



# Der Begriff „Triple Detection“ in der Gelpermeationschromatographie und der Feld-Fluss-Fraktionierung – Ursprung und heutige Bedeutung

Dr. Gerhard Heinmann

Postnova Analytics GmbH

## Einleitung

Vor einiger Zeit hat sich in der Gelpermeationschromatographie (GPC), auch Größenausschlusschromatographie (SEC = Size Exclusion Chromatography) genannt, der Begriff der „Triple Detection“, im Deutschen meist als „Dreifachdetektion“ bezeichnet, etabliert. Ursprünglich wurde die Bezeichnung als Synonym für die Kombination eines molekulargewichtssensitiven statischen Rechtwinkel-Lichtstreuendetektors mit einem ebenfalls molekulargewichtssensitiven Viskositätsdetektor und einem weiteren Detektor, meist einem Brechungsindexdetektor (RI = Refractive Index Detector), der auf die Konzentration einer Probe anspricht, eingeführt. Später wurde der Begriff der „Triple Detection“ von verschiedenen Geräteherstellern oft auch irreführend verwendet, um eigene Gerätekonfigurationen wie z. B. ein GPC/SEC-System, das lediglich mit drei konzentrationssensitiven Detektoren, nämlich einem UV-Detektor, einem RI-Detektor und einem Fluoreszenz- oder ELSD-Detektor ausgestattet war, unter dieser Bezeichnung an Kunden verkaufen zu können.

Die Bedeutung des Begriffs der „Triple Detection“ hat sich im Laufe der Zeit gewandelt; mittlerweile wird der Begriff zunehmend auch im Bereich der Feld-Fluss-Fraktionierung [1-4] verwendet. Meist versteht man darunter heutzutage die Kombination eines statischen Mehrwinkel-Lichtstreuendetektors (MALS) mit einem Viskositätsdetektor und einem Brechungsindexdetektor (RI).

## Ursprüngliche Bedeutung des Begriffs „Triple Detection“

Die ursprüngliche Bedeutung des Begriffs „Triple Detection“ dürfte heutzutage nur noch einem kleinen Kreis versierter GPC/SEC-Anwender bekannt sein. Er wurde von der heute nicht mehr am Markt aktiven, bis 2007 in der amerikanischen Stadt Houston in Texas ansässigen, Firma Viscotek Corporation eingeführt, die 2008 von der Malvern Instruments übernommen wurde. Der Begriff beschreibt die gemeinsame mathematische Auswertung der Signale eines statischen Rechtwinkel-Lichtstreuendetektors (RALS = Right Angle Light Scattering Detector, Abbildung 1), eines Viskositätsdetektors sowie eines Brechungsindexdetektors [5].

Das Problem bei dieser Detektorkombination liegt darin, dass der Rechtwinkel-Lichtstreuendetektor nur dann direkt ab-

solute Molekulargewichte einer Polymer-, Biopolymer oder Proteinprobe bestimmen kann, wenn das Makromolekül das vom Laser gestreute Licht in alle Raumrichtungen symmetrisch, also isotrop, streut. Das ist aber nur der Fall, wenn die Probenmoleküle relativ klein sind; ihre Trägheitsradien dürfen die Grenze von  $1/20$  der verwendeten Laserwellenlänge nicht überschreiten (Abbildung 2).

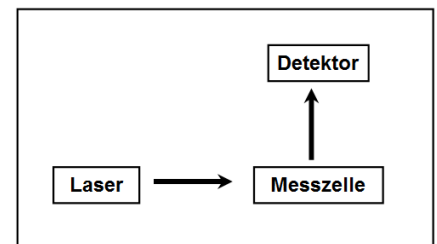


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines RALS-Lichtstreuendetektors (Right Angle Light Scattering)

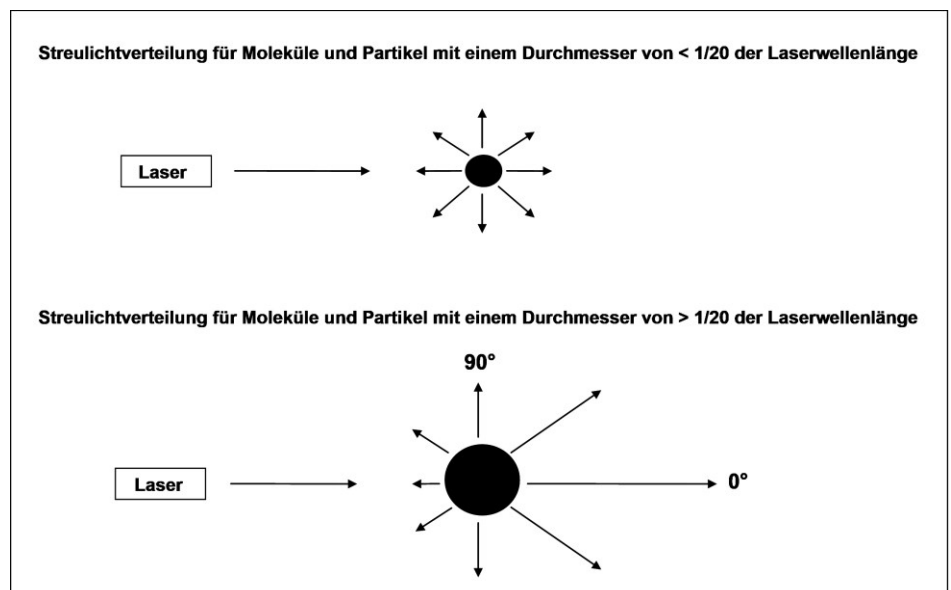


Abb. 2: Streulichtverteilung bei kleinen und großen Makromolekülen

Bei den oft verwendeten roten Lasern, die üblicherweise bei einer Wellenlänge von 633 nm arbeiten, entspricht diese Grenze in etwa einer molekularen Größe bzw. einem Trägheitsradius des Moleküls von ca. 15 nm. Wird das Molekül deutlich größer als 15 nm, dann wird das Licht asymmetrisch gestreut; die Streuung wird in die Vorwärtsrichtung fokussiert und das wahre Streulicht kann nur noch bei einem messtechnisch nicht zugänglichen Winkel von Null Grad bestimmt werden.

Eine Größe bzw. ein Trägheitsradius von 15 nm entspricht bei synthetischen Polymeren immerhin einem Molekulargewicht von ca. 100.000 Da, bei verzweigten Polysacchariden deutlich mehr als 200.000 Da und bei sehr kompakt gefalteten Proteinen mit Sekundär- und Tertiärstruktur sogar weit mehr als 500.000 Da. Es gibt aber natürlich eine Vielzahl an synthetischen und natürlichen Polymeren die diesen Größenbereich bei weitem überschreiten.

Die Limitierung des RALS-Detektors wurde durch eine ausgeklügelte Mathematik umgangen (Abbildung 3); dabei wurden die drei Signale des statischen Rechtwinkel-Lichtstreuendetektors sowie des Viskositätsdetektor und des Brechungsindexdetektor gemeinsam ausgewertet. Daher stammt die ursprüngliche Bezeichnung „Triple Detection“.

Zunächst wurde im ersten Schritt aus dem Signal des statischen Rechtwinkel-Lichtstreuendetektors das Molekulargewicht der Probe bestimmt. Mit dem Viskositätsdetektor wurde dann die Intrinsische Viskosität der Probe gemessen. Beide Werte flossen nun in die Bestimmung des Trägheitsradius der Probe ein. Aus dem Trägheitsradius wiederum wurde ein neuer Formfaktor bestimmt. War dieser größer als zu Beginn der Berechnung, dann führte dies zu einem höheren Molekulargewicht. Dieses höhere Molekulargewicht wurde nun wiederum mit der Intrinsischen Viskosität verrechnet und zwar so lange, bis sich am Ende das berechnete Molekulargewicht nicht mehr erhöhte. Nun hatte

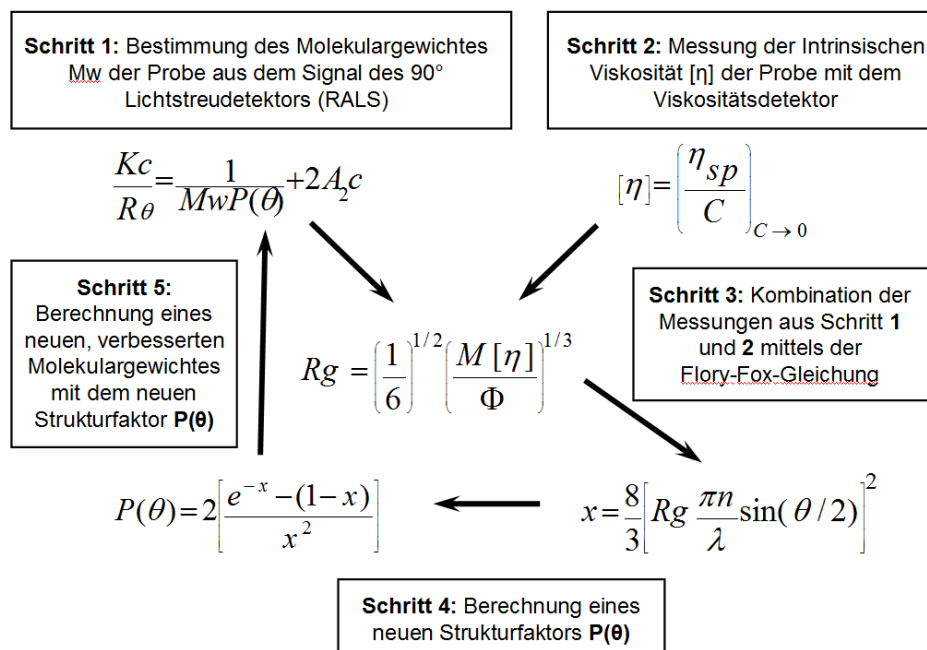


Abb: 3: Der mathematische Ablauf der „Triple Detection“-Methode (Erläuterung der Mathematik aus [5] entnommen und grafisch dargestellt).

man das korrekte Molekulargewicht der Probe berechnet.

Streng genommen war diese Art der iterativen Berechnung nur für ideal gaußförmige Polymerknäuel zutreffend, da die Flory-Fox Gleichung als Teil der Berechnungsmethode verwendet wurde und diese Gleichung nur für ideal gaußförmige Polymerknäuel gültig ist. Reale Messungen ergaben allerdings, dass man die Methode der Triple Detection auch auf eine Vielzahl an synthetischen Polymeren in organischen Lösungsmitteln wie auch Biopolymeren, Polysacchariden und Proteinen sowie Antikörpern in wässrigen Laufmitteln anwenden konnte.

Kritisch wurde es nur, wenn die Struktur der Probe stark von der Knäuelform abwich, wie es z. B. bei dem sehr kettensteifen und gestreckten Hyaluronsäuremolekül der Fall ist, oder auch bei dem nahezu stäbchenförmigen DNA-Molekül. Bei derartigen Proben konnte die Methode der Triple Detection nicht mehr erfolgreich angewendet werden.

#### Heutige Bedeutung des Begriffs „Triple Detection“

Da sich im Laufe der vergangenen Jahre immer mehr die so genannten statischen Mehrwinkel-Lichtstreuendetektoren

(MALS = Multi Angle Light Scattering, Abbildung 4) im Bereich der GPC/SEC und der Feld-Fluss-Fraktionierung am Markt durchgesetzt haben und fast niemand mehr mit einem reinen Rechtwinkel-Lichtstreuendetektor arbeitet, hat sich auch der noch immer verwendete Begriff der Triple Detection in seiner Bedeutung geändert. Heute versteht man unter dem Begriff der Triple Detection meist die Kombination eines statischen Mehrwinkel-Lichtstreuendetektors mit einem Viskositätsdetektor und einem Brechungsindexdetektor.

Da das absolute Molekulargewicht einer Probe auch für große Moleküle, die die Grenze von 15 nm Trägheitsradius bei weitem überschreiten, direkt aus der

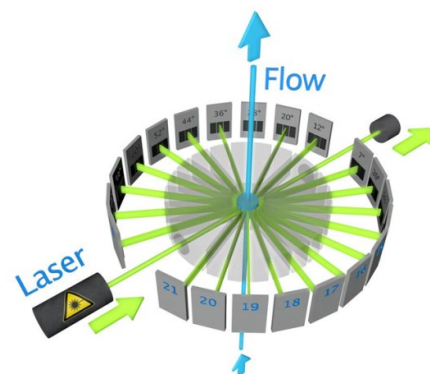


Abb: 4: Schematischer Aufbau eines MALS-Detektors (Multi Angle Light Scattering)

Winkelabhängigkeit des MALS-Detektors bestimmt werden kann (Abbildung 5), ist die in Abbildung 3 beschriebene mathematische Routine nun nicht mehr notwendig. Vielmehr liefert der MALS-Detektor direkt das absolute Molekulargewicht einer Probe, der Viskositätsdetektor bestimmt die Intrinsische Viskosität der Probe und der Brechungsindexdetektor liefert die Probenkonzentration an jedem Punkt des Chromatogramms.

Vorteil dieser Methode ist dass die Verwendung der Flory-Fox Gleichung nicht mehr nötig ist, und die neue „Triple Detection“ auf alle Arten von Proben angewendet werden kann, unabhängig von ihrer Struktur.

Aus dem so genannten **Mark-Houwink-Plot**, der doppelt logarithmischen Auftragung der Intrinsischen Viskosität über dem Molekulargewicht, wie auch dem so genannten Konformationsplot, der doppelt logarithmischen Auftragung des Trägheitsradius über dem Molekulargewicht, können weiterhin über die Zimm-Stockmayer-Theorie [6] die Verzweigungsgrade von Polymer- und Biopolymermolekülen bestimmt werden. Diese Berechnungen werden in einem **anderen Teil dieser Reihe** näher beschrieben.

### Fazit

Die Bedeutung des Begriffs der „Triple Detection“ in der GPC/SEC und der Feld-Fluss-Fraktionierung hat sich im Laufe der Zeit verändert. Beschrieb der Begriff ursprünglich die mathematische Kombination der Signale eines statischen Rechtwinkel-Lichtstreuendetektors, eines Viskositätsdetektors sowie eines Brechungsindexdetektors, so wird er heute zunehmend für die Kombination eines statischen Mehrwinkel-Lichtstreuendetektors mit einem Viskositätsdetektor und einem Brechungsindexdetektor verwendet.

Wird neben dem Brechungsindexdetektor noch ein weiterer Konzentrationsdetektor, meist ein UV-Detektor, verwendet, dann spricht man oft von „Tetra Detection“ oder, im Deutschen, von der

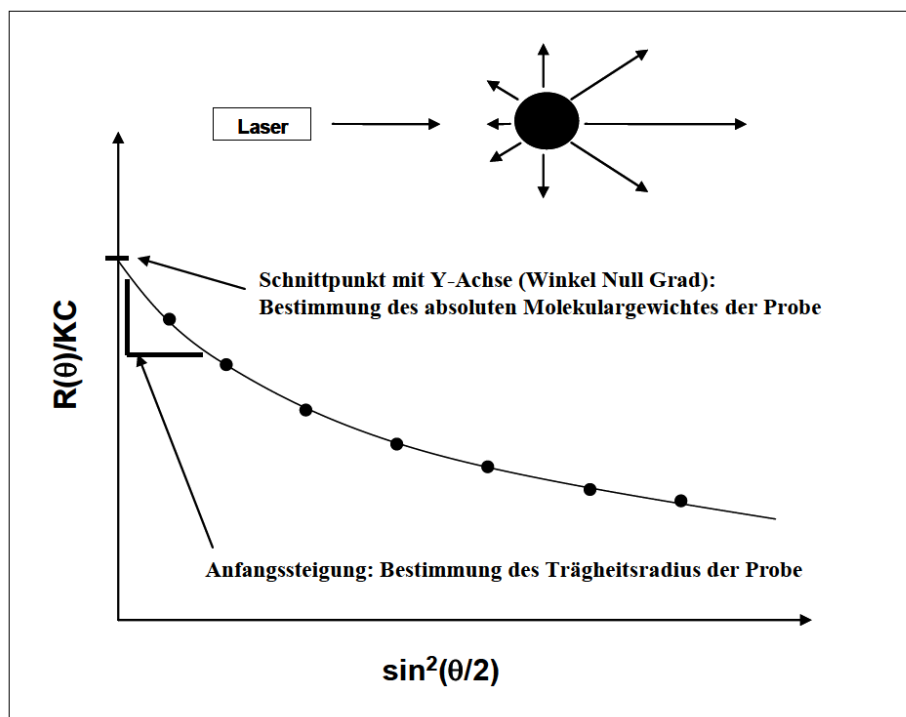


Abb. 5: Bestimmung des absoluten Molekulargewichtes einer Probe und deren Trägheitsradius aus der Winkelabhängigkeit des Streulichtes mit einem MALS-Detektor

„Vierfach Detektion“. Mit dieser Kombination an Detektoren können zusätzlich die **Zusammensetzung von Copolymeren** über der Molekulargewichtsverteilung und sich über die Molekulargewichtsverteilung ändernde  $dn/dc$ -Werte ermittelt werden, sofern mindestens eines der Homopolymere UV-aktiv ist.

### Literatur

- [1] J.C. Giddings, "New separation concept based on a coupling of concentration and flow non-uniformities", *Separation Sci.*, 1 123-125 (1966).
- [2] J.C. Giddings, F.J. Yang, M.N. Myers, "Flow Field-Flow Fractionation: A Versatile New Separation Method", *Science*, 193 1244-2145 (1976).
- [3] F. A. Messaud, R. D. Sanderson, J. R. Runyon, T. Otte, H. Pasch and S. K. R. Williams, "An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers", *Progress in Polymer Science*, 34, 351-368 (2009).
- [4] G. Heinzmann, "Comprehensive Characterization of Natural Rubber samples using Thermal Field-Flow Fractionation (TF3) coupled with Online Multi-Angle Light Scattering Detection (MALS), Viscosity Detection and Evaporative Light Scattering Detection (ELSD) – Maximizing the Amount of Information from a Single Separation Experiment", Vortrag, ISPAC, 30th International Symposium on Polymer Analysis and Characterization, Linz, Austria, 11 - 14 June 2017.
- [5] *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques*, (2003), edited by Chi-San Wu, Marcel Dekker Inc., ISBN 0-8247-4710-0, Chapter 3.5.3: "Right Angle Laser Light Scattering and Triple Detection".
- [6] Zimm, B.H., Stockmayer, W.H.: *J. Chem. Phys.* 17, 1301, (1949)