

Copolymer- und Proteinanalytik in der Gelpermeationschromatographie

Dr. Gerhard Heinzmann

Copolymeranalyse und Konjugatanalyse mit Brechungsindex- und UV-Detektion

Wird neben dem Brechungsindexdetektor als zusätzlicher Detektor ein UV-Detektor verwendet, dann können weitere Informationen über die Probe erhalten werden. Der UV-Detektor ist wie der Brechungsindexdetektor ein Konzentrationsdetektor, er spricht aber selektiv auf chromophore Gruppen im Polymermolekül an. Daher kann er dazu verwendet werden, die Zusammensetzung von Copolymeren oder Konjugaten zu bestimmen. Voraussetzung dafür ist, dass mindestens eine der Komponenten des Copolymers UV-aktiv ist.

Ein Beispiel hierzu ist der synthetische Kautschuk, der aus Styrol und Butadien besteht. Die Styrolkomponente ist aufgrund des aromatischen Rings im Molekül bei einer Wellenlänge von 254 nm stark UV-aktiv während die Butadienkomponente bei dieser Wellenlänge nahezu UV-inaktiv ist. Die Signale der beiden Konzentrationsdetektoren können nun zur Auswertung der Copolymerzusammensetzung verwendet werden. Grundlage dazu ist eine einfache Mathematik:

$$RI = C_A \times A_{RI} + C_B \times B_{RI}$$

$$UV = C_A \times A_{UV} + C_B \times B_{UV}$$

RI = Fläche des RI-Signals

UV = Fläche des UV-Signals

A_{RI} = RI - Ansprechfaktor für Komponente A

B_{RI} = RI - Ansprechfaktor für Komponente B

A_{UV} = UV - Ansprechfaktor für Komponente A

B_{UV} = UV - Ansprechfaktor für Komponente B

Zunächst müssen die Ansprechfaktoren der einzelnen Komponenten des Copolymers sowohl für den Brechungsindexdetektor (dn/dc-Wert) als auch für den UV-Detektor (dA/dc-Wert) bestimmt werden. Sind diese bekannt, dann kann mittels der aufgeführten Gleichungen die Zusammensetzung eines Copolymers an jedem Punkt der Molekulargewichtsverteilung bestimmt werden

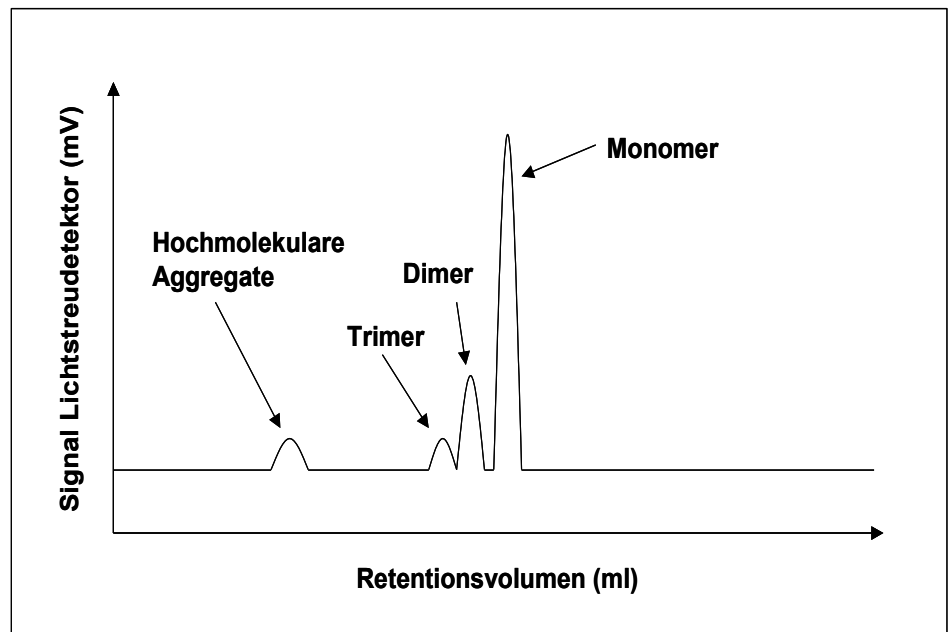


Abb. 1 Chromatogramm eines Lichtstreuendetektors für eine Rinderserumalbumin-Probe (BSA = Bovine Serum Albumine) mit hochmolekularen Aggregationen

Aus der Zusammensetzung kann dann wiederum der dn/dc-Wert der Polymerprobe an jedem Messpunkt ermittelt werden und mit dem korrekten dn/dc-Wert kann schließlich mittels eines Lichtstreuendetektors das absolute Molekulargewicht der Probe und dessen Verteilung bestimmt werden.

Ein weiteres Beispiel für den Einsatz der Copolymeranalyse ist die Charakterisierung von PEGylierten Proteinen und auch HESylierten Proteinen, also mit Hydroxyethylstärke ummantelten Proteinen, die im Bereich der „Drug-Delivery“ Systeme im pharmazeutischen Bereich sehr häufig eingesetzt werden. Hier ist das Proteinmolekül in der Regel bei einer UV-Wellenlänge von 280 nm sehr aktiv während die Polyethylenglycol-Moleküle (PEG) wie auch die Hydroxyethylstärkemoleküle (HES) bei dieser Wellenlänge in erster Näherung nahezu UV-inaktiv sind. Somit kann mit der Methode der Copolymeranalyse (die im pharmazeutischen Bereich oft auch als „Konjugatanalyse“ bezeichnet wird) schnell und einfach mit nur einem chromatographischen Lauf bestimmt werden wie viele PEG- oder HES-Moleküle an einem Protein-

molekül gebunden sind. Aus dem Lichtstreuendetektor resultiert dann wiederum das absolute Molekulargewicht des Konjugatmoleküls.

Gelpermeationschromatographie in der Proteinanalytik

Die Gelpermeationschromatographie wird in zunehmendem Maße auch in der biomolekularen Forschung eingesetzt. Der größte Teil der Proben sind in diesem Bereich Polysaccharide und Proteine.

Als Laufmittel werden meist wässrige Puffersysteme verwendet, als Detektor kommt vor allem im Bereich der Proteine fast immer ein UV-Detektor zum Einsatz. Es wird aber nur in seltenen Fällen eine Säulenkalibrierung mit Proteinstandards durchgeführt, da Proteine oft stark mit dem Füllmaterial der Trennsäule(n) wechselwirken und daher die Elutionsvolumina von Proteinproben nicht zuverlässig sind. Zur Bestimmung von Molekulargewichten wird daher auch im Proteinbereich immer öfter mit der Lichtstreuung gearbeitet.

Da globuläre Proteine sehr kleine Moleküle mit hoher Dichte sind ist bis zu einem Molekulargewicht von ca. 500.000 g/mol für die Molekulargewichtsbestimmung ein reiner Rechtwinkel-Lichtstreuendetektor vollkommen ausreichend. Erst wenn die Grenze von 500.000 g/mol deutlich überschritten wird, zeigt sich eine Winkelabhängigkeit in der Lichtstreuung. Unter dieser Grenze wirken globuläre Proteine als isotrope Streuer.

Mit einem Lichtstreuendetektor können die absoluten Molekulargewichte von Proteinproben bestimmt werden. Gleichzeitig können auch kleine Mengen an hochmolekularen Proteinaggregationen gut bestimmt werden, da der Lichtstreuendetektor sehr sensitiv auf hochmolekulare Substanzen anspricht. In Abbildung 1 ist das Chromatogramm einer Rinderserumalbumin-Probe (BSA = Bovine Serum Albumine) mit Aggregationen abgebil-

det. Deutlich ist bei einem kleinen Elutionsvolumen ein Peak in der Lichtstreuung zu erkennen der von einer geringen Menge an sehr hochmolekularen Proteinaggregationen stammt. Im Konzentrationsdetektor (UV-Detektor) hingegen wäre dieser Peak nahezu nicht mehr zu erkennen.

Wird zusätzlich ein Viskositätsdetektor in der Proteinanalytik verwendet, dann kann über das Produkt Intrinsische Viskosität mal Molekulargewicht auch der hydrodynamische Radius einer Proteinprobe bestimmt werden. Der hydrodynamische Radius kann alternativ auch über die dynamische Lichtstreuung bestimmt werden. Die Bestimmung von Verzweigungsstrukturen hingegen ist im Bereich der Proteinanalytik kein Thema, da Proteine nahezu monodisperse Moleküle sind mit einer sehr komplexen Struktur (Sekundärstruktur, Faltung).

Der Brechungsindexdetektor kann zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet werden. Da alle Proteine aus einer begrenzten Anzahl an Nukleinsäuren aufgebaut sind, haben viele Proteine einen sehr ähnlichen dn/dc -Wert, der in der Regel im Bereich von 0,160 ml/g bis 0,190 ml/g liegt.

Der dA/dc -Wert bzw. Extinktionskoeffizient hingegen, den man für die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben über den UV-Detektor benötigt, kann bei Proteinen je nach Nukleinsäuresequenz um mehrere Größenordnungen variieren. Daher ist eine Konzentrationsbestimmung über den UV-Detektor im Bereich der Proteinanalytik sehr viel schwieriger als dies mit einem Brechungsindexdetektor der Fall ist.