

Strukturviskosität von verdünnten Lösungen von Biopolymeren

Von

E. Gruber und J. Schurz*

Aus dem Institut für Makromolekulare Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt und dem Sonderforschungsbereich 41, Chemie und Physik der Makromoleküle, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland

Mit 8 Abbildungen

(Eingegangen am 5. April 1974)

Structural Viscosity of Dilute Solutions of Biopolymers

The importance of the rheological behaviour of solutions of macromolecules is briefly evaluated. The viscosity of the solutions depends on concentration, shear rate and time of shear, this relation being determined by the structure of the dissolved molecules. In dilute solutions shear dependence of viscosity is very frequently caused by the preferential orientation of anisotropic molecules. In such a case the particle dimensions can be calculated from the true limiting viscosity number, an anisotropy factor, the rotational diffusion constant and the effective particle density. These numbers can be derived from the flow curve, which has been extrapolated to zero concentration. It is necessary to measure the flow curve at shear gradients, which are sufficiently low to allow for an extrapolation to vanishing shear rate. By comparing the experimental flow curve with a choice of theoretical ones, the rotational diffusion constant and the anisotropy factor (axial ratio) can be found. From the limiting viscosity number and the axial ratio, the particle density can be calculated.

Einleitung

Makromoleküle spielen in der Biologie eine Hauptrolle. Sie bauen die Gewebe auf, sie speichern die Bau- und Arbeitspläne, sie transportieren Rohmaterialien und Stoffwechselprodukte und sie speichern Energie. Für den Organismus sind sie Baustoff, Werkzeug, Datenbank und Energiequelle. Drei Eigenschaften, die nur Makromoleküle besitzen, haben ihnen diese Bedeutung verliehen. Erstens ihre Größe, die sie als Strukturbildner qualifiziert, zweitens ihre ungeheure Mannig-

* Neue Anschrift: Institut für Physikalische Chemie der Universität Graz.

faltigkeit der Funktionalität, wodurch sie zu Informationsträgern und zu molekularen Werkzeugen werden können, und drittens ihr geringer osmotischer Druck in Lösung, der den Organismus vor dem osmotischen Kollaps bewahren kann.

Auf der Passivseite steht ein wesentlicher Nachteil dieser großvolumigen Teilchen: sie können nicht problemlos in Lösung transpor-

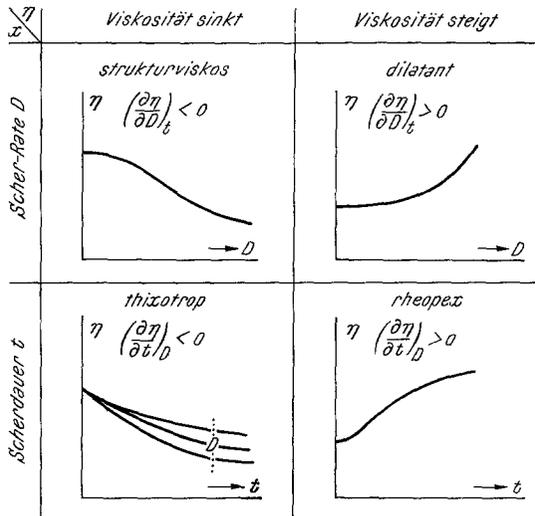


Abb. 1. Übersicht über Nicht-Newton'sches Fließverhalten von Lösungen

tiert werden. Auf kurze Strecken bewegen sich die Moleküle in der weitestgehend ruhenden Zellflüssigkeit bzw. in der interstitialen Flüssigkeit durch Diffusion. Diese langsame Diffusion der voluminösen Gebilde ist, biologisch betrachtet, allerdings sogar ein Vorteil, weil dadurch die anschließenden Reaktionen leichter reversibel, also mit optimaler Energieausnutzung, geführt werden können.

Beim Umpumpen der gesamten Lösungen macht sich dagegen die Viskositäts-erhöhung durch die gelösten Makromoleküle störend bemerkbar, weil durch sie Energie verbraucht wird. Auf der anderen Seite ist die Viskositäts-erhöhung auch mitunter erwünscht, z. B. an manchen Stellen des Blutkreislaufes, wo durch Erniedrigung der Reynolds-Zahl R_e unter den kritischen Wert

$$\left(R_e = \frac{r \bar{v} \rho}{\eta} < 1000-1200 \right)$$

verhindert wird, daß die Blutströmung turbulent wird.

Strukturviskosität makromolekularer Lösungen

Die rheologischen Eigenschaften (Viskosität und Elastizität) eines Systems sind abhängig von den Variablen Zusammensetzung, Druck, Temperatur, Deformationsgeschwindigkeit (Scherrate) und Deformationsdauer. Die Änderung der Viskosität mit Scherrate D und Scherdauer t wird mit eigenen Namen bezeichnet, die in folgendem Schema

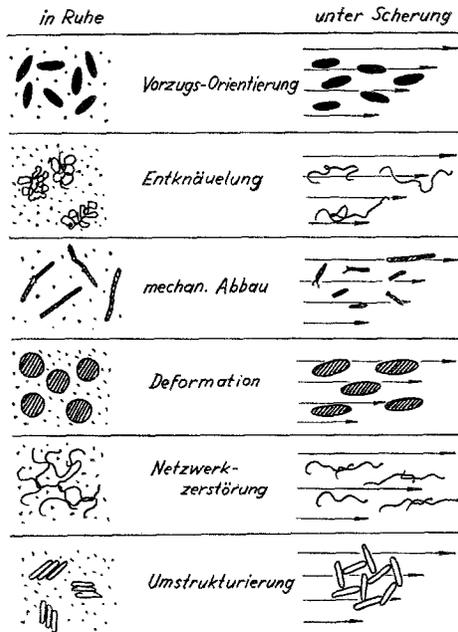


Abb. 2. Strukturrheologische Vorstellungen zur Erklärung der Scherabhängigkeit der Viskosität

(Abb. 1) zusammengestellt sind. Während die Viskosität von Lösungen niedermolekularer Verbindungen im allgemeinen nicht von der Scherrate und der Scherdauer abhängig ist (*Newtonsches* Fließverhalten), können in Lösungen von Makromolekülen Fließeigenschaften der oben gezeigten Art auftreten. Durch das Fließen können die gelösten Moleküle ausgerichtet oder deformiert, mitunter sogar zerstört werden, gleichzeitig können in der Lösung Überstrukturen ab- oder auch aufgebaut werden.

Abb. 2 zeigt die häufigsten Gründe für eine Viskositätsänderung. Vorzugsorientierung anisotroper Teilchen führt zu einer Viskositätsniedrigung der Lösung. Dieser Mechanismus ist vorwiegend für die

Strukturviskosität verdünnter Lösungen verantwortlich. Knäuelmoleküle können durch Scherung teilweise entknäuelte werden. Das führt eigentlich zu einer Viskositäts-erhöhung, die aber meist durch eine parallelgehende Vorzugsorientierung kompensiert wird. Sehr große Moleküle können durch starke Scherkräfte echt gespalten werden; ein solcher Abbau führt zu einer irreversiblen Erniedrigung der Viskosität. In konzentrierten Lösungen großvolumiger Teilchen ist die Viskosität besonders groß, Deformation und Vorzugsorientierung der Moleküle führt in einem solchen Fall zu stark strukturviskosen Eigenschaften der Lösung. Wird eine Netzwerklösung — ein sehr häufiger Lösungstyp in konzentrierten Polymersystemen — geschert, kommt es zur Zerstörung des Netzwerks und damit ebenfalls zu einem Abfall der Viskosität. Umstrukturierungsvorgänge im Verlaufe der Scherung können aber auch zur Bildung von sehr sperrigen Gebilden in der Lösung führen und damit die Viskosität erhöhen.

Betrachtet man diese Mechanismen, sieht man unmittelbar, daß sich am Beginn der Scherung die Viskosität in allen diesen Fällen ändern muß; manchmal stellt sich sehr schnell ein Fließgleichgewicht ein, manchmal wird überhaupt nie ein Fließgleichgewicht erreicht. Es hängt von der Einstellgeschwindigkeit des Fließgleichgewichts ab, ob die Zeitabhängigkeit während einer Messung in Erscheinung tritt oder nicht.

Um eine Substanz gut strukturrheologisch charakterisieren zu können, sollte man deren Viskosität im gesamten Bereich von Scherbedingungen, in dem sich diese ändert, messen. Außerdem müssen sowohl Konzentrations- als auch Zeitabhängigkeit berücksichtigt werden. Dies ist allerdings eine Maximalforderung. In der Praxis muß man sich oft mit einer stark redundanten Informationsmenge begnügen. Einerseits gibt es nur wenige kommerzielle Viskosimeter, die auch in den Extremmeßbereichen (sehr große oder sehr kleine Scherraten oder bei schnellen zeitlichen Veränderungen) genügend genau arbeiten. Andererseits hat man oft nur eine sehr kleine Probenmenge zur Verfügung (besonders von biologischen Präparaten), wodurch eine umfassende rheologische Untersuchung mit herkömmlichen Geräten unmöglich gemacht wird.

In dieser Arbeit soll lediglich auf die Scherabhängigkeit der Viskosität verdünnter Lösungen eingegangen werden. Die Konzentrationsabhängigkeit wird nicht betrachtet, sondern es werden jeweils nur auf verschwindende Konzentration extrapolierte, reduzierte Größen verwendet, die das Gelöste in unendlich verdünntem Zustand charakterisieren. Auch auf die Zeitabhängigkeit wird nicht eingegangen; die Viskositätswerte sind konstante Gleichgewichtswerte, die sich beim Erreichen des Fließgleichgewichts einstellen.

Bestimmung der „echten Grenzviskositätszahl $[\eta]_0$ “

Die wichtigste Kenngröße zur rheologischen Charakterisierung einer verdünnten, kolloidalen Lösung ist die Grenzviskositätszahl (GVZ, Symbol: $[\eta]_0$). Man versteht darunter die auf verschwindende

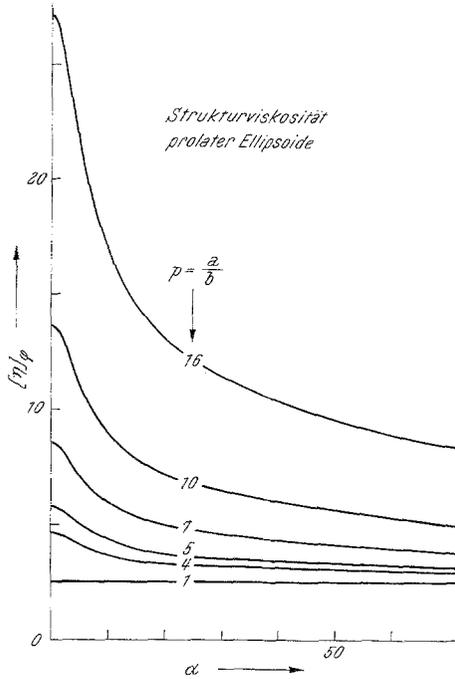


Abb. 3. Abfall der Grenzviskositätszahl mit der Scherrate (nach Scheraga¹)

$$[\eta]\varphi = [\eta] \cdot \varrho; \alpha = D \cdot D_R^{-1}; \varrho: \text{Teilchendichte, } D_R: \text{Rotationsdiffusionskonstante}$$

Konzentration und Scherrate (Symbol: D) Null extrapolierte, reduzierte Viskosität;

$$[\eta]_0 = \lim_{\substack{c \rightarrow 0 \\ D \rightarrow 0}} \eta_{\text{red}} \qquad \eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{c}$$

Die GVZ ist eine Funktion der Dichte und der Anisotropie der gelösten Teilchen. Kennt man die Teilchendichte, kann man einen Anisotropiefaktor berechnen. Wenn man weiß, welche Form die Teilchen haben, läßt sich auch ihre Größe bzw. ihre Masse aus der GVZ gewinnen.

Die genaue Bestimmung von $[\eta]_0$ erfordert eine Extrapolation

auf verschwindende Scherrate ($D = 0$). Das ist nicht immer leicht möglich, denn die Viskosität ist eine komplizierte Funktion der Scherrate, die nur für sehr kleine Scherraten linearisierbar ist. Abb. 3 zeigt den Abfall der Grenzviskositätszahl von prolaten Ellipsoiden nach *Scheraga*¹ bei Erhöhung der Scherrate. Aufgetragen ist hier die dimensionslose Volumen-*GVZ* $[\eta]_{\varphi} = [\eta] \cdot \rho$ gegen den gleichfalls dimensionslosen Scherparameter $\alpha = D/D_R$ ($D_R = \text{Rotationsdiffusionskonstante}$). „ p “ bezeichnet das Verhältnis der Polachse a zur Äquatorachse b der

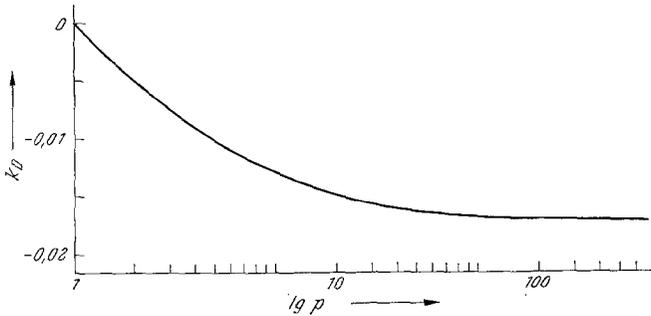


Abb. 4. k_D als Funktion der Anisotropie bei prolaten Rotationsellipsoiden
 $[\eta] = [\eta]_0 (1 + k_D \alpha^2)$

Teilchen. Bei kleinen Scherraten sinkt die Viskositätszahl nach einer quadratischen Gleichung:

$$[\eta] = [\eta]_0 + [\eta]_0 k_D \alpha^2 = [\eta]_0 \left(1 + k_D \frac{D^2}{D_R^2} \right) \quad (1)$$

*Kuhn*² hat für stark anisotrope Teilchen ($p \rightarrow \infty$) den Wert $k_D = -0,034$ angegeben. Dieser Wert stimmt jedoch nicht mit den neueren Rechnungen von *Scheraga*¹ überein. Aus den von *Scheraga* angegebenen Tabellen läßt sich der in Abb. 4 gezeigte Verlauf von $k_D = f(p)$ für Rotationsellipsoide errechnen. k_D nähert sich für stark anisotrope Teilchen dem Wert $k_D = -0,017$. Um nach der Formel (1) extrapolieren zu können, ist es erforderlich, bis zu sehr kleinen Werten von α zu messen (womöglich bis $\alpha < 1$). Bei den meisten kompakten und unstrukturierten Makromolekülen liegen die Werte von D_r in der Größenordnung 10^3 bis 10^4 s^{-1} , so daß hier eine Messung bei einer Scherrate von 10^3 s^{-1} noch einem ziemlich niedrigen α -Wert entspricht. Anders liegt dieses Problem bei stark anisotropen und hochstrukturierten Teilchen, die, wie z. B. DNA-Moleküle, sehr viel niedrigere Rotationsdiffusionskonstanten haben können ($10^{-2} < D < 10^2 \text{ s}^{-1}$).

In einem solchen Fall muß der Viskositätsverlauf bis zu entsprechend kleinen Scherraten verfolgt werden, was mit vielen herkömmlichen Viskosimetern nicht möglich ist. Für diesen Zweck wurden spezielle Viskosimeter vorgeschlagen, wie das Schwimm-Rotationsviskosimeter mit magnetischem Antrieb von *Zimm* und *Crothers*³, die mit besonderen Einrichtungen zur Variation der Scherrate versehen wurden⁴. Besonders genaue Absolutmessungen können mit einem kürzlich beschriebenen Niederdruck-Kapillarviskosimeter gemacht werden⁵.

Bestimmung der Rotationsdiffusionskonstante und des Anisotropiefaktors aus der Fließkurve

Da der Faktor k_D in Formel (1) eine Funktion des Anisotropiefaktors ist, kann man nicht direkt aus einer Auftragung η vs. D^2 die Rotationsdiffusionskonstante gewinnen. Kennt man aber die ganze Fließkurve oder mindestens einen großen Teil, hat man einen größeren Informationsinhalt zur Verfügung. Durch Vergleich der gemessenen Fließkurven mit theoretischen Modellfunktionen kann man dann sowohl die Anisotropie als auch die Rotationsdiffusionskonstante ermitteln.

Wie ein solcher Kurvenvergleich im Prinzip gemacht werden kann, soll an einigen Beispielen gezeigt werden. Als Vergleichsfunktionen werden normierte Fließkurven

$$\frac{[\eta]_\alpha}{[\eta]_0} \text{ vs. } \lg \alpha$$

verwendet. In Abb. 5 sind solche Fließkurven für prolata Ellipsoide abgestufter Exzentrizität dargestellt (nach Berechnungen von *Scheraga*¹). Rotationsellipsoide sind für viele Teilchensorten als Äquivalentmodelle brauchbar. Die gemessene Fließkurve wird im selben Maßstab in der Form $[\eta]_\alpha/[\eta]_0$ vs. $\lg D$ aufgetragen und durch Horizontalverschiebung mit einer passenden Modellkurve zur Deckung gebracht. Deckung ist nur mit einer Kurve der gesuchten Exzentrizität p zu erreichen. Aus der Horizontalverschiebung der Maßstäbe D der gemessenen und α der berechneten Kurve läßt sich die Rotationsdiffusionskonstante D_R ablesen.

Da gilt $\lg D_R = \lg D - \lg \alpha$, folgt für $\alpha = 1$

$$\lg D_R = \lg D.$$

Der Abszissenwert 1 des α -Maßstabs zeigt also auf dem D -Maßstab direkt den Wert der Rotationsdiffusionskonstante an. Voraussetzung

für die Anwendbarkeit dieses Verfahrens ist natürlich, daß die echte *GVZ* vorher durch lineare Extrapolation einwandfrei ermittelt werden konnte.

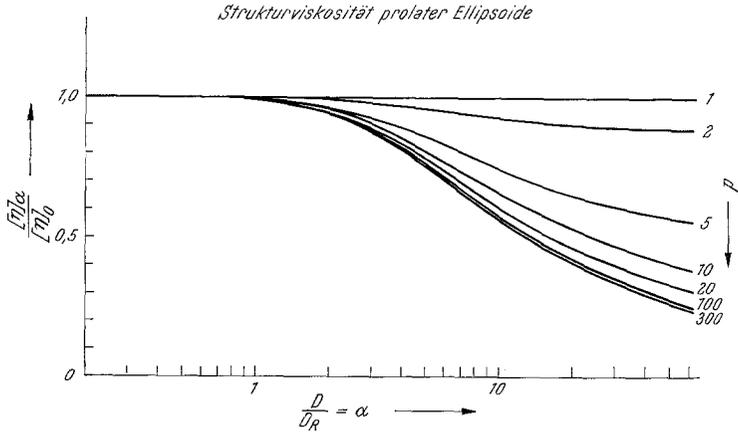


Abb. 5. Berechnete Fließkurven von Modell-Körpern (prolate Ellipsoide) nach *Scheraga*¹. Normierte Darstellung

$$\frac{[\eta]_\alpha}{[\eta]_0} \text{ vs. } \lg D/D_R$$

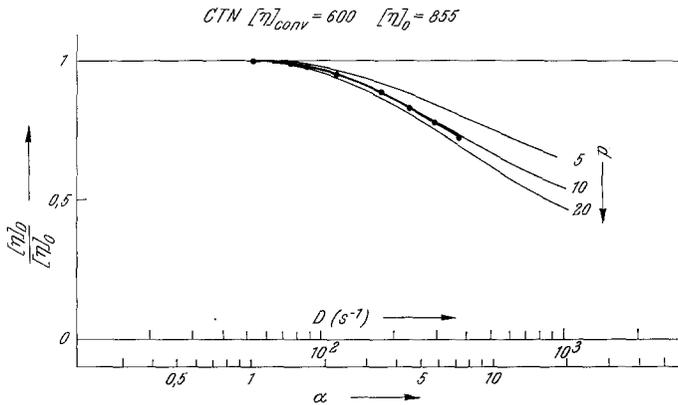


Abb. 6. Teil einer Fließkurve von Cellulose trinitrat in Aceton (25 °C), gemessen mit einem Miniatur-Fallkugelviskosimeter⁶

Man sollte sich auch darüber im klaren sein, daß die Methode nur anwendbar ist, wenn eine theoretische Annahme zutrifft, die bisher stillschweigend gemacht wurde: die theoretischen Kurven stellen die Abnahme

der relativen Volumen- GV -Zahlen dar, während die experimentellen Kurven die Änderung der auf die Massenkonzentration bezogenen GVZ wiedergibt. Diese Funktionen sind nur vergleichbar, wenn sich die Teilchendichte mit der Scherrate nicht ändert.

Die Methode des Kurvenvergleichs ist um so genauer, je vollständiger der Verlauf der Fließkurve bekannt ist. Für eine erste Orientierung genügt oft auch ein kleinerer Ausschnitt. Abb. 6 zeigt den Beginn einer Fließkurve von Cellulosetrinitrat (CTN) in Aceton bei 25°C . Die konventionelle GVZ , $[\eta]_{\text{conv}}$, wurde zu $600\text{ cm}^3\text{ g}^{-1}$ und die echte GVZ , $[\eta]_0$, zu 855 bestimmt. Es ergibt sich für diese Probe ein Anisotropiefaktor von $p \approx 10$ und eine Rotationsdiffusionskonstante von $D_r = 52\text{ s}^{-1}$.

Bestimmung der Teilchendichte

Ein schwieriges Problem der Rheologie verdünnter Lösungen bietet die Frage, welche Teilchendichte, deren Kenntnis für die Ermittlung der Volumen- GVZ erforderlich ist, man für die Berechnungen verwenden soll. Unter Teilchendichte ρ_v versteht man in diesem Zusammenhang die Teilchenmasse, bezogen auf das immobilisierte Volumen. Letzteres setzt sich zusammen aus Trockenvolumen, Volumen des Quellungsmittels und Volumen des immobilisierten Lösungsmittels. Es gibt keine theoretische Möglichkeit, die rheologisch wirksame Teilchendichte zu erfassen, noch kennt man eine nichtrheologische Meßmethode, mit der man diese wichtige Größe messen könnte.

Kennt man jedoch die Anisotropie des Teilchens und die echte GVZ , kann man nach der Formel

$$[\eta]_{\varphi,0} = [\eta]_0 \cdot \rho_v$$

ρ_v berechnen. $[\eta]_{\varphi,0}$ kann man Tabellen entnehmen. Für prolate Ellipsoide verwenden wir wieder die von *Scheraga* berechneten Werte. Um zwischen den tabellierten Werten interpolieren zu können, wurde $[\eta]_{\varphi,0}$ als Funktion des Achsenverhältnisses p aufgetragen (Abb. 7).

So ist für prolate Rotationsellipsoide mit einem Achsenverhältnis von $p = 10$, wie es für die oben erwähnte CTN -Probe festgestellt wurde, $[\eta]_{\varphi,0} = 13,63$. Es ergibt sich in diesem Fall ein ρ_v von $1,6 \cdot 10^{-2}\text{ g cm}^{-3}$.

Als weiteres Beispiel sollen zwei DNA-Proben dienen, deren Fließkurven in Abb. 8 wiedergegeben werden (gemessen von *R. Gruber*⁷). Beide Proben sind in $0,05m$ - NaCl gelöst. Es handelt sich um zwei verschiedene Chargen eines kommerziellen Präparats einer Lachsperma-DNA (Fa. Calbiochem). Die Proben unterschieden sich beträchtlich in ihrem rheologischen Verhalten, dessen Kenngrößen in Tab. 1 zusammengestellt sind. Obwohl beide Substanzen das für native DNA

typische UV-Spektrum zeigten, enthält die Viskositätsmessung, daß die Tertiärstruktur der Probe-DNA-1 stark geschädigt ist. Eine gestreckte Doppelhelix müßte ein wesentlich größeres Achsenverhältnis

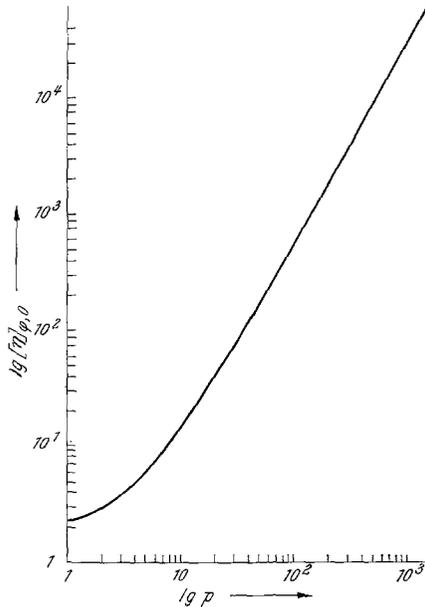


Abb. 7. Volumengrenzviskositätszahl $[\eta]_{\phi,0}$ von prolaten Ellipsoiden als Funktion des Achsenverhältnisses (nach Scheraga¹)

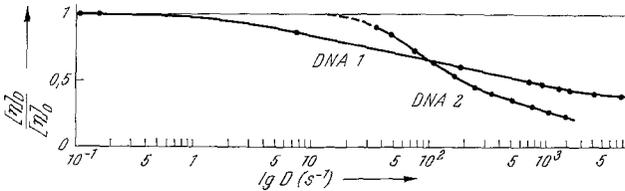


Abb. 8. Fließkurven zweier Proben von Lachssperma-DNA in 0,5*m*-NaCl (Calbiochem). Probe-DNA-1 hat eine niedrigere *GVZ*, geringeres Achsenverhältnis *p* und eine kleinere Rotationsdiffusionskonstante *D_R*, was auf laterale Assoziation hinweist

als $p = 3,5$ aufweisen. Eine gedrungener Teilchengestalt kann durch Knicke und Knäuelbereiche oder durch laterale Assoziation zustande kommen. Die besonders niedrige Rotationsdiffusionskonstante deutet darauf hin, daß die Teilchen sehr groß sind, daß es sich also durchaus

um Assoziat handeln kann. Damit steht auch die niedrige Teilchendichte im Einklang, die durch eine größere Menge von immobilisiertem Lösungsmittel zustande kommt.

Die Moleküle der DNA-2 dagegen zeigen die typische, stark gestreckte Form ($p \approx 20$) und einen Wert der Rotationsdiffusionskonstanten, der in derselben Größenordnung liegt wie D_R -Werte, die für hochmolekulare DNA mit Hilfe der Strömungsdoppelbrechung bestimmt wurden⁸. Wir können also annehmen, daß wir hier eine intakte, leicht gebogene Doppelhelix vorliegen haben, etwa in Form einer

Tabelle 1. *Rheologische Kenngrößen zweier Lachssperma-DNA-Proben (Calbiochem), gelöst in 0,05m-NaCl-Lösung*

		DNA-1	DNA-2
$[\eta]_{\text{conv}}$	($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	1405	1720
$[\eta]_0$	($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	2040	5020
p		3,5	20
D_R	(s^{-1})	0,6	12
$[\eta]_{\varphi,0}$		4,22	38,53
ρ_v	(g cm^{-3})	$2,07 \cdot 10^{-3}$	$7,69 \cdot 10^{-3}$

Superhelix. Die Dichte einer gleichmäßig gekrümmten Superhelix ist eine Funktion des Achsenverhältnisses des sie umhüllenden Ellipsoids und der Helixlänge L . Sie kann näherungsweise durch folgende Formel angegeben werden⁹:

$$\rho_v = \rho_0 q \frac{p^2}{a^2} \quad (2)$$

(ρ_0 : Dichte der gestreckten Helix, q : Helixquerschnitt, p : Achsenverhältnis, a : Längsachse.)

ρ_0 und q kann man aus den bekannten *Crick—Watson*-Modellen berechnen, so daß sich nach (2) die Gesamtteilchenlänge ergibt. Für DNA-2 errechnet sich $a = 5,56 \cdot 10^3 \text{ \AA}$, $b = 278 \text{ \AA}$. Die gestreckte Länge der Doppelhelix ergibt sich zu

$$L = 2 \sqrt{\pi^2 b^2 + a^2},$$

in unserem Fall: $L = 1,13 \cdot 10^4 \text{ \AA}$. Schließlich führt das zu einem Molekulargewicht von $M = 1,8 \cdot 10^7$.

Im allgemeinen Fall kennt man den Zusammenhang zwischen Achsenverhältnis und Dichte nicht. Hier kann man einen zweiten Weg gehen und nach Rechnungen von *Perrin*¹⁰ die Teilchendimen-

sionen aus der Rotationsdiffusionskonstante berechnen. *Perrin* gab für lange prolate Rotationsellipsoide die Formel:

$$D_R = \frac{3 kT}{16 \pi \eta_s a^3} (2 \ln 2p - 1)$$

an.

Es gibt noch eine Reihe weiterer Möglichkeiten, die Meßdaten zu kombinieren, um die Dimensionen der Teilchen zu erhalten. Alle diese Methoden machen aber bestimmte Annahmen, deren Berechtigung durch eine andersartige unabhängige Messung überprüft werden sollte.

Literatur

- ¹ *H. A. Scheraga*, J. Chem. Phys. **23**, 1526 (1955).
- ² *W. Kuhn* und *H. Kuhn*, Helv. Chim. Acta **28**, 97 (1944).
- ³ *B. H. Zimm* und *D. M. Crothers*, Proc. Nat. Acad. Sci. **48**, 905 (1962).
- ⁴ *E. Gruber* und *J. Schurz*, Rheol. Acta **11**, 36 (1972).
- ⁵ *E. Gruber* und *C. Sezen*, Angew. Makromol. Chem. **36**, 57 (1974).
- ⁶ *C. Sezen*, Diplomarbeit, Darmstadt 1972.
- ⁷ *R. Gruber*, Dissertation, Universität Graz 1973.
- ⁸ *R. E. Harrington*, Biopolymers **10**, 337 (1971).
- ⁹ *E. Gruber*, Dissertation, Univ. Graz, 1968.
- ¹⁰ *F. Perrin*, J. phys. radium **5**, 497 (1934); **7**, 1 (1936).

Prof. Dr. J. Schurz
Institut für Physikalische Chemie
Universität Graz
Heinrichstraße 28
A-8010 Graz
Österreich