

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Gum Arabic/Gum Acacia

Gum Arabic/Gum Acacia: Umfassende Charakterisierung mit der GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Dr. Gerhard Heinzmann, Dr. Bernd Tartsch

Mit der zunehmenden Leistungsfähigkeit der modernen Gelpermeationschromatographie (GPC/SEC) nimmt auch die Komplexität der zu untersuchenden Proben zu. Ein Beispiel für eine sehr anspruchsvolle Applikation ist Gummi Arabicum (engl: Gum Arabic, auch Gum Acacia genannt). Er wird als Exsudat aus dem Pflanzensaft von Verek-Akazie (*Acacia senegal*) und Seyal-Akazie (*Acacia seyal*) gewonnen. Gummi arabicum ist ein natürliches Polysaccharid das als Zusatzstoff sowohl in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie wie auch in der Parfüm- und Kosmetikindustrie Anwendung findet. Durch die strukturellen Besonderheiten dieser makromolekularen, biologischen Substanz werden die Möglichkeiten der modernen GPC/SEC besonders eindrucksvoll dargestellt.

Einleitung

Seit einigen Jahrzehnten ist die Gelpermeationschromatographie (GPC) oder Größenausschlusschromatographie (SEC = Size Exclusion Chromatography) eine der wichtigsten Analysemethoden für alle Arten von natürlichen und synthetischen makromolekularen Stoffen. Durch den Einsatz von molekulargewichtssensitiven Detektoren wie Viskositätsdetektoren und Lichtstredetektoren können nicht nur absolute Molekulargewichte sondern auch Strukturinformationen (hydrodynamische Größen, Verzweigungsgrade, Kettenflexibilitäten) erhalten werden [1,2].

Mit der zunehmenden Leistungsfähigkeit der modernen Gelpermeationschromatographie (GPC/SEC) nimmt auch die Komplexität der zu untersuchenden Proben zu. Ein Beispiel für eine sehr anspruchsvolle GPC/SEC-Applikation ist Gum Arabic/Gum Acacia.

Gum Arabic/Gum Acacia

Gum Arabic ist ein natürlich vorkommender, makromolekularer Stoff der zunehmend Anwendung in der Lebensmittel- bzw. Getränkeindustrie und Parfümindustrie findet. Gum Arabic ist eine Mischung eines niedermolekularen Polysaccharidanteils und eines höhermolekularen Glycoproteinanteils. Da die Mischung je nach Herkunft des Materials stark variiert ist die genaue molekulare Struktur von Gum Arabic noch immer weitestgehend unbekannt.

Charakterisierung von Gum Arabic/Gum Acacia mit Kleinwinkel-Lichtstredetektion (LALS), Viskositätsdetektion und Brechungsindexdetektion (RI)

Abbildung 1 zeigt ein Dreifachchromatogramm einer typischen Gum Arabic-Probe (Lichtstremessung, Viskositätsdetektion, Brechungsindexdetektion).

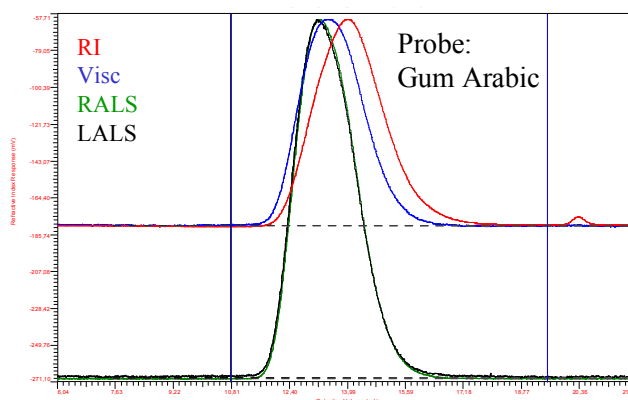


Abb. 1: Dreifachchromatogramm einer Gum Arabic-Probe
Mittleres Molekulargewicht (M_w) = 290.000 D
Mittlere Intrinsische Viskosität (IV_w) = 0,213 dl/g

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Gum Arabic/Gum Acacia

Aufgrund der sehr komplexen und zudem mit der Herkunft variierenden Struktur und Zusammensetzung von Gum Arabic/Gum Acacia ist es nahezu unmöglich die korrekten Molekulargewichte dieser Verbindungen mit der herkömmlichen GPC/SEC-Technik mit reiner Brechungsindexdetektion zu bestimmen. Es sind keinerlei Standards verfügbar die auch nur eine annähernd vergleichbare Struktur aufweisen. Die korrekten Molekulargewichte dieser Proben können aber mit einem Lichtstreuendetektor ermittelt werden. Da diese Moleküle zum Teil einen sehr großen molekularen Radius in Lösung aufweisen, ist nur ein Kleinwinkel-Lichtstreuendetektor (Low Angle Light Scattering (LALS) Detektor, [3]) in der Lage, die Molekulargewichte dieser Proben exakt und ohne jegliche mathematische Extrapolation oder Korrektur der Daten zu erfassen.

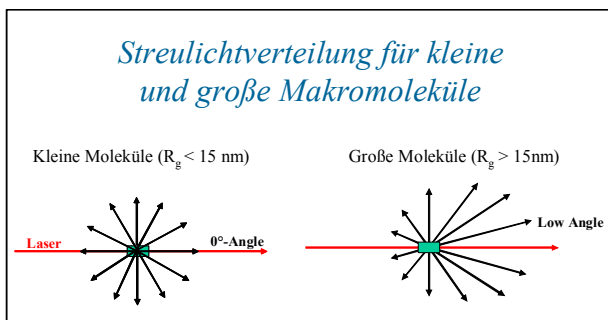


Abb.2: Streulichtverteilung für kleine und große Makromoleküle

Dies wird deutlich wenn man die physikalischen Grundlagen der Lichtstreuung betrachtet: Hat eine Makromolekül einen Trägheitsradius der größer ist als etwa 1/20 der Laserwellenlänge des Messlichtes (was einem Trägheitsradius von ca. 15 nm entspricht), dann treten Interferenzen im Streulicht auf, die dazu führen dass das Streulicht zu steigenden Winkeln hin abgeschwächt wird (Abb. 2). Mathematisch wird dies durch den sogenannten Streufaktor oder Formfaktor $P(\theta)$ ausgedrückt [4]:

$$P(\theta) = R_{\theta}/R_0$$

Der Formfaktor beschreibt also die Abnahme des beobachteten Streulichtes (R_{θ}) bei höheren Winkeln im Vergleich zum Streulicht bei einem theoretischen Messwinkel von Null Grad (R_0), der aufgrund des Laserstrahls messtechnisch aber nicht zugänglich ist. In Abb. 3 ist diese Abschwächung des Streulichtes für verschiedene Messwinkel gegen das Molekulargewicht aufgetragen, wobei die Bezugsgröße das Molekulargewicht eines kettensteifen Makromoleküls mit einem Mark-Houwink a -Wert von $> 0,8$ ist.

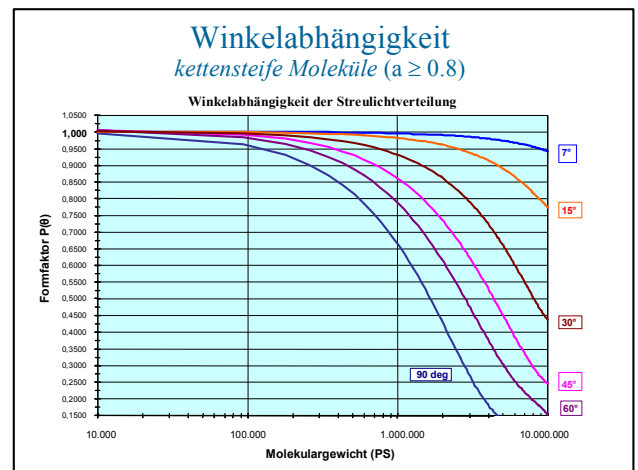


Abb.3: Winkelabhängigkeit der Streulichtverteilung

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass der Formfaktor $P(\theta)$ bis zu einem absoluten Molekulargewicht von ca. 100.000 D für alle Winkel nahe bei 1 liegt, was einer nahezu kugelsymmetrischen Streuung des Lichtes entspricht. Wird das Molekulargewicht größer, weichen die verschiedenen Winkel von 1 ab, d. h. das Streulicht wird zu steigenden Winkeln hin immer mehr abgeschwächt. Bei sehr großen Molekülen ist klar zu erkennen, dass nur der kleinste Winkel (7°) auch bei einem Molekulargewicht von z. B. 1 Mio Dalton noch das gesamte Streulicht erfassen kann und somit ein exaktes Molekulargewicht liefert. Alle anderen Winkel zeigen bereits eine deutliche Abschwächung des Streulichtes.

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Gum Arabic/Gum Acacia

Der 90°-Winkel erfasst bei 1 Mio D lediglich noch ca. 65% des wirklich vorhandenen Streulichtes und würde somit ein deutlich zu geringes Molekulargewicht berechnen.

Verschiedene kommerziell erhältliche Geräte (sog. Multi Angle Light Scattering (MALS) Detektoren) nutzen gerade diese Abschwächung des Streulichtes aus, indem Sie bei mehreren Winkeln gleichzeitig das Streulicht messen und dann auf den Winkel Null extrapolieren. Diese Extrapolation basiert aber auf einem mathematischen Fit der Messdaten und ist daher in jedem Fall mit einer deutlich höheren Unsicherheit und Fehlerrate verbunden als die direkte Messung des Streulichtes bei einem möglichst kleinen Winkel, über den die MALS-Geräte aus optisch-physikalischen Gründen nicht verfügen können.

Strukturbestimmung durch Dreifachdetektion

Zusätzlich zur Molekulargewichtsbestimmung über einen Kleinwinkel-Lichtstreuendetektor (LALS-Detektor) können die Viskositäten der Gum Arabic-Proben in einer GPC/SEC-Messung über einen Vierkapillar-Viskositätsdetektor erfasst werden, wie er z. B. im Viscotek Dreifachdetektor Modell TDA-302 enthalten ist (Abb. 4).



Abb.4: Viscotek Dreifachdetektor Modell TDA-302 mit Kleinwinkel-Lichtstreuendetektor, Viskositätsdetektor, Brechungsindexdetektor und UV-Detektor

Mit diesen Werten kann dann der so genannte Mark-Houwink-Plot erstellt werden (logarithmische Auftragung des Molekulargewichtes gegen die Intrinsic Viskosität; Abb. 5), mit dessen Hilfe eine qualitative und quantitative Strukturbestimmung der Proben möglich ist [5]. Die Steigung des Mark-Houwink-Plots ist ein Maß für die Kompaktheit der gelösten Polymermoleküle. Ein a-Wert von 0,6 – 0,8 ist typisch für ein knäuelartiges Molekül, größere a-Werte weisen auf eine gestreckte, offenkettige Struktur hin, kleinere a-Werte wie z. B. 0,4 -0,5 für Dextrane lassen auf eine kompakte, gegebenenfalls verzweigte Struktur schließen.

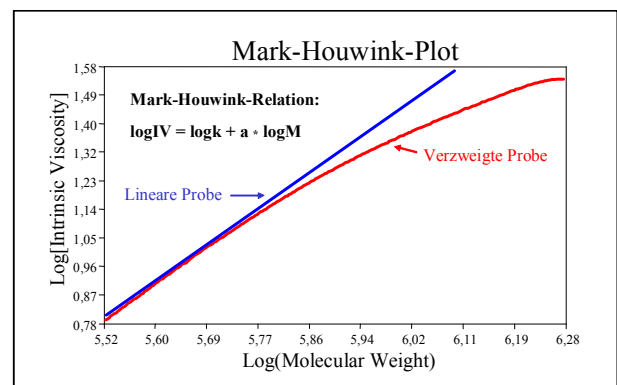


Abb.5: Mark-Houwink-Plot einer verzweigten Gum Arabic-Probe und einer linearen Referenzprobe

Zusammensetzungsanalyse mit RI- und UV-Detektion

Wie bereits dargestellt ist Gum Arabic eine Mischung eines niedermolekularen Polysaccharidanteils und eines höhermolekularen Glycoproteinanteils. Da nur der Glycoproteinanteil eine nennenswerte UV-Aktivität aufweist (der Polysaccharidanteil enthält keine chromophoren Gruppen und ist daher nahezu UV-inaktiv) kann unter Verwendung eines zusätzlichen UV-Detektors in einem gewissen Umfang die Zusammensetzung der Probe ermittelt werden. Das UV-Chromatogramm zeigt spezifisch den Glycoproteinanteil der Probe. Da die Ansprechfaktoren der einzelnen Anteile für den RI-Detektor und den UV-

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Application Note: Gum Arabic/Gum Acacia

Detektor bekannt sind kann nun der Glycoproteinanteil einer Gum Arabic-Probe über der gesamten Molekulargewichtsverteilung der Probe aufgezeigt und quantifiziert werden.

Zusammenfassung

Die Kleinwinkel-Lichtstreuung (LALS) ist die einzige GPC/SEC-Detektionsmethode, die Molekulargewichte von Gum Arabic/Gum Acacia-Proben exakt und ohne jegliche mathematische Extrapolation oder Korrektur der Daten erfassen kann. In Kombination mit einer Viskositätsdetektion kann die GPC/SEC mit LALS neben absoluten Molekulargewichten auch intrinsische Viskositäten, Größen und Strukturinformationen von makromolekularen Proben exakt und reproduzierbar bestimmen. Wird neben einem Brechungsindexdetektor (RI) auch noch ein UV-Detektor verwendet kann auch die Zusammensetzung der aus einem niedermolekularen Polysaccharidanteil und einem höhermolekularen Glycoproteinanteil bestehenden Probe analysiert werden. Damit stellt diese Methode ein wichtiges Werkzeug für die Charakterisierung von Gum Arabic/Gum Acacia sowohl im Bereich der Qualitätskontrolle als auch in der Forschung und Entwicklung dar.

Literatur:

- [1] W.W. Yau, J.J. Kirkland, D.D. Bly: Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, Wiley & Sons, New York (1979)
- [2] S. Mori, H.G. Barth: Size Exclusion Chromatography, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1999)
- [3] G. Heinzmann, R. Walkenhorst: Bestimmung von absoluten Molekulargewichten mittels GPC-Kleinwinkellichtstreuung, GIT Spezial – Separation (2002)
- [4] K.-F. Arndt, G. Müller: Polymercharakterisierung, Carl Hanser Verlag, München, Wien, (1996)
- [5] R. Walkenhorst: Polymercharakterisierung mit 3 Augen, GIT (1998)