

Anwendertipps für die etwas andere LC

GPC/SEC: Detektion und Einfluss der Auswerteparameter



► Dr. Daniela Held, Marketing und Vertrieb
PSS, Polymer Standards Service



► Peter Kilz, Softwareentwicklung und
Komplettlösungen, Mitbegründer von PSS,
Polymer Standards Service

GPC/SEC ist eine flüssigchromatographische Methode für die Charakterisierung von Makromolekülen, die ihre ganz eigenen Anforderungen an experimentelle Ausstattung und Auswertung stellt. Die Unterschiede im Vergleich zu anderen flüssigchromatographischen Verfahren liegen hauptsächlich in der Verwendung von speziellen Trennsäulen und der Verwendung von Spezialdetektoren. Häufig kommen in der GPC/SEC gekoppelte Detektionsverfahren zum Einsatz, die Zugang zu weiteren Produkteigenschaften liefern.

Multiple Eigenschaftsverteilungen bei Makromolekülen

Das Besondere an Makromolekülen ist, dass diese, mit Ausnahme einiger Proteine und der DNA, eine Molmassenverteilung aufweisen. Selbst Homopolymere, die einfachsten aus nur einer Grundeinheit aufgebauten Makromoleküle, sind Mischungen einer homologen Reihe von Vielfachen dieser Grundeinheit. Für Makromoleküle kann aus diesem Grund keine definierte Molmasse angegeben werden. Es werden Molmassenmittelwerte, z.B. die zahlenmittlere Molmasse, M_n , und die gewichtsmittlere Molmasse, M_w sowie die Breite der Verteilung, Polydispersität D , angegeben:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum M_i \cdot n_i}{\sum n_i}$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum M_i \cdot w_i}{\sum w_i} = \frac{\sum M_i^2 \cdot n_i}{\sum M_i \cdot n_i}$$

$$D = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$$

Tab. 1: Einfluss der Lage des internen Standards auf die Molekulargewichte am Beispiel von M_w

Interner Standard [ml]	Differenz [%]	M_w [Da]	Differenz [%]
21,80	+2,10	46.500	+36,8
21,65	+1,40	41.900	+23,2
21,50	+0,70	37.500	+10,3
21,35	–	34.000	–
21,20	–0,70	29.800	–12,4
21,05	–1,40	26.400	–22,4
20,90	–2,10	23.300	–31,5

Neben der Molmassenverteilung (molekulare Uneinheitlichkeit, MMD) sind in fast allen Fällen aber noch weitere Eigenschaftsverteilungen zu beachten. Hier sind neben der Endgruppenverteilung (Endgruppenuneinheitlichkeit, FTD) auch die Comonomerverteilung (chemische Uneinheitlichkeit, CCD) und die strukturelle Verteilung (strukturelle Uneinheitlichkeit, MAD) zu nennen. Diese Verteilungen sind mit Hilfe fraktionierender Verfahren wie der GPC/SEC zugänglich.

Durch die konsequente Weiterentwicklung im Bereich Polymer-HPLC und mehrdimensionale Chromatographie konnten in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte bei der simultanen Bestimmung von multiplen Eigenschaftsverteilungen gemacht werden [1, 2].

Zur Bestimmung der einfachen Molmassenverteilung hat sich GPC/SEC als Standardmethode sowohl in der Qualitätskontrolle, als auch in der F&E etabliert. Der Siegeszug der GPC/SEC ist wohl auch dadurch zu erklären, dass diese kostengünstig und mit einfachen, meist schon vorhandenen Mitteln durchzuführen ist. Man nimmt einfach eine HPLC-Anlage, ersetzt die Säule durch eine GPC-Säule, kalibriert mit Referenzmaterialien und schon hat man die Molmassenmittelwerte und die Verteilung.

So weit die Theorie und das Lehrbuchwissen. In der Praxis muß man natürlich einige wesentliche Details beachten, die auf den ersten Blick nicht so offensichtlich sind:

1) Detektor- und Geräteauswahl für GPC/SEC

Die Anforderungen an Geräte- und Detektoren sind in der GPC/SEC im Prinzip ähnlich wie in der HPLC. Es werden robuste, wartungsarme und präzise Geräte benötigt. Im Einzelnen findet man aber einige Punkte, die besondere Aufmerksamkeit verdienen.

a) Die Lösungsmittelbeständigkeit von den Komponenten und ihren Teilen (Dichtungen, Kapillaren, Fritten u.ä.) hat in der GPC/SEC eine besondere Bedeutung, da hier sehr häufig auch anspruchsvolle Lösungsmittel (THF, Chloroform,



Abb. 1: GPC/SEC-Anlage mit spezieller Auswertesoftware

HFIP, DMF u.ä.) verwendet werden, denen oftmals noch Salz zugesetzt wird. Dadurch steigt die Korrosionsanfälligkeit und Dichtungen bzw. mechanische Bauteile werden stark beansprucht. Es lohnt sich also hier auf qualitativ hochwertige Komponenten zu achten. Im Gegensatz zur HPLC wird die GPC/SEC isokratisch mit einem Lösungsmittel oder einer festen Lösungsmittelzusammensetzung gefahren. Für GPC/SEC reicht damit eine isokratische Pumpe, wie die PSS GPC1200 isokratische Pumpe, völlig aus (vgl. Abb. 1). Nur für Polymer-HPLC oder 2D Chromatographie werden Gradientenpumpen benötigt.

b) Besonderes Augenmerk verdient die Konstanz der Flussrate der verwendeten Pumpe. In der GPC/SEC wird die Elutionsvolumen-Achse kalibriert und zur Auswertung herangezogen. Die Reproduzierbarkeit der Analysenbedingungen und ihr Bezug zur Kalibration spielt

eine wesentliche Rolle. Kleine Abweichungen auf der (linearen) Elutionsvolumenachse können zu großen Abweichungen auf der (logarithmischen) Molmassenachse führen. Überprüfen kann man den Bezug zur Kalibration indem bei jeder Messung ein interner Standard als Flussmarker mit gemessen wird. Tabelle 1 zeigt den Einfluss auf die Ergebnisse, wenn sich die Lage des internen Standards ändert. Abbildung 2 zeigt das Elugramm und die Molmassenergebnisse einer korrekt nach DIN 55672 ausgewerteten Probe mit und ohne Korrektur mit dem internen Standard.

c) Der Wahl des passenden Detektors für die eigenen Fragestellungen ist bei der GPC-Analytik ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Diodenarraydetektoren (DAD), wie sie sich in der HPLC durchgesetzt haben, werden in der GPC/SEC kaum eingesetzt. Wenn überhaupt mit UV-Detektion gearbeitet wird, dann werden UV-Detektoren mit einer fest eingestellten Wellenlänge verwendet. Weit verbreitet in der GPC/SEC sind Brechungsindexdetektoren (RI), die universell einsetzbar sind als UV-Detektoren. Sollen sehr niedrige Konzentrationen detektiert werden, werden auch Verdampfungslichtstreuendetektoren (ELSD) eingesetzt, die zwar den Vorteil der höheren Empfindlichkeit haben, allerdings auch höhere experimentelle Anforderungen stellen (Gasanschluss, geeignete, salzlose Lösungsmittel oder Lösungsmittel mit verdampfbaren Salzen). Außerdem ist zu beachten, dass diese Detektionsart bei Polymeren nicht in allen Fällen quantitativ arbeitet.

Neben diesen sogenannten Konzentrationsdetektoren werden in der GPC/SEC auch molmassensensitive Detektoren wie Mehrwinkel-

lichtstreuendetektoren (MALLS), Klein- und Rechtwinkellichtstreuendetektoren (LALLS/RALLS) und on-line Viskositätsdetektoren eingesetzt. Diese Detektoren müssen in Kombination mit einem Konzentrationsdetektor eingesetzt werden und werden häufig ebenfalls miteinander kombiniert. Für die Triple-Detektion benötigt man beispielsweise einen Konzentrationsdetektor (z. B. RI), einen 90°-Winkellichtstreuendetektor (RALLS) und ein on-line Viskosimeter, welches es erlaubt die methodischen Limitierungen der 90°-Winkellichtstreuung (allerdings nicht der Lichtstreuung generell) zu überwinden.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die zur Verfügung stehenden Detektoren und Methoden und zeigt welche zusätzlichen Verteilungsinformationen neben der MMD gewonnen werden können.

Natürlich ist nicht jeder Detektor geeignet für jede Applikation. Abbildung 3 zeigt exemplarisch für eine Probe mit einer breiten Molekulargewichtsverteilung die zu erwartenden Detektorsignale.

Vereinfacht kann man die Signalintensität (SI) eines Detektors (die Response) immer mit der folgenden Formel beschreiben:

$$SI = K_{\text{Detektor}} \cdot k_{\text{Substanz}} \cdot m_{\text{inj.}} \cdot M^x$$

wobei: K_{Detektor} : detektorspezifische Konstante
 k_{Substanz} : substanzspezifische Konstante
 $m_{\text{inj.}}$: injizierte Masse
 M : Molmasse
 x : detektorabhängige Konstante ($-1 < x < 1$), für Konzentrationsdetektoren gilt: $x = 0$

Tab. 2: Überblick über die in der GPC/SEC verwendeten on-line Detektor Typen und die erhaltenen Ergebnisse.

Detektor	Typ	Methode(n)	Primärinformation	Sekundärinformation	Kommentar
UV, z. B. PSS VWD1200	Konzentration	Konventionelle GPC/SEC	–	MMD	UV/RI-Kombination: zusätzlich CCD
RI, z. B. PSS RI1200	Konzentration	Konventionelle GPC/SEC	–	MMD	Sehr universell, UV/RI-Kombination: zusätzlich CCD
ELSD, z. B. PSS ELS4000	Konzentration	Konventionelle GPC/SEC	–	MMD	Geeignet für geringe Substanzmengen
On-line Lichtstreuener, z. B. PSS SLD7000	Molmassensensitiv (M)	GPC/SEC- LALLS RALLS MALLS	MMD	MALLS: Verzweigungs- und Strukturinformationen über Trägheitsradius	Bei MALLS zusätzlich MAD, für Copolymere, Mischlösungsmittel und nicht vollständig lösliche Proben schwierig
On-line Viskosimeter, z. B. PSS eta 2010	Molmassensensitiv (Mark-Houwink alpha)	GPC/SEC- Viskosimetrie Mit RALLS oder 90° MALLS → Tripletdetektion	Intrinsische Viskosität $[\eta]$, Viskositätsverteilung	MMD, Verzweigungs- und Strukturinformationen, M_n für Copolymere	Zusätzlich MAD, für nicht vollständig lösliche Proben schwierig

MMD: molekulare Uneinheitlichkeit, CCD: chemische Uneinheitlichkeit, MAD: strukturelle Uneinheitlichkeit

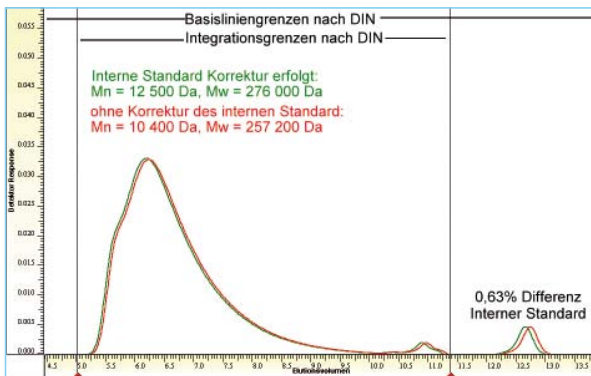


Abb. 2: Elogramm einer Probe mit breiter Molekulargewichtsverteilung mit ausgeprägtem niedermolekularen Anteil. Basislinie und Integrationsgrenzen wurden nach DIN gesetzt, für die grüne Kurve wurde eine Auswertung mit interner Standardkorrektur durchgeführt, die rote Kurve zeigt dieselbe Probe ohne Korrektur des internen Standards.

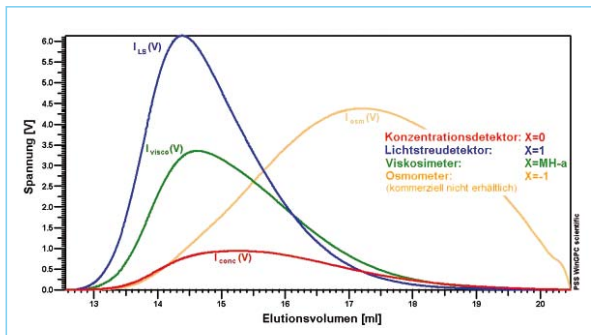


Abb. 3: Unterschiedliche Detektorsignale für eine Probe mit einer breiten Molekulargewichtsverteilung. Durch die Kombination der unterschiedlichen Signale lassen sich bei gekoppelten Methoden wie GPC/SEC-LS zusätzliche Rückschlüsse auf die Probeneigenschaften ziehen.

UV-Detektoren eignen sich natürlich nur für Substanzen, die auch UV-aktive Gruppen ausweisen ($k_{\text{Substanz}} \neq 0$). RI- und ELS-Detektoren sind hier universeller einsetzbar, da es nur wenige Substanzen gibt die in einem bestimmten Lösungsmittel isorefraktiv ($k_{\text{Substanz}} = 0$) sind.

Molmassensensitive Detektoren sind prinzipiell besser geeignet für hohe Molmassen. Nur wenn die stoffspezifische Konstante k_{Substanz} groß ist, können bei GPC/SEC typischen injizierten Massen auch noch für niedrige Molmassen aussagekräftige Signale gemessen werden.

Die Frage ob ein Viskosimeter oder ein Lichtstreuendetektor besser geeignet ist läßt sich allgemein nicht beantworten. Lichtstreuendetektoren haben den Vorteil vom Handling her einfacher zu sein, allerdings sind sie z.B. bei Copolymeren (dn/dc -Problematik) oder Verzweigungsanalysen Viskosimetern oft unterlegen.

GPC/SEC Detektoren können parallel oder in Reihe angeschlossen werden. Beim Kombinieren der Detektoren in einer bestimmten Reihenfolge sollten folgende Kriterien beachtet werden:

- Robustheit der Detektorzelle, d.h. wieviel Rückdruck hält die Zelle aus. Je weniger Rückdruck die Zelle aushält, desto weiter hinten im Aufbau sollte der Detektor verwendet werden.
- Zellvolumen: je niedriger das Zellvolumen, desto geringer ist die Bandenverbreiterung. Detektoren mit größerem Zellvolumen sollten deshalb am Ende des Aufbaus verwendet werden.
- Druckeinfluss auf das Detektionssignal, zum Beispiel bei RI und Viskositätsdetektoren.

2) Einfluss der Metadaten und der experimentellen Parameter

In Deutschland regeln 3 DIN Normen die Anwendung der GPC-Analytik:

- DIN 55672-1 GPC mit THF als Elutionsmittel
- DIN 55672-2 GPC mit DMAc als Elutionsmittel
- DIN 55672-3 GPC mit Wasser als Elutionsmittel

International hat die Normenreihe ISO 13885 Bedeutung, die sich eng an obige DIN Normen anlehnt. Im Umgang mit US-Firmen oder Behörden spielt die ASTM D 5296-05 eine große Rolle, die ISO 16014 Normenreihe basiert auf japanischen Arbeiten. Alle Normen enthalten Richtlinien zur Ergebnisberechnung, zur Datenqualität und zur Ergebnisdokumentation. Arbeitet man nach diesen Normen, so kann man viele Auswertefehler (z.B.: bei der Erstellung von Kalibrierkurven oder beim Setzen von Basislinie und Integrationsgrenzen) minimieren und reproduzierbare und präzise Ergebnisse erhalten [3]. Für GPC-LS, GPC-Viskosimetrie und Triple-Detektion gibt es bisher noch keine Normen.

Neben dem Einfluss der Auswerteparameter, die über die Normen gut und nachvollziehbar beschrieben sind, ist es auch wichtig den Einfluss experimenteller Parameter auf die Analysergebnisse abschätzen zu können. Tabelle 3 gibt einen Überblick über den Einfluss von experimentellen Parametern auf die Molmassenmittelwerte und die Molmassenverteilung. Dabei wird deutlich, dass die Methoden GPC/SEC und

Tab. 3: Einfluss experimenteller Größen auf die Genauigkeit von M_n , M_w und D für GPC/SEC und GPC/SEC mit molmassensensitiven Detektoren:
 ++ sehr starker Einfluss, + starker Einfluss, kein Einfluss

Einflussgröße	GPC ¹	GPC-LS ²	GPC-Viskosimetrie ³	Triple-Detektion ⁴	Maßnahmen für aussagekräftige Messungen
Nicht genau reproduzierbare Flussrate	++	Kein Einfluss	++	Kein Einfluss	Internen Flussmarker/Standard verwenden, Pumpe regelmäßig warten
Chemisch ungeeignete Kalibrierstandards	++	Kein Einfluss	Kein Einfluss	Kein Einfluss	Geeignete Standards und Verfahren verwenden (breite oder integrale Kalibration, Visko, LS, Triple, Copolymeranalytik mittels Dualdetektion)
Konzentration im richtigen Bereich, aber nicht genau bekannt	Kein Einfluss	+	+	+	Konzentrationsdetektor kalibrieren, geeignete stationäre Phasen wählen
Injektvolumen im richtigen Bereich, aber nicht genau bekannt, nicht reproduzierbar	Kein Einfluss	+	+	+	Konzentrationsdetektor kalibrieren, geeignetes Injektionssystem wählen, Reproduzierbarkeit Autosampler überprüfen
dn/dc nicht genau bekannt/falsch	Kein Einfluss	++	Kein Einfluss	++	Brechungsindexinkrement dn/dc unabhängig bestimmen, mit kalibrierten Konzentrationsdetektor arbeiten
Wechselwirkung mit Säulenmaterial	++	++	++	++	stationäre und mobile Phase optimieren
Temperaturschwankungen ⁵	Kein Einfluss	Kein Einfluss	Kein Einfluss	Kein Einfluss	Verwendung des internen Flussmarkers/Standards empfohlen

¹ mit RI/UV/ELS/IR-Detektion

² MALLS, RALLS, LALLS

³ Einfluss auf Ergebnisse aus universeller Kalibration

⁴ 90° Lichtstreuung mit Korrektur durch Viskosimeterdaten

⁵ RI-Detektoren und Viskosimeter sollten temperiert sein, bei hochviskosen Lösungsmitteln (DMF, DMAc, Wasser) wird der Massentransport in die Poren durch Verwendung eines Säulenofens verbessert (bessere Auflösung)

GPC/SEC gekoppelt mit molmassensensitiven Detektoren zum Teil durch sehr unterschiedliche experimentelle Parameter beeinflusst werden.

Zusammenfassung

GPC/SEC wird als gut verstandene und leistungsfähige Methode zur schnellen und präzisen Charakterisierung von Makromolekülen eingesetzt. Die Analysen können mit modernen Standardanalysengeräten durchgeführt werden, die durch GPC/SEC-Spezialdetektoren intelligent ergänzt werden. Dadurch sind sogar multiple Verteilungsinformationen in Polymeren zugänglich. Zusammenfassend für alle GPC/SEC Spezialdetektoren und -Detektorkombinationen muss aber noch einmal herausgestellt werden, dass ohne vorherige saubere GPC/SEC-Separation nach hydrodynamischem Volumen (Molmasse) eine Bestimmung der Verteilungsinformationen nicht möglich ist. Bei Verwendung eines nicht geeigneten Säulenmaterials, das zum Beispiel zu Adsorption führen kann, können alle Vorteile der fraktionierenden Methoden verlorengehen. Auch molmassensensitive Detektoren können an dieser Stelle nicht wirklich weiterhelfen. Statt hier mit erweiterter Detektion zu arbeiten hat es sich bewährt, die Separation zu effektivieren oder zu

modifizieren [4]. Für Copolymere und/oder endgruppenfunktionalisierte Polymere bieten die Polymer-LAC (Liquid adsorption chromatography) und 2D-Chromatographie neue Wege [1, 2], die in der Regel eindeutiger Informationen liefern als die spezialisierten Detektionssysteme.

Literatur

- [1] Pasch, H.; Trathnigg, B.: HPLC of Polymers, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, (1998)
- [2] Held, D.; Kilz, P.: Macromolecular Symposia 231, 145, (2006)
- [3] Kilz, P.; Held, D. in Chromatogramme richtig integrieren und bewerten, Hrsg.: Kromidas, S.; Kuss, H.-J., Wiley-VCH, Weinheim, (2008)
- [4] Reinhold, G.: Poster Austrian Polymer Days (2005)

► KONTAKT

Dr. Daniela Held
Peter Kilz
 PSS Polymer Standards Service GmbH
 Mainz
 Tel.: 06131/96239-41
 Fax: 06131/96239-11
 dheld@polymer.de
 www.polymer.de