

Relativ oder Absolut?

Bewertung von Messergebnissen in der Gelpermationschromatographie

Gerhard Heinzmann

Einleitung

Werden mit der Gelpermationschromatographie (GPC), auch Größenausschlusschromatographie genannt (SEC = Size Exclusion Chromatography), Molekulargewichte von makromolekularen Proben bestimmt dann stellt sich dem Anwender oft die Frage, ob das erzielte Ergebnis relativ oder absolut ist. Verwendet man z. B. einen statischen Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor (MALS = Multi Angle Light Scattering Detector) und kalibriert diesen mit einem eng verteilten Polymerstandard, stellt sich die Frage, ob man dann relative Ergebnisse erhält, weil man ja relativ zu einem Kalibrierstandard misst oder ob man absolute Ergebnisse – also tatsächlich vorliegende Molekulargewichte – erhält, da das Signal des MALS-Detektors direkt proportional zum Molekulargewicht einer Probe ist.

Relative und Absolute Molekulargewichte

Die Frage ob man relative Molekulargewichte oder absolute Molekulargewichte mit der GPC/SEC bestimmt kann alleine durch die Art der verwendeten Detektoren beantwortet werden.

Relative Molekulargewichte werden immer dann bestimmt, wenn das GPC/SEC-System nur mit einem Konzentrationsdetektor ausgestattet ist. Dies ist in den meisten Fällen ein Brechungsindexdetektor (RI = Refractive Index Detector). Weiterhin werden oft auch UV-Detektoren, Fluoreszenzdetektoren sowie seltener Verdampfungslichtstreuendetektoren (ELSD = Evaporative Light Scattering Detector) verwendet.

All diesen Detektoren ist gemeinsam, dass sie lediglich auf die Konzentration einer Probe ansprechen und nicht auf das Molekulargewicht. Außerdem hat jeder dieser Detektoren noch einen zweiten, detektorspezifischen Ansprechfaktor wie z. B. das Brechungsindexinkrement (dn/dc) der Probe im Fall des RI-Detektors und den Extinktionskoeffizienten (ϵ) der Probe bei einer gegebenen Wellenlänge im Fall des UV-Detektors.

Um von dem zunächst erhaltenen reinen Konzentrationssignal nun auf das Molekulargewicht einer Probe zu kommen, muss man das GPC/SEC-System mit einer Reihe von Polymerstandards mit bekanntem Molekulargewicht kalibrieren. Meist werden im organischen Bereich Polystyrol- oder PMMA-Standards verwendet, im wässrigen Bereich sind Polyethylenoxide und Pullulane am verbreitetsten.

Es wird eine Kalibrierkurve erstellt, bei der die Molekulargewichte der Standards über deren Elutionsvolumen aufgetragen werden (Abbildung 1).

Eluiert nun eine Probe, dann wird aus dem Elutionsvolumen und der Kalibrierkurve das Molekulargewicht der Probe bestimmt. Man nimmt also quasi an, dass es sich bei der Probe um dasselbe Material (mit derselben Struktur) handelt, aus dem auch die Standards bestehen. Sollte dies nicht der Fall sein, dann ist das bestimmte Molekulargewicht eben nur relativ zu den verwendeten Standards.

Absolute Molekulargewichte werden hingegen dann ermittelt, wenn das GPC/SEC-System zusätzlich zum Konzentrationsdetektor mit einem molekulargewichtssensitiven

Detektor ausgestattet ist. Dies kann entweder ein statischer Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor oder ein Viskositätsdetektor sein.

Statische Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS)

Das Signal eines MALS-Detektors ist direkt proportional zum dem nach dem Gewicht gemittelten Molekulargewicht M_w einer makromolekularen Probe (Gleichung 1):

Gleichung [1]

$$\text{Fläche des Lichtstreusignals} = \text{Gerätekonstante} \times \text{Konzentration} \times (dn/dc)^2 \times M_w$$

Sind die Konzentration und das Brechungsindexinkrement dn/dc einer Probe bekannt, dann kann man mit einem MALS-Detektor absolute, also wirklich vorhandene Molekulargewichte bestimmen. Eine der beiden Größen (Konzentration und dn/dc) kann auch aus dem Brechungsindexdetektor bestimmt werden.

Ob die Gerätekonstante des MALS-Detektors mit Toluol oder einem eng verteilten Polymer- oder Proteinstandard bestimmt wird, ist dabei im Rahmen der GPC/SEC-Messgenauigkeit

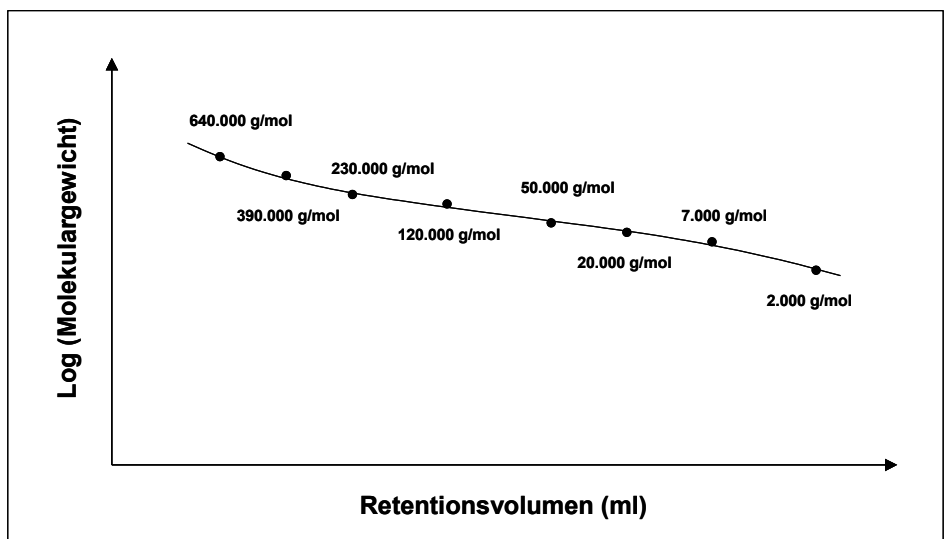


Abb. 1: Kalibrierung eines GPC/SEC-Systems mit eng verteilten Polymerstandards

vollkommen unerheblich, da der mit Abstand größte Fehler bei GPC/SEC-Messungen durch den statistischen Trennprozess auf der GPC/SEC-Säule entsteht.

Ein MALS-Detektor misst also auch dann absolute Molekulargewichte, wenn er mit einem eng verteilten Polymer- oder Proteinstandard kalibriert wird und nicht mit Toluol.

Viskositätsdetektion

Wird zusätzlich zum Konzentrationsdetektor ein Viskositätsdetektor verwendet, dann können ebenfalls absolute Molekulargewichte bestimmt werden. Da aber im Gegensatz zum MALS-Detektor das Signal des Viskositätsdetektors nicht direkt proportional zum Molekulargewicht einer makromolekularen Probe sondern zur deren Intrinsischen Viskosität ist (Gleichung 2), muss zur Bestimmung von absoluten Molekulargewichten eine so genannte „Universelle Kalibriergerade“ erstellt werden.

Gleichung [2]

$$\text{Fläche des Viskositätsdetektors} = \text{Gerätekonstante} \times \text{Konzentration} \times \text{Intr. Viskosität}$$

Bei der Universellen Kalibration werden – wie im Fall der relativen Kalibrierung – die Molekulargewichte einer Reihe von eng verteilten Standards über dem Elutionsvolumen aufgetragen. Als weiterer Parameter fließt nun aber auch noch die gemessene Intrinsische Viskosität der Standards in die Kalibrierung mit ein (siehe Tabelle 1).

Da die Intrinsische Viskosität umgekehrt proportional zur Dichte eines Moleküls ist, kann man aus dem Elutionsvolumen – welches dem hydrodynamischen Volumen der Probe entspricht – und deren Dichte die absolute Masse der Probe bestimmen.

Fazit

Die Frage ob man mit einem GPC/SEC-System relative oder absolute Molekulargewichte bestimmen kann, lässt sich sehr einfach anhand der verwendeten Detektoren beantworten. Relative Ergebnisse werden immer dann erzielt, wenn als Detektor nur ein Konzentrationsdetektor verwendet wird.

Da in diesem Fall eine Kalibrierkurve mit eng verteilten Molekulargewichtsstandards erstellt werden muss und die Probe dann gegen diese Standardkurve verglichen wird, ist das resultierende Molekulargewicht ein relativer Wert.

Werden hingegen molekulargewichtssensitive Detektoren wie statische Mehrwinkel-Lichtstreuungsdetektoren (MALS) und Viskositätsdetektoren zur Bestimmung von Molekulargewichten verwendet, dann resultieren absolute Molekulargewichte.

Der MALS-Detektor kann dabei die Molekulargewichte nach erfolgter Kalibrierung direkt bestimmen, da sein Signal direkt proportional zum Molekulargewicht einer Probe ist. Dagegen muss bei Verwendung eines Viskositätsdetektors eine Universelle Kalibriergerade mit eng verteilten Molekulargewichtsstandards erstellt werden.

Bei beiden molekulargewichtssensitiven Detektoren (MALS und Viskositätsdetektor) ist es im Rahmen der GPC/SEC-Messgenauigkeit vollkommen unerheblich welche Substanz zur Kalibrierung der Detektoren verwendet wird.

Tab. 1: Daten für eine universelle Kalibrierung mit eng verteilten Polystyrolstandards (PS)

Standard	Retentionsvolumen [ml]	Mp [g/mol]	Intr. Viskosität [in dl/g]
PS 1.000	21,0969	1.000	0,0405
PS 4.000	20,3856	4.000	0,0635
PS 7.000	20,0521	7.000	0,0778
PS 10.000	19,7675	10.000	0,0915
PS 18.000	19,0558	18.000	0,1378
PS 43.000	17,8792	43.000	0,2603
PS 90.000	17,0129	90.000	0,4406