

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 28

Differentielle und Kumulative Molekulargewichtsverteilungen

Problemstellung

Wir betreiben eine GPC/SEC-Anlage mit Dreifachdetektion. Arbeiten wir nur mit dem Brechungsindexdetektor und kalibrieren gegen Polymerstandards, dann erhalten wir immer sehr schöne, weitestgehend gaussförmige differentielle Molekulargewichtsverteilungen. Wenn wir den Lichtstreuendetektor verwenden, dann sind die differentiellen Molekulargewichtsverteilungen zum Teil sehr gekrümmt oder sie enden nicht auf der Basislinie.

Frage

Wie werden differentielle und kumulative Molekulargewichtsverteilungen erzeugt und welche Aussagekraft haben diese Grafiken? Warum sehen die Molekulargewichtsverteilungen teilweise sehr unschön aus, wenn man mit der Lichtstreuung arbeitet und wie kann man dieses Problem beheben?

Lösung

Jede Polymer- und Biopolymerprobe enthält Moleküle mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Nur Proteinproben sind weitestgehend monodispers bzw. uniform. Das Maß für die Verteilungsbreite einer Polymerprobe ist die Polydispersität (Quotient aus M_w/M_n). Die Verteilung der Molekulargewichte in einer polymeren Probe wird entweder in einer differentiellen Auftragung oder in einer kumulativen Auftragung abgebildet (Abb. 1 a und b). Aus der differentiellen Auftragung, die meist einem gaußförmigen Peak ähnelt, ist schnell ersichtlich, welche Molekülmassen am häufigsten in der Probe vertreten sind, aus der kumulativen Auftragung die in einer S-förmigen Auftragung von 0 bis 100 % geht kann man hingegen schnell erkennen, wie viel Prozent einer Probe oberhalb bzw. unterhalb einer bestimmten Molekülmasse liegen. Beide Auftragungen haben daher Ihre Berechtigung.

Arbeitet man nur mit Brechungsindexdetektion und einer Kalibrierkurve die z. B. mit eng verteilten Polymerstandards erstellt wurde, dann werden die

Molekulargewichtsverteilungen der Proben aus der in den meisten Fällen weitestgehend linear verlaufenden Kalibrierkurve abgeleitet. Somit erhält man praktisch immer sehr schöne, nahezu gaussförmige differentielle Verteilungen. Arbeitet man hingegen mit der Lichtstreuendetektion, dann erhält man bei manchen Proben sehr unschöne differentielle Verteilungen die teilweise stark gekrümmt sind oder nicht auf der Basislinie enden (Abb. 2a). Die Ursache dafür sind chromatographische Probleme. Wenn ein Teil der Probe auf der Trennsäule absorbiert und somit verspätet eluiert, dann ist der Verlauf des Molekulargewichtes über dem Retentionsvolumen nicht linear, sondern man beobachtet oft zu höheren Elutionsvolumen wieder einen Anstieg der Molekulargewichte. Ursache hierfür sind hochmolekulare Probenanteile, die aufgrund der beschriebenen Wechselwirkungen mit dem Material der Trennsäule zu spät eluieren (Abb. 2a). Ein derart gekrümmter Verlauf des Molekulargewichtes über dem Elutionsvolumen kann nicht vernünftig in eine differentielle Molekulargewichtsverteilung umgerechnet werden, da es nun zwei Punkte in der Verteilung mit gleichem Molekulargewicht gibt. Dies führt zu den Effekten der seltsamen Krümmung in der Verteilung oder dem Abbrechen der Verteilungskurve oberhalb der Basislinie.

Der GPC/SEC-Anwender hat nun zwei Möglichkeiten dieses Problem zu beheben: Entweder optimiert man die chromatographischen Bedingungen so, dass man eine weitestgehend wechselwirkungsfreie Chromatographie erreicht und der Verlauf des Molekulargewichtes über dem Retentionsvolumen linear ist oder man nutzt die Möglichkeiten der digitalen Datenverarbeitung und erzeugt einen solchen linearen Verlauf virtuell (Abb. 2b). Viele GPC/SEC-Softwarepakete ermöglichen es dem Anwender, den Verlauf des Molekulargewichtes über dem Retentionsvolumen mit einer mathematischen Anpassung zu verändern. Im einfachsten Fall ist dies eine lineare Anpassung, aus der dann wiederum problemlos eine schöne und nahezu gaussförmige differentielle Molekulargewichtsverteilung berechnet werden kann. Wichtig ist auch zu wissen dass manche Softwarepakete

diese lineare Anpassung automatisch machen und somit immer sehr schöne Molekulargewichtsverteilungen resultieren wobei aber die ursprünglichen Messdaten verändert werden. Die OmniSEC-Software von Viscotek, a Malvern company hingegen zeigt immer zuerst die Rohdaten und überlässt es dann dem Anwender, in welcher Form er diese Daten zur besseren Anschaulichkeit verändern möchte.

Schlussfolgerung

Da polymere Proben (abgesehen von Proteinen) immer aus Molekülen mit verschiedenen Molekulargewichten bestehen ist es sinnvoll eine Verteilung der Molekulargewichte grafisch darzustellen. Dies kann in einer differentiellen und einer kumulativen Form geschehen. Beide Abbildungen sind sinnvoll und geben unterschiedliche Informationen.

Da im Fall der Säulenkalibrierung die Molekulargewichtsverteilungen immer aus den weitestgehend linearen Kalibrierkurven abgeleitet werden erhält man hier im Fall der differentiellen Verteilungen meist gaussförmige Kurven. Wird mit einem Lichtstreuendetektor gearbeitet dann erhält man absolute Molekulargewichte. Sind Wechselwirkungen zwischen Probe und Material der Trennsäule vorhanden, dann ist der Verlauf der Molekulargewichte über dem Retentionsvolumen nicht linear was eventuell zu stark gekrümmten und sehr unschönen differentiellen Molekulargewichtsverteilungen führen kann. Dieses Problem kann entweder über eine Optimierung der chromatographischen Bedingungen gelöst werden oder über einen Fit der Messdaten z. B. an eine lineare Funktion.

Autor:

Dr. Gerhard Heinzmann,
Viscotek, a Malvern company

Für weitere Informationen können Sie jederzeit sehr gerne Kontakt zu uns aufnehmen!

Abb.1: Differentielle und Kumulative Molekulargewichtsverteilung (MWD)

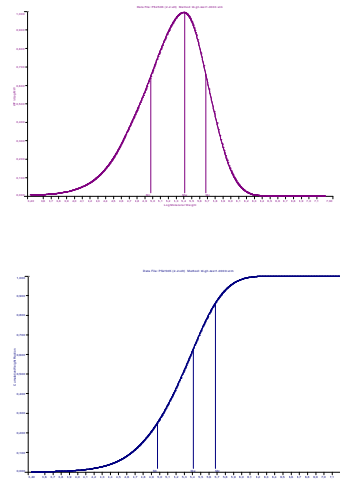


Abb.2: Differentielle MWD mit und ohne linearen Fit

