

Trägheitsradius, Hydrodynamischer Radius und Viskositätsradius: Wie groß ist ein Makromolekül in Lösung?

Dr. Gerhard Heinzmann

Wenn Makromoleküle charakterisiert werden dann sind die primären Messgrößen das mittlere Molekulargewicht der Probe und die Verteilung der Molekulargewichte.

Neben dem Molekulargewicht ist aber auch die Größe von Makromolekülen ein wichtiger Faktor z. B. in Bezug auf Diffusionseffekte und Membranfiltrationen. Es gibt verschiedene Werte, die die Größe eines Makromoleküls in Lösung beschreiben: den Trägheitsradius, den Hydrodynamischen Radius und den Viskositätsradius. Je nach verwendeter Messmethode können für alle diese Werte auch verschiedene Mittelwerte wie z. B. Zahlen- Gewichts- und Zentrifugenmittelwerte (R_n , R_w und R_z) aufgeführt werden.

Es stehen verschiedene Messmethoden zur Verfügung mit denen man die Radien von Makromolekülen bestimmen kann: Statische Mehrwinkel-Lichtstreuung, Dynamische Lichtstreuung und die Gelpermeationschromatographie mit einer Kombination aus Viskositätsdetektion, statischer Mehrwinkel-Lichtstreuung und Brechungsindexdetektion.

Definition und Bestimmung des Trägheitsradius, des hydrodynamischen Radius und des Viskositätsradius

Zur Beschreibung der Größe eines Makromoleküls in Lösung werden verschiedene Radienangaben verwendet. Die Radien werden folgendermaßen definiert:

Trägheitsradius R_g

In der Polymerphysik ist der Trägheitsradius (auch Gyrationradius) R_g ähnlich definiert wie das Trägheitsmoment (Abbildung 1).

Besteht ein Makromolekül aus N gleichartigen Bausteinen mit Ortsvektoren r_1 bis r_N , dann ist das Quadrat des Trägheitsradius R_g definiert als der mittlere quadratische Abstand der Bausteine zum Schwerpunkt des Makromoleküls r_s (Gleichung 1).

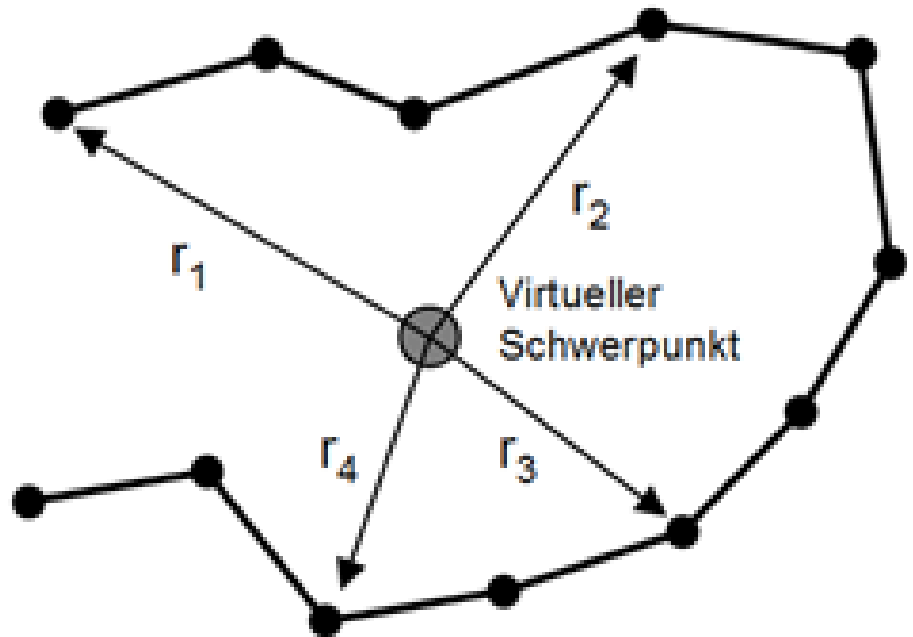


Abb. 1: Schematische Darstellung der Berechnung des Trägheitsradius eines Makromoleküls

$$R_g^2 \stackrel{\text{def}}{=} \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\vec{r}_i - \vec{r}_s|^2$$

[1]

Hydrodynamischer Radius R_H

Der hydrodynamische Radius R_H ist der Radius einer hypothetischen festen Kugel, die in einem Lösungsmittel dieselben Diffusionseigenschaften besitzt wie das durch den hydrodynamischen Radius beschriebene Makromolekül; er wird über die Stokes-Einstein-Gleichung definiert (Gleichung 2).

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

[2]

k_B = Boltzmann-Konstante

T = Temperatur

η = Viskosität des Lösungsmittels

D = Diffusionskoeffizient

Viskositätsradius R_η :

Der Viskositätsradius R_η wird definiert über die Intrinsische Viskosität $[\eta]$ einer makromolekularen Probe und deren Molekulargewicht M_w (Gleichung 3). Er ist dem hydrodynamischen Radius sehr ähnlich und wird im Bereich der Makromolekularen Chemie eher seltener verwendet.

$$R_\eta = \left(\frac{3[\eta] \cdot M_w}{10\pi \cdot N_A} \right)^{1/3} \cdot 10^7$$

[3]

N_A = Avogadro-Zahl

$[\eta]$ = Intrinsische Viskosität der Probe

M_w = nach dem Gewicht gemittelttes Molekulargewicht der Probe

Messverfahren zur Bestimmung der Radien eines Makromoleküls in Lösung

Die verschiedenen Radien eines Makromoleküls können mit unterschiedlichen Messverfahren bestimmt werden: Mit der stati-

schen Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS = Multi Angle Light Scattering) kann aus der Winkelabhängigkeit des von der Probe gestreuten Lichts direkt der Trägheitsradius einer makromolekularen Probe bestimmt werden. Dazu wird das Streulichtsignal, das bei den verschiedenen Winkeln gemessen wird, über den Winkeln aufgetragen und die Streulichtintensität auf Null extrapoliert. Aus der Anfangssteigung dieser Funktion kann dann direkt der Trägheitsradius der Probe bestimmt werden (Abbildung 2).

Mit der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann direkt der hydrodynamische Radius einer makromolekularen Probe bestimmt werden. Im Fall der Dynamischen Lichtstreuung wird die Brown'sche Molekularbewegung der Makromoleküle in Lösung gemessen. Die in sehr kurzen Abständen erfassten Messdaten werden korreliert und aus der Korrelationsfunktion resultiert zunächst der Diffusionskoeffizient der Probe aus dem dann nach der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung [2]) der hydrodynamische Radius des Makromoleküls berechnet werden kann. Zur Messung des hydrodynamischen Radius mit der DLS sind keine Informationen über die Probe notwendig; es muss lediglich die Viskosität des Lösungsmittels sowie dessen Brechungsindex bekannt sein. Außerdem muss ein DLS-Instrument nicht kalibriert werden wodurch diese Technik für den Anwender sehr einfach zu handhaben ist.

Wird in der Gelpermeationschromatographie (GPC/SEC) ein Viskositätsdetektor zusammen mit einem Brechungsindexdetektor und einem MALS-Detektor verwendet (so genannte GPC/SEC mit Dreifachdetektion) dann können sowohl der Trägheitsradius, der hydrodynamische Radius wie auch der Viskositätsradius einer Probe bestimmt werden. Der Trägheitsradius R_g kann dabei einerseits wiederum direkt aus der Winkelabhängigkeit des MALS-Detektorsignals bestimmt werden, er kann aber auch aus dem Produkt aus Molekulargewicht M_w und Intrinsic Viskosität $[\eta]$ der Probe berechnet werden. Dazu wird die Flory-Fox-Gleichung zugrunde gelegt (Gleichung 4):

$$[\eta] \cdot M = 6^{3/2} \cdot \phi \cdot R_g^3 \quad [4]$$

Der hydrodynamische Radius R_H einer Probe kann ebenfalls nach der Flory-Fox-Gleichung aus dem Produkt aus Molekulargewicht und Intrinsic Viskosität der Probe berechnet werden. Ausgehend von der bereits erwähnten Beziehung zwischen der Intrinsic Viskosität $[\eta]$ und der Dichte ρ eines Makromoleküls:

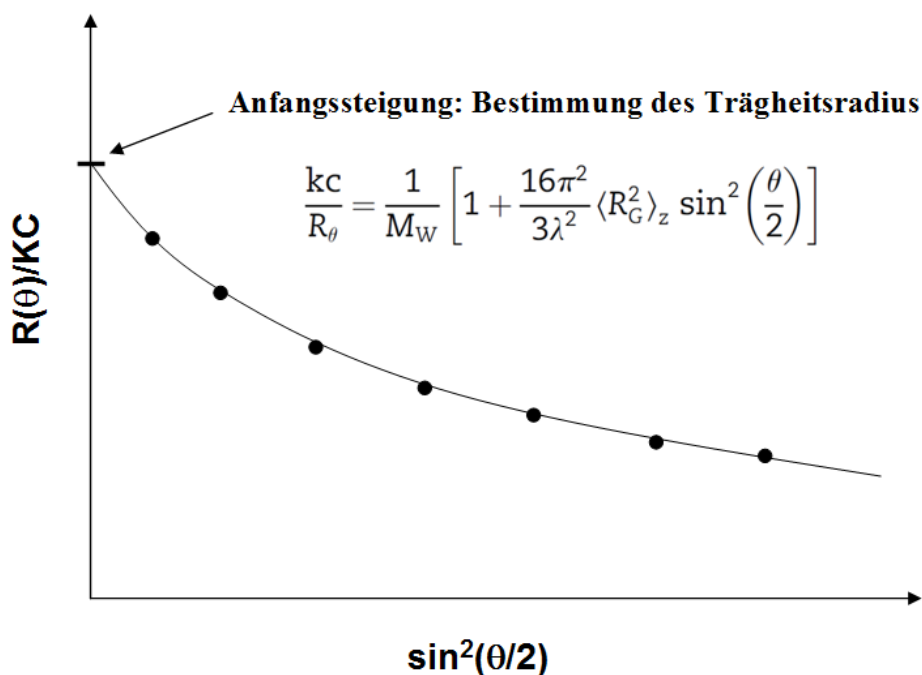


Abb. 2: Auftragung von $R(\theta)/KC$ über $\sin^2(\theta/2)$ zur Bestimmung des Trägheitsradius mit der statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS)

$$[\eta] = 6^{3/2} \cdot \phi_0 \cdot \frac{4\pi}{3} \cdot \frac{3R_G^3}{4\pi M} = \frac{1,67}{\rho}$$

kann nun folgende Beziehung für ein statistisches Polymerknäuel hergeleitet werden (da gilt: $\rho = M/V_h$):

$$[\eta] = \frac{1,67 \cdot V_h}{M}$$

V_h = hydrodynamisches Volumen

Und daraus wiederum:

$$[\eta] \cdot M = 1,67 \cdot \frac{4}{3} \pi \cdot R_H^3$$

Aus dieser Gleichung geht hervor dass die dritte Potenz des hydrodynamischen Radius proportional ist zu dem Produkt aus dem Molekulargewicht und der Intrinsic Viskosität einer Probe.

Misst man daher in der GPC/SEC mit Hilfe eines Viskositätsdetektors und eines MALS-Detektors die Intrinsic Viskosität und das Molekulargewicht einer Probe dann kann aus dem Produkt der beiden Größen nach der Flory-Fox-Gleichung sowohl der hydrodynamische Radius der Probe wie auch deren Trägheitsradius bestimmt werden. Es ist allerdings wichtig zu wissen dass die Flory-Fox-Gleichung mit der Konstante von $2,86 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ streng genommen nur für statistische Knäuelpolymere gültig ist.

Einen physikalisch exakten Wert für den Trägheitsradius erhält man hingegen wenn man ihn aus der Steigung der Winkelabhängigkeit des Streulichtsignals im MALS-

Detektor ermittelt. Der MALS-Detektor kann aber nur die Radien von Proben mit einem Radius von ca. >10nm messen (minimaler Durchmesser der Probe ca. 1/20 der Laserwellenlänge des MALS-Detektors) da unterhalb dieses Wertes die Streulichtverteilung isotrop ist und somit keine auswertbare Anfangssteigung der Winkelabhängigkeit vorhanden ist. Der Trägheitsradius von Proben mit einem Radius von <10nm kann daher nur über die Kombination Viscometer/MALS nach der Flory-Fox-Gleichung bestimmt werden.

Die Flory-Fox-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der dritten Potenz des Trägheitsradius (R_g^3) einer Probe und dem Produkt aus der Intrinsic Viskosität $[\eta]$ und dem nach dem Gewicht gemittelten Molekulargewicht M_w der Probe. ϕ ist die Flory-Fox-Konstante, für ein statistisches Polymerknäuel ist ihr Wert $2,86 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

Weiterhin kann anhand der Flory-Fox-Gleichung die reziproke Relation der Intrinsic Viskosität $[\eta]$ und der Dichte ρ eines Makromoleküls hergeleitet werden:

$$[\eta] = 6^{3/2} \cdot \phi_0 \cdot \frac{4\pi}{3} \cdot \frac{3R_G^3}{4\pi M} = \frac{1,67}{\rho}$$

Diese Beziehung ist die Grundlage für das Prinzip der **Universellen Kalibrierung in der GPC/SEC**.

Fazit

Die Größe eines Makromoleküls in Lösung kann durch verschiedene Werte beschrieben werden: den Trägheitsradius R_g , den hydrodynamischen Radius R_H und den Viskositätsradius R_η . Diese Werte können je nach Art der Probe stark voneinander abweichen. Bei einem typischen Polymermolekül in Lösung, z.B. einem Polystyrolmolekül, das in Tetrahydrofuran (THF) gelöst ist, ist der Trägheitsradius deutlich größer als der hydrodynamische Radius, da das Polymermolekül eine offene, vom Lösungsmittel durchspülte Struktur aufweist. Bei einem in Wasser gelösten Protein hingegen sind beide Radien sehr ähnlich, da das Proteinmolekül eine sehr kompakte und dichte Struktur besitzt. Nahezu gleich sind die Radien z. B. bei einem Liposom, da sich hier die gesamte molekulare Masse quasi auf einer Kugelschale mit definiertem Abstand zum Zentrum des Schwerpunktes des Moleküls befindet.

Zur Bestimmung der Radien müssen geeignete Methoden verwendet werden; statische Mehrwinkel-Lichtstreuung zur Bestimmung des Trägheitsradius, Dynamische Lichtstreuung zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius und GPC/SEC mit Dreifachdetektion zur Bestimmung aller drei genannten Radien.

Mit der GPC/SEC mit Dreifachdetektion können sowohl die Intrinsicische Viskosität $[\eta]$ als auch das Molekulargewicht M_w einer Probe bestimmt werden. Aus dem Produkt der Intrinsicischen Viskosität und dem Molekulargewicht einer Probe können neben dem Viskositätsradius R_η ebenfalls der Trägheitsradius R_g und der hydrodynamische Radius R_H einer Probe bestimmt werden.

Allerdings beruhen diese Berechnungen auf der Flory-Fox-Gleichung die streng genommen nur für Makromoleküle gilt die in Lösung als statistische Knäuelpolymere vorliegen.

Werden Polymerproben gemessen die stark von der Form eines statistischen Knäuelpolymeres abweichen wie z. B. Hyaluronsäure die eine sehr gestreckte, offene Form aufweist oder DNA welche eine nahezu stäbchenförmige Molekülform besitzt dann ist die Bestimmung des Trägheitsradius über die Flory-Fox-Gleichung nicht mehr zuverlässig. Bei diesen Proben muss der Trägheitsradius über die Anfangssteigung der Winkelabhängigkeit des Streulichtsignals im MALS-Detektor ermittelt werden.