

Viskositätsdetektion und Dreifachdetektion in der Gelpermeationschromatographie

Gerhard Heinzmann

Grundlagen der Viskositätsdetektion

Ein oft in der GPC/SEC verwendeter Detektor ist der Viskositätsdetektor. Er bestimmt die Intrinsic Viskosität $[\eta]$ einer makromolekularen Probe, auch Staudinger-Index oder Grenzviskositätszahl genannt. Die Intrinsic Viskosität steht in reziproker Relation zur Dichte eines Makromoleküls:

$$[\eta] = \frac{1,67}{\delta}$$

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Geräte zur Messung der Intrinsic Viskosität auf den Markt gebracht. Alle diese Geräte basieren auf der Messung des hydrodynamischen Rückdrucks den eine Probe erzeugt, wenn sie durch eine sehr dünne, analytische Kapillare gepresst wird.

Die einfachsten Geräte waren so genannte „Single Capillary“ Detektoren die den Rückdruck in einer einzigen Messkapillare bestimmten. Da bei diesen Gerätetypen aber sämtliche Störungen von außen wie z. B. Pumpenpulsationen das Messsignal verfälschten, wurden diese Geräte nie erfolgreich eingesetzt. Bessere Resultate lassen sich mit „Dual Capillary“ Systemen erzeugen wobei in diesem Fall die Probe nur durch eine der beiden Messkapillaren läuft und das Signal der zweiten Kapillare zur Referenzbildung verwendet wird. Damit können störende Signale von außen weitestgehend kompensiert werden und es resultiert ein verwendbares Viskositätssignal.

Das am besten bewährte Prinzip der Viskositätsmessung ist das Prinzip des Vierkapillar-Viskositätsdetektors mit ausbalancierter Viskositätsmessbrücke. Dieses Messprinzip wurde zu Beginn der achtziger Jahre von Max Haney, dem Gründer der Firma Viscotek Corporation in Houston Texas/USA, in den Markt eingeführt [1]. Es beruht auf dem Prinzip der Wheatston'schen Brückenschaltung in der Elektrotechnik: Es werden vier Messkapillaren verwendet wobei der Widerstand einer Messkapillare durch ein so genanntes Verzögerungsvolumen verändert wird (Abbildung 1). Mit dieser Technik kann der hydrodynamische Rückdruck einer Probe sehr empfindlich gemessen werden und somit die

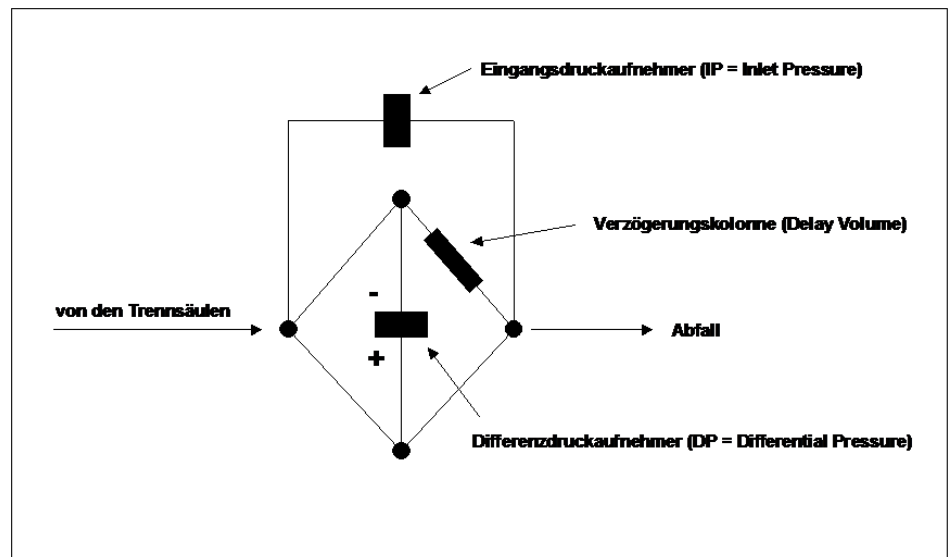


Abb. 1 Vierkapillar-Viskositätsdetektor

Intrinsic Viskosität der Probe bestimmt werden.

Das Messprinzip des Vierkapillar-Viskositätsdetektors beruht auf einer ausbalancierten Kapillarbrücke mit zwei Ästen; einem positiven Ast der nur aus einer dünnen Kapillare besteht und einem negativen Ast der ebenfalls aus einer dünnen Kapillare und einem sogenannten Verzögerungsvolumen (Delay Volume) besteht. Zwischen den beiden Ästen der Kapillarbrücke befindet sich ein sehr sensibler Druckaufnehmer (als Differenzdruckaufnehmer oder DP (Differential Pressure Transducer) bezeichnet) der den Druckunterschied zwischen dem positiven und negativen Ast der Brücke misst. Wenn reines Lösungsmittel in beiden Ästen fließt dann ist der Flusswiderstand in beiden Ästen identisch und die Druckdifferenz zwischen den Ästen damit gleich Null.

Fließt nun die Probe durch das System dann erzeugt sie im oberen negativen Ast der Brücke nahezu keinen Rückdruck, da sie sich in das vergleichsweise große Volumen der Verzögerungssäule ausbreiten kann. Gleichzeitig erzeugt die Probe aber in der sehr engen Messkapillare im unteren positiven Ast der Brücke einen recht hohen Rückdruck, so dass ein positiver Druckpeak erzeugt wird. Aus diesem Peak kann nun, unter Kenntnis

des gleichzeitig mit einem zweiten Druckaufnehmer (IP = Inlet Pressure oder Eingangsdrukaufnehmer) gemessenen Eingangsdruks über der gesamten Brücke und unter Kenntnis der Probenkonzentration, zunächst die relative Viskosität der Probe und durch eine Extrapolation der Konzentration auf den Wert Null letztendlich die Intrinsic Viskosität der Probe bestimmt werden.

Universelle Kalibrierung

Eine der wichtigsten Anwendungen der Viskositätsdetektion in der GPC/SEC ist die Universelle Kalibrierung. Bei dieser Technik wird der Viskositätsdetektor zusammen mit einem Brechungsindexdetektor verwendet.

Der Brechungsindexdetektor bestimmt die Konzentration einer Probe an jedem Punkt des Elutionsvolumens und der Viskositätsdetektor bestimmt gleichzeitig die Intrinsic Viskosität der Probe an jedem Punkt des Elutionsvolumens.

Da beide Detektoren keinen Rückdruck erhalten dürfen, werden der Brechungsindexdetektor und der Viskositätsdetektor in der Regel parallel zueinander aufgebaut. Sie müssen nicht exakt zur gleichen Zeit auf die Probe ansprechen; der zeitliche Unterschied im Ansprechverhalten der beiden Detektoren

wird mittels eines eng verteilten Kalibrationsstandards ermittelt und korrigiert.

Erstellt man eine Kalibrierkurve (siehe Fachartikel [Einführung in die Gelpermeationschromatographie](#), Abschnitt „Kalibrierung eines GPC/SEC-Systems mit Standards“) z. B. mit eng verteilten Polystyrolstandards, dann liegen neben der Konzentration und dem Elutionsvolumen der Standards auch deren Intrinsicische Viskositäten vor (Siehe Tabelle 1). Mit beiden Informationen können nun über eine universelle Kalibrierkurve die absoluten Molekulargewichte und deren Verteilung bestimmt werden.

Benoît zeigte 1967, dass die Kalibrierkurven von vollkommen unterschiedlichen Makromolekülen auf ein und dieselbe Kalibrierkurve zusammenfallen, wenn man neben den Retentionsvolumina und somit den relativen Molekulargewichten der Proben auch die Intrinsicischen Viskositäten mit einrechnet [2]. Dieses Prinzip wird Universelle Kalibrierung genannt:

$$[\eta] \times M_w = 2,5V_h = 2,5 \left(\frac{4}{3} \pi R_h^3 \right) = 10,47 R_h^3$$

Das Produkt aus Intrinsicischer Viskosität $[\eta]$ und Molekulargewicht $[M_w]$ der Probe ist proportional zu dem hydrodynamischen Volumen $[V_h]$ der Probe und somit auch zum hydrodynamischen Radius der Probe $[R_h^3]$ in der dritten Potenz.

Es wird nun zusätzlich zum hydrodynamischen Radius der Probe, welcher über das Retentionsvolumen bestimmt wird, über den Viskositätsdetektor auch die Intrinsicische Viskosität und somit die molekulare Dichte der Probe gemessen. Aus beiden Werten kann das absolute Molekulargewicht der Probe bestimmt werden, unabhängig davon, um welche Art von Probe es sich handelt und welche Struktur die Probe aufweist.

Beispielhaft soll dies an einer linearen Polystyrolprobe und einer ebenfalls linearen

Polycarbonatprobe gezeigt werden: Die Polycarbonatmoleküle sind bekanntermaßen kettensteifer als die Polystyrolmoleküle und bilden daher in Lösung bei gleichem Molekulargewicht ein größeres Knäuel aus als die Polystyrolmoleküle. Somit eluieren die Polycarbonatmoleküle früher als die Polystyrolmoleküle und würden deshalb bei der konventionellen GPC/SEC ein zu großes Molekulargewicht vortäuschen. Misst man nun aber auch die Intrinsicische Viskosität der Moleküle mit, dann müssen die Polycarbonatmoleküle physikalisch zwingend eine höhere Intrinsicische Viskosität aufweisen als die Polystyrolmoleküle, da sie das selbe Molekulargewicht haben und einen größeren hydrodynamischen Radius.

Daher muss die molekulare Dichte geringer und somit die Intrinsicische Viskosität größer sein. Teilt man nun das zu große relative Molekulargewicht der Polycarbonatmoleküle durch die höhere Intrinsicische Viskosität der Moleküle, dann resultiert das absolute Molekulargewicht der Polycarbonatmoleküle.

Trägt man nun den Logarithmus der Intrinsicischen Viskosität über dem Logarithmus des Molekulargewichtes auf (Mark-Houwink-Plot; Abbildung 2), dann kann man über den Vergleich einer linearen Probe mit einer verzweigten Probe wiederum Rückschlüsse auf den Verzweigungsgrad einer Probe ziehen. Genauere Erläuterungen hierzu finden sich im nachfolgenden Abschnitt „Bestimmung von Verzweigungsstrukturen“.

Tab. 1 Daten für eine Universelle Kalibrierung mit eng verteilten Polystyrolstandards (PS)

Standard	Retentionsvolumen	Mp	Intrinsicische Viskosität
	[ml]	[g/mol]	[dl/g]
PS1.000	21,0969	1.000	0,0405
PS 4.000	20,3856	4.000	0,0635
PS 7.000	20,0521	7.000	0,0778
PS 10.000	19,7675	10.000	0,0915
PS 18.000	19,0558	18.000	0,1378
PS 43.000	17,8792	43.000	0,2603
PS 90.000	17,0129	90.000	0,4406

Grundlagen der GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Verfügt ein GPC/SEC-System über einen Konzentrationsdetektor (meist ein Brechungsindexdetektor), einen Viskositätsdetektor und einen Rayleigh-Lichtstreuungsdetektor, dann spricht man von einem GPC/SEC-System mit Dreifachdetektion. Wird weiterhin auch noch ein UV-Detektor verwendet, wird das System als Tetradektionssystem bezeichnet oder auch als Dreifachdetektionssystem, da der UV-Detektor nur ein weiterer Konzentrationsdetektor ist. Der große Vorteil eines GPC/SEC-Systems mit Dreifachdetektion liegt in den Informationen, die die einzelnen Detektoren liefern können.

Der Lichtstreuungsdetektor ermittelt die absoluten Molekulargewichte der Proben, während der Viskositätsdetektor für die Bestimmung der Struktur eingesetzt wird. Der Konzentrationsdetektor wird für die Bestimmung der Probenkonzentration an jedem Punkt des Elutionsvolumens benötigt.



Abb. 2 Mark-Houwink-Plot

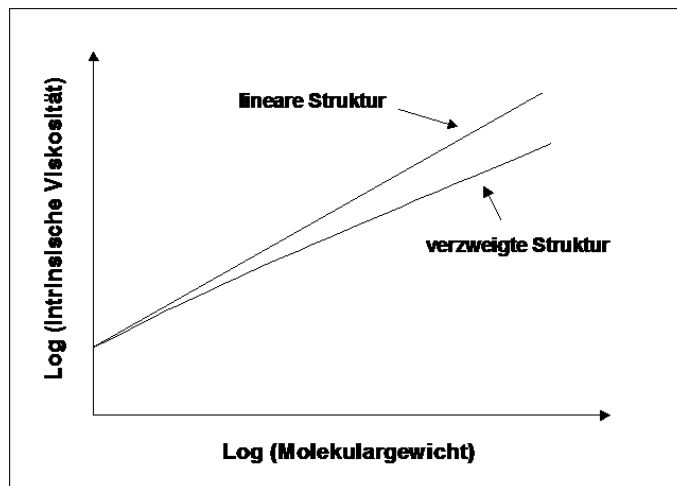


Abb. 3 Mark-Houwink-Plot einer linearen Probe und einer verzweigten Probe mit gleicher chemischer Zusammensetzung

Der Viskositätsdetektor kann die intrinsische Viskosität von Makromolekülen mit molaren Massen bis ca. 1000 g/mol messen. Dies entspricht einem Trägheitsradius von ca. 1 nm. Damit ist er hinsichtlich der Bestimmung von molekularen Größen und somit auch Verzweigungsstrukturen der reinen Lichtstreuung deutlich überlegen, da die Lichtstreuung die Größe von Makromolekülen nur bis ca. 1/20 der Laserwellenlänge messen kann, was einem Trägheitsradius von ca. 10 nm entspricht.

Grundlage dazu ist der Mark-Houwink-Plot der im folgenden Kapitel näher erläutert wird.

Bestimmung von Verzweigungsstrukturen

Die GPC/SEC mit Dreifachdetektion kann neben den absoluten Molekulargewichten auch die Verzweigungsstruktur von polymeren Proben bis in den Oligomerbereich bestimmen. Grundlage für die Bestimmung der Verzweigungsstruktur einer polymeren Probe ist der bereits in Abbildung 2 erwähnte Mark-Houwink-Plot. Abbildung 3 zeigt den Mark-Houwink-Plot einer linearen Probe und einer verzweigten Probe mit gleicher chemischer Zusammensetzung.

Über die bereits im Fachartikel [Verwendung von Lichtstreuendetektoren in der Gelpermeationschromatographie](#) beschriebene Zimm-Stockmayer-Theorie, kann nun die Verzweigungsstruktur einer Probe ermittelt werden. Im Vergleich zur reinen Lichtstreuung wird nun aber der für die Bestimmung der Verzweigungsstruktur maßgebliche g-Faktor nicht über das Verhältnis der Trägheitsradien berechnet sondern über das Verhältnis der Intrinsischen Viskositäten der linearen Probe und der verzweigten Probe bei gleichem Molekulargewicht [M]:

$$g = \left[\frac{Rg(\text{verzweigt})}{Rg(\text{linear})} \right]_M = \left[\frac{[\eta](\text{verzweigt})}{[\eta](\text{linear})} \right]_M^{1/\varepsilon}$$

Der Unterschied im Verhältnis der Trägheitsradien und der Intrinsischen Viskositäten wird durch den Strukturfaktor Epsilon [ε] beschrieben. Der Strukturfaktor Epsilon hat einen Wert von 0,75 für alle knäuelartige Polymere wie z. B. Polystyrol, Dextrane, Polyethylenoxid und viele andere Polymere. In der Literatur sind Werte für Epsilon im Bereich von 0,5 bis ca. 1,5 aufgeführt [3].

Ist der g-Faktor bestimmt, dann kann über dieselben Gleichungen, die bereits im Abschnitt „Bestimmung von Verzweigungsstrukturen“ im Fachartikel [Verwendung von Lichtstreuendetektoren in der Gelpermeationschromatographie](#) beschrieben wurden, die Verzweigungszahl für eine Probe an jedem Punkt Ihrer Molekulargewichtsverteilung berechnet werden. Auch in diesem Fall ob-

liegt es dem Anwender zu entscheiden, ob er eine sternförmige Verzweigung untersuchen möchte und als Ergebnis eine Anzahl an Armen erhält (Gleichung 1) oder ob er eine willkürliche Verzweigungsstruktur untersuchen möchte und eine Anzahl an Verzweigungen erhält. Er muss auch entscheiden, ob die Probe an jedem Messpunkt monodispers (Gleichung 2) oder polydispers (Gleichung 3) vorliegt.

Gleichung 1

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

sternförmige Verzweigungen; f = Anzahl der Arme

Gleichung 2

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

trifunktional, monodispers; B_n = Anzahl der Verzweigungen

Gleichung 3

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

trifunktional, polydispers; B_n = Anzahl der Verzweigungen

Interpretation der Ergebnisse

Mit der Technologie der GPC/SEC mit Dreifachdetektion können sehr viele Informationen über eine makromolekulare Probe bestimmt werden. Jeder Detektor liefert eine andere physikalische Information die wiederum kombiniert werden können um zusätzliche Ergebnisse bestimmen zu können. Der Lichtstreuendetektor liefert primär das absolute Molekulargewicht der Probe an jedem Messpunkt und somit auch die Molekulargewichtsverteilung der Probe. Der Viskositätsdetektor liefert die Intrinsische Viskosität der Probe an jedem Messpunkt. Aus dem Produkt der Intrinsischen Viskosität und dem Molekulargewicht kann nun der hydrodynamische Radius der Probe und dessen Verteilung bestimmt werden.

Der Brechungsindexdetektor liefert die Konzentration der Probe an jedem Messpunkt. Außerdem kann man mit Hilfe des Brechungsindexdetektors bei bekannter Probenkonzentration den dn/dc-Wert einer makromolekularen Probe bestimmen.

$$\frac{d_n}{d_c} = \frac{\text{Signal RI}}{\text{Konstante (RI)} \times \text{Konzentration}}$$

Mit den gemessenen Intrinsischen Viskositäten und Molekulargewichten einer Probe kann man bei einer genügend breiten Verteilung (Polydispersität mindestens > 1,2) einer

Probe den so genannten Mark-Houwink-Plot erzeugen (log η über log Mw). Aus diesem Plot resultieren die Steigung der Mark-Houwink-Geraden bzw. -Kurve (a-Wert) und der Achsenabschnitt (log K-Wert).

Der a-Wert ist ein Maß für die Struktur der Probe. Ein a-Wert von 0,7 bzw. im Bereich von 0,6 bis 0,8 ist typisch für eine knäuelartige Struktur der Polymerprobe, a-Werte kleiner als 0,6 deuten auf eine kompaktere Probenstruktur hin, die z. B. durch Verzweigungen im Polymermolekül hervorgerufen werden kann. a-Werte größer als 0,8 deuten auf eine offenerere, gestreckte Form des Polymermoleküls hin, wie sie z. B. bei der Hyaluronsäure vorliegt. Der Extremfall wäre ein stäbchenförmiges Molekül.

Aus dem Mark-Houwink-Plot einer Probe kann nun durch den Vergleich einer linearen Probe mit einer verzweigten Probe gleicher chemischer Zusammensetzung die Verzweigungsstruktur einer Polymerprobe bestimmt werden.

Literatur

[1] Haney, M. A., *American Laboratory*, 17(4), pp. 116-126 (1985)

[2] Z. Grubisic, P. Rempp and H. Benoit "A universal calibration for gel permeation chromatography" *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* Volume 5, Issue 9, pages 753-759, September 1967

[3] "Branched Polymers", in *Encyclopedia of Polymer Science & Engr.*, Vol. 2, John Wiley, 1985, pp 478-499.