

Bestimmung des Molekulargewichts in der Ultrazentrifuge nach dem Archibald-Verfahren

Von Priv.-Doz. Dr. H.-G. ELIAS*)

Technisch-Chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, Schweiz

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Hermann Staudinger zum 80. Geburtstag gewidmet

Das Verfahren arbeitet schnell, mit geringen Substanzmengen und gestattet die Ermittlung des Gewichtsmittels des Molekulargewichtes und unbekannter Konzentrationen. Bei aus zwei Komponenten bestehenden paucimolekularen Substanzen lassen sich Molekulargewicht und Konzentration jeder einzelnen Komponente bestimmen. Die Ermittlung von Molekulargewichts-Verteilungen erscheint denkbar. Der Anwendungsbereich erstreckt sich von Molekulargewichten von ca. 100 bis zu einigen 10^6 .

1. Einleitung

Ultrazentrifugen-Methoden¹⁾ haben trotz des apparativen Aufwandes unter den Verfahren zur Molekulargewichtsbestimmung von Makromolekülen stets einen bevorzugten Platz eingenommen, da sie als einzige zusätzliche Aussagen über Pauci- bzw. Polymolekularität gestatten. Als vorteilhaft erweist sich außerdem, daß die Absolutkonzentration des gelösten Makromoleküls nicht bekannt zu sein braucht. Zur Ausschaltung der bei endlichen Konzentrationen auftretenden Wechselwirkungseffekte genügt vielmehr die Kenntnis der Meßdaten an einer Verdünnungsreihe. Schließlich ist die Vorbereitung der Proben weit weniger kompliziert als z. B. bei Streulichtmessungen.

Experimentell und theoretisch hat es sich als zweckmäßig erwiesen, bei den Vorgängen in der Ultrazentrifuge drei Stadien zu unterscheiden:

1. den Transportprozeß, der im Grenzfall durch eine unendlich hohe Sedimentations-Geschwindigkeit und eine Diffusionsgeschwindigkeit null gekennzeichnet ist,

2. den Übergangszustand, eine Periode, bei der im allgemeinen der Einfluß der Diffusion während des Transportes schon so merklich ist, daß keine ungehinderte („freie“) Sedimentation auftreten kann, und schließlich

3. das Sedimentationsgleichgewicht, bei dem der Fluß durch Sedimentation und der durch Diffusion sich in jedem Volumelement der Ultrazentrifugenzone gerade ausbalancieren.

Von den beiden schon von Svedberg^{1a)} vorgeschlagenen Verfahren wurde bislang überwiegend die Transportmethode (Verfahren der Sedimentationsgeschwindigkeit) verwendet, während das Gleichgewichtsverfahren mehr zur Überprüfung theoretischer Vorstellungen und weniger als Routine-Methode diente.

Die Vorteile der Transportmethode liegen darin, daß sie auf relativ einfache Weise Paucimolekularität bzw. die Verteilung der Sedimentationskoeffizienten erkennen läßt. Bei der Bestimmung von Molekulargewichten können jedoch Komplikationen auftreten, die durch den Transportvorgang selbst bedingt sind und nur dann wegfallen, wenn das hypothetische System eines molekulareinheitlichen, ungeladenen Gelöstes in einem einheitlichen Lösungsmittel in idealer Lösung vorliegt.

Ist dagegen eine molekulareinheitliche Substanz in einem nicht-einheitlichen Lösungsmittel gelöst (z. B. Enzyme in Salzlösungen), dann ist das berechenbare Molekulargewicht \bar{M}_{SD} nicht mehr durch die Svedberg-Gleichung (1) gegeben, sondern durch Gl. (2)²⁾.

A ist eine Konstante, in die die Kreuzdiffusionskoeffizienten und die thermodynamischen Aktivitätsfunktionen der Bestandteile Enzym-Salz und Wasser eingehen. Selbst bei unendlicher Verdünnung des makromolekularen Anteiles verschwindet also dieser Einfluß nicht.

*) Erweiterte Fassung eines Vortrages auf der „Informal Discussion on Ultracentrifugation“ der Faraday Society vom 14.–15. September 1960 in Birmingham sowie mehrerer Vorträge auf den Ultrazentrifugen-Kursen der Fa. Beckman Instruments GmbH, München, in den Jahren 1958–1960.

1) a) Th. Svedberg u. K. O. Pedersen: Die Ultrazentrifuge, Verlag Steinkopff, Dresden und Leipzig 1940; photomechanischer Nachdruck, Johnson Reprint Co., New York 1960. b) G. Meyerhoff, Angew. Chem. 72, 699 [1960].

2) R. L. Baldwin, J. Amer. chem. Soc. 80, 496 [1958].

Bei der üblichen Berechnung des Molekulargewichtes aus Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten sollte man daher bei Systemen mit Lösungsmitteln aus mehr als einer Komponente nicht das wahre Molekulargewicht der gelösten makromolekularen Substanz erhalten. Der Fehler scheint jedoch i. allg. klein zu sein. Er

$$(1) \quad \bar{M}_{SD} = \frac{RTs_0}{D_0(1 - \nu_{PLM})}$$

$$(2) \quad \bar{M}_{SD} = \frac{RTs_0}{D_0(1 - \nu_{PLM})(1 + c_s A)}$$

s_0 , D_0 = Sedimentations- bzw. Diffusions-Koeffizienten bei unendlicher Verdünnung; ν_{PLM} = Dichte des Lösungsmittels; ν = partielles spezifisches Volumen des gelösten Makromoleküls; c_s = Salzkonzentration

ist aber groß bei Systemen, die Moleküle sehr unterschiedlicher Größe mit starken Wechselwirkungskräften enthalten und dort wiederum bei solchen, bei denen der 2. Virialkoeffizient A_2 niedrig oder negativ ist, wie es kürzlich für gepufferte Lösungen von 3-Phospho-D-glycerinaldehyd-dehydrogenase gezeigt werden konnte³⁾. Hier erhält man bei der Berechnung des Molekulargewichtes mit Gl. (1) Werte, die mit der Temperatur abnehmen, aber eindeutig nicht auf reversiblen Assoziations-Dissoziations-Gleichgewichten beruhen.

Hat man dagegen ein einheitliches Lösungsmittel und ein polymolekulares Gelöstes (z. B. synthetische Hochpolymere), dann berechnet sich aus Gl. (1) ein gemischtes Mittel des Molekulargewichtes^{4–7)}, dessen numerischer Wert von der Art der Auswertung und dem Typ und der Breite der Verteilungsfunktion der Molekulargewichte abhängt. Nach anderer Auffassung⁸⁾ soll das gemischte Mittel außerdem noch von der Abhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten vom Molekulargewicht, also vom Lösungsmittel, abhängen. Hinweise für einen solchen Effekt wurden bei den Messungen an extrem hochmolekularen Dextranen (Molekulargewichte in der Größenordnung von $5 \cdot 10^6$) gefunden⁹⁾.

Das Sedimentationsgleichgewicht ist dagegen theoretisch viel einfacher zu erfassen^{10,11)}. Für die praktische Verwendung der Methode sind jedoch die Zeiten bis zur Einstellung des Gleichgewichtes auch dann immer noch zu hoch, wenn man sehr geringe Füllhöhen benutzt¹²⁾. Das Sedimentations-Gleichgewicht liefert aber bei polymolekularen Substanzen einfach das Gewichtsmittel \bar{M}_w des Molekulargewichtes, ferner spielen die Kreuzdiffusionskoeffizienten keine Rolle.

Das Verfahren von Archibald¹³⁾ verbindet diese Vorteile der Gleichgewichtsmethode mit dem geringeren Zeitbedarf des Transportverfahrens. Es beruht auf der einfachen Überlegung, daß zu jeder beliebigen Zeit an Meniscus und Boden der Ultrazentrifugenzone die Bedingungen des Sedimentationsgleichgewichtes herrschen müssen, da an diesen Stellen weder etwas heraus sedimentieren noch hinein-

3) H.-G. Elias, A. Garbe u. W. Lamprecht, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319, 22 [1960].

4) I. Jullander, Ark. Kem., Mineralog. Geol., Ser. A 27, Nr. 8 [1945].

5) S. J. Singer, J. Polymer Sci. 1, 445 [1946].

6) G. Herdan, Nature [London] 164, 502 [1949].

7) P.-O. Kinell, Svensk kem. Tidskr. 67, 19 [1949]; Ark. Kem. 14, 327 [1959].

8) L. E. Miller u. F. E. Hamm, J. phys. Chem. 57, 110 [1953].

9) H.-G. Elias, Makromolekulare Chem. 33, 166 [1959].

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

11) R. L. Baldwin u. K. E. van Holde, Fortschr. Hochpolymer-Forsch. 1, 451 [1960].

12) K. E. van Holde u. R. L. Baldwin, J. phys. Chem. 62, 734 [1958].

13) W. J. Archibald, J. phys. Colloid Chem. 57, 1204 [1947].

diffundieren kann. Bei einem echten Gleichgewicht liegt dagegen in allen Volumelementen der Zelle ein vollständiges Gleichgewicht vor.

2. Theoretische Grundlagen

Während der Annäherung an das Sedimentations-Gleichgewicht ist der Fluß J_i des Gelösten i durch die Einheitsquerschnittsfläche der Ultrazentrifugenzelle in unendlich verdünnter Lösung

$$(3) \quad J_i = c_i s_i \omega^2 r - D_i (\partial c_i / \partial r) \quad (i = 1, \dots, q)$$

wobei r der Abstand vom Rotationszentrum und $(\partial c / \partial r)$ der Konzentrationsgradient ist. Im Gleichgewicht ist der Fluß J_i an allen Stellen der Ultrazentrifugen-Zelle gleich null. Da nun der Meniscus m der Lösung und der Boden b der Zelle für den Fluß des Gelösten undurchlässig sind, müssen an diesen Stellen stets die Bedingungen des Gleichgewichtes herrschen, also

$$\text{am Meniscus: (4a)} \quad \left(\frac{s_i}{D_i} \right)_m = \frac{(\partial c_i / \partial r)_m}{(c_i)_m \omega^2 r_m} = \frac{\delta_m}{\omega^2}$$

$$\text{am Boden: (4b)} \quad \left(\frac{s_i}{D_i} \right)_b = \frac{(\partial c_i / \partial r)_b}{(c_i)_b \omega^2 r_b} = \frac{\delta_b}{\omega^2}$$

Zur Auswertung sind daher jeweils Konzentrationsgradient $(\partial c / \partial r)$ und Konzentration c_i an Meniscus und Boden, der Abstand von Meniscus r_m und Boden r_b zum Rotationszentrum und die Winkelgeschwindigkeit ω zu bestimmen. Alle Größen können aus einem Ultrazentrifugen-Versuch ermittelt werden. Für molekular-einheitliche Stoffe sind δ_m und δ_b gleich groß und zeitunabhängig.

Durch Kombination der Gl. (4) mit Gl. (1) erhält man daher einen Ausdruck für das Molekulargewicht

$$(5) \quad M_i = \frac{RT \delta_m}{\omega^2 (1 - v \rho_{LM})} = \frac{RT \delta_b}{\omega^2 (1 - v \rho_{LM})}$$

Die Gleichungen (4) und (5) ergeben sich aus der kinetischen Theorie und gelten nur für Zweikomponenten-Systeme. Bei Mehrkomponenten-Systemen sind sie nicht mehr gültig, da die Sedimentations- und Diffusions-Koeffizienten nicht einfach durch die entsprechenden Mittelwerte ersetzt werden können. Sie sind vielmehr durch die Ausdrücke der Ableitungen der Thermodynamik irreversibler Prozesse zu ersetzen^{2,14}). Eingehendere Betrachtungen haben jedoch gezeigt^{15,16}), daß Gl. (5) auch zur Bestimmung des Molekulargewichtes eines polymolekularen Gelösten in einem einheitlichen Lösungsmittel dienen kann. Auf die Frage des Mittelwertes des Molekulargewichtes wird weiter unten eingegangen. Gl. (5) gilt nicht mehr, wenn Lösungsmittelgemische oder Salzlösungen als Lösungsmittel verwendet werden. Hierdurch hervorgerufene Fehler scheinen jedoch innerhalb der experimentellen Fehler zu liegen.

Der Wert der von Archibald vorgeschlagenen Methode als Reinheitstest wurde schon früh von Pedersen¹⁷) diskutiert. Trotzdem mag es erstaunlich scheinen, daß es fast 10 Jahre dauerte, bis das Verfahren größere Beachtung fand, von einzelnen Pionierarbeiten^{18,19}) abgesehen. Der Grund dafür liegt darin, daß die experimentellen Einrichtungen nicht verfügbar waren, die für eine genaue Ermittlung der Versuchsdaten erforderlich sind. Die Fort-

schritte der letzten Jahre — $\lambda/2$ -Phasenplatte als Schlierendiaphragma, Zellen mit synthetischer Grenzschicht, gute Drehzahlkonstanz bei niedrigen Geschwindigkeiten sowie Temperaturkontrolle und -regelung während des Versuches — lassen vermuten, daß sich das Archibald-Verfahren als Routine-Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes immer stärker durchsetzen wird.

Aus Gl. (5) geht hervor, daß zur Ermittlung des Molekulargewichtes die Bestimmung der Konzentrationsgradienten dc/dr sowie der Konzentrationen an Meniscus und Boden erforderlich sind. Da bei der Ableitung ein molekular-einheitliches Gelöstes in einem idealen bzw. pseudoidealen Lösungsmittel (keine Konzentrations-Abhängigkeit des scheinbaren Molekulargewichtes) vorausgesetzt wurde, muß ferner noch der Einfluß der Molekulargewichtsverteilung bzw. der Paucimolekularität und des nichtidealen Lösungsverhaltens berücksichtigt werden. Diese Fragen werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Archibald¹³) schlug noch ein zweites Verfahren vor, das unabhängig von den (dc/dr) -Werten am Meniscus und Boden arbeitet. Wegen seiner aufwendigen Rechenarbeit ist es bisher nur einmal²⁰) verwendet worden.

3. Die Ermittlung des Konzentrationsgradienten (dc/dr)

Bei einem Archibald-Versuch unter Benutzung einer Philpot-Svensson-Optik erhält man Bilder wie Abb. 1. Der

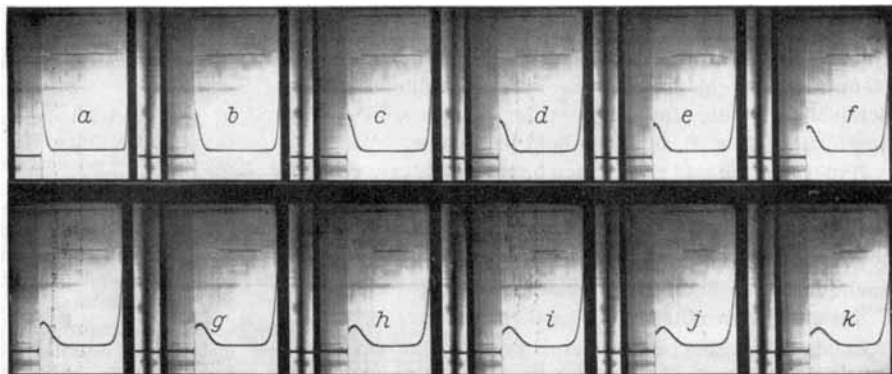


Abb. 1. Philpot-Svensson-Aufnahmen eines Ultrazentrifugen-Versuches nach Archibald an einem Copolymerisat aus Fumarsäurediäthylester und Isobutylen⁴⁸) (Fraktion IV) in Aceton. Spinco-Ultrazentrifuge der Fa. Beckman Instruments, 24630 U/min, Phasenwinkel 70°, Aufnahme-Abstand 8 min, Ausgangskonzentration $c_0 = 1,203 \cdot 10^{-2}$ g/ml, $T = 25,0^\circ\text{C}$

wahre Konzentrationsgradient dc/dr ergibt sich aus der auf einer Zeichnung der vergrößerten photographischen Platte ablesbaren Höhe y zu

$$(6) \quad dc/dr = \frac{y \cdot \tan \theta}{L T m_y E (dn/dc)}$$

θ = Winkel des Schlierendiaphragmas, wenn die Ablenkung null einem ablesbaren Winkel von 90° entspricht, L = optischer Hebelarm der Ultrazentrifugen-Optik, T = Lichtweg in der Ultrazentrifugenzelle („Zelldicke“), m_y = Vergrößerungsfaktor der Ultrazentrifugen-Optik in y -Richtung, E = Vergrößerungsfaktor des Vergrößerungsapparates. Weitere Bezeichnungen können der Abb. 2 entnommen werden.

Die Bestimmung der y -Werte setzt eine gute Justierung der Optik voraus²¹). Eine genügend genaue Bestimmung ist ferner nur dann gegeben, wenn als Schlierendiaphragmen $\lambda/2$ -Phasenplatten²²) mit eingebettetem Draht²³) verwendet werden. Phasenplatten sind in modernen kommerziellen Ultrazentrifugen bereits eingebaut. Die in älteren Apparaten als Schlierendiaphragmen vorhandenen Balken, Drähte, Schneiden, Spalte oder Skalen genügen den Anforderungen der Archibald-Methode in der Regel nicht.

Die Bestimmung der y_b -Werte am Boden ist meist sehr unzuverlässig. Einmal wird ein Teil des Lichtstrahles durch die Geome-

¹⁴) G. J. Hooyman, *Physica* 22, 751, 761 [1956].

¹⁵) P. J. Dunlop, *J. phys. Chem.* 61, 994 [1957].

¹⁶) I. J. O'Donnell u. L. J. Gosting, in W. Hamer: *The Structure of Electrolyte Solutions*, Wiley, New York 1959.

¹⁷) K. O. Pedersen, in *Les Proteines, Rapport et Discussion*, 9^{ème} Conseil de Chimie, Brüssel 1953.

¹⁸) C. H. Li, A. Tiselius, K. O. Pedersen, L. Hagdahl u. H. Carstensen, *J. biol. Chemistry* 190, 317 [1951].

¹⁹) J. Porath, *Acta chem. scand.* 6, 1237 [1952].

²⁰) R. A. Brown, D. Kritchevsky u. M. J. Davies, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 3342 [1954].

²¹) R. Trautman, *Biochim. biophysica Acta* 28, 417 [1958].

²²) A. Wolter, *Ann. Physik* 7, 182 [1950].

²³) R. Trautman u. V. W. Burns, *Biochim. biophysica Acta* 14, 26 [1954].

trie der Zellen abgeschnitten²⁰), ferner erhält man eine scheinbare Verkürzung der Zelle durch die sonst übliche Justierung auf maximalen Gradienten²⁴) und schließlich entspricht der Zellenboden bei vielen Ultrazentrifugen-Zellen nicht dem Ideal eines Kreisbogens, der vom Rotationszentrum aus geschlagen wurde²⁵).

Ein großer Teil dieser Fehler kann vermieden werden, wenn man einen künstlichen Boden durch Unterschichten der zu untersuchenden Flüssigkeit mit einer anderen erzeugt, die dichter als diese, möglichst lichtdurchlässig sein und außerdem nicht mit der zu untersuchenden Lösung reagieren soll. Als solche Unterschichtungsflüssigkeiten haben sich für wäßrige Lösungen bewährt: Chloroform²⁵), Silikon-Öl Dow Corning 555²⁵) oder Wacker AR 710²⁶), Quecksilber²⁰) und fluoridierte Kohlenwasserstoffe wie Perfluortributylamin (Fluorochemical FC-43 der Minnesota Mining and Manufacturing Co.)²⁷) oder ein oligomeres Copolymeres aus Trifluorethyläthylen und Vinylidenfluorid (Kel-F-Polymer Oil No. 1, The Kellogg Chem. Comp.)¹²). Mit Chloroform erhält man allerdings bei vielen Lösungen von Proteinen an der Grenzfläche leicht Aggregationen, die jedoch durch eine Verbreiterung der Bodenlinie mit der Zeit erkannt werden können²⁸).

Bei der Ultrazentrifugation von Makromolekülen in Salzlösungen ist die Basislinie durch die partielle Sedimentation der Salze oft gekrümmt. In diesem Falle verwendet man vorteilhaft Doppelsektor-Zellen, bei denen eine Zelle die Lösung, die andere das Lösungsmittel aufnimmt. Bei genau gleich hoher Füllung erhält man dann durch optische Subtraktion direkt den Konzentrationsgradienten der Lösung des Makromoleküls.

Die Konzentrationsgradienten wurden meist durch Messungen mit einer *Philpot-Svensson*-Optik bestimmt, da hier direkt die dem Konzentrationsgradienten proportionalen y -Werte erhalten werden. Bei Interferenzmessungen müssen die Konzentrationsgradienten aus den $\Delta n = f(c)$ -Kurven erst berechnet werden. Messungen mit einer *Rayleigh*-Interferenzoptik sind daher bislang nur einmal berichtet worden²⁸).

*Baldwin*¹¹) hat jedoch ein Rechenverfahren angegeben, das die $(\partial c/\partial r)$ -Werte auch ohne numerische Differentiation zu ermitteln gestattet, so daß man die höhere Meßgenauigkeit der *Rayleigh*-Interferenzoptik ausnutzen kann. Nach diesem Verfahren hat man

$$\frac{\ln(\Delta c_r/\Delta c_m)}{r-r_m} \text{ gegen } (r-r_m)$$

aufzutragen, wobei die Werte von $\Delta c_r/\Delta c_m$ und $(r-r_m)$ direkt aus den photographischen Platten entnommen werden können. Der Grenzwert der Funktion (7) liefert dann direkt den gewünschten Ausdruck.

$$(7) \quad \lim_{r \rightarrow r_m} \frac{\ln(\Delta c_r/\Delta c_m)}{r-r_m} = \frac{1}{c_m} \cdot \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right)_m$$

4. Die Konzentration an Meniscus bzw. Boden

Durch den Sedimentationsvorgang verändert sich die anfängliche Konzentration c_0 und nimmt am Meniscus ab, während sie am Boden zunimmt. Die Konzentrationen c_m und c_b müssen daher aus den Versuchsdaten berechnet werden, wobei zu berücksichtigen ist, daß durch die Sektor-Form der Zelle eine Verdünnung auftritt. Man erhält dann z. B. für die Konzentration am Meniscus

$$(8) \quad c_m = c_0 - \int_{r_m}^{r_p} (r^2/r_m^2) (\partial c/\partial r) dr = c_0 - \Delta c_m$$

r_m = Abstand des Meniscus vom Rotationszentrum, r_p = Abstand eines beliebigen Punktes auf der Plateau-Zone vom Rotationszentrum, r = Abstand eines beliebigen Punktes der Konzentrationsgradienten-Kurve vom Rotationszentrum, Δc_m = Konzentrationsverschiebung am Meniscus.

²⁴) S. M. Klainer u. G. Kegeles, J. phys. Chem. 59, 952 [1955].

²⁵) A. Ginsburg, P. Appel u. H. K. Schachman, Arch. Biochem. Biophys. 65, 545 [1956].

²⁶) H.-G. Elias u. H. H. Schlubach, Liebigs Ann. Chem. 627, 126 [1959].

²⁷) D. A. Yphantis, J. phys. Chem. 63, 1742 [1959].

²⁸) W. F. H. M. Mommaerts u. B. Blankenhorn Aldrich, Biochim. biophysica Acta 28, 627 [1958].

Bei der Ableitung der Gl. (8)^{24,29}), die auch für polymolekulare Substanzen gilt²⁹), wurde lediglich das Gesetz der Erhaltung der Masse zugrundegelegt. Die Berechnungen gingen von der *Lamm*-schen Differentialgleichung der Ultrazentrifuge³⁰) aus und benutzten einige bekannte Lösungsvorschläge^{31,32}). Bei kompressiblen Lösungsmitteln gilt jedoch das in Gl. (8) enthaltene Quadratgesetz der Verdünnung^{1a}) nicht mehr³³). Im Gegensatz zu Sedimentationsgeschwindigkeits-Messungen³⁴) ist dieser Effekt bei *Archibald*-Versuchen aber nur von geringer Bedeutung, da die Versuche sowieso bei geringeren Umdrehungsgeschwindigkeiten als dort ausgeführt werden.

Die Ermittlung der Δc -Werte ist neben der der $(\partial c/\partial r)$ -Werte das zweite experimentelle Hauptproblem bei *Archibald*-Versuchen. Bei kurzen Sedimentationszeiten, niedrigen Geschwindigkeiten und/oder kleinen Sedimentationskoeffizienten strebt der Exponentialfaktor der Verdünnungs-Gleichung

$$(9) \quad c_p = c_0 \exp(-2 \omega^2 s_c t)$$

dem Wert null zu. Die Konzentration c_p in der Plateau-Zone (vgl. Abb. 2) ist daher praktisch gleich der Anfangs-

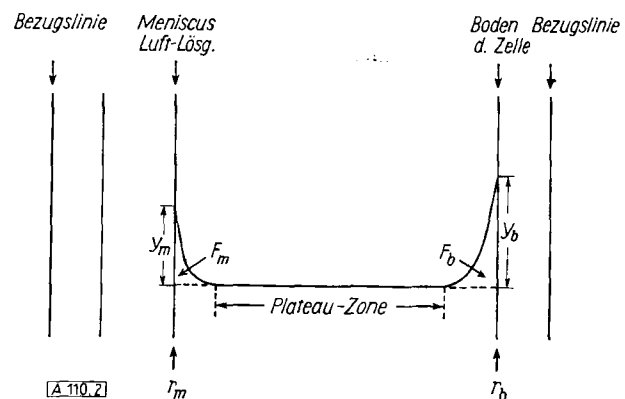


Abb. 2. Schematische Zeichnung für die Auswertung typischer *Archibald*-Versuche (vgl. auch Abb. 1)

konzentration c_0 , und der Korrektur-Faktor (r^2/r_m^2) in Gl. (8) wird 1. In diesem Falle kann man die Konzentrationsverschiebung über Gl. (10) berechnen. F_m ist dabei

$$(10) \quad \Delta c_m = \frac{F_m \cdot \tan \theta}{L T m_x m_y E^2 (dn/dc)} \quad (c_p \approx c_0)$$

die Fläche unter der Gradientenkurve ($F = (dn/dx) \cdot dx$) und m_x die Vergrößerung der Ultrazentrifugen-Optik in x -Richtung. Die Fläche wird dazu auf der vergrößerten Zeichnung der photographischen Platte ausplanimetriert.

Bei bekanntem Sedimentations-Koeffizienten läßt sich die Konzentration c_p in der Plateau-Zone über Gl. (9) auch dann berechnen, wenn sie stark von der Anfangskonzentration c_0 abweicht, Winkelgeschwindigkeit ω , Sedimentations-Koeffizient s_c bei der betreffenden Konzentration und Zeit t also groß sind. Aus der Konzentration c_p kann dann die Konzentration c_m am Meniscus über Gl. (11)

$$(11) \quad c_m = c_p - \int_{r_m}^{r_p} (\partial c/\partial r) dr = c_p - \Delta c_m$$

ermittelt werden, wozu lediglich wieder die Fläche F_m zu bestimmen ist. Der Sedimentations-Koeffizient s_c kann bei der unten beschriebenen *Trautman*-schen Modifikation des *Archibald*-Verfahrens leicht erhalten werden, da man lediglich nach dem Erscheinen einer Zone freien Lösungsmittels am Meniscus weiter zu zentrifugieren hat, um die Sedimentations-Geschwindigkeit zu bestimmen.

²⁹) G. Kegeles, S. M. Klainer u. W. J. Salem, J. phys. Chem. 61, 1286 [1957].

³⁰) O. Lamm, Arb. Mat., Astronomi Fysik, Ser. B 2, 21 [1929].

³¹) H. Gutfreund u. A. G. Ogston, Biochem. J. 44, 163 [1949].

³²) R. L. Baldwin, ebenda 55, 644 [1953].

³³) H. Fujita, J. Amer. chem. Soc. 78, 3598 [1956].

³⁴) H.-G. Elias, Makromolekulare Chem. 29, 30 [1959].

Bei großen Werten für den Sedimentations-Koeffizienten, Winkelgeschwindigkeit und/oder Versuchszeit sowie unbekanntem Sedimentations-Koeffizienten sind aufwendigere Rechen-Verfahren erforderlich. Als solche wurden vorgeschlagen: trapezoidale Integration²⁵, Einführung einer neuen Hilfsskala (z-Skala)²⁶ und Benutzung eines zusätzlichen Hilfsversuches in einer Zelle mit synthetischer Grenzschicht²⁶. Für nähere Einzelheiten muß auf die Original-Literatur^{25, 26, 28} sowie auf²⁷ verwiesen werden.

Bei polymolekularen Substanzen wird der Einfluß der Konzentrationsverschiebung natürlich schon dann eliminiert, wenn man wie üblich auf die Zeit null extrapoliert (s. u.).

Alle bisherigen Betrachtungen setzen voraus, daß bei den Messungen noch eine gewisse Plateau-Zone, also eine Zone konstanter Konzentration erhalten bleibt. Bei langen Versuchszeiten und niedrigen Molekulargewichten ist das nicht mehr der Fall, hier muß die Konzentration am Meniscus über Gl. (12) berechnet werden²⁵. Die Änderung der

$$(12) \quad c_m = c_0 + \frac{1}{r_b^2 - r_m^2} \int_{r_m}^{r_p} r^2 (\partial c / \partial r) dr - r_b^2 \int_{r_m}^{r_p} (\partial c / \partial r) dr$$

Konzentration am Meniscus ist inzwischen auch theoretisch untersucht worden^{27, 28}.

5. Der Einfluß der Molekular-Uneinheitlichkeit

Bei pauci- oder polymolekularen Substanzen überlagert sich während des Sedimentations-Vorganges der Konzentrationsverschiebung noch eine solche des Molekulargewichtes, da die Substanzen mit höheren Sedimentationskoeffizienten denen mit niedrigeren vorausziehen. Zu Beginn des Versuches kann aber eine solche Auftrennung nach den Molekulargewichten noch nicht vorhanden sein. Man trägt daher die δ -Werte für Meniscus und Boden in einem Diagramm gegen die Zeit auf und extrapoliert auf den Anfangszustand, der aber nicht notwendig die Zeit null des Versuchsbeginns zu sein braucht. Die Extrapolation ist nicht immer einfach, da die Kurven häufig gekrümmt sind (Abb. 3). Aus der Kurvenform sollten sich im Prinzip

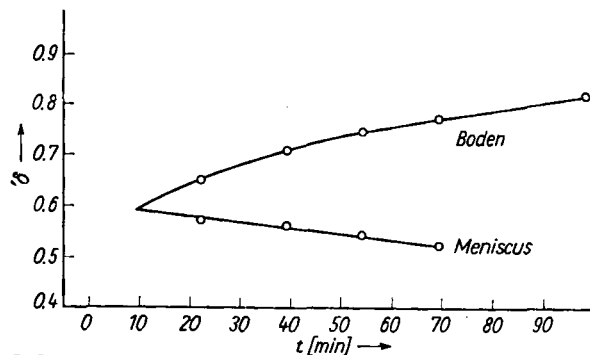


Abb. 3. Extrapolation der δ_m - und δ_b -Werte auf den Anfangszustand bei polymolekularem Gelösten für ein Chondroitinschwefelsäure-Präparat (CS 1); $c_0 = 4,90 \cdot 10^{-3}$ g/ml, $T = 25,0^\circ\text{C}$; δ -Werte in willkürlichen Einheiten

Breite und Typ der Verteilungsfunktion der Molekulargewichte errechnen lassen, doch dürfte sich dafür die Trautmansche Modifikation des Archibald-Verfahrens besser eignen (Abschnitt 7).

Eine exaktere Extrapolation auf den Anfangszustand ist möglich, wenn man die δ_t -Werte gegen die Wurzel aus der Zeit aufträgt, da diese Kurven auch bei polymolekularen Stoffen bis zum Verhältnis $c_t/c_0 = 0,6$ linear sein sollten²⁷.

²⁵ R. Trautman, J. phys. Chem. 60, 1211 [1956].

²⁶ A. Ehrenberg, Acta chem. scand. 11, 1257 [1957].

²⁷ H.-G. Elias: Theorie und Praxis der Ultrazentrifugen-Technik, Beckman Instruments GmbH., München, 2. Aufl. 1961, im Druck.

²⁸ H. Fujita u. V. J. MacCosham, J. chem. Physics 30, 291 [1959].

6. Der Einfluß der Nichtidealität der Lösungen

Lösungen von Makromolekülen zeigen nur in seltenen Fällen (θ -Temperatur) ein pseudo-ideales Verhalten, d. h. eine Konzentrationsunabhängigkeit der Meßwerte. Eine Durchrechnung ergibt für nicht zu hohe Konzentrationen²⁹

$$(13) \quad \frac{1}{M_{app}} = \frac{1}{M_w} (1 + \frac{(\partial \ln y_g / \partial \ln c)_w}{M_w})$$

bzw. in eine Reihe nach Potenzen der Konzentration entwickelt

$$(14) \quad \frac{1}{M_{app}} = \frac{1}{M_w} + 2 A_2 c + 3 A_3 c^2 + \dots$$

wobei y_g der Aktivitätskoeffizient des Gelösten und A_2, A_3, \dots die zweiten, dritten... Virialkoeffizienten sind. Das in Gl. (13) in Klammern stehende Aktivitätsglied ist ein sehr komplizierter Mittelwert, das Gewichtsmittel über das z-Mittel, entsprechend auch der in Gl. (14) auftretende 2. Virialkoeffizient. Man kann daher nicht erwarten, daß die 2. Virialkoeffizienten aus Archibald-Messungen denen aus Streulichtmessungen, kombinierten Sedimentations- und Diffusionsmessungen oder osmotischen Messungen gleich sind, es sei denn bei einem molekulareinheitlichen Gelösten im einheitlichen Lösungsmittel (Zweikomponenten-Systeme).

| Substanz | T [°C] | Lösungs- mittel | Molekular- gewichte | | Virialkoeffiz. | |
|---|--------|-----------------------------|------------------------|-------------|----------------|----------------------------|
| | | | \bar{M}_w | \bar{M}_n | Archibald | Sedi- ment.+ Diffus. |
| Polyäthylenglykol | | | | | | |
| H 10000 | 25 | Wasser | 10900 | 9700 | 116 | 114 |
| WSR 35 | 25 | Wasser | 74000 | 5300 | 23,6 | 16,5 |
| WSR 205 | 25 | Wasser | 156000 | 7000 | 35,0 | 26,0 |
| WSR 301 | 25 | Wasser | 750000 | — | 44,2 | 18,6 |
| Coagulant | 25 | Wasser | 800000 | — | 30,4 | 17,4 |
| Heparin | | | | | | |
| I | 25 | 1 n KCl | 15700 | — | 21,0 | 21,6 |
| IV | 25 | 1 n KCl | 13800 | — | 35,0 | 44,0 |
| 3-Phospho-D-glycerinaldehyd-dehydrogenase | | | | | | |
| | 20 | Glycin-NaOH- NaCl-Puffer | 117000 | — | -1,7 | -0,36 |

Tabelle 1. Vergleich der nach verschiedenen Methoden erhaltenen 2. Virialkoeffizienten A_2 (atm·cm³·g⁻²)²⁹⁻³²

In Tabelle 1 sind einige an jeweils gleichen Substanzen nach verschiedenen Methoden bestimmte 2. Virialkoeffizienten A_2 gegenübergestellt. Zur Charakterisierung der Verteilungsbreite sind jeweils auch die Gewichtsmittel des Molekulargewichtes \bar{M}_w aus Archibald- oder Lichtstreuungs-Messungen und die Zahlenmittel \bar{M}_n aus osmotischen oder Endgruppen-Bestimmungen angegeben. Man entnimmt der Tabelle 1, daß bei den polymolekularen Polyäthylenglykolen im einheitlichen Lösungsmittel Wasser die nach den verschiedenen Methoden ermittelten 2. Virialkoeffizienten numerisch um so besser übereinstimmen, je stärker das Verhältnis \bar{M}_w/\bar{M}_n dem Wert 1 zustrebt. Bei Stoffen in Mischlösungen (z. B. Salzlösungen) ist eine numerische Übereinstimmung auch dann nicht zu erwarten, wenn die makromolekulare Komponente selbst molekulareinheitlich ist, da bei den einzelnen Methoden die verschiedenen Wechselwirkungsglieder und Kreuzdiffusionskoeffizienten in unterschiedlicher Weise in die meßbare Konzentrationsabhängigkeit eingehen (für Ultrazentrifugenmessungen, vgl. ^{10, 11}), für Streulicht-Messungen vgl. ⁴³).

²⁹ Th. A. Ritscher u. H.-G. Elias, Makromolekulare Chem. 30, 48 [1959].

⁴⁰ F. Palat u. H.-G. Elias, Naturwissenschaften 46, 322 [1959].

⁴¹ H.-G. Elias, A. Garbe u. W. Lamprecht, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319, 22 [1960].

⁴² H.-G. Elias, unveröffentl.

⁴³ S. N. Timasheff u. M. J. Kronman, Arch. Biochem. Biophys. 83, 60 [1959].

7. Das Trautman-Verfahren

Ein elegantes Verfahren wurde von *Trautman*^{35, 44)} angegeben. Bei dieser Modifikation werden nicht nur wie beim ursprünglichen *Archibald*-Verfahren die Aufnahmen bis zum Erscheinen des Maximums (vgl. Aufnahme d der Abb. 1) ausgewertet, sondern darüber hinaus alle anderen $(\partial c/\partial r)$ -Werte am Meniscus, und zwar solange, bis $(\partial c/\partial r) = 0$ wird.

Durch einfache Umformung von Gl. (5) erhält *Trautman* unter Einführung eines neuen Parameters q z. B. für die Werte am Meniscus

$$(15) \quad q_m = M_{app} (1 - \nu_{Lsg}) \cdot c_0 - M_{app} (1 - \nu_{Lsg}) \cdot \Delta c_m$$

mit

$$(16) \quad q_m = \frac{RT (\partial c/\partial r)_m}{\omega^2 r_m}$$

Die q_b -Werte sind analog zu berechnen. Trägt man daher q_m bzw. q_b gegen die Δc_m - bzw. Δc_b -Werte auf, so sollten bei molekular einheitlichen Stoffen bzw. Substanzen mit

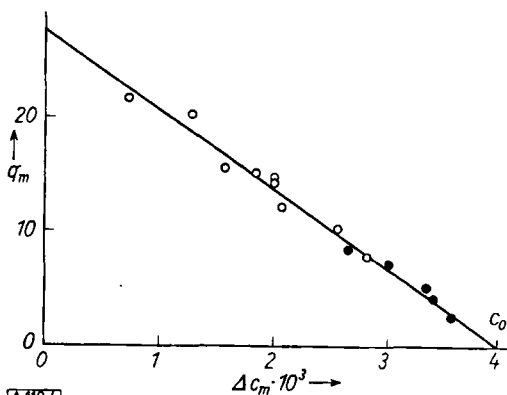


Abb. 4. Trautman-Diagramm für Messungen an einem Polyäthylenglykol W 182 in Wasser⁴⁷⁾; $c_0 = 3,96 \cdot 10^{-3}$ g/ml, $T = 25,0^\circ\text{C}$, \circ 29500 U/min, \bullet 44700 U/min

sehr enger Molekulargewichts-Verteilung sich Geraden ergeben, aus denen nach Gl. (16) das scheinbare Molekulargewicht bei der betreffenden Konzentration errechnet werden kann. Ein solches Trautman-Diagramm ist in Abb. 4 wiedergegeben. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse läßt sich die Konzentration des Gelösten ermitteln, sofern das Brechungsindex-Inkrement bekannt ist. Bei bekannter Ausgangskonzentration kann der Abszissenwert dagegen als zusätzlicher Bestimmungspunkt dienen.

Bei paucimolekularen Systemen erhält man in einem Trautman-Diagramm statt einer einzigen Linie deren zwei oder mehr, wie es zuerst von *Erlander* und *Foster*⁴⁵⁾ an praktisch pseudo-idealen Lösungen gezeigt wurde (Abb. 5).

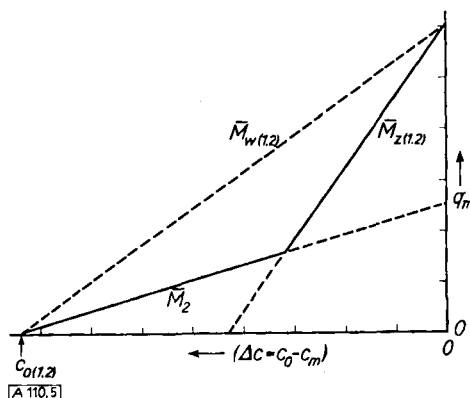


Abb. 5. Schematische Zeichnung für die Auswertung von Trautman-Diagrammen bei paucimolekularen Stoffen mit zwei Komponenten 1 und 2; nach *Erlander* und *Foster*⁴⁵⁾

⁴⁴⁾ R. Trautman u. Ch. F. Crampton, J. Amer. chem. Soc. 81, 4036 [1959].

⁴⁵⁾ S. R. Erlander u. J. F. Foster, J. Polymer Sci. 37, 103 [1959].

Aus den Neigungen läßt sich das Molekulargewicht einer Komponente sowie das Gewichts- und das z-Mittel des Molekulargewichtes des Gemisches beider Komponenten bestimmen. Zusammen mit den ebenfalls erhältlichen Konzentrationen läßt sich dann das Molekulargewicht der anderen Komponente errechnen. Das Verfahren arbeitet auch dann gut, wenn keine vollständige oder sogar überhaupt keine Trennung der einzelnen Komponenten erreichbar ist. Eine vollständige Trennung der Gipfel ist aber beim Transportverfahren überhaupt erst die Voraussetzung für eine Bestimmung der Sedimentations-Koeffizienten.

Allerdings scheinen nach *Erlander* und *Foster*⁴⁵⁾ nicht beliebig große Konzentrations-Unterschiede faßbar zu sein, da für eine genügende Meßgenauigkeit ein Konzentrationsverhältnis von 1:5 nicht unterschritten werden darf.

Um möglichst den gesamten c -Bereich zu überstreichen, zentrifugiert man jeweils ca. 1 h bei verschiedenen Geschwindigkeiten, da am Anfang jedes Versuches die Konzentration sich am schnellsten ändert⁴⁵⁾.

Bei polymolekularen Stoffen sollte man in einem Trautman-Diagramm eine gekrümmte Linie erhalten, was bei Amylose-Fractionen auch gefunden wurde⁴⁶⁾. Leider wurde in dieser Arbeit nicht versucht, aus dem Trautman-Diagramm die Molekulargewichtsverteilung zu berechnen und mit anderen Methoden zu überprüfen. Es muß daher offen bleiben, ob aus *Archibald-Trautman*-

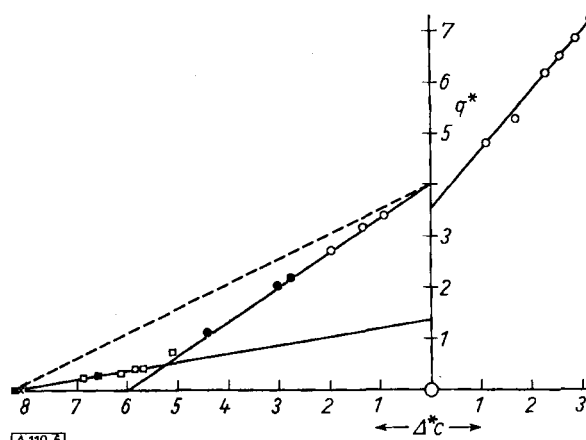


Abb. 6. Trautman-Diagramm einer Mischung aus menschlichem Mercapto-Albumin ($1,964 \cdot 10^{-3}$ g/ml) und Ribonuclease ($2,185 \cdot 10^{-3}$ g/ml), nach *Erlander* und *Foster*⁴⁵⁾; q - und Δc -Werte in willkürlichen Einheiten. \circ 12590 U/min, \bullet 20410 U/min, \square 39460 U/min, \blacksquare 59780 U/min

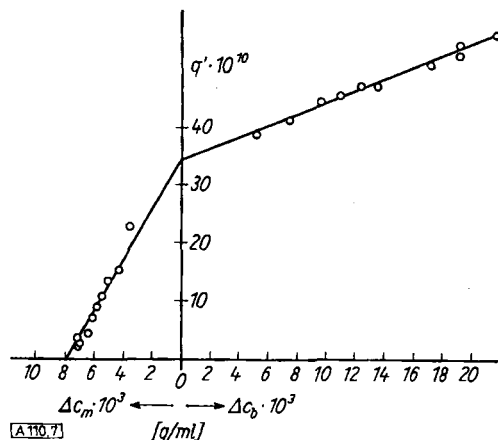


Abb. 7. Trautman-Diagramm der Ultrazentrifugen-Aufnahmen für die Fraktion IV eines Copolymerisats aus Fumarsäurediäthylester und Isobutylen⁴⁸⁾ in Aceton; $c_0 = 8,03 \cdot 10^{-3}$ g/ml, 24630 U/min, $T = 25,0^\circ\text{C}$

⁴⁶⁾ W. B. Everett u. J. F. Foster, J. Amer. chem. Soc. 81, 3459 [1959].

⁴⁷⁾ H.-G. Elias u. R. Merkle, unveröffentl.; R. Merkle, Diplom-Arbeit, ETH. Zürich 1960.

⁴⁸⁾ Präparation vgl. K.-H. Jaeger u. H. Mittenzwei, Klin. Wschr. 36, 441 [1958].

⁴⁹⁾ D. Starck, Diss., ETH Zürich 1960.

Versuchen Molekulargewichtsverteilungen mit genügender Genauigkeit bestimmt werden können, umso mehr, als nach den Rechnungen von Yphantis²⁷⁾ in Trautman-Diagrammen auch dann gekrümmte Linien auftreten, wenn nichtideale Lösungen eines molekulareinheitlichen Stoffes vorliegen. Allerdings wurde ein solches Verhalten experimentell bei den bekannt stark nicht-idealen Lösungen³⁹⁾ von praktisch molekulareinheitlichen Polyäthylenglykolen in Wasser nicht gefunden⁴⁷⁾ (vgl. auch Abb. 4). Systematische Versuche zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung aus Archibald-Versuchen sind in unseren Laboratorien begonnen worden.

Die q_b -Werte des Bodens weisen nicht immer die theoretische Abhängigkeit von der Konzentrationsverschiebung auf. Häufig findet man Verschiebungen wie in Abb. 6, was auf optische Fehler hinweist. Bei synthetischen Hochpolymeren erhält man gelegentlich Bilder wie Abb. 7. Hier schneiden sich zwar die $q_m = f(\Delta c_m)$ und $q_b = f(\Delta c_b)$ -Funktionen in einem Punkt bei $\Delta c = 0$, die Geraden besitzen jedoch verschiedene Neigungen. Der Effekt ist vermutlich auf die Kompressibilität der am Boden der Zelle sich befindenden Polymerteilchen zurückzuführen, was sich u. a. in einem mit dem Druck variablen Brechungsindex-Inkrement äußert.

8. Die Mittelwerte des Molekulargewichts

Schon früh wurde erkannt¹³⁾, daß die dem Anfangszustand entsprechenden δ - bzw. q -Werte dem Gewichtsmittel des Molekulargewichtes \bar{M}_w entsprechen. Extrapolation auf unendliche Verdünnung vorausgesetzt. Dieser Anfangszustand ist beim Archibald-Verfahren durch eine Extrapolation der δ -Werte auf die Zeit 0 erhältlich, beim Trautman-Diagramm aus dem Ordinaten-Abschnitt für $\Delta c_m = 0$ errechenbar.

Bei endlichen Zeiten (entsprechend endlichen Δc -Werten) bekommt man jedoch nach Yphantis²⁷⁾ kompliziertere Mittelwerte des Molekulargewichtes, in die noch die Sedimentationskoeffizienten eingehen. In einem Trautman-Diagramm ergibt daher die experimentell gefundene Anfangsneigung bei kleinen Δc -Werten nicht das z -Mittel über die Gesamtmischung (vgl. Abb. 5 und 6), wie von Erlander und Foster⁴⁵⁾ angenommen wurde, sondern einen Mittelwert des Molekulargewichts, der noch von der Form der Makromoleküle in Lösung abhängt. Bei Kugeln ist der erhaltbare Mittelwert praktisch (aber nicht exakt) mit dem z -Mittel identisch, bei statistischen Knäueln liegt er zwischen z - und Gewichtsmittel.

9. Anwendungen des Archibald-Verfahrens

In Tabelle 2 sind alle bislang bekannten Molekulargewichtswerte aus Archibald-Messungen den aus kombinierten Sedimentations- und Diffusionsmessungen bestimmten gegenübergestellt. Die Übereinstimmung ist in allen Fällen gut. Außerdem wurde das Verfahren zu Molekulargewichtsbestimmungen an folgenden Substanzen verwendet, für die aber keine Vergleichswerte bekannt sind: Polyfructosane aus Gräsern²⁶⁾, Laevan (*B. mesentericus*)²⁶⁾, Histon-Fractionen⁴⁴⁾ und Bacitracin¹⁹⁾.

Bei synthetischen Makromolekülen wurde das Verfahren seltener verwendet. Die ersten Messungen an einem Polymeren (Polyvinylchlorid) stammen von Kegeles, Klainer und Salem²⁹⁾, doch fehlen Kontrollmessungen nach anderen Methoden. Messungen von Elias^{39, 42, 47)} an Polyäthylenglykolen verschieden breiter Molekulargewichtsverteilung und unter Kontrolle mittels anderer Methoden bewiesen, daß das Archibald-Verfahren auch bei synthetischen Makromolekülen mit Erfolg verwendet werden kann (vgl. Tabelle 3).

Wie aus den Tabellen 2 und 3 hervorgeht, scheint die obere Grenze der noch sicher meßbaren Molekulargewichte in der Größenordnung von einigen 10^6 zu liegen. Dextrane mit Molekulargewichten von $5 \cdot 10^8$ *) konnten nicht mehr nach dem Archibald-Verfahren bestimmt werden, weil

| Substanz | Molekulargewichte | | | Lit. |
|---|--------------------------|--------------------------------|---------------|---------|
| | \bar{M}_w Archibald | \bar{M}_sD (Sed. + Diff.) | M (Formel) | |
| α -Ketosuccinamidsäure | | | | |
| reaktive Form | 130 | — | 131 | 54) |
| inaktive Form | 260 | — | 262 | 54) |
| Raffinose | 505 | — | 493 | 54) |
| Glycyl-L-Leucin | 188 | — | 188 | 55) |
| L-Cystinpeptid (A) | 231 | 222 | — | 56) |
| | 250 | 410 | — | 18) |
| | 410 | 410 | — | 18) |
| Peptid-Fractionen | 1000 | 1400 | — | 18) |
| aus dem adrenocorticotropen Hormon | 1400 | 2800 | — | 18) |
| | 1500 | 2500 | — | 18) |
| | 1800 | 2600 | — | 18) |
| Digitonin | 1310 | 1310 | — | 20) |
| Heparin I | 15800 | 15500 | — | 40) |
| Heparin IV | 13800 | 13700 | — | 40) |
| Chondroitinschwefelsäure CS I | 86500 | 83000 | — | 57, 58) |
| 3-Phospho-D-glycerinaldehyd-Dehydrogenase | 117000 | 117000 | — | 41) |
| | 14000 | — | 13683 | 44) |
| Ribonuclease | 14000 | 14000 | — | 25) |
| | 14000 | — | 13895 | 58) |
| Cytochrom c | 13300 | 13300 | — | 36) |
| Apomyoglobin I | 18800 | 17200 | — | 36) |
| CO-Myoglobin | 18300 | 18500 | — | 36) |
| Rhodanese | 36300 | 38000 | — | 36) |
| Alkoholdehydrogenase aus Leber | 84400 | 83300 | — | 36) |
| Altes gelbes Enzym | 106000 | 102000 | — | 36) |
| Myeloperoxidase | 157000 | 149000 | — | 36) |
| | 73200 | 72200 | — | 36) |
| Rinderserumalbumin | 71500 | — | — | 24) |
| | 70300 | 67000–71000 | — | 58) |
| β -Lactoglobulin | 35500 | 35400 | — | 25) |
| Myosin | 420000 | — | — | 49) |
| | 420000 | 850000 ⁶⁰⁾ | — | 28) |
| Poly-DL-lysyl-L-tyrosin | 23700 | 23900 | — | 59) |
| Lysozym | 14100 | 14000–17000 ⁶¹⁾ | — | 62) |
| Apurinsäure | 27000 | 25000*) | — | 62) |
| Amylose-Fraktion | 2080000 | 2440000*) | — | 46) |

*) Lichtstreuung.

Tabelle 2. Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen nach dem Archibald-Verfahren an natürlich vorkommenden Makromolekülen und niedermolekularen Substanzen

nicht genügend geringe Drehzahlen bei gleichzeitig stabilem Lauf und hoher Drehzahlkonstanz erhalten werden können. Eine untere Grenze existiert für das Verfahren nicht.

Das Trautman-Diagramm ist erst bei wenigen Messungen benutzt worden: Amylose-Fractionen⁴⁶⁾, Histon-Fractionen⁴⁴⁾, Ribonuclease⁴⁵⁾, Ovalbumin⁴⁵⁾, Polyäthylenglykolen^{39, 42, 47)}, einem Hormon-Extrakt aus dem Thymus^{42, 47a)} und Fractionen von Copolymerisaten aus Fumar-säure-diäthylester und Isobutylene⁴⁸⁾.

⁴⁹⁾ P. H. v. Hippel, H. K. Schachman, P. Appel u. M. F. Morales, Biochim. Biophys. Acta 28, 504 [1958].

⁵⁰⁾ S. S. Cohen u. H. K. Schachman, Virology 3, 575 [1957].

⁵¹⁾ W. Bushuk u. H. Benoit, Canad. J. Chem. 36, 1616 [1958].

⁵²⁾ G. Kegeles u. M. S. Narasinga Rao, J. Amer. chem. Soc. 80, 5721 [1958].

⁵³⁾ M. S. Narasinga Rao, ebenda 80, 5724 [1958].

⁵⁴⁾ T. T. Otani u. A. Meister, J. biol. Chemistry 224, 137 [1954].

⁵⁵⁾ R. Wade, H. Winitz, u. J. P. Greenstein, J. Amer. chem. Soc. 78, 373 [1956].

⁵⁶⁾ S. M. Klainer u. G. Kegeles, Arch. Biochem. Biophysics 63, 247 [1956].

⁵⁷⁾ F. Patat u. H.-G. Elias, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 315, 1 [1959].

⁵⁸⁾ H.-G. Elias u. F. Patat, Naturwissenschaften 47, 108 [1960]; Abhandl. math. naturwiss. Klasse Akad. Wiss. Literatur Mainz 1960, No. 4.

⁵⁹⁾ F. Michel u. H. L. Hülsmann, Chem. Ber. 93, 13 [1960].

⁶⁰⁾ H. Portzehl, Z. Naturforsch. 5b, 75 [1950]; H. Portzehl, G. Schramm u. H. H. Weber, ebenda 5b, 61 [1950].

⁶¹⁾ J. T. Edsall, in H. Neurath u. K. Bailey: The Proteins, Vol. I B, Academic Press Inc., New York 1953.

⁶²⁾ D. B. Smith, G. C. Wood u. P. A. Charlwood, Canad. J. Chem. 34, 364 [1956].

| Substanz | Molekulargewichte | | | | Lit. |
|-----------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------|
| | \bar{M}_w (Archibald) | \bar{M}_w (Lichtstr.) | \bar{M}_n (Sed. + Diff.) | \bar{M}_n (Osmose) | |
| H 6000 | 7150 | 7350 | — | 6410 | ³⁹⁾ |
| H 10000 | 10500 | 12000 | 10500 | 9680 | ³⁹⁾ |
| AG 29000 | 34000 | 31000 | 32000 | 29000 | ³⁹⁾ |
| W 182 | 49000 | 48500 | — | 43700 | ⁴⁷⁾ |
| WSR 35 | 73000 | — | 76000 | 5300 | ⁴²⁾ |
| WSR 205 | 160000 | — | 150000 | 7000 | ⁴²⁾ |
| WSR 301 | 735000 | — | 755000 | — | ⁴²⁾ |
| Coagulant | 700000 | — | 800000 | — | ⁴²⁾ |

Tabelle 3. Archibald-Versuche an Polyäthylenglykolen in Wasser

Vorteilhaft ist, daß das Archibald-Verfahren auch dann gute Werte liefert, wenn in der ursprünglichen Lösung Aggregate vorhanden waren⁴⁹⁾, was leicht an der Verbreiterung des künstlichen Bodens erkannt werden kann⁵⁰⁾. In

solchen Fällen gibt die Auswertung der Meniscuswerte direkt das Molekulargewicht des nichtaggregierten Anteiles.

Ein besonders wichtiges Anwendungsgebiet für das Archibald-Verfahren scheint die Bestimmung des Gewichtsmittels des Molekulargewichtes \bar{M}_w von Copolymeren zu werden. Streulicht-Messungen versagen hier häufig und liefern u. U. um Größenordnungen falsche Werte⁵¹⁾. Außer zur Molekulargewichts-Bestimmung läßt sich die Methode auch zur Untersuchung von Assoziations-Dissoziations-Gleichgewichten verwenden, wie es für das Studium von Monomer-Dimer-Gleichgewichten vorgeschlagen³⁹⁾, für verschiedene Reaktionstypen durchgerechnet⁵²⁾ und bei der Untersuchung der Assoziation von α -Chymotrypsin auch experimentell benutzt wurde⁵³⁾.

Eingegangen am 30. September 1960 [A 110]

Analytisch-technische Untersuchungen

Die Ampullentechnik, eine einfache Präzisionsmethode für gaschromatographische Untersuchungen

Von Dr. H. CHERDRON, Dipl.-Chem. L. HÖHR und Prof. Dr. WERNER KERN

Institut für organische Chemie der Universität Mainz

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Hermann Staudinger zum 80. Geburtstag in Verehrung gewidmet

Diese Arbeitstechnik ist zur gaschromatographischen Untersuchung hochsiedender Flüssigkeiten oder Festsubstanzen (Hochpolymeren) geeignet, kann aber auch bei der Reaktionsgaschromatographie angewandt werden. Man schmilzt die Probe in eine evakuierte Glasampulle ein und unterwirft sie dann z. B. einer schonenden Pyrolyse oder Hydrolyse. Anschließend wird die Ampulle zertrümmert und deren Inhalt mit dem Trägergas in den Gaschromatographen gespült. An der Zersetzung von Polyoxy-methylenen wird die Arbeitstechnik erläutert; die hier erzielte Genauigkeit liegt bei etwa 1%.

Einleitung

Gaschromatographisch untersucht wurden ursprünglich nur gasförmige oder flüssige Substanzen, da man diese relativ leicht und genau in den Trägergasstrom und damit auf die Trennsäule bringen kann. Aus apparativen Gründen können dabei nur solche Stoffe analysiert werden, deren Siedepunkt unter 450 °C liegt. In letzter Zeit sind Arbeiten bekannt geworden, in denen die Gaschromatographie auch zur Untersuchung von hochsiedenden Flüssigkeiten oder von Feststoffen herangezogen wird. Im Prinzip beruhen diese Verfahren darauf, daß man die Moleküle der zu untersuchenden Probe chemisch oder thermisch in Bruchstücke überführt, die unterhalb 450 °C siedend. So gelang es¹⁾, schwer flüchtige organische Verbindungen durch gaschromatographische Analyse der bei 800 °C entstandenen Pyrolyse-Produkte zu identifizieren. Aldehyde und Ketone lassen sich durch Pyrolyse ihrer 2,4-Dinitrophenylhydrazone, organische Säuren über ihre Kaliumsalze bestimmen²⁾. Auch bei der Untersuchung von Polymeren wurde diese Methodik angewandt, beispielsweise bei der Analyse von Homo- und Copolymeren von Acryl- und Methacrylsäure-estern³⁻⁵⁾ und von Vinylacetat-Vinylchlorid-Copolymeren⁶⁾.

Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit hängt dabei vor allem davon ab, wie man die Ausgangssubstanz in kleinere Bruchstücke spaltet. Hierfür sind im wesentlichen zwei Methoden angewandt worden: Man behandelt entweder die Probe in einem einseitig zugeschmolzenen Röhrchen außerhalb des Gaschromatographen und kondensiert die Spaltprodukte in einer Kühlfalle bzw. spült sie direkt mit dem Trägergas in den Gaschromatographen ein, oder man nimmt die Zersetzung im Gaschromatographen selbst (z. B. am Eingang der Trennsäule) vor. Die Reaktionsbedingungen sind so zu wählen, daß die Substanz praktisch momentan zersetzt wird; andernfalls werden die Komponenten schlecht getrennt bzw. treten als unscharfe Fraktionen aus der Säule aus. So muß beispielsweise die thermische Zersetzung eines Polyacryl- bzw. Polymethacrylsäure-esters³⁻⁵⁾ an einem Heizdraht bei 800–1000 °C vorgenommen werden, obwohl die thermische Stabilität dieser Polymeren wesentlich niedriger ist (Halbwertstemperatur 327 bzw. 328 °C⁷⁾). Bei diesen hohen Temperaturen können natürlich Sekundärreaktionen eintreten, so daß die Zahl der Spaltstücke zunimmt und damit vor allem die quantitative Analyse erschwert wird. Das gleiche gilt für die Anwendung chemischer Methoden, wie z. B. Hydrolyse oder Acidolyse, wo man hohe Säurekonzentrationen und hohe Reaktionstemperaturen wählen muß, um eine momentane Spaltung der eingesetzten Substanzen zu erreichen.

¹⁾ J. Janák, Nature [London] 185, 684 [1960].

²⁾ J. W. Ralls, Analytic. Chem. 32, 332 [1960].

³⁾ E. A. Radell u. H. C. Strutz, ebenda 31, 1890 [1959].

⁴⁾ J. Strassburger, G. M. Brauer, M. Tryon u. A. F. Forziati, ebenda 32, 454 [1960].

⁵⁾ J. E. Guillet, W. C. Wooten u. R. L. Combs, J. appl. Polymer Sci. 3, 61 [1960].

⁶⁾ R. S. Lehrle u. J. C. Cobb, Nature [London] 183, 1671 [1959].

⁷⁾ B. G. Achhammer, M. Tryon u. G. M. Kline, Kunststoffe 49, 600 [1959]. — Als Halbwertstemperatur bezeichnet man die Temperatur, bei der das Polymere innerhalb von 30 min zur Hälfte zersetzt wird.