

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 18

Wie findet man die optimalen Bedingungen für ein GPC/SEC-Experiment? Teil 2: Natürliche Polymere (Biopolymere) und Proteine

Problemstellung

Wir betreiben in unserem Labor eine GPC/SEC-Anlage mit Dreifachdetektion. Wir befassen uns überwiegend mit der Analyse von biologischen Makromolekülen. Zukünftig sollen auch Proteinproben analysiert werden. Die GPC/SEC-Anlage wird daher mit wässrigen Puffersystemen betrieben. Es sind mehrere Trennsäulensätze verfügbar.

Frage

Wie können wir für eine Biopolymerprobe oder eine Proteinprobe die optimalen GPC/SEC-Bedingungen ermitteln ohne jedes Mal eine langwierige Methodenentwicklung durchführen zu müssen?

Lösung

Es ist für eine erfolgreiche Durchführung eines GPC/SEC-Experimentes sehr wichtig dass die Probe, die Trennsäule(n), das Löse- und Laufmittel und weitere Bedingungen wie Temperatur der Säulen und Detektoren, Art und Stärke des Puffers und weitere Details möglichst optimal aufeinander abgestimmt sind. Nur dann können verwertbare Chromatogramme und daraus exakte und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

Im Bereich der biologischen oder natürlichen Polymere ist das Finden der optimalen Bedingungen teilweise sehr schwierig. Da hier in aller Regel im wässrigen Bereich gearbeitet wird sind Parameter wie pH-Wert und Art und Stärke des verwendeten Puffers wichtig. Allgemein gilt: reines Wasser ohne Salz- bzw. Pufferzusatz ist als Laufmittel für die GPC/SEC nicht geeignet; die Wechselwirkungen zwischen Probe und Trennsäule werden mit reinem Wasser nicht unterdrückt. Daher setzt man immer ein Salz ein. Der am häufigsten verwendete Salzzusatz ist Natriumnitrat (ca. 0,1 molar). Mit diesem Löse- und Laufmittel können viele neutrale Polysaccharide wie z. B. Dextrane, Pullulane und Maltodextrine bei Raumtemperatur oder 35-40°C und

einem neutralen pH-Wert zuverlässig und reproduzierbar gemessen werden. Größere Probleme hingegen bereiten komplexe Polysaccharide die partiell geladen sind. Zu dieser Substanzklasse gehören z. B. Chitosane, Pectine und Carrageenane. Hier muss darauf geachtet werden dass der richtige pH-Wert und die richtige Temperatur gewählt wird. So sind Chitosane oberhalb von pH 6,3 nicht mehr löslich während Carrageenane unterhalb von ca. 60°C Dimere bilden und somit ein zu hohes Molekulargewicht resultiert. Auch die Wahl der geeigneten Trennsäule(n) ist hier von Bedeutung. Größte Ansprüche an den Anwender stellen sehr große, zum Teil geladene Polysaccharide (Polyelektrolyte) dar. Die sind z. B. Xanthane und Alginate. Hier können nur noch sehr spezielle, auf den extrem hochmolekularen Bereich zugeschnittene Trennsäulen unter genau definierten Bedingungen verwendet werden. Auch native Stärken bilden einen Spezialfall; sie können meist nur noch mit Dimethylsulfoxid (DMSO) bei 60-80°C analysiert werden. Allgemein gilt bei den Biopolymeren dass man mit Aggregationen zu kämpfen hat.

Um die Proben vollständig in Lösung zu bringen werden oft drastische Bedingungen wie erhöhte Temperatur und starkes Rühren eingesetzt. Hier muss man allerdings sehr darauf achten dass man bei diesen Prozeduren nicht die hochmolekularen Probenanteile zerstört und dadurch das Analyseergebnis schon vor dem eigentlichen GPC/SEC-Experiment verfälscht.

Bezüglich der verwendeten Trennsäulen gibt es im wässrigen Bereich deutlich mehr Auswahl als im organischen Bereich. Für Biopolysaccharide werden verschiedene Säulentypen auf Acrylatbasis verwendet, es sind aber auch etliche Säulen auf Basis von modifizierten Silicamaterialien erhältlich. Wiederum kann anhand der Herstellerangaben zu den Trenngrenzen und der Trennleistung einzelner Säulen ein geeignetes Säulenset zusammengestellt werden.

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 18

Allerdings ist darauf zu achten dass sich die Biopolymere in Ihrer Struktur stark unterscheiden können so dass die vom Hersteller z. B. für Dextrane angegebenen Trenngrenzen für die zu analysierende Probe ggf. stark nach oben oder unten abweichen können. Auch hier sind oft zwei lineare Säulen (mixed bed Säulen) eine gute Wahl wobei wiederum der ungefähre Molekulargewichtsbereich der Probe bekannt sein sollte.

Im Bereich der Proteine sind die individuellen Ansprüche der einzelnen Proben sehr ausgeprägt. Neben wenigen Standard-Proteinen wie BSA und Lysozym die z. B. bei Raumtemperatur in einem neutralen Phosphatpuffer mit einer Superdex 200 Trennsäule von Pharmacia oder einer G3000SWXL-Trennsäule auf Silicabasis von TosohBioscience gemessen werden können muss tatsächlich für fast jedes andere Protein zunächst ein optimaler Satz an Messbedingungen gesucht werden.

Schlussfolgerung

Biopolymere und Proteine stellen im Allgemeinen höhere Anforderungen an den Anwender einer GPC/SEC-Anlage als synthetische Polymere. Da wässrige Laufmittel eingesetzt werden müssen mehr Parameter berücksichtigt werden als bei reinen organischen Laufmitteln (pH-Wert, Art und Stärke des Puffers). Obwohl es sich z. B. bei verschiedenen Polysacchariden um chemisch sehr verwandte Stoffe handelt die sich oft nur über die Verknüpfungsstruktur unterscheiden können die Anforderungen an die GPC/SEC doch extrem unterschiedlich sein. So lassen sich z. B. Dextrane und abgebaute Stärken problemlos bei Raumtemperatur mit einem neutralen wässrigen Puffer analysieren, native Stärken hingegen können meist nur noch mit Dimethylsulfoxid (DMSO) bei 60-80°C analysiert werden. Noch individueller wird die Methodenerstellung im Fall der Proteine. Hier sind bislang nur für wenige sehr gut bekannte Substanzen optimierte Methoden entwickelt worden; für die Mehrzahl an Proteinen obliegt diese Aufgabe auch heute noch dem GPC/SEC-Anwender.

Author: Dr. Gerhard Heinzmann, Viscotek GmbH

Für weitere Informationen können Sie jederzeit sehr gerne Kontakt zu uns aufnehmen