

GPC/SEC mit Dreifachdetektion Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 26

GPC-Analytik von komplexen Bio-Polysacchariden

Problemstellung

Seit einiger Zeit betreiben wir eine GPC/SEC-Anlage mit wässrigen Laufmitteln. Untersucht werden überwiegend Proben aus dem Bereich der Bio-Polysaccharide. Einige Proben können unter Standardbedingungen analysiert werden, andere hingegen benötigen sehr spezielle Bedingungen.

Frage

Woher weiß man, welche Bedingungen für die Analyse bestimmter Bio-Polysaccharide notwendig sind?

Lösung

Bei der Substanzklasse der Bio-Polysaccharide handelt es sich um Makromoleküle, die weitestgehend aus derselben Monomereinheit, einem Zuckermolekül mit der Zusammensetzung $C_6H_{12}O_6$, aufgebaut sind. Aufgrund der unterschiedlichen Verknüpfungsart der Zuckermoleküle resultieren aber stark unterschiedliche Endprodukte. Außerdem sind die Endprodukte teilweise chemisch modifiziert und/oder enthalten weitere Bestandteile wie z. B. Proteinanteile. Es resultiert daher eine Substanzklasse die sehr unterschiedliche Anforderungen an die GPC/SEC-Analytik stellt [1].

Vergleichsweise einfach zu analysieren sind neutrale Polysaccharide wie z. B. Dextrane, Pullulane oder Maltodextrine. Hier können Standardbedingungen für die GPC/SEC-Analytik eingesetzt werden, d. h. man arbeitet bei 35°C mit einem Phosphat- oder Nitratpuffer und verwendet z. B. ViscoGel GMPWXL-Trennsäulen.

Anspruchsvoller hingegen sind teilweise geladene Polysaccharide wie z. B. Pektine, Gum Arabic, Chitosane und Hyaluronsäure. Hier sind meist spezielle Pufferbedingungen und ggf. auch spezielle Trennsäulen notwendig. So lösen sich z. B. Chitosane (Abb. 1) nur im sauren Milieu bei einem pH-Wert von weniger als 6,3. Die Hyaluronsäure ist ein sehr kettensteifes Molekül und benötigt daher zur Trennung Säulen mit sehr großen Poren.

Besondere Anforderungen sowohl an die Probenvorbereitung wie auch die GPC/SEC-Analyse stellen sehr hochmolekulare, große Polysaccharide wie z. B. Alginate, Carrageenane, Xanthane und native Stärken. Hier müssen sehr spezielle chromatographische Bedingungen und Trennsäulen verwendet werden. Bei Carrageenanen muss z. B. bei einer Temperatur von mindestens 60°C gearbeitet werden da sich bei niedrigeren Temperaturen Dimere bilden, native Stärken lösen sich nur in Dimethylsulfoxid (DMSO) und müssen auch in diesem Laufmittel analysiert werden. Die Probenvorbereitung für derartige Proben ist schwierig da man einerseits die Proben möglichst vollständig lösen möchte ohne aber die hochmolekularen Anteile bereits vor der Analyse zu zerstören. Die Proben sollten daher weder gerührt noch mit Ultraschall behandelt werden; dies könnte zu Kettenbrüchen führen. Lediglich langsames Schütteln und sanftes Erwärmen ist zulässig. Auch muss bei einer eventuellen Filtration der Probe darauf geachtet werden, dass ein Filter mit hinreichend großen Poren verwendet wird. Es besteht auch immer die Gefahr dass ein Teil der Probe auf der Trennsäule oder deren Eingangsfiler zurückbleibt und somit das Ergebnis der Analyse verfälscht wird.

Die sehr ähnliche chemische Zusammensetzung vieler Bio-Polysaccharide hat aber auch Vorteile. So liegt z. B. das für die Lichtstreuung sehr wichtige Brechungsindexinkrement (dn/dc) für etliche Bio-Polysaccharide bei ca 0,150 ml/g. Somit haben die Bio-Polysaccharide einen recht hohen dn/dc -Wert der auch noch die Analyse von Proben mit geringen Molekulargewichten über die Lichtstreuung ermöglicht.

Schlussfolgerung

Obwohl die Substanzklasse der Bio-Polysaccharide auf einer nahezu identischen chemischen Basis beruht sind die durch unterschiedliche Verknüpfung der Grundeinheit entstandenen Endprodukte sehr verschieden. Daher stellen sie auch sehr unterschiedliche Anforderungen an

GPC/SEC mit Dreifachdetektion Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 26

die GPC/SEC-Analytik. Während neutrale Polysaccharide wie Dextrane und Pullulane unter Standardbedingungen analysiert werden können müssen für teilweise geladene Polysaccharide bereits spezielle Bedingungen verwendet werden. Die größten Anforderungen an die Proben-
vorbereitung und die GPC/SEC-Analytik stellen sehr hochmolekulare, große Polysaccharide wie z. B. Xanthane und native Stärken. Hier muss auf eine besondere Sorgfalt bei der Probenvorbereitung und der Analyse geachtet werden.

Die sehr ähnliche chemische Zusammensetzung der Bio-Polysaccharide hat aber auch den Vorteil dass die dn/dc -Werte dieser Substanzklasse nur geringe Schwankungen aufweisen. Dies vereinfacht die Analyse derartiger Proben mit der Lichtstreuung.

Literatur

[1] E. J. Vandamme, S. De Baets und A. Steinbüchel:
„Biopolymers-Polysaccharides I und Polysaccharides II“,
Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2002

Abbildung 1

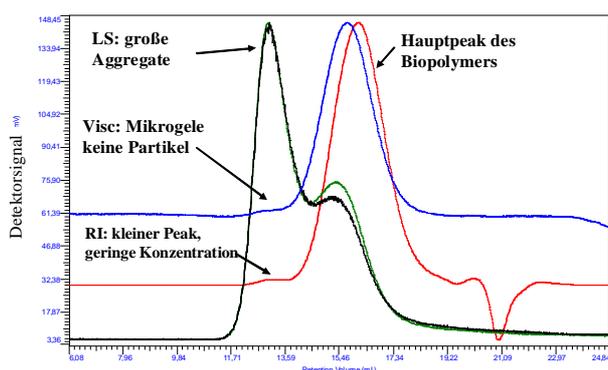


Abb. 1: Dreifachchromatogramm einer Chitosanprobe mit Aggregationen/Mikrogelanteilen

Author: Dr. Gerhard Heinzmann, Viscotek GmbH

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