

## Dynamische Lichtstreuung als GPC-Detektionstechnologie

Dr. Gerhard Heinzmann

### Grundlagen der dynamischen Lichtstreuung (DLS)

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst bzw. suspendiert. Es wird dann ebenfalls das Streulicht der makromolekularen Probe z. B. bei einem Winkel von 90° gemessen. Allerdings werden sehr viel mehr Datenpunkte aufgenommen als dies bei der statischen Lichtstreuung der Fall ist, d. h. das von der Probe gestreute Licht wird in sehr viel kürzeren Zeitabständen gemessen. Die Messdaten werden auch nicht direkt ausgewertet sondern sie werden an einen Korrelator übermittelt, der zunächst eine Autokorrelationsfunktion für die Daten errechnet. Aus der Autokorrelationsfunktion wird dann über einen mathematischen Algorithmus, der als Regularisierung bezeichnet wird, der Diffusionskoeffizient der Probe ermittelt. Aus dem Diffusionskoeffizienten  $D$  wird schließlich über die Stokes-Einstein-Beziehung der hydrodynamische Radius  $R_h$  der Probe bzw. die Verteilung der hydrodynamischen Radien berechnet:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

Ein großer Vorteil der dynamischen Lichtstreuung ist darin zu sehen dass man das Gerät nicht kalibrieren muss und man weiterhin keinerlei Informationen über die Probe benötigt um ein Ergebnis zu erhalten. Lediglich die Viskosität des verwendeten Lösungsmittels und dessen Brechungsindex müssen bekannt sein. Die Konzentration der Probe muss nur groß genug sein, dass ein Messsignal erhalten wird. Sie wird nicht zur Berechnung der hydrodynamischen Radien der Probe benötigt. Auch der bei der statischen Lichtstreuung so wichtige  $dn/dc$ -Wert der Probe spielt bei der dynamischen Lichtstreuung keine Rolle.

Festzuhalten ist die Tatsache, dass man mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung nur die hydrodynamischen Radien einer makromolekularen Probe bestimmen kann. Möchte man das Molekulargewicht einer Proteinprobe bestimmen, dann muss man entweder das Gerät im statischen Modus

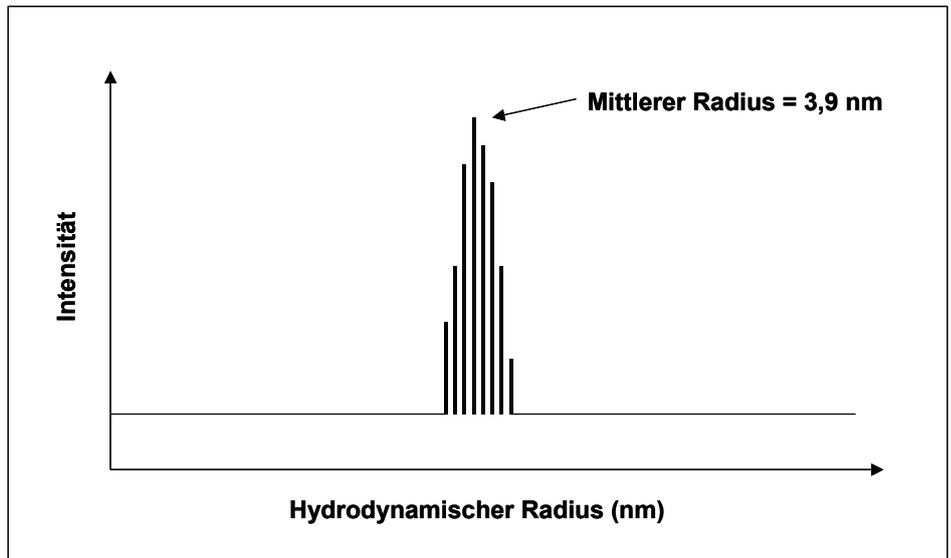


Abb. 1: Messung einer BSA -Probe mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung

betreiben (wobei dann wieder eine Gerätekalibrierung notwendig wird und die Konzentration der Probe und der  $dn/dc$ -Wert bekannt sein müssen) oder man berechnet das Molekulargewicht über eine Modellbeziehung zwischen hydrodynamischen Radien und Molekulargewichten von globulären Proteinen. In diesem Fall ist das Ergebnis aber nur eine Abschätzung und nicht etwa ein gemessener Wert.

Abbildung 1 zeigt das Resultat der Messung einer Rinderserumalbumin-Probe (BSA = Bovine Serum Albumine) mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung. Die Probe ist identisch mit der in Abbildung 2 gemessenen BSA-Probe, man sieht hier aber keine separaten Peaks für die Dimere und Trimere des BSA. Es ist lediglich ein etwas verbreiteter Peak zu erkennen. Die dynamische Lichtstreuung kann verschiedene Spezies erst

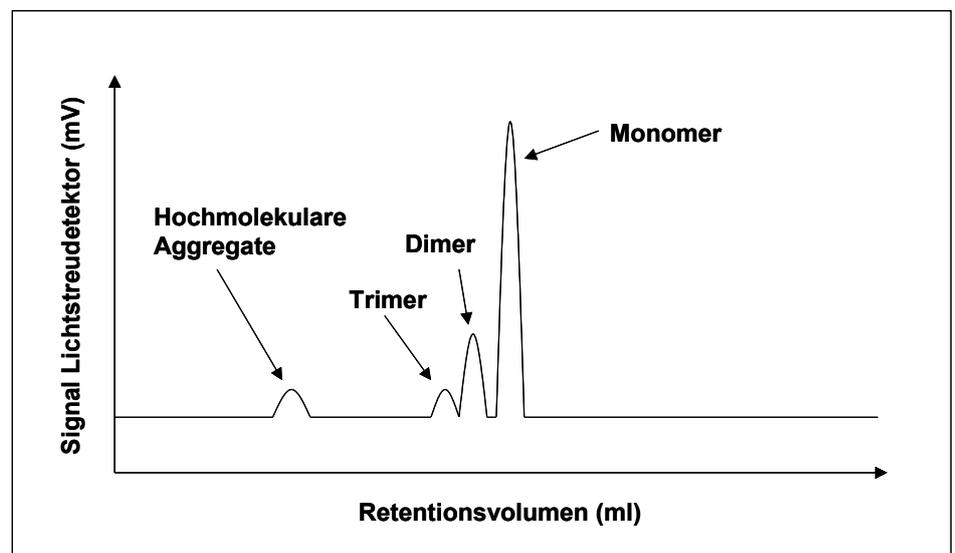


Abb. 2: Chromatogramm einer Rinderserumalbumin-Probe (BSA = Bovine Serum Albumine) mit Aggregationen

dann in separate Peaks auftrennen, wenn sie einen Größenunterschied von mindestens einem Faktor 2 aufweisen. Dies ist aber noch nicht einmal beim Trimer des BSA der Fall verglichen mit dem Monomer.

Bei der DLS wird neben den hydrodynamischen Radien auch noch ein Wert für die Polydispersität der Probe angegeben. Dieser Wert ist aber nur die relative Standardabweichung des Ergebnisses und ist nicht zu vergleichen mit der Polydispersität, die in der GPC/SEC angegeben wird und dort als Quotient aus dem nach dem Gewicht gemittelten Molekulargewicht der Probe und dem Zahlenmittel des Molekulargewichtes ( $M_w/M_n$ ) berechnet wird.

Hat eine Probe bei einer Messung mit der dynamischen Lichtstreuung eine Polydispersität von weniger als 20%, dann wird sie in der Regel als monodispers angesehen. Ist der Polydispersitätsindex höher, dann sind Aggregationen vorhanden.

#### Verwendung der dynamischen Lichtstreuung als GPC/SEC-Detektionsmethode

Aufgrund der Tatsache, dass man für die Berechnung einer Autokorrelationsfunktion eine Zeit von mindestens ca. 1-3 Sekunden benötigt, ist die zeitliche Auflösung dieser Technik sehr gering (obwohl die primäre Datenaufnahme sehr schnell verläuft). Dieser Umstand beschränkt auch Ihren Einsatz als Detektor in der Gelpermeationschromatographie, da hier die Probe mit einer bestimmten Geschwindigkeit durch eine Messzelle mit einem sehr geringen Volumen fließt und die Verweildauer in der Messzelle meist nicht ausreicht um mehrere Autokorrelationsfunktionen aufnehmen zu können. Diese wären aber notwendig, um z. B. die Verteilungsbreite einer Probe ermitteln zu können. Daher misst man oft nur eine Autokorrelationsfunktion über die gesamte Probe und erhält somit nur einen mittleren hydrodynamischen

Radius für die Probe (was bei einer monodispersen Proteinprobe auch vollkommen ausreichend ist) oder man arbeitet mit so genannten stopped-flow-Methoden, bei denen man den GPC/SEC-Fluss kurzzeitig anhält, um genügend Zeit für die Aufnahme einer Autokorrelationsfunktion zu haben. Eine weitere Möglichkeit ist es, von vorneherein mit einem geringen GPC/SEC-Fluss von z. B. 0,5 ml/min zu arbeiten, was dann aber die GPC/SEC-Trennung recht langwierig macht.

Abbildung 3 zeigt die Messung einer breit verteilten, hochmolekularen Polymerprobe mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung im Flussmodus. Hierbei wird als Messzelle im DLS-Gerät eine Durchflusszelle verwendet und es wird mit einem chromatographischen Fluss von 0,3 bis 0,5 ml/min gearbeitet. Die durchgezogene Linie ist das Signal des DLS-Gerätes angegeben in kcounts pro Sekunde und die Punkte sind die gemessenen hydrodynamischen Radien in Nanometern. Die für die Aufnahme eines Datenpunktes benötigte Messzeit beträgt 3 Sekunden.

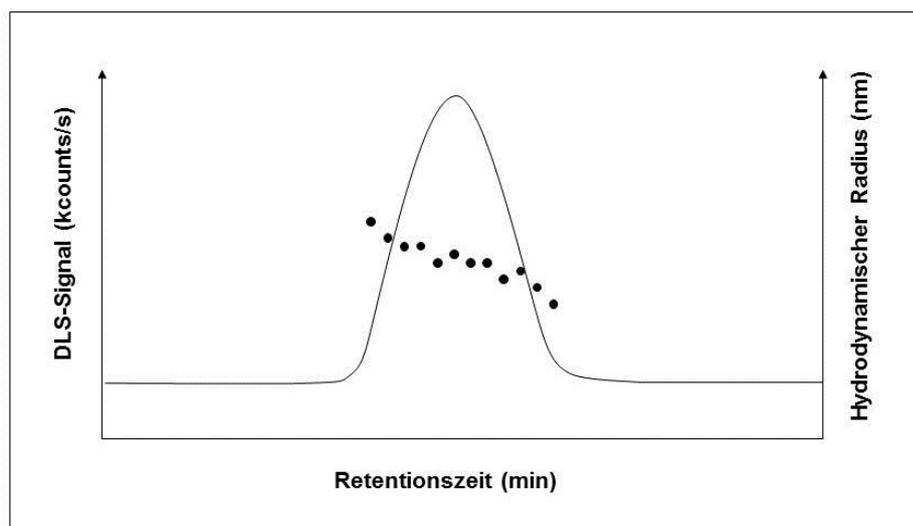


Abb. 3: Chromatogramm einer DLS-Messung im Flow Mode (breit verteilte Polymerprobe)