

GPC-Analytik von (Bio) Polymeren mit Lichtstreuendetektion

Zur GPC-Analyse von Makromolekülen in Lösung sind Lichtstreuengeräte seit etwa 20 Jahren im Einsatz. Die Firma PSS hat die Anforderungen der Kunden und des Laborumfeldes unter die Lupe genommen und daraufhin eine Lichtstreuulösung entwickelt, die Neues bietet und Bewährtes beibehält.

1 Die molekularen Eigenschaften von Makromolekülen, z.B. Proteinen, lassen sich hervorragend mit GPC untersuchen.

PETER KILZ*

Zu Recht gilt die Gelchromatographie (GPC, auch SEC oder GFC genannt) als das wichtigste Untersuchungsverfahren zur Bestimmung der molekularen Eigenschaften von synthetischen und natürlichen Makromolekülen in Lösung. Anders als traditionelle Methoden, die nur Eigenschaftsmittelwerte ermitteln, erlaubt die GPC auf einfache und schnelle Weise Eigenschaftsverteilungen von Makromolekülen zu bestimmen, wie z.B. Molmassenverteilung, Zusammensetzungsverteilung, Endgruppenverteilung oder Verzweigungsverteilung [1].

Häufig wird die GPC über Referenzmaterialien kalibriert, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen und um Instrumente und Analysemethoden zu qualifizieren. Es ist mit der konventionellen GPC jedoch weder möglich, weitergehende Informationen über den Molekülaufbau (Struktur, Verzweigung, Dichte, etc.) zu erhalten, noch auf eine Kalibration über Referenzmaterialien zu verzichten. Vermeiden lassen sich diese Einschränkungen, indem als Detektoren in der GPC Lichtstreuengeräte eingesetzt werden [2]. Damit lässt sich

*P. Kilz, PSS GmbH, 55023 Mainz

Tabelle 1: Vergleich der Gluten-Ergebnisse mit konventioneller GPC und GPC-LS

GPC-Verfahren	LS-Detekt. (SLD7000)	Kalibration Pullulan
M_n [D]	10 800	18 600
M_w [D]	14 600	41 400
M_w/M_n	1,36	2,22
M_p [D]	8 530	55 700

während der Elution kontinuierlich die Molmasse messen. Je nach Gerätetyp können mit der Lichtstreuung auch noch andere Größen qualitativ und quantitativ bestimmt werden, wie z.B.:

- Trägheitsradien (R_g)
- Verzweigungsgrad (Langkettenverzweigung)
- Änderungen der Molekülstruktur
- Aggregations-/Agglomerationsverhalten
- Alterungs-/Lagerprozesse

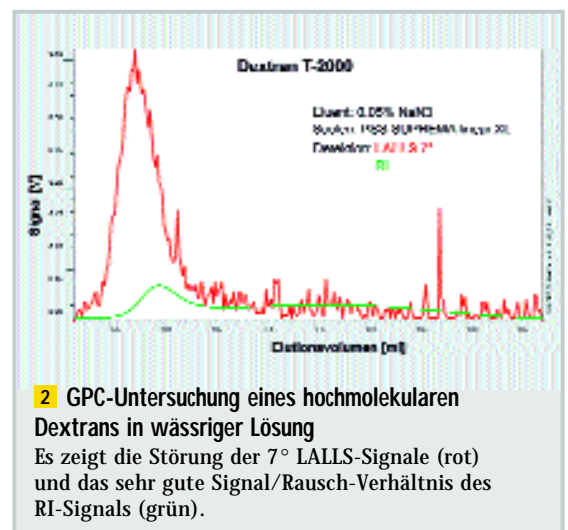
Am Beispiel von Gluten (Kleberproteine, die im Getreide vorkommen und die Backfähigkeit von Mehlsorten beeinflussen) wird der Unterschied zwischen einer konventionellen GPC-Auswertung und einer absoluten Molmassenbestimmung mit der GPC-Lichtstreuendetektion deutlich (Tab. 1). Glutene werden im Bereich der Nahrungsmittel, Kosmetik und Pharmazie eingesetzt, wobei die genaue Kenntnis der Molmassen für den jeweiligen Einsatzzweck wichtig ist.

Lichtstreuengerät nach Kundenwunsch

Diverse Lichtstreuengeräte sind seit ca. 20 Jahren in der GPC im Einsatz und besitzen je nach Hersteller unterschiedliche Eigenschaften mit ausgeprägten Vor- und Nachteilen, die je nach Einsatzzweck bedeutsam sein können. Die Firma PSS hat sowohl die Anforderungen der Kunden, als auch des Laborumfeldes untersucht, um eine Lichtstreuulösung auf den Markt zu bringen, die Neues bietet und Bewährtes beibehält. So hat sich das Mainzer Unternehmen, das über langjährige praktische Erfahrungen und Kenntnisse auf dem Gebiet der Lichtstreuendetektoren verfügt, an der Entwicklung eines

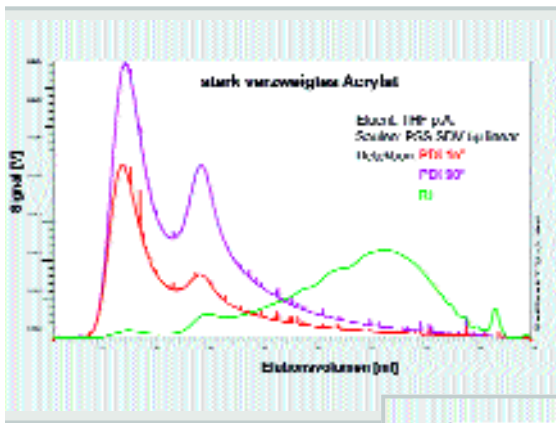
neuen Lichtstreuengerätes beteiligt. Ergebnis der engen Zusammenarbeit mit Experten auf dem Feld der Lichtstreuung (Brookhaven Instruments) war das Lichtstreuophotometer SLD 7000. Es zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus:

- hohe Flexibilität: Verwendung als Detektor oder statisches LS-Instrument
- Praxisrelevanz: simultane Messung von sieben Winkeln im Bereich von 35 bis 145°
- Zuverlässigkeit: selbstentlüftende, zylindrische Messzelle mit Indexmatching, kleinem Totvolumen und hoher Druckstabilität (35 bar)
- moderner optischer Aufbau: Lichtwellenleiter-Technik mit hoher Sensitivität, niedrigem Rauschen und nur geringem Streulicht
- moderne Elektronikkomponenten: ultra-sensitiver CCD-Detektor, USB Datenübertragung
- hohe Signalgüte: kleines Zellvolumen (50 μ l) verhindert Bandenverbreiterung und andere Artefakte
- exakte Ergebnisse: extrem kleines Streuvolumen (20 nl) für hohe Präzision



2 GPC-Untersuchung eines hochmolekularen Dextrans in wässriger Lösung

Es zeigt die Störung der 7° LALS-Signale (rot) und das sehr gute Signal/Rausch-Verhältnis des RI-Signals (grün).



3 Rohdatenansicht eines Zweiwinkel-Lichtstreugeräts

Es verdeutlicht den geringeren Anteil an Signalstörungen in THF (anhand eines stark verzweigten PMMA); die unterschiedlichen Strukturen sind qualitativ erkennbar, aber mit dem TALLS-Verfahren nicht einfach quantifizierbar.

- hohe Verlässlichkeit: durch optimierte Flusswege und getrennte Optik/Elektronik
- einfache Benutzung: Plug&Play Betrieb, nahtlose WinGPC-Integration auch in Verbindung mit Mehranlagenfähigkeit und weiteren Detektoren (z.B. Viskosität)
- kompakte Bauform: optimiertes Gerätedesign unter Nutzung aktueller Miniaturisierungskonzepte

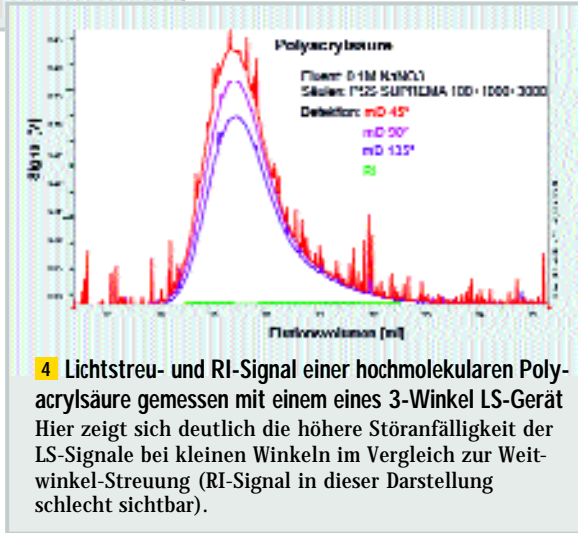
Prinzipielle Messprinzipien

LALLS:

Die Kleinwinkel-Lichtstreuung (LALLS = Low Angle Laser Light Scattering) besitzt konstruktionsbedingt den kompliziertesten optischen Aufbau [3]. Das führt oft zu Signal-Störimpulsen ("Spikes"), wenn kleine Luftbläschen oder Partikel in die Messzelle eingespült werden (Abb. 2). Die Zelle muss häufiger gereinigt werden, da schon kleinste Ablagerungen (Schichten) das optische Verhalten beeinflussen und zu bedeutender Störstreuung beitragen. Außer der Molmasse liefert dieser Gerätetyp keine weiteren Messgrößen; eine winkelabhängige Messung, z.B. zur Bestimmung von Verzweigungsgraden, ist nicht möglich. Der große Vorteil dieses Gerätekonzepts liegt in der exakten Messung von großen Molmassen (größer 10 Mio. g/mol) ohne die prinzipbedingten Fehler, die bei der Winkelextrapolation auftreten können [4].

RALLS:

Die Lichtstreuung mit nur einem 90° Streusignal (RALLS = Right Angle Laser Light Scattering) ist konstruktiv sehr einfach und robust. Das Lichtstreuungssignal ist i.d.R. nicht stark gestört. Jedoch liefert diese Art der Lichtstreuung nur bei relativ kleinen Molmassen (ca. 200 kg/mol bzw. Molekülgrößen kleiner 10 nm) richtige Ergebnisse und kann prinzipbedingt keine Strukturinformationen über die Probe liefern. Bei höheren Molmassen muss auf eine Korrektur des Lichtstreuungssignals mit einem Viskositätsdetektor zurückgegriffen werden [5]. Dazu müssen eine ganze Reihe von Annahmen gemacht werden,



4 Lichtstreu- und RI-Signal einer hochmolekularen Polycrylsäure gemessen mit einem eines 3-Winkel LS-Gerät

Hier zeigt sich deutlich die höhere Störanfälligkeit der LS-Signale bei kleinen Winkeln im Vergleich zur Weitwinkel-Streuung (RI-Signal in dieser Darstellung schlecht sichtbar).

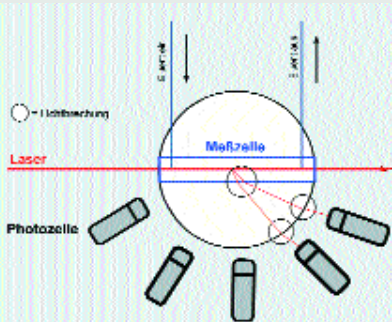
die im Regelfall unbekannter Proben nicht (einfach) überprüft werden können.

TALLS:

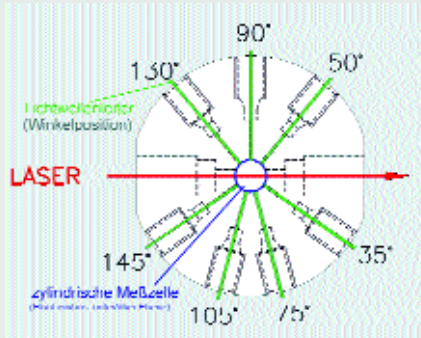
Der Einsatz von Zwei- bzw. Dreiwinkel-Lichtstreugeräten stellt aus Sicht des Autors keine wesentliche Verbesserung der oben beschriebenen Situation dar. Bei den gängigen 2-Winkel-Lichtstreugeräten (TALLS = Two Angle Laser Light Scattering), die bei 15° und 90° arbeiten, findet man oft die Kombination der Nachteile von LALLS- und RALLS-Geräten [6]. D.h. man muss mit Annahmen arbeiten und/oder das Kleinwinkelsignal zeigt Störungen (Abb. 3). Bei den verfügbaren 3-Winkelgeräten ist der Winkelbereich zu klein (effektiv ca. 50° bis 120°), um unabhängige Strukturaufklärung über einen großen Molmassenbereich betreiben zu können. Die Signalgüte dieser Geräte ist i.d.R. gut, wenn auch bei besonders bei wässrigen Applikationen Störungen auftreten können (Abb. 4). Für kleine Moleküle (isotrope Streuung) sind beide Gerätetypen einsetzbar, jedoch würde für solche Anwendungen auch ein viel günstigerer RALLS-Detektor genügen.

MALLS:

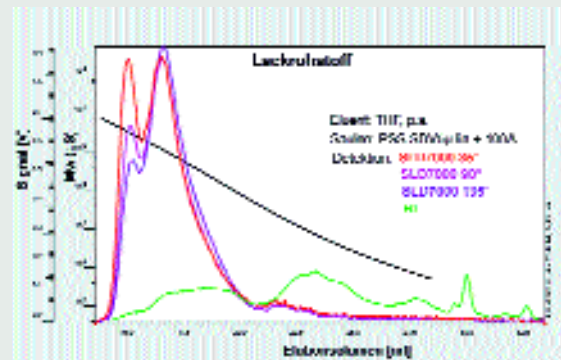
Die vorhandenen Mehrwinkel-Lichtstreugeräte (MALLS = Multi Angle Laser Light Scattering) überwinden die o.g. Beschränkungen und nutzen die Möglichkeiten der Lichtstreuung umfassend aus [7]. Wichtiger als die Vielzahl der Winkel ist der effektiv zur Verfügung stehende Winkelbereich (typisch 30° bis 150°). Für die exakte Beschreibung der meisten



5 Schematischer Aufbau einer kommerziellen MALLS-Lichtstreuzeile
Der eingezeichnete Strahlengang illustriert die Brechungseffekte. Die Winkelposition der Photozelle weicht dadurch von dem wirklichen Streuwinkel ab und muss korrigiert werden.



6 Aufbau der zylindrischen Lichtstreuzeile [8b] des PSS SLD 7000 MALLS Lichtstreugerätes
Die Lichtwellenleiter führen direkt in die Messzelle und es existiert nur ein 90° Phasenübergang, was zu deutlich besseren Signalqualitäten führt (vgl. auch Abb. 7).



7 GPC-Analyse eines Lackbindemittelsystems mit dem PSS SLD 7000 Lichtstreugerät in THF
Die multimodale Probe überstreicht einen weiten Molmassenbereich (schwarze Kurve)

Streuungsfunktionen reichen sieben Winkel völlig aus, weitere Winkel führen zur Redundanz und erhöhen unnötig die Anschaffungs- und Betriebskosten. Unabhängig von der Anzahl der Winkel stellt die Signalgüte und -stabilität ein wichtiges Qualitätskriterium dar. Diese wird wesentlich durch den Aufbau der Messzelle bestimmt. Ein in der GPC häufig verwendeter MALLS-Detektor benutzt einen Glasblock mit Längsbohrung (Abb. 5). Das Streulicht wird dabei an mehreren Stellen gebrochen (Phasenübergang Lösung-Glas, Glas-Luft), da die Durchtrittswinkel nicht rechtwinklig sind. Dies kann – bevorzugt bei kleinen Winkeln – zu Signalstörungen oder sogar völlig unbrauchbaren Messsignalen einzelner Winkelpositionen führen.

Weiter entwickelte MALLS-Technik

Das neuentwickelte Lichtstreugerät PSS SLD 7000 basiert grundsätzlich auf der MALLS-Technik, die jedoch in vielen As-

pekten weiter entwickelt wurde. So weist das Gerät eine zylindrische Zellgeometrie auf, wie sie in klassischen Lichtstreugeräten traditionell angewendet wird (Abb. 6). Die Lichtwellenleiter sind im 90°-Winkel in die Zellwand eingebaut, wodurch keine Lichtbrechungseffekte auftreten und Fremdlichtanteile minimiert werden [8]. Das führt direkt zu hohen Signal/Rausch-Verhältnissen und sehr guten Signalformen. Abbildung 7 zeigt die Rohsignale bei 35°, 90° und 145° sowie das Konzentrationssignal im direkten Vergleich. Das Lackbindemittel ist multimodal und deckt einen weiten Mol-

massenbereich ab (10 Mio. bis unter 1000 g/mol). Die schwarze Kurve zeigt die mit dem SLD 7000 gemessene Molmasse, die auch bei relativ kleinen Konzentrationen und Molmassen noch sehr zuverlässig bestimmt werden kann. Die Qualität der Rohsignale ist im hochmolekularen Bereich sehr gut, unterhalb von ca. 10 kg/mol ist ein leichtes Rauschen zu erkennen. Das ist prinzipbedingt, da die Stärke des Lichtstreusignals proportional der Konzentration und der Molmasse ist. Sind beide Faktoren klein, ist das Produkt sehr klein und das Signal/Rausch-Verhältnis wird sich naturgemäß verringern.

Weitere Informationen über:

www.polymer.de

- Direkter Link zu den Literaturhinweisen des Artikels
- Weitere Details zu MALLS-Dektoren
- Infoveranstaltungen und Schulungen rund um GPC

Halle 5.1, Stand K13-K14

Tabelle 2: Vergleichende Übersicht von Lichtstreuverfahren und -geräten

Typ	Verfahren	Anwendung	Einschränkungen	Voraussetzungen*
LALLS Kleinwinkelgeräte	M-Messung ohne Extrapolation	MWD, hochmolekulare Proben	oft „Spikes“, wartungsintensiv, keine Rg-Messung	sehr sauberes System (ohne Partikel, Staub)
RALLS 90° Einwinkelgeräte	M-Messung ohne Winkelkorrektur	nur MWD von niedermolekularen Proben, vergleichende Analysen	keine Winkelkorrektur, Rg nur in Verbindung mit Viskosimeter	M < 200 000 D, Probeneigenschaft bekannt
TALLS Zwei-/Drei-Winkelgeräte	M-Messung mit 2(3)-Punkt Extrapolation	MWD, hoch- und niedermolekulare Proben	„Spikes“ bei 15°, eingeschränkte Winkelkorrektur, Rg ungenau	Knäuelstatistik sollte bekannt sein
MALLS Mehrwinkelgeräte (z.B. PSS SLD 7000)	M- und Rg-Messung mit Vielwinkel-Extrapolation	exakte MWD, verlässliche Rg, Verzweigungen, Strukturmerkmale		

*) generelle Voraussetzungen bei allen GPC-Lichtstreuverfahren:
 j Der Wert des Brechungsindexinkrements (dn/dc) muss sehr genau bekannt sein [9a], da dieser Wert quadratisch in die Bestimmung der Molmasse eingeht. Wichtig dabei ist, daß dn/dc den Messbedingungen entspricht (Lösungsmittel, Wellenlänge, etc.) [9b].
 k Verwendung guter GPC-Säulen ohne Partikelelution, um "Spikes" zu vermeiden
 l flexible und einfache Software zur umfassenden Analyse der Daten, Berechnung und Darstellung der Ergebnisse, damit die Vielzahl der verschiedenen Datensysteme im Labor reduziert werden kann [10]

Fazit

Die Lichtstreuendetektion in der GPC kann zu einem deutlichen Informationsgewinn führen. Die Auswahl der für die Anwendung am besten geeigneten Lichtstreugeräte kann in Anbetracht der Anzahl der Anbieter und Messprinzipien aufwändig sein. Ein universell einsetzbares Gerät ist das PSS SLD 7000, das als MALLS-Gerät hohe Leistungsfähigkeit bei kompakten Ausmaßen und attraktivem Preis verbindet. In Verbindung mit einer leistungsfähigen und flexibel ausbaubaren Softwarelösung, wie der PSS WinGPC, passt sich die Methode der GPC-Lichtstreuakopplung nahtlos in die vorhandene Laborumgebung ein und sichert schnelle und fundierte Antworten auf die aktuellen Fragestellungen bei natürlichen, synthetischen und (Bio-)Polymeren. LP

Literatur:

Die Literaturquellen finden Sie im Internet als direkter Link