

## GPC/SEC: Polymerstandard ist nicht gleich Polymerstandard

Dr. Gerhard Heinzmann

In der Gelpermeationschromatographie (GPC), auch als Größenausschlusschromatographie bezeichnet (SEC = Size Exclusion Chromatography), werden je nach verwendeten Detektoren verschiedene Methoden eingesetzt, um das GPC/SEC-System zu kalibrieren.

Man unterscheidet zwischen zwei unterschiedlichen Verfahrensweisen:

1. Dem Einsatz von reinen Konzentrationsdetektoren und der damit einhergehenden so genannten Säulenkalibrierung, bei der eine Reihe von eng verteilten Polymerstandards verwendet wird, um die Trenncharakteristik der eingesetzten Trennsäulen zu kalibrieren (Kalibrierung von Molekulargewicht und ggf. Intrinsic Viskosität über dem Elutionsvolumen).
2. Der statischen Lichtstreuung (MALS = Multi Angle Light Scattering), bei der in der Regel ein einzelner eng verteilter Polymerstandard ausreicht um den Lichtstreuendetektor zu kalibrieren. Der Lichtstreuendetektor kann dann die Molekulargewichte der Proben direkt messen, ohne dass das Elutionsvolumen eine Bedeutung hat.

Alternativ zu einem Polymerstandard wird oft auch Toluol als Kalibrationsstandard für einen statischen Lichtstreuendetektor verwendet, da das Rayleigh-Verhältnis von Toluol bekannt ist. Das Rayleigh-Streulichtverhältnis von reinem Toluol ist die Menge an Streulicht die von reinem Toluol erzeugt wird; mit diesem Wert kann direkt die Kalibrierkonstante eines MALS-Detektors ermittelt werden, indem die Messzelle des MALS-Detektors mit reinem Toluol befüllt und das resultierende Streulicht gemessen wird.

Es kommt immer wieder vor, dass GPC/SEC-Anwender nach erfolgter Kalibrierung des GPC/SEC-Systems für einen weiteren Polymerstandard, der nicht Teil der Kalibrierung war, nicht die Werte finden, die für den Standard vom Hersteller angegeben werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben, die im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

### Organische Polymerstandards, z. B. Polystyrole und Polymethylmethacrylate

Hier ist es sehr wichtig zu wissen, dass es im Wesentlichen zwei Werte für das Rayleigh-Verhältnis von Toluol in der Literatur gibt, die sich um ca. 8% unterscheiden.

Firmen, die im amerikanischen und asiatischen Raum Lichtstreuendetektoren und Polymerstandards herstellen, verwenden einen anderen Wert für das Rayleigh-Verhältnis von Toluol, der als Grundlage für die Kalibrierung von statischen Lichtstreuendetektoren dient, als Firmen, die im europäischen Raum Lichtstreuendetektoren und Polymerstandards herstellen. Dieser Unterschied im verwendeten Rayleigh-Streulichtverhältnis setzt sich nun in den Polymerstandards fort, die diese Firmen, basierend auf der mit Toluol durchgeführten Kalibrierung der verwendeten statischen Streulichtdetektoren, herstellen. Es verwundert GPC/SEC-Anwender daher immer wieder, dass Polymerstandards von verschiedenen Herstellern, die mit nahezu identischen Molekulargewichtsverteilungen ausgewiesen sind, nicht kompatibel sind. Das heißt, die Standards liegen nicht auf einer gemeinsamen Kalibrierkurve sondern weichen von dieser ab, meist recht exakt um die genannten 8%, die von den unterschiedlichen Rayleigh-Verhältnissen in der Kalibration der Lichtstreuendetektoren herrühren, mit denen die Molekulargewichte dieser Standards bestimmt wurden. Weiterhin findet man bei Messungen mit Lichtstreuendetektoren, wie bereits erwähnt, oft einen um ca. 8% abweichenden Wert für das Molekulargewicht des Standards, der nach der Kalibrierung zur Überprüfung des GPC/SEC-Systems vermessen wurde.

Sollte ein GPC/SEC-Anwender daher eine derartige Abweichung verschiedener Standards sehen, dann ist die Ursache dafür oft in den unterschiedlichen Rayleigh-Verhältnissen zu sehen, die die Hersteller der Standards für die Kalibrierung Ihrer Systeme verwendet haben. Natürlich ist es unnötig

anzumerken, dass jeder Hersteller von Lichtstreuendetektoren und Polymerstandards davon überzeugt ist, dass er das korrekte Rayleigh-Verhältnis für Toluol verwendet ...

### Wässrige Polymerstandards, z. B. Polyethylenoxide, Pullulane und Dextrane

Polyethylenoxide sind synthetisch hergestellte Polymerstandards. Hier gilt dieselbe Problematik wie für die organischen Standards beschrieben.

Andere Probleme treten auf, wenn man das GPC/SEC-System mit Polysaccharid-Standards kalibrieren möchte; hier handelt es sich um Naturprodukte. Es sind vor allem Pullulan-Standards und Dextran-Standards verfügbar. Pullulane und Dextrane sind aus den gleichen Basiseinheiten aufgebaut, sie unterscheiden sich aber deutlich in Ihrer Verknüpfungsstruktur.

Pullulane sind aufgrund Ihrer Verknüpfungsstruktur über einen weiten Molekulargewichtsbereich lineare Moleküle, während Dextrane mit zunehmendem Molekulargewicht immer stärkere Verzweigungen ausbilden. Außerdem sind die kommerziell erhältlichen Pullulanstandards eng verteilt (Polydispersität =  $M_w/M_n < 1,5$ ) während die kommerziell erhältlichen Dextranstandards eher breit verteilt sind (Polydispersität =  $M_w/M_n > 2$ ).

Es ist sehr wichtig zu wissen, dass die kommerziell erhältlichen Pullulanstandards, die von verschiedenen Händlern angeboten werden, alle von ein und demselben Hersteller stammen und somit sehr zuverlässig sind was Reproduzierbarkeit und Genauigkeit angeht. Außerdem eignen sie sich aufgrund Ihrer linearen Struktur und Ihrer engen Verteilung hervorragend für eine Kalibrierung eines GPC/SEC-Systems.

Für Dextranstandards gilt exakt das Gegenteil. Dextrane sind in der Regel Naturprodukte, die sich von Charge zu Charge stark in Ihrer Verzweigungsstruktur unterscheiden können. Das bedeutet, dass ein Dextran

standard mit gleichem Molekulargewicht, der aus einer anderen Charge stammt, im Vergleich mit seinem Pendant aus einer früheren Charge einen stark unterschiedlichen hydrodynamischen Radius aufweisen kann und somit zu einem anderen Zeitpunkt von der Trennsäule eluiert wird.

Dextranstandards eignen sich aufgrund ihrer im Vergleich zu Pullulanstandards recht hohen Polydispersität sowie ihrer durch ihre willkürliche Verzweigungsstruktur bedingten geringen Reproduzierbarkeit der Elutionsvolumina weitaus weniger für eine Kalibrierung eines GPC/SEC-Systems als dies für Pullulanstandards der Fall ist.

**Fazit:**

Es gibt sehr viele Firmen und Händler, die Polymerstandards sowohl für die organische GPC/SEC als auch für die wässrige GPC/SEC anbieten. Die Preise für diese Standards reichen von wenigen Euro für Milligramm-Mengen bis zu mehreren hundert Euro für Mikrogramm-Mengen. Der Anwender sollte sich gut überlegen, welche Standards er für die Kalibrierung seines GPC/SEC-Systems verwendet, da die Qualität seiner Ergebnisse in direkter Relation zur Qualität seiner Kalibration steht.

Wichtig ist auch zu wissen auf welche Basis die Werte bezogen sind, die der Hersteller für seine Standards angibt. Ein unterschiedliches Rayleigh-Verhältnis für Toluol, das verschiedene Firmen verwenden, kann hier direkt zu einem Fehler von 8% im Molekulargewicht der Probe führen, da die Molekulargewichte der Standards, die für die Säulenkalibrierung und die Kalibrierung von Lichtstreuendetektoren verwendet werden, in direktem Bezug zu dem Rayleigh-Verhältnis von Toluol stehen.