



Die Universelle Kalibrierung in der Gelpermationschromatographie: Absolute Molekulargewichte, Größen und Strukturen von Makromolekülen aus der Intrinsischen Viskosität

Dr. Gerhard Heinzmann, Alina Heinzmann, Sophia Heinzmann

Einleitung

In einem vorhergehenden [Artikel](#) dieser Reihe wurde die relative Kalibrierung in der Gelpermationschromatographie (GPC), auch Größenausschlusschromatographie genannt (SEC = Size Exclusion Chromatography), näher beschrieben [1]. Mit der Methode der relativen Kalibrierung können auf einfache Weise die Molekulargewichte von Polymer- und Biopolymerproben bestimmt werden. Allerdings sind die Ergebnisse nur relativ, da eine Kalibrierkurve aus linearen, eng verteilten Standards zur Ermittlung der Resultate verwendet wird. Man vergleicht die Probe mit dieser Kalibrierkurve, und die Aussage, die man erhält, lautet: Wäre die chemische Struktur der Probe identisch mit den zur Erstellung der Kalibrierkurve verwendeten Standards, dann wäre das Molekulargewicht der Probe so wie es aus dieser Messung resultiert. Weicht die Probe chemisch oder strukturell von den zur Erstellung der Kalibrierkurve verwendeten Standards ab, dann sind die Ergebnisse eigentlich falsch, oder aber eben relativ, was dem wissenschaftlichen Anspruch dieser Methode genügt.

Bei modernen Hochleistungspolymeren und vielen Biopolymeren kommt aber oft die Frage auf, welche wirklichen oder absoluten Molekulargewichte vorliegen, und welche Struktur das Polymer oder Biopolymer aufweist. Ist es linear oder verzweigt? Und wenn es verzweigt ist, wie hoch ist der Verzweigungsgrad bei einem gegebenen Molekulargewicht? Diese Fragen können mit der Methode der relativen Kalibrierung in der GPC/SEC nicht beantwortet werden, da eine Verschiebung des Peaks im Elutionsvolumen immer nur als Änderung des relativen Molekulargewichtes interpretiert werden kann. Strukturen von Polymeren sind mit der Technik der relativen Kalibrierung nicht bestimmbar. Meist wird als geeignete Technik zur Messung von absoluten Molekulargewichten und

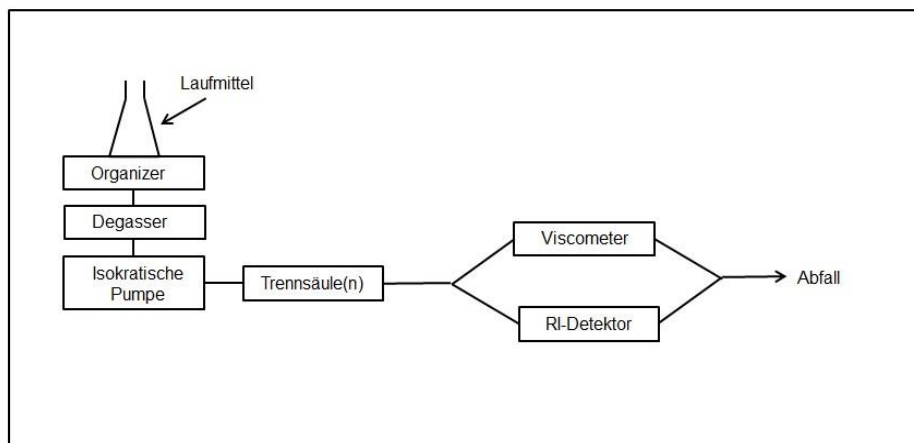


Abb. 1: Aufbau eines GPC/SEC-Systems für die Universelle Kalibrierung

$$\text{Peakfläche Brechungsindexdetektor} = \text{Gerätekonstante} \times \text{Konzentration} \times (dn/dc)$$

$$\text{Peakfläche Viskositätsdetektor} = \text{Gerätekonstante} \times \text{Konzentration} \times \text{Intrinsische Viskosität}$$

Polymerstrukturen die statische Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS=Multi Angle Static Laser Light Scattering) angegeben [2]. Es gibt allerdings auch die Technik der Universellen Kalibrierung in der GPC/SEC, die ohne die statische Lichtstreuung auskommt, und dennoch alle Resultate erzielen kann, die auch mit der statischen Lichtstreuung bestimmt werden können. Weiterhin unterliegt die statische Lichtstreuung physikalischen Grenzen, was z. B. die Bestimmung von molekularen Größen, wie dem Trägheitsradius einer Polymerprobe, und deren Verzweigungsstrukturen betrifft. Die Universelle Kalibrierung kann weitaus kleinere Makromoleküle umfassend charakterisieren, als dies mit der statischen Lichtstreuung möglich ist. Im Folgenden soll die Technik der Universellen Kalibrierung näher erläutert werden.

Die Universelle Kalibrierung in der GPC/SEC: Technische Voraussetzungen

Ein GPC/SEC-System, mit dem eine Universelle Kalibrierkurve erstellt werden kann, muss zumindest einen differentiellen Brechungsindexdetektor (RI = Refractive Index Detector) enthalten, der die Konzentration der Probe an jedem

Punkt des Elutionsvolumens misst, und zusätzlich einen Viskositätsdetektor, mit dessen Hilfe die Intrinsischen Viskositäten der Polymerproben bestimmt werden können. Da beide Detektoren keinen zu hohen Rückdruck bekommen dürfen, werden die beiden Detektoren meist parallel zueinander geschaltet (Abbildung 1). Nur so kann eine einwandfreie Funktion beider Detektoren im GPC/SEC-System gewährleistet werden. Bei dem Viskositätsdetektor handelt es sich heutzutage in der Regel um einen modernen, differentiellen Vierkapillar-Viskositätsdetektor mit ausbalancierter Messbrücke, der nach dem Wheatstone-Prinzip funktioniert, und der Verzögerungskolonnen in einem Arm der Viskositätsmessbrücke enthält [3].

Das Ansprechverhalten der beiden Detektoren ist unter Abbildung 1 beschrieben.

Der dn/dc -Wert ist das Brechungsindexinkrement einer Polymerprobe, es wird in ml/g angegeben [4].

Erstellung einer Universellen Kalibrierkurve

Das Prinzip der Universellen Kalibrierung in der GPC/SEC wurde 1967 erstmals von dem Arbeitskreis um Henri Benoit beschrieben [5]. Benoit zeigte auf, dass, wenn man das Produkt aus Molekulargewicht und Intrinsic Viskosität von Polymerstandards gegen deren Retentionsvolumen aufträgt, alle Polymerstandards auf eine Kalibrierkurve fallen, vollkommen unabhängig von deren chemischer Zusammensetzung und deren Verzweigungsstruktur (Abbildung 2).

Die physikalische Grundlage der Universellen Kalibrierung in der GPC/SEC beruht auf der Tatsache, dass das Produkt aus Molekulargewicht (MW) einer Probe und deren Intrinsic Viskosität (IV) proportional zum Hydrodynamischen Volumen (Vh) in Lösung ist:

$$MW \times IV \sim V_h$$

Zur Erstellung einer Universellen Kalibrierkurve werden, wie im Fall der relativen Kalibrierung, zunächst die Peak-Molekulargewichte einer Reihe von eng verteilten Standards über dem Elutionsvolumen aufgetragen. Als weiterer Parameter fließt nun aber auch noch die gemessene Intrinsic Viskosität der Standards in die Kalibrierung mit ein.

Auswertung der Messdaten einer Universellen Kalibrierung

Wurde eine Universelle Kalibrierkurve mit eng verteilten Polymerstandards erstellt, dann ist die Auswertung von Polymerproben sehr einfach. Der Brechungsindexdetektor misst die Konzentration

der Probe an jedem Punkt des Elutionsvolumens, und der Viskositätsdetektor misst die Intrinsic Viskosität der Probe, ebenfalls an jedem Punkt des Elutionsvolumens. Aus beiden Informationen resultiert aus dem Vergleich der Probe mit der Universellen Kalibrierkurve das absolute Molekulargewicht der Probe und dessen Verteilung. Ein Beispiel soll erläutern, wie dies physikalisch möglich ist: Eluieren z. B. eine verzweigte und eine lineare Polymerprobe gleicher chemischer Zusammensetzung zur gleichen Zeit, dann muss die verzweigte Probe eine geringere Intrinsic

Viskosität aufweisen, da Sie mehr Masse im selben Volumen besitzt, und somit eine höhere molekulare Dichte aufweist. Die Intrinsic Viskosität ist umgekehrt proportional zur molekularen Dichte eines Makromoleküls. Verrechnet man nun das relative Molekulargewicht, welches aus dem Retentionsvolumen der Probe resultiert, mit der aus dem Viskositätsdetektor resultierenden Intrinsic Viskosität, dann erhält man das absolute Molekulargewicht der Probe, vollkommen unabhängig von deren Struktur und deren chemischer Zusammensetzung.

Tab. 1: Daten für die Erstellung einer Universellen Kalibrierkurve mit eng verteilten Polystyrolstandards (PS)

Standard	Retentionsvolumen (in ml)	Mp (in g/mol)	Intrinsic Viskosität (in dl/g)
PS 1 kDa	21,09	1.000	0,040
PS 4 kDa	20,38	4.000	0,063
PS 7 kDa	20,05	7.000	0,077
PS 10 kDa	19,76	10.000	0,091
PS 18 kDa	19,05	18.000	0,137
PS 43 kDa	17,97	43.000	0,260
PS 90 kDa	17,01	90.000	0,440
PS 150 kDa	15,43	146.000	0,580
PS 280 kDa	12,93	282.000	1,006
PS 570 kDa	10,27	570.000	1,500

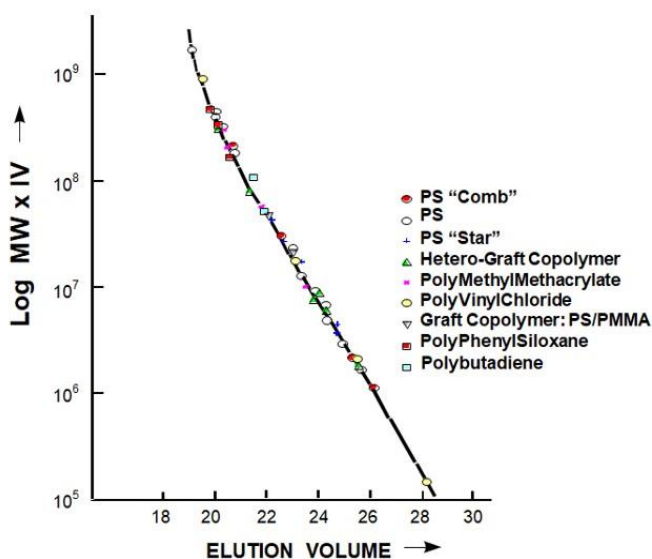


Abb. 2: Universelle Kalibrierkurve nach H. Benoit et. al. [5]

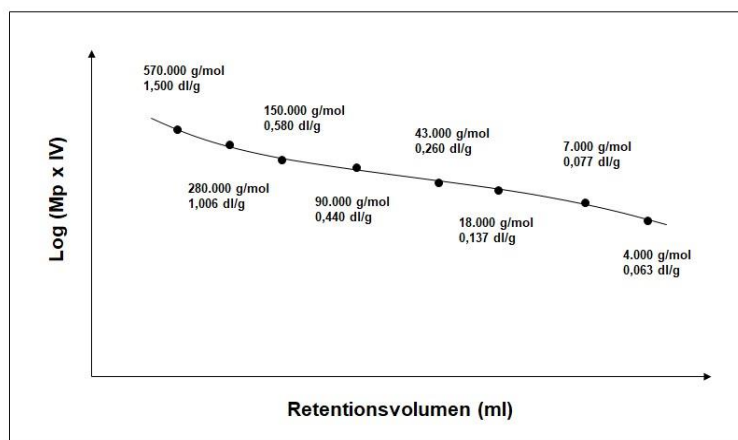


Abb. 3: Universelle Kalibrierkurve mit eng verteilten, linearen Polystyrol-Polymerstandards. Aufgetragen sind die Werte für die Peak-Molekulargewichte (Mp) der Polymerstandards und deren Intrinsic Viskositäten (IV) über dem Retentionsvolumen

Nebenstehendes Beispiel soll dies verdeutlichen.

Neben den absoluten Molekulargewichten einer Probe können auch deren Trägheitsradien R_g mittels der Flory-Fox Theorie [6], und deren hydrodynamische Radien ermittelt werden, da, wie schon zuvor erwähnt, das Produkt aus dem Molekulargewicht einer Probe und deren Intrinsic Viskosität proportional zum Hydrodynamischen Volumen V_h , und somit auch zum Hydrodynamischen Radius R_h , in Lösung ist

Flory-Fox-Gleichung:

$$MW \times IV = 6^{3/2} \times \Theta_0 \times R_g^3$$

(Θ_0 = Flory-Fox-Konstante)

Über den Mark-Houwink-Plot, die Auftragung der Intrinsic Viskositäten einer Polymerprobe über deren absolute Molekulargewichte, können weiterhin die molekularen Strukturen der Polymerprobe sowie deren Verzweigungsgrade bestimmt werden [7]. Grundlage für die Bestimmung der Verzweigungsgrade ist die Zimm-Stockmayer-Theorie [8].

Vorteile und Nachteile der Universellen Kalibrierung im Vergleich zur statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung

Ein wesentlicher Vorteil der Universellen Kalibrierung besteht sicherlich darin, dass kein statischer Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor (MALS-Detektor) zur Bestimmung der absoluten Molekulargewichte und der molekularen Verzweigungsstrukturen im GPC/SEC-System benötigt wird. Weiterhin können mit der Universellen Kalibrierung neben den absoluten Molekulargewichten einer Probe kann auch deren Trägheitsradius R_g mittels der Flory-Fox Theorie [6], und deren hydrodynamischer Radius ermittelt werden, da, wie schon zuvor erwähnt, das Produkt aus dem Molekulargewicht einer Probe und deren Intrinsic Viskosität proportional zum Hydrodynamischen Volumen V_h , und somit auch zum Hydrodynamischen Radius R_h , in Lösung ist. Die statische Mehrwinkel-Lichtstreuung kann aus physikalischen Gründen hingegen nur den Trägheitsradius R_g einer Polymerprobe bestimmen. Der hydrodynamische Radius einer Polymerprobe ist mit der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung nicht bestimmbar. Ein wesentlicher Nachteil der Universellen Kalibrierung im Vergleich zur statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung besteht allerdings darin, dass es im

Beispiel: Auswertung der Messdaten einer Universellen Kalibrierung

Nehmen wir an, zwei Proben eluieren zum gleichen Zeitpunkt, und würden damit, verglichen mit der Kalibrierkurve, zunächst beide ein relatives Molekulargewicht von 100.000 g/mol anzeigen. Nun muss, die verzweigte Probe, wie schon erwähnt, physikalisch zwingend eine geringere Intrinsic Viskosität aufweisen, da sie eine höhere molekulare Dichte besitzt. Verrechnet man nun das relative Molekulargewicht mit der gemessenen Intrinsic Viskosität, dann erhält man das absolute Molekulargewicht. In diesem Beispiel hat die lineare Probe eine Intrinsic Viskosität von 1,0 dl/g, und die verzweigte Probe hat eine Intrinsic Viskosität von 0,5 dl/g.

Es gilt daher:

$$\frac{\text{Relatives Molekulargewicht}}{\text{Intrinsic Viskosität}} = \text{Absolutes Molekulargewicht}$$

Lineare Probe:

$$\frac{100.000}{1,0} = 100.000 \frac{g}{mol} \text{ (Absolutes Molekulargewicht)}$$

Verzweigte Probe:

$$\frac{100.000}{0,5} = 200.000 \frac{g}{mol} \text{ (Absolutes Molekulargewicht)}$$

Fall der Universellen Kalibrierung sehr wichtig ist, dass keine Wechselwirkungen zwischen der Polymerprobe und dem Material in der Trennsäule vorhanden sind. Derartige Wechselwirkung zwischen Probe und Trennsäulenmaterial würden das Retentionsvolumen der Probe verfälschen. Das Retentionsvolumen der Probe ist aber ein Parameter, der unmittelbar in die Bestimmung der Ergebnisse eingeht, die mittels der Universellen Kalibrierung bestimmt werden. Gerade in der wässrigen GPC/SEC kommt es aber oft zu Wechselwirkungen zwischen der Polymerprobe und dem Material in der Trennsäule, da hier oft OH-Gruppen in der Probe vorhanden sind, die mit den polaren Anteilen des Trennsäulenmaterials Wechselwirkungen ausbilden können.

Dies würde die Resultate der Universellen Kalibrierung verfälschen. Im Gegensatz dazu ist das Retentionsvolumen der Probe im Fall der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung nicht relevant. Es wird zur Bestimmung der absoluten Molekulargewichte einer Polymerprobe sowie deren molekularen Größen und Verzweigungsstrukturen nicht benötigt. All diese Informationen resultieren im Fall der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung direkt aus der Fläche der Peaks der Mehrwinkel-Lichtstreuung und der Winkelabhängigkeit des gestreuten Lichts in den unterschiedlichen Messwinkeln. Weiterhin wird zur Kalibrierung eines Mehrwinkel-Lichtstreuendetektors nur ein einziger, eng verteilter Polymerstandard

mit bekanntem Molekulargewicht benötigt, während im Fall der Universellen Kalibrierung eine Reihe von eng verteilten Polymerstandards mit bekanntem Molekulargewicht benötigt wird. Weiterhin muss die Intrinsic Viskosität mindestens eines Standards bekannt sein, falls auch der Viskositätsdetektor kalibriert werden soll oder muss. Mit der Methode der Universellen Kalibrierung sind aber auch Polymerstrukturen von kleinen Makromolekülen zugänglich, die aufgrund der fehlenden Winkelabhängigkeit bei Makromolekülen mit einem Trägheitsradius von weniger als 10 nm über die statische Mehrwinkel-Lichtstreuung nicht bestimmbar sind.

Fazit

Die Universelle Kalibrierung stellt in der GPC/SEC eine elegante Methode dar, mit deren Hilfe die absoluten Molekulargewichte von Polymer- und Biopolymerproben bestimmt werden können, wie auch deren Trägheitsradien und Hydrodynamische Radien, und die Polymerstrukturen und Verzweigungsgrade, ganz ohne Einsatz eines Mehrwinkel-Lichtstreuendetektors. Ein wesentlicher Vorteil der Universellen Kalibrierung ist ein höherer Informationsgehalt im Vergleich zur Mehrwinkel-Lichtstreuung. Ein wesentlicher Nachteil der Universellen Kalibrierung im Vergleich zur statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung besteht hingegen darin, dass im Fall der Universellen Kalibrierung eine komplett wechselwirkungsfreie GPC/SEC Tren-

nung vorliegen muss, da das Retentionsvolumen der Probe maßgeblich ist für die Ergebnisse der Messung, während im Fall der Mehrwinkel-Lichtstreuung das Retentionsvolumen einer Probe nicht für die Berechnung der Resultate relevant ist. Weiterhin müssen für die Erstellung einer Universellen Kalibrierkurve eine Reihe von eng verteilten Polymerstandards gemessen werden, während zur Kalibrierung eines Lichtstredetektors nur ein einziger Standard gemessen werden muss.

Literatur

[1] G. Heinzmann, A. Heinzmann und S. Heinzmann, *„Die relative Kalibrierung in der Gelpermationschromatographie: Warum es wissenschaftlich korrekt sein kann, Äpfel mit Birnen zu vergleichen“*; Analytik NEWS (2022)

[2] G. Heinzmann, *„Statische und Dynamische Lichtstreuung - Grundlagen und Anwendungen in der Polymer-, Protein- und Nanopartikelanalytik“*, Analytik NEWS (2016)

[3] G. Heinzmann, *„Differentielle Viskositätsdetektoren in der GPC/SEC und der Feld-Fluss Fraktionierung – Verzögerungskolonne oder Holdup-Reservoir?“*; Analytik NEWS (2020)

[4] G. Heinzmann, A. Heinzmann und S. Heinzmann, *„Das Brechungsindexinkrement – ein kleiner Wert mit großer Wirkung im Bereich der Polymeranalytik“*; Analytik NEWS

[5] H. Benoit, P. Rempp, Z. Grubisic, *„A Universal Calibration for Gel Permeation Chromatography“*, Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Letters, 5, 753, (1967)

[6] Fox, T. G., Flory, P. J., *„Second-Order Transition Temperatures and Related Properties of Polystyrene. I. Influence of Molecular Weight“*, Journal of Applied Physics, 21 (6), 581–591, (1950)

[7] G. Heinzmann, A. Heinzmann und S. Heinzmann, *„Konformationsplot oder Mark-Houwink-Plot? Welche graphische Auftragung von GPC/SEC-Daten eignet sich besser zur Bestimmung von Polymerstrukturen?“*; Analytik NEWS (2023)

[8] Zimm, B. H., Stockmayer, W. H., Journal of Chemical Physics, 17, 1301, (1949)