

Die Svedbergsche Ultrazentrifuge, Forschungsinstrument der makromolekularen Chemie

Von Prof. Dr. G. MEYERHOFF

Institut für physikalische Chemie der Universität Mainz

Die von Svedberg entwickelte Ultrazentrifuge gestattet es, Substanzen mit Molekulargewichten von $M = 3 \times 10^2$ bis 3×10^8 zu untersuchen. Die Größe des Molekulargewichtes läßt sich aus Sedimentationsmessungen in Verbindung mit Diffusionsmessungen, z.T. aber auch mit der Ultrazentrifuge allein, bestimmen. Außerdem können aus einem Gemisch weniger monomolekularer Substanzen die Anteile der Einzelkomponenten und bei einer polymolekularen Substanz ihre Molekulargewichtsverteilung ermittelt werden. Auch Größen, die ein Maß für die Wechselwirkung zwischen Polymeren und Lösungsmittel liefern, wie der zweite osmotische Virialkoeffizient und die räumlichen Abmessungen der gelösten Moleküle, lassen sich erfassen.

Diese Arbeit soll einen Überblick über die methodischen und theoretischen Grundlagen der Ultrazentrifugentechnik geben und insbesondere auf die in den letzten Jahren erzielten Fortschritte in Theorie und Technik sowie die heute zur Diskussion stehenden Probleme eingehen. Hinsichtlich spezieller Einzelheiten sei auf ausführlichere Darstellungen¹⁻⁶⁾ verwiesen.

I. Historischer Überblick

Zu Anfang der zwanziger Jahre versuchte *The Svedberg* (geboren am 30. August 1874 in Härnäs unweit Uppsala, 1909 Ordinarius für physikalische Chemie, 1926 Nobelpreisträger*)¹⁾, erstmals eine Zentrifuge nicht in herkömmlicher Weise als präparatives Hilfsmittel zu verwenden, sondern den Sedimentationsvorgang selbst zu beobachten. Nach einer von *Svedberg* aufgestellten Gleichung sollte es möglich sein, aus der Sedimentationsgeschwindigkeit Größe und Gestalt der gelösten oder suspendierten Teilchen zu bestimmen.

Svedberg und seine Mitarbeiter begannen ihre Versuche mit einer kleinen Zentrifuge von 150-facher Erdbeschleunigung, in der sie das Verhalten von Gold-Sol untersuchten. Als Bedingungen für eine konvektionsfreie Sedimentation fanden sie, daß die Meßzelle Sektorform besitzen und daß bei konstanter Temperatur und vibrationsfreiem Lauf zentrifugiert werden muß.

Schon mit dem nächsten Zentrifugenmodell, das eine 5000-fache Erdbeschleunigung erreichte, konnten aus dem Sedimentationsgleichgewicht Molekulargewichte von Proteinen bestimmt werden, die man bis dahin nur abschätzen konnte. Diesen Zentrifugentyp, der zur Messung von Sedimentationsgleichgewichten diente und der über ein Getriebe angetrieben wurde, vervollkommnete *Svedberg*, bis sich bei einem mittleren Abstand des Meßraumes von der Rotationsachse von 52 mm eine 19000-fache Erdbeschleunigung ergab.

Daneben wurde ein anderer Zentrifugentyp für wesentlich höhere Beschleunigungen entwickelt, die eigentliche Ultrazentrifuge. Bei dieser sind die Zentrifugalfelder so groß, daß sogar sehr kleine Teilchen aussedimentiert werden

(bis zu $M < 1000$). Zum Erreichen der erforderlichen hohen Rotor-Umdrehungszahlen ging *Svedberg* vom mechanischen zum hydraulischen Antrieb über und erreichte Zentrifugalfelder von 156000 g, 200000 g, 265000 g und schließlich bei einem Radius von 32,5 mm sogar 750000 g. Noch höhere Beschleunigungen konnten erzielt werden; jedoch muß man dann den Radius sehr klein wählen, wobei die Meßgenauigkeit zu gering wird. Als am günstigsten hat sich ein effektiver Radius von 65 mm erwiesen, der bei Drehzahlen von 60000 U/min Beschleunigungen von 240000 g ergibt. Die meisten der heutigen Ultrazentrifugen arbeiten mit Rotoren von diesem effektiven Radius und zwischen 50000 und 65000 U/min liegenden Höchstdrehzahlen. Damit lassen sich Molekulargewichte von $M = 10^8$ bis herab zu niedermolekularen Substanzen, wie Rohrzucker, untersuchen.

Svedberg gelang es mit Hilfe seiner Zentrifugen, Molekulargewichte von Stoffen zu bestimmen, deren Größe bis dahin nicht exakt meßbar war. Zwar konnte man bald auch aus dem osmotischen Druck das Molekulargewicht großer Moleküle (bis zu $M = 10^6$) ermitteln, jedoch vermag die Ultrazentrifuge wesentlich spezifischere Aussagen zu liefern. So liegen Proteine häufig als Gemisch von 2, 3 oder noch mehr Einheiten verschiedener Größe vor. Osmotisch erhält man nur einen Mittelwert des Molekulargewichtes, während in der Ultrazentrifuge das Gemisch getrennt wird. Dem Sedimentationsdiagramm läßt sich dann entnehmen, welche Molekulargewichte auftreten und wie groß die Anteile der einzelnen Komponenten des Gemisches sind. Auch der neuesten Methode zur Bestimmung hoher Molekulargewichte, dem Lichtstreuungsverfahren, ist die Ultrazentrifuge in dieser und mancher anderen Hinsicht überlegen.

Das Sedimentationsgleichgewicht und die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit in Verbindung mit getrennten Diffusionsmessungen benutzte *Svedberg* zur Aufklärung der Molekülgröße und -gestalt von Proteinen, Enzymen, Viren und später auch von Polysacchariden und synthetischen Polymeren. Wenn auch besonders bei den zuletzt genannten fadenförmigen Molekülen noch viele Fragen offen blieben, als sich *Svedberg* im Jahre 1949 einem neuen Forschungsgebiet, der Atomphysik, zuwandte, so hat er doch auch hier äußerst befriedigend gewirkt.

II. Ultrazentrifugen-Typen und Meßtechnik

Die Ultrazentrifugen besitzen als wichtigstes Teil einen Rotor, der im Vakuum läuft und mit zwei oder auch mehr Bohrungen parallel zur Rotationsachse versehen ist. Diese Bohrungen nehmen die eigentlichen Meßzellen auf. Der

*) Vgl. z. B. „Wer ist's?“ in *Nachr. Chem. Techn.* 2, 172 [1954].
1) *The Svedberg u. K. O. Pedersen: Die Ultrazentrifuge*, Theodor Steinkopf, Dresden und Leipzig 1940.

2) *A. L. Geddes, J. B. Nichols u. E. D. Bailey*, in *A. Weissberger: Physical Methods of Organic Chemistry*, Interscience Publ., Inc., New York 1949, Bd. I, I.

3) *J. Hengstenberg*, in *H. A. Stuart: Die Physik der Hochpolymeren*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953, Bd. II.

4) *G. Meyerhoff*, in *Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie*, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1955, Bd. III/1.

5) *J. W. Williams, K. E. van Holde, R. L. Baldwin u. H. Fujita*, *Chem. Reviews* 58, 715 [1958].

6) *H. K. Schachmann: Ultracentrifugation in Biochemistry*, Academic Press, New York und London 1959.

Antrieb erfolgt über eine Achse, die aus der Vakuumkammer herausgeführt wird, entweder durch Turbinen oder mit einem Elektromotor.

Konstruktion der Ultrazentrifugen

Antrieb

Svedberg¹⁾ benutzte für seine Ultrazentrifugen Rotoren mit horizontaler Rotationsachse. An den Enden der Achse waren zwei kleine Turbinen angebracht, gegen die eine elektrisch betriebene Ölpumpe Drucköl strömen ließ. Hierdurch wurde der Rotor in Umdrehungen gesetzt und gleichzeitig durch das temperierte Öl auf konstanten Temperaturen gehalten.

Derart konstruierte Ultrazentrifugen erfordern für die Herstellung und den Betrieb einen recht hohen Aufwand. Man versuchte daher bald, Luft als Antriebsmittel zu benutzen. Beams und Pickels²⁾ verwandten eine Turbine, die mit Luft angetrieben wurde und gleichzeitig, um die Reibung gering zu halten, auf einem Luftpolster schwiebte. Über einer dünne Achse war die Turbine mit dem Rotor in der Vakuumkammer verbunden, der, wie bei allen neueren Zentrifugen, um eine vertikale Achse rotierte. Jedoch wurden von diesem wie von dem Öl-Typ nur wenige Exemplare, zusammen weniger als 20, hergestellt. Dagegen erreichte eine von Schramm³⁾ konstruierte luftgetriebene Ultrazentrifuge^{3a)} wegen ihrer Zuverlässigkeit und der verhältnismäßig geringen Kosten für Anschaffung und Unterhalt eine große Stückzahl. Sie wird, inzwischen stark verbessert, auch heute noch hergestellt (bisher über 150 Exemplare) und weist bei einem mittleren Radius von 65 mm eine maximale Drehzahl von 50000 U/min auf, die sich mit großer Konstanz einhalten lässt. Ihre Leistungsfähigkeit reicht für die meisten Untersuchungen aus.

In den fünfziger Jahren entwickelte Pickels^{3a)} eine elektrisch angetriebene Ultrazentrifuge, die jetzt in über 300 Laboratorien benutzt wird^{3b)}. Der Aufbau ist im Prinzip ähnlich wie bei den luftgetriebenen Zentrifugen, nur daß statt der Turbine ein Elektromotor mit Getriebe den Rotor über eine dünne Welle antreibt. Neuerdings kann man auch auf das Getriebe, das bei den hohen Drehzahlen nur eine begrenzte Lebensdauer hat, verzichten. Nachdem Beyerle¹⁰⁾ einen Prototyp beschrieb, bei dem Rotor und Elektromotor gleiche Drehzahlen aufwiesen, sind jetzt zwei derartige getriebelose elektrische Ultrazentrifugen erhältlich^{3a,c)}. Die eine von ihnen erreicht nach Wiedemann¹¹⁾ Drehzahlen bis 65000 U/min, sonst stellen 60000 U/min bei 65 mm Radius die Standardausführung für elektrisch angetriebene Ultrazentrifugen dar.

Eine elegante reibungsfreie Aufhängung des Rotors stammt von Beams¹²⁾ und Mitarb., die einen Rotor mit Stahlkern benutzen. Dieser Rotor kann, durch zwei oberhalb und unterhalb von ihm angebrachte elektronisch gesteuerte Magnete zentriert, völlig frei in der Vakuumkammer rotieren. Die Reibung ist dabei verschwindend gering, sie resultiert allein aus dem nicht vollkommenen Vakuum. Angetrieben wird der Rotor durch eine Lüftturbine, die ihn über eine Welle in Bewegung setzt. Die Welle wird ausgekuppelt, wenn die gewünschte Umdrehungszahl erreicht ist. Die Drehzahl bleibt dann konstant, sie nimmt um etwa 1% pro Tag ab.

- ¹⁾ I. W. Beams u. E. G. Pickels, Rev. Sci. Instruments 6, 299 [1935].
²⁾ G. Schramm, Kolloid-Z. 97, 106 [1941]; G. Bergold, Z. Naturforschung 1, 2 [1946].
^{3a)} E. G. Pickels, Machine Design 22, 102 [1950]; Methods in medic. Res. 5, 107 [1952].
^{3b)} Hersteller: Phywe A.G., Göttingen.
^{3c)} Hersteller: Beckman Instruments, Belmont Calif., USA.
¹⁰⁾ K. Beyerle, D. Mohring u. Th. Buecher, Chemie-Ing.-Techn. 26, 94 [1954].
¹¹⁾ E. Wiedemann, ebenda 28, 263 [1956].
¹²⁾ I. W. Beams, H. M. Dixon, A. Robeson u. N. Snidow, J. physic. Chem. 59, 915 [1955].

Rotoren

Die Rotoren haben sich seit Svedbergs ersten Modellen am wenigsten geändert. Der erreichbaren Maximalbeschleunigung ist durch die Festigkeit des Rotormaterials eine Grenze gesetzt, die im wesentlichen vom Verhältnis Zugfestigkeit zu Dichte bestimmt wird. Man erhält daher für Stahl und Duraluminium etwa die gleichen Festigkeits-eigenschaften. Da sich bei letzterem örtlich auftretende hohe Spannungen durch leichtes Fließen stark vermindern, verwendet man jetzt ausschließlich Duraluminium-Legierungen als Rotormaterial, das zudem ein kleineres Trägheitsmoment ergibt.

Abb. 1 zeigt als Beispiel einen heute viel verwendeten Rotor mit zwei Bohrungen zur Aufnahme der Meßzellen. Rotoren mit beschränkter Drehzahl besitzen auch vier oder sechs Bohrungen. Mit Ausnahme der ölgetriebenen Rotoren erfolgt der Antrieb über eine dünne Welle, die infolge ihrer Elastizität eine Selbstbalancierung des sich drehenden Rotors erlaubt. Dies ermöglicht den für



Abb. 1. Ultrazentrifugenrotor^{3a)}, davor zwei Meßzellen
(Phywe-Werkphoto)

konvektionsfreie Sedimentation erforderlichen ruhigen Lauf. Weiter ist eine gute Temperaturkonstanz notwendig. Die Anforderungen in Bezug auf die Temperaturkonstanz sind für wässrige Lösungsmittel niedriger als für organische Lösungsmittel, sie steigen außerdem mit abnehmender Konzentration. Die Temperatur läßt sich durch Heizen und Kühlen der gesamten Vakuumkammer am besten steuern (Meyerhoff¹³⁾). Im allgemeinen erreichen die heutigen Ultrazentrifugen eine Konstanz von $\pm 0,1^\circ\text{C}$, die in den meisten Fällen ausreicht. Die Meßtemperatur läßt sich z. B.^{3b)} zwischen -20 und $+150^\circ\text{C}$ wählen, so daß thermisch sehr empfindliche Präparate, wie einige Eiweißstoffe, ebenso wie nur bei hohen Temperaturen lösliche Produkte, z. B. Polyäthylen, untersucht werden können.

Zur Messung der Temperatur des Rotors kann man einen in diesen eingesetzten Thermistor^{3b)} verwenden, dessen Widerstandsänderung mit der Temperatur potentiometrisch gemessen wird. Der eine Kontakt wird durch eine in der Mitte des Rotorbodens angebrachte Wolfram-Nadel gebildet, die in Quecksilber taucht. Das Quecksilber wird mit Siliconöl vor dem Verdampfen im Vakuum geschützt.

Ein elegantes Verfahren, das keinen direkten elektrischen Kontakt mit dem laufenden Rotor erfordert, mißt die Temperatur mit einem Magneten^{3a)}. Am unteren Rotorzapfen befindet sich hierbei ein permanenter ringförmiger Magnet, der mit einem Material temperaturveränderlicher Magnetisierbarkeit belegt ist. Damit wird die Feldstärke des Magneten temperaturabhängig. Der umlaufende Magnet stellt einen Wechselspannungsgenerator dar, dessen Spannung temperaturveränderlich ist, so daß die Rotortemperatur durch eine einfache Spannungsmessung bestimmt werden kann.

Jedoch dürfte z. Zt. noch ein Thermoelement, das man an einer Stelle niedriger Umfangsgeschwindigkeit nahe an die Rotoroberfläche bringt, um dessen Temperaturstrahlung

zu messen, den beiden vorstehend beschriebenen Meßanordnungen an Empfindlichkeit mindestens gleichkommen^{13, 14)}. Temperaturänderungen des Rotors von 0,02 °C lassen sich gut feststellen und durch Erwärmen oder Abkühlen am besten der ganzen Vakuumkammer um wenige Zehntel Grad auffangen¹³⁾.

Meßzellen

Die Meßzellen bestehen aus einem sektorförmigen Raum der oben und unten durch Quarz-Scheiben abgeschlossen ist und die zu untersuchende Lösung aufnimmt. Die Sektorform ist erforderlich, um eine konvektionsfreie Sedimentation der gelösten Partikel in radialer Richtung zu ermöglichen. Dieser von Svedberg entwickelte einfache Typ wird auch heute noch verwiegend verwendet. Daneben sind jedoch für zahlreiche spezielle Zwecke Sonderkonstruktionen getreten.

In der Abb. 2 ist der allgemeine Aufbau einer Ultrazentrifugenzelle wiedergegeben, links von oben nach unten ein Schraubring,

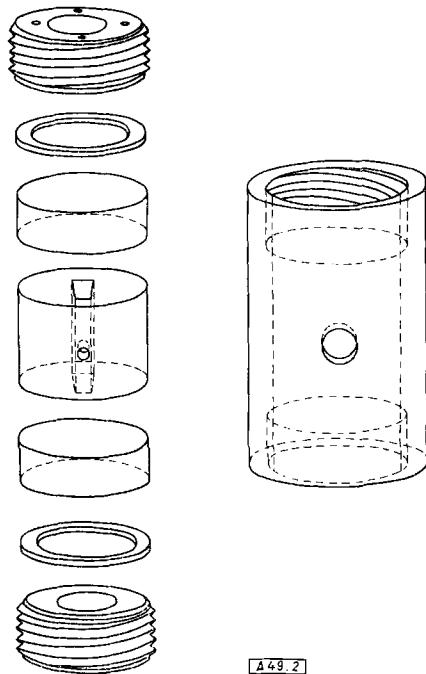


Abb. 2. Ultrazentrifugenzelle, allgemeiner Aufbau mit Standardmittelstück

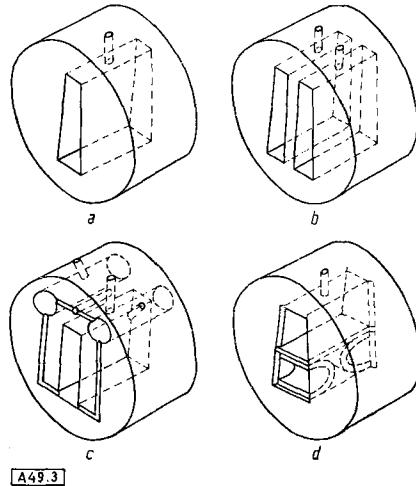


Abb. 3. Verschiedene Mittelstücke der Ultrazentrifugenzellen
a) Standardzelle, b) Doppelsektorzelle, c) Unterschichtungszelle,
d) Separierzelle

¹³⁾ G. Meyerhoff u. V. G. Schulz, Makromolekulare Chem. 7, 294 [1951].

¹⁴⁾ D. F. Waugh u. D. A. Yphantis, Rev. Sci. Instruments 23, 609 [1952].

ein Dichtungsring, obere Quarz-Scheibe, Zellenmittelstück, untere Quarz-Scheibe usw., rechts das Zellenmantelstück mit der Einfüllöffnung, die durch ein Schräubchen verschlossen wird.

Abb. 3 zeigt verschiedene Mittelstücke, nämlich für eine gewöhnliche Zelle, eine Doppelsektorzelle, eine Unterschichtungszelle und eine Separierzelle.

Die Doppelsektorzelle (Abb. 3b) benutzt man für interferometrische Beobachtungsverfahren, bei denen der eine Sektor mit der Lösung, der andere mit reinem Lösungsmittel gefüllt wird.

Setzt man eine mit der Lösung gefüllte Zeile einem Zentrifugalfeld aus, so beginnen sich am Meniskus Lösung und Lösungsmittel zu trennen. Diesem Sedimentationsvorgang wirkt jedoch die Diffusion entgegen, welche die bei reiner Sedimentation ideal scharfe Trennungslinie verbreitert. Zu niedrigen Molekulargewichten gehören niedrige Sedimentations- aber hohe Diffusionsgeschwindigkeit, wodurch die Beobachtbarkeit auf höhere Molekulargewichte beschränkt wird.

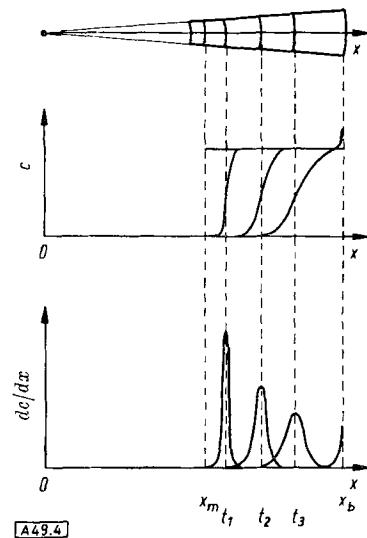


Abb. 4. Schematischer Ablauf einer Sedimentation. Oben die sektorförmige Zelle, darunter der Konzentrationsverlauf $c = f(x)$ und der Verlauf des Konzentrationsgradienten $\frac{dc}{dx} = f'(x)$
 $x = 0$ Rotationsachse
 x_m = Flüssigkeitsmeniskus
 x_b = Zellenboden

Die drei eingezeichneten Konzentrations- bzw. Konzentrationsgradienten-Kurven entsprechen drei verschiedenen langen Sedimentationszeiten, z. B. $t_1 = 20$, $t_2 = 40$, $t_3 = 60$ min

Kegeles¹⁵⁾ und Pickels¹⁶⁾ konstruierten deshalb Zellen, bei denen eine Grenzschicht zwischen Lösung und Lösungsmittel zu Anfang des Versuchs in der Zellenmitte gebildet wird. Man füllt hierbei die Zelle zur Hälfte mit Lösung, auf die dann aus einem in der Zelle befindlichen Vorratsbehälter Lösungsmittel rinnt^{17b)}. Diese Aufschichtung muß sehr vorsichtig erfolgen; bei wäßrigen Lösungen läßt sich das Hinaufrinnen durch eine auf dem Meniskus schwimmende Paraffinöl-Schicht dämpfen.

Eine nach dem Unterschichtungsprinzip arbeitende Zelle gab Meyerhoff¹⁷⁾ an. Bei dieser läuft die schwerere Lösung langsam unter das Lösungsmittel, indem zwei zylindrische Vorratsbehälter sich automatisch entleeren. Die Lösung strömt dabei durch feine Rillen, die in das Zellenmittelstück eingebracht sind und von den Quarz-Scheiben abgeschlossen werden. Dieser Zellentyp, der als einziger die Grenzschichtbildung in der Zellenmitte für organische und wäßrige Lösungsmittel bei Drehzahlen bis 60000 UpM erlaubt, ist in der Abb. 3c dargestellt^{18a)}.

Mit den Zellen, die den Sedimentationsvorgang in der Zellenmitte beginnen lassen, können Molekulargewichte auch von niedermolekularen Substanzen bestimmt werden. So ließen sich Molekulargewichte von Rohrzucker ($M = 3 \cdot 10^6$) bis zum Influenza-Virus ($M = 3 \cdot 10^8$) ermitteln. Der Meßbereich der Ultrazentrifuge umfaßt durch diese spe-

¹⁵⁾ G. Kegeles, J. Amer. chem. Soc. 74, 5532 [1952].

¹⁶⁾ E. G. Pickels, W. F. Harrington u. H. K. Schachmann, Proc. nat. Acad. Sci. USA 38, 943 [1952].

¹⁷⁾ G. Meyerhoff, Makromolekulare Chem. 15, 68 [1955].

ziellen Zellen mindestens 7 Größenordnungen, ein Bereich, der nur äußerst selten von einer physikalischen Meßmethode erreicht wird.

Ein weiterer Zellentyp dient dazu, biologisch aktive Stoffe, die häufig nicht genügend rein in für optische Meßmethoden ausreichender Menge darstellbar sind, zu untersuchen. In diesen Zellen werden zwei Schichten des Meßraumes nach teilweisem Aussedimentieren mechanisch voneinander getrennt, so daß man die Konzentration in zwei Zellenteilen nach dem Stillstand der Zentrifuge bestimmen und damit den Sedimentationskoeffizienten ermitteln kann. Die ursprüngliche Form stammt von *Tiselius*¹⁸⁾; inzwischen wurden von *Béyerle*¹⁹⁾ und *Yphantis*¹⁹⁾ andere Zellentypen angegeben, von denen die letztere in der Abb. 2d dargestellt ist. In dieser Zelle befindet sich eine von Gummifedern unterstützte Platte. Sie liegt während des Versuches auf dem Zellenboden. Beim Abbremsen des Rotors bewegt sie sich infolge der abnehmenden Zentrifugalkraft bis zur Zellenmitte. Allerdings ist es sehr schwierig, eine gleichmäßige Bewegung der Platte einzuhalten, so daß keine Durchmischung eintritt. Man kann den Sedimentationsraum nach *Bodmann*, *Kranz* u. *Schulz*²⁰⁾ auch durch eine Lage Filterpapier am Boden der Meßzelle unterteilen. Mit dieser Methodik wurden die Sedimentationskonstanten z. B. von Enzymen gemessen.

Meßmethoden

Lichtabsorption

Zur optischen Beobachtung des Konzentrationsverlaufes in der Zelle lassen sich die Absorption und die Refraktion des Lichtes verwenden. *Svedberg* benutzte zunächst die Lichtabsorption, indem man eine Kamera scharf auf die Ultrazentrifugenzelle einstellt und bei monochromatischem Licht bestimmter Wellenlänge aufnimmt. Die Wellenlänge ist so zu wählen, daß das Licht von der gelösten Substanz, nicht aber vom Lösungsmittel (einschließlich evtl. Salze, Puffer) absorbiert wird. Ultraviolette Licht wird z. B. von den meisten biologischen Substanzen absorbiert. Dagegen konnten bisher keine geeigneten Systeme Wellenlänge/Lösungsmittel/gelöste Substanz bei technisch gebräuchlichen synthetischen Polymeren gefunden werden.

Man erhält auf der photographischen Platte eine mit der Konzentration abnehmende Schwärzung, die durch Eichung die Konzentration in der Zelle anzugeben erlaubt. Hierbei treten mannigfache Schwierigkeiten auf. Da man kaum eine völlig gleichmäßige Intensität des in die Zelle einfallenden Lichtes erreichen kann, ist man auf Bezugsaufnahmen beim reinen Lösungsmittel angewiesen. Die Bezugsaufnahmen müssen im allgemeinen zu einem anderen Zeitpunkt als der Hauptversuch gewonnen werden, so daß aus der zeitlich veränderlichen Intensität des Lichtes Fehler resultieren. Gerade die für die Ultrazentrifuge erforderlichen Lampen hoher Leuchtdichte haben nur eine sehr bedingt konstante Intensität. Außerdem ist völlig gleichmäßiges Entwickeln der Platten erforderlich. Jedoch ergeben alle Konzentrationsbildner, die man aus dem Schwärzungsverlauf photometrisch gewinnt, eine mehr oder weniger „zittrige“ Kurve. Das Wandern der Wendepunkte auf dieser Kurve erlaubt dann die Berechnung des Sedimentationskoeffizienten. Es ist zu erwarten, daß das Absorptionsverfahren bald auf die stark komplizierende photographische Aufnahme (die Schwärzung als Logarithmus der Lichtintensität gibt eine S-förmige Kurve) verzichten kann. Die Photomultiplier sind inzwischen soweit entwickelt, daß man die Lichtintensität durch direkte Messung mit einer Photozelle kleinen Querschnittes messen kann.

Da die Refraktionsmethoden präzisere Aussagen über den Konzentrationsverlauf in der Zelle erlauben, wurde während der letzten 20 Jahre die Absorptionsmethode kaum mehr benutzt. Erst in jüngster Zeit wurde dieses Verfahren erneut angewandt, da es Messungen bei sehr niedrigen Kon-

zentrationen (10^{-5} g/cm³ für Proteine und Nucleinsäuren) erlaubt und es nicht immer auf die Einzelheiten der Sedimentationskurve ankommt.

Refraktionsmethoden

Das erste Refraktionsverfahren wurde am *Svedbergschen Institut* von *Lamm*²¹⁾ entwickelt und als *Lammsche Skalenmethode* häufig angewandt. Hierbei wird eine gleichmäßig unterteilte Glas-Skala durch die Zentrifugenzelle hindurch photographiert. Ein vorhandener Konzentrationsgradient bewirkt eine ihm proportionale Verschiebung der Skalstriche auf der Platte. Ein Vergleich mit einer Bezugsaufnahme durch reines Lösungsmittel ergibt den Verlauf des Konzentrationsgradienten in der Zelle.

Diese Refraktionsmethode wurde inzwischen weitgehend durch die in der Handhabung angenehmeren Schlierenmethoden ersetzt, die von *Philpot*²²⁾ und *Svensson*²³⁾ als Zylinderlinsenverfahren eingeführt wurden und heute als Standardmethoden bei den meisten Ultrazentrifugen benutzt werden. Hierbei wird ein beleuchteter, zur Sedimentationsrichtung senkrechter Spalt durch eine Schlierenlinse als paralleles Licht durch die Zentrifugenzelle geführt, durch eine zweite Schlierenlinse auf ein Schlierendia-phragma fokussiert und über ein photographisches Objektiv und eine Zylinderlinse auf die Photoplatte abgebildet. Hierbei entsteht eine Abbildung des Konzentrationsgradienten als Funktion des Abstandes von der Rotationsachse.

Die maximale Höhe des Gradienten auf dem Bilde kann durch Neigen des Diaphragmas variiert werden; sie ist dem Tangens des Neigungswinkels proportional. Als Diaphragma lassen sich gerade Kanten, Drähte oder Spalte verschiedener Dicke verwenden, die an Präzision des Bildes jedoch alle durch eine sogenannte Phasenkante übertrroffen werden. Nach *Wolter*²⁴⁾ und *Kosse*²⁵⁾ bringt man eine völlig durchsichtige Phasenplatte, die eine gerade Kante aufweist, in den Strahlengang. Durch die Phasenkante wird auf der einen Seite der Kante das Licht um eine halbe Wellenlänge verzögert gegenüber dem auf der anderen Seite der Kante vorbeigehenden Licht. Hierdurch werden von der Kante sehr scharfe Schatten an allen Stellen nichtverschwindender Konzentrationsgradienten hervorgebracht. Um auch an den Stellen konstanter Konzentration einen scharfen Schatten zu erhalten, ist es günstig, genau über die Phasenkante einen feinen Draht zu legen (*Wiedemann*²⁶⁾).

Interferenzverfahren

Während man für Diffusions- und Elektrophorese-Versuche schon seit einiger Zeit Interferenzverfahren benutzt, finden diese für die Ultrazentrifuge erst seit kurzem Anwendung. Zur Erzeugung von Interferenzdiagrammen benötigt man im allgemeinen monochromatisches Licht, das wegen seiner geringen Intensität zu langen Belichtungszeiten führt. Da die Ultrazentrifugenzellen Sektoren von 2 bis 4° besitzen, gelangt außerdem nur der 180. bis 90. Teil des Lichtes bis zur registrierenden Photoplatte, so daß Belichtungszeiten von ≥ 2 min erforderlich werden. Ist der Sedimentationsvorgang langsam genug, um derartige Belichtungszeiten zu erlauben, so lassen sich Konzentrationsbilder großer Genauigkeit gewinnen.

Das *Rayleigh-Interferenzverfahren*^{27, 28)} läßt sich relativ leicht durch einfache Änderungen an der Schlierenoptik bei den gebräuchlichen Ultrazentrifugen anwenden. Man läßt monochromatisches Licht von einem in Sedimentationsrichtung liegenden Schlitz durch eine Schlierenlinse parallel richten und durch zwei feine Spalte in zwei Strahlen aufteilen, die durch das Lösungsmittel bzw. durch die Lösung einer Zweisektorenzelle hindurch-

¹⁸⁾ Vgl.¹⁾, Seite 132.

¹⁹⁾ D. A. Yphantis u. D. F. Waugh, J. physic. Chem. 60, 630 [1956].

²⁰⁾ O. Bodmann, D. Kranz, D. Laue u. G. V. Schulz, Angew. Chem. 72, 272 [1960]; Makromolekulare Chemie, im Druck.

²¹⁾ O. Lamm in¹⁾, Seite 226.

²²⁾ I. St. L. Philpot, Nature [London] 141, 283 [1938].

²³⁾ H. Svensson, Kolloid-Z. 87, 181 [1939]; 90, 141 [1940].

²⁴⁾ H. Wolter, Ann. Physik 7, 341 [1950].

²⁵⁾ W. Kossel u. H. Strohmeier, Z. Naturforsch. 6a, 510 [1951].

²⁶⁾ E. Wiedemann, Helv. chim. Acta 40, 2074 [1957].

²⁷⁾ J. S. L. Philpot u. G. H. Cook, Research 1, 234 [1948].

²⁸⁾ H. Svensson, Acta chem. scand. 3, 1170 [1949]; 4, 399 [1950].

treten. Hinter der Zelle liegen zwei etwas weitere Schlitze, die einen möglichst kleinen Teil des von der Zelle beschriebenen Kreisbogens ausblenden. Eine zweite Schlierenlinse fokussiert das Licht auf die Ebene, in der bei der Schlierenmethode das Diaphragma liegt. Kurz hinter dieser Ebene befindet sich das abbildende photographische Objektiv und dahinter die Zylinderlinse in ihrer normalen Stellung (Achse in Sedimentationsrichtung). Auf der Photoplatte erhält man dann eine Schar dicht nebeneinanderliegender Linien, von denen jede den Verlauf der Konzentration in der Sedimentationsrichtung darstellt.

Auch das z. B. von Scheibling²⁹⁾ und Antweiler³⁰⁾ für Diffusion und Elektrophorese verwendete Jamin-Interferometer läßt sich für die Ultrazentrifuge benutzen, wie Beams und Mitarb.¹²⁾ zeigten. Diese verwenden einen Rotor, in den, um 90° gegen die Meßzelle versetzt, eine weitere Zelle mit einem feinen Schlitz eingesetzt wird. Der Schlitz zerhackt den Lichtstrahl und läßt das Licht nur für einen sehr kleinen Teil der Rotorumdrehung (ungefähr 0,2°) durch die Zelle treten. Hierdurch wird die optische Präzision sehr erhöht. Allerdings erscheint der optische und mechanische Aufbau dieses Systems sehr kompliziert.

III. Theoretische Grundlagen

Kinetische Beziehungen

Zur Vereinfachung betrachten wir zunächst eine binäre flüssige Mischung, bestehend aus dem Lösungsmittel (Index 1) und der gelösten Substanz (Index 2). Das gelöste Teilchen wandert mit der Geschwindigkeit $\frac{dx}{dt}$ unter dem Einfluß der Zentrifugalbeschleunigung $\omega^2 x$, wobei ω die Winkelgeschwindigkeit und x den Abstand von der Rotationsachse bedeuten. Das Verhältnis von Geschwindigkeit zur Größe des Zentrifugalfeldes liefert die Geschwindigkeit des Teilchens im Einheitsfeld und definiert den Sedimentationskoeffizienten S:

$$(1) \quad S = \frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

Der Sedimentationskoeffizient hat die Dimension einer Zeit und wird in Svedberg-Einheiten (10^{-13} sec) angegeben.

Der Sedimentation wirkt stets die Diffusion entgegen. Der system-spezifische Diffusionskoeffizient D ist nach dem 1. Fickschen Gesetz definiert durch die Stoffmenge dm_D , die in der Zeit dt durch eine Fläche q hindurchtritt.

$$(2a) \quad \frac{dm_D}{dt} = -D \cdot q \cdot \frac{dc}{dx}$$

D hat die Dimension cm^2/sec und wird für Flüssigkeiten zweckmäßig in Fickschen Einheiten ($10^{-7} cm^2/sec$) angegeben.

Infolge der Sedimentation wird entsprechend die Stoffmenge dm_S in der Zeit dt durch den Querschnitt q transportiert:

$$(2b) \quad \frac{dm_S}{dt} = +c \cdot q \cdot \frac{dx}{dt}$$

Der Stofftransport an Gelöstem beträgt also insgesamt

$$\frac{dm}{dt} = \frac{dm_S}{dt} + \frac{dm_D}{dt} = (S \cdot c \cdot \omega^2 x - D \cdot \frac{dc}{dx}) \cdot q$$

Zwischen zwei Abständen x und $x + dx$ nimmt die Substanzmenge dann in der Zeit dt um

$$(3a) \quad -\frac{d}{dx} \left(S \cdot c \cdot \omega^2 \cdot q \cdot x - D \cdot q \cdot \frac{dc}{dx} \right) dx$$

zu. In der gleichen Zeit tritt eine Konzentrationsänderung $\frac{dc}{dt}$ im Volumen $q \cdot dx$ ein um

$$q \cdot \frac{dc}{dt} \cdot dx$$

Setzt man noch $q = \varphi x$ (φ = Sektorwinkel der Zelle) ein, so ergibt sich unter Verwendung von Gl. (3a)

$$(3b) \quad \frac{dc}{dt} = \frac{1}{x} \cdot \frac{d}{dx} \left(D \cdot x \cdot \frac{dc}{dx} - S \cdot c \cdot \omega^2 \cdot x^2 \right)$$

Falls D und S unabhängig von x sind, erhält man Gl. (4),

$$(4) \quad \frac{dc}{dt} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{1}{x} \frac{dc}{dx} \right) - S \cdot \omega^2 \left(x \frac{dc}{dx} + 2c \right)$$

²⁹⁾ G. Scheibling, J. Chim. physique Physico-Chim. biol. 47, 688 [1950].

³⁰⁾ H. S. Antweiler, Chemie-Ing.-Techn. 24, 284 [1952].

die Lammsche Differentialgleichung der Ultrazentrifuge. Sie ist unter der Voraussetzung gewonnen, daß die Reibungskräfte bei der Sedimentation und der Diffusion gleich groß sind und beide Koeffizienten nicht von der Konzentration abhängen.

Thermodynamische Beziehungen

Das Gesamtpotential einer idealen Nichtelektrolytlösung in der Ultrazentrifuge setzt sich aus dem chemischen Potential,

$$(5) \quad \mu_2 = \mu_2^0 + \frac{RT}{M_2} \ln c_2,$$

wenn μ_2^0 ein Standardpotential darstellt, und dem Ultrazentrifugenpotential $-\frac{\omega^2 x^2}{2}$ zusammen.

Nach Gibbs und Svedberg und Pedersen¹⁾ ist das Gesamtpotential jeder Komponente einer Lösung unabhängig von der Lage im Gravitationsfeld, also

$$d\left(\mu_2 - \frac{\omega^2 x^2}{2}\right) = 0$$

oder

$$(6) \quad \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial p} \right)_c \cdot \frac{dp}{dx} + \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial c_2} \right)_p \cdot \frac{dc_2}{dx} - \omega^2 x = 0$$

Für ein inkompressibles System ist $\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial p} \right) = v_2$ (partielles spezifisches Volumen) und $\frac{dp}{dx} = \omega^2 x / \rho$, worin ρ die Dichte der Lösung ist.

Mit $\frac{\partial \mu_2}{\partial c_2} = \frac{RT}{M_2 c_2}$

$$\text{folgt } v_2 \cdot \omega^2 x \cdot \rho + \frac{RT}{M_2 c_2} \frac{dc_2}{dx} - \omega^2 x = 0$$

$$(7) \quad \frac{1}{c_2} \frac{dc_2}{dx} = \frac{M_2}{RT} (1 - v_2 \rho) \omega^2 x$$

Beschränken wir uns nicht auf ideale Lösungen, so ist statt Gl. (5) zu schreiben

$$(5a) \quad \mu_2 = \mu_2^0 + \frac{RT}{M_2} \ln \gamma_2 c_2$$

(γ_2 = Aktivitätskoeffizient)

Für Elektrolyte tritt noch das Glied

$$\frac{z_2}{M_2} \cdot \epsilon \cdot \Phi$$

hinzzu. Hierin sind z_2 = Valenz des Ions, ϵ = Zahl der Elementarladungen je Mol, Φ = elektrostatisches Potential.

Mit Gl. (5a) folgt für nichtideale Lösungen von Nichtelektrolyten

$$(7a) \quad \frac{1}{c_2} \frac{dc_2}{dx} + \frac{d \ln \gamma_2}{dc_2} \frac{dc_2}{dx} = \frac{M_2}{RT} (1 - v_2 \rho) \omega^2 x$$

Will man statt des Aktivitätskoeffizienten mit den häufig zweckmäßigeren Virialkoeffizienten des osmotischen Druckes p rechnen

$$(8) \quad p_2 = \frac{RT}{M_2} c_2 + B c_2^2 + C c_2^3 + \dots$$

so ist für $\ln \gamma_2$ zu schreiben

$$(8a) \quad \ln \gamma_2 = \frac{2 M_2}{RT} B c_2 + \frac{3}{2} \frac{M_2}{RT} C c_2^2 + \dots$$

Svedberg-Gleichung

Die kinetischen und thermodynamischen Gleichungen lassen sich kombinieren. Berechnet man aus Gl. (7) $\frac{dc_2}{dx}$ und $\frac{dc_2}{dx^2}$ und setzt in Gl. (4) ein, so findet man für den Fall des Gleichgewichtes ($\frac{dc}{dt} = 0$) die Gleichung von Svedberg

$$(9) \quad M_2 = \frac{S_2}{D_2} \frac{RT}{(1 - v_2 \rho)}$$

die für eine ideale binäre Lösung strenge Gültigkeit besitzt. Für reale Lösungen gilt die von Schulz³¹⁾ gefundene fundamentale Beziehung.

$$(9a) \quad M_2 = \frac{S_2}{D_2} \frac{RT}{(1 - v_2 \rho)} \left(1 + 2 \frac{M_2}{RT} \cdot B c_2 + 3 \frac{M_2}{RT} \cdot C c_2^2 + \dots \right).$$

Auch hierin ist die Annahme enthalten, daß die Reibung f bei Sedimentation und Diffusion gleich groß ist.

Schreibt man Gl. (9a) in der Form³²⁾

$$(9b) \quad \frac{D_2}{S_2} (1 - v_2 \rho) = \frac{RT}{M_2} + 2 B c + 3 C c^2 + \dots$$

so erhält man eine den bei der Lichtstreuung und beim osmotischen Druck geltenden Beziehungen analoge Form. Bei der Lichtstreuung ist nach Debye

$$(10) \quad \frac{Hc_2}{\tau} \cdot RT = \frac{RT}{P(\theta)M_2} + 2Bc_2 + 3Cc_2^2$$

wenn H verschiedene Konstanten zusammenfaßt. τ bedeutet die Intensität der Streustrahlung und P (θ) erfaßt die Abhängigkeit der Streuung vom Beobachtungswinkel θ . Für den osmotischen Druck gilt Gl. (8).

Man wendet Gl. (9) im allgemeinen so an, daß man die Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten bei verschiedenen Konzentrationen mißt und nach $c_2 = 0$ extrapoliert, um S_2^0 und D_2^0 zu erhalten. Bei Verwendung der Gl. (9a) oder (9b) erhält man aus den bei gleichen c_2 -Werten gemessenen S_2 und D_2 neben dem Molekulargewicht gleichzeitig die Virialkoeffizienten.

Während Gl. (9) die Sedimentationsgeschwindigkeit als Grundlage zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet, benutzt eine andere Beziehung das nach längerem Zentrifugieren bei geeigneter Drehzahl sich einstellende Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion. In diesem Fall ist nach Gl. (2a) und (2b) in jedem Abstand x von der Rotationsachse

$$(11) \quad c_2 \cdot S_2 \cdot \omega^2 x = D_2 \frac{dc_2}{dx}$$

Einsetzen in Gl. (9) oder (9b) liefert die Grundgleichungen für eine ideale Lösung

$$(12) \quad M = \frac{RT d \ln c_2}{(1-v_2\rho) \omega^2 x^2}$$

bzw. eine nichtideale Lösung³¹⁾

$$(12a) \quad \frac{dx}{d \ln c_2} (1-v_2\rho) \omega^2 x = \frac{RT}{M_2} + 2Bc_2 + 3Cc_2^2 + \dots$$

wobei man in praxi den Ausdruck $\frac{d \ln c_2}{dx}$ durch $\frac{c''_2}{x''^2 - x'^2}$ ersetzt und c_2 an zwei benachbarten Abständen x' und x'' ermittelt.

Bei einer Substanz von hohem Molekulargewicht ist der Diffusionskoeffizient niedrig; es kann dann sehr lange dauern, bis sich das Sedimentationsgleichgewicht ausgebildet hat. Archibald³³⁾ konnte zeigen, daß sich auch der Übergangszustand von der homogenen zur Gleichgewichtsverteilung der Konzentration in der Zelle zur Ermittlung von $\frac{S_2}{D_2}$ und damit M₂ verwenden läßt.

Gl. (11) muß zu jeder Zeit für den Zellenboden (b) und den Flüssigkeitsmeniskus (m) gelten, also

$$(13) \quad \frac{S_2}{D_2} = \frac{1}{\omega^2} \cdot \frac{\left(\frac{dc}{dx}\right)_m}{x_m c_m} = \frac{1}{\omega^2} \cdot \frac{\left(\frac{dc}{dx}\right)_b}{x_b c_b}$$

Diese Gleichung besagt, daß sich zwar Konzentration und Konzentrationsgradient an den beiden Grenzflächen koninuierlich ändern, die Quotienten $\frac{dc/dx}{x \cdot c}$ jedoch konstant sind. Allerdings ist die erforderliche genaue Bestimmung der beiden dc/dx- und c-Werte nicht ganz einfach, so daß man bei diesem Verfahren mit größeren Fehlergrenzen rechnen muß.

Einfluß der Polymolekularität

Die vorstehenden Gleichungen gelten nur für binäre Lösungen, d. h. für eine molekulareinheitliche Substanz in einem reinen Lösungsmittel. Die meisten der natürlichen und synthetischen Polymeren bestehen jedoch aus Molekülen sehr verschiedener Größe, und es lassen sich daher nur Durchschnittswerte für das Molekulargewicht angeben.

Man unterscheidet Zahlen-, Gewichts- und z-Durchschnitt (M_n, M_w, M_z). Den Zahlendurchschnitt erhält man bei Messungen

des osmotischen Druckes und der kolligativen Eigenschaften, den Gewichtsdurchschnitt z. B. aus der Lichtstreuung und den z-Durchschnitt mit Hilfe der Gleichgewichts-Ultrazentrifuge. Besitzt jedes i-mere den Gewichtsbruch m_i bezogen auf das Gesamtpolymer, so wird

$$(14) \quad M_n = \frac{\sum_i m_i}{\sum_i m_i M_i}; M_w = \frac{\sum_i m_i M_i}{\sum_i M_i}; M_z = \frac{\sum_i m_i M_i^2}{\sum_i m_i M_i}$$

wofür man auch allgemein³⁴⁾ schreiben kann

$$(14a) \quad M_\beta = \frac{\sum_i m_i M_i^\beta}{\sum_i m_i M_i^{\beta-1}} \quad \begin{array}{ll} \beta = 0 & \text{für } M_n \\ \beta = 1 & \text{für } M_w \\ \beta = 2 & \text{für } M_z \end{array}$$

und $\beta = 3, 4, \dots$ für manchmal interessierende höhere Durchschnittswerte von M wie z+1, z+2 ...

Ein Maß für die Uneinheitlichkeit des Polymeren liefert der Quotient zweier Durchschnittswerte. Nach Schulz³⁵⁾ ist die Uneinheitlichkeit U durch

$$(15) \quad U = \frac{M_w}{M_n} - 1$$

darstellbar.

Die statistische Standardabweichung σ der Verteilung ist gegeben durch

$$(16) \quad \sigma^2 = M_w^2 \left\{ \frac{M_z}{M_w} - 1 \right\}$$

wobei allerdings zu bedenken ist, daß M_z einen nur schwer exakt zu bestimmenden Durchschnittswert darstellt.

Bei einer polymolekularen Substanz in einem nicht idealen Lösungsmittel sind sowohl das Molekulargewicht als auch die Virialkoeffizienten bzw. Aktivitätskoeffizienten nur als Durchschnittswerte zu erfassen.

Um das Zusammenwirken von Polymolekularität und Nichtidealität zu betrachten, nehmen wir an, daß ein Polymeres aus n Molekulargewichtskomponenten besteht. Es befindet sich jetzt jedes i-mere in einem System, das aus dem Lösungsmittel (Index 1) und den restlichen (n-1) Polymeren besteht. Statt der Änderung des chemischen Potentials mit der Konzentration c₂ ist jetzt die Summe dieser Änderungen über alle Konzentrationen k zu nehmen und in Gl. (7) oder (7a) einzusetzen.

Aus Gl. (5a) folgt für k ≠ i

$$\frac{d\mu_i}{dc_k} = \frac{RT}{M_i} \frac{d\ln \gamma_i}{dc_k}$$

und für k = i

$$\frac{d\mu_i}{dc_i} = \frac{RT}{M_i} \left[\frac{1}{c_i} + \frac{d\ln \gamma_i}{dc_i} \right]$$

Unter der Annahme, daß v_{sp} = v₂ = v_j für alle Polymerisationsgrade gilt, finden wir somit

$$(17) \quad \frac{1}{c_i} \frac{dc_i}{dc_x} + \sum_{k=2}^{n+1} \frac{d\ln \gamma_i}{dc_k} \frac{dc_k}{dx} = \frac{M_i}{RT} (1-v_{sp}\rho) \omega^2 x$$

wobei i ebenfalls von 2 bis n+1 läuft.

Diese Gleichung von Goldberg³⁶⁾ benutzte Fujita³⁷⁾, um aus Gleichgewichtsmessungen nach der Summierung über alle i den Gewichtsdurchschnitt von M zu bestimmen. Hierzu berechnet man aus Gl. (12) bei endlicher Konzentration ein scheinbares Molekulargewicht M_w^{*}. Dieses ist mit M_w verknüpft durch

$$(18) \quad \frac{1}{M_w^*} = \frac{1}{M_w} + \frac{2}{RT} \left[1 + \frac{\lambda^2 M_z^2}{12} \right] \frac{1}{M_w^2} \sum_{i=2}^{n+1} \sum_{k=2}^{n+1} M_i M_k B_{ik} m_i m_k$$

Hierin ist $\lambda = \frac{(1-v_{sp}\rho)(x_b^2 - x_m^2)\omega^2}{2RT}$ und somit das zweite Glied

in der eckigen Klammer nur eine kleine Korrekturgröße. In der runden Klammer steht der zweite Virialkoeffizient, wie er sich aus der Intensität des Streulichtes als Differenz zwischen Lösung und Lösungsmittel nach Kirkwood und Goldberg³⁸⁾ für den Beobachtungswinkel θ = 0 ergibt:

$$(19) \quad \frac{Hc}{\tau} = \frac{1}{M_w} + \frac{2}{RT} \frac{1}{M_w^2} \sum_{i=2}^{n+1} \sum_{k=2}^{n+1} M_i M_k B_{ik} m_i m_k$$

³¹⁾ G. V. Schulz, Z. physik. Chem. 193, 168 [1944].

³²⁾ G. Meyerhoff, Z. Elektrochem. 61, 1249 [1957].

³³⁾ R. J. Goldberg, J. physic. Chem. 57, 194 [1953].

³⁴⁾ H. Fujita, ebenda 63, 1326 [1959].

³⁵⁾ J. G. Kirkwood u. R. J. Goldberg, J. chem. Physics 18, 54 [1950].

Für den osmotischen Druck gilt entsprechend statt Gl. (8)

$$(20) \quad \frac{P}{c} = \frac{RT}{M_n} + \sum_{i=2}^{n+1} \sum_{k=2}^{n+1} B_{ik} m_i m_k c + \dots$$

In den Gleichungen (18) bis (20) ist c die Gesamtkonzentration des gelösten Polymeren.

Nun ist im allgemeinen die Abhängigkeit des zweiten Virialkoeffizienten B vom Molekulargewicht nicht sehr groß, die Mittelwerte von B_{ik} in Gl. (18) bis (20) lassen sich daher mit der heute möglichen Meßgenauigkeit nicht nachprüfen.

Für die praktische Bestimmung von B als dem Maß für die Wechselwirkung zwischen Polymerem und Lösungsmittel dürften daher Gl. (8), (9b) und (10) der binären Lösungen meistens auch für polymolekulare Stoffe ausreichen.

IV. Auswertung und einige charakteristische Meßergebnisse

Molekulargewichtsbestimmung

Die konventionelle Methode der Bestimmung von M besteht darin, daß man die Sedimentationskoeffizienten und in getrennten Versuchen die Diffusionskoeffizienten für eine Konzentrationsreihe ermittelt und entweder einzeln oder als Quotient $\frac{S}{D}$ zur Konzentration null extrapoliert. Die Svedberg-Gleichung (9) bzw. Gl. (9b) liefern dann das Molekulargewicht, das für monomolekulare Substanzen eindeutig ist. Für polymolekulare Substanzen erhält man einen Durchschnittswert $M_{S,D}$, der als $M_{w,w}$ zu bezeichnen ist, wenn S und D beide als Gewichtsdurchschnitte berechnet sind. Nach Jullander³⁹⁾ ist dieses $M_{w,w}$ immer etwas kleiner als M_w . Auch wenn man, wie es meistens geschieht, S aus dem Wandern des Maximums und D aus dem Verhältnis Höhe zu Fläche der Sedimentations- bzw. Diffusionskurve bestimmt und dabei nicht mit exakten Gewichtsdurchschnittswerten operiert, erhält man ein $M_{S,D}$, das etwas kleiner als M_w , aber wesentlich größer als der Zahlendurchschnitt M_n ist.

In den meisten Fällen ist der Unterschied zwischen M_w und $M_{S,D}$ recht klein, wie durch Untersuchungen an polymolekularen Substanzen von sehr verschiedener Einheitlichkeit gezeigt werden konnte (Meyerhoff⁴⁰⁾). Da bei dieser Methode die experimentellen Voraussetzungen am günstigsten sind, ist sie, von extrem uneinheitlichen Präparaten abgesehen, auch heute noch das sicherste Verfahren zur Ermittlung des Molekulargewichtes. In der Ultra-

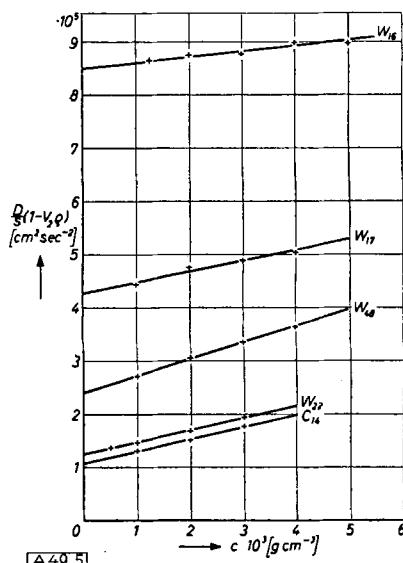


Abb. 5. Bestimmung des Molekulargewichtes $M_{S,D}$ aus der Konzentrationsabhängigkeit von $\frac{D}{S} (1-v_{sp}\rho)$ für Szwarc-Polystyrole in Toluol

³⁹⁾ I. J. Jullander, Ark. Kem., Mineralog. Geol., Ser. A 21, 1 [1945].

⁴⁰⁾ G. Meyerhoff, Makromolekulare Chem. 12, 45 [1954].

zentrifuge ist dabei nur das Wandern des gut messbaren Sedimentationsgipfels zu verfolgen, die Sedimentationskurve selbst braucht im einzelnen nicht vermessen zu werden. Dies ist nur für die Diffusionskurve erforderlich, die im getrennten Versuch unter wesentlich günstigeren Bedingungen, als es in der Ultrazentrifuge möglich ist, bestimmt werden kann. In der Diffusionszelle läßt sich gut eine Temperaturkonstanz von $0,01^\circ\text{C}$ erreichen, die Zellscheiben stehen nicht unter dem extrem hohen Druck wie in der Zentrifugenzelle und weisen daher kaum Verzerrungen auf, außerdem kann man die Belichtungszeit auf $1/100$ reduzieren.

Abb. 5 zeigt als Beispiel die Bestimmung der Molekulargewichte von Polystyrolen⁴¹⁾ nach Gl. (9b).

Da die getrennte Diffusionsmessung ein etwas zeitraubendes Verfahren ist, haben sich viele Autoren bemüht, diese Messung zu vermeiden und M direkt aus dem Sedimentationsbild zu bestimmen. Die hierzu erforderlichen mathematischen Beziehungen sind bekannt, jedoch kann die experimentelle Methodik noch nicht immer genügend genaue Sedimentationsbilder liefern. Insbesondere ist die Schärfe der Optiken, trotz großer Fortschritte in der letzten Zeit, häufig noch etwas unvollkommen. Man muß also bei den nachstehend beschriebenen Verfahren oft mit etwas geringerer Genauigkeit zufrieden sein.

Beim Sedimentationsgleichgewicht beobachtet man den Verlauf der Konzentration c und des Konzentrationsgradienten $\frac{dc}{dx}$, wie er sich nach recht langer Zeit zwischen Meniskus und Zellenboden einstellt. Nach Gl. (12) oder (12a) erhält man daraus für jede Stelle x der Zelle ein Molekulargewicht M_{wx} . Integriert man diese M_{wx} über die gesamte Zellentiere, so gewinnt man den Gewichtsdurchschnitt

$$M_w = \frac{\int_{x_b}^{x_m} M_{wx} \cdot x \cdot c_x \cdot dx}{\int_{x_b}^{x_m} x \cdot c_x \cdot dx}$$

Auch der z -Durchschnitt und etwas weniger eindeutig der Zahlendurchschnitt von M ist aus dem Gleichgewicht bestimmbar.

Unter Verwendung von Archibalds Gleichungen³⁹⁾ konnten Kegel u. Mitarb.⁴²⁾ zeigen, daß sich aus dem scheinbaren Molekulargewicht M_w^*

$$(18a) \quad \frac{1}{M_w^*} = \frac{(1-v_{sp}c) \omega^2 x}{RT \ln c} = \frac{1}{M_w} [1 + f(B_{ik})c + \dots]$$

der Gewichtsdurchschnitt M_w berechnen läßt, wenn man $\frac{1}{M_w^*}$ nach $c = 0$ extrapoliert. Ebenso wie beim eigentlichen Archibalds-Verfahren, bei dem man c und $\frac{dc}{dx}$ am Boden und Meniskus als Funktion der Zeit t beobachtet, hat man vorher zur Zeit $t = 0$ zu extrapolieren. Durch diese Zeitemporelation eliminiert man die sich bei polymolekularen Substanzen einstellende Verteilung der verschiedenen hohen Molekulargewichte. Es reichern sich ja die hohen Anteile am Zellenboden, die leichten Anteile am Meniskus an.

Fujita⁴³⁾ gibt eine Methode an, wie man aus dem Sedimentationsbild für monomolekulare Substanzen den Diffusionskoeffizienten ermitteln kann. Von Gehatia⁴⁴⁾ stammen verschiedene Verfahren, die ebenfalls D aus der Sedimentationskurve zu berechnen gestatten, oder auch sofort das Verhältnis $\frac{S}{D}$ liefern. Er entwickelt z. B. die Gl. (19) von Williams u. Mitarb.³⁹⁾ mit $\alpha = 2\omega^2 s$ in eine

$$(19) \quad \left(\frac{dc}{dx} \right)_{\max} = c_0 \frac{e^{-\alpha}}{\left[\frac{4\pi}{\alpha} (e^{-\alpha} t - 1) \right]^{1/2}}$$

Reihe, die natürlich nur für nicht zu lange Sedimentationszeiten gültig ist. In den Zellen, die eine Grenzschicht in der Zellenmitte bilden (Abb. 3c), ist dies verhältnismäßig leicht zu realisieren. Für den Gradienten folgt

$$(19b) \quad \frac{4\pi t}{c_0^2} \left(\frac{dc}{dx} \right)_{\max}^2 = \frac{1}{D} - 5 \frac{s\omega^2 t}{D},$$

⁴¹⁾ G. Meyerhoff, Z. physik. Chem. N. F. 23, 100 [1960].

⁴²⁾ G. Kegel, S. M. Klainer u. W. J. Salem, J. physic. Chem. 61, 1286 [1957].

⁴³⁾ H. Fujita, J. chem. Physics 24, 1084 [1956]; 31, 5 [1959].

⁴⁴⁾ M. Gehatia, Kolloid-Z. 167, 1 [1959].

woraus sich $\frac{S}{D}$ gut bestimmen lässt. D ergibt sich nur ungefähr, da die wahre Zeit t nicht bekannt ist: sie fällt wegen unvermeidlicher kleiner Störungen nicht mit dem Sedimentationsbeginn zusammen. D bestimmt man daher besser aus der durch t dividierten Gl. (19b) als $f\left(\frac{t}{t}\right)$, wobei dann $\frac{S}{D}$ ungenauer zu erfassen ist. Aus der Extrapolation von $\frac{S}{D}$ nach $c = 0$ erhält man einen Durchschnittswert $M_{S,D}$. Diese und weitere von (Gehatia⁴⁴) vorgeschlagene Methoden gehen zum Teil über die heute experimentell erreichbare Genauigkeit hinaus.

Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung aus dem Sedimentationsdiagramm

Untersucht man eine aus wenigen Komponenten bestehende Substanz, so lassen sich die Komponenten in der Ultrazentrifuge vollständig trennen, falls sie nicht zufällig gleiche oder fast gleiche Sedimentationskoeffizienten besitzen. Abb. 6a zeigt ein normales Human-Serum, das in die Albumin (A)-, Globulin (G)- und Makroglobulin-Anteile (M) aufgespalten wird. Zum Vergleich ist in Abb. 6b darunter ein pathologisches Serum mit stark angereicherten Makroglobulin-Anteilen wiedergegeben⁴⁵). Es handelt sich um eine Makroglobulinämie Waldenström⁴⁶), die allein durch ein Sedimentationsdiagramm sicher nachgewiesen werden kann.

Schwieriger ist die Untersuchung von polymolekularen Substanzen, bei denen sehr viele kontinuierlich ansteigende Molekulargewichtsanteile mit ebenso kontinuierlich zuneh-

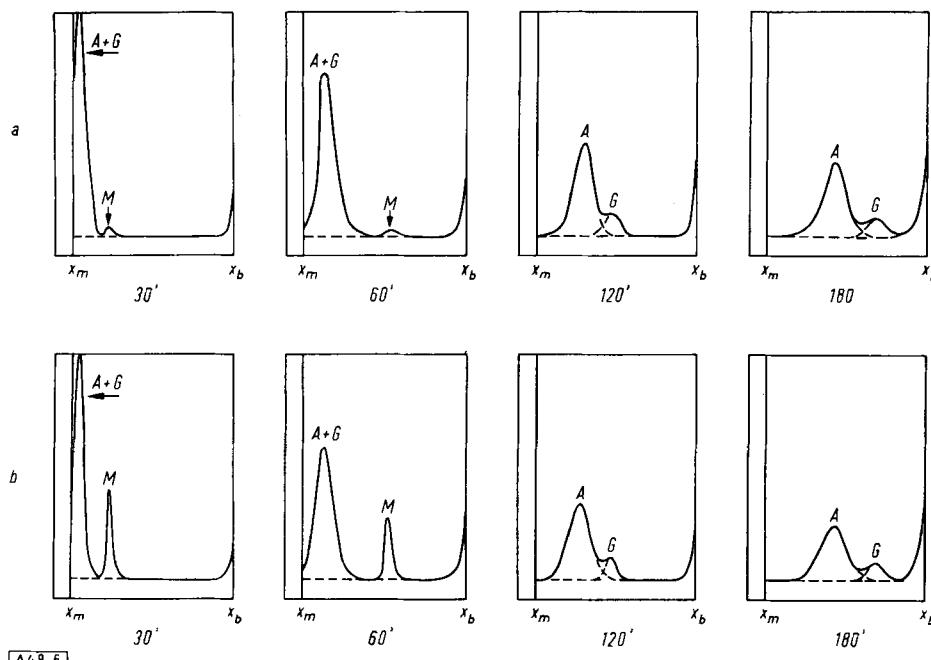


Abb. 6. Sedimentationsbilder von Human-Serum, mit Pufferlösung 1:3 verdünnt. a) normales Serum; b) Serum mit pathologisch hohem Makroglobulin-Gehalt

menden Sedimentationskoeffizienten vorhanden sind. Im Sedimentationsbild überlagert sich der Sedimentation die Diffusion, die sich jedoch ausschalten lässt, wenn man nach der Zeit $t = \infty$ extrapoliert. Da im allgemeinen sowohl S als auch D konzentrationsabhängig sind, ist außerdem nach $c = 0$ zu extrapolieren. Aus der Verteilung der Sedimentationskoeffizienten lässt sich dann bei bekanntem Zusammenhang zwischen S und M die Molekulargewichtsverteilung angeben.

Als erste beschäftigten sich Signer und Groß⁴⁷) mit diesem Problem, denen zahlreiche Bearbeiter folgten. Jedoch gelang es erst in letzter Zeit Eriksson⁴⁸), zuverlässige Ergebnisse zu erhalten.

⁴⁵) G. Meyerhoff, unveröffentl.

⁴⁶) J. Waldenström, Acta med. scand. 117, 216 [1944].

⁴⁷) R. Signer u. H. Gross, Helv. chim. Acta 17, 726 [1934].

⁴⁸) A. F. V. Eriksson, Acta chem. scand. 10, 360 [1956].

Wie Cantow⁴⁹) zeigte, lässt sich die Extrapolation nach $c = 0$ vermeiden, indem man mit einem wechselwirkungsfreien Lösungsmittel (Θ -Lösungsmittel mit $B = 0$) arbeitet. Man kann in diesem Fall die Konzentrationsabhängigkeit von S und D vernachlässigen und aus den bei einer einzigen Konzentration erhaltenen Sedimentationsbildern die Molekulargewichtsverteilung ermitteln. Allerdings sind bei einem Θ -Lösungsmittel die Anforderungen an die

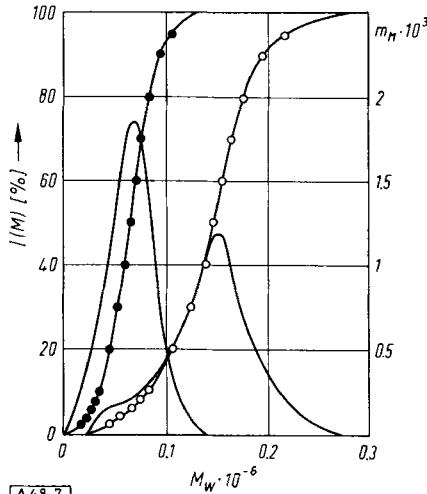


Abb. 7. In der Ultrazentrifuge im Θ -Lösungsmittel Cyclohexan bestimmte Molekulargewichtsverteilungen zweier Szwarc-Polystyrole
● $M_w = 65000, M_n = 53000$ ○ $M_w = 143000, M_n = 124000$

Temperaturkonstanz höher als bei einem guten Lösungsmittel. Abb. 7 zeigt derart gewonnene Molekulargewichtsverteilungen von Polystyrolen⁴⁹).

Bestimmung der Knäueldimensionen aus S (oder D) und der Viskositätszahl $[\eta]$

Neben dem zweiten osmotischen Virialkoeffizienten B ist die Ausdehnung eines fadenförmigen Moleküls eine interessante Größe zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel und gelöstem Polymeren. Man misst diese Ausdehnung als Fadenendenabstand oder Trägheitsradius in Lösung meistens mit Hilfe der Lichtstreuung, die jedoch nur Molekulargewichte über $M \approx 300000$ sicher zu erfassen vermag. Der Sedimentationskoeffizient S (oder D) erlaubt

die Berechnung dieser Größen auch für wesentlich niedrigere Molekulargewichte. Man hat dann lediglich die einfach zu bestimmende Viskositätszahl zusätzlich zu messen.

Mit zwei von Brinkman⁵⁰) und Debye und Bueche⁵¹) angegebenen Funktionen $\Phi(\sigma)$ und $\psi(\sigma)$ lassen sich Viskosität und Reibung als Funktion des Molekulargewichtes und des Trägheitsradius R^* darstellen. Hierin bedeutet σ ein Maß für das Eindringen der Strömung in das Knäuel. Die ursprünglichen Funktionen

$$(20) \quad [\eta] = 5,43 \cdot 10^{24} \frac{R^{*3}}{M} \Phi(\sigma)$$

und

$$(21) \quad \frac{S \cdot n}{(1 - v_{sp} \rho)} = \frac{kT}{D \cdot \eta} = 24,3 R^* \cdot \psi(\sigma)$$

⁴⁹) H. J. Cantow, Makromolekulare Chem. 30, 169 [1959].

⁵⁰) H. C. Brinkman, Physica 13, 447 [1947].

⁵¹) P. Debye u. A. M. Bueche, J. chem. Physics 16, 573 [1948].

(k = Boltzmann-Konstante, η = Viscosität des Lösungsmittels) lassen sich nur auswerten, wenn man spezielle

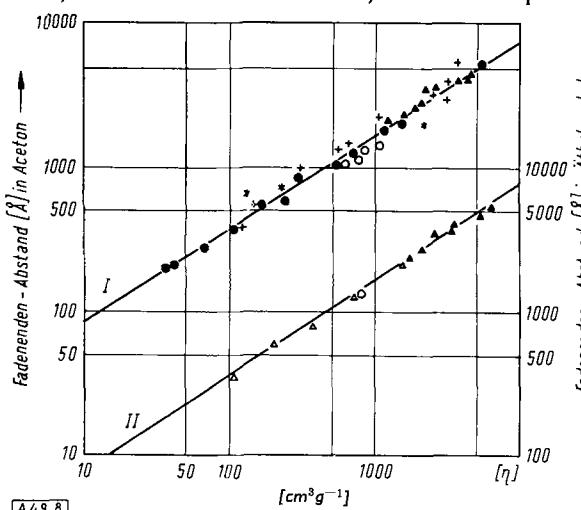


Abb. 8. Aus dem Sedimentationskoeffizienten und der Viscositätszahl bestimmte Fadenendenabstände für Cellulosenitrate in Aceton (Kurve I) und Äthylacetat (Kurve II) als Funktion der Viscositätszahl. Zum Vergleich sind Lichtstreuungsmessungen eingezeichnet. Kreise = Sedimentationsmessungen (● Baumwolle, ○ Linters, □ Holz-Zellstoff); Lichtstreuungsmessungen: + Holtzer, • Badger, ▲ Huque, △ Hunt

Zuschriften

Quantitative Autoradiographie tritierter Verbindungen in Papierchromatogrammen

Von Prof. Dr. A. NARATH und cand. ing. D. GUNDLACH
Institut für angewandte Photochemie und Filmittechnik
der Technischen Universität Berlin-Charlottenburg

Die Autoradiographie gilt allgemein als qualitative Methode. Es konnte aber gezeigt werden, daß auch quantitative Bestimmungen autoradiographisch möglich sind. Die Untersuchungen wurden mit tritiertem Thymin vorgenommen und führten zu folgender Beziehung:

$$(1) \quad S'_{\max} = a \cdot \log \frac{A_0 \cdot t}{F \cdot d} - b$$

S'_{\max} = $\log (10^{S_{\max}} - 1)$ nach Seidel transformiert die maximale Schwärzung innerhalb eines Chromatogrammflecks.

A_0 = Gesamtaktivität des Chromatogrammflecks (μC).

t = Expositionzeit in Tagen

F = Fläche des Chromatogrammflecks (cm^2)

d = Stärke des Chromatogrammpapiers (cm)

a = Anstieg der linearen Schwärzungskurve nach (1)

b = Achsenabschnitt der linearen Schwärzungskurve nach (1).

Für die Bestimmung unbekannter Aktivitäten ergibt sich damit aus (1):

$$(2) \quad A_0 = \frac{F \cdot d}{t} 10^{\frac{S'_{\max} + b}{a}}$$

Während der Anstieg a durch das photographische Material und die Entwicklungsbedingungen festgelegt wird, ist der Achsenabschnitt b ein Maß für die Verteilung der Substanz innerhalb eines Chromatogrammflecks. Betrachtet man diese Verteilung als einen geometrischen Körper, dessen Inhalt $V = g \cdot F \cdot h$ (V = Volumen; F = Fläche; h = Höhe; g = geometrischer Faktor) ist, so ergibt sich, daß der Achsenabschnitt b dem geometrischen Faktor g proportional ist.

Als photographische Emulsionen wurden hochempfindliche, handelsübliche Röntgenfilme (Gevaert Structurix D 10, AGFA SINO) und Röntgenfilme ohne Schutzschicht (Gevaert Structurix D 10 ohne Schutzschicht, Adox Versuchsemulsion Nr. 232) benutzt. Durch Ausschaltung der durch die Schutzschicht bedingten Abschirmung der schwachen β -Strahlung des Tritiums konnten ein bis zwei Zehnerpotenzen an Empfindlichkeit gewonnen werden.

Eine allgemeine Aussage über die untere Nachweigrenze ist nicht möglich, da diese von zu vielen Faktoren abhängt. Immerhin gelang es, Aktivitäten von $10^{-5} \mu\text{C}/\text{cm}^2$ bei einer Belichtungszeit von 10 Tagen zu bestimmen. Dabei handelt es sich um die an der Oberfläche des Chromatogrammflecks wirksame Aktivität, die ohne Zerstörung derselben bestimmt wurde. Bei hohen Gesamt-

Voraussetzungen über $R^* = f(M)$ macht, z. B. Gaußsche DichteVerteilung im gelösten Knäuel mit $R^* \sim M^{1/2}$. Für beliebigen Zusammenhang zwischen R^* und M (das Wurzelgesetz $R^* \sim M^{1/2}$ gilt nur für 0-Lösungsmittel), hat man aus Gl. (20) und (21) R^* zu eliminieren und aus

$$(22) \quad \frac{S' \cdot \eta}{(1 - v_{sp} \rho)} \frac{1}{(M[\eta])^{1/3}} = \frac{kT}{D\eta} \frac{1}{(M[\eta])^{1/3}} = 1.38 \cdot 10^{-7} \frac{\phi(\sigma)}{(\Phi(\sigma))^{1/3}}$$

zunächst die Größe σ zu bestimmen, um dann aus Gl. (20) oder (21) den Radius R^* zu berechnen. Dieses von Peterlin⁵²⁾ vorgeschlagene Verfahren ergibt gute Übereinstimmung mit den aus Streulichtmessungen gewonnenen Werten. Hierfür zeigt Abb. 8 ein Beispiel, in der für Cellulosenitrate in Aceton und Äthylacetat aus Sedimentationsversuchen berechnete Fadenendenabstände (Kreise) und Fadenendenabstände aus Streulichtmessungen als Funktion der Viscositätszahlen dargestellt sind⁵³⁾.

Der Autor dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie für die Unterstützung seiner Arbeiten.

Eingegangen am 14. April 1960 [A 49]

⁵²⁾ A. Peterlin, J. Colloid. Sci. 10, 587 [1955].

⁵³⁾ G. Meyerhoff, J. Polymer Sci. 29, 399 [1958]; Makromolekulare Chem. 32, 249 [1959].

aktivitäten ergaben z. B. $75 \mu\text{C}$ (30γ Substanz) in 8 Stunden eine maximale Schwärzung von 0,2 über dem Schleier bei Verwendung einer Emulsion ohne Schutzschicht.

Eingegangen am 22. Juli 1960 [Z 953]

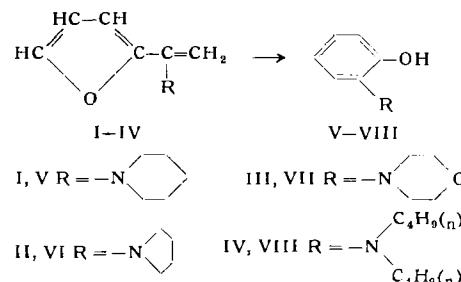
Umlagerung von Enaminen aus 2-Acetylfur'an in N-substituierte o-Aminophenole

Von Prof. Dr. L. BIRKOFER und Dipl.-Chem. G. DAUM
Chemisches Institut der Universität Köln

2-Acetylfur'an läßt sich mit sekundären Aminen in Gegenwart katalytischer Mengen Eisessig zu Enaminen umsetzen. Als Amine wurden Piperidin, Pyrrolidin, Morphin und Di-n-butylamin eingesetzt, und N-[1-(α -Furyl)-vinyl-(1)]-piperidin (I), N-[1-(α -Furyl)-vinyl-(1)]-pyrrolidin (II), N-[1-(α -Furyl)-vinyl-(1)]-morpholin (III) sowie [1-(α -Furyl)-vinyl-(1)]-di-n-butylamin (IV) erhalten.

Während man im allgemeinen Enamine durch Destillation reinigen kann, trat beim Versuch, die Enamine I—IV zu destillieren, eine Umlagerung unter Aufspaltung des Furanringes ein, wobei sich substituierte o-Aminophenole bildeten.

Es entstand aus I o-Piperidyl-(1)-phenol¹⁾ (V) (Ausb.: 65 %, Fp 75 °C), aus II o-Pyrrolidyl-(1)-phenol²⁾ (VI) (65 %, Fp 111 °C), aus III o-Morpholyl-(4)-phenol (VII) (56 %, Fp 131 °C) und aus IV o-Di-n-butyl-aminophenol (VIII) (50 %, Kp₁₃, 143 °C). V-Hydrochlorid: Fp 175 °C, VI-Hydrochlorid: Fp 188 °C, VII-Hydrochlorid: Fp 220 °C und VIII-Hydrochlorid: Fp 181 °C. Die IR- und UV-Spektren bestätigten die Struktur der Verbindungen V—VIII.



Eingegangen am 25. Juli 1960 [Z 958]

¹⁾ V ist identisch mit o-Piperidyl-(1)-phenol, das von A. H. Sommers u. S. E. Aaland, J. Amer. chem. Soc. 75, 5280 [1953], auf anderem Wege dargestellt wurde. — ²⁾ VI ist mit dem von A. H. Sommers, J. Amer. chem. Soc. 78, 2439 [1956], auf andere Weise gewonnenen o-Pyrrolidyl-(1)-phenol identisch.