

Untersuchung von Biopolymeren mit GPC-Viskosimetrie



Daniela Held

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) hat sich als Methode zur Charakterisierung von Polymeren und Biopolymeren etabliert. Mittels GPC lassen sich für viele unterschiedliche Produkte die Molmassenmittelwerte (z.B. M_w und M_n) sowie die gesamte Molekulargewichtsverteilung (MGV) schnell und sicher ermitteln. GPC ist jedoch eine Relativmethode. Um die Molmassen zu bestimmen benötigt man Kalibrierstandards, die zu den eigenen Produkten passen. Sind Kalibriersubstanzen und untersuchte Proben chemisch und/oder strukturell unterschiedlich dann bestimmt man mit GPC die apparenten Molmassen, nämlich Molmassen bezogen auf die verwendeten Kalibrierstandards. Für viele Applikationen reicht dieser Ansatz völlig aus. Sollen hingegen Produkte charakterisiert werden, die sich durch Verzweigungsgrad oder chemische Zusammensetzung unterscheiden reicht die konventionelle GPC-Analytik nicht mehr aus.



Abb. 1: On-line Viskosimeter Eta1001

Ein interessantes Beispiel für den oben beschriebenen Fall sind Pektine. Pektine sind hochmolekulare Pflanzenstoffe, die in Blättern, Wurzeln und Früchten vorkommen. Sie bestehen aus 1,4- α -glykosidisch verknüpften Galakturonsäure-Einheiten, die zum Teil mit Methanol verestert sind. Je nach Veresterungsgrad unterscheidet man zwischen hochveresterten (>50%) und niedrigveresterten (<50%) Pektinen. Die Molmassen der unterschiedlichen Pektine liegen in einem weiten Bereich zwischen 10.000 und 500.000 D. Die Struktur der Pektine ist abhängig vom Polymerisationsgrad der wiederum die Viskosität der Lösungen,

und das Gelbildungsverhalten beeinflusst. Hauptanwendungsgebiet der Pektine ist in der Lebensmittelindustrie (z.B. als Verdickungsmittel), aber auch in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie [1]. Geeignete Standards zur Kalibration der eigenen GPC-Anlage sind für Pektine nicht kommerziell erhältlich. Um dennoch exakte Molekulargewichtsmittelwerte zu bestimmen, werden häufig online Viskosimeter (Abb. 1) eingesetzt. Anders als bei den (Konzentrations)-Detektoren wie Brechungsindex (RI)- oder UV-Detektor ist hier die Signalintensität nicht nur abhängig von der Konzentration, sondern auch von der Molmasse der eluierenden Probe.

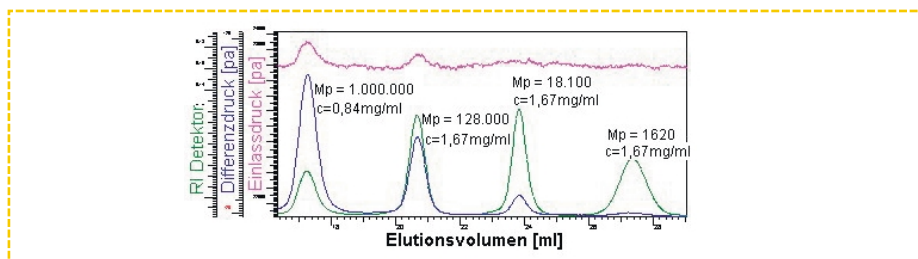


Abb. 2: Detektorsignale für PS ReadyCal rot, eine Mischung aus 4 engverteilten Polystyrol-Standards. Der niedrigste Standard ($M_p=1620$ D) wird trotz der geringen (GPC-typischen) Konzentration noch vom Viskosimeter detektiert.

Funktionsweise und Übersicht von on-line Viskosimetern

Neben dem on-line Viskosimeter benötigt man alle weiteren Komponenten einer GPC-Anlage, d.h. eine isokratische Pumpe mit hoher Flusskonstanz, ein Probenaufgabeventil oder einen Autosampler, eine oder mehrere geeignete Trennsäulen sowie einen Konzentrationsdetektor (z.B. einen RI-Detektor). Beim Arbeiten in wässrigen Medien ist zusätzlich ein Degasser empfehlenswert. Das on-line Viskosimeter wird dabei als weiterer Detektor in die GPC-Anlage integriert. Prinzipiell unterscheidet man zwischen Ein-, Zwei- und Vier-Kapillar-Viskosimetern. Einkapillar-Viskosimeter sind aufgrund ihrer geringen Empfindlichkeit und experimentellen Schwierigkeiten (Lasec-Effekt [2]) im allgemeinen für den Einsatz in der GPC ungeeignet. Benötigt man eine gute Auflösung oder hat man eher niedermolekulare oder niedrigviskose Produkte, dann sind Vier-Kapillarviskosimeter besser geeignet. Bei diesen Viskosimetern wird die Polymerlösung nach dem Eintritt in das Gerät geteilt und durch zwei unterschiedliche Stränge (für Polymerlösung und Lösungsmittel) weitergeleitet. Die Polymerlösung im Probenstrang läuft ungehindert durch, während die Polymerlösung im Lö-

sungsmittelstrang auf Konzentration ≈ 0 verdünnt oder zeitverzögert weitergegeben wird. Der Druckunterschied zwischen dem Lösungsmittelstrang und dem Strang für die Polymerlösung (Differenzdruck) und der Druckunterschied entlang des kompletten Systems (Einlassdruck) sind dabei die relevanten Messgrößen aus denen man die spezifische Viskosität und daraus die intrinsische Viskosität $[\eta]$ ermittelt. Bereits 1985 wurde von Vierkapillar-Viskosimeter berichtet [3] die mit einem ausgeglichenen Fluss in beiden Kapillarsträngen arbeiteten. Neu entwickelte Systeme mit einem asymmetrischen Split-Design haben den besonderen Vorteil, dass der größte Teil der Polymerlösung nicht verdünnt und damit auch wirklich detektiert werden kann [4]. Die Signalstärke und somit das Signal/Rauschverhältnis werden erhöht was letztendlich zu einer deutlich verbesserten Analyse führt.

Abbildung 2 zeigt die beiden Druck-Signale sowie das Konzentrationssignal (RI-Detektor) erhalten mit einem Eta 1001 mit asymmetrischem Split-Design und einen Agilent HP 1100 RI für eine Mischung aus 4 Polystyrolstandards unterschiedlicher Molmasse (PSS PS ReadyCal rot). Dabei entspricht das Einlassdrucksignal vom Prinzip und von der

Auflösung in etwa dem Signal, das bei einem Einkapillar-Viskosimeter zu erwarten ist. Man erkennt im Vergleich deutlich die bessere Sensitivität des Differenzdruck-Signals, sowie das bessere Signal-Rausch Verhältnis. Ebenfalls zu sehen ist, dass sich der Einlassdruck beim Eluieren der Probe, gerade bei hochmolekularen Proben, verändert. Geräte, die den Einlassdruck nicht on-line messen, sondern als festen Wert vorgegeben haben, sind deshalb nicht sinnvoll einsetzbar und deshalb bereits aus dem Markt verschwunden.

An diesem Beispiel kann man gut erkennen wie empfindlich ein Viskosimeter der neueren Generation auch im niedermolekularen Bereich sein kann. Obwohl bei Konzentration und Injektvolumen konventionelle GPC-Bedingungen beibehalten wurden sieht man noch den niedermolekularen Standard mit 1620 g/mol (Konzentration: 1,68 mg/ml, Injektvolumen von 100 μ l, PSS SDV linear M Säulensatz aus insgesamt drei Säulen). Die hohe Sensitivität wird durch den asymmetrischen Split erreicht. Zudem werden bei diesem Viskosimeter qualitativ sehr hochwertige Hastelloy-Druckaufnehmer verwendet, die sich durch ein besonders niedriges Signal-Rausch Verhältnis sowie durch deutlich

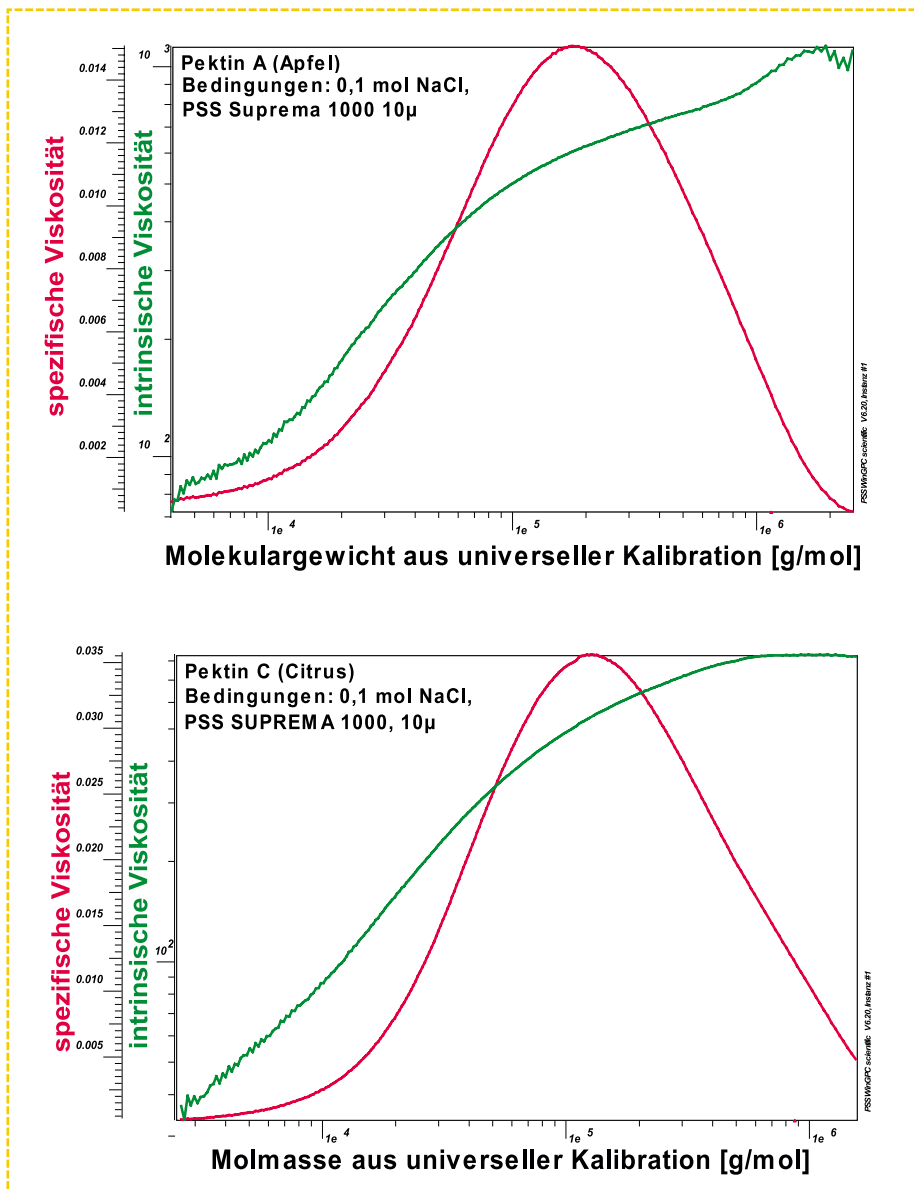


Abb. 3: Mark-Houwink Plots von Pektin A aus Apfelpektinextrakt (a) und Pektin C aus verschiedenen Citrusarten (b)

verbesserte Stabilität auch in aggressiven oder salzhaltigen Lösungsmitteln auszeichnen.

Informationen aus on-line Viskositätsmessungen

Wie schon oben diskutiert erhält man bei Viskositätsmessungen als Ergebnis die intrinsische Viskosität, und zwar neben dem Wert für die gesamte Probe auch die intrinsische Viskosität für jedes Elutionsvolumen, und damit (bei erfolgreicher Trennung auf den GPC-Säulen) auch für jedes Molekulargewicht. Somit erhält man keine apparenten Molekulargewichte wie in der konventionellen GPC üblich sondern man kann eine Auswertung mit einer universellen Kalibrierkurve durchführen. Dieses Prinzip wurde bereits 1966 von Benoît et. al beschrieben [5]. Unabhängig von der Wahl der verwendeten Standards, d.h. unab-

hängig von der Chemie oder der Struktur, ergibt sich immer dieselbe universelle Kalibrierkurve. Zusätzlich zu den Molekulargewichtsmittelwerten erhält man aus einer GPC-Viskositätsmessung von Proben mit einer breiten MGW einen Mark-Houwink Plot, dem man Informationen über die Struktur der Probe in Lösung bzw. die Strukturänderung mit dem Molekulargewicht entnehmen kann.

Tabelle 1 zeigt die Primär- und Sekundärinformationen sowie die notwendigen Voraussetzungen für GPC und GPC-Viskositätsmessungen. Zum besseren Vergleich der Methoden wurden hier zusätzlich noch die Informationen und Voraussetzungen für GPC-Lichtstreuung aufgelistet. Tabelle 2 zeigt die Molmassen, die man zum einen aus einer konventionellen GPC-Analyse mit einer Pullulankalibrierkurve erhält, zum anderen die Molmassen aus der GPC-Viskositätskopplung sowie die Zusatzinfor-

mationen aus der Viskositätsmessung. Deutlich zu erkennen ist, dass die Pullulan-Standards zwar den Trend richtig beschreiben (Pektin A hat eine höhere Molmasse als Pektin C), die erhaltenen Molmassen aber viel zu hoch sind.

Erst unter Verwendung der universellen Kalibrierkurve erhält man realistische Molmassen im erwarteten Bereich. Gegenüber einer GPC-Lichtstreuung hat man hier den Vorteil, dass man das Brechungsindexinkrement (dn/dc) für die Lichtstreuung nicht kennen muss. Dieses ändert sich unter anderem auch mit der Zusammensetzung, so dass für Copolymere wie Pektine, die Analyse schwierig ist. Neben den Molekulargewichtsmittelwerten erhält man auch noch die intrinsischen Viskositäten der beiden Pektine sowie die Mark-Houwink Auftragungen. Auch diese Ergebnisse sind gut geeignet, um beide Proben zu unterscheiden. Abbildung 3 zeigt die Mark-Houwink Plots der beiden Pektine (3a: Pektin A aus Apfelpektinextrakt, 3b: Pektin C aus verschiedenen Citrusarten). Die Molekulargewichte (x-Achse) wurden aus der universellen Kalibrierkurve erhalten. Messbedingungen: Agilent HP 1100 System (isokrat. Pumpe, Autosampler, RI-Detektor), ETA1001 Viskositätsdetektor, PSS WinGPC-Software mit Viskositätsauswertung, PSS Suprema 10 µ Säulen.

Generell gilt: Je kompakter die Struktur, desto niedriger ist die intrinsische Viskosität für ein definiertes Molekulargewicht. Ursache für eine kompaktere Struktur können sowohl Verzweigungen als auch flexiblere Kettensegmente sein. Der Mark-Houwink Koeffizient $\alpha=0$ für kompakte Kugeln und $\alpha=2$ für steife Stäbchen. Für flexible Polymerknäuel erwartet man Werte im Bereich $0,5 < \alpha < 0,8$. Ändert sich α mit dem Molekulargewicht, so spricht das für eine Strukturänderung mit dem Molekulargewicht innerhalb der Probe.

Fazit

GPC-Messungen mit on-line Viskositätsdetektoren sind ein geeignetes Verfahren, um Biopolymere wie zum Beispiel Pektine zu charakterisieren. Sie können sehr gut bei Makromolekülen eingesetzt werden, für die keine geeigneten Kalibrierstandards vorhanden sind. Neben Copolymeren lassen sich auch verzweigte Polymere mit on-line Viskosimetern gut untersuchen. Zeigen die Proben keine extrem hohe Viskosität (wie bei der GPC, bedingt durch die hohe Verdünnung üblich), dann ist ein 4-Kapillar-Viskosimeter den Ein- und Zweikapillar-Viskosimetern deutlich überlegen. Bei der Auswahl des

Tab. 1: Vergleich Informationen aus GPC, GPC-Viskositätsmessungen und GPC-Lichtstreuungen

Methode	Primärinformation	Sekundärinformation	Notwendige Voraussetzungen
GPC	-	Molekulargewichts-Verteilung	Konventionelle Kalibrierkurve, Standards sollten chemisch/strukturell gleich sein
GPC-Viskosimetrie	Intrinsische Viskosität, Viskositätsverteilung	Molekulargewichts-Verteilung, Verzweigungsinformationen, Strukturinformationen, Mn für Copolymere	Universelle Kalibrierkurve
GPC-Lichtstreuung	Molekulargewichtsverteilung	Verzweigungsinformationen,* Strukturinformationen*	dn/dc bekannt und konstant über die Probe**

* nur bei Mehrwinkellichtstreuung

** Zur Problematik der dn/dc-Bestimmung für Copolymere und für Polymere in Mischlösungsmitteln vergleiche Literaturstelle [6]

Tab. 2: Molekulargewichtsmittelwerte und Zusatzergebnisse für Pektin A und Pektin C.

Probe	Pullulan Kalibration		GPC-Viskosimetrie		Zusatzergebnisse Viskosimetrie	
	M _w [D]	M _n [D]	M _w [D]	M _n [D]	[η] [cm ³ /g]	MH-α
Pektin A*	688.000	189.000	150.000	30.400	424,2	0,484
Pektin C**	595.000	144.000	130.000	25.400	382,1	0,552

* kommerziell erhältlich, aus Apfelpektinextrakt, keine Angabe über den Veresterungsgrad

** kommerziell erhältlich, aus verschiedenen Citrusarten, Veresterungsgrad 67–71%

entsprechenden Gerätes sollte man auf eine solide und stabile Bauweise achten. Besonders wichtig sind hier die Druckaufnehmer. Diese sollten stabil auch gegenüber aggressiven Lösungsmitteln sein und keine Hysterese aufweisen.

Noch anzumerken ist, dass eine GPC-Viskosimetrie Messung immer noch eine GPC-Messung ist. Das bedeutet: wenn man die Möglichkeiten eines Viskosimeters voll ausschöpfen möchte, muss die Chromatographie sauber und wechsel-

wirkungsfrei laufen. Nur bei Verwendung geeigneter Trennsäulen können alle möglichen Informationen genutzt werden.

Literatur

- [1] Ebert, G.: Biopolymere, Teubner Studienbücher, 1993, 357 ff.
- [2] Yau, W.; Jackson, C.; Barth, H.; Haney, M.: „The Lescq effect: is it limited to single-capillary viscometers“, Waters Int. GPC Symposium, 1991
- [3] Haney, M.: J. Appl. Polymer Sci. 30, 753, (1985)
- [4] EU-Patent, Patent-Nummer: EU 200 101 110 629, 1991, WEG Dr. Bures GmbH & Co KG, Dr. K.-D. Bures
- [5] Benoît, H.; Grubisic, Z.; Rempp, P.; Decker, D.; Zilliox, J. G.: J. Chem. Phys. 63, 1507 (1966)
- [6] Kratochvil, P.: Classical Light Scattering from Polymer Solutions, Elsevier Sci. Publ. B.V., 1987, 187 ff.

Die Autorin

Dr. Daniela Held

PSS Polymer Standards Service GmbH
In der Dalheimer Wiese 5
55120 Mainz
Fax: 06131/96239-11
dheld@polymer.de
www.polymer.de