

Einführung in die Gelpermeationschromatographie

Dr. Gerhard Heinzmann

Grundlagen der Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC), oft auch als Größenausschluss-chromatographie (SEC = Size Exclusion Chromatography) ist eine Technik die ähnlich wie die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) die in einem geeigneten Lösungsmittel gelösten Probenmoleküle auf einer Trennsäule auftrennt und danach mit einer geeigneten Technik detektiert.

Während bei der HPLC die Trennung aufgrund von Wechselwirkungen der Probenmoleküle mit dem Material der Trennsäulen stattfindet, sind solche Wechselwirkungen in der GPC vollkommen unerwünscht. In der GPC werden die Moleküle rein durch die Diffusion in die Poren des Trennsäulenmaterials getrennt. Da kleine Moleküle in den Trennsäulen mehr Poren finden für die Diffusion als große Moleküle, eluieren die großen Moleküle zuerst von der Säule. Diese Trennung ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Es ist sehr wichtig, dass man in der GPC eine geeignete Kombination von Lösungsmittel, Trennsäulenmaterial und weiteren Parametern wie z. B. der Temperatur findet, die einen optimalen GPC-Trennmechanismus gewährleistet. Für eine Vielzahl an synthetischen Polymeren sind diese Bedingungen sehr gut bekannt. Weniger bekannt hingegen sind diese Bedingungen für Biopolymere wie z. B. Polysaccharide. Hier ist oft eine aufwändige Methodenentwicklung notwendig, um geeignete Parameter für die Analyse von Hyaluronsäure, Chitosanen oder Pektinen zu finden. Am wenigsten bekannt sind die Bedingungen für die Analyse von Proteinen. Abgesehen von einer kleine Zahl an Standardproteinen wie z. B. Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine, BSA) oder Lysozym, muss für nahezu jedes Protein zunächst ein optimaler Satz an Parametern wie Trennsäulenmaterial, Salzgehalt, pH-Wert und ggf. Temperatur gefunden werden, um eine wechselwirkungsfreie Gelpermeationschromatographie zu ermöglichen.

Die Gelpermeationschromatographie ist eine sehr langsame Analysetechnik. Man muss

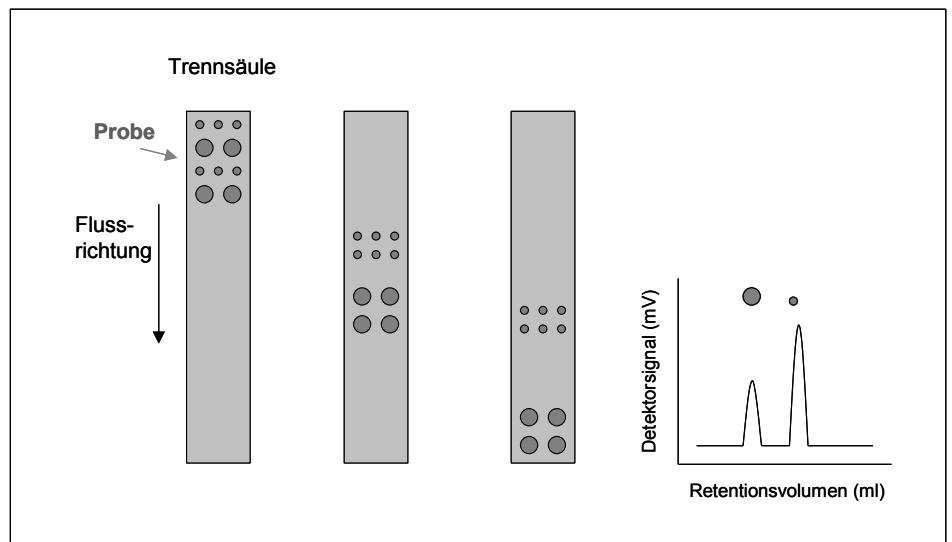


Abb. 1: Trennmechanismus in der Gelpermeationschromatographie

den Probenmolekülen genügend Zeit geben, um in die Poren des Trennsäulenmaterials diffundieren zu können. Daher darf der Lösungsmittelfluss nicht zu hoch gewählt werden. Auf der anderen Seite kann man den Fluss aber auch nicht beliebig klein wählen, da dann einerseits die Analysenzeit zu lang wird und andererseits der Einfluss der unerwünschten Querdiffusion zu groß wird und die Trennung verschlechtert. Typische Flussraten sind daher für organische Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran 1 ml/min und für wässrige Lösungsmittel 0,7 ml/min.

Aufbau eines GPC-Systems mit Brechungsindexdetektion

In der einfachsten Form ist ein GPC-System mit einem Brechungsindexdetektor ausgestattet. Dieses System wird oft als Basis-GPC-System oder als konventionelles GPC-System bezeichnet. Moderne GPC-Systeme sind meist mit weiteren Detektoren wie Lichtstreuungsdetektoren, Viskositätsdetektoren, UV-Detektoren oder UV-Photodiodenarraydetektoren ausgestattet. Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines GPC-Systems mit Brechungsindexdetektion.

Die wichtigen Komponenten eines GPC-Systems sind zum einen die GPC-Pumpe,

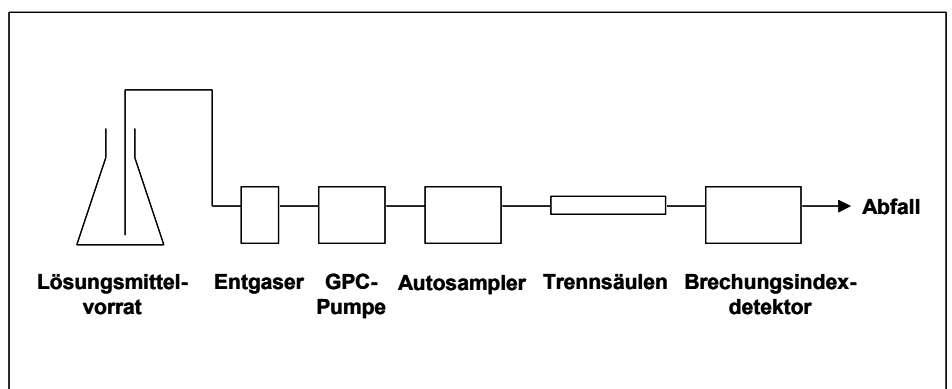


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines GPC-Systems mit Brechungsindexdetektion

die einen möglichst konstanten Lösungsmittelfluss erzeugen muss, sowie die Trennsäulen, die eine gute Auftrennung der Probe gewährleisten müssen. Der Detektor muss anzeigen zu welchem Zeitpunkt die Probe von der Trennsäule eluiert. Er sollte unabhängig vom Molekulargewicht der Probe und deren Zusammensetzung ein konstantes Konzentrationssignal anzeigen.

Da vor allem im Bereich der synthetischen Polymere viele Substanzen keine UV-Aktivität aufweisen hat sich im Gegensatz zur HPLC wo überwiegend ein UV-Detektor verwendet wird in der GPC der Brechungsindexdetektor als am häufigsten eingesetzter Detektor bewährt. Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau eines Brechungsindexdetektors.

Der differentielle Brechungsindexdetektor (RI = Refractive Index Detector) misst den Unterschied des Brechungsindex der Probe und des reinen Lösungsmittels. Er erzeugt ein Signal, das direkt proportional zur Konzentration der Probe ist. Es gibt aber noch einen zweiten Parameter der die Fläche des Signals eines Brechungsindexdetektors bestimmt: den so genannten dn/dc -Wert, das Brechungsindexinkrement. Der dn/dc -Wert wird erhalten indem man den Brechungsindex einer Probe über deren Konzentrationen aufträgt.

Insgesamt gilt daher folgende Beziehung:

$$RI\text{-Signal} = K_{RI} \cdot \text{Konzentration} \cdot dn/dc$$

Für die konventionelle GPC ist der dn/dc -Faktor nicht von Bedeutung. Dennoch sollte man wissen, dass aufgrund dieses Faktors z. B. eine Polymethylmethacrylat-Probe mit gleicher Konzentration wie eine Polystyrolprobe nur ein etwa halb so großes Signal im Brechungsindexdetektor erzeugt, da der dn/dc -Wert der Polymethylmethacrylat-Probe nur etwa halb so groß ist wie der dn/dc -Wert der Polystyrolprobe (0,185 ml/g für Polystyrol in THF und 0,088 ml/g für Polymethylmethacrylat in THF). Auflistungen für den dn/dc -Wert verschiedener Proben lassen sich in der Literatur finden [1].

Weitere Komponenten in einem einfachen GPC-System können ein Online-Vakuumentgaser und ein Säulenthermostat sein. Beide Geräte sind aber nicht zwingend notwendig, da der Brechungsindexdetektor nicht sehr empfindlich auf gelöste Gase reagiert und der Trennmechanismus in der GPC entropischer Art ist und daher nur eine geringe Temperaturabhängigkeit aufweist (im Gegensatz zur HPLC). Es genügt, wenn man die Trennsäulen thermisch gegen die Umgebung etwas abschirmt.

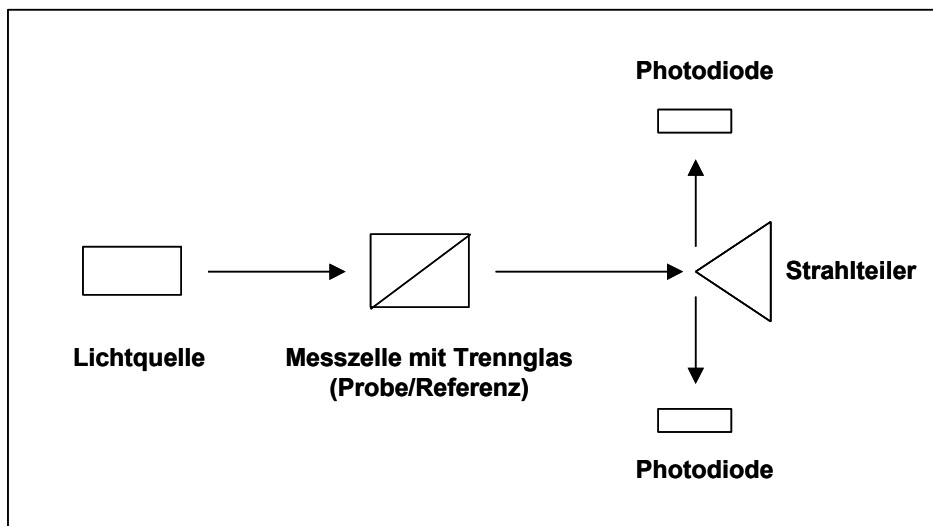


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Brechungsindexdetektors

Zur Vervollständigung des Systems fehlen noch ein Injektor (manuell oder Autosampler) und eine GPC-Software, die eine Auftragung des Molekulargewichtes über dem Elutionsvolumen durchführen kann.

Im Folgenden wird dargestellt, wie man zunächst die geeigneten Trennsäulen für eine bestimmte Analysenaufgabe auswählt und wie man ein konventionelles GPC-System mit Standards mit bekanntem Molekulargewicht kalibriert.

Die Trennsäulen

Die für die GPC/SEC verfügbaren Trennsäulen können zunächst in zwei Gruppen getrennt werden: Trennsäulen für den Bereich der organischen Laufmittel und Trennsäulen für den Bereich der wässrigen Laufmittel.

Das Material der Trennsäulen für organische Laufmittel besteht in aller Regel aus Styrol-Divinylbenzol (SDV), also einem stark quervernetzten Polystyrol. Die starke Vernetzung führt dazu, dass das Material sich in organischen Laufmitteln nicht mehr lösen kann, sondern nur noch quillt und somit eine poröse Packung erzeugt. Durch gezielte Synthese des Materials können exakt definierte Porengrößen erzeugt werden, die einen bestimmten Molekulargewichtsbereich einer Probe auftrennen können. Es sind auch spezielle Materialien verfügbar, die z. B. fluorierte Polymere trennen können. Laufmittel ist hier meist Hexafluoroisopropanol oder auch Trifluorethanol.

Trennsäulen für die wässrige GPC/SEC sind oft auf Methacrylatbasis aufgebaut. Es gibt im wässrigen Bereich aber eine größere Menge an Trennsäulenmaterialien als im organischen Bereich. Je nach Trennaufgabe können polykationische oder polyanionische Materia-

lien verwendet werden. Für die Trennung von Proteinen werden auch Silicasäulen und Polysaccharidsäulen eingesetzt (Superdex, Superose).

Die zweite Aufteilung der Trennsäulen ist die Auftrennung in single porosity Trennsäulen und mixed bed Trennsäulen.

Single porosity Trennsäulen haben eine sehr genau definierte Porengröße und können daher einen eng begrenzten Molekulargewichtsbereich sehr effektiv auftrennen. Möchte man einen größeren Molekulargewichtsbereich abdecken, dann muss man zwei oder mehrere Trennsäulen mit verschiedenen Porengrößen hintereinander schalten.

Dabei ist zu beachten, dass die Kennlinien der verschiedenen single porosity Trennsäulen zueinander passen, so dass ein weitestgehend linearer Trennbereich entsteht. Ist die Trennkurve nicht linear, dann spricht man von einem so genannten Säulen-Mismatch.

Mixed bed Trennsäulen erleichtern dem Anwender die Säulenauswahl. Bei diesem Säulentyp hat der Hersteller mehrere Porengrößen gemischt und somit ein Säulenmaterial erzeugt, das einen sehr viel größeren Molekulargewichtsbereich abdecken kann als eine single porosity Trennsäule.

Allerdings trennen die mixed bed Trennsäulen in einem engen Molekulargewichtsbereich die Probe nicht so effektiv wie eine single porosity Trennsäule. Daher verwendet man meist zwei mixed bed Trennsäulen hintereinander, um einerseits eine genügend effektive Trennung zu erreichen und andererseits einen genügend großen Molekulargewichtsbereich abdecken zu können.

Als sehr hilfreich und kostensparend hat sich der Einsatz einer Vorsäule bewährt. Diese

sehr kurze Trennsäule, die in der Regel mit dem gleichen Material gefüllt ist welches auch in den Trennsäulen verwendet wird, hat eine Art Schutzwirkung. Deswegen wird sie im englischen Sprachgebrauch auch als „Guard Column“ bezeichnet. Jede Art von Verschmutzung in der Probe, die normalerweise auf den Trennsäulen aufgefangen werden würde, bleibt auf der Vorsäule haften. Nach einiger Zeit kann man die verschmutzte kostengünstige Vorsäule austauschen und die sehr viel teureren Trennsäulen weiter verwenden.

Kalibrierung eines GPC/SEC-Systems mit Standards

Hat man ein GPC/SEC-System mit Brechungsindexdetektion aufgebaut und die richtigen Trennsäulen für seine Applikation ausgewählt, dann muss man zunächst das GPC/SEC-System bzw. die Trennsäulen kalibrieren. Dazu verwendet man eine Satz an Polymer-, Biopolymer (Polysaccharid)- oder Proteinstandards mit genau bekanntem Molekulargewicht. Eine Faustregel besagt, dass man pro Trennsäule etwa vier bis fünf Standards mit unterschiedlichem Molekulargewicht verwenden sollte.

Abbildung 4 zeigt eine Säulenkalibrierung mit acht unterschiedlichen Standards. Es wird das Molekulargewicht der Standards über dem Elutionsvolumen aufgetragen.

Die Standards bestehen aus Polymeren, Biopolymeren oder Proteinen, die eine möglichst enge Molekulargewichtsverteilung aufweisen. Im Fall der Polymere ist Polystyrol der am häufigsten verwendete Standard, im Fall der Biopolymere sind Pullulane (lineares Polysaccharid) sehr verbreitet und im Bereich der Proteine ist kommerziell ein Satz an Proteinstandards verfügbar, der einen Molekulargewichtsbereich von ca. 10.000 D bis 700.000 D abdeckt.

Von jedem Standard wird nur ein Messpunkt auf der Kalibrierkurve aufgetragen. Es handelt sich um das Peak-Molekulargewicht (M_p), welches an der Peakspitze vorliegt. Die GPC/SEC-Software macht eine mathematische Anpassung aller Kalibrationspunkte an eine Kurve. Diese Fitfunktion kann mit den meisten am Markt verfügbaren Softwarepaketen weitestgehend frei gewählt werden.

Es besteht die Möglichkeit einen Fit erster Ordnung (linear) zu wählen oder einen Fit höherer Ordnung (meist bis zu fünfter Ordnung). In der überwiegenden Zahl der Fälle wird ein Fit dritter Ordnung gewählt, da diese S-förmige Kurve den tatsächlichen Verlauf der Trenncharakteristik einer Säulenkombination am besten widerspiegelt.

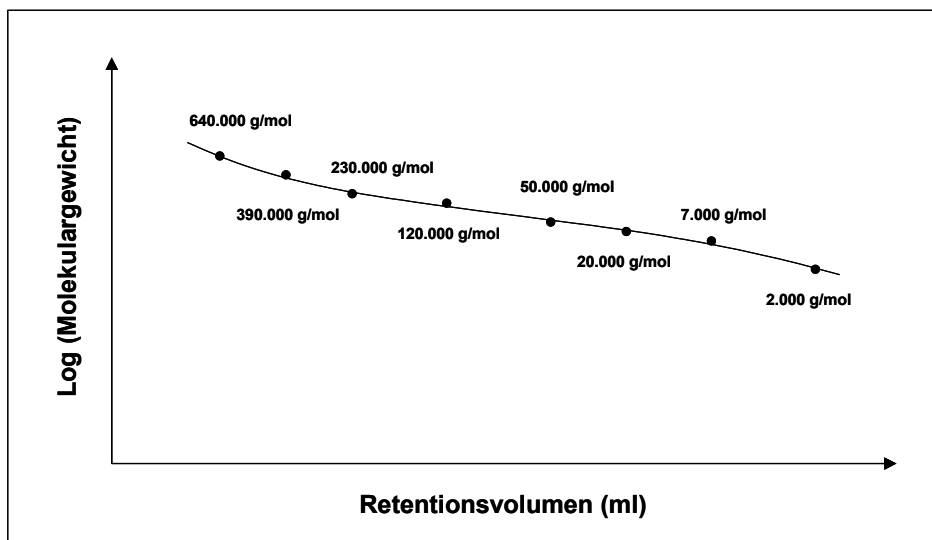


Abb. 4: Säulenkalibrierung mit acht unterschiedlichen Molekulargewichtsstandards

Durch den gewählten Fit an die Kalibrierkurve weichen die vorgegebenen Molekulargewichtswerte von den berechneten Molekulargewichtswerten ab. In einer DIN-Norm [2] wird vorgegeben, dass die relative Abweichung zwischen dem vorgegebenen Molekulargewichtswert (Sollwert) und dem über den Fit berechneten Molekulargewichtswert (Istwert) nicht mehr als 5% betragen darf.

Der Fit dritter Ordnung (Abbildung 5) ist meist am geeignetsten, da sich die Kurve sowohl im hochmolekularen Bereich wie auch im niedermolekularen Bereich ins Unendliche bewegt, was einer realen GPC-Trennung entspricht.

Ab einer gewissen Größe sind alle Moleküle so groß, dass sie auf der Trennsäule nicht mehr aufgetrennt werden und somit zum gleichen Zeitpunkt eluieren. Gleiches gilt für

Moleküle die eine bestimmte Größe unterschreiten. Da diese Moleküle in alle vorhandenen Poren diffundieren können werden auch sie nicht mehr aufgetrennt und eluieren ebenfalls zum gleichen Zeitpunkt. Die Trenngrenze im hochmolekularen Bereich wird als Ausschlussgrenze (Exclusion Limit) bezeichnet, während die Trenngrenze im niedermolekularen Bereich als totale Permeation (Total Permeation) bezeichnet wird.

Um die für eine Säulenkalibrierung benötigte Zeit zu verkürzen, werden oft mehrere Standards mit möglichst großem Molekulargewichtsunterschied in einer Injektion bzw. einem Probengläschen gemischt. Derartige Mischungen werden auch von verschiedenen Herstellern angeboten. Da lediglich die Peakspitzen zur Kalibrierung benötigt werden, ist es kein Problem wenn die einzelnen Peaks nicht basisliniengetreunt sind.

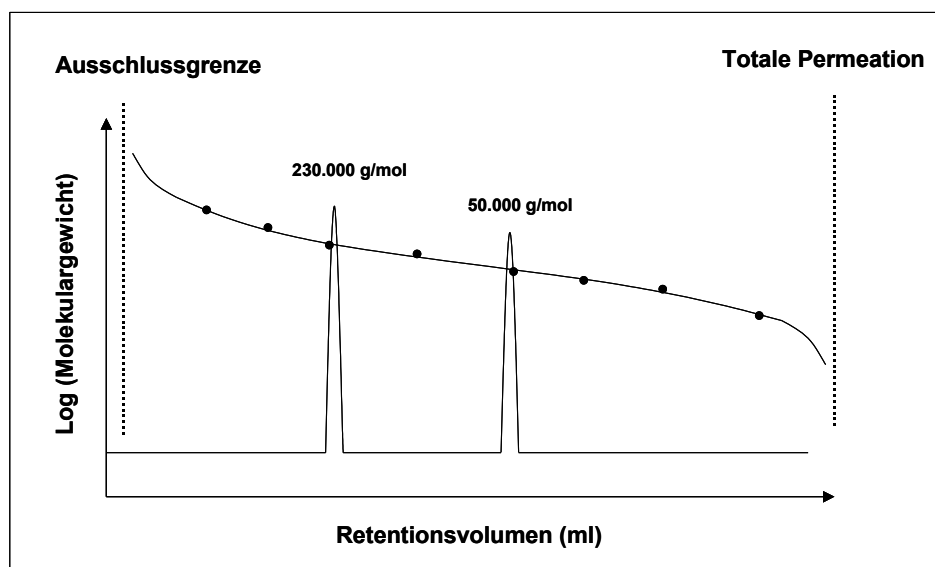


Abb. 5: Säulenkalibrierung mit Fit dritter Ordnung. Eingezeichnet sind die Ausschlussgrenze sowie die Totale Permeation

Neben der Kalibrierung mit mehreren eng verteilten Standards besteht auch die Möglichkeit einen einzigen breit verteilten Standard zur Kalibrierung der Trennsäulen zu verwenden, wenn von diesem Standard entweder die einzelnen Gewichtsfraktionen inklusive zugehöriger Molekulargewichte bekannt sind oder der M_n - und M_w - Wert (Erläuterung siehe nachfolgendes Kapitel „Interpretation der Ergebnisse“). Da diese Art der Kalibrierung aber nur in sehr wenigen Ausnahmefällen angewandt wird sei an diesem Punkt auf die Literatur verwiesen.

Interpretation der Ergebnisse

Nachdem eine Säulenkalibrierung durchgeführt wurde kann man nun damit beginnen Proben zu messen. Dazu wird eine ungefähre Menge der Probe in ein Probengefäß eingewogen und mit Lösungsmittel gelöst. Eine für die GPC/SEC typische Probenkonzentration ist 1 mg/ml.

Je nach Art und Molekulargewicht der Probe kann es bis zu mehreren Tagen dauern bis sich die Probe vollständig gelöst hat. Besonders bei sehr hochmolekularen Proben ist darauf zu achten, dass keine drastischen Bedingungen beim Lösen der Probe verwendet werden, da es dadurch zu Kettenbrüchen in den Makromolekülen und somit zu einem ungewollten Abbau der Probe bereits bei der Probenvorbereitung kommen kann.

Zu vermeiden sind Lösungsversuche mit Ultraschall und schnellem Rühren. Durch diese Methoden können zu starke Scherkräfte erzeugt werden. Ebenso darf die Probe nicht zu stark erhitzt werden, da sonst ein thermischer Abbau droht. Sanftes Schütteln und leichte Erwärmung sind zulässige Methoden, um das Lösen der Probe zu beschleunigen.

Nachdem man die Probe vollständig gelöst hat und eine klare Lösung resultiert, kann die Probe in das GPC/SEC-System injiziert werden. Dazu kann entweder eine Spritze und ein manuelles Injektionsventil verwendet werden oder man arbeitet mit einem Autosampler. Wenn die Probe die Trennsäulen durchlaufen hat, resultiert ein Probenpeak bei einem bestimmten Bereich des Elutionsvolumens (Abbildung 6).

Die GPC/SEC-Software kann nun jedem Messpunkt des Peaks über die zuvor erstellte Trennsäulenkalibration ein Molekulargewicht und eine Konzentration zuordnen. Typische Datensammelraten moderner GPC/SEC-Softwarepakete liegen im Bereich von 1-20 Punkte pro Sekunde.

Da eine Auflistung aller einzelnen Molekulargewichte und deren Konzentration zu auf-

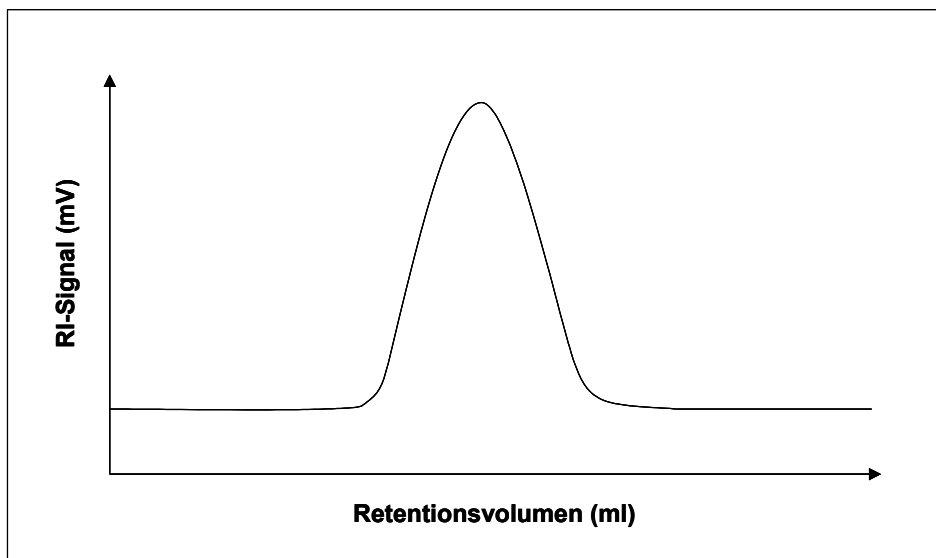


Abb. 6: Typisches Chromatogramm einer Makromolekularen Probe

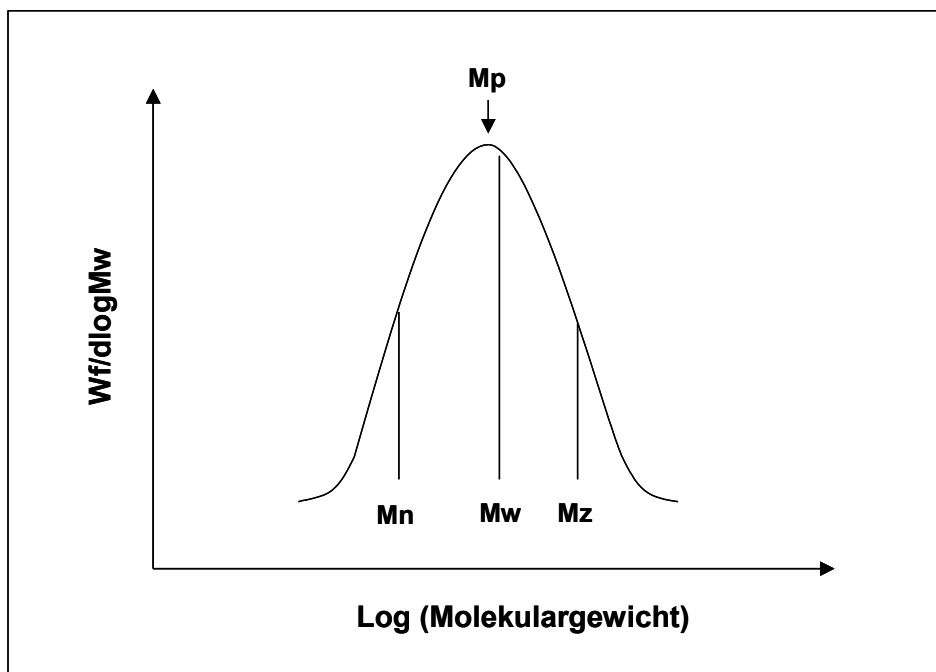


Abb 7: Differenzielle Molekulargewichtsverteilung einer makromolekularen Probe

wändig wäre, werden Mittelwerte für die Molekulargewichte berechnet.

Diese Mittelwerte werden folgendermaßen bestimmt:

$$M_n = \frac{\sum (n_i \cdot M_i)}{\sum n_i}$$

(Number Average = Zahlenmittelwert)

$$M_w = \frac{\sum (n_i \cdot M_i^2)}{\sum (n_i \cdot M_i)}$$

(Weight Average = Gewichtsmittelwert)

$$M_z = \frac{\sum (n_i \cdot M_i^3)}{\sum (n_i \cdot M_i^2)}$$

(Z-Average = Zentrifugenmittelwert)

$$M_{z+1} = \frac{\sum (n_i \cdot M_i^4)}{\sum (n_i \cdot M_i^3)}$$

M_p = Molekulargewicht an der Peakspitze

M_n ist der arithmetische Mittelwert der Molekulargewichte. Die Berechnung erfolgt wie

bei einem Würfelspiel: Summe der Anzahl der Würfel multipliziert mit der Augenzahl geteilt durch die Summe der Gesamtzahl aller Würfel.

Die folgenden Werte M_w , M_z und M_{z+1} errechnen sich nun ganz einfach dadurch, dass jedes Mal sowohl im Nenner wie auch im Zähler dieser Gleichung das Molekulargewicht in einer Potenz dazugenommen wird. So verschiebt sich der Molekulargewichtsmittelwert immer mehr in den hochmolekularen Bereich, wobei M_w meist am nächsten zur Peakspitze (M_p) liegt.

Berechnet man nun eine Molekulargewichtsverteilung aus diesen Werten, dann ergibt sich folgendes Bild:

Der Quotient aus M_w/M_n ist definiert als die Verteilungsbreite (Polydispersität) einer Probe. Besteht die Probe aus Molekülen die alle dasselbe Molekulargewicht aufweisen, dann ist der Polydispersitätsfaktor gleich 1. Dieser Fall tritt meist nur bei Proteinproben auf. Nahezu alle Polymer- und Biopolymerproben weisen einen Polydispersitätsfaktor größer 1 auf.

Neben den Molekulargewichten einer Probe und deren Verteilung können mit verschiedenen Softwarepaketen z. B. auch die Anteile einer Probe unterhalb oder oberhalb eines definierten Molekulargewichtes berechnet werden. Dies ist oft ein wichtiges Merkmal für die Qualitätskontrolle.

Die Limitierung der konventionellen GPC/SEC-Technologie liegt darin begründet, dass die gemessenen Molekulargewichte nur relativ gegen z. B. lineare Polystyrol-Standards gemessen werden. Wird z. B. eine Polycarbonat-Probe gegen Polystyrol-Standards gemessen, dann resultiert systematisch ein zu großes Molekulargewicht für die Polycarbonat-Probe, da das Polycarbonat-Molekül sich in Lösung nicht so gut knäulen kann wie ein Polystyrolmolekül. Das Polycarbonat-Molekül ist kettensteifer im Vergleich zu einem Polystyrolmolekül und hat daher in Lösung einen größeren hydrodynamischen Radius. Es wird daher immer etwas früher eluieren als ein gleich schweres

Polystyrolmolekül und somit ein zu hohes Molekulargewicht vortäuschen. Arbeitet man mit linearen Proben und linearen Standards, dann kann man diesen Unterschied im Elutionsvolumen mit zwei konstanten Faktoren ausgleichen und somit die Polystyrolkalibration in eine virtuelle Polycarbonatkalibrierung umrechnen (Mark-Houwink-Kalibration).

Oder man verwendet für jede Probenart entsprechende Standards, also z. B. Polycarbonat-Standards für die Messung von Polycarbonat. Die konventionelle GPC/SEC-Technologie versagt aber 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 Lichtstreuendetektoren oder Viskositätsdetektoren eingesetzt werden.

Literatur

[1] *Refractive Increment Data Book for Polymer and Biomolecular Scientists*, A. Theisen, C. Johann, M. P. Deacon and S. E. Harding, Nottingham University Press, 2000 (ISBN 1-897676-29-8)

[2] DIN 55672-1; GPC in Tetrahydrofuran