

Die Bedeutung von detektorspezifischen Ansprechfaktoren in der Chromatographie

Dr. Gerhard Heinzmann

Postnova Analytics GmbH

Einleitung

Die am häufigsten verwendeten Detektoren in der Chromatographie sind einfache Konzentrationsdetektoren wie z. B. ein UV/VIS-Detektor oder ein Brechungsindexdetektor. Die Bezeichnung „Konzentrationsdetektor“ rührt daher, dass das Signal dieser Detektoren in der Regel direkt proportional zur Konzentration einer Probe ist. Wird die doppelte Probenmenge injiziert, dann resultiert im Konzentrationsdetektor die doppelte Signalhöhe und -fläche. Obwohl die Verwendung dieser Art von Detektoren sehr einfach erscheint gibt es doch einige Dinge, die der Anwender wissen sollte, um die Daten die mit diesen Detektoren erzeugt werden korrekt interpretieren zu können. Denn bei allen Konzentrationsdetektoren gilt, dass es neben der Konzentration einen weiteren, detektorspezifischen Ansprechfaktor gibt, der ebenfalls das Messsignal beeinflusst.

Richtige und falsche Interpretation der Daten von Konzentrationsdetektoren

Eine korrekte Interpretation der Messdaten von Konzentrationsdetektoren liegt vor, wenn der Anwender eine Probe mit einem Konzentrationsdetektor zweimal misst, wobei er bei der zweiten Messung die doppelte Probenmenge injiziert und dadurch ein doppelt so großes Messsignal erhält. Dann ist die Aussage „bei der zweiten Messung wurde die doppelte Probenmenge gefunden“ korrekt. Voraussetzung dafür ist lediglich, dass der verwendete Konzentrationsdetektor im entsprechenden Messbereich einen linearen Signalverlauf zeigt.

Misst der Anwender hingegen zwei chemisch unterschiedliche Proben und erhält zwei gleich große Signale im Konzentrationsdetektor, dann könnte er zum Schluss kommen, dass bei diesen beiden Proben die gleiche Probenmenge injiziert wurde, da die Signale im Konzentrationsdetektor ja gleich groß sind. Diese Interpretation kann aber vollkommen falsch sein, da es bei jedem Konzentrationsdetektor neben der Konzentration noch einen weiteren, detektorspezi-

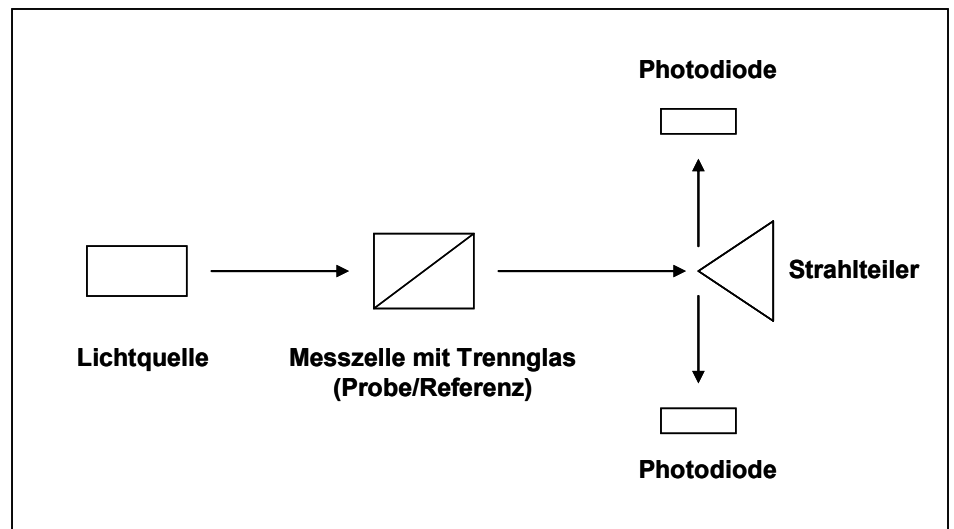


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Brechungsindexdetektors

fischen Ansprechfaktor gibt, der maßgeblich für die resultierende Signalhöhe und -fläche zuständig ist und im Wesentlichen von der chemischen Zusammensetzung und ggf. auch von der Größe einer Probe abhängig ist.

Im Fall eines Brechungsindexdetektors wird dieser detektorspezifische Ansprechfaktor als Brechungsindexinkrement (dn/dc) bezeichnet. Er beschreibt, wie sich der Brechungsindex einer Lösung mit steigender Probenkonzentration verändert:

$$RI\text{-Signal} = RI\text{-Kalibrierfaktor} \times \text{Konzentration} \times dn/dc \quad [1]$$

Die Messung basiert beim Brechungsindexdetektor auf der Ablenkung eines Lichtstrahls beim Durchgang durch eine aus zwei Hälften bestehende Durchflusszelle (Abbildung 1). Die eine Hälfte der Zelle, die Referenzzelle, enthält das reine Lösungsmittel mit dem Brechungsindex n_0 ; sie wird während der Messung nicht durchströmt. Die zweite Hälfte der Zelle wird von der Probenlösung bzw. dem Eluenten mit dem Brechungsindex n durchströmt. Der Lichtstrahl wird primär beim Übergang von der Flüssigkeit in der Probenzelle zum Trennglas zwischen den Zellen gebrochen. Weiterhin wird er nochmals an der Grenzfläche Flüssigkeit/Glas beim Verlassen der Durchflusszelle sowie

beim Übergang Glas/Luft, ebenfalls beim Verlassen der Zelle, gebrochen. Eine exakte Analyse der Lichtbrechung müsste all diese Brechungseffekte in Betracht ziehen. Es zeigt sich aber, dass eine vereinfachte Betrachtung der Lichtbrechung wie in Gleichung [1] gezeigt weitestgehend das gleiche Resultat ergibt.

Im Fall eines UV-Detektors ist der detektorspezifische Ansprechfaktor der Extinktionskoeffizient (ϵ) einer Probe. Er beschreibt, wie sich die Absorption einer Lösung mit steigender Probenkonzentration verändert.

$$V\text{-Signal} = UV\text{-Kalibrierfaktor} \times \text{Konzentration} \times \epsilon \quad [2]$$

Der Einfluss der detektorspezifischen Ansprechfaktoren auf das Detektorsignal ist meist ebenso proportional wie der Einfluss der Konzentration.

Werden daher z. B. mit einem Brechungsindexdetektor zwei chemisch unterschiedliche Proben gemessen – wobei das Brechungsindexinkrement der einen Probe nur halb so groß ist wie das der anderen Probe – dann wäre die korrekte Interpretation im Fall von zwei gleich großen Detektorsignalen nicht etwa „beide Proben haben dieselbe Konzentration“ sondern vielmehr „die Probe mit dem höheren Brechungsindexinkrement

hat nur die halbe Konzentration im Vergleich zu der Probe mit dem geringeren Brechungsindexinkrement“.

Ein Beispiel für zwei solche Proben wären Polystyrol und Polymethylmethacrylat (PMMA) gelöst in THF. Der dn/dc von Polystyrol ist mit einem Wert von 0,185 ml/g etwa doppelt so groß wie der dn/dc von PMMA mit einem Wert von 0,088 ml/g.

Noch komplexer wird die Interpretation der Daten, wenn man mit einem UV-Detektor arbeitet, da in diesem Fall der detektorspezifische Ansprechfaktor ϵ neben der chemischen Zusammensetzung der Probe auch noch von der verwendeten Wellenlänge abhängig ist.

Misst man ein und dieselbe Substanz, z. B. Polystyrol in THF gelöst, zuerst bei einer Wellenlänge von 280 nm und danach bei einer Wellenlänge von 254 nm, dann wird man trotz gleicher Konzentration bei den beiden unterschiedlichen Wellenlängen unterschiedliche Signalhöhen erhalten, da die Extinktionskoeffizienten von Polystyrol bei 280 nm und 254 nm unterschiedlich sind.

Unterschiedliche Arten von Konzentrationsdetektoren

Prinzipiell kann in der Chromatographie jeder Detektor als Konzentrationsdetektor verwendet werden, der ein zur Konzentration einer Probe proportionales Detektorsignal liefert. Neben den bereits erwähnten Brechungsindexdetektoren und UV-Detektoren werden oft auch Fluoreszenzdetektoren oder Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektoren (ELSD = Evaporative Light Scattering Detector) als Konzentrationsdetektoren verwendet. Auch bei diesen Detektoren gibt es neben der Konzentration einen zweiten, detektorspezifischen Ansprechfaktor der das resultierende Messsignal beeinflusst.

Während es im Fall des Brechungsindexdetektors umfangreiche Literatur und Tabellen zu den dn/dc -Werten verschiedener Materialien gibt, sind die ϵ -Werte die man für die Interpretation eines UV-Signals benötigt eher unbekannt. Lediglich im Bereich der Proteine und Antikörper sind diese Werte halbwegs bekannt, da diese Substanzen aus einer begrenzten Anzahl von Nukleinsäuren bestehen, deren Extinktionskoeffizienten bekannt sind. Kennt man daher die Nukleinsäuresequenz eines Proteins, dann kann man den ϵ -Wert des Proteins anhand der bekannten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleinsäuren berechnen.

Weitestgehend unbekannt sind die detektorspezifischen Ansprechfaktoren vieler Substanzen bei der Fluoreszenzdetektion oder

der ELSD-Detektion. Im Fall der Fluoreszenzdetektion hängt der detektorspezifische Ansprechfaktor einer Probe sowohl von der Anregungswellenlänge als auch von der Emissionswellenlänge und natürlich auch von der chemischen Zusammensetzung der Probe ab.

Korrekte Bestimmung der Probenkonzentration ohne Kenntnis des detektorspezifischen Ansprechfaktors

Natürlich kann man trotz der aufgeführten Problematik die Konzentration einer Probe mit jedem Konzentrationsdetektor bestimmen, ohne den detektorspezifischen Ansprechfaktor zu kennen. Dazu muss der Detektor nur mit einer Probe mit bekannter Konzentration kalibriert werden. Danach kann die Konzentration einer Probe mit gleicher chemischer Zusammensetzung bestimmt werden, wie es bereits zu Beginn des zweiten Abschnitts beschrieben wurde: Ein doppelt so großer Peak bedeutet eine doppelt so große Konzentration.

Oder einfacher ausgedrückt: Wenn man einen Brechungsindexdetektor mit einer in THF gelösten Polystyrolprobe mit bekannter Konzentration kalibriert, dann kann man die Konzentrationen von anderen in THF gelösten Polystyrolproben bestimmen. In diesem Fall ist der detektorspezifische Ansprechfaktor konstant; er wird quasi ein Teil der Kalibrierkonstante und sein absoluter Wert ist dadurch unerheblich.

Die Bestimmung der Konzentration von Proben, die eine andere chemische Zusammensetzung als der Kalibrierstandard und somit auch einen anderen dn/dc -Wert aufweisen, ist mit dieser Methode aber nicht möglich. Gleiches gilt auch für alle anderen Konzentrationsdetektoren.

Bestimmung des detektorspezifischen Ansprechfaktors einer Probe

Man kann auch den detektorspezifischen Ansprechfaktor einer Probe bestimmen. Dazu muss der Kalibrierfaktor des Konzentrationsdetektors wiederum mit einer Probe mit bekannter Konzentration und mit bekanntem detektorspezifischem Ansprechfaktor bestimmt werden. Im Fall des RI-Detektors kann man den Detektor z. B. mit einer in THF gelösten Polystyrolprobe kalibrieren; hier ist der detektorspezifische Ansprechfaktor der dn/dc -Wert, der für Polystyrol in THF 0,185 ml/g beträgt. Misst man nun eine andere Probe mit bekannter Konzentration, dann kann man mit dem bekannten Kalibrierfaktor und der ebenfalls bekannten Konzentration den unbekanntem detektorspezifischen Ansprechfaktor bestimmen:

$$dn/dc = RI\text{-Signal} / (RI\text{-Kalibrierfaktor} \times \text{Konzentration}) \quad [2]$$

Ein Beispiel: Würde man den RI-Detektor mit in THF gelöstem Polystyrol mit einer Konzentration von 1 mg/ml kalibrieren und danach eine ebenfalls in THF gelöste PMMA-Probe mit derselben Konzentration messen, dann wäre das Signal der PMMA-Probe nur ca. halb so groß wie das der Polystyrolprobe und daraus würde ein ebenfalls nur etwa halb so großer dn/dc -Wert für PMMA resultieren.

Eigenschaften der detektorspezifischen Ansprechfaktoren bei Proben mit Molekulargewichts- und Partikelgrößenverteilungen

Wenn man Proben analysiert, die eine Verteilung aufweisen, wie z. B. Polymere und Biopolymere die eine Molekulargewichtsverteilung besitzen oder Nanopartikel die eine Partikelgrößenverteilung aufweisen, dann stellt sich die Frage, ob die detektorspezifischen Ansprechfaktoren über der Verteilung konstant sind oder sich ändern. Je nach Art der Probe kann dies sehr unterschiedlich sein.

Polymere und Biopolymere (Polysaccharide):

Bei Homopolymeren ist z. B. der dn/dc -Wert des Brechungsindexdetektors ein konstanter Wert über der Molekulargewichtsverteilung. Wenn ein bestimmtes Molekulargewicht erreicht ist, ändert sich der dn/dc -Wert nicht mehr mit weiter ansteigendem Molekulargewicht. Nur bei sehr kleinen Molekulargewichten kann sich der dn/dc -Wert der Probe ggf. ändern da hier Endgruppeneffekte mehr an Bedeutung gewinnen (siehe Abbildung 2).

Bei Copolymeren muss man zwischen homogenen und heterogenen Proben unterscheiden. Ist die Zusammensetzung des Copolymers über dem Molekulargewichtverlauf homogen, dann ist der dn/dc -Wert konstant. Ist die Zusammensetzung des Copolymers über dem Molekulargewichtverlauf aber heterogen, d. h. ändert sich das Verhältnis von Komponente A zu Komponente B mit steigendem Molekulargewicht, dann ändert sich auch der dn/dc -Wert. Dies muss bei der Analyse der Probe berücksichtigt werden; zur Analyse der korrekten Molekulargewichtsverteilung muss mit einem sich ändernden dn/dc -Wert gerechnet werden.

Nanopartikel:

Bei Nanopartikeln ist der detektorspezifische Ansprechfaktor sowohl im Fall des Brechungsindexdetektors als auch im Fall des UV-Detektors bei den meisten Proben von der Größe der Partikel abhängig, da in diesem Fall neben der Absorption oder

Ablenkung des Lichtes auch noch Streueffekte hinzukommen.

Polyelektrolyte und biologische Makromoleküle (Proteine, Antikörper) in wässrigen Laufmitteln:

Bei Polyelektrolyten (z. B. Polyacrylsäuren) und biologischen Makromoleküle die in wässrigen Laufmitteln analysiert werden, ist der dn/dc -Wert der Probe oft vom pH-Wert des Lösungs- bzw. Laufmittels abhängig, da dieser den Dissoziationsgrad der Probe beeinflusst.

Fazit

Konzentrationsdetektoren sind im Bereich der Chromatographie die am häufigsten verwendeten Detektoren. Ihr Ansprechverhalten ist direkt proportional zur Konzentration einer Probe, daher scheint Ihr Einsatz nur geringe Anforderungen an den Anwender zu stellen.

Wenn der Anwender aber nicht weiß, dass es bei jedem Konzentrationsdetektor neben der Konzentration noch einen zweiten, detektor-spezifischen Ansprechfaktor gibt, der das Signal des Detektors ebenfalls beeinflusst und der unter anderem von der chemischen Zusammensetzung einer Probe abhängig ist (und ggf. auch noch von weiteren Parametern wie z. B. dem pH-Wert des Eluenten, der verwendeten Wellenlänge bei einem UV-Detektor oder Fluoreszenzdetektor oder der Zusammensetzung von Copolymeren und der Größe von Nanopartikeln), dann kann es sehr schnell zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse kommen. Es könnte z. B. angenommen werden, dass zwei Substanzen die nacheinander eluieren und einen gleich großen Peak im Konzentrationsdetektor erzeugen auch die gleiche Konzentration aufweisen. Diese Annahme ist aber nur dann korrekt, wenn sie auch denselben detektorspezifischen Ansprechfaktor besitzen, was aber wiederum nur stimmt, wenn sie chemisch identisch und ggf. (im Fall von Nanopartikel) gleich groß sind. Man kann daher sehr schnell zu falschen Resultaten gelangen wenn man diese Details nicht beachtet.

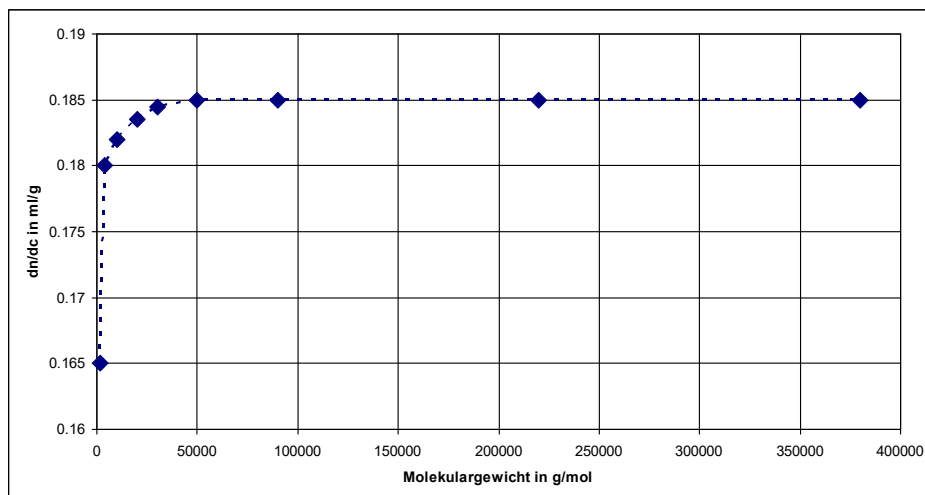


Abb. 2: dn/dc -Wert von Polystyrol in Abhängigkeit vom Molekulargewicht aus „Characterisation of Copolymers“, RAPRA Technology Limited, May 1995, Authors: D. T. Gillespie, H. K. Hammons, J. Li, Viscotek Corp., Houston, Texas/USA