

Verwendung von Lichtstredetektoren in der Gelpermeationschromatographie

Gerhard Heinzmann

Grundlagen der Lichtstreuung

Die konventionelle GPC/SEC-Technologie versagt völlig, wenn die Proben strukturell anspruchsvoller werden. Bei verzweigten Proben kann man nicht mehr sagen, ob eine Verschiebung im Elutionsvolumen einer Probe auf eine Änderung der Verzweigungsstruktur oder auf eine Änderung des Molekulargewichtes zurück zu führen ist. Ebenso kann eine Verschiebung im Elutionsvolumen bei Copolymeren auf eine veränderte Copolymerzusammensetzung oder ein verändertes Molekulargewicht zurückzuführen sein.

Um derartige Fragen zu klären müssen weiterführende Detektoren wie Lichtstredetektoren oder Viskositätsdetektoren eingesetzt werden.

Physikalische Grundlage für die statische Lichtstreuung ist die Rayleigh-Gleichung:

Gleichung 1

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \frac{1}{(M_w \times P_{\theta})} + 2A_2 \times C$$

K = Konstante

C = Konzentration

R_{θ} = Streulicht beim Winkel θ

P_{θ} = Strukturfaktor

A_2 = Zweiter Virialkoeffizient

M_w = nach dem Gewicht gemittelttes mittleres Molekulargewicht

Die Fläche des Peaks in der Lichtstreuung ist direkt proportional zum Molekulargewicht der Probe. Da der zweite Virialkoeffizient (A_2 -Wert) sowie die Konzentration der Probe an jedem Punkt des Chromatogramms sehr gering sind wird der gesamte zweite Term in aller Regel vernachlässigt. Der Aufbau eines Lichtstredetektors ist vom Prinzip her sehr einfach: eine Laserdiode strahlt in eine Messzelle und das Streulicht wird bei einem beliebigen Winkel gemessen. Der einfachste Fall ist die Rechtwinkelmessung. Hier wird die Photodiode, die zur Messung des Streulichtes eingesetzt wird, bei einem Winkel von 90° eingebaut. Dadurch werden Brechungseffekte beim Glasdurchgang vermieden und

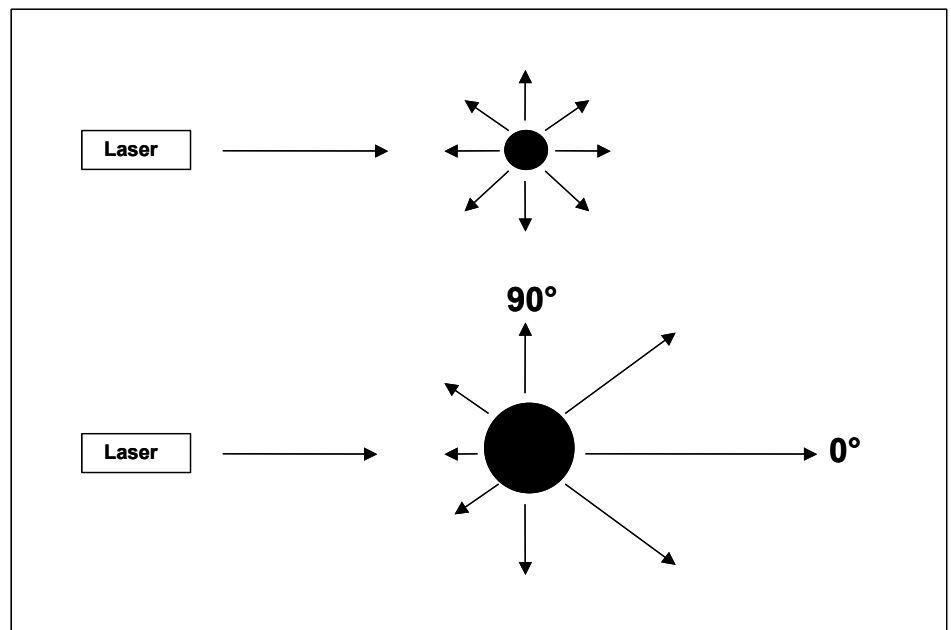


Abb. 1: Streulichtverteilung bei kleinen und bei großen Molekülen

man erhält ein hervorragendes Signal zu Rausch Verhältnis. Als Messzelle kann eine normale Fluoreszenzzelle verwendet werden.

Diese 90° -Lichtstreuung (RALS = Right Angle Light Scattering) kann für eine Vielzahl an Molekülen problemlos eingesetzt werden. Vor allem im Bereich der globulären Proteine ist sie weit verbreitet. Überschreiten die zu messenden Moleküle aber eine bestimmte Größe, dann tritt eine winkelabhängige Streulichtverteilung auf, die eine einfache Messung bei 90° nicht mehr möglich macht (Abbildung 1).

Bei Molekülen die eine Größe von ca. $1/20$ der verwendeten Laserwellenlänge überschreiten tritt eine unsymmetrische Streulichtverteilung auf. Das volle Streulicht der Probe kann jetzt nur noch in Vorwärtsrichtung bei einem Winkel von Null Grad gemessen werden. Ursache dafür ist die Tatsache, dass der Laserstrahl nun mehrere Streuzentren im Molekül finden kann und somit eine Interferenz auftritt die das Streulicht zu höheren Winkeln hin abschwächt.

Bei einer typischen Laserwellenlänge von 670 nm trifft dies für Moleküle zu die eine Größe von ca. 30 nm und somit einen Radius

von ca. 15 nm überschreiten. Bezüglich des Molekulargewichtes bedeutet dies z. B. für lineare Polystyrolmoleküle, dass ab einem Molekulargewicht von ca. 100.000 D das Streulicht eine Winkelabhängigkeit aufweist. Für Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 100.000 D ist die Streulichtverteilung in alle Raumrichtungen isotropisch. Daher können alle Proben mit einem Molekulargewicht von weniger als 100.000 D problemlos mit einem reinen Rechtwinkel-Lichtstredetektor vermessen werden. Erst wenn die Moleküle signifikant größer werden müssen weitere Messwinkel hinzugezogen werden. Im Fall von verzweigten Molekülen oder globulären Proteinen verschiebt sich die Molekulargewichtsgrenze der isotropen Streuung deutlich nach oben hin zu höheren Molekulargewichten.

Für Moleküle die deutlich größer sind als $1/20$ der verwendeten Laserwellenlänge gibt es mehrere Möglichkeiten, um das exakte Molekulargewicht mit der Lichtstreuung bestimmen zu können. Entweder man misst das Streulicht bei einem möglichst kleinen Winkel der nahe Null Grad liegt (Kleinwinkel-Lichtstreuung, LALS = Low Angle Light Scattering) oder man misst das Streulicht bei

möglichst vielen Winkeln, um möglichst exakt auf den Winkel Null Grad extrapolieren zu können (Mehrwinkel-Lichtstreuung, MALS = Multi Angle Light Scattering). Beide Techniken sind kommerziell verfügbar. Ein Vorteil der MALS-Geräte ist, dass sie zusätzlich zum Molekulargewicht aus der Anfangssteigung der winkelabhängigen Streulichtverteilung den Trägheitsradius der Moleküle bestimmen und somit Informationen über die Verzweigungsstruktur eines Moleküls ermitteln können. Die LALS-Geräte hingegen messen das Molekulargewicht einer Probe direkt, ohne auf eine Extrapolation der Messdaten angewiesen zu sein und sind damit physikalisch gesehen exakter als die MALS-Geräte.

Eine weitere Methode zur Messung großer Moleküle ist die Korrektur des Molekulargewichtes, das bei einem Winkel von 90° gemessen wird, mit den Daten eines Viskositätsdetektors (so genannte Dreifachdetektion). Einige am Markt erhältliche Softwarepakete enthalten diese Winkelkorrektur. Allerdings wird in aller Regel eine knäuel-förmige Struktur des Moleküls in Lösung vorausgesetzt, was den Anwendungsbereich dieser Technik stark einschränkt.

Bestimmung von absoluten Molekulargewichten

Arbeitet man mit einem Lichtstreuendetektor, vollkommen egal ob RALS, MALS oder LALS, dann muss man wissen, dass es zwei Parameter gibt, die für die Bestimmung des absoluten Molekulargewichtes einer Probe zwingend notwendig sind: die Konzentration der Probe und der dn/dc-Wert der Probe. Dies wird deutlich, wenn man sich das Ansprechverhalten eines Lichtstreuendetektors ansieht: (Gleichung 2)

Gleichung 2

$$\text{Fläche des Lichtstreusignals} = K_{LS} \times \text{Konzentration} \times \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \times \text{Molekulargewicht}$$

K_{LS} ist die Kalibrationskonstante des Lichtstreuendetektors. Sie kann ermittelt werden indem man entweder Toluol oder einen sehr genau charakterisierten, möglichst eng verteilten Polymerstandard (z. B. Polystyrol in THF oder Pullulan in wässrigen Laufmitteln) misst. Die Kalibrierung mit Toluol scheint physikalisch exakter zu sein da Toluol ein klar definiertes Molekül ist. Es existieren allerdings zwei Rayleigh-Verhältnisse in der Literatur von denen eines überwiegend im amerikanischen Raum verwendet wird und das andere überwiegend im europäischen Raum. Diese beiden Rayleigh-Verhältnisse unterscheiden sich um ca. 8% was z. B. erklärt, warum Polymerstandards von euro-

päischen Herstellern oft nicht mit den chemisch identischen Standards von amerikanischen Herstellern übereinstimmen. Daher ist die Kalibrierung mit einem eng verteilten Polymerstandard eher zu empfehlen, zumal in diesem Fall auch die Peakverbreiterung der Probe auf den Säulen besser erfasst und korrigiert werden kann.

Der **dn/dc-Wert** ist der sogenannte Kontrastfaktor einer Probe in einem bestimmten Lösungsmittel. Er kann ermittelt werden, indem man den Brechungsindex einer gelösten Probe über deren Konzentration aufträgt. Einer dieser beiden Parameter kann aus dem Signal eines Brechungsindexdetektors (RI = Refractive Index Detector) ermittelt werden, da das Ansprechverhalten eines Brechungsindexdetektors folgendermaßen aussieht:

Gleichung 3

$$\text{Fläche des Brechungsindexdetektors} = K_{RI} \times \text{Konzentration} \times \frac{dn}{dc}$$

Daher wird in fast allen Fällen ein Brechungsindexdetektor zusammen mit einem Lichtstreuendetektor verwendet.

Es gibt nun drei Möglichkeiten wie man das absolute Molekulargewicht einer Probe mit der Lichtstreuung bestimmen kann:

Fall 1:

Der Anwender kann sowohl die Konzentration der Probe wie auch deren dn/dc-Wert vorgeben und damit das Molekulargewicht der Probe bestimmen.

Fall 2:

Der Anwender kann die Konzentration der Probe vorgeben und den dn/dc-Wert der Probe aus dem Signal des Brechungsindexdetektors berechnen lassen.

Fall 3:

Der Anwender kann den dn/dc-Wert der Probe vorgeben und die Konzentration der Probe aus dem Signal des Brechungsindexdetektors berechnen lassen.

Betrachten wir den Fall einer Polysaccharidprobe. Polysaccharide sind meist hygroskopisch und enthalten daher oft eine unbekannte Menge an Feuchtigkeit. Nehmen wir an dass unsere Polysaccharidprobe 10% Feuchte enthält. Dann ergibt sich folgendes Bild:

Ergebnis für Fall 1:

Der Anwender wiegt eine bestimmte Menge an Probe ein ohne zu wissen, dass 10% der Probe Feuchtigkeit sind und gibt die Konzentration der Probe wie auch deren dn/dc-Wert vor. Nun berechnet die Software aus der Fläche des Lichtstreupeaks nach Gleichung 2

das Molekulargewicht der Probe. Da aber die eingewogene Konzentration aufgrund der in der Probe enthaltenen Feuchte um 10% zu hoch war, wird auch das berechnete Molekulargewicht 10% zu hoch sein (da die Konzentration im Nenner steht wenn man Gleichung 2 nach dem Molekulargewicht auflöst).

Ergebnis für Fall 2:

Der Anwender wiegt wiederum eine bestimmte Menge an Probe ein, ohne zu wissen dass 10% der Probe Feuchtigkeit sind. Unter der Annahme, dass die eingewogene Konzentration korrekt ist, lässt er den dn/dc-Wert aus dem Signal des Brechungsindexdetektors berechnen (Gleichung 3). Nun resultiert aufgrund der Feuchte ein 10% zu geringer dn/dc-Wert. Wird über die Lichtstreuung (Gleichung 2) nun das Molekulargewicht der Probe bestimmt, so wird der Fehler im Molekulargewicht noch deutlich größer als im Fall 1, da der falsche dn/dc-Wert quadratisch in die Lichtstreugleichung eingeht.

Somit führt nur Fall 3 zu einem korrekten Ergebnis:

Der Anwender wiegt wiederum eine bestimmte Menge an Probe ein, ohne zu wissen, dass 10% der Probe Feuchtigkeit sind. Da er aber den dn/dc-Wert der Probe kennt, gibt er diesen vor und lässt die Konzentration der Probe aus dem Signal des Brechungsindexdetektors berechnen. Die Software bestimmt nun die exakte Konzentration der Probe am Ort der Detektion. Somit werden die 10% Feuchte, die in der Probe enthalten sind, erkannt und es resultiert zunächst die korrekte Probenkonzentration. Mit dieser korrekten Probenkonzentration und dem ebenfalls korrekten dn/dc-Wert kann nun über die Lichtstreuung das korrekte absolute Molekulargewicht der Probe ermittelt werden.

Obwohl die Lichtstreuung oft als Absolutmethode bezeichnet wird, muss man zur Berechnung von korrekten Molekulargewichten mehrere Dinge beachten:

Der Lichtstreuendetektor muss zunächst kalibriert werden. Hierzu kann man entweder Toluol verwenden oder einen sehr genau charakterisierten, möglichst eng verteilten Polymerstandard.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes einer Probe muss sowohl deren Konzentration als auch deren dn/dc-Wert bekannt sein. Einer dieser Parameter kann aus dem Signal des Brechungsindexdetektors berechnet werden. Man muss sich daher gut überlegen, welcher dieser Parameter bei einer Probe zuverlässiger ist. Kennt man keinen der beiden Parameter, dann kann die Software auch kein Molekulargewicht berechnen. In diesem Fall kann man beispielsweise versuchen, eine möglichst exakte Probenkonzentration zu ermitteln.

tration herzustellen und dann den dn/dc -Wert zu berechnen.

Bestimmung von Trägheitsradien

Neben den absoluten Molekulargewichten kann mit der Lichtstreuung auch der Trägheitsradius (Radius of Gyration, RMS-Radius) und somit ein Maß für die Größe eines Makromoleküls in Lösung ermittelt werden. Um physikalisch in der Lage zu sein mit einem Lichtstreuendetektor den Trägheitsradius einer Probe ermitteln zu können, müssen zwingend zwei Voraussetzungen erfüllt sein:

- der Lichtstreuendetektor muss mit mindestens zwei Messwinkeln ausgestattet sein.
- die Probenmoleküle müssen eine Größe von mindestens $1/20$ der Laserwellenlänge (ca. 15 nm Trägheitsradius) aufweisen.

Sind diese beiden Voraussetzungen erfüllt, dann bewegt man sich im Bereich der winkelabhängigen Lichtstreuung (siehe Abbildung 1). Trägt man das Messsignal der verschiedenen Winkel über den Messwinkeln auf, dann kann man eine Extrapolation auf den Messwinkel Null Grad durchführen (Abbildung 2). Aus dem Schnittpunkt der Extrapolation beim Winkel Null Grad kann nun die Streulichtintensität bei dem Winkel Null Grad und daraus das absolute Molekulargewicht bestimmt werden. Zusätzlich kann aus der Anfangssteigung dieser Extrapolation der Trägheitsradius der Probe ermittelt werden.

Wie schon unter „Grundlagen der Lichtstreuung“ beschrieben, ist eine solche Extrapolation der Messdaten erst ab einer Molekülgröße von ca. 30 nm möglich. Dies entspricht einem Molekulargewicht von mindestens 100.000 D bei knäueförmigen Polymermolekülen. Daher ist unterhalb von einem Molekulargewicht von mindestens 100.000 D die Mehrwinkellichtstreuung nicht sinnvoll einsetzbar. In diesem Molekulargewichtsbereich wird immer mit einem einzigen Messwinkel gearbeitet, der üblicherweise bei 90° liegt.

Im Bereich von ca. 100.000 g/mol bis ca. 500.000 g/mol ist die Winkelabhängigkeit des gestreuten Lichtes meist gut mit einer linearen Anpassung zu beschreiben. Daher genügen für die Bestimmung der absoluten Molekulargewichte in diesem Molekulargewichtsbereich zwei Messwinkel die an beliebigen Stellen sein können. Meist wird ein 90° Winkel und ein zweiter, kleinerer Messwinkel verwendet.

Wenn die zu untersuchenden Moleküle größer werden und ein Molekulargewicht von 500.000 D überschreiten, dann kann die Winkelabhängigkeit des Streulichtes nicht

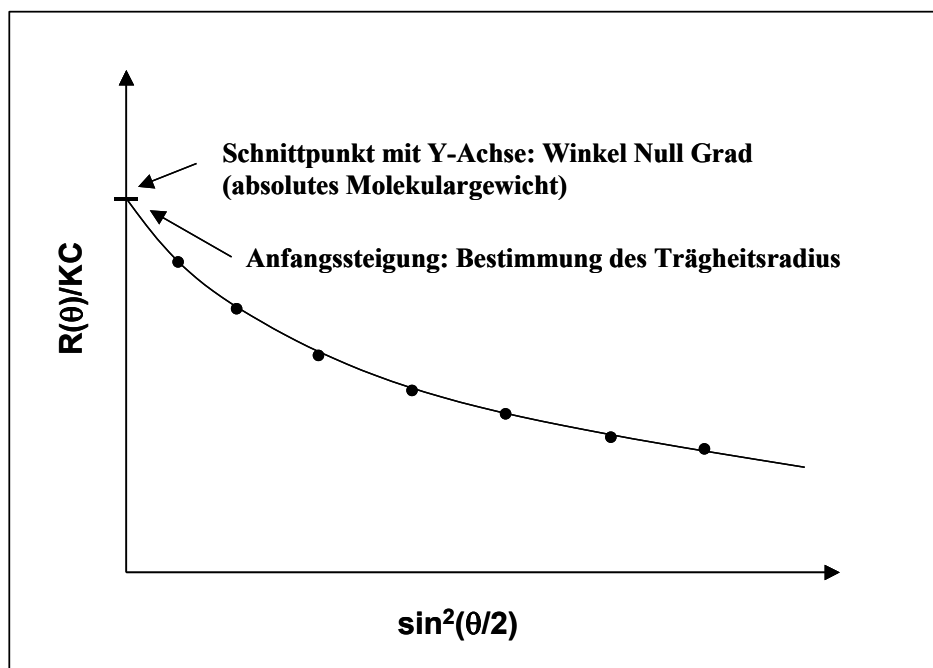


Abb. 2: Bestimmung der Trägheitsradien mit Mehrwinkel-Lichtstreuung

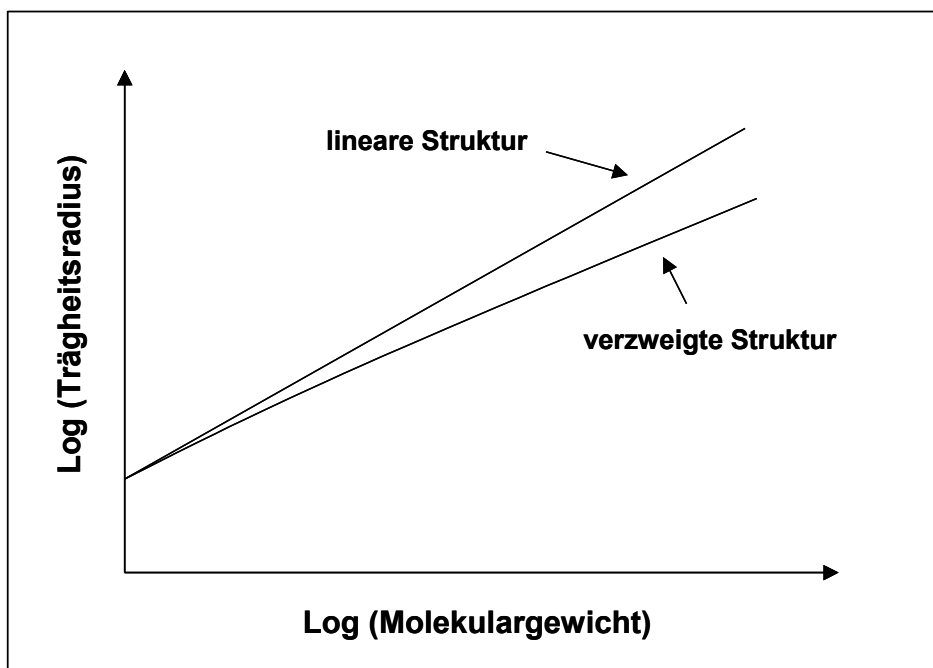


Abb. 3: Konformationsplot

mehr mit einer linearen Funktion angepasst werden sondern es muss eine gekrümmte Funktion verwendet werden (Abbildung 2). Je größer die Moleküle werden umso stärker wird die Krümmung der Winkelabhängigkeit. Die verschiedenen am Markt verfügbaren Softwarepakete bieten Funktionen zur mathematischen Anpassung der Messdaten und somit zur Bestimmung der absoluten Molekulargewichte und Trägheitsradien der Proben an.

Bestimmung von Verzweigungsstrukturen

Ausgehend von den Trägheitsradien und der Molekulargewichtsverteilung einer Probe, kann nun über die Zimm-Stockmayer-Theorie [1] der Verzweigungsgrad einer makromolekularen Probe ermittelt werden. Dazu wird eine verzweigte Probe mit einer linearen Probe gleicher chemischer Zusammensetzung verglichen. Graphisch wird der Logarithmus des Trägheitsradius über dem Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen (Konformationsplot; Abbildung 3).

Es wird zunächst ein g-Faktor definiert, der die Verhältnisse der Trägheitsradien der

verzweigten Probe und der Trägheitsradien der linearen Probe bei gleichem Molekulargewicht bestimmt:

Gleichung 4

$$g = \frac{R_g(\text{verzweigt})}{R_g(\text{linear})}$$

bei gleichem Molekulargewicht

Die Zimm-Stockmayer-Theorie definiert nun verschiedene Gleichungen um aus dem g-Faktor (Verhältnisse der Trägheitsradien) für verschiedene Polymerarchitekturen eine Verzweigungszahl (B_n) oder eine Anzahl an Armen (f) zu bestimmen. Einige der am häufigsten verwendeten Beispiele sind:

sternförmige Verzweigungen; f = Anzahl der Arme:

Gleichung 5

$$g = \frac{(3f - 2)}{f^2}$$

trifunktional, monodispers; B_n = Anzahl der Verzweigungen:

Gleichung 6

$$g = \left(\left(1 + \frac{B_n}{7} \right)^{1/2} + \left(\frac{4B_n}{9} \right) \right)^{-1/2}$$

trifunktional, polydispers; B_n = Anzahl der Verzweigungen:

Gleichung 7

$$g = \frac{6}{B_n} \times \left[\frac{1}{2} \times \left(\frac{2 + B_n}{B_n} \right)^{1/2} \times \ln \left(\frac{(2 + B_n)^{1/2} + B_n^{1/2}}{(2 + B_n)^{1/2} - B_n^{1/2}} \right) - 1 \right]$$

Für sternförmig verzweigte Polymere resultiert eine Anzahl an Armen, für willkürlich verzweigte Polymere eine Anzahl an Verzweigungen. Die Anzahl an Verzweigungen kann dann über dem Molekulargewichtsverlauf aufgetragen werden.

Wird noch eine Wiederholeinheit definiert dann kann auch eine Verzweigungsfrequenz ermittelt werden. Definiert man beispielsweise für den Fall des Polyethylens eine Wiederholeinheit von 14.000 dann entspricht dies 1000 Monomereinheiten zu je 14 g/mol und die Verzweigungsfrequenz kann dann als Verzweigungen pro 1000 Monomereinheiten interpretiert werden. Natürlich wird die absolute Anzahl an Verzweigungen immer mit dem Molekulargewicht zunehmen, die Verzweigungsfrequenz hingegen kann zu- oder abnehmen ja nachdem ob das Polymermolekül schneller in der Hauptkette wächst oder ob mehr Verzweigungen eingebaut werden.

Literatur

[1] Zimm, B. H., Stockmayer, W. H.; *J. Chem. Phys.*, 17, 1301, (1949)