

GPC/SEC mit Dreifachdetektion Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 6

Welche Parameter sind wichtig für die Bestimmung von Molekulargewichten mittels Lichtstreuendetektion?

Problemstellung

Ich arbeite mit einer GPC/SEC-Anlage mit Dreifachdetektion. In der Methode zur Bestimmung der Molekulargewichte kann ich sowohl einen Wert für die Konzentration der Probe vorgeben und einen Wert für das Brechungsindexinkrement (dn/dc). Jeweils einer dieser Werte kann auch aus dem RI-Signal berechnet werden. Nur wenn ich keinen der beiden Werte vorgebe berechnet die Software auch keine Molekulargewichtsverteilung.

Frage

In welcher Form gehen die Probenkonzentration und das Brechungsindexinkrement der Probe in die Berechnung der Molekulargewichtsverteilung ein und wie wichtig sind diese Parameter? Ist es besser diese Parameter vorzugeben oder einen der Parameter aus dem Signal des RI-Detektors berechnen zu lassen?

Lösung

Um zu verstehen wie aus den drei Signalen (Brechungsindexdetektor, Viskositätsdetektor und Lichtstreuendetektor) die Molekulargewichtsverteilung einer Probe bestimmt wird muss man sich das Ansprechverhalten der Detektoren ansehen:

Signal RI = K_{RI} x dn/dc x Konzentration

Signal Visk = K_{VISC} x Intr. Viskosität x Konzentration

Signal LS = K_{LS} x $(dn/dc)^2$ x Mw x Konzentration

Die K-Werte sind die Kalibrationskonstanten der einzelnen Detektoren. Wie zu erkennen ist steckt die Konzentration linear in jedem Detektorsignal. Das Brechungsindexinkrement dn/dc hingegen steckt linear im Signal des RI-Detektors und quadratisch im Signal des Lichtstreuendetektors. Daher kommt vor allem dem dn/dc -Wert eine besondere Bedeutung zu wenn Molekular-

gewichtsverteilungen mit einem Lichtstreuendetektor bestimmt werden.

Mit einer geeigneten Software (z. B. der OmniSEC-Software von Viscotek) kann man nun wahlweise die beiden Parameter Konzentration und dn/dc vorgeben oder aber einen der beiden Parameter aus dem RI-Signal berechnen lassen (nach vorheriger Kalibration der Detektoren mit einem Standard mit bekanntem Molekulargewicht und bekanntem dn/dc). Sind sowohl die Konzentration wie auch der dn/dc -Faktor der Probe exakt bekannt und handelt es sich um ein reines Polymer ohne Feuchteanteile oder Zusätze welches zu 100% von der Trennsäule eluiert dann führen alle Berechnungsmethoden zum selben (korrekten) Ergebnis.

Enthält die Probe aber eine unbekannte Menge an Feuchte was z. B. bei biologischen Proben (Polysaccharide, Proteine) sehr oft der Fall ist oder sind niedermolekulare Zusätze vorhanden (z. B. Additive) die eventuell auch noch unlöslich sind und daher vor der Injektion abfiltriert werden müssen dann ist die Konzentration keine exakt bekannte Größe mehr und kann daher auch nicht vorgegeben werden. Die am Detektor vorliegende Konzentration muss nun aus dem Signal des RI-Detektors berechnet werden. Dazu ist aber die Vorgabe des dn/dc -Wertes zwingend erforderlich. Gleiches gilt natürlich auch wenn die Probe partiell auf der Trennsäule absorbiert; dadurch sinkt die Wiederfindungsrate und somit die Konzentration am Detektor auf einen (unbekannten) Wert von kleiner 100% der dann über den RI-Detektor bestimmt werden muss.

Ist dagegen der dn/dc -Wert der Probe unbekannt so kann er ebenfalls aus dem RI-Signal bestimmt werden. Hierzu muss aber die Konzentration der Probe vorgegeben werden und exakt sein. Auch muss die Wiederfindungsrate 100% betragen (keine Absorptionseffekte der Probe auf der Trennsäule). Ist dies nicht der Fall so wird ein falscher dn/dc -Wert für die Probe bestimmt.

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 6

Dieser falsche dn/dc-Wert wiederum wird dann quadratisch in die Lichtstreugleichung eingehen und so zu einer völlig falschen Molekulargewichtsverteilung führen.

Generell gilt dass es immer am besten ist den dn/dc-Wert für eine Probe vorzugeben (so er denn exakt bekannt ist oder aus der Literatur entnommen oder bestimmt werden kann) und die Probenkonzentration aus dem RI-Signal berechnen zu lassen. So werden kleine Fehler in der Einwaage oder geringe Probenverluste auf der Trennsäule kompensiert und es resultiert eine korrekte Molekulargewichtsverteilung. Ist der dn/dc-Wert einer Probe unbekannt so muss man ihn aus dem RI-Signal berechnen. Hier ist darauf zu achten dass die dafür notwendige Probenkonzentration so exakt wie möglich einzustellen ist und man möglichst eine Mehrpunktmessung (z. B. bei vier verschiedenen Konzentrationen) durchführen sollte um den dn/dc-Wert exakt zu bestimmen. Die OmniSEC-Software von Viscotek bietet hierfür ein entsprechendes Berechnungsmodul. Auch ist darauf zu achten dass der RI-Detektor dieselbe Temperatur und dieselbe Wellenlänge hat wie der Lichtstreuendetektor da der dn/dc-Wert von diesen Größen abhängt und sich mit Ihnen verändert.

Schlussfolgerung

Obwohl gemeinhin angenommen wird dass die Lichtstreuung absolute Molekulargewichte liefert gibt es doch zumindest zwei Parameter die in die Berechnungen mit eingehen: die Konzentration der Probe und deren dn/dc-Wert. Jeweils einer dieser Parameter kann aus dem Signal eines RI-Detektors berechnet werden, der andere muss dazu bekannt sein. Man muss sehr sorgfältig abwägen welcher der beiden Parameter für eine Probe zuverlässiger ist; oft wird eine Konzentration vorgegeben die durch unbekannte Feuchteanteile der Probe oder durch eine partielle Absorption der Probe auf der Trennsäule verfälscht wird und dadurch zu einem falschen dn/dc-Wert und letztendlich einem falschen Molekulargewicht führt. Ebenso werden oft falsche dn/dc-Werte verwendet die z. B. aus der Literatur entnommen werden aber bei einer anderen Laserwellenlänge oder einer anderen Temperatur gemessen wurden. Wiederum resultieren falsche Molekulargewichte. Nur wenn die verwendeten dn/dc-Werte und Konzentrationen korrekt sind ist auch das berechnete Molekulargewicht der Proben zuverlässig und korrekt.

Author: Dr. Gerhard Heinzmann, Viscotek GmbH

Für weitere Informationen können Sie jederzeit sehr gerne Kontakt zu uns aufnehmen.