

## A.19. ZAWARTOŚĆ POLIMERÓW O MAŁEJ MASIE CZĄSTECZKOWEJ

### 1. METODA

Niniejsza metoda chromatografii żelowej jest odpowiednikiem metody OECD TG 119 (1996). Podstawowe zasady i dalsze informacje techniczne podano w piśmiennictwie.

#### 1.1. Wstęp

Ze względu na bardzo różne właściwości polimerów, nie jest możliwe opisanie jednej metody, która dokładnie podawałaby warunki rozdziału i oceny oraz obejmowała wszystkie możliwości i szczególne przypadki występujące podczas rozdziału polimerów. Zwłaszcza w przypadku złożonych układów polimerycznych często nie można stosować chromatografii żelowej (GPC). Masę cząsteczkową można wówczas oznaczać za pomocą innych metod („Wskazówki dotyczące korygowania zawartości cząstek o małej masie cząsteczkowej ze względu na obecność nierozpuszczalnego polimeru”) podając równocześnie wszystkie informacje i uzasadnienie wybranej metody.

Opisana metoda jest zgodna z normą DIN 55672 <sup>1)</sup>. W normie tej zawarte są dokładne informacje o wykonaniu doświadczeń i ocenie wyników. Wszelkie zmiany dotyczące modyfikacji warunków doświadczenia należy uzasadnić. Można stosować inne wzorce, jeżeli są certyfikowane. W opisanej metodzie w celu kalibracji stosuje się próbki polistyrenu o znanej polidispersyjności. Jednak dla pewnych polimerów może być konieczna modyfikacja tej metody, na przykład dla polimerów rozpuszczalnych w wodzie i polimerów o długich, rozgałęzionych łańcuchach.

#### 1.2. Definicje i jednostki

Małą masę cząsteczkową definiuje się jako masę cząsteczkową poniżej 1000 daltonów.

Liczbowo średnią masę cząsteczkową  $M_n$  i wagowo średnią masę cząsteczkową  $M_w$  oznacza się stosując następujące równania:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

gdzie:

- $H_i$  – wielkość sygnału detektora od linii podstawowej dla objętości retencji  $V_i$ ,
- $M_i$  – masa cząsteczkowa frakcji polimeru dla objętości retencji  $V_i$ ,
- $n$  – liczba składników polimeru,
- $M_w/M_n$  – szerokość rozkładu masy cząsteczkowej, będąca miarą dyspersyjności układu.

#### 1.3. Materiały kontrolne

Ze względu na to, że GPC jest metodą względną, należy wykonać kalibrację. Zwykle stosuje się w tym celu wzorce polistyrenowe o budowie liniowej i znanych średnich masach cząsteczkowych  $M_n$  i  $M_w$  oraz o znanym wąskim rozkładzie masy cząsteczkowej. Do oznaczania masy cząsteczkowej nieznannej próbki stosuje się krzywą kalibracyjną tylko wtedy, jeżeli warunki rozdziału tej próbki i wzorców są identyczne.

Oznaczona zależność pomiędzy masą cząsteczkową i objętością elucji jest prawdziwa jedynie dla określonych warunków danego doświadczenia. Warunki te obejmują przede wszystkim temperaturę, rozpuszczalnik (lub mieszaninę rozpuszczalników), warunki chromatograficzne i kolumnę dzielącą lub układ kolumn.

Masy cząsteczkowe próbki oznaczone w ten sposób są wartościami względnymi i opisuje się je jako „masy cząsteczkowe równoważne masom polistyrenu”. Oznacza to, że zależnie od różnic strukturalnych i chemicznych

<sup>1)</sup>DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrohuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

pomiędzy próbką i wzorcami, masy cząsteczkowe mogą różnić się od wartości absolutnych w większym lub mniejszym stopniu. Gdy stosuje się inne wzorce, na przykład glikol polietylenowy, tlenek polietylenu, poli(metakrylan metylu), kwas poliakrylowy, należy podać uzasadnienie.

#### 1.4. Zasada metody badań

Stosując GPC, można oznaczyć zarówno rozkład masy cząsteczkowej próbki, jak i średnie masy cząsteczkowe ( $M_n$ ,  $M_w$ ). GPC jest szczególnym rodzajem chromatografii cieczowej, w której próbka jest rozdzielana w zależności od objętości hydrodynamicznych poszczególnych składników<sup>1)</sup>.

Rozdział następuje w miarę, jak próbka przechodzi przez kolumnę wypełnioną materiałem porowatym, zwykle żelem organicznym. Małe cząstki mogą penetrować pory, podczas gdy duże cząstki są wykluczane. Droga dużych cząstek jest przez to krótsza i one wymywają się w pierwszej kolejności. Cząstki średniej wielkości penetrują niektóre z porów i wymywają się później. Najmniejsze cząstki, o średnim promieniu hydrodynamicznym mniejszym niż pory żelu, mogą penetrować wszystkie pory. One wymywają się jako ostatnie.

W idealnym przypadku o rozdziale decyduje wyłącznie wielkość cząstek, ale w praktyce trudno jest zapobiec co najmniej niektórym interferencyjnym efektom absorpcyjnym. Niejednorodne wypełnienie kolumny i martwe objętości mogą utrudnić rozdział<sup>1)</sup>.

Detekcję prowadzi się wykorzystując na przykład współczynnik załamania lub absorpcję w UV i uzyskuje się krzywą rozkładu. Jednakże w celu przypisania krzywej rzeczywistych wartości mas cząsteczkowych, konieczna jest kalibracja kolumny przez przepuszczenie przez nią polimerów o znanej masie cząsteczkowej i dość podobnej budowie, na przykład różnych wzorców polistyrenowych. Powstaje typowa krzywa Gaussa, niekiedy zniekształcona przez niewielkie ogonowanie po stronie małych mas cząsteczkowych. Oś pionowa wskazuje ilość (wagowo) wymywanych cząstek o różnej masie cząsteczkowej, a oś pozioma logarytm masy cząsteczkowej.

Z tej krzywej określa się zawartość substancji o małej masie cząsteczkowej. Obliczenia mogą być dokładne tylko wówczas, jeżeli substancje o małych masach cząsteczkowych odpowiadają równoważnie na jednostkę masy polimeru jako całości.

#### 1.5. Kryteria jakościowe

Powtarzalność (względne odchylenie standardowe: RSD) objętości elucji powinna być lepsza niż 0,3%. Jeżeli to kryterium nie jest spełnione, należy wymaganą powtarzalność analizy zapewnić przez korygowanie za pomocą wzorca wewnętrznego, a chromatogram oceniać w zależności od czasu<sup>2)</sup>. Polidispersyjność zależy od mas cząsteczkowych wzorców. W przypadku wzorców polistyrenowych typowymi wartościami są:

$M_p < 2000$   $M_w/M_n < 1,20$

$2000 \leq M_p \leq 10^6$   $M_w/M_n < 1,05$

$M_p > 10^6$   $M_w/M_n < 1,20$

$M_p$  - masa cząsteczkowa wzorca w maksimum pików.

#### 1.6. Opis metody badań

##### 1.6.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych polistyrenu

Wzorce polistyrenowe rozpuszcza się przez ostrożne mieszanie w wybranym eluencie. Podczas przygotowania roztworów należy stosować się do zaleceń producenta.

Stężenia wybranych wzorców zależą od różnych czynników, na przykład wstrzykiwanej objętości, lepkości roztworu i czułości detektora analitycznego. Maksymalną objętość wstrzykiwaną należy dostosować do długości kolumny, aby zapobiec przeładowaniu. Typowe objętości wstrzykiwane w celu rozdziałów analitycznych z zastosowaniem GPC z kolumną 30 cm×7,8 mm mieszczące się na ogół pomiędzy zawartościami 40 i 100 µl. Można stosować większe objętości, ale nie powinny one przekraczać 250 µl. Przed kalibracją kolumny należy oznaczyć optymalny stosunek pomiędzy wstrzykiwaną objętością i stężeniem.

<sup>1)</sup> Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). *Modern Size Exclusion Liquid Chromatography*, J. Wiley and Sons.

<sup>2)</sup> DIN 55672 (1995). *Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel*, Teil 1.

### 1.6.2. Przygotowanie roztworu próbki

Do przygotowania roztworów próbek stosuje się takie same wymagania. Próbkę rozpuszcza się ostrożnie wstrząsając w odpowiednim rozpuszczalniku, na przykład w tetrahydrofuranie (THF). W żadnym wypadku nie należy jej rozpuszczać stosując łąźnię ultradźwiękową. W razie potrzeby roztwór próbki oczyszcza się za pomocą membrany filtracyjnej o wielkości porów pomiędzy 0,2 i 2  $\mu\text{m}$ .

W sprawozdaniu należy uwzględnić obecność nierozpuszczonych cząstek, ponieważ mogą one pochodzić z substancji o dużym ciężarze cząsteczkowym. W celu oznaczenia zawartości procentowej rozpuszczonych cząstek należy zastosować odpowiednią metodę. Roztwór należy wykorzystać w ciągu 24 godzin.

### 1.6.3. Korekta ze względu na zawartość zanieczyszczeń i dodatków

Zwykle konieczna jest korekta ze względu na zawartość cząstek o  $M < 1000$ , spowodowana udziałem obecnych związków niepolarnych (np. zanieczyszczeń i/lub dodatków), chyba że mierzona zawartość wynosi  $< 1\%$ . Osiąga się to przez bezpośrednią analizę roztworu polimeru lub GPC eluatu.

W przypadkach gdy eluat po przejściu przez kolumnę jest zbyt rozcieńczony do dalszej analizy, należy go zatężyć. Może być konieczne odparowanie eluatu do sucha i ponowne rozpuszczenie go. Stężenie eluatu należy zmieniać w warunkach, które zapewniają, że nie nastąpią zmiany w eluacie. Traktowanie eluatu po etapie GPC zależy od metody analitycznej stosowanej w celu oznaczania ilościowego.

### 1.6.4. Aparatura

- pojemnik na rozpuszczalnik,
- urządzenie do odgazowania (gdy to wskazane),
- pompa,
- wytłumiacz pulsacji (gdy to wskazane),
- układ dozujący,
- kolumny chromatograficzne,
- detektor,
- przepływomierz (gdy to wskazane),
- urządzenie rejestrujące i przetwarzające dane,
- naczynie na odpady.

Należy zapewnić, aby układ GPC był obojętny w stosunku do stosowanych rozpuszczalników (na przykład kapilary stalowe do THF).

### 1.6.5. Układ dozujący i układ zasilania rozpuszczalnikiem

Na kolumnę, w ściśle zdefiniowanej strefie, wprowadza się ręcznie lub za pomocą automatycznego dozownika określoną objętość próbki. Pociągając lub wciskając zbyt szybko tłok strzykawki podczas operacji manualnych można spowodować zmiany w obserwowanym rozkładzie mas cząsteczkowych. Układ zasilania rozpuszczalnikiem powinien być, w miarę możliwości, bezpulsacyjny, dzięki zainstalowaniu wytłumiacza pulsacji. Szybkość przepływu powinna być rzędu 1 ml/min.

### 1.6.6. Kolumna

Polimer (w zależności od próbki) ocenia się stosując jedną albo kilka kolumn połączonych kolejno. W handlu dostępne są liczne materiały porowate do kolumn, które mają określone właściwości (np. wielkość porów, granice wykluczania). Wybór żelu do rozdzielania lub długości kolumny zależą zarówno od właściwości próbki (objętości hydrodynamicznych, rozkładu masy cząsteczkowej), jak i od określonych warunków rozdziału, takich jak rozpuszczalnik, temperatura i szybkość przepływu<sup>1), 2), 3)</sup>.

<sup>1)</sup> DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

<sup>2)</sup> Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

<sup>3)</sup> ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography – GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

## 1.6.7. Półki teoretyczne

Kolumnę lub zestaw kolumn stosowany do rozdziału należy scharakteryzować za pomocą liczby półek teoretycznych. Obejmuje to, w przypadku THF jako rozpuszczalnika wymywającego, wprowadzenie na kolumnę o znanej długości roztworu etylobenzenu lub innej odpowiedniej rozpuszczonej substancji niepolarniej. Liczba półek teoretycznych obliczana jest z następujących równań:

$$N = 5,54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \quad \text{lub} \quad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

gdzie:

- N – liczba półek teoretycznych,
- $V_e$  – objętość elucji w maksimum piku,
- W – szerokość podstawy piku,
- $W_{1/2}$  – szerokość piku w połowie wysokości.

## 1.6.8. Skuteczność rozdziału

Oprócz liczby półek teoretycznych, która decyduje o szerokości pasma, rolę odgrywa również skuteczność rozdziału, określana przez nachylenie krzywej kalibracyjnej. Skuteczność rozdziału kolumny otrzymuje się z następującej zależności:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e(10M_x)}}{\text{pole powierzchni przekroju kolumny}} \geq 6,0 \left[ \frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

gdzie:

- $V_{e,M_x}$  – objętość elucji dla polistyrenu o masie cząsteczkowej  $M_x$ ,
- $V_{e(10M_x)}$  – objętość elucji dla polistyrenu o 10 razy większej masie cząsteczkowej.

Rozdział układu definiuje się na ogół następująco:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2 / M_1)}$$

gdzie:

- $V_{e1}, V_{e2}$  – objętości elucji dwóch wzorców polistyrenowych w maksimum piku,
- $W_1, W_2$  – szerokości podstaw pików,
- $M_1, M_2$  – masy cząsteczkowe w maksimum piku (powinny różnić się 10 razy).

Wartość R dla układu kolumn powinna być większa niż 1,7<sup>1)</sup>.

## 1.6.9. Rozpuszczalniki

Wszystkie rozpuszczalniki powinny mieć wysoką czystość (stosuje się THF o czystości 99,5%). Pojemnik na rozpuszczalnik (gdy to konieczne w atmosferze gazu obojętnego) powinien być odpowiednio duży w celu kalibracji kolumny i licznych analiz próbki. Rozpuszczalnik należy odgazować za pomocą pompy, zanim zostanie podany na kolumnę.

<sup>1)</sup> ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

#### 1.6.10. Kontrola temperatury

Temperatura krytycznych składników układu (pętli dozującej, kolumn, detektora i przewodów) powinna być stała i odpowiednia dla danego rozpuszczalnika.

#### 1.6.11. Detektor

Celem detektora jest ilościowa rejestracja stężenia próbki wymytej z kolumny. W celu zapobieżenia niepożądanemu poszerzeniu pików należy stosować jak najmniejszą objętość kuwety celki detektora. Nie powinna być ona większa niż 10  $\mu\text{l}$ , z wyjątkiem detektorów lepkościowych i do światła rozproszonego. W celu detekcji stosuje się na ogół refraktometrię różnicową. Jednak, o ile wymagają tego szczególne właściwości próbki lub rozpuszczalnika wymywającego, można stosować również inne rodzaje detektorów, np. UV/VIS, IR, detektory lepkościowe itd.

### 2. WYNIKI BADAŃ

W celu szczegółowej oceny kryteriów jak również wymagań dotyczących zbierania i przetwarzania danych należy odwołać się do normy DIN <sup>1)</sup>.

Dla każdej próbki należy przeprowadzić dwa niezależne doświadczenia i analizować je indywidualnie. Ważne jest, aby we wszystkich przypadkach wykonać oznaczenia dla ślepych prób, traktowanych w tych samych warunkach, co próbka.

Należy również wyraźnie wykazać, że mierzone wartości są wartościami względnymi równoważnymi masom cząsteczkowym stosowanego wzorca.

Po oznaczeniu objętości retencji lub czasów retencji (możliwie skorygowanych z zastosowaniem wzorca wewnętrznego), wykreśla się wartość  $\log M_p$  ( $M_p$  - maksimum pików wzorca do kalibracji) względem jednej z tych wielkości. Konieczne są co najmniej dwa punkty kalibracyjne na dziesięć mas cząsteczkowych i wymaga się co najmniej pięciu punktów pomiarowych dla pełnej krzywej, która powinna obejmować szacowaną masę cząsteczkową próbki. Punkt końcowy krzywej kalibracyjnej dla małych mas cząsteczkowych określa się za pomocą n-heksylobenzenu lub innej odpowiedniej niepolarniej substancji. Masy cząsteczkowe średnie liczbowo i średnie wagowo oznacza się na ogół za pomocą elektronicznego przetworzenia danych. W przypadku przekształceń manualnych należy oprzeć się na normie ASTM D 3536-91 <sup>2)</sup>.

Jeżeli na kolumnie pozostaje jakiś nierozpuszczalny polimer, jego masa cząsteczkowa jest prawdopodobnie większa niż masy we frakcji rozpuszczalnej, i jeżeli się go nie uwzględni, będzie wpływał on na podwyższenie zawartości małych mas cząsteczkowych. Wskazówki dotyczące korygowania zawartości niskich mas cząsteczkowych w przypadku nierozpuszczalnych polimerów podano w rozdziale „Wskazówki dotyczące korygowania zawartości cząstek o małej masie cząsteczkowej ze względu na obecność nierozpuszczalnego polimeru”.

Krzywa rozkładu powinna mieć postać tabeli lub rysunku (częstotliwość różnicowa lub suma zawartości procentowych względem  $\log M$ ).

Przy przedstawianiu graficznym dziesięciu masom cząsteczkowym powinno odpowiadać około 4 cm szerokości, a maksymalny pik powinien mieć około 8 cm wysokości.

W przypadku całkowitych krzywych rozkładu różnica rzędnych pomiędzy 0 i 100% powinna wynosić około 10 cm.

### 3. SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie powinno zawierać, z uwzględnieniem zakresu przeprowadzonych badań, następujące informacje:

1) badana substancja:

- a) dostępne informacje dotyczące badanej substancji (tożsamość, dodatki, zanieczyszczenia),
- b) opis postępowania z próbką, spostrzeżenia, problemy;

<sup>1)</sup> DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

<sup>2)</sup> ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography – GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

## 2) oprzyrządowanie:

- a) pojemnik na eluent, gaz obojętny, odgazowanie eluenta, skład eluenta, zanieczyszczenia,
- b) pompa, wycłumiacz pulsacji, układ dozujący,
- c) kolumny rozdzielcze (producent, wszystkie informacje dotyczące charakterystyki kolumn, takie jak wielkość porów, rodzaj materiału rozdzielczego itd., liczba, długość i kolejność stosowanych kolumn),
- d) liczba pól teoretycznych kolumny (lub kombinacji), skuteczność rozdziału (rozdzielczość układu),
- e) informacje na temat symetrii pików,
- f) temperatura kolumny, sposób kontroli temperatury,
- g) detektor (zasada pomiaru, objętość kuwety),
- h) przepływomierz, o ile jest stosowany (producent, zasada pomiaru),
- i) układ rejestrujący i przetwarzający dane (sprzęt komputerowy i oprogramowanie);

## 3) kalibracja układu:

- a) szczegółowy opis metody stosowanej do sporządzania krzywej kalibracyjnej,
- b) informacje na temat kryteriów jakościowych tej metody (np. współczynnika korelacji, sumy kwadratów błędów itd.),
- c) informacje dotyczące wszelkich ekstrapolacji, założeń i przybliżeń dokonanych podczas procedury doświadczalnej oraz oceny i przetwarzania danych,
- d) wszelkie pomiary zastosowane w celu konstruowania krzywej kalibracyjnej należy zestawić w tabeli zawierającej następujące informacje dotyczące każdego punktu kalibracji:
  - nazwa próbki,
  - producent próbki,
  - wartości charakteryzujące wzorce  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$  i  $M_w/M_n$ , dostarczane przez producenta lub pochodzące z kolejnych pomiarów, wraz ze szczegółami odnośnie do metody oznaczenia,
  - dozowana objętość i stężenie dozowanej próbki,
  - wartość  $M_p$  stosowana do kalibracji,
  - objętość elucji lub skorygowany czas retencji mierzony w maksimum pików,
  - $M_p$  obliczona dla maksimum pików,
  - błąd procentowy obliczonej wartości  $M_p$  i wartości kalibracji;

## 4) informacje dotyczące zawartości polimerów o małej masie cząsteczkowej:

- a) opis metod stosowanych podczas analizy i sposób, w jaki prowadzono doświadczenia,
- b) informacje dotyczące zawartości procentowej cząstek o małej masie cząsteczkowej (w/w) w stosunku do całej próbki,
- c) informacje na temat zanieczyszczeń, dodatków i innych niepolarnych cząstek w procentach wagowych w stosunku do całej próbki;

## 5) ocena:

- a) ocena na podstawie czasu: metody stosowane do zapewnienia wymaganej powtarzalności (metoda korygowania, wzorzec wewnętrzny itd.),
- b) informacje o tym, czy ocenę przeprowadzono na podstawie objętości elucji czy czasu retencji,
- c) informacje dotyczące granic oceny, jeżeli pik nie jest w pełni analizowany,
- d) opis metod wygładzania danych, jeżeli były stosowane,
- e) procedury przygotowania i wstępnej obróbki próbki,
- f) obecność nierozpuszczonych cząstek, jeżeli występują,
- g) objętość dozowana ( $\mu\text{l}$ ) i stężenie dozowanej próbki ( $\text{mg/ml}$ ),
- h) spostrzeżenia dotyczące wpływów, które prowadzą do odchylenia od idealnego profilu GPC,
- i) szczegółowy opis wszelkich modyfikacji procedur badawczych,
- j) szczegóły dotyczące zakresów błędów,
- k) wszelkie inne informacje i spostrzeżenia istotne dla interpretacji wyników.

## WSKAZÓWKI DOTYCZĄCE KORYGOWANIA ZAWARTOŚCI CZĄSTEK O MAŁEJ MASIE CZĄSTECZKOWEJ ZE WZGLĘDU NA OBECNOŚĆ NIEROZPUSZCZALNEGO POLIMERU

Gdy w próbce obecny jest nierozpuszczalny polimer, powoduje to ubytek masy podczas analizy GPC. Nierozpuszczalny polimer jest nieodwracalnie zatrzymywany na kolumnie lub w trakcie sączenia próbki, podczas gdy część rozpuszczalna próbki przechodzi przez kolumnę. W przypadku gdy możliwe jest zmierzenie lub oszacowanie przyrostu współczynnika załamania polimeru ( $dn/dc$ ), można oszacować ubytek masy próbki na kolumnie. W takim przypadku dokonuje się korekty, stosując zewnętrzną kalibrację z materiałami odniesienia o znanym stężeniu i  $dn/dc$  w celu kalibracji wskazań refraktometru. W powyższym przykładzie stosuje się wzorzec poli(metakrylanu metylu) (pMMA).

Podczas kalibracji zewnętrznej w celu analizy polimerów akrylowych analizuje się metodą GPC wzorzec pMMA o znanym stężeniu w tetrahydrofuranie, a uzyskane dane wykorzystuje się do określenia stałej refraktometru zgodnie z równaniem:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

gdzie:

- K – stała refraktometru (w mikrowoltosekundach/ml),
- R – wartość sygnału dla wzorcowego pMMA (w mikrowoltosekundach/ml),
- C – stężenie wzorcowego pMMA (w mg/ml),
- V – objętość wstrzykiwana (w ml),
- $dn/dc$  – przyrost współczynnika załamania dla pMMA w tetrahydrofuranie (w ml/mg).

Dla wzorcowego pMMA typowe są następujące dane:

$$R = 2937891$$

$$C = 1,07 \text{ mg/ml}$$

$$V = 0,1 \text{ ml}$$

$$dn/dc = 9 \times 10^{-5} \text{ ml/mg.}$$

Uzyskaną wartość K,  $3,05 \times 10^{11}$ , wykorzystuje się następnie do obliczenia teoretycznej wartości sygnału detektora, gdy 100% wstrzykniętego polimeru wymywa się przez detektor.