

1 Optischer Aufbau zur Kleinwinkel-Lichtstreuung

Absolute Molekulargewichtsbestimmung in der Ausschlußchromatographie

THOMAS A. SUCK*

Das Molekulargewicht ist eine wichtige Größe in der Chemie. Neben anderen Bestimmungsverfahren läßt sich auch die Ausschlußchromatographie hierfür einsetzen.

Um eine Molekulargewichtsverteilung zu erhalten, ist zuerst die Eichkurve für eine Säule oder Säulenkombination aufzunehmen. Als Resultat erhält man eine angenäherte lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen. Dies ist die übliche Methode. Hier gilt es aber zu beachten, daß die Molmassenverteilung über das Retentionsvolumen jeweils nur für eine Stoffklasse gilt. Zudem erfolgt bei der chromatographischen Methode die Trennung nach dem hydrodynamischen Volumen und nicht nach dem Molekulargewicht. Bei unbekannt Substanzen kann daher das Molekulargewicht nur mit Einschränkungen bestimmt werden. Will man eine exakte Auswertung seiner Probe, so ist ein Detektor zu verwenden, dessen Ausgangssignal als Funktion der Elutionszeit direkt proportional dem Molekulargewicht ist. Im folgenden Artikel wird ein molekulargewichts-sensitiver Detektor vorgestellt, der nach dem Prinzip der Kleinwinkel-Laser-Lichtstreuung arbeitet.

Dieser Detektor erlaubt die absolute Bestimmung der Molmassenverteilung unbekannter Substanzen, ohne vorher eine Eichung der Säulen durchzuführen.

Grundlagen

Da eine ausführliche Theorie des Streuprozesses den Rahmen des Artikels sprengen würde, sei auf die einschlägige Literatur verwiesen [1, 2]. Im folgenden wird deshalb nur auf die wesentlichen Gesetzmäßigkeiten eingegangen. Die Grundeigenschaften der Streuung sind einfacher Natur. Als einfallende Welle hat man eine ebene Welle der Form:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{i\omega t} \quad (1)$$

Streuung hängt davon ab, daß in der untersuchten Substanz durch Verschiebungspolarisation Dipole induziert werden. Die Dipolachse liegt in Richtung des elektrischen Feldstärkevektors, und schwingt mit der gleichen Frequenz wie die erregende Welle. Das induzierte Dipolmoment ist von der Größe

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (2)$$

wobei α die Polarisierbarkeit ist und nur in Spezialfällen eine skalare Größe darstellt. Eine typische Streuanordnung für die Kleinwinkel-Lichtstreuung ist in Abbildung 1 zu sehen. Das gestreute Licht wird unter dem Beobachtungswinkel Θ detektiert.

Allgemein läßt sich der Streuprozess durch

$$\vec{E}_s = (S) \vec{E}_0 \quad (3)$$

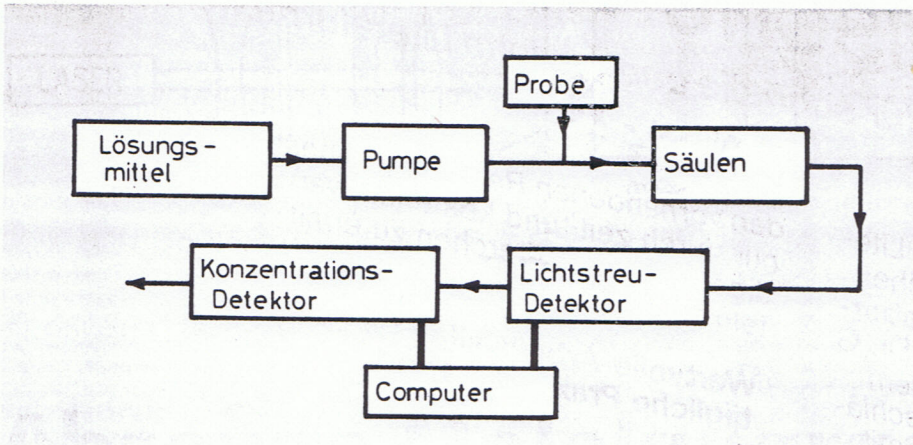
beschreiben, wobei \vec{E}_0 und \vec{E}_s die elektrischen Feldstärken des Primär- bzw. des gestreuten Lichtes sind. S ist die „Streumatrix“ und berücksichtigt die Wechselwirkungen zwischen der einfallenden Lichtwelle und dem Teilchen. Zur mathematischen Behandlung des Streuprozesses muß die Wellengleichung angewendet werden, und die Energieabstrahlung des Dipols kann durch den Poynting-Vektor berechnet werden und daraus die Intensität. Für die Streuintensität in Abhängigkeit vom Beobachtungswinkel Θ ergibt sich

$$I_s(\Theta) = I_0 \frac{16 \pi^4 \alpha^2}{\lambda^2 r^2} P(\Theta) \quad (4)$$

λ ist dabei die Wellenlänge des Primärlichtes im Vakuum, r der Abstand zwischen Detektor und Probe, und $P(\Theta)$ ist der Formfaktor (der Interferenzeffekte innerhalb der Teilchen berücksichtigt, die auftreten, falls die Aggregatdimensionen $> \lambda/20$ sind).

Gleichung (4) gilt nur für ein Teilchen und ist deshalb mit der Anzahl der Teilchen $N = N_A \cdot \rho \cdot V/M$ im Streuvolumen V zu multiplizieren. N_A ist die Avogadro-Zahl und ρ und M sind die Dichte bzw. die molare Masse der Aggregate. In einer Flüssigkeit treten innerhalb eines kleinen Volumenelements infolge der Temperaturbewegung Dichte- und Konzentrationsschwankungen auf. Tritt nun Licht durch diese Flüssigkeit, so wird es durch die lokal verschiedenen Dichten gestreut. Die Theorie dazu liefert die Schwingungstheorie von Smoluchowski

* Dr. T. A. Suck, Suck-Wissenschaftliche Geräte Entwicklung, Göttingen, 3000 Stegeng.



2 Blockdiagramm des experimentellen Aufbaus

und Einstein, die den Zusammenhang zwischen der Intensität des gestreuten Lichts und dem Molekulargewicht in Abhängigkeit von der Konzentration liefert [3, 4]. Diese Zusammenhänge überführen Gl. (4) in

$$I_s(\Theta) = I_0 \frac{4 \pi^2 n^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 k \cdot T \cdot c}{r^2 \lambda^4 (d\psi/dc)} P(\Theta) \quad (5)$$

mit k : Boltzmannkonstante, I_0 : Primärintensität, ψ : osmotischer Druck, T : absolute Temperatur, n : Brechungsindex der Lösung, dn/dc : separat zu bestimmendes Brechungsincrement. Der osmotische Druck ψ ist als Potenzreihe der Massenkonzentration darstellbar. Es gilt:

$$\psi = RT \left(\frac{c}{M} + B c^2 + C c^3 \dots \right) \quad (6)$$

wobei R die Gaskonstante, B und C der zweite bzw. dritte Virialkoeffizient, und M das mittlere Molekulargewicht ist. Die Reihenentwicklung läßt sich meistens nach dem zweiten Glied abbrechen und ergibt eingesetzt in (5) mit

$$k = R/N_A \quad (7)$$

$$I_s(\Theta) = I_0 \frac{4 \pi^2 n^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \cdot c}{N_A r^2 \lambda^4 (1/M + 2 B c)} P(\Theta)$$

In der Literatur wird bei Streuexperimenten oft der Rayleigh-Faktor

$$R(\Theta) = \frac{I_s(\Theta) r^2}{I_0 V} \quad (8)$$

V : Streuvolumen benutzt. Setzt man dies in Gl. (7) ein, so folgt allgemein

$$\frac{K \cdot c}{R(\Theta)} = \left(\frac{1}{M} + 2 B c \right) \frac{1}{P(\Theta)} \quad (9)$$

K ist dabei eine Konstante, die abhängig vom Polarisationszustand des Primärlichtes ist.

Für den Strukturfaktor $P(\Theta)$ gilt:

$$\frac{1}{P(\Theta)} = 1 + \left(\frac{16 \pi^2}{3 \lambda^2} \right) R_g^2 \sin^2(\Theta/2)$$

mit R_g : Trägheitsradius, und für sehr kleine Streuwinkel ($\Theta < 6^\circ$) ist $P(\Theta) \sim 1$.

Das Brechungsincrement dn/dc in der Konstanten K und der zweite Virialkoeffizient B sind durch eine statische Lichtstreuungsmessung zugänglich.

Aus Gl. (9) folgt, daß durch Messen der Streulichtintensität (bei kleinen Streuwinkeln Θ) und der Konzentration das Molekulargewicht berechnet werden kann.

Einsatz des Streulichtdetektors in der Ausschlußchromatographie

Bei der chromatographischen Trennung stehen einem Molekül nur begrenzt „Hohlräume“ zur Verfügung, in die es hineindiffundieren kann. Je größer so ein Molekül ist, in desto weniger „Räume“ kann es eindringen, während für ein kleines Molekül alle Türen offen stehen. Deshalb werden zuerst die großen Moleküle ausgeschlossen, und die kleinen werden zuletzt eluiert. Mit der Elution des Lösungsmittels ist die chromatographische Trennung beendet. Dies bedeutet, daß innerhalb eines bestimmten Elutionsvolumens lokal eine monodisperse Fraktion der Probe betrachtet wird.

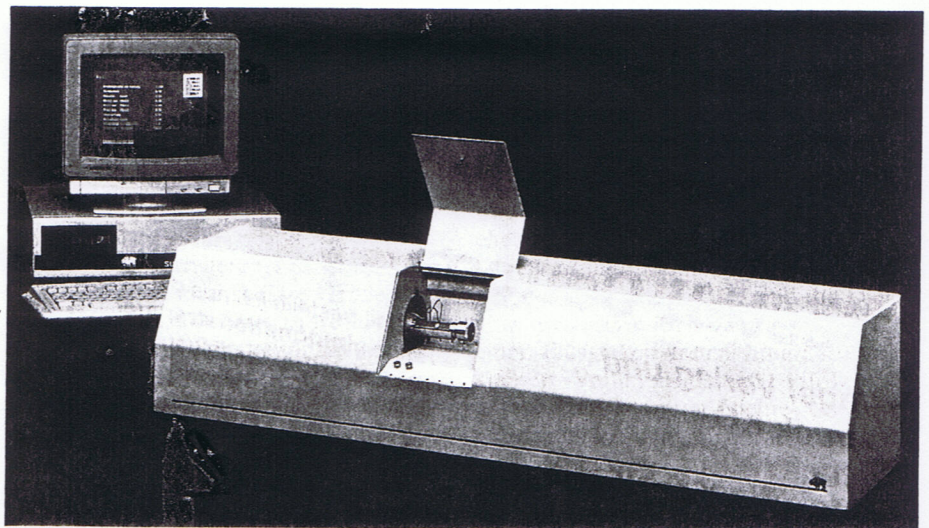
Ein experimenteller Aufbau wie in Abbildung 2 dargestellt, führt zu den in Abbildung 3 gezeigten Meßwerten. Innerhalb eines bestimmten Elutionsvolumens v_i wird das zugehörige Lichtstreuungssignal $R(\Theta_i)$ und das Konzentrationssignal c_i detektiert.

Das in diesem Elutionsvolumen vorliegende Molekulargewicht M_i erhält man, indem Gl. (9) nach dem Molekulargewicht umgestellt wird.

$$M_i = \left(\frac{K \cdot c_i}{R(\Theta_i)} - 2 B \cdot c_i \right)^{-1} \quad (10)$$

Das Zahlenmittel M_n , das Gewichtsmittel M_w und das z -Mittel M_z werden anschließend aus den berechneten M_i -Werten gebildet.

Zu berücksichtigen ist, daß die durch die Säule erreichte Trennung nicht durch ein großes Probenvolumen im Detektor verschlechtert wird. Das Probenvolumen sollte in der Größenordnung von 10 μ l sein, damit die Moleküle durch Diffu-

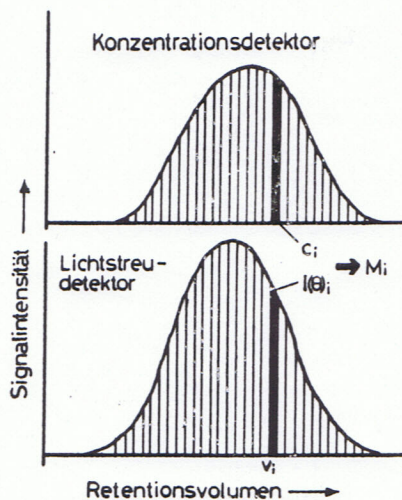


4 Chromatographiestation VLS10

sion nicht wieder vermischt werden.

Optischer Aufbau des Lichtstreu-detektors

Im VLS10 (Abbildung 1, Abbildung 4) sind alle genannten Forderungen realisiert worden. Das VLS10 ermöglicht die kontinuierliche Streuwinkelstellung im Winkelbereich von $2^\circ - 6^\circ$. Eine aufwendige Optik realisiert die präzise Streuwinkelselektion. Als Lichtquelle dient ein He-Ne-Laser, und ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) detektiert das Streulicht. Die Streuwinkelselektion wird durch eine patentierte Optik erreicht, indem zwei Blenden entlang der optischen Achse verfahren werden (s. Abbildung 1). Zu einem bestimmten Streuwinkel gehören ganz definierte Blendenpositionen, die eine Funktion des Brechungsindex der Probe sind. Die Blendenpositionen werden durch ein Computerprogramm berechnet und anschließend durch Schrittmotoren positioniert.



3 Ausgangssignal des Lichtstreu- und Konzentrationsdetektors

Fazit

Die wesentlichen Vorteile des VLS10 sind: Die absolute Molmassendetektion ab 10^3 g/mol, der kleine Streuwinkel $\Theta < 6^\circ$, dadurch keine Verfälschung des Meßsignals durch den Strukturfaktor $P(\Theta)$, keine Eichung mit Standards notwendig, geringes Probenvolumen von $9 \mu\text{l}$ und Ausgangssignal direkt proportional dem Molekulargewicht. Damit steht ein Detektor zur Verfügung, der die Bestimmung des absoluten Molekulargewichts mit der Ausschlußchromatographie ermöglicht.

Literatur

- [1] Kerker, M.: The Scattering of Light, Academic Press, New York (1969).
- [2] Bayvel, L. P., and A. R. Jones: Electromagnetic Scattering and its Applications, Applied Science Publishers, London and New Jersey (1981).
- [3] Smoluchowski, M.: Ann. Physik, 25, 205 (1908).
- [4] Einstein, A.: Ann. Physik, 33, 1275 (1910).

Weitere Informationen

403