



GPC/SEC mit Dreifachdetektion: Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 33

Wofür wird der dA/dc-Wert einer makromolekularen Probe benötigt?

Problemstellung

Wir betreiben eine GPC/SEC-Anlage mit Vierfachdetektion (Lichtstreuung, Viskositätsdetektion, Brechungsindexdetektion und UV-Detektion). In der Software wird bei bestimmten Auswertemethoden unter anderem auch nach einem dA/dc-Wert für den Kalibrierstandard und die Probe gefragt.

Frage

Wofür wird der dA/dc-Wert einer makromolekularen Probe benötigt und wie kann man ihn bestimmen?

Antwort

Im Bereich der GPC/SEC werden je nach Anwendung verschiedene Konzentrationsdetektoren verwendet. Im Polymer- und Biopolymerbereich (Polysaccharide) wird überwiegend ein Brechungsindexdetektor eingesetzt, im Bereich der Proteinanalytik wird überwiegend ein UV-Detektor eingesetzt. Es ist wichtig zu wissen dass diese Detektoren nicht nur auf die Konzentration einer makromolekularen Probe ansprechen sondern dass es für jeden Konzentrationsdetektor einen zweiten, detektorspezifischen Parameter gibt der für die Fläche des Detektorsignals maßgeblich ist. Im Fall des Brechungsindexdetektors ist dies der dn/dc-Wert (Änderung des Brechungsindex der Probe über deren Konzentration):

Signal Brechungsindexdetektor (RI) = K_{RI} x dn/dc x Konzentration

Im Fall des UV-Detektors hingegen ist dies der dA/dc-Wert (Änderung der Absorption der Probe über deren Konzentration):

Signal UV-Detektor (UV) = K_{UV} x dA/dc x Konzentration

Während die dn/dc-Werte für viele Polymere in verschiedenen Lösungsmitteln gut bekannt und in der Literatur aufgeführt sind gilt dies nicht für die dA/dc-Werte. Man kann aber den dA/dc-Wert einer Probe genauso aus dem Signal des UV-Detektors bestimmen wie dies auch für den dn/dc-Wert und das Signal des Brechungsindexdetektors gilt: Man kalibriert den UV-Detektor mit einem Standard mit bekanntem dA/dc-Wert und bestimmt dann aus der Fläche des UV-Peaks den dA/dc-Wert der Probe unter Kenntnis der exakten Probenkonzentration. Das Problem ist aber oft dass kein Standard mit bekanntem dA/dc zur Verfügung steht. Daher wird meist für den Standard ein willkürlicher dA/dc-Wert verwendet und der dA/dc-Wert der Probe(n) relativ dazu bestimmt. Dieses Vorgehen ist ausreichend exakt um z. B. eine Copolymeranalyse (GPC Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 11) durchführen zu können.

Sehr viel exakter kann man hingegen den dA/dc-Wert von Proteinen bestimmen. Der dA/dc-Wert eines Proteins ist definiert als der Quotient des molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins geteilt durch das Molekulargewicht des Proteins. Da diese beiden Werte für viele Proteinproben bekannt bzw. gut bestimmbar sind kann auch der dA/dc-Wert gut bestimmt werden. Dies ist bei Proteinen wichtig wenn man mit UV-Detektion und Lichtstreuung arbeitet da im Fall der Proteine sehr oft die Probenkonzentrationen sehr ungenau sind und daher über den Konzentrationsdetektor bestimmt werden müssen.

Fazit

Jeder Konzentrationsdetektor der in der GPC/SEC verwendet wird hat einen zweiten, detektorspezifischen Parameter der neben der Probenkonzentration für die Fläche des Detektorsignals maßgeblich ist. Im Fall des UV-Detektors ist dies der dA/dc-Wert. Um die Konzentration einer Probe aus der Fläche des UV-Peaks bestimmen zu können muss der dA/dc-Wert bekannt sein. Umgekehrt kann der dA/dc-Wert aus dem UV-Peak bestimmt werden wenn die Konzentration der Probe bekannt ist und die Wiederfindungsrate 100% beträgt. Für Proteinproben kann der dA/dc-Wert aus dem molaren Extinktionskoeffizienten und dem Molekulargewicht des Proteins berechnet werden. Der dA/dc-Wert wird unter

anderem auch für die Zusammensetzungsanalyse von Copolymeren und Konjugaten benötigt (siehe GPC Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 11).

Abb.1:

GPC/SEC-System mit Vierfach-detektion (Lichtstreuung, Viskositätsdetektion, Brechungsindexdetektion und UV-Detektion)



Autor:

Dr. Gerhard Heinzmann

Malvern Instruments GmbH

Tel: +49 (0)7032 9777 0

Fax: +49 (0)7032 77854

e-mail: gerhard.heinzmann@malvern.com

[Weitere Informationen zu](#)

[Viscotek GPC / SEC Systemen von Malvern](#)

