

# Säulenkombination oder Linear-Säule – eine Konzeptdiskussion



Thorsten Hofe

Wie viel Auflösung braucht man in der GPC? Wann sollten Linear-Säulen und wann Säulen mit monomodaler Porosität eingesetzt werden? Ist es besser mit Einzelsäulen oder einer Säulenkombination zu arbeiten? Wie wichtig sind Auflösung und Bodenzahl zur Beurteilung der Säulenperformance?

## Grundlegende Beschreibung einer GPC-Säule

Eine GPC-Säule ist ausgezeichnet durch:

- Säulenlänge
- Säulenvolumen
- Säulendurchmesser
- Partikelgröße
- Porosität
- Porenvolumen

Die praktische Herausforderung besteht darin, ein Trennmaterial zu gestalten, dass neben einem großen Porenvolumen (gute Trennleistung) auch die Robustheit besitzt (druckstabil d.h. wenig Quellungsporosität), um im Laborralltag bestehen zu können.

Eine gute Trennleistung ist die Grundlage, um einzelne Oligomere als singuläre Peaks darstellen zu können oder aus einer gegebenen Polymermischung möglichst

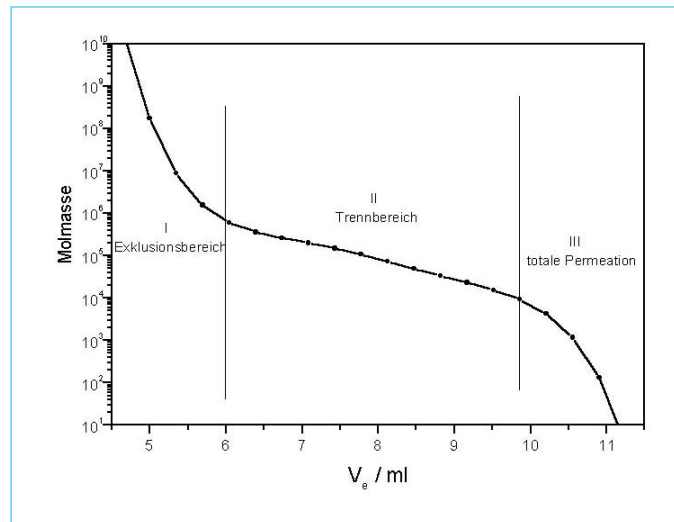


Abb. 1: Der Trennbereich einer GPC-Säule ist der Bereich in dem die Steigung der Kalibrationskurve möglichst flach verläuft. An den Rändern verläuft die Kalibrationskurve deutlich steiler; hier findet keine Trennung mehr statt.

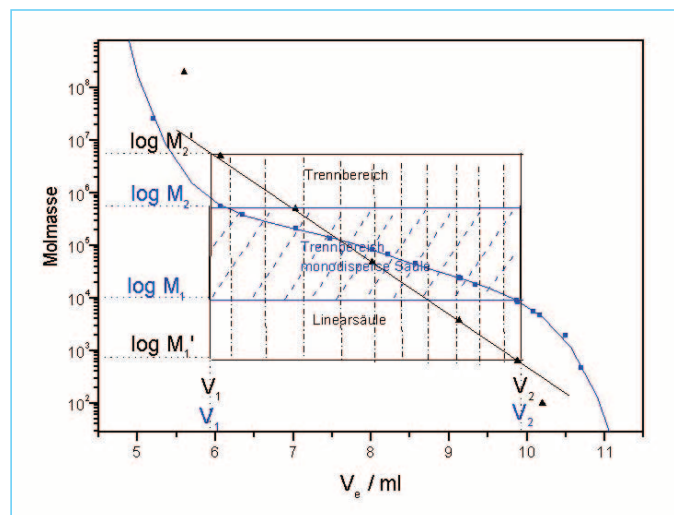


Abb. 2: Vergleich des Trennbereiches einer Linear-Säule (schwarze Kurve) und einer Säule mit monodispersen Trennmaterial (blaue Kurve)

viele Polymere unterschiedlichen hydrodynamischen Volumens voneinander separieren zu können. Um dieses Ziel zu erreichen, muss eine GPC-Säule eine entsprechende Porengrößenverteilung besitzen und über eine hinreichende Anzahl von Poren verfügen. Je breiter die Porengrößenverteilung desto größer ist der Separationsbereich. Je größer das zugängli-

che Porenvolumen, desto größer ist auch die Auflösung einer Säule. Die Porengrößenverteilung hingegen beschreibt den Trennbereich den eine GPC Säule abdeckt.

Grundsätzlich lässt sich eine GPC Säule durch drei Bereiche beschreiben (Abb. 1)

1. Ausschlussvolumen (I)
2. zugängliches Porenvolumen (II)
3. totale Permeation (III)

In der GPC werden Polymere in Lösung nach hydrodynamischem Volumen getrennt. Die großen Moleküle eluieren zuerst, da diesen Molekülen nur wenige, oder gar keine Poren zur Verfügung stehen (I). Im eigentlichen Trennbereich (II) eluieren die Polymere separiert nach Größe d.h. nach hydrodynamischem Volumen. Am Ende eluieren die kleinen Moleküle die in alle Poren diffundieren und somit nicht mehr nach Größe separiert werden (III).

Diesseits und jenseits des definierten Trennbereiches einer GPC Säule werden die Peaks sehr schmal, sie laufen zusammen. Unterschiedlich große Polymerketten werden nicht mehr separiert und treten als sog. Schulter im Rahmen eines Elugrammes oder als scharfer singulärer Peak auf (I+III) auf.

## Auflösung und Trennbereich für unterschiedliche Säulenkonzepte

In der GPC unterscheidet man stationäre Phasen die aus monomodalen Porengrößenverteilungen aufgebaut sind von solchen die auf einem multimodalen Ansatz basieren. Die monomodalen Materialien werden in verschiedene Einzelporositäten unterteilt (z.B. 100 Å, 500 Å, 10E4 Å, 10E6 Å). Die multimodalen Trennmaterialien sind die Grundlage für die Linear-Säulen.

Linear-Säulen sind, wie der Name schon sagt, durch weitgehend lineare, aber steil verlaufende Kalibrationskurven ausgezeichnet. Darüber hinaus zeigen sie einen sehr großen Trennbereich und besitzen eine breite Porengrößenverteilung. Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin

## Keywords

GPC, Separation, Trennsäulen

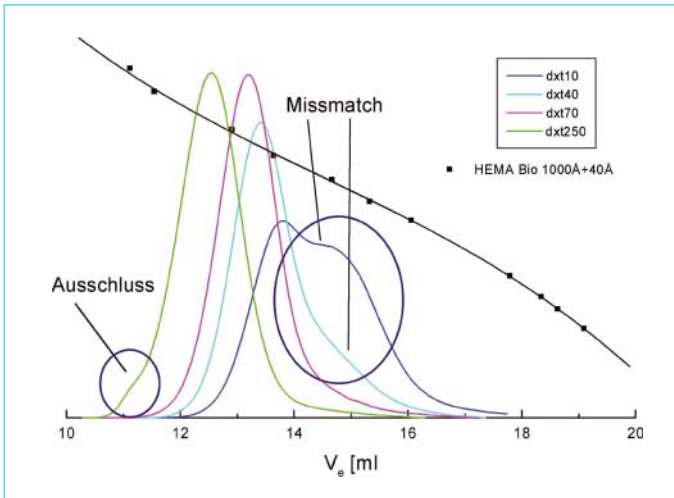


Abb. 3: Mismatch und hochmolekularen Ausschluss am Beispiel einer Hema Bio Säule 10 µm, 1.000 Å, 40 Å x 300 mm Säulenkombination. Bei 11 ml (Ausschluss) und zwischen 14 und 16 ml (Mismatch) sind die Elugramme mancher Dextrane durch sogenannte Schultern gekennzeichnet.

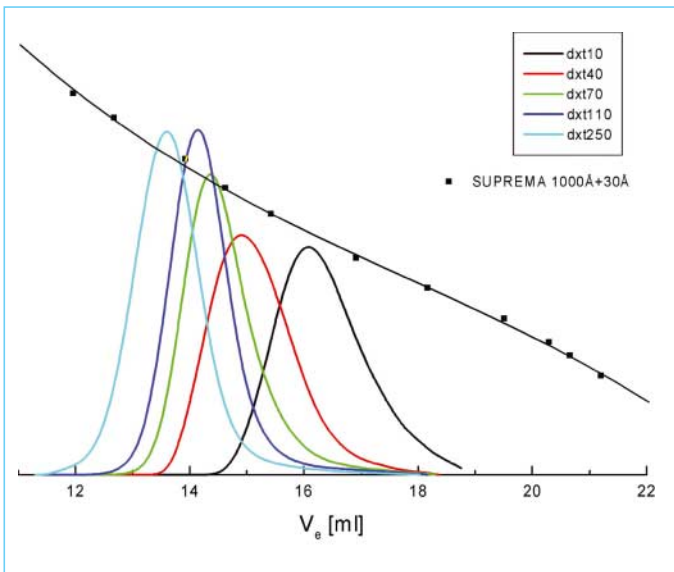


Abb. 4: Säulenkombination ohne Mismatch und ohne hochmolekularem Ausschluss am Beispiel einer Suprema 10 µm 30 Å, 1.000 Å x 8 x 300 mm Säulenkombination

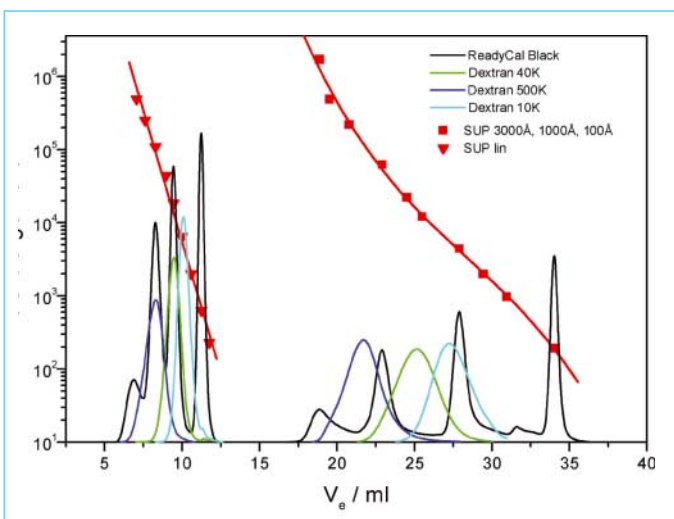


Abb. 5: Vergleich der Kalibrationskurven und Trennleistung einer Suprema Linear-Säule und einer Kombination aus drei Suprema 10 µm, 8 x 300 mm Säulen (100 Å, 1.000 Å, 3.000 Å). Verglichen werden Dextran Proben sowie ein PEO Molmassencocktail (PEO ReadyCal Black)

dass mit einer Säule ein großer Molmassenbereich bei konstanter Auflösung abgedeckt werden kann (Abb. 2, schwarzer Bereich).

Die Einzelporositäten hingegen sind durch eine enge Porengrößenverteilung gekennzeichnet, d.h. dass zugängliche Porenvolumen ermöglicht in einem bestimmten Trennbereich bzw. Molmassenbereich eine maximale Auflösung. Allerdings ist der Trennbereich dieser Säulen deutlich kleiner (Abb. 2, blauer Bereich).

In einem gegebenen Elutionsvolumenbereich  $\Delta V$  überstreicht eine Linear-Säule einen deutlich größeren Molmassenbereich als eine vergleichbare Säule mit monomodaler Porengrößenverteilung. Die Auflösung der monomodalen Säule hingegen ist deutlich größer.

Werden zwei Säulen gleicher Porosität miteinander kombiniert so verbessert sich die Auflösung ( $R_s$ ), um den Faktor 1,4 (GL 1). Die Analysenzeit hingegen verlängert sich um den Faktor 2, da sich die Säulenlänge ( $L$ ) verdoppelt und somit auch das Retentionsvolumen ( $V_r$ ) (GL 2).

$$R_s \approx L^{1/2} \quad (GL 1)$$

$R_s$  = Auflösung  
 $L$  = Länge der Trennstrecke

$$V_r = t_r \times F \quad (GL 2)$$

$V_r$  = Retentionsvolumen  
 $t_r$  = Retentionzeit  
 $F$  = Flussrate

Grundsätzlich lässt sich also feststellen, dass die Auflösung durch eine Verlängerung der Trennstrecke zu verbessern ist. Die Auflösung  $R_s$  ist definiert als:

$$R_s = 2 \frac{V_{r1} + V_{r2}}{w_1 - w_2} \quad (GL 3)$$

$V$  = Retentionsvolumen der Peaks  
 $w$  = Halbwertsbreite der Peaks

Oftmals ist es hilfreich die Auflösung einer GPC Säule unter Berücksichtigung der Molmassen der retendierten

Peaks zu betrachten. Eine entsprechenden Molmassen-normierung der Separation bzw. des Retentionsvolumens führt ausgehend von Gleichung 3 zu

$$R_{sp} = 2 \frac{(V_{r1} + V_{r2})}{(w_1 - w_2)} \times \lg \left( \frac{M_2}{M_1} \right) \quad (GL 4)$$

$V_r$  = Retentionsvolumen  
 $w$  = Peakbreite  
 $M$  = Molmasse

Die spezifische Resolution  $R_{sp}$  ist ein Maß für die Auflösung zweier Polymerpeaks innerhalb einer Molmassendekade. So bedeutet ein  $R_{sp}$ -Wert von 2 dass innerhalb einer Molmassendekade zwei Polymerpeaks bis auf 2/3 Ihrer Gesamthöhe voneinander basisliniensepariert werden können. Je größer der  $R_{sp}$ -Wert für eine Säule ist, desto mehr Polymerpeaks können innerhalb einer Molmassendekade voneinander basisliniensepariert werden. Weiter oben haben wir gelernt, dass durch Kombination mehrerer Säulen der gleichen Porosität die Auflösung verbessert d.h. der  $R_{sp}$  Wert vergrößert werden kann.

## Bodenzahl

Die Bodenzahl ist ein weiteres Kriterium zur Beschreibung der Performance einer GPC Säule. Die Bodenzahl  $N$  muss bei der Beschreibung einer Säule streng von der Auflösung  $R_{sp}$  unterschieden werden. Die Bodenzahl ist ein Maß für die Packungsgüte des Säulenbettes und ist u.a. direkt mit der Partikelgrößenverteilung korreliert. Je kleiner die Partikelgrößenverteilung und je besser die Packungsgüte desto höher ist die gemessene Bodenzahl  $N$  (1/m) einer Säule. Zur Bestimmung der Bodenzahl werden Elutionszeit und Halbwertsbreite des Peaks in Relation gesetzt. (GL 5). Linearsäulen und Säulen aus Einzelporositäten unterscheiden sich nicht grundsätzlich in ihren Bodenzahlen.

Je höher die gemessene Bodenzahl ist, desto geringer ist die axiale Dispersion und somit die Bandenverbreiterung der

Peaks. Bodenzahl und Auflösung sind jedoch streng zu trennen. Eine Säule mit monomodaler Porengrößenverteilung kann eine schlechtere Bodenzahl als eine Linearsäule besitzen und trotzdem kann die Auflösung und somit die Polymerseparation der monomodalen Säule besser sein. Für die Auflösung in einem bestimmten Trennbereich, steht die Porengrößenverteilung einer Säule im Vordergrund und nicht die Bodenzahl. Eine hohe Bodenzahl ist eine notwendige Voraussetzung um eine gute Säulenperformance zu gewährleisten aber kein hinreichendes Kriterium.

$$N = 16 \left( \frac{V_r}{w} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{V_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{GL 5})$$

$N$  = Bodenzahl [1/m]

$w$  = Peakbreite an der Basislinie

$w_{1/2}$  = Peakbreite in halber Höhe

### Säulenmismatch

Eine Säulenkombination aus Einzelporositäten vergrößert den Trennbereich und verbessert die Auflösung. Werden Säulen unterschiedlicher Porosität miteinander kombiniert, so können Polymere über mehrere Molmassen-Dekaden mit einer Auflösung  $R_{sp} > 3$  voneinander separiert werden.

Grundvoraussetzung für eine Säulenkombination aus unterschiedlichen Einzelporositäten ist eine homogene Porengrößenverteilung. Deswegen können nicht alle Einzelporositäten miteinander kombiniert werden. Ist der Unterschied der Porengrößenverteilung zweier Einzelporositäten zu groß (z.B. 100 Å und 1E6 Å), so entsteht in einem bestimmten Elutionsvolumenbereich eine Deckungslücke an Poren. Dieses führt zu einem Verlust an Auflösung und somit auch zu einer „Unstetigkeit“ der Kalibrationskurve. Das Elutogramm der untersuchten Probe zeigt im Bereich der Unstetigkeit eine Multimodalität, d.h. es treten sog. „Schultern“ auf.

Im umgekehrten Fall, d.h. wenn es durch das Überlappen der gewählten Einzelporositäten zu einem lokalen Überangebot an Poren einer bestimmten Größe kommt wird die Auflösung lokal verbessert. Es kommt ebenfalls zu einer Unstetigkeit der Kalibrationskurve, sie verläuft flacher.

Diese Inhomogenitäten, hervorgerufen durch eine nicht optimale Porengrößenverteilung sind Ursache für das sog. Säulenmismatch. Lokale Fluktuationen der Auflösung entlang des Trennbereiches der Säulenkombination bzw. der Kalibrationskurve führen zu Artefakten in den Elutogrammen und der Molmassenverteilung. Die untersuchte Probe ist durch „Schultern“ ausgezeichnet die keiner physikalischen Realität der Proben entsprechen (Abb. 3). Sie treten als Folge des Säulenmismatches auf.

Es soll an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass streng zwischen Säulenmismatch und Auflösung unterschieden werden muss. Multimodalitäten von Elutogrammen, die auf Säulenmismatch basieren, sind nur scheinbar auf eine besonders gute Auflösung zurückzuführen. In Wirklichkeit beschreiben diese nicht die wahre Molmassenverteilung der untersuchten Probe, sondern nur die inhomogene Porengrößenverteilung der Säule an der betrachteten Stelle des Elutogramms.

### Pyrussieg ohne Mismatch

Gelingt es nicht, ausgewählte Einzelporositäten oder auch Linear-Säulen ohne Mismatch miteinander zu kombinieren [siehe auch GIT Sep., 2004. S 13, Abb. 3], so bleibt nur der Umweg über die Synthese einer one-batch Porengrößenverteilung d.h. einer während der Synthese hergestellten breiten Porengrößenverteilung. Dieser Weg führt in Kombination mit entsprechender Quellungsporosität zu einem vermeintlich mismatch-freiem Säulenmaterial mit

Tab. 1: Vergleich der spezifischen Resolution der Suprema linear Säule und der Säulenkombination Suprema 3.000 Å, 1.000 Å, 100 Å

	$R_{sp}$ min	$R_{sp}$ max	Retentionszeit in ml
Suprema 3.000 Å, 1.000 Å, 100 Å	3	5	17,5–37
Suprema linear	0,7	2,1	5–12,5

großem Porenvolumen. Problematisch hierbei ist jedoch die Druckstabilität dieser Phasen. Die Poren kollabieren sehr schnell, wenn der Gegenstand zunimmt. Die Anpassung der Kalibrationskurven gestaltet sich ebenfalls sehr schwierig, da die Porengrößenverteilung nicht zu einer linearen Kalibrationskurve führt. Auch die Gefahr der Überladung der Säule ist nicht zu unterschätzen, da ähnlich wie bei Linearsäulen für einen großen Trennbereich insgesamt deutlich weniger Poren als bei einer Säulenkombination zur Verfügung stehen. Das Ziel einer mismatch-freien Säule wird so mit erheblichen experimentellen Nachteilen erkauft.

### Wie kann das Säulenmismatch detektiert werden?

Prinzipiell sollte sich die Variation der Auflösung auch in den Kalibrationskurven der GPC widerspiegeln. Bei einem Verlust an Auflösung nimmt die Steigung der Kalibrationskurve lokal zu. Eine lokal flacher verlaufende Kalibrationskurve deutet auf eine verbesserte Auflösung in diesem Bereich hin.

Oftmals sind jedoch die besprochenen Inhomogenitäten so gering, dass diese durch eine Kalibrationskurve nicht eindeutig abgebildet werden. Einerseits spiegeln engverteilte Polymerstandards das Mismatch nicht wieder (Elutionsband zu schmal, Polymerkettenkonzentration im Streifen zu groß) und andererseits führt die Interpolation zwischen zwei Stützpunkten innerhalb der Kalibrationskurve dazu, dass das Mismatch nicht erkannt wird, sofern dieses zwischen den beiden Stützpunkten liegt.

Das mögliche Säulenmismatch kann dann nur durch

einen entsprechenden chromatographischen Test mit geeigneten Referenzsubstanzen nachgewiesen werden. Hierzu werden homogene breitverteilte Referenzstandards mit unterschiedlichen mittleren Molmassen eingesetzt.

In Abbildung 3 sind verschiedene breitverteilte Dextrane auf einer Hema Bio Säulenkombination 1.000 Å & 40 Å vermessen worden. Die Kalibrationskurve ist glatt und zeigt keinen Hinweis auf ein Säulenmismatch. Manche Elutogramme hingegen sind durch Schultern ausgezeichnet.

Auf der hochmolekularen Seite, bei ca. 11 ml ist der hochmolekulare Ausschluss, die Kalibrationskurve verläuft hier sehr steil, Ursache für die Schulter im Peak; es stehen keine Poren für die Trennung zur Verfügung. Die Schulter bei 15 ml ist auf Säulenmismatch, d.h. inhomogene Porengrößenverteilung zurückzuführen.

Auf einer vergleichbaren Suprema Säulenkombination 1.000 Å & 30 Å eluieren die gleichen Dextrane glatt und ohne Schultern. Mismatch und hochmolekularer Ausschluss treten hier nicht auf.

Auch bei Linear-Säulen kann es, trotz linearer Kalibrationskurve, zu einem Säulenmismatch kommen. Die Abmischung unterschiedlicher Einzelporositäten zu einer multimodalen Gesamtporosität kann zu einer variierenden Porengrößenzusammensetzung und somit einem Mismatch führen.

### Säulenkombinationen oder Linear-Säule

Bei der Herstellung der Gelmaterialien in verschiedenen Porositäten muss berücksichtigt werden dass die empfohl-

lenen Säulenkombinationen zu einer homogenen Porengrößenverteilung ohne Mismatch führen. Ist dieses gegeben, so lassen sich durch Kombination von Einzelporositäten sowohl Auflösung und Trennbereich nach Bedarf zusammenstellen. In Abbildung 5 sind die beiden Säulenkonzepte nochmals gegenübergestellt. Eine Linearsäule führt schnell, nach max. 12 min zu einem Ergebnis. Auf einer Säulenkombination aus drei Säulen verdreifacht sich die Analysenzeit.

Andererseits führt die Säulenkombination zu einer deutlich besseren Auflösung über den gesamten Molmassen bzw. Elutionsvolumenbereich. Bei der ReadyCal Black Probe werden alle vier Polymere voneinander basisliniensepariert. Zur Separation steht ein Volumen von 17,5 ml zur Verfügung. Im Fall der Linear-Säule beträgt das Trennvolumen nur 6 ml. Auf beiden Säulen wurden die gleichen Polymere vermessen. Auf der Säulenkombination ist die Peakbreite deutlich größer. Dies ist auf das größere Trennvolumen und

somit auch flacher verlaufenden Kalibrationskurve zurückzuführen. Auf der hochmolekularen Seite ist der Unterschied am deutlichsten. Während die Säulenkombination die beiden hochmolekularen Peaks noch basisliniensepariert, laufen diese auf der Linear-Säule ineinander.

In Tabelle 1 sind die spezifischen Resolutionen Rsp der beiden Säulenkonzepte gegenübergestellt. Über den gesamten Molmassenbereich ist die Auflösung der Säulenkombination der Linear-Säule um einen Faktor 2–4 überlegen. Ein weiterer Nachteil der Linear-Säulen ist die Gefahr der Säulenüberladung. Konstruktiv bedingt, ist das Porenvolumen in einem vergleichbaren Molmassenbereich deutlich kleiner als für eine Einzelporosität. Es besteht somit die Gefahr Molmassenbestimmungen oder Molmassenverteilungsinformationen. Elugramme können Sidepeaks und Schultern aufweisen, die wie im Falle des Mismatch nicht der physikalischen Kettenlängenverteilung der untersuchten Probe entsprechen.

Andererseits sind die Analysenzeiten auf der Linear-Säule um ca. 3–4 mal schneller.

Der Einsatz von Linear-säulen hat durchaus seine Berechtigung, solange ein Produktscreening oder eine kurze Analysenzeit im Vordergrund steht. Geht es aber um eine möglichst weitreichende Produktinformation, maximale Auflösung über einen großen Trennbereich und robuste Chromatographiebedingungen so bleiben Säulenkombinationen aus ausgewählten Einzelporositäten weiterhin die erste Wahl.

### Fazit

- Monomodale Säulen haben hohe Auflösung aber kleinen Trennbereich
- Linear-Säulen haben großen Trennbereich aber eine schlechte Auflösung
- Durch Säulenkombinationen kann die Auflösung verbessert werden
- Sidepeaks oder Schultern breitverteilter Proben können eventuell auf eine fehlerhafte Säulenkombination oder mangelnde

Auflösung der Säule zurückgeführt werden

- Säulenmismatch kann durch breitverteilte Standards detektiert werden
- Säulenmismatch kann nicht immer aus der Kalibrationskurve abgelesen werden

### Literatur

- [1] Harald Pasch, Bernd Trathnigg: HPLC of Polymers; Springer-Verlag, 1997
- [2] Sadao Mori, Howard G. Barth: Size Exclusion Chromatography, 1999
- [3] CLB; Grundlagen der GPC; 1/1999, S.14ff
- [4] GIT Separation 2004; S.13; Abbildung 3

### Dr. Thorsten Hofe

Chemiestudium an der Universität Mainz und Toronto; Promotion am Inst. f. Physikalische Chemie an der Universität Mainz.

PSS Polymer Standards Service GmbH  
In der Dalheimer Wiese 5  
55120 Mainz  
info@polymer.de  
www.polymer.de

■