

1 Wie kleine Schwankungen beim Durchfluss für große Probleme sorgen, verdeutlicht dieser Beitrag.

1%
ABWEICHUNG



Bild: © Nuthawut - stock.adobe.com

WIE KLEINSTE SCHWANKUNGEN DER FLUSSRATE DAS GPC/SEC-ERGEBNIS BEEINFLUSSEN

1% Abweichung, 40% Fehler: So wichtig ist Durchflussmessung

Kalibrierungen sind Pflicht für wiederholgenaue Ergebnisse. Doch gerade aufwendige Messreihen wie in der Gel-Permeations-Chromatographie dauern oft lange, sodass die tatsächliche Flussrate minimal abweichen kann. Welch enorme Folgen dies nach sich zieht, zeigt das folgende Beispiel.

Eine der leistungsfähigsten Techniken für die Charakterisierung natürlicher und synthetischer Polymere ist sicherlich die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC), auch bekannt als Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC). Ihre Flexibilität und der Informationsgehalt einer einzigen Messung machen sie zur Technik der Wahl für vielfältige Applikationen, von der einfachen Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung und der Polydispersität bis hin zur komplexesten Strukturanalyse oder der Verteilung der Co-Polymerzusammensetzung.

Ein großer Vorteil der GPC/SEC als Analytikmethode ist ihre Einfachheit. Ein typisches Einstiegssystem, das aus einer Pumpe, einem manuellen Injektor, einer Säule und einem Brechungsindexdetektor sowie einigen Referenzstandards besteht, ist alles, was man braucht, um eine zuverlässige Analysemethode zu etablieren. Die Erweiterung mit zusätzlichen Säulen und massensensitiven Detektoren – z. B. ein Viskosimeter oder/und ein Detektor zur Mehrwinkellichtstreuung (Multi Angle Light Scattering, MALS) – verbessert die Möglichkeiten eines solchen Systems exponentiell und eröffnet den

VERFASST VON
Carlo Dessy
Geschäftsführer
Testa Analytical
Solutions

Weg zu komplexeren Anwendungen und dichterem Informationsgehalt.

Die Kalibrationskurve als Ausgangspunkt

Sehr häufig beruhen die Ergebnisse auf einer Kalibrierungskurve, die durch einen Satz von Referenzstandards mit bekanntem Molekulargewicht (Molecular Weight, MW) und enger MW-Verteilung erhalten wird. Dies ist zumindest in den Fällen zutreffend, in denen ein Brechungsindexdetektor (Refractive Index Detector, RID) der einzig verfügbare Detektor ist. Die Kalibrierungskurve wird dann durch Auftragen des nominalen Molekulargewichts gegen das durch die Messung bestimmte Peak-Elutionsvolumen erstellt (s. Abb. 2).

In ähnlicher Weise lässt sich bei Verwendung eines Viskosimeters zum Nachweis eine universelle Kalibrierung erstellen. Dazu wird das Produkt aus nominalem Molekulargewicht und gemessener intrinsischer Viskosität gegen das ermittelte Peak-Elutionsvolumen aufgetragen (s. Abb. 3).

In beiden Fällen basiert das berechnete Molekulargewicht einer unbekannt Probe auf ihrem berechneten Elutionsvolumen und anhand der Kalibrierungskurve. Es ist nun wichtig zu bedenken, dass GPC/SEC-Messungen i. d. R. zeitaufwendig sind und je nach absoluter Durchflussrate und Anzahl der verwendeten Säulen im System zwischen rund 45 Minuten bis zu mehreren Stunden dauern können. Daher ist es üblich, die erforderlichen Standards und unbekannt Proben an verschiedenen Tagen oder sogar Wochen durchzuführen, sodass sich ein sehr loses Zeitverhältnis zwischen Kalibrierung und Probenmessung ergibt. In Anbetracht dessen liegt es auf der Hand, dass jede Abweichung der Durchflussrate zwischen den Durchläufen der Standards und der Probe das endgültig ermittelte Molekulargewicht beeinflussen wird. Die Frage lautet dann: „Wie groß ist dieser Einfluss?“ und „Welche Abweichung darf ich tolerieren, bevor eine Neukalibrierung erforderlich ist?“

Tabelle 1:
Vergleich des Polydispersitätsverhältnisses

Durchflussrate [mL/min]	Mw/Mn	Abweichung
1,00	2,439	0,00%
1,01	2,477	1,55%
0,99	2,427	0,49%

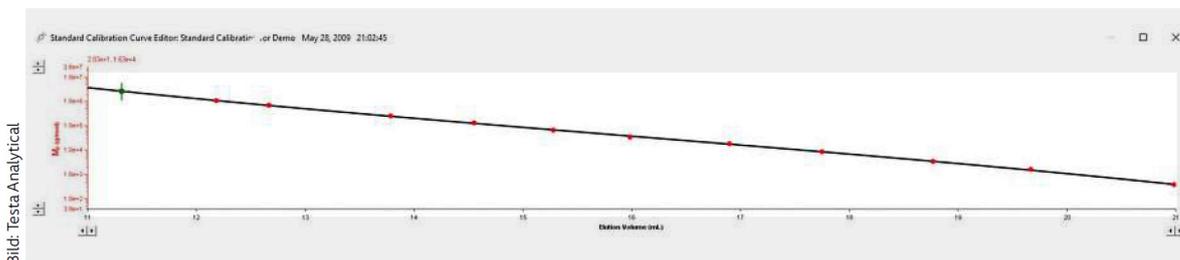
Wie verlässlich ist die Messung wirklich?

In einer typischen Laborumgebung ist die Genauigkeit der Flussrate, bei den meisten verwendeten HPLC-Pumpen, Vertrauenssache. Da eine HPLC-Pumpe i. d. R. nur einmal im Jahr überprüft und validiert wird, geht man häufig davon aus, dass sie in der Lage ist, die gewünschte exakte Flussrate über einen langen Zeitraum hinweg ohne nennenswerte Abweichungen zu liefern. Oft wird der von der HPLC-Pumpe gemeldete Gegendruck als Referenz und Bestätigung für einen einwandfreien Betrieb herangezogen. In Anbetracht der Vielzahl von Parametern, die den gemeldeten Gegendruck beeinflussen können (Temperatur, Zustand der Säulen und Leitungen, Qualität des Lösungsmittels, um nur einige zu nennen), hat dieser Parameter jedoch nur eine begrenzte Aussagekraft für die Genauigkeit des Durchflusses in einem Langzeitbetrieb (die meisten GPC/SEC-Systeme laufen wochenlang rund um die Uhr), da eine Abweichung von einem Prozent beim Gesamtgedruck scheinbar unauffällig ist.

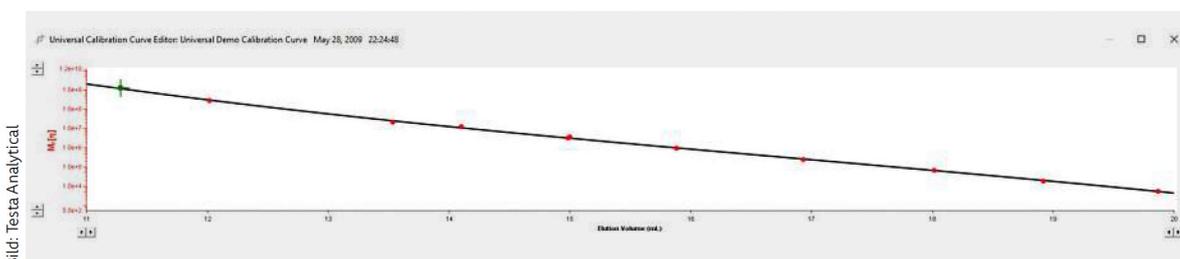
In diesem Beitrag untersuchen wir die Auswirkungen einer Abweichung von einem Prozent bei der Durchflussrate auf die Ergebnisse für eine unbekannt Probe, die sowohl mit einer Standardkalibrierung als auch mit einer universellen Kalibrierung bestimmt wurde. Wir haben eine so geringe Abweichung gewählt, da sie, umgerechnet in Gegendruck für ein typisches GPC/SEC-System, oft unter der Nachweisgrenze des Druckwand-

LP TIPP

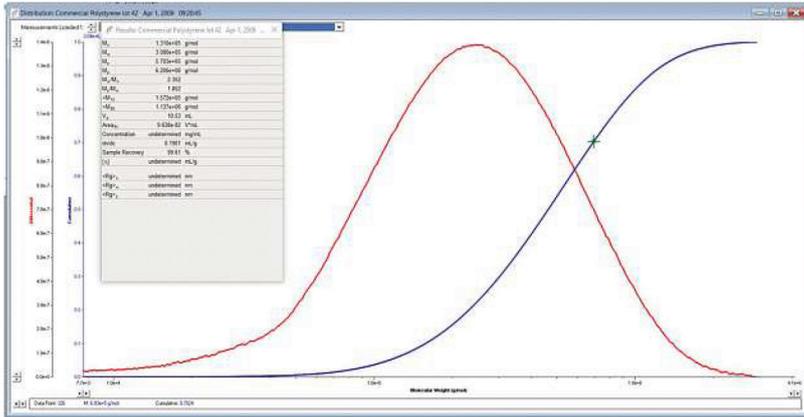
Ausführlichere Tabellen für die Proben aus Abbildung 5 finden Sie in der **Online-Version** dieses Beitrags auf www.laborpraxis.de



2 Standard-Kalibrierungskurve



3 Universelle Kalibrierung



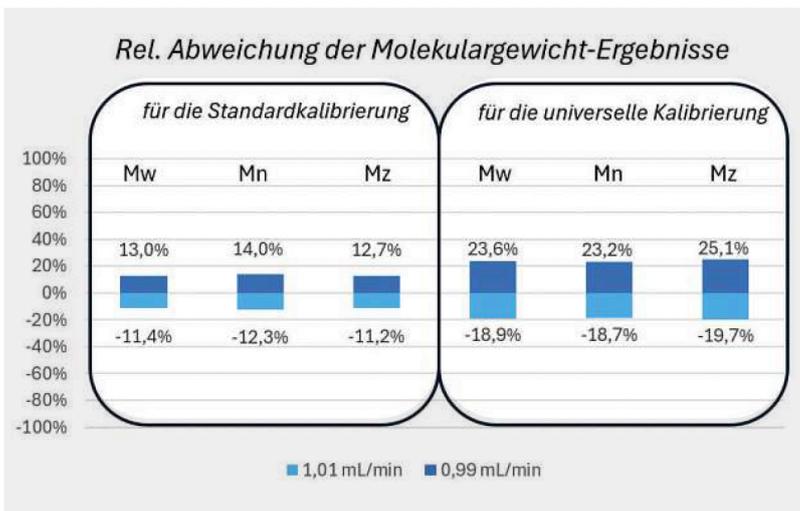
4 Molekulargewichtverteilung bei korrekter Durchflussrate

Bild: Testa Analytical

ren, dass das Molekulargewicht auf der Kalibrierungskurve ein logarithmischer Wert ist, der gegen den linearen Wert des Elutionsvolumens aufgetragen wird.

Ein grundlegender Parameter für jede Polymerprobe ist die Polydispersität, definiert als das Verhältnis von Massenmittel und Zahlenmittel der Molmasse M_w/M_n . Es ist daher von großem Interesse, die Auswirkungen einer kleinen Abweichung der Flussrate auf diesen wichtigen Wert zu untersuchen. Die Ergebnisse für das obige Beispiel sind in Tabelle 1 zu finden. Sie zeigen, dass die Polydispersität nur geringfügig von der Abweichung der Fließgeschwindigkeit beeinflusst wird.

Nach der Bewertung des Effekts auf der Grundlage einer Standardkalibrierung ist es interessant, die Bewertung auf der Grundlage eines Stichprobenlaufs gegen eine universelle Kalibrierung zu wiederholen (s. Abb. 6). Auch hier wurden positive und negative einprozentige Abweichungen von der korrekten Flussrate untersucht; die Ergebnisse sind rechts in Abbildung 5 zusammengefasst.



5 Vergleich der Molekulargewicht-Ergebnisse zum Soll-Durchfluss von 1,00 mL/min, links: für die Standardkalibrierung, rechts: für die universelle Kalibrierung

Bild: LABORPRAXIS Daten: Testa Analytical

Fazit: Durchflussraten messen statt raten

Die Auswirkungen einer kleinen Flussratenabweichung sind unglaublich groß (insgesamt über 40 %) auf ein System, das eine universelle Kalibrierung als Berechnungsgrundlage verwendet. Auch im Falle der „konventionellen“ Kalibrierung, führen kleine Abweichungen der Flussrate zu inakzeptablen Ergebnissen. Dies unterstreicht deutlich, wie wichtig es ist, die aktuellen Durchflussraten ständig zu überwachen und mit einer geeigneten Methode das laufende Chromatogramm zu korrigieren.

Diese einfachen Experimente zeigen die Bedeutung eines genauen und über die Zeit konstanten Durchflusses. Gleichzeitig verdeutlichen sie, dass bordeigene Mittel, wie der von der Pumpe gemeldete Gegendruck, für eine zuverlässige Beurteilung des Zustands der Pumpe selbst und damit des aktuell geförderten Durchflusses nicht ausreichen. Die Fehler in den ermittelten Molekulargewichten sind bei weitem nicht einfach zu ignorieren oder zu akzeptieren, insbesondere, weil moderne Mittel zur kontinuierlichen Überwachung des aktuellen Durchflusses in Form von nicht-invasiven Durchflussmessern ohne weiteres zur Verfügung stehen. (clu)

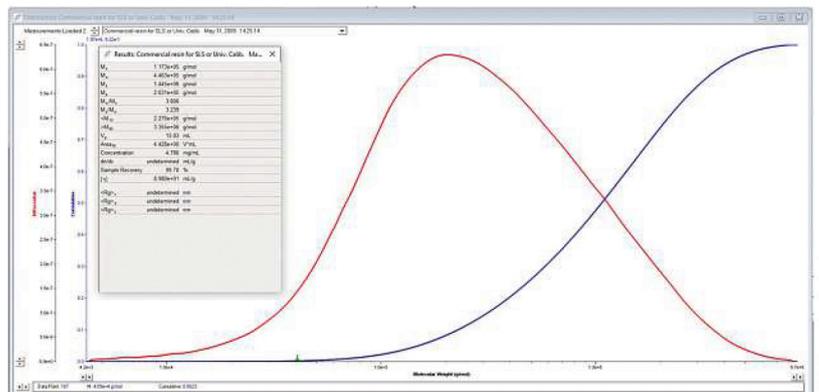
lers der Pumpe liegt und somit mit Bordmitteln nicht nachweisbar ist.

Kleiner Fehler, große Folgen

Für den Test wurde eine Probe direkt nach der Kalibrierung gemessen und anschließend der für die Berechnung verwendete Durchflussparameter manuell geändert. Dies wurde für eine zweite Probe wiederholt, wobei diesmal ein Viskositätsdetektor und universelle Kalibrierung zum Einsatz kamen (s. Abb. 4)

Abbildung 5, linker Teil, zeigt deutlich, wie sich der positive und negative 1%-Fehler auf die erhaltenen Molekulargewichte auswirkt. Die nominale Durchflussrate (und diejenige, mit der die Standards für die Kalibrierung durchgeführt wurden) betrug 1,000 mL/min. Die Berechnungen wurden daher bei 1,010 und 0,990 mL/min durchgeführt.

Die obigen Ergebnisse belegen, dass sich bereits eine Abweichung von einem Prozent bei der Durchflussrate signifikant auf die Molekulargewichtsergebnisse auswirkt und zu einer Änderung von insgesamt über 20 Prozent führt. Dieser Effekt mag auf den ersten Blick überraschen, lässt sich jedoch durch die Tatsache erklä-



6 Molekulargewichtverteilung, berechnet anhand der Universalkalibrierung (andere Probe als in Abb. 4)

Bild: Testa Analytical