

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 9

Bestimmung der Größe von Makromolekülen in Lösung

Problemstellung

In unserem Arbeitskreis sollen demnächst neben den Molekulargewichten der Proben auch die Größen der Makromoleküle in Lösung bestimmt werden. Hierzu stehen neben einem Brechungsindexdetektor ein Viskositätsdetektor sowie ein Lichtstreuendetektor mit mehreren Messwinkeln zur Verfügung.

Frage

Mit welchem Detektor kann die Größe eines Polymerknäuels bzw. eines Makromoleküls in Lösung am zuverlässigsten bestimmt werden?

Lösung

Zunächst ist festzuhalten dass die Größe eines Makromoleküls in Lösung durch zwei Parameter beschrieben werden kann: den hydrodynamischen Radius der Probe sowie den Trägheitsradius der Probe. Der empirisch definierte hydrodynamische Radius der Probe ist das Äquivalent zu einer harten, undurchspülten Kugel mit demselben hydrodynamischen Widerstand wie die Probe ihn aufweist. Im Gegensatz dazu ist der Trägheitsradius statistisch definiert; er ist die Wurzel aus der Summe der quadratischen Abstände aller Massepunkte der Probe die vom Schwerpunkt aus gemessen werden. Bei einem Polymerknäuel ist daher der hydrodynamische Radius in der Regel deutlich kleiner als der Trägheitsradius während bei einem globulären Protein der hydrodynamische Radius die tatsächlich vorliegende Größe sehr genau wiedergibt. Allgemein kann man festhalten dass im biomolekularen Bereich der hydrodynamische Radius besser bekannt ist während im Bereich der synthetischen Polymere eher der Trägheitsradius verwendet wird.

Der Trägheitsradius kann mit einem Lichtstreuendetektor gemessen werden der über mindestens 2 Messwinkel verfügt. Zur Bestimmung des Trägheitsradius einer Probe werden die Flächen der Streulichtsignale verschiedener Messwinkel auf den Messwinkel von Null Grad extrapoliert. Aus der Anfangssteigung dieser Kurve kann

dann der Trägheitsradius der Probe ermittelt werden. Stehen nur zwei Messwinkel zur Verfügung so kann nur eine lineare Extrapolation durchgeführt werden. Mit drei oder mehr Messwinkeln können auch gekrümmte Funktionen angepasst werden. Die große Limitation dieser Technik besteht darin dass Moleküle deren Durchmesser kleiner ist als 1/20 der verwendeten Laserwellenlänge (bei einer Laserwellenlänge von 670 nm entspräche dies einem Trägheitsradius von ca. 15 nm) zu klein sind um eine winkelabhängige Verteilung des Streulichtes erzeugen zu können. Für diese Moleküle kann die reine Lichtstreuung keine Größeninformation mehr liefern. Bei Polystyrol entspricht diese Grenze etwa einem Molekulargewicht von 150.000 D, bei globulären Proteinen liegt diese Grenze sogar bei ca. 900.000 D.

Im Gegensatz dazu kann mit der Kombination der Lichtstreuendetektion (ggf. nur mit einem einzigen Messwinkel) mit der Viskositätsdetektion oder auch mit der reinen Viskositätsdetektion (Universelle Kalibrierung) der hydrodynamische Radius einer Probe bis zum Oligomerbereich, also bis zu einer Größe von ca. 1 nm und einem Molekulargewicht von weniger als 1000 D, zuverlässig bestimmt werden. Dazu wird entweder aus dem Lichtstreuendetektor oder über die universelle Kalibrationskurve das Molekulargewicht der Probe bestimmt. Der Viskositätsdetektor liefert die intrinsische Viskosität der Probe. Das Produkt aus beiden Parametern ist proportional zum hydrodynamischen Volumen und somit zum hydrodynamischen Radius der Probe.

Schlussfolgerung

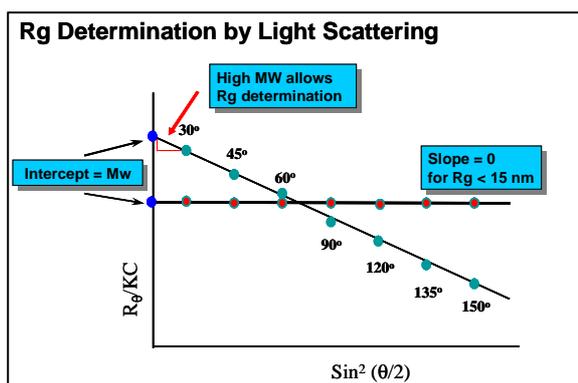
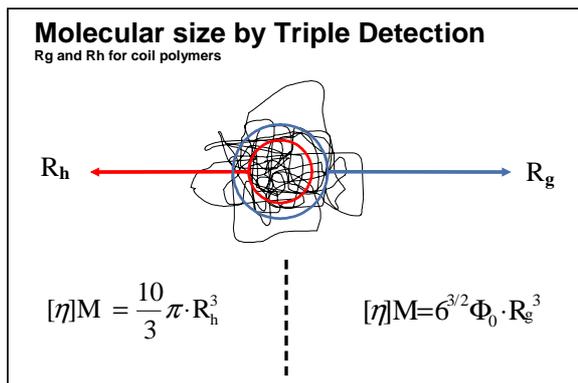
Für die Größenbestimmung von Makromolekülen in Lösung eignen sich sowohl Lichtstreuendetektoren mit mindestens zwei Messwinkeln wie auch eine Kombination von Lichtstreuendetektion und Viskositätsdetektion (Triple Detection) oder eine reine Viskositätsdetektion (natürlich immer in Verbindung mit einem Brechungsindexdetektor). Die reine Lichtstreuendetektion kann über eine Extrapolation der Messwinkel den Trägheitsradius der Probe bestimmen. Dazu muss die Probe aber einen Trägheitsradius von mindestens 15 nm aufweisen was bei

GPC/SEC mit Dreifachdetektion Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 9

synthetischen Polymeren einem Molekulargewicht von mehr als 150.000 D und bei globulären Proteinen einem Molekulargewicht von mehr als 900.000 D entspricht.

Sehr viel besser und zuverlässiger kann der hydrodynamische Radius einer Probe über eine reine Viskositätsdetektion oder die Kombination von Lichtstreuungsdetektion und Viskositätsdetektion bestimmt werden. Die untere Grenze liegt hier bei ca. 1 nm was einem Molekulargewicht von weniger als 1000 D entspricht.

Abb. 1: Bestimmung von hydrodynamischen Radien und Trägheitsradien von Makromolekülen in Lösung



Author: Dr. Gerhard Heinzmann, Viscotek GmbH

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