工程师

有机相、水相色谱柱和标准样品适用于传统

校正、普适校正、光散射检测；

OmniSEC工作站软件进行系统控制，检

测器信号收集、数据处理

整套由Viscotek生产的GPC / SEC

分离，检测系统

Viscotek公司（马尔文子公司）提供：

- ▶ 整套由Viscotek生产的GPC分离，检测系统（包括自动/手动进样器，泵，真空除气装置，RI，UV/PDA，在线粘度，光散射检测器）
- ▶ 完整的软件系统OmniSEC，对于所有构件进行系统控制，检测器信号收集，和数据处理
- ▶ 各种普通及其特种色谱柱和各种分子量标准样品
- ▶ 色谱方法建立，客户服务
- ▶ 在中国设有四个分公司进行客户服务



Contents

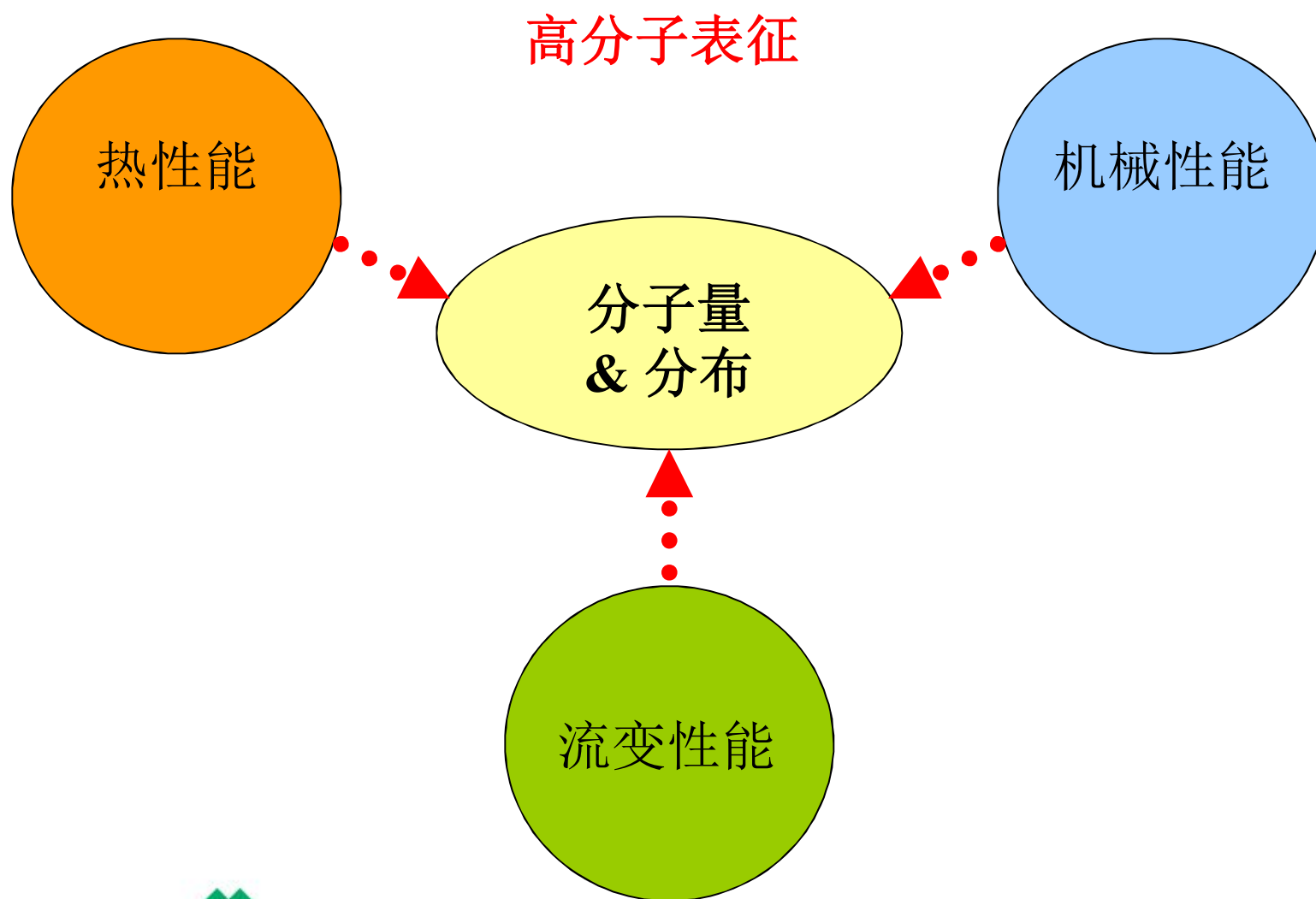
► Introduction

- 高分子和分子量

► GPC原理和检测器

► 应用

Introduction



Introduction

polymer 缘于希腊文字组合 *poly* 和 *meros*, 含义是 “many parts.”

自然高分子 vs. 合成高分子

Cellulose (纤维素)

Polysaccharides (多糖)

Starches (淀粉)

Proteins (蛋白质)

.....

Polyethylene (聚乙烯)

Nylon (尼龙)

PET (聚对苯二甲酸乙二醇酯)

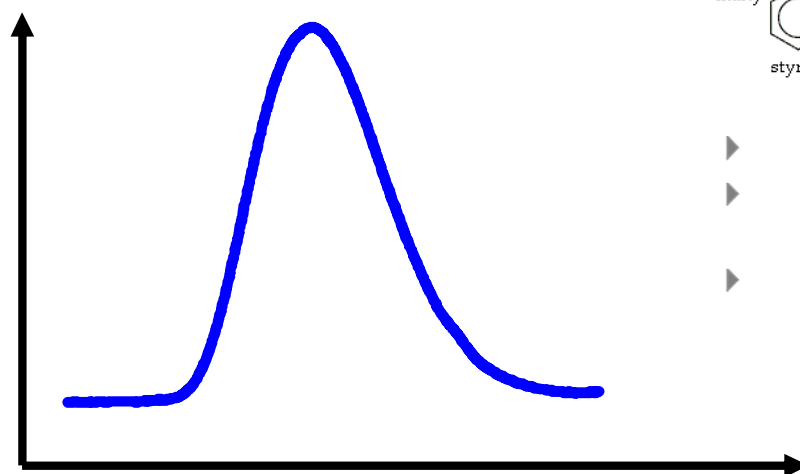
Polystyrene (聚苯乙烯)

.....

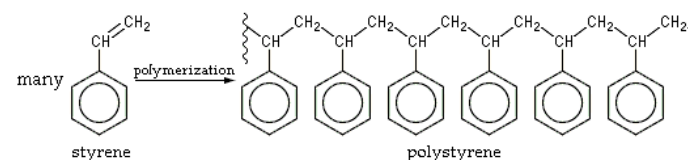
分子量

- ▶ 当然，不是所有的高分子链的长度（或分子量）都相同，因此就会有**一个分子量分布**
- ▶ **分子量分布的形状**对于高分子的性能有很大影响

高分子含量
(分子数量)



链长 (分子量)



- ▶ 一个苯乙烯单体的分子量是104 Da (or g/mol)
- ▶ 一个聚苯乙烯高分子的分子量为 $(104 \times n)$, $n = 2, 3, 4, 5, \dots, n$
- ▶ 每一个高分子（高分子链）可以有不同的长度，因此不同的分子量

计算分子量分布积聚

Number Average (Mn)

数量分布

$$\overline{Mn} = \frac{\sum c_i}{\sum c_i / M_i}$$

Weight Average (Mw)

重量分布

$$\overline{Mw} = \frac{\sum M_i c_i}{\sum c_i}$$

z-Average (Mz)

Z-均分布

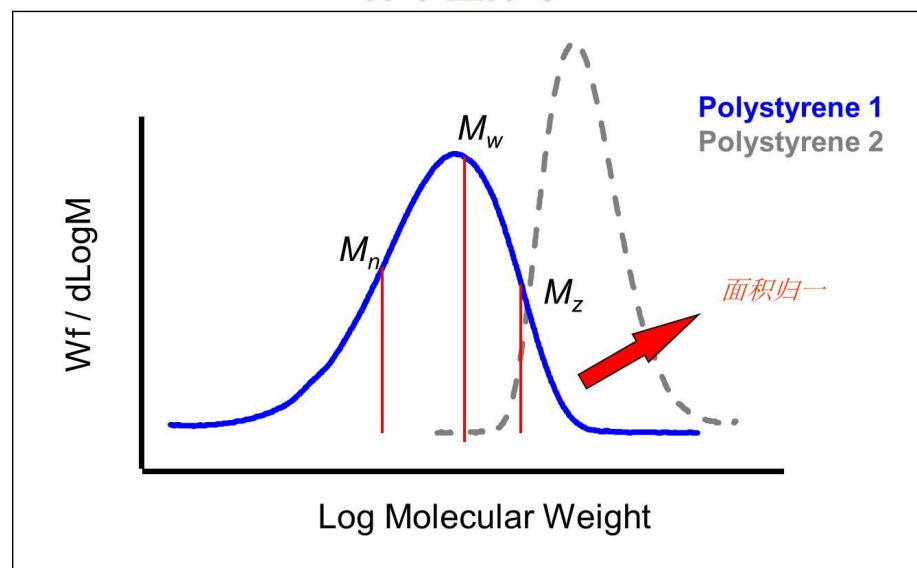
$$\overline{Mz} = \frac{\sum M_i^2 c_i}{\sum M_i c_i}$$



Polydispersity
(多分散性)

$$(Pd) = Mw/Mn$$

分子量分布



分子量分布

单分布高分子	$M_w/M_n = 1.00$
窄分布高分子	$M_w/M_n < 1.20$
适中分布高分子	$M_w/M_n < 2.00$
宽分布高分子	$M_w/M_n > 2.00$

分子量分布

 M_n

对小分子敏感

1. Thermodynamic
2. End group influence

平均分子量 M_w 对高分子性能的影响

 M_w

对大分子敏感

1. Bulk properties
2. Toughness

 M_z

对大分子特别敏感

1. Viscoelastic properties
2. Melt Viscosity

<i>MW Average</i>	<i>Method</i>	<i>MW Range</i>
<i>Mn</i>	End Group Analysis	$< 10^4$
	Membrane Osmometry	$\sim 10^4 - 5 \times 10^5$
	Vapor Pressure Osmometry	$< 5 \times 10^4$
	Ebulliometry	$< 10^4$
	Cryoscopy	$< 10^4$
<i>Mw</i>	Light Scattering	$10^3 - 10^7$
	Ultracentrifugation	$10^3 - 10^7$
<i>Mv</i>	Viscometry	$> 10^2$
<i>Mz</i>	Ultracentrifugation	$10^4 - 10^7$

至少需要两种以上方法，才能得到分子量分布的信息

GPC 可以通过一个测试得到整个分子量分布!

Contents

► Introduction

- 高分子和分子量

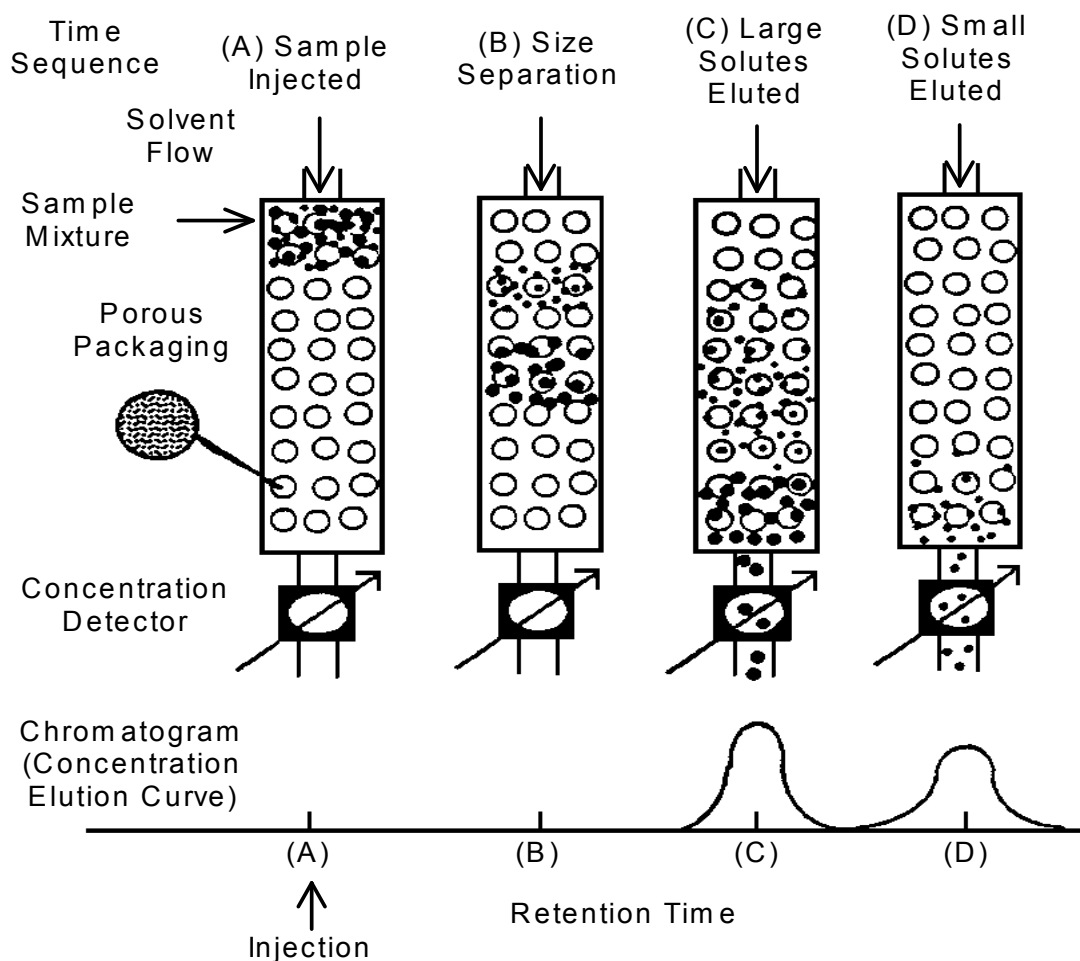
► GPC原理和检测器

► 应用

GPC - Gel Permeation Chromatography

Gel Permeation Chromatography (GPC), 也称为 Size Exclusion Chromatography (SEC) 或者 Gel Filtration Chromatography (GFC), 是一种根据尺寸分离高分子材料的色谱技术。

GPC 柱子分离基于分子大小而不是分子量 Mw



和HPLC不同,
GPC柱分离不
需要化学相互
作用

GPC 完全依赖
于物理分离原
理

GPC - Gel Permeation Chromatography

当样品从色谱柱中洗脱出来，使用一个或者多个检测器对其进行检测。通过

传统校正曲线 - Conventional Calibration,
在线粘度检测器 - Universal Calibration
或者三检测器连用 - Triple Detection

得到不同物理参数的分布，比如分子量，分子尺寸 R_g 和 R_h ，特性粘度 *intrinsic viscosity*，同时还有高分子结构，构象，缔合，共聚组成的信息。

GPC 技术

- 传统校正曲线 - Conventional Calibration 使用一个浓度检测器和一个校正的GPC柱子，提供相对分子量Mw和分散程度polydispersity (PD)
- 粘度检测器联用 - 使用粘度检测器，浓度检测器和校准的GPC柱子，提供真实分子量true molecular weight, 分子尺寸size, 特性粘度intrinsic viscosity以及构像 conformation, 缔合aggregation和枝接度branching信息
- 三检测器连用 - Triple Detection 使用光散射检测器, 粘度检测器和浓度检测器提供绝对分子量absolute molecular weight, 分子尺寸size, 特性粘度intrinsic viscosity, 以及构像 conformation, 缔合aggregation和枝接度branching信息

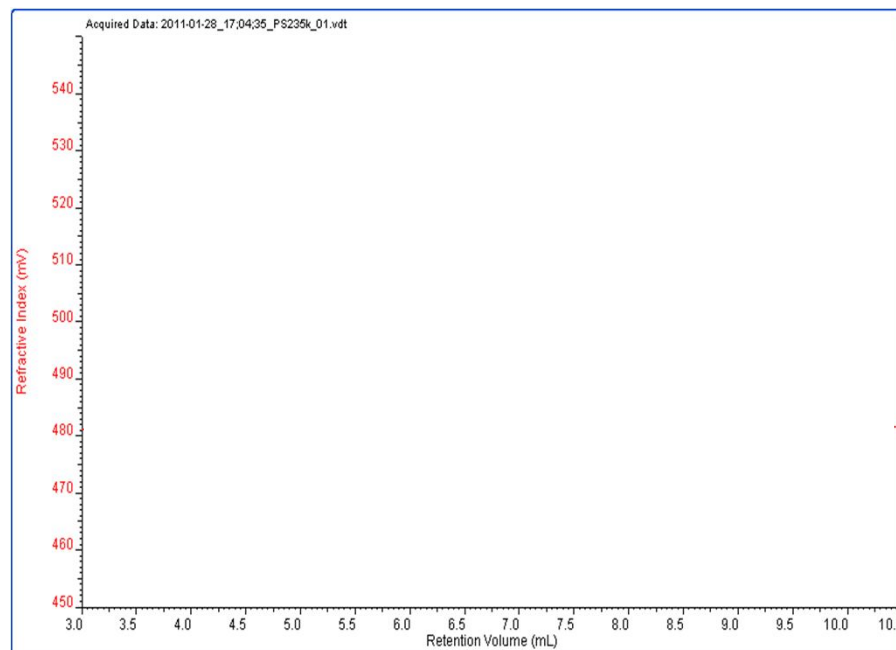
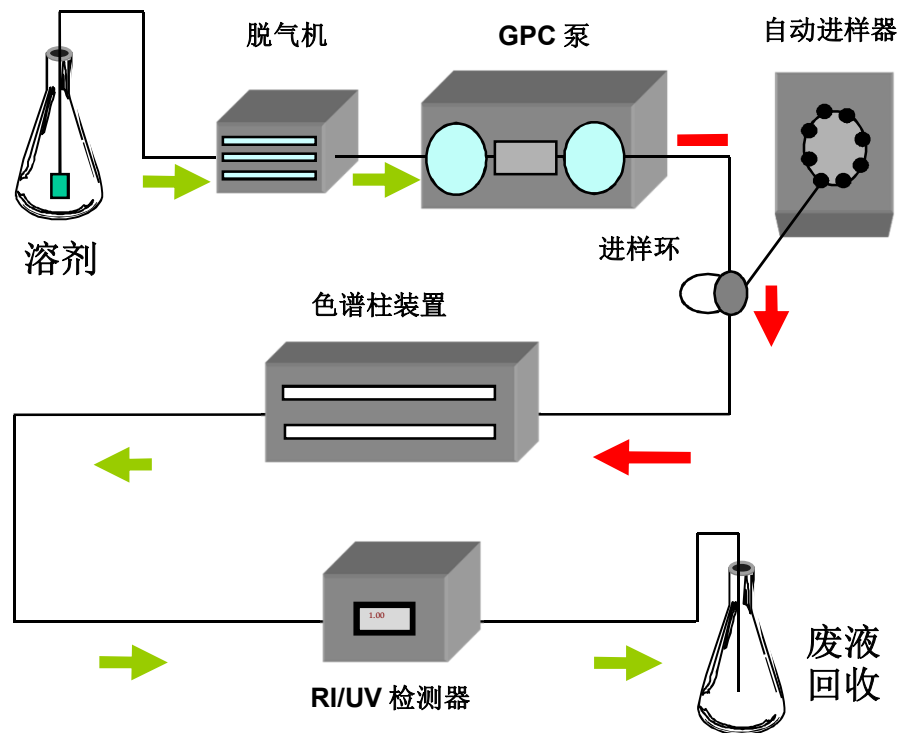


GPC – 传统校正

传统校正或者传统GPC, 是最简单的GPC形式。使用一个浓度检测器, 最常用的如折光指数RI或者紫外吸收UV, 和一个使用标准分子量样品校正过的GPC/SEC柱子, 检测相对分子量和分子量分布



传统校正GPC硬件配置示意图

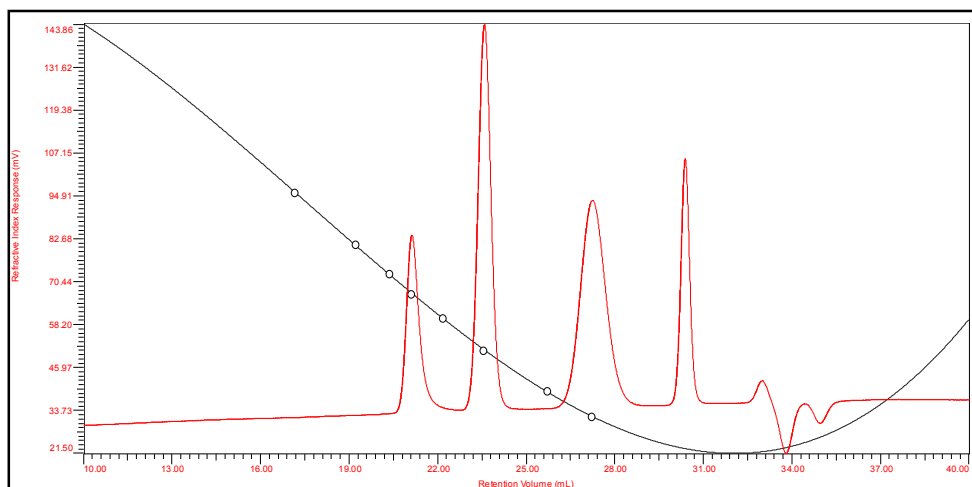


RI 信号 ———

→ 低压力
→ 高压力

GPC传统校正曲线检测

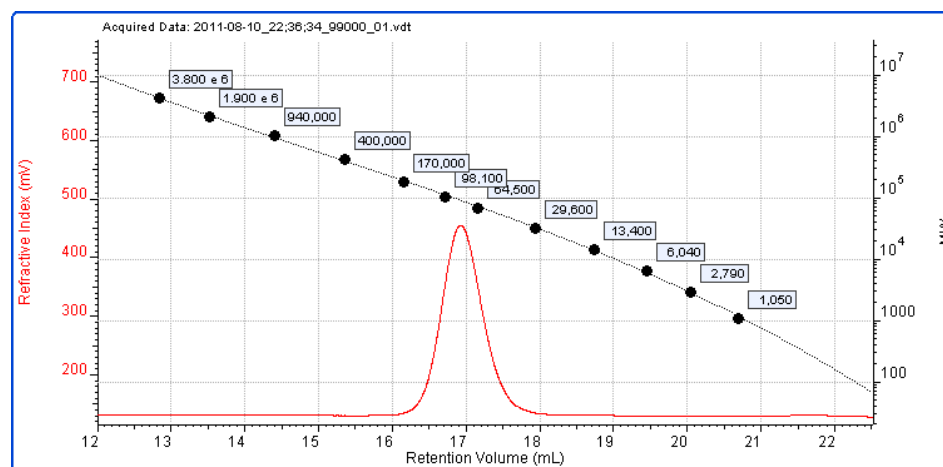
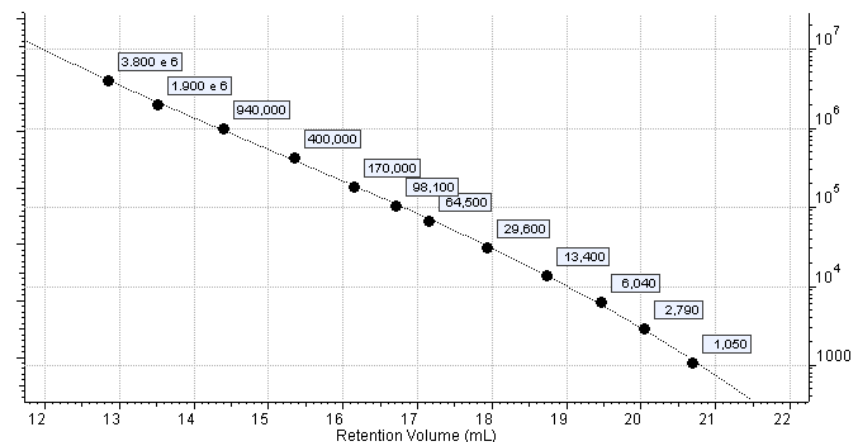
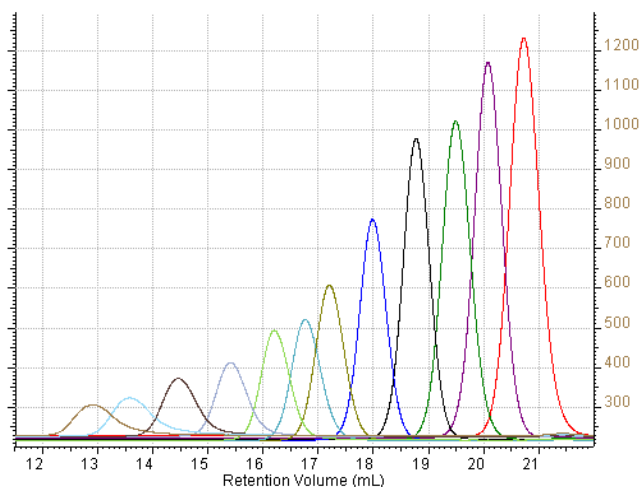
- ▶ 使用传统的 RI 或者 UV/VIS. 浓度检测器
- ▶ 需要高分子标准样品得到一条分子量对应流出时间的校正曲线.
- ▶ 基于传统校正曲线, 可以得到分子量和分子量分布.



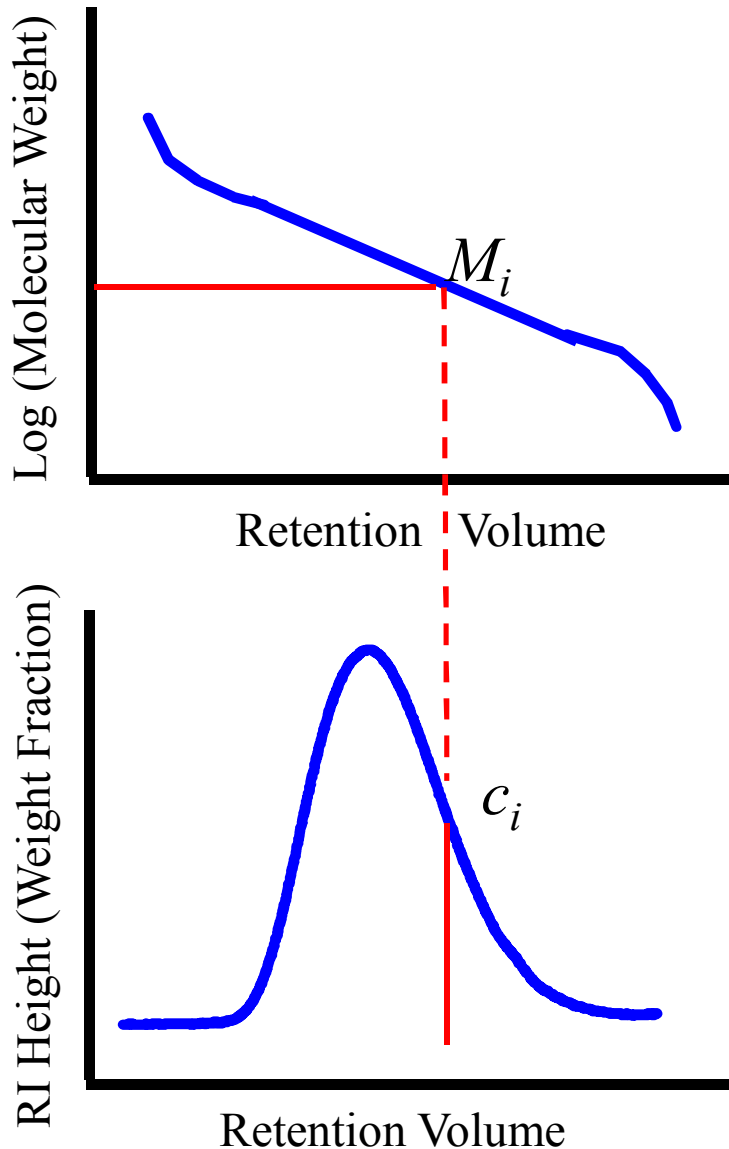
GPC传统校正曲线检测

一系列标准物

使用最合适的数学拟和



使用校正曲线得到每一个流出组分相对分子量信息



Weight Average (Mw)
(Average Molecular Weight)

$$\overline{Mw} = \frac{\sum M_i c_i}{\sum c_i}$$

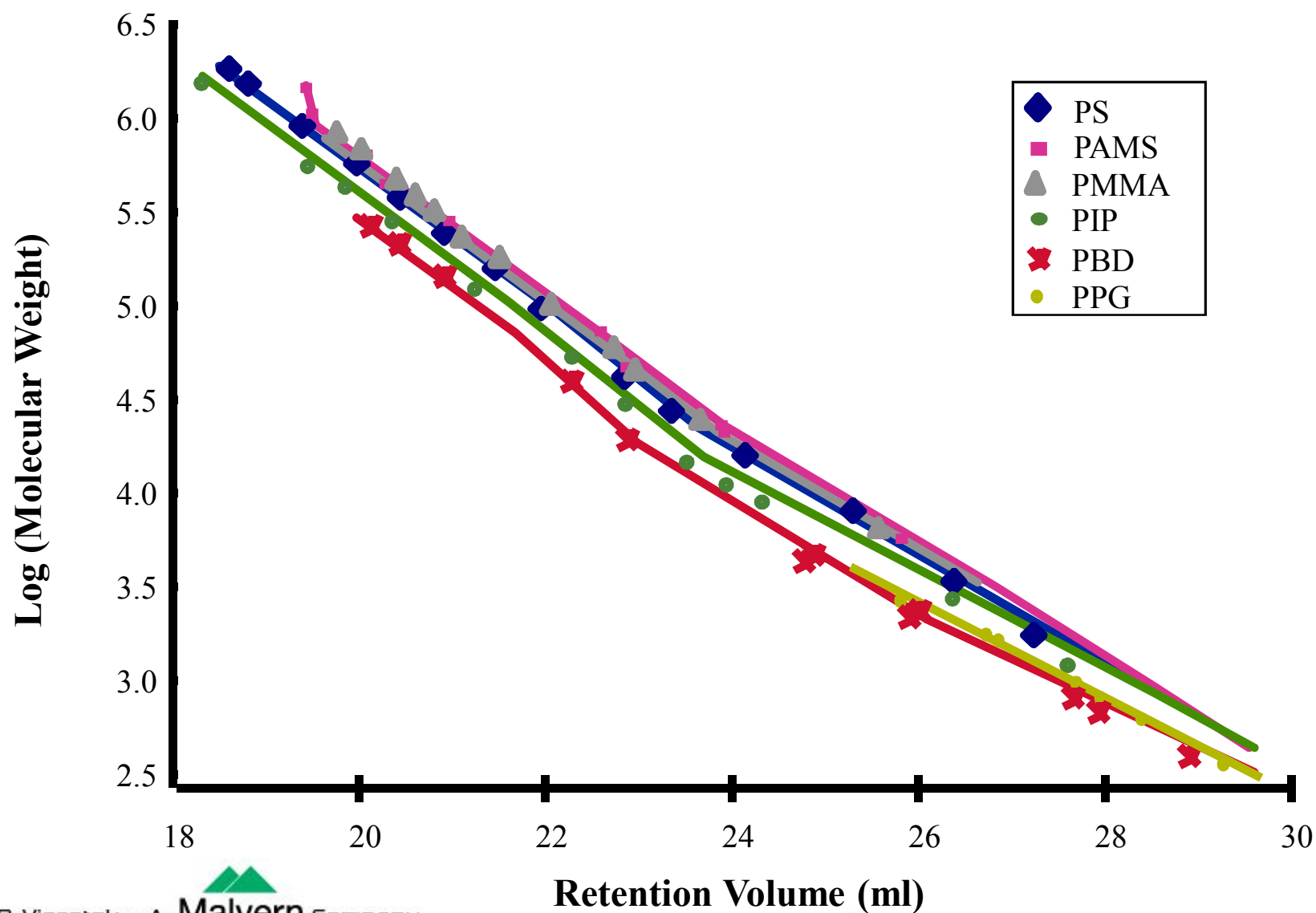
Number Average (Mn)
(Weights Low Molecular Weights)

$$\overline{Mn} = \frac{\sum c_i}{\sum c_i / M_i}$$

z-Average (Mz)
(Weights High Molecular Weights)

$$\overline{Mz} = \frac{\sum M_i^2 c_i}{\sum M_i c_i}$$

Overlay of Conventional Calibration Curves



GPC – 传统校正

传统校正优点

- 1) 简单，便捷，广泛使用
- 2) 相对便宜.

传统校正缺点

- 1) 检测样品只有和标样为相同物质分子量才准确。

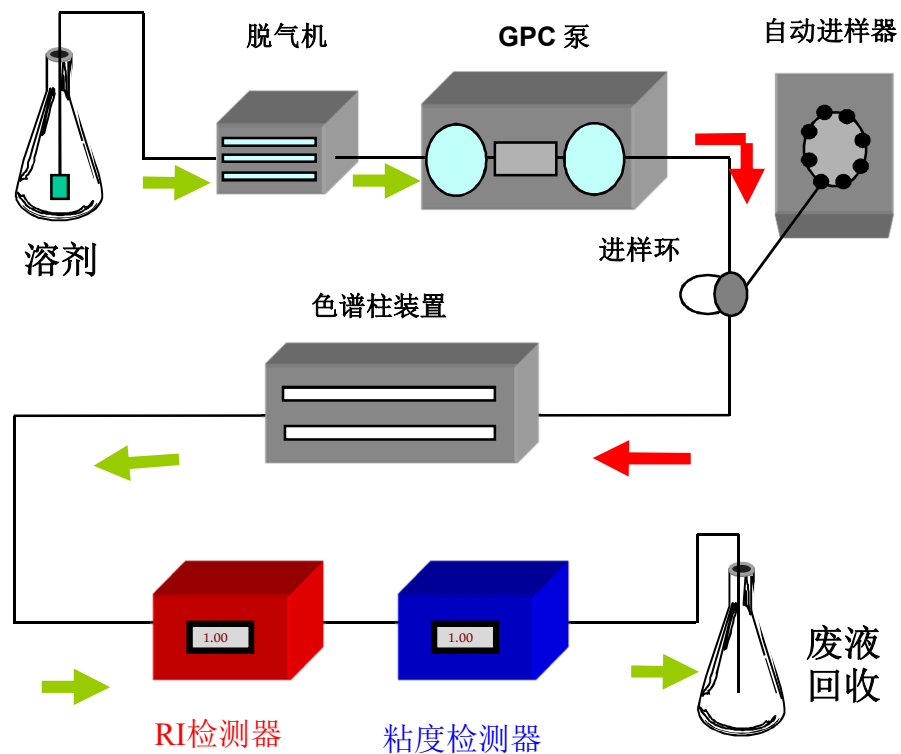
Example: PS vs. PS, PMMA vs. PMMA

- 2) 忽略结构差异。所有的标样和样品都假想为线性结构。不考虑支链，缔合和其他结构修饰。

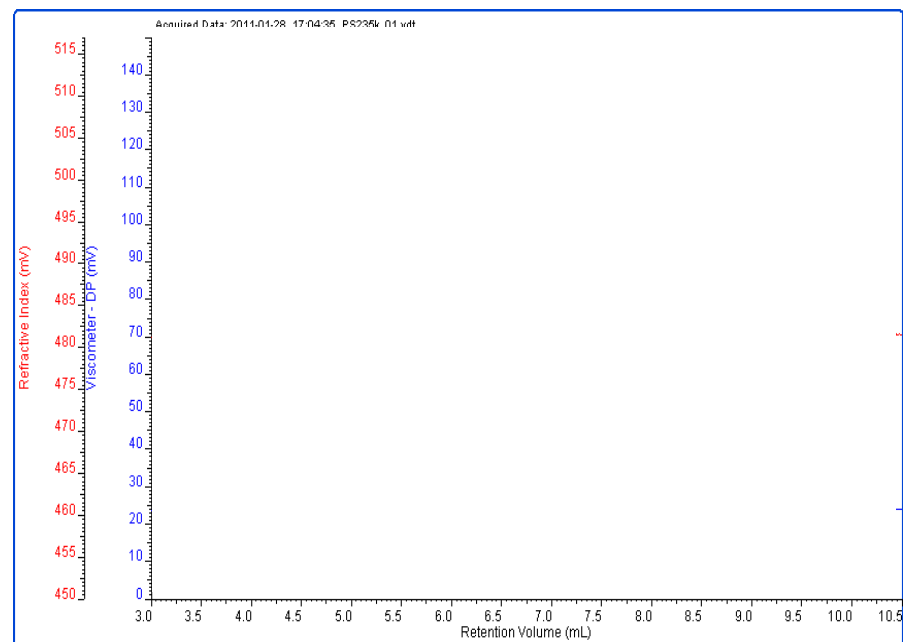
GPC – 在线粘度计

通用校正除了需要一个浓度检测器外，还需要一个附加的差动粘度计1983年Dr. Haney 发明了在线四毛细管粘度计使得通用校正成为现实。

GPC粘度检测器硬件配置示意图



→ 低压力
→ 高压力

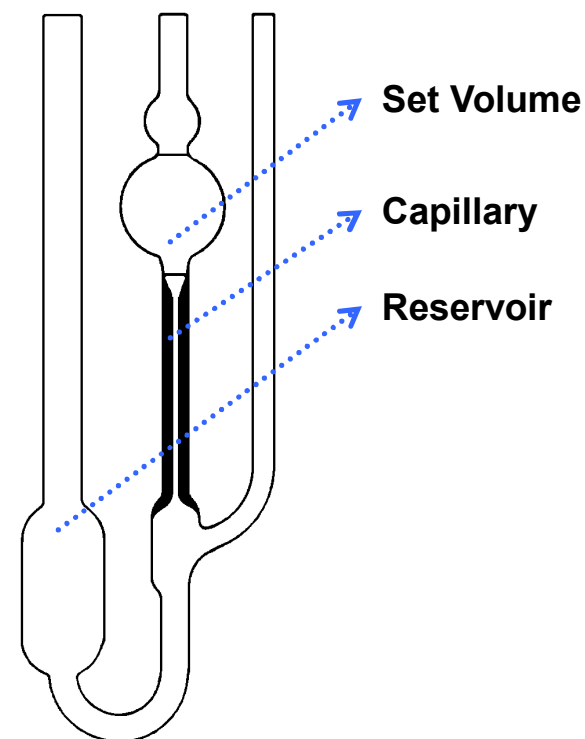
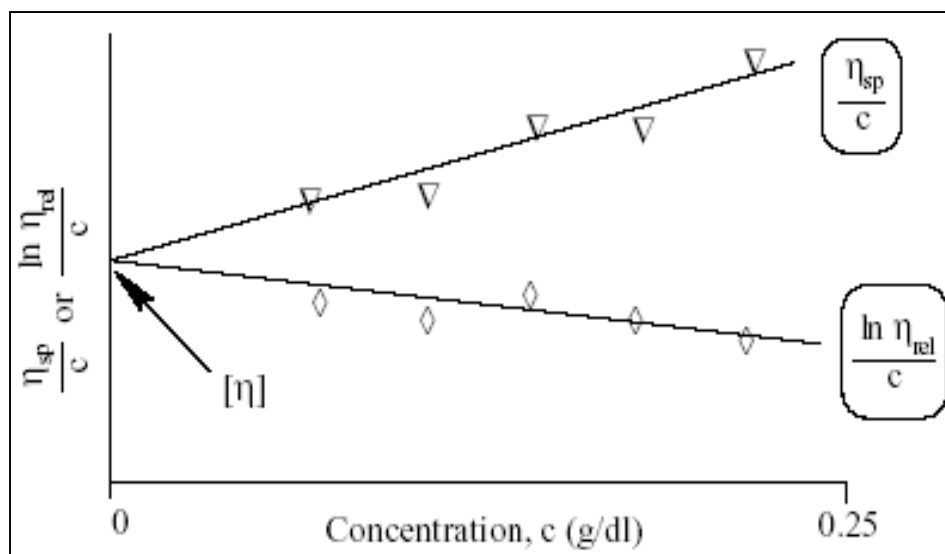


示差信号 ————
粘度信号 ————

溶液粘度测定法

► 使用玻璃毛细管粘度计:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad \eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0}$$



$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \equiv \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\ln \eta_{rel}}{c}$$

结构变化对于特性粘度的影响

1. 构象

如果高分子为自身折叠结构，那将具有较高密度，导致较低特性粘度IV。这可由于较强的分子内吸引作用（如：分子内氢键）或者不良溶剂产生。

2. 链长

随着链段长度增加，高分子链密度下降。这导出了著名的联系分子量（~链长）与特性粘度IV的Mark-Houwink方程。

$$[\eta] = KM^a$$

3. 链的柔韧性

一个刚性链将产生一个低密度的线团构象，意味着高IV。

4. 聚集，缔合

不溶解的高分子密度非常高，因此IV很低。

5. 支链化

支链高分子结构更加紧密，具有更高密度，较低IV。

6. 大小（流体力学半径 R_h ）

$$IV \times \frac{M_w}{N_A} = \frac{5}{2} \times V_h = \frac{5}{2} \times \frac{4}{3} \pi R_h^3 \quad N_A \text{ is Avogadro's No.}$$

长链 vs 枝接 – 定性

Molecular Size in Solution

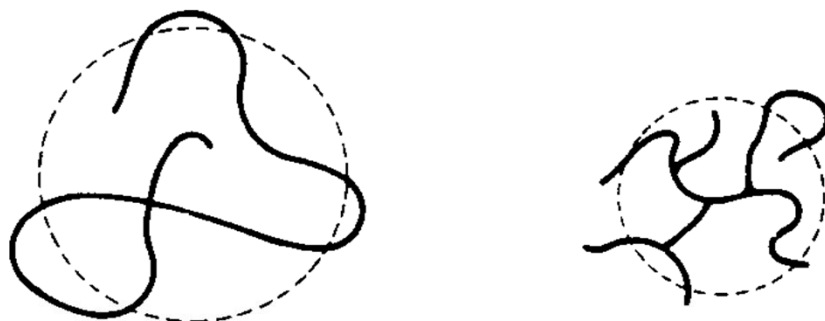
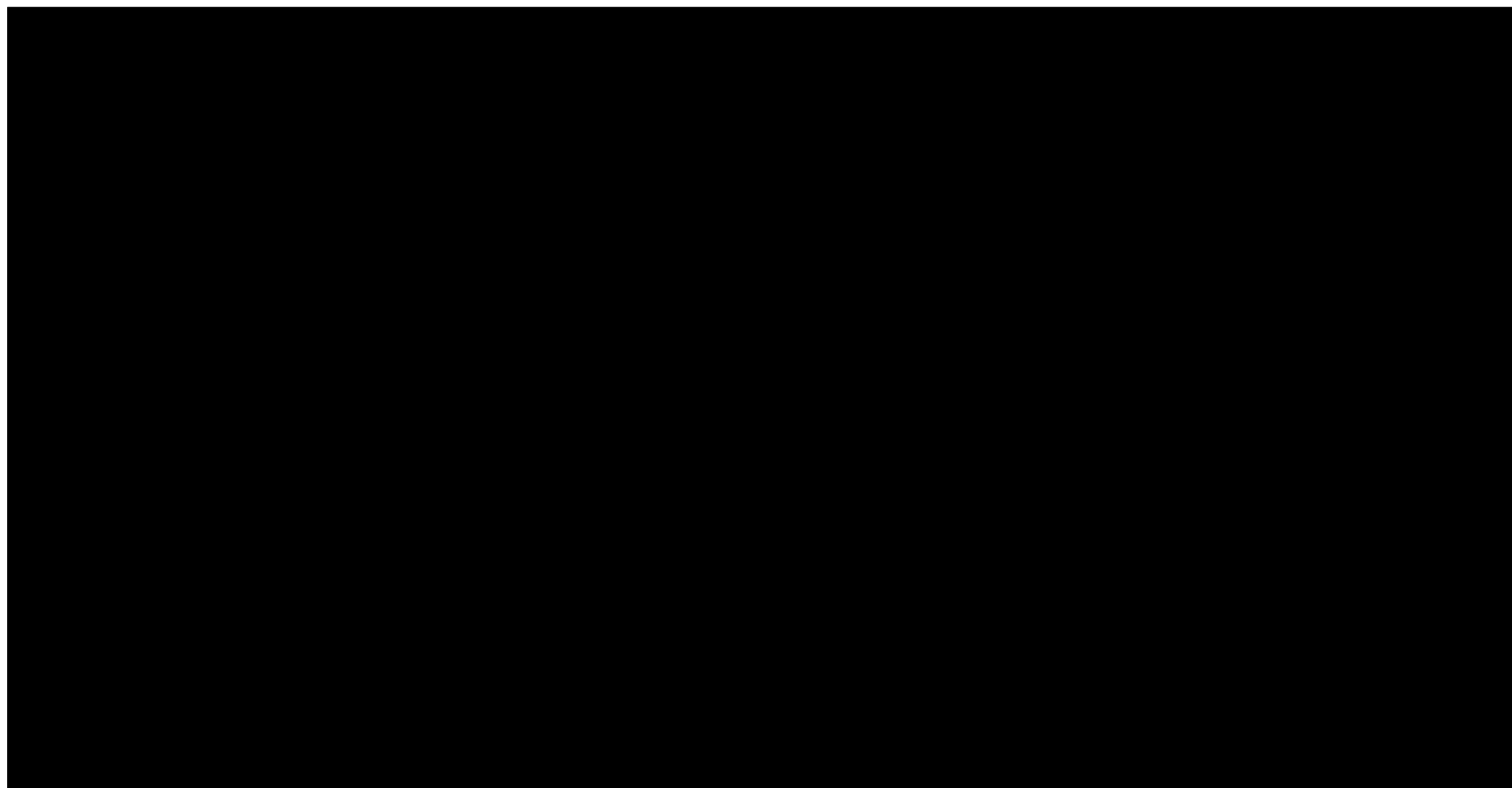


FIGURE 1.

Illustration of the difference in pervaded volume between a linear chain and a branched chain with the same total chain length.

因为具有相同分子量，较小的流体力学体积意味着较高密度。较高的密度意味着较低的特性粘度。

长链 vs 枝接 – 定量



粘度检测器的优点

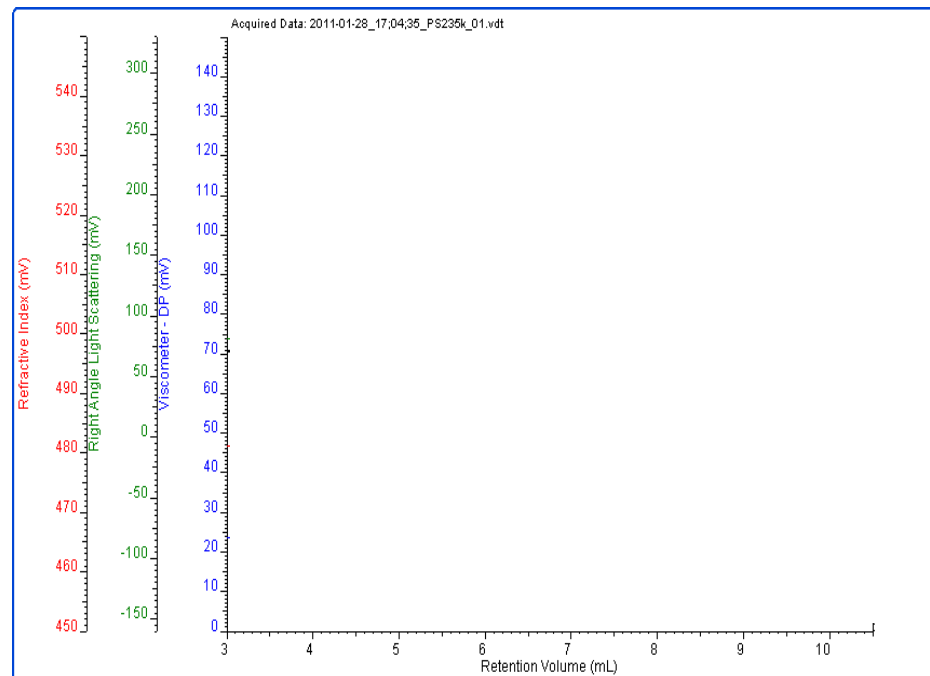
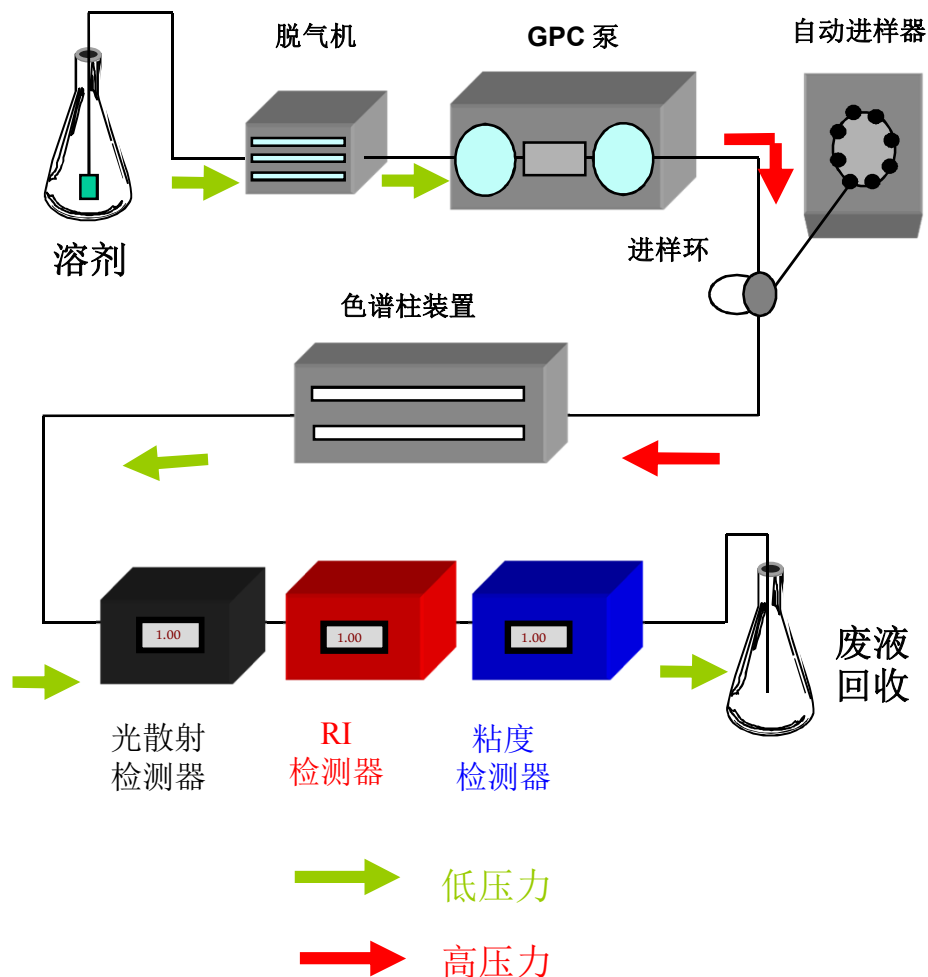
1. 通用校正提供了除光散射检测外，唯一的一种检测真实分子量的实用方法
2. 粘度检测器提供了其他的附加信息，如结构，构象，缔合，枝接，这些都是传统校正所不能提供的

GPC – 三检测器连用

三检测器成为一种首选的方法来表征自然和合成高分子以及蛋白质。这种方法结合了浓度检测器，粘度检测器和光散射检测器，在一个GPC/SEC测试过程中提供绝对分子量，分子尺寸和特性粘度，同时提供结构，构象，缔合和枝接的信息。

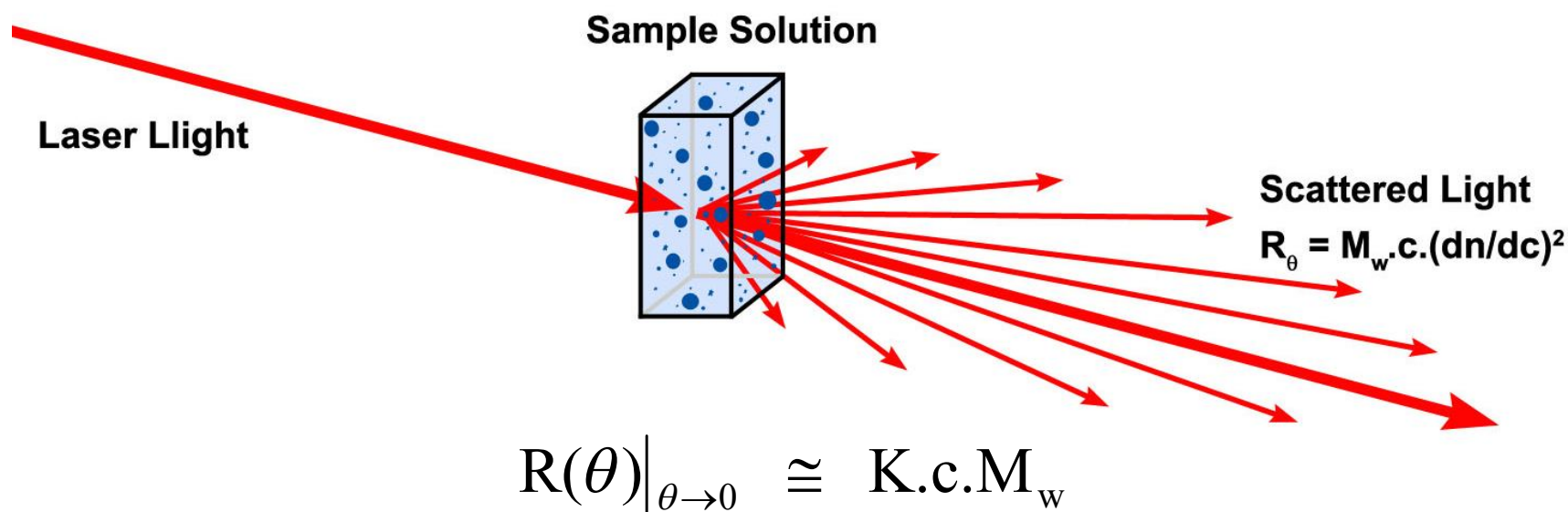


GPC三检测器硬件配置示意图



示差 信号 ————
 粘度 信号 ————
 直角光散射 信号 ————
 小角光散射 信号 ————

静态光散射原理

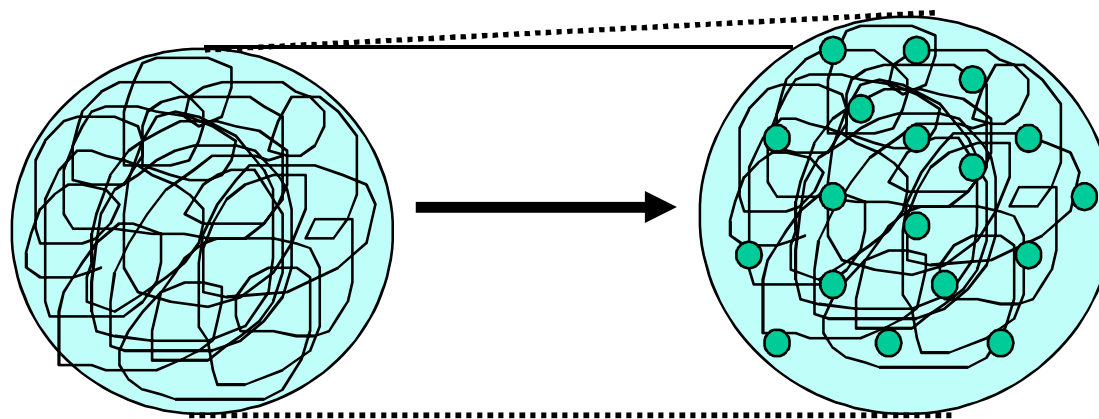


- $R(\theta)$ is the excess Rayleigh scattering ratio that would be obtained at detector angle of zero.
- c is the Polymer Concentration in Solution
- M_w is the ABSOLUTE Weight Average Molecular Weight
- K is an Optical Constant $\sim (dn/dc)^2$

在线光散射检测器

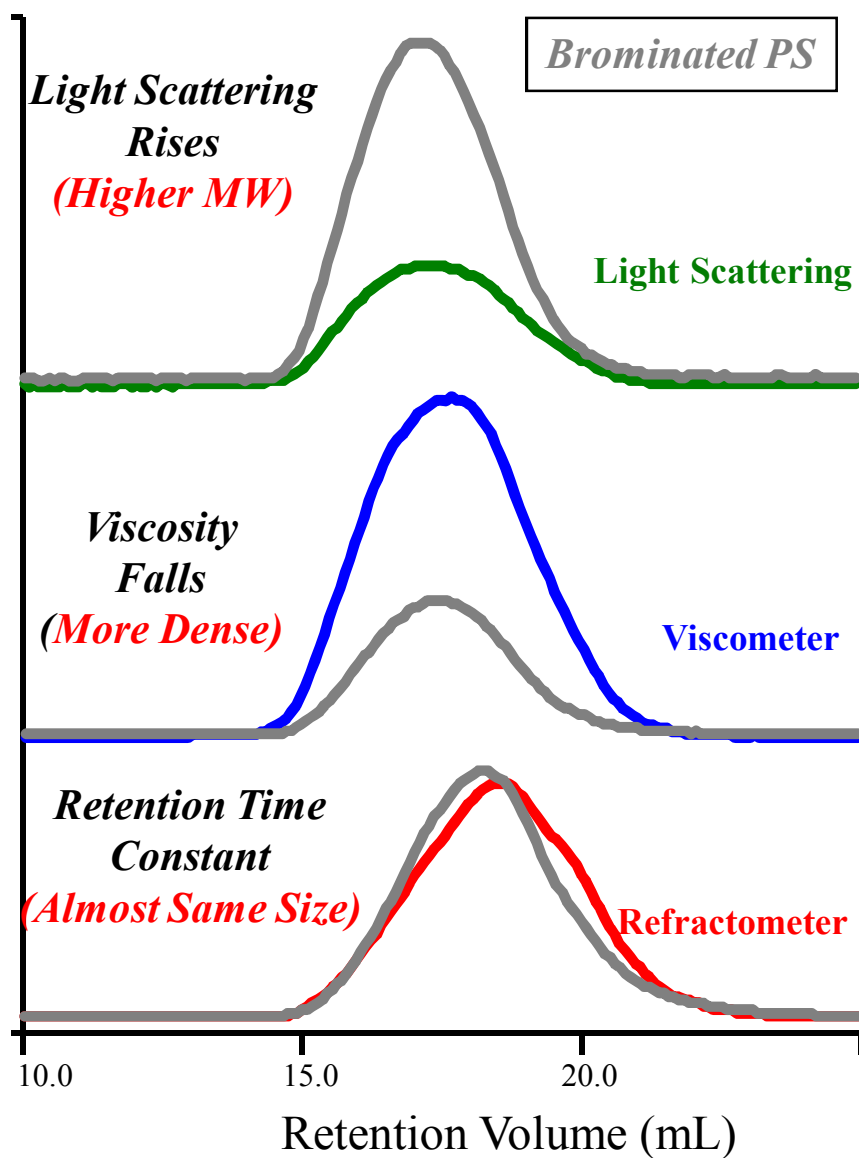
- ▶ 绝对分子量，不依赖于流出时间
- ▶ 均方旋转半径 Radius of Gyration, R_g
- ▶ 第二维利系数, A_2
- ▶ 构象分析 (Log R_g vs. Log MW)

聚苯乙烯溴化



M (g/Mole)	: 明显增长
$V_h \cong Rg^3$ (L/Mole)	: 微小增长
Density (g/L)	: 明显增长

聚苯乙烯溴化影响



聚苯乙烯溴化是一个三检测器应用的经典例子。传统色谱技术无法分别溴化聚苯乙烯(620,000)和线性聚苯乙烯(250,000)的区别。但是对于光散射检测器和粘度检测器，溴化后信号将有显著不同。

结构修饰

三检测器连用可以直接检测高分子结构的变化。由于同时检测特征粘度和分子量，信息的可靠性得以增加。

三检测器连用优点

- ▶ 光散射检测器提供绝对分子量不需要色谱柱校正
- ▶ 粘度检测器提供特性粘度同时提供结构信息，如构型，链的刚性，链的枝化程度，聚集
- ▶ 如果光散射检测器不适合应用（或没有配置），通用校正提供真实分子量
- ▶ 对于**Radius of Gyration (R_g) > 10 nm**的高分子可检测 **R_g** ；可检测任意尺寸的高分子材料的 **Hydrodynamic Radius (R_h)**

GPC/SEC方法总结

通过一个色谱测试得到

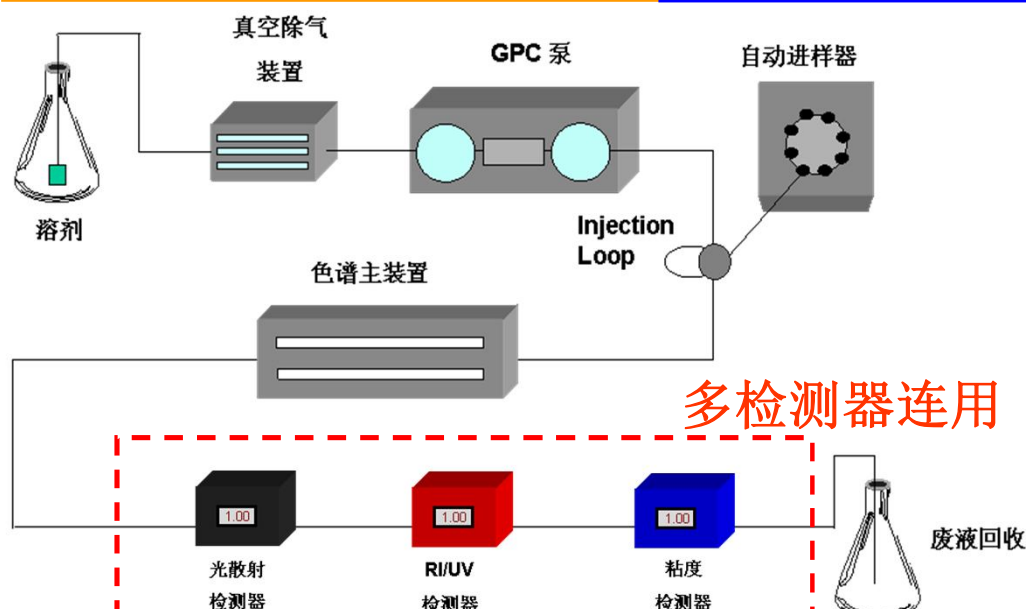
- 标准样品需要与待测样品具有相似或者相同的化学结构才能得到较为正确分子量，且为相对分子量(M_n, M_w, M_z)
- 使用简单，相对便宜
- 有大量的历史数据

- 需要7-13个标准样品
- 需要进行冗长的标准曲线检测
- 标准曲线必须覆盖待测样品的流出时间

- 得到特征粘度[IV]
- 校正曲线不依赖于高分子标准物种类可以得到真实分子量
- 得到高分子的结构信息，如支化，粒径大小(R_h 可小于1nm)
- 得到Mark-Houwink曲线K和 α 值， α 代表分子量构象信息
- 可检测光散射信号很弱的样品

光散射检测 (RI/UV+LS)

- 得到绝对分子量(M_n, M_w, M_z)及其分布
- 不需要校正曲线
- 得到高分子的结构信息，如粒径大小(R_g)



Contents

► Introduction

- 高分子和分子量

► GPC原理和检测器

► 应用

应用实例:

- ▶ 合成高分子
- ▶ 天然高分子
- ▶ 蛋白质

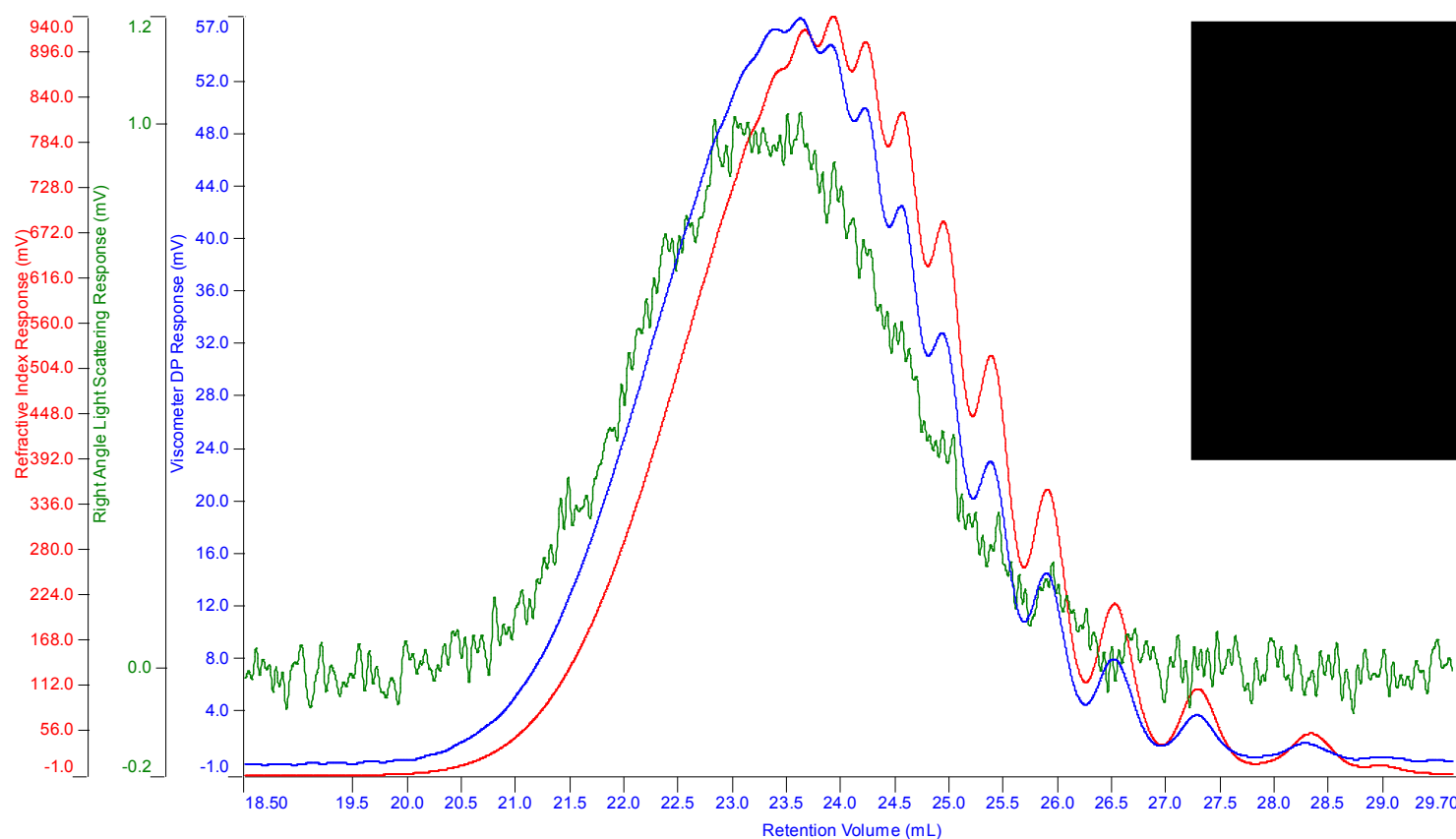
应用 – 需要考虑到的因素

- ▶ 色谱柱选择 – 类型、数量
- ▶ 流动相 / 添加物 – θ 溶剂条件、盐
- ▶ 样品制备 – 溶剂、溶解条件
- ▶ 温度 – 溶解、分析
- ▶ 其他因素 – 需要的检测器、流速

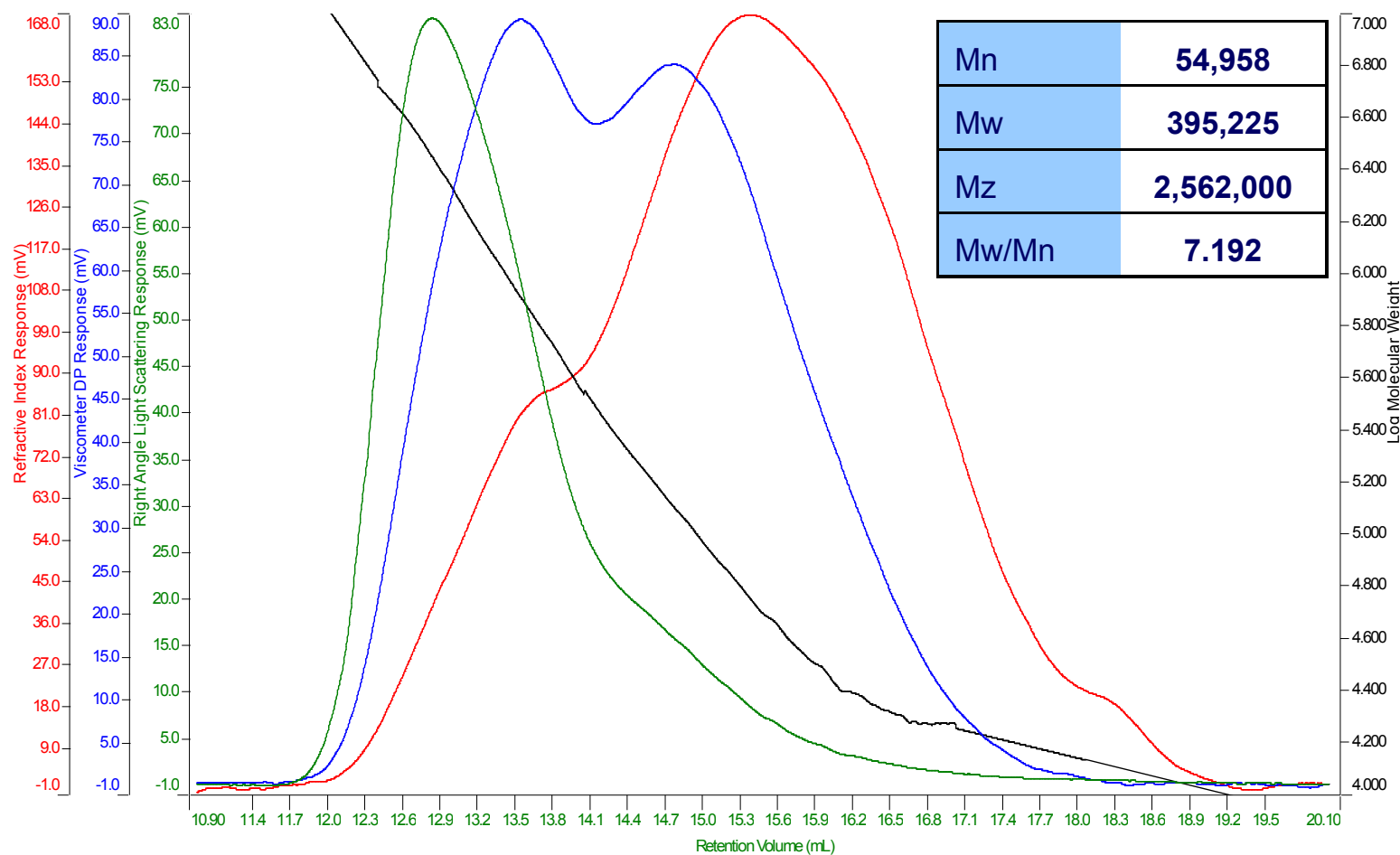


聚己酸内脂 (PCL)

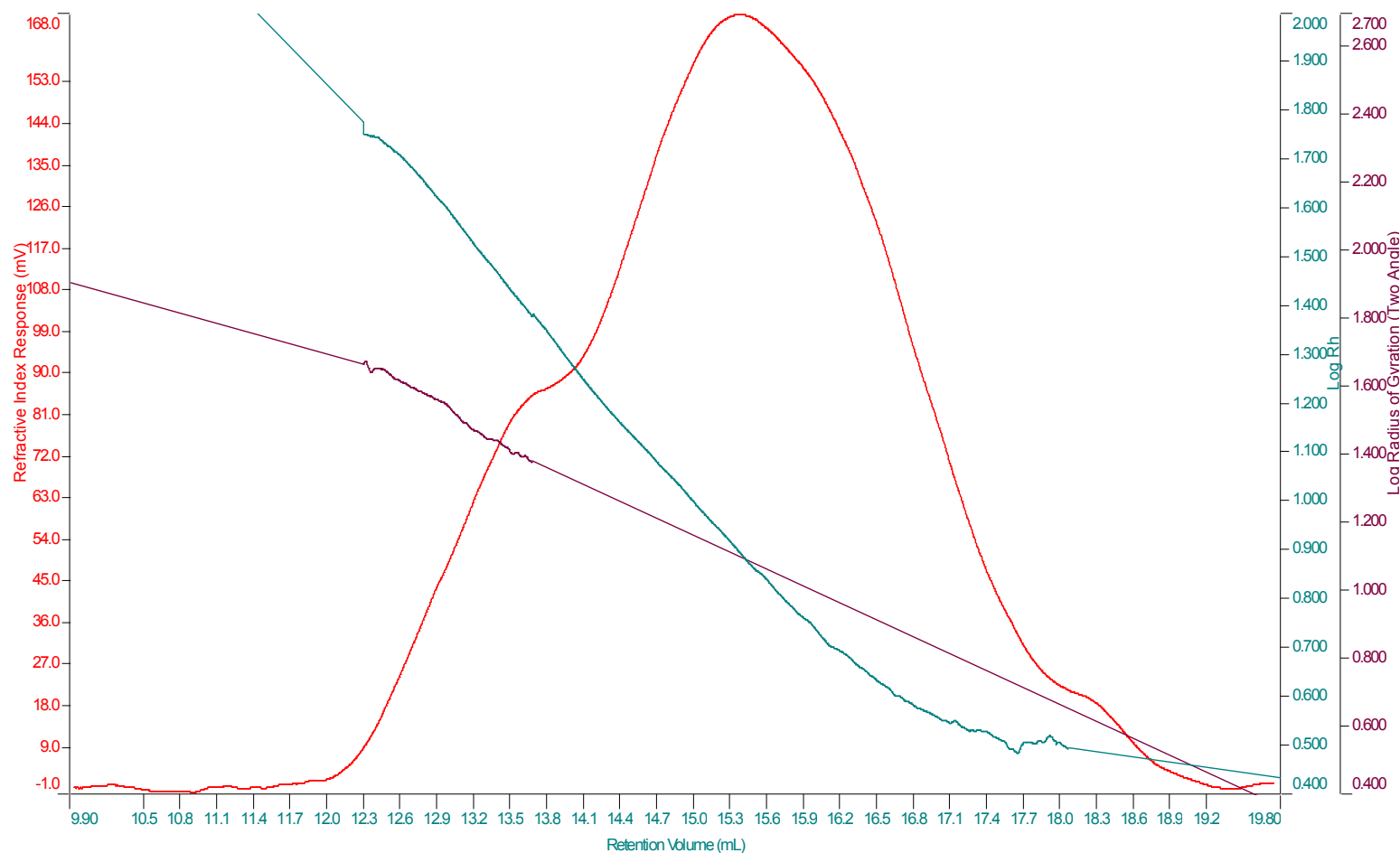
In THF at 30oC with 3 x Oligo-GPC Columns:



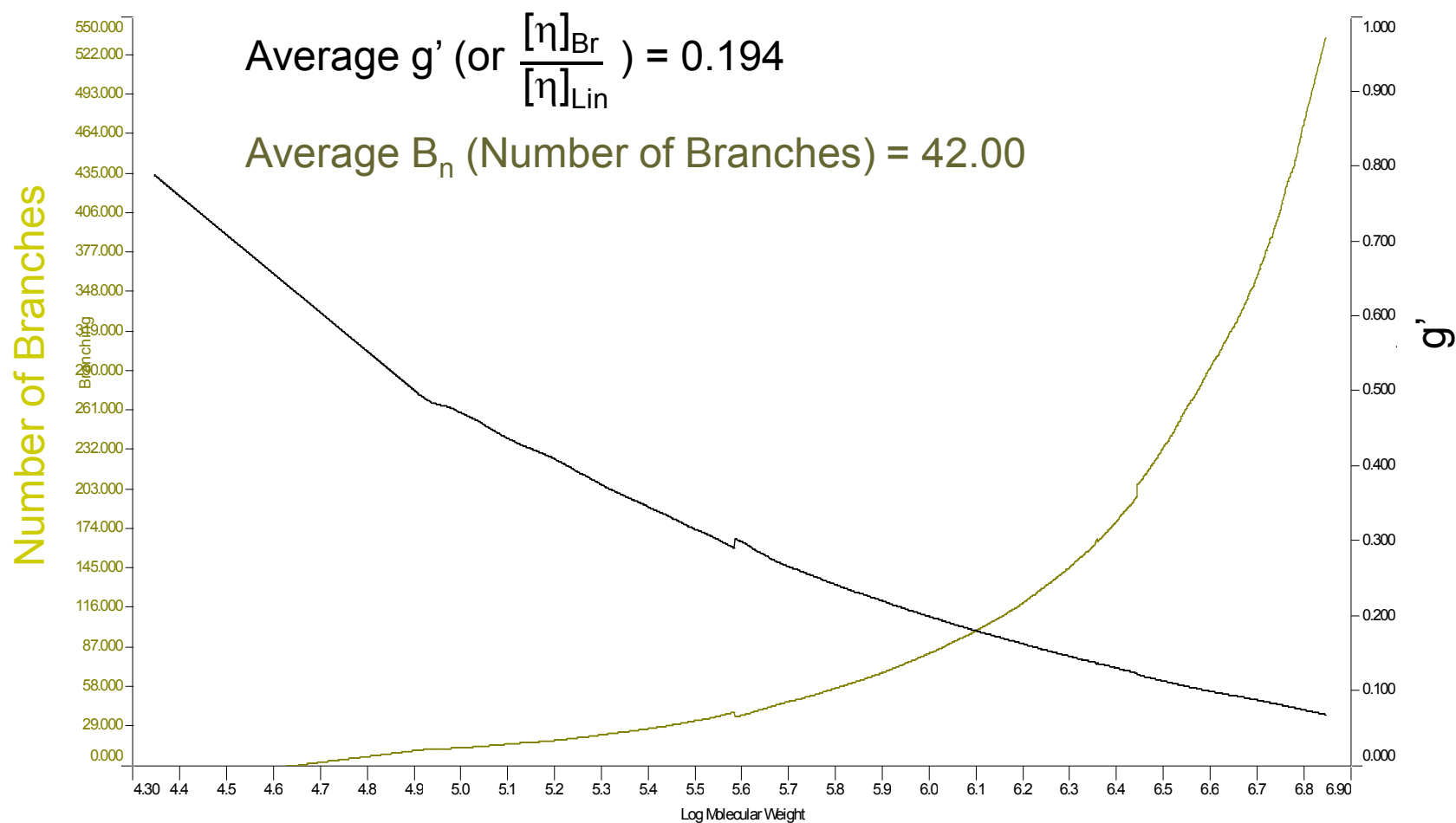
HT-GPC - LDPE的三检测器色谱



HT-GPC – LDPE尺寸分布



HT-GPC - LDPE的枝化分布曲线

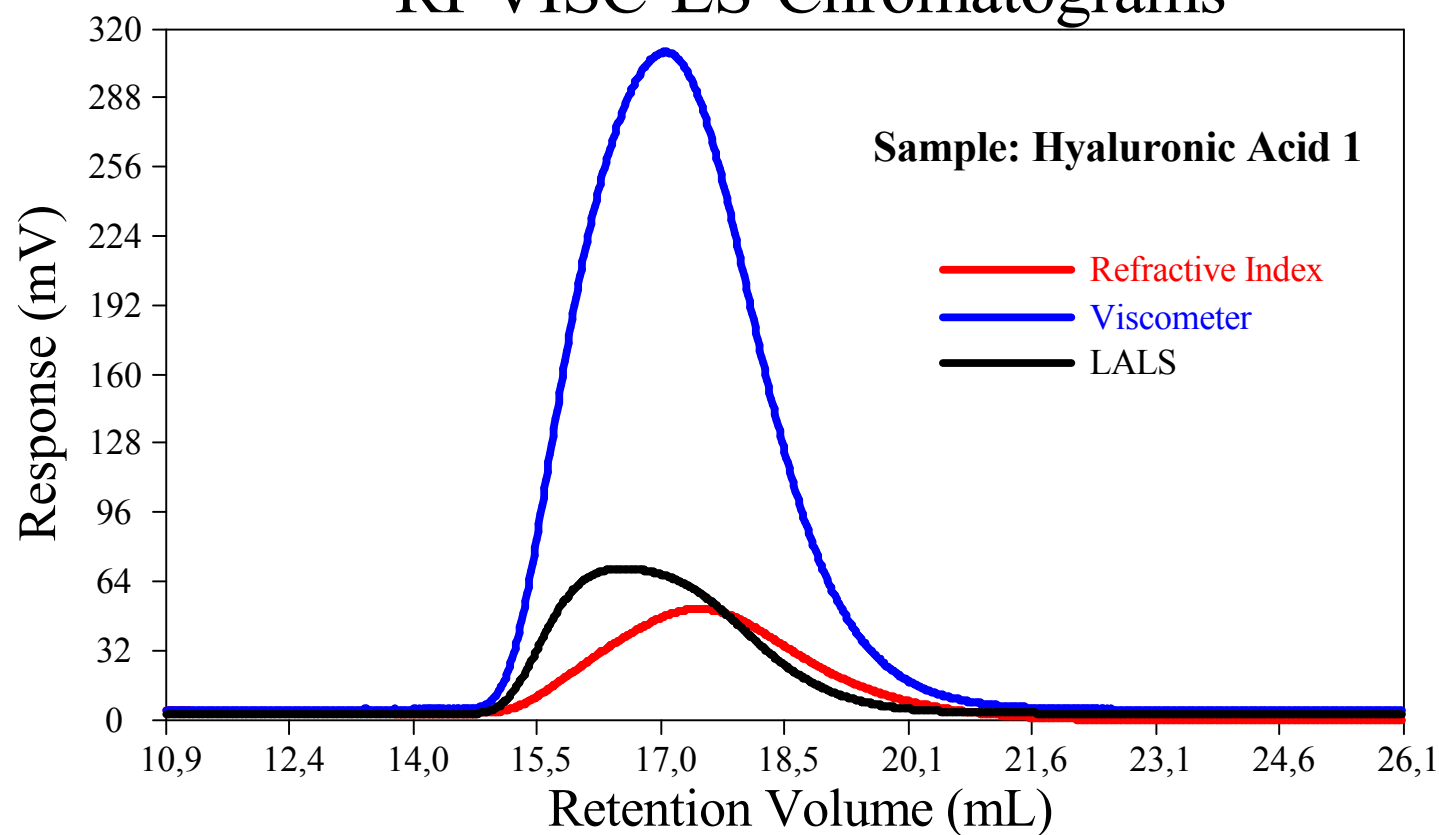


应用

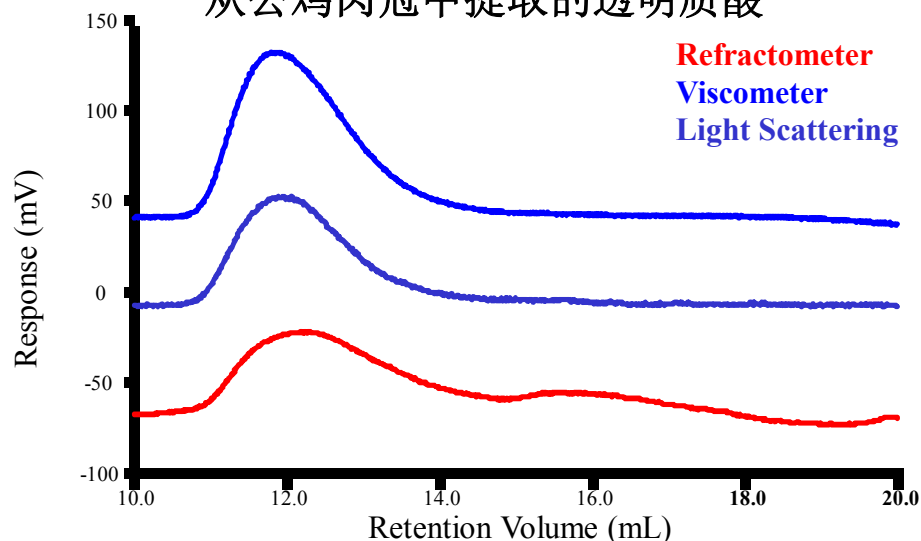
- ▶ 合成高分子
- ▶ 天然高分子
- ▶ 蛋白质

透明质酸 - Hyaluronic Acid

RI-VISC-LS-Chromatograms



从公鸡肉冠中提取的透明质酸



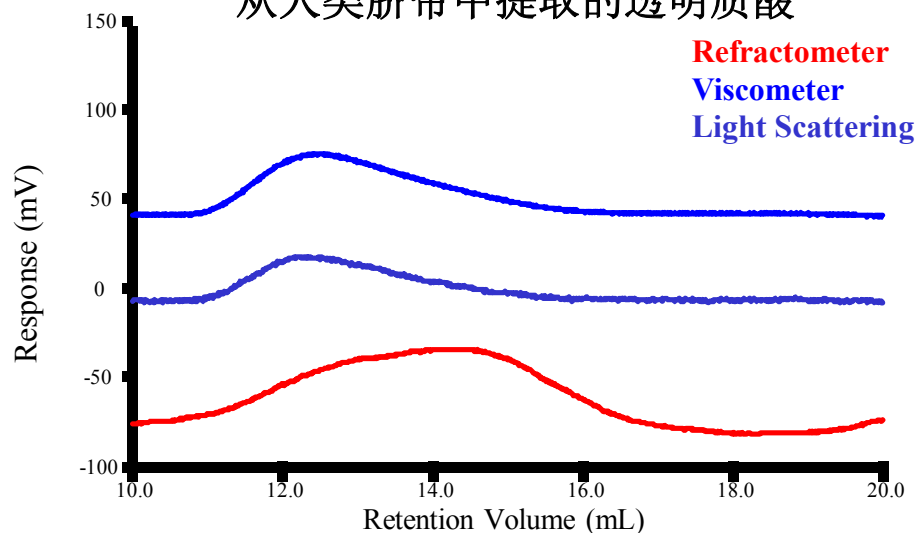
Stiff-Chain Polymers
透明质酸 (HA) 是一种典型的刚性链炭氢高分子
(Note the Large IV and RG Values)

从公鸡肉冠中提取的HA具有较高多分散性

Vs

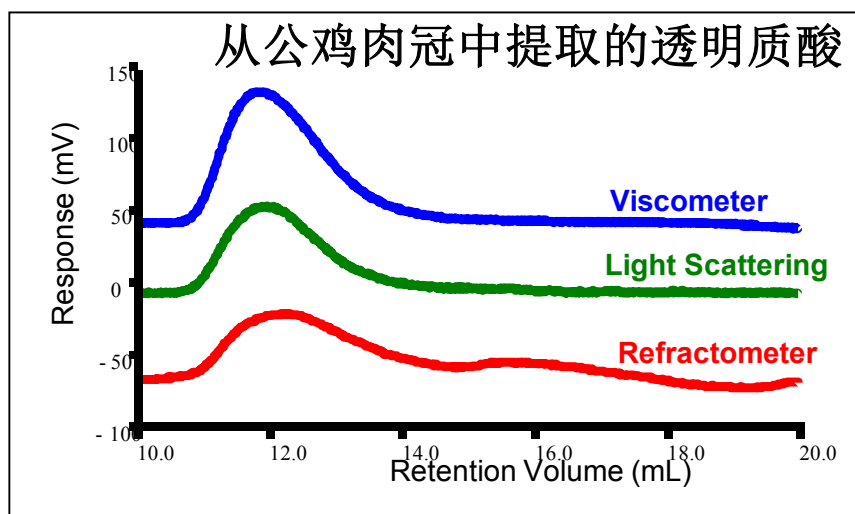
从人类脐带中提取的HA具有适中的多分散性
(Sigma Chemicals)

从人类脐带中提取的透明质酸



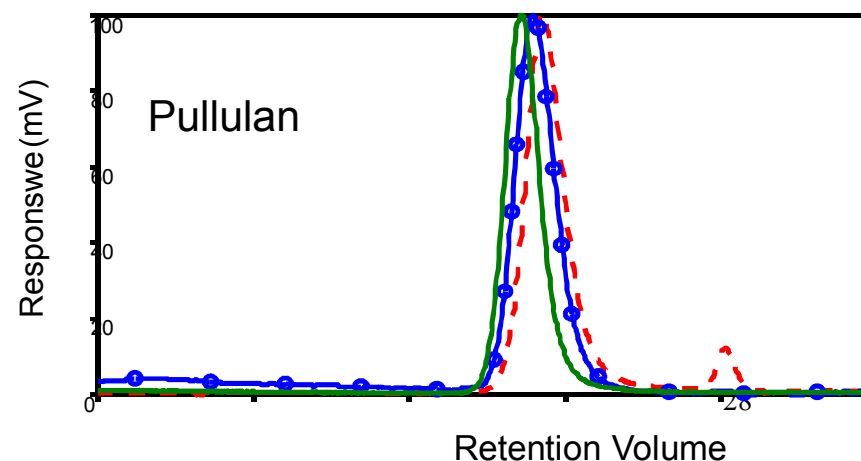
	公鸡肉冠	人类脐带
Mw	1,006,000	393,600
Mn	296,500	142,500
IV(dL/g)	14.041	7.773
Rg(nm)	74	44

链的刚性对特性粘度的影响



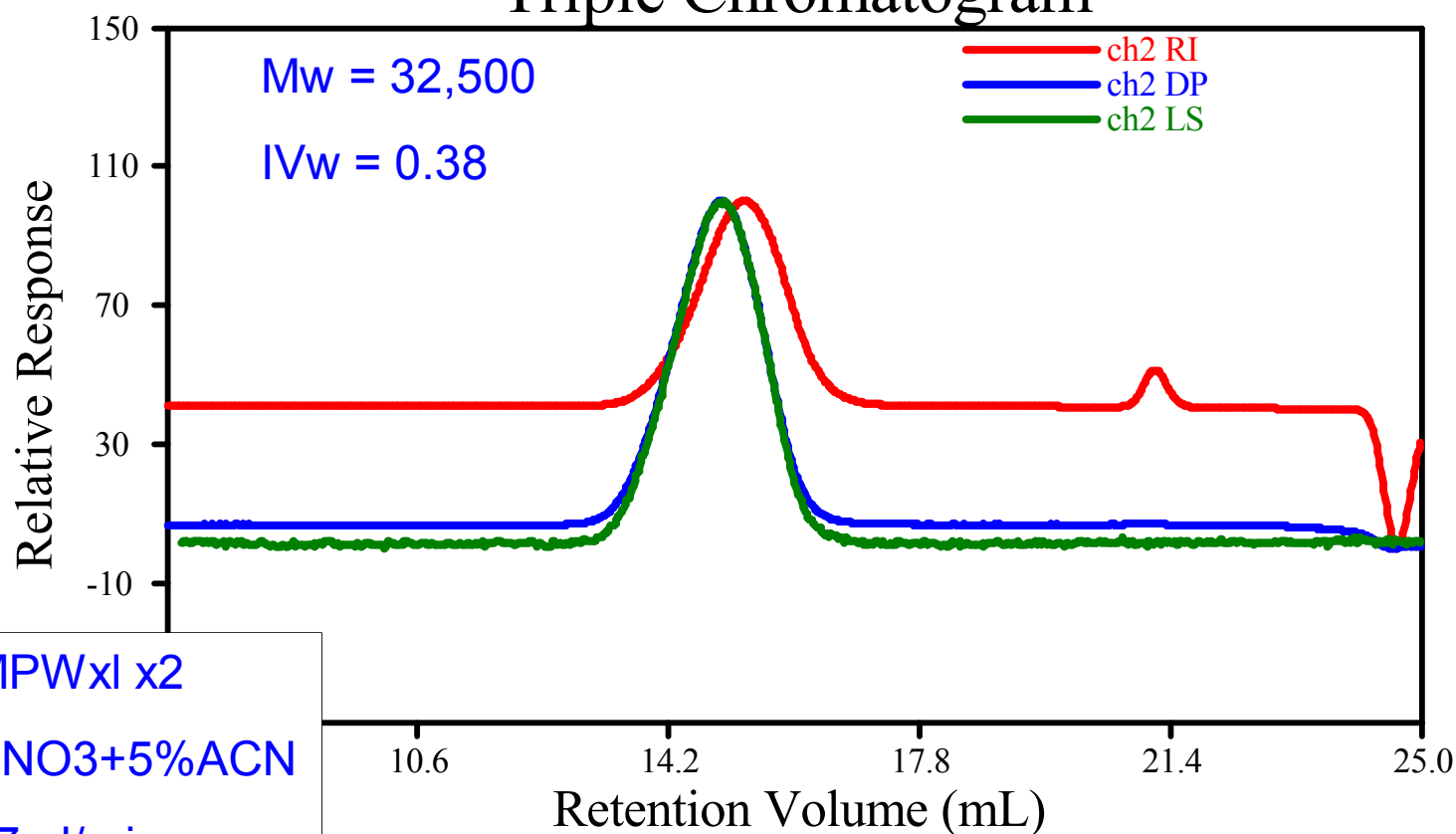
相对于普鲁兰多糖，透明质酸是一种具有相对刚性的链结构的多糖

	普鲁兰多糖 Pullulan 400	透明质酸 Hyaluronic Acid
Mw	383,000	393,600
Mn	367,000	142,500
IV (dL/g)	1.15	7.77



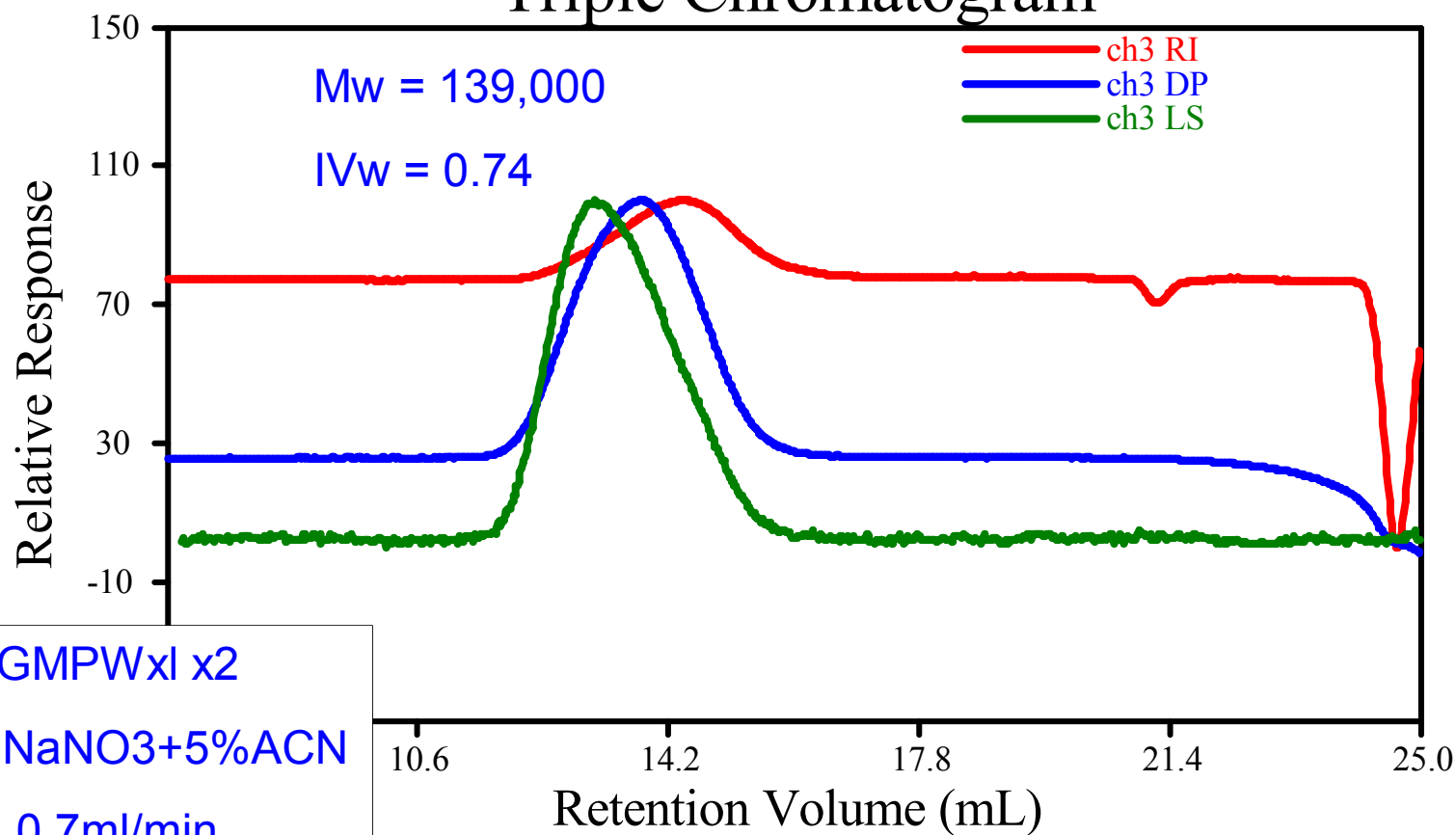
多糖修饰 - Polysaccharide Modification

Triple Chromatogram



多糖修饰 - Polysaccharide Modification

Triple Chromatogram



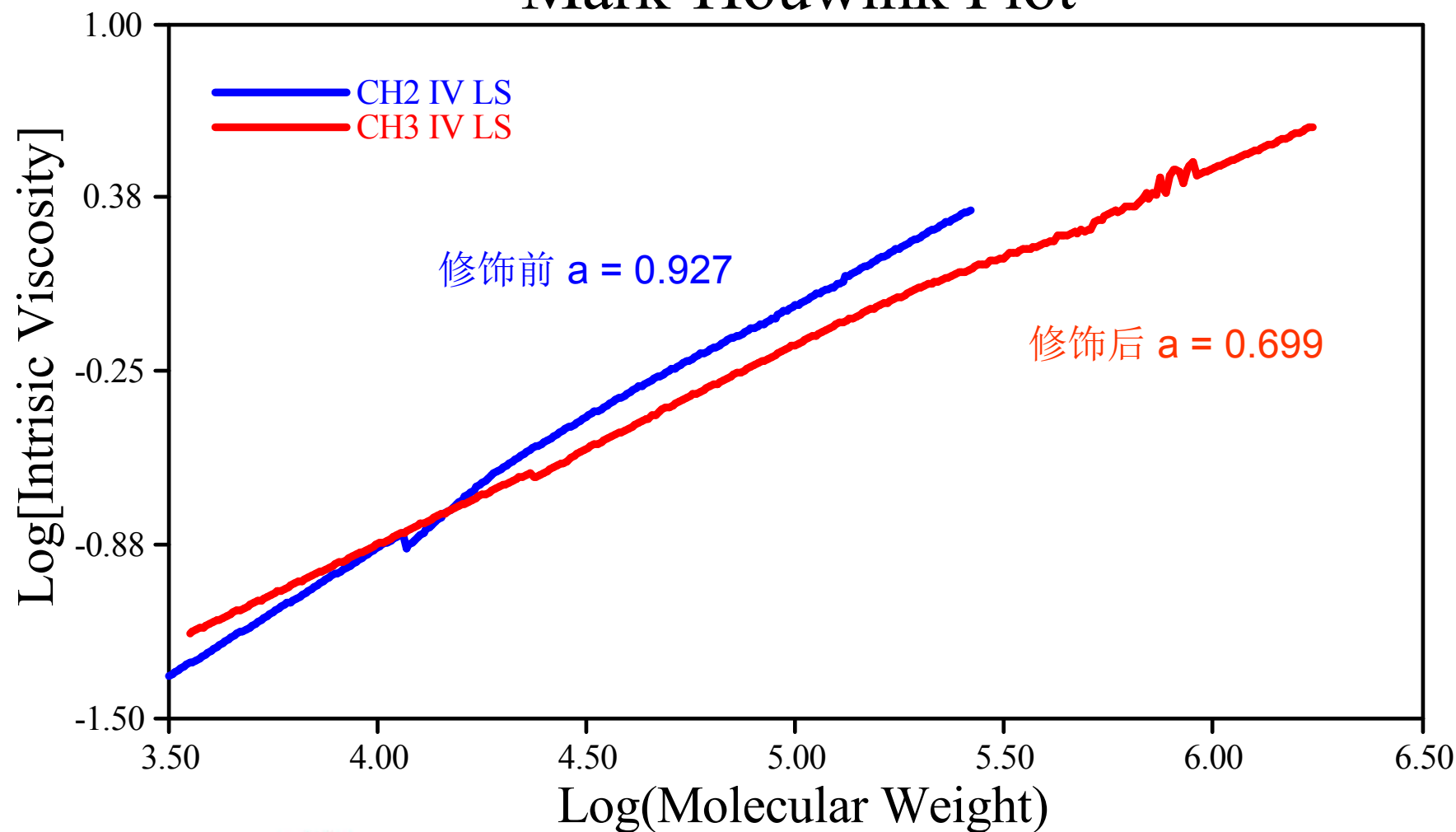
GMPWxl x2

0.1M NaNO₃+5%ACN

0.7ml/min

多糖修饰 - Polysaccharide Modification

Mark-Houwink Plot

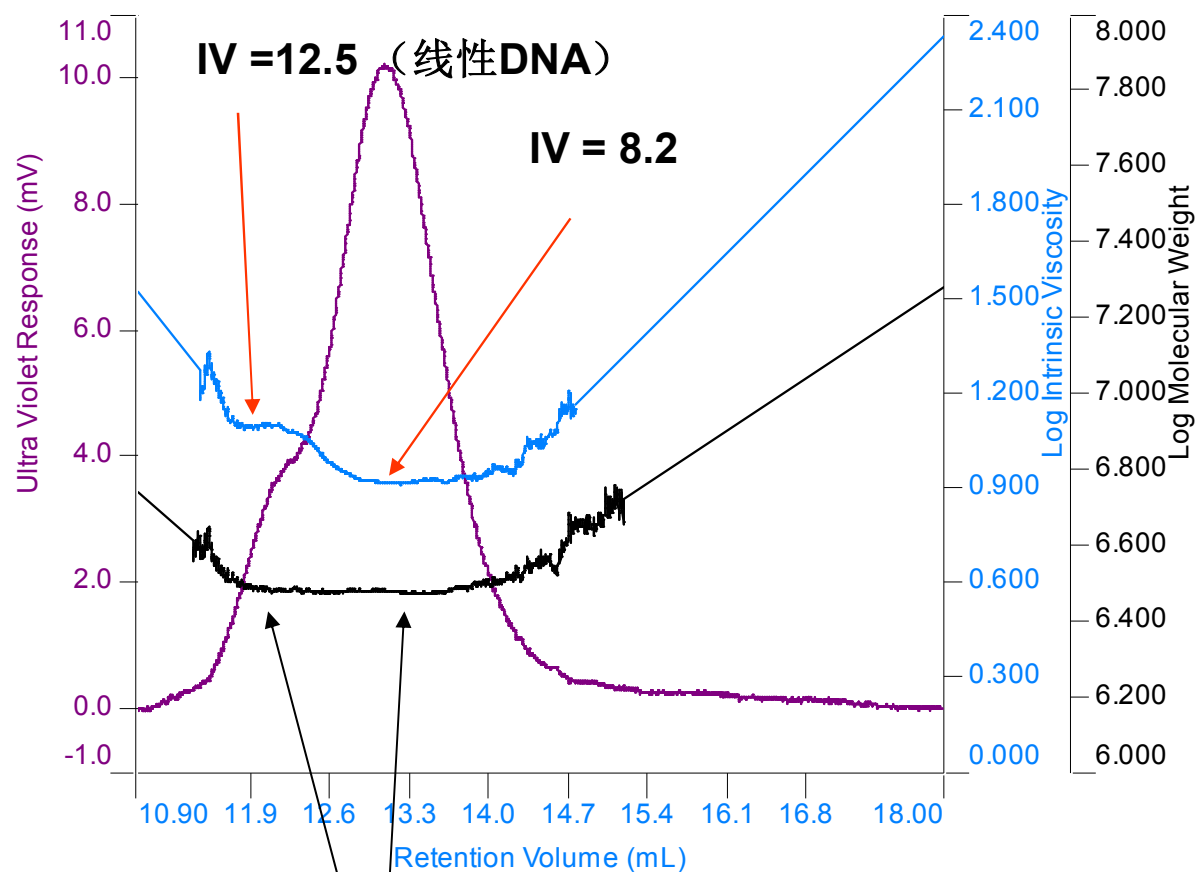


辨别DNA的结构差异

DNA - Recognition of Different Structures

DNA Structure	Molecular Weight in 10^6 g/mol	Intr. Viscosity in dl/g	Hydrodyn. Radius in nm
Closed Coil (CC)	3,2	4,6	62,8
Open Coil (OC)	3,2	9,1	77,9
Linear	3,2	12,2	86,8

DNA样品的纯度辨别 - Purity of DNA samples



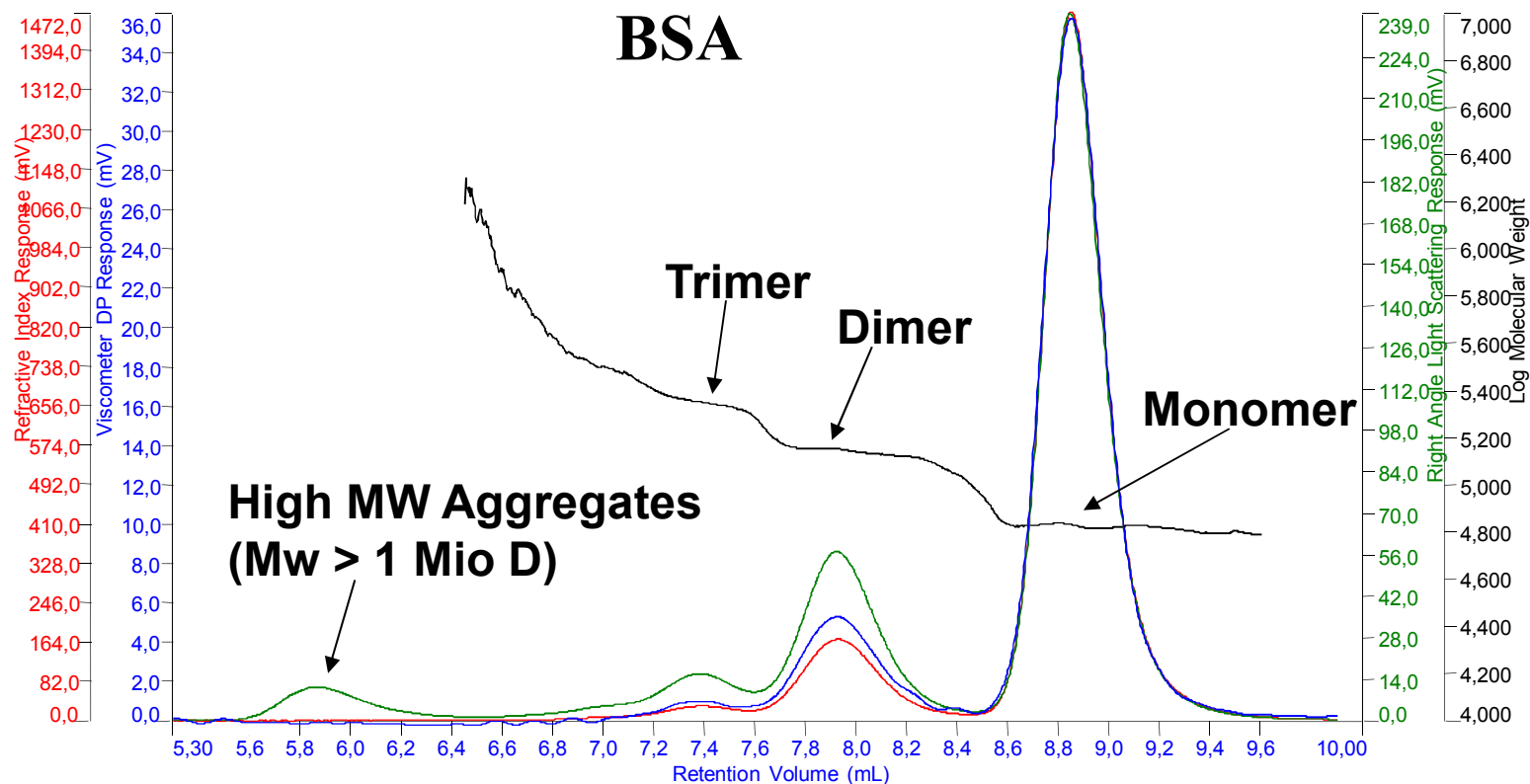
IV of linear DNA matches IV of shoulder in Open Coil sample.

So shoulder is contamination by linear DNA

分子量相同

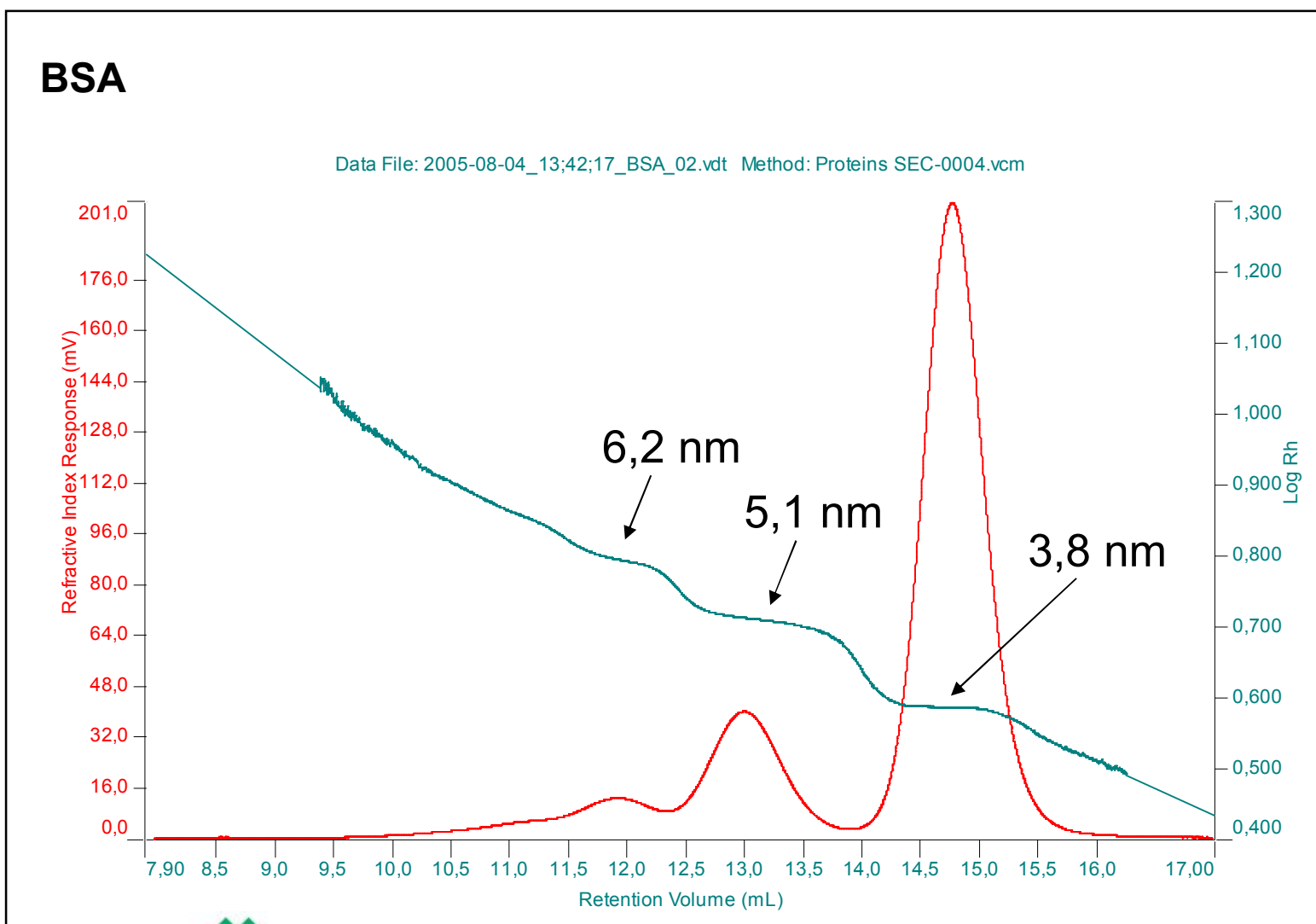
应用

- ▶ 合成高分子
- ▶ 天然高分子
- ▶ 蛋白质



	Mw (D) (LS)	(Visc) IVw (dl/g)	Rh (nm)
Monomer:	66.400	0,056	3,88
Dimer:	133.000	0,071	5,32
Trimer:	201.000	0,095	6,69

从粘度测试得到的流体力学直径 - Hydrodynamic Radius



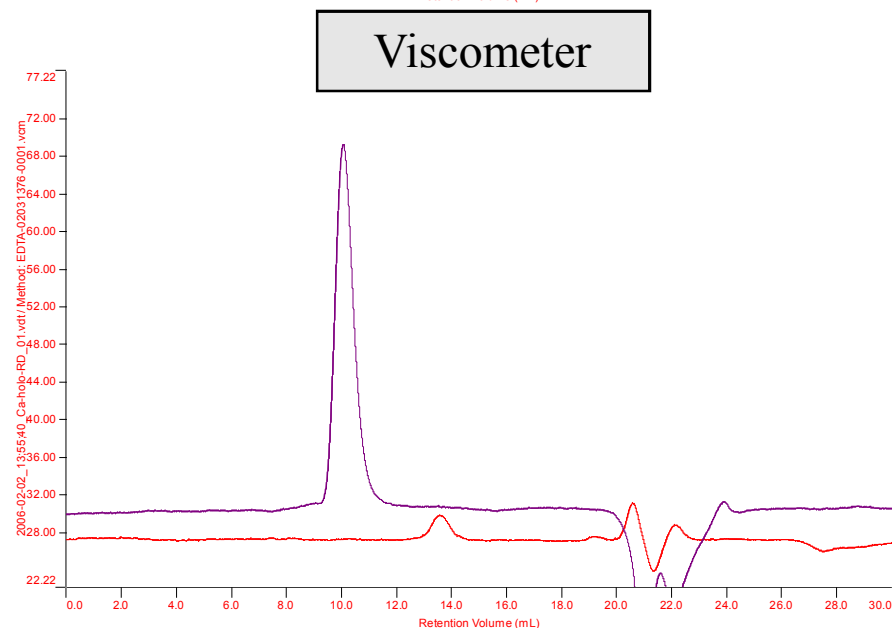
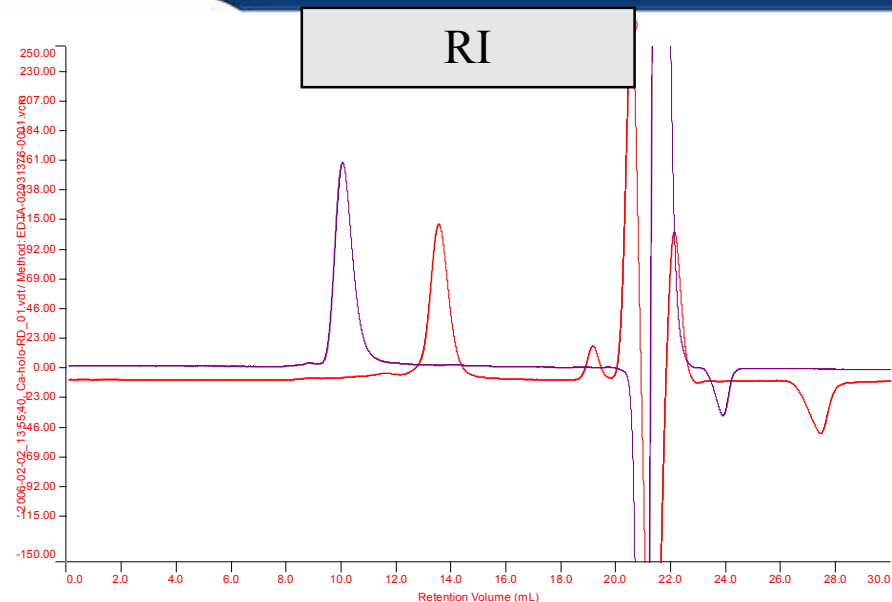
蛋白质构象

- Protein Conformation

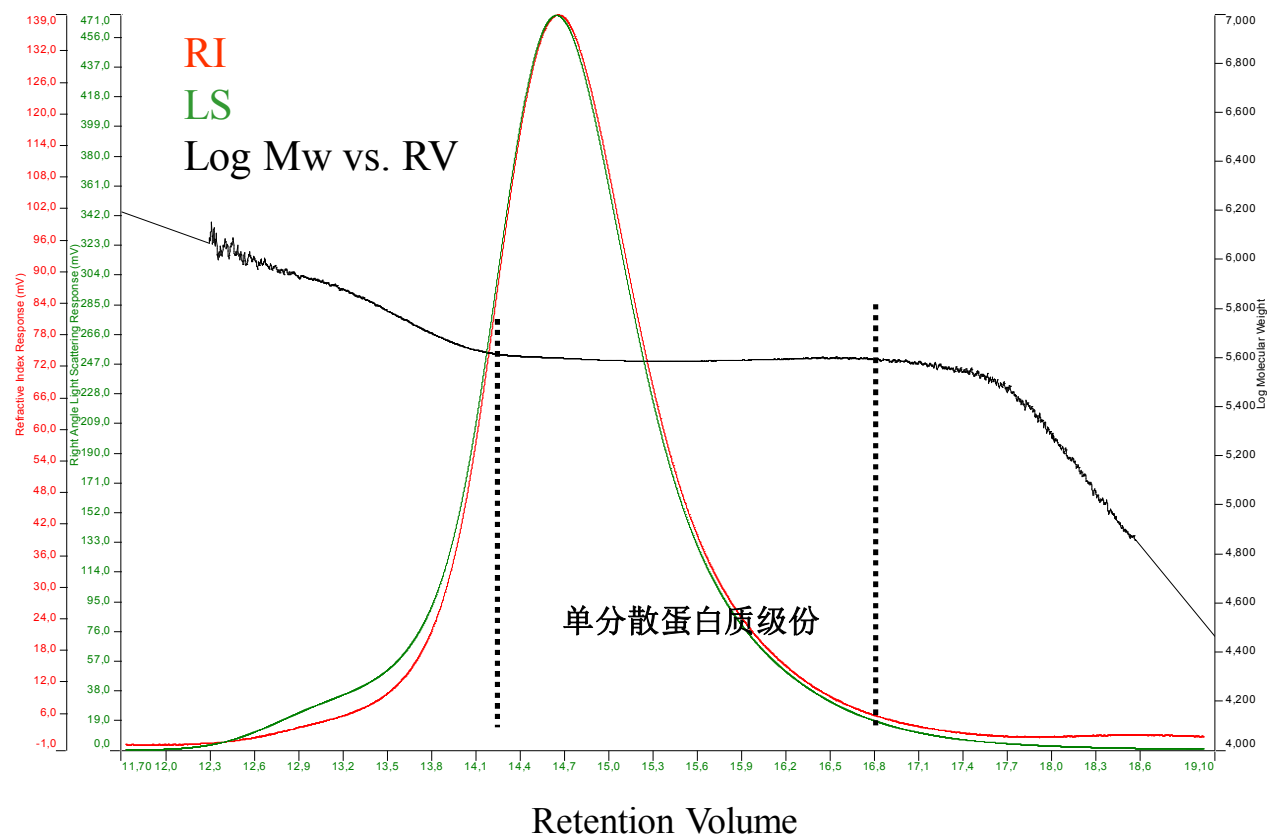
同样的蛋白质样品，除了加入一些钙盐。粘度和尺寸清楚的显示构象的区别。

分子量差别显示有少量缔合物成分存在于第二个样品中。

Sample Id	Mw	IV	Rh
With Ca	77,445	0.0531	4.016
Without Ca	78,887	0.5134	8.616

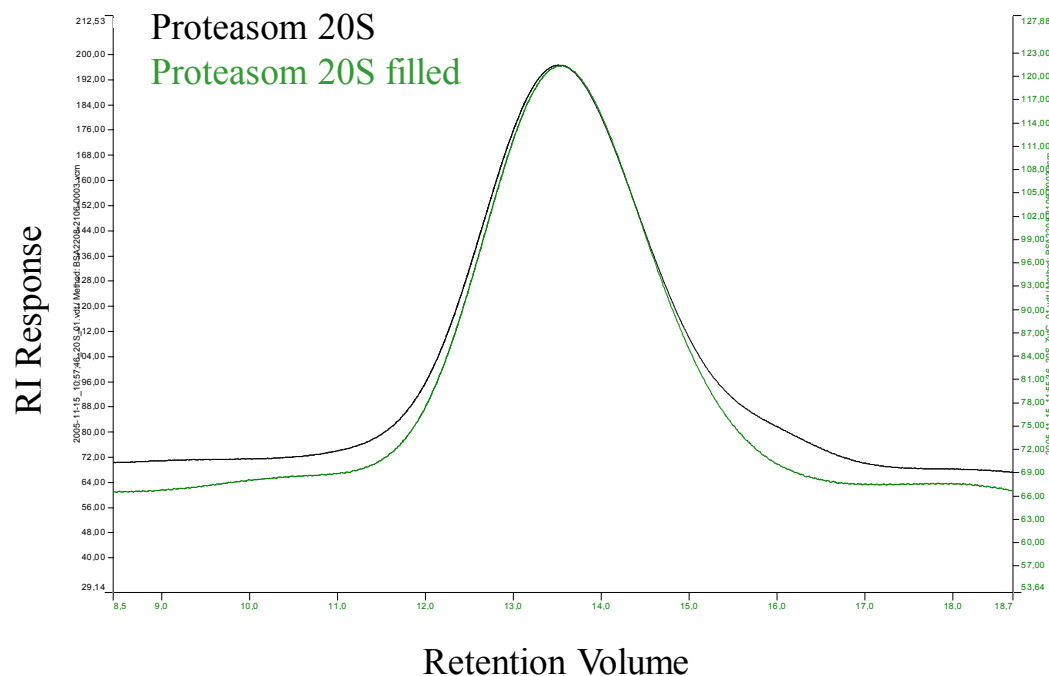


蛋白质分级



填充生物高分子 - „Filled“ Biomolecules

(蛋白酶体20S 加入 细胞色素 C)
(Proteasom 20S filled with Cytochrome C)



Molecular Weights:

Proteasom 20S: **695.000 D**

Proteasom 20S filled: **791.000 D**

填充了 8个 Cytochrome C
(细胞色素 C Mw : 12.000 D)

更多信息

请登录Viscotek网站:

<http://www.viscotek.com/>

应用报告

<http://www.viscotek.com/applications.htm>



销售支持热线:

800 820 6902

Thank you for your attention!