



Das Brechungsindexinkrement – ein kleiner Wert mit großer Wirkung im Bereich der Polymeranalytik

Dr. Gerhard Heinzmann, Alina Heinzmann und Sophia Heinzmann

Einleitung

Das Brechungsindexinkrement ist definiert als die Änderung des Brechungsindex n mit der Konzentration c (dn/dc). Es kann je nach gewählter Substanz und Lösungsmittel einen negativen oder einen positiven Wert annehmen. Als Einheit für das Brechungsindexinkrement wird meist die Angabe [ml/g] verwendet. Der dn/dc -Wert ist ein wichtiger Parameter im Bereich der Bestimmung von Molekulargewichten von synthetischen und biologischen Makromolekülen mit der Technik der statischen Lichtstreuung. Der dn/dc -Wert geht quadratisch in die Rayleigh-Lichtstreugleichung ein. Kleine Fehler im dn/dc -Wert können daher schnell zu großen Fehlern im resultierenden Molekulargewicht führen. Es gibt verschiedene Methoden wie dieser wichtige Parameter bestimmt werden kann; er kann sowohl im Batch-Modus wie auch mit chromatographischen Techniken bestimmt werden. Im Folgenden soll die Bedeutung und die Bestimmung des dn/dc -Wertes näher betrachtet werden.

Bestimmung des dn/dc -Wertes

Eine exakte Bestimmung des dn/dc -Wertes einer Probe kann je nach Applikation eine einfache oder aber auch sehr komplexe Aufgabe sein. Sehr einfach ist die Bestimmung des dn/dc -Wertes, wenn man mit reinen, pulverförmigen Polymerproben ohne Verunreinigungen arbeitet, die sich vollständig und rückstandsfrei in einem Lösungsmittel (z. B. THF) lösen. Man kann von diesen Proben eine exakte Konzentration in Lösung herstellen und diese Lösung in einer Küvette mit einem externen Refraktometer vermessen. Man trägt den gemessenen Brechungsindex n über der Konzentration c der Probe auf; die Steigung der Auftragung ist der dn/dc -Wert.

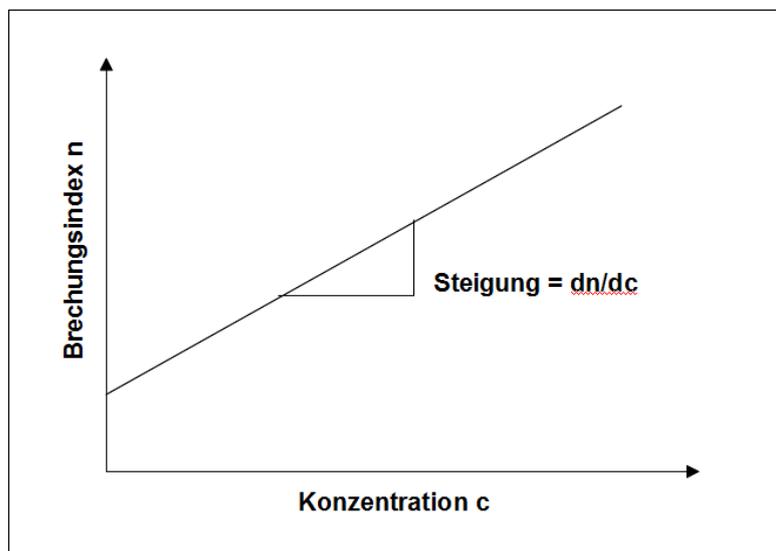


Abb. 1: Bestimmung des dn/dc -Wertes mit einem externen Refraktometer

Sehr genau bekannte Werte für das Brechungsindexinkrement sind z.B. 0,185 ml/g für Polystyrol gelöst in THF, 0,147 ml/g für Polysaccharide wie Pullulan und Dextran in wässrigen Lösungsmitteln, sowie ebenfalls 0,185 ml/g für das Protein BSA (Bovine Serum Albumine) und auch viele andere Proteine und Antikörper, ebenfalls in wässrigen Lösungsmitteln.

Man kann den dn/dc -Wert auch mit einem Chromatographiesystem und dem in der GPC/SEC-Analytik meist verwendeten, differentiellen Brechungsindexdetektor (RI= Differential Refractive Index Detector) bestimmen. Ein differentieller Brechungsindex misst den Unterschied zwischen dem Brechungsindex einer in einem Lösungsmittel gelösten Probe und dem reinen Lösungsmittel. Er verfügt über eine in Referenz und Probe geteilte Zelle, die meist durch ein dünnes Trennglas getrennt ist. In der

statischen, im Messbetrieb nicht durchflossenen, Referenzseite, befindet sich reines Lösungsmittel; die Probe fließt durch die Probenseite der Messzelle, wie in Abbildung 2 dargestellt.

Das Ansprechverhalten des Brechungsindexdetektors kann vereinfacht mit folgender Gleichung (1) dargestellt werden:

Kalibriert man den RI-Detektor mit einem Standard mit bekanntem dn/dc -Wert und bekannter Konzentration, dann kann der dn/dc -Wert einer unbekannt Probe bestimmt werden, wenn deren Konzentration bekannt ist. Voraussetzung ist allerdings, dass die Wiederfindung in der GPC/SEC-Messung 100% beträgt (also kein Verlust der Probe auf den Trennsäulen entsteht). Umgekehrt kann aus dem Signal des RI-Detektors aber auch die Konzentration einer Probe bestimmt werden, wenn deren dn/dc -Wert bekannt ist.

$$\text{Fläche}_{RI\text{-signal}} = \text{Kalibrierungskonstante (RI)} \times \text{Konzentration} \times \frac{dn}{dc} \quad (1)$$

Man wird in diesem Fall mit beiden Verfahren (Externes Refraktometer und Chromatographie-System mit RI-Detektor) ein im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmendes, korrektes Resultat für die Konzentration oder den dn/dc -Wert einer Probe erzielen.

Schwieriger wird die Bestimmung des dn/dc -Wertes, wenn man mit Proben arbeitet, die Verunreinigungen oder Additive enthalten. Misst man bei diesen Proben den dn/dc -Wert in einer Küvette mit einem externen Differential-Refraktometer, dann können die nicht abgetrennten Verunreinigungen oder Additive das Resultat verfälschen. Hier ist sicherlich eine Messung mit dem GPC/SEC-Brechungsindexdetektor nach der Trennung der Probe über der GPC/SEC-Trennsäule besser, da in diesem Fall die störenden Verunreinigungen oder Additive von der zu messenden Probe getrennt werden. Es muss aber die exakte Konzentration der Probe nach Abtrennung der störenden Anteile bekannt sein.

Der schwierigste Fall liegt sicherlich dann vor, wenn mit salzhaltigen Lösungen gearbeitet wird, z. B. bei der wässrigen GPC/SEC, und wenn ggf. Polyelektrolyte oder Proteine untersucht werden. Zwar kann man in diesem Fall die Probe mit demselben Salzgehalt, wie im Laufmittel der GPC/SEC-Anlage verwendet, in einem externen Differential-Refraktometer messen, allerdings bewirkt der Durchgang der Probe durch die GPC/SEC-Trennsäule einen gewissen Dialyseeffekt, so dass die Mikroumgebung der Probe nach der Trennsäule eine andere sein kann, als dies im ursprünglichen Laufmittel der Fall war. Dies kann Einflüsse z.B. auf den Dissoziationsgrad einer Probe, und somit auch auf deren dn/dc -Wert haben. Daher ist hier eindeutig die Bestimmung des dn/dc -Wertes mit dem GPC/SEC-Brechungsindexdetektor am Ort der Detektion zu bevorzugen. Ein großes Problem ist aber die Kenntnis der genauen Bedingungen am Ort der Detektion und der exakten Konzentration.

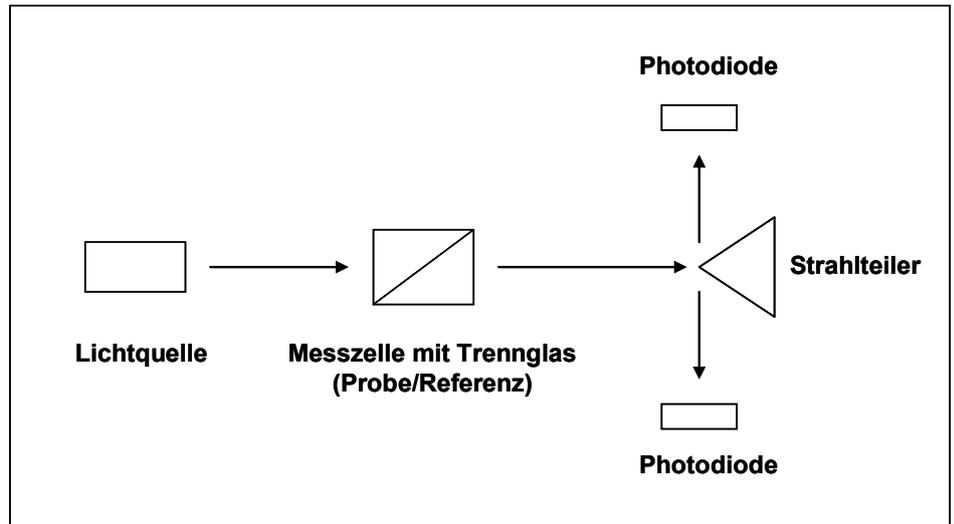


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Brechungsindexdetektors

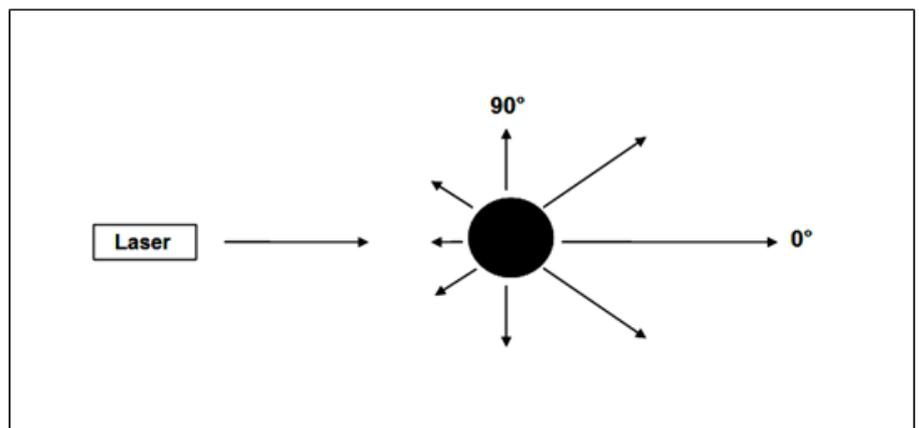


Abb.3: Streulichtverteilung im MALLS Detektor für Proben mit einem Durchmesser von mehr als $1/20$ der verwendeten Laserwellenlänge

Bedeutung des dn/dc -Wertes in der statischen Lichtstreuung

Der dn/dc -Wert geht quadratisch in die Rayleigh-Lichtstreugleichung ein; er ist ein Teil des als „Optische Konstante“ bezeichneten Faktors K:

$$\frac{KC}{R_0} = \frac{1}{M_w} + 2A_2C \quad (2)$$

R_0 = Rayleigh-Verhältnis beim Streuwinkel Null Grad

M_w = nach dem Gewicht gemitteltes mittleres Molekulargewicht

C = Konzentration

K = optische Konstante
 $= (2\pi^2 n_0^2) / (N_A \lambda_0^4) \times (dn/dc)^2$

A_2 = zweiter Virialkoeffizient

Oft wird im Bereich der Polymeranalytik mit einem Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor (MALLS = Multi-Angle Static Laser Light Scattering Detector) in Kombination mit einem Brechungsindexdetektor gearbeitet. Der MALLS-Detektor misst das von einer gelösten Probe gestreute Licht bei möglichst vielen Messwinkeln (Abbildung 3).

Einfach ausgedrückt sieht das Ansprechverhalten des Mehrwinkel-Lichtstreuendetektors folgendermaßen aus, wie in Gleichung (3) dargestellt:

M_w ist dabei das nach dem Gewicht gemittelte Molekulargewicht der Probe.

$$\text{Fläche}_{\text{MALLS-signal}} = \text{Kalibrierkonstante (MALLS)} \times \text{Konzentration} \times \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \times M_w \quad (3)$$

Zu beachten ist auch, dass es für jeden einzelnen Winkel im MALLS-Detektor eine eigene Kalibrierkonstante ermittelt werden muss. Dies wird üblicherweise durch einen Kalibrierschritt durchgeführt, der Normalisierung genannt wird; zunächst wird nur ein Winkel des MALLS-Detektors kalibriert (in der Regel der 90°-Winkel), alle anderen Winkel werden dann auf diesen Winkel normalisiert, d.h. die Ansprechfaktoren werden für einen isotrop streuenden Polymerstandard auf denselben Wert festgelegt.

Da der dn/dc -Wert quadratisch in die Lichtstreugleichung eingeht, wird deutlich, dass bereits kleine Fehler im dn/dc -Wert schnell zu großen Fehlern im resultierenden Molekulargewicht führen können. Es ist daher von großer Bedeutung, dass dieser wichtige Parameter für jede Probe möglichst exakt bestimmt wird.

Hier kommt dem RI-Detektor eine besondere Bedeutung zu. Aus dem Signal des RI-Detektors kann, wie schon beschrieben, entweder der dn/dc -Wert einer Probe oder deren Konzentration bestimmt werden. Der genaueste Weg in der GPC/SEC zur Bestimmung eines möglichst exakten Molekulargewichtes einer Probe ist es daher, wenn man zunächst mit dem RI-Detektor z. B. über Mehrfachmessungen möglichst exakt den dn/dc -Wert der Probe bestimmt, und diesen dann nutzt um über das Signal des RI-Detektors eine möglichst genaue Probenkonzentration zu ermitteln. Diese genaue Konzentration fließt dann in die Lichtstreugleichung ein und führt mit dem ebenfalls exakten dn/dc -Wert zu einem korrekten Molekulargewicht.

Zu beachten ist auch, dass die Wellenlänge der Lichtquelle im differentiellen Brechungsindexdetektor mit der Wellenlänge des später verwendeten Mehrwinkel-Lichtstreuendetektors übereinstimmt, damit ein korrektes Molekulargewicht einer Probe bestimmt werden kann. Der dn/dc -Wert hängt nicht nur vom verwendeten Lösungsmittel und der Temperatur, sondern auch von der Wellenlänge der Lichtquelle ab.

Fazit

Das Brechungsindexinkrement einer Probe ist ein wichtiger Parameter, wenn es um die Bestimmung von Molekulargewichten mit der Methode der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung geht. Für eine Vielzahl von Polymeren und Biopolymeren finden sich zuverlässige Daten in der Literatur [1]. Kennt man allerdings den dn/dc -Wert einer Probe nicht, dann muss man sich gut überlegen, wie man diesen Wert möglichst exakt bestimmen kann. Eventuell ist die Bestimmung mit einem externen Refraktometer möglich, dies gilt aber nur für sehr reine Proben, die sich gut lösen. Sobald Verunreinigungen oder Additive in der Probe enthalten sind, ist die Bestimmung des dn/dc -Wertes mit einem GPC/SEC-Brechungsindexdetektor, nach der Trennung der Probe über einer GPC/SEC-Trennsäule, die bessere Methode. Besonders komplex und anspruchsvoll wird die Bestimmung des dn/dc -Wertes einer Probe, wenn mit salzhaltigen Laufmitteln und Polyelektrolyten und Proteinen gearbeitet wird, da der dn/dc -Wert hier stark von der Mikroumgebung der Probe am Ort der Detektion abhängt. Da die GPC/SEC-Säule einen Dialyseeffekt aufweist, können aber am Ort der Detektion völlig andere Bedingungen vorherrschen, als wenn die Probe im normalen Laufmittel gelöst wäre.

Literatur

[1] A. Theisen, C. Johann, M.P. Deacon and S.E. Harding: "Refractive Increment Data Book for Polymer and Biomolecular Scientists", Nottingham University Press (1999), ISBN: 1897676298