

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 31

Wie kann der zweite Virialkoeffizient (A_2 -Wert) in der Lichtstreuung mit der GPC/SEC ermittelt werden?

Problemstellung

Wir betreiben eine GPC/SEC-Anlage mit Dreifachdetektion. Wir möchten den zweiten Virialkoeffizienten (A_2 -Wert) in der Lichtstreuung für eine Probe bestimmen. Wie muss man dazu vorgehen?

Frage

Wie kann man den zweiten Virialkoeffizienten (A_2 -Wert) in der Lichtstreuung für eine Probe bestimmen und welche Bedeutung hat dieser Wert?

Lösung

Die der Rayleigh-Lichtstreuung zugrunde liegende Formel sieht folgendermaßen aus:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P_\theta} + 2A_2 c$$

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

R_θ	Rayleigh-Verhältnis beim Streuwinkel θ
M_w	Nach dem Gewicht gemittelttes mittleres Molekulargewicht
P_θ	Streuungsfunktion R_θ/R_0
c	Konzentration
K	Optische Konstante
A_2	Zweiter Virialkoeffizient

Da im Bereich der GPC/SEC meist recht geringe Probenkonzentrationen verwendet werden (typischerweise 1-2 mg/ml) und die Probe durch die Trennsäulen aufgetrennt wird sind die Probenkonzentrationen an

jedem Punkt des Chromatogramms so klein dass Term mit dem zweiten Virialkoeffizienten ($2A_2 \times c$) in aller Regel vernachlässigt wird und nicht in die Berechnungen der Molekulargewichtsverteilung einer Probe eingeht.

In bestimmten Fällen (z. B. bei einer Batch-Auswertung) kann der A_2 -Wert aber durchaus eine nennenswerte Größenordnung annehmen und daher von Interesse sein. Besonders interessant ist dieser Wert im Bereich der Proteinkristallographie. Um gute Aussichten für die Züchtung eines Protein-Einkristalls zu haben, sollte der A_2 -Wert einer Proteinlösung leicht negativ sein da er die Wechselwirkung zwischen den Proteinmolekülen und den umgebenden Lösungsmittelmolekülen beschreibt. Ein positiver A_2 -Wert bedeutet dass sich die Proteinmoleküle gut lösen und keine Tendenz zur Kristallbildung besteht. Ein stark negativer A_2 -Wert hingegen bedeutet, dass die Proteinmoleküle aus der Lösung gedrängt werden und amorph ausfallen. Nur bei einem leicht negativen A_2 -Wert besteht die Tendenz, dass sich ein Proteinkristall bildet da die Proteinmoleküle sich untereinander etwas mehr anziehen als sie von den umgebenden Lösungsmittelmolekülen angezogen werden und sie daher zum langsamen Austritt aus der Lösung neigen.

Der A_2 -Wert kann in der GPC/SEC mit der statischen Lichtstreuung bestimmt werden. Dazu kann man z. B. vier verschiedene Volumina einer Probe aus einem Vial mit einer GPC/SEC-Anlage mit Dreifachdetektion (Lichtstreuung, Viskositätsdetektion und Brechungsindexdetektion) messen oder alternativ dazu vier verschiedene Konzentrationen der Probe und mit der OmniSEC-Software von Viscotek, a Malvern company eine A_2 -Bestimmung durchführen wie in Abbildung 1 gezeigt. Dabei wird die Rayleigh-Lichtstreugleichung von der OmniSEC-Software nach A_2 aufgelöst (Abb. 2) und der A_2 -Wert über die bekannten Probenkonzentrationen iterativ ermittelt.

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 31

Schlussfolgerung

Der zweiten Virialkoeffizient (A_2 -Wert) in der Lichtstreuung ist ein Parameter der für normale GPC/SEC-Analysen nicht von Bedeutung ist da der gesamte zweite Term ($2A_2 \times c$) in der Lichtstreugleichung aufgrund der geringen Konzentrationen und der Auftrennung der Probe vernachlässigbar klein wird. Für bestimmte Analysen wie z.B. Batch-Analysen kann dieser Wert aber durchaus relevante Größenordnungen annehmen. Besonders von Interesse ist der A_2 -Wert für Proteinkristallographen, da er die Wechselwirkung zwischen den Proteinmolekülen und den umgebenden Lösungsmittelmolekülen beschreibt. Nur bei einem leicht negativen A_2 -Wert einer Proteinlösung besteht eine gute Chance dass man Proteinkristalle erhält. Der A_2 -Wert einer makromolekularen Probe kann mit der GPC/SEC mit Lichtstreuung oder Dreifachdetektion einfach ermittelt werden indem entweder verschiedene Volumina oder verschiedene Konzentrationen einer Probe gemessen werden und die Lichtstreugleichung nach A_2 aufgelöst wird. Die OmniSEC-Software kann den A_2 -Wert dann iterativ bestimmen.

Author:

Dr. Gerhard Heinzmann,
Viscotek, a Malvern company

Abb.1: Iterative Bestimmung des A_2 -Wertes einer Polystyrolprobe mit der OmniSEC-GPC/SEC-Software von Viscotek, a Malvern company

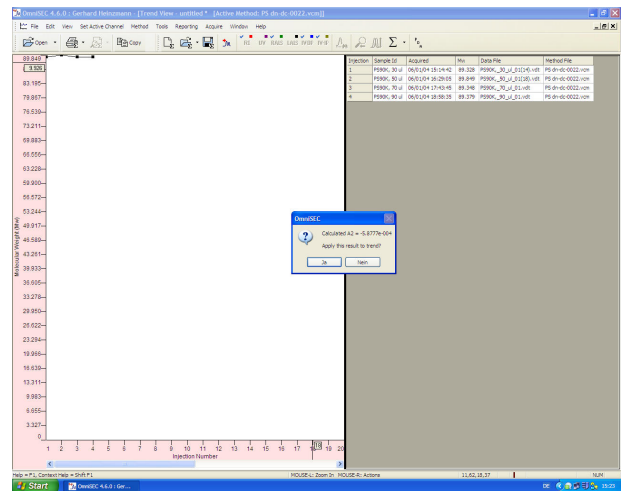


Abb.2: Graphische Auftragung des A_2 -Wertes

