

DIE BESTIMMUNG DES MOLEKULARGEWICHTS AUS
ZWEI PUNKTEN UND DEM MAXIMUM DER GRADIENTENKURVE
DER ULTRAZENTRIFUGE

RAINER JAENICKE UND MATATIAHU GEHATIA

*Institut für physikalische Chemie der Universität Frankfurt/Main und
Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt/Main (Deutschland)*

(Eingegangen am 18 März, 1960)

SUMMARY

*The determination of the molecular weight from two points and the maximum
of the ultracentrifugal gradient curve*

The theory of Brownian motion in the centrifugal field, derived previously, provides a new method, the "Zweipunkt-Methode", (2PM), for the determination of the sedimentation coefficient s as well as the diffusion coefficient D from the maximal gradient and two points of a single experimental gradient curve obtained by means of the usual optical systems of the ultracentrifuge.

The experimental conditions and the verification of this method are discussed for three various substances with molecular weights between 20,000 and 150,000. The obtained results in case of these substances are in good agreement with the data given in the literature.

The mean error of the values of s and D for medium molecular weights ($\sim 100,000$), obtained at optimal conditions of experiment and evaluation, was 1 to 3 %, *i.e.* only one third of the error in the case of the three-points-method mentioned in a previous paper. For small molecular weights the mean error does not exceed 8 %. The variations of s/D are less than 5 % for medium molecular weights, for small ones they approach 20 % as a maximum.

Comparing the various former methods with the 2PM it seems that the 2PM has some advantages in the case of ideal systems of homogeneous particles; on the other hand the 2PM seems to be suitable to detect qualitatively the heterogeneity of strong polydisperse systems.

EINLEITUNG

Die mathematische Analyse der Gradientenkurve in der Ultrazentrifuge^{1,2} liefert Beziehungen für die Konzentration und den Konzentrations- bzw. Brechungsindex-Gradienten einer in der Ultrazentrifuge rotierenden Lösung von Makromolekülen, die neue Möglichkeiten zur Bestimmung des Sedimentations- und Diffusionskoeffi-

Abkürzungen: SM, Svedberg-Methode; MGM, Maximalgradienten-Methode; 3PM, Dreipunkt-Methode; 2PM, Zweipunkt-Methode. Die früher formulierte graphische "Two-points-method" ist von der vorliegenden 2PM zu unterscheiden.

zienten, bzw. ihres Quotienten s/D , d.h. zur direkten Molekulargewichtsbestimmung eröffnen²⁻⁵.

Die bisher vorgeschlagenen Wege erweisen sich insofern als nicht ganz befriedigend, als auf Grund der unzureichenden optischen Hilfsmittel, die die Empfindlichkeit der mathematischen Analyse nicht annähernd auszunutzen gestatten, Fehler in s/D zwischen > 6 % (3PM) und 17 % (MGM) auftraten.

Im folgenden wird nun eine aus den gleichen Voraussetzungen gewonnene Methode mitgeteilt, die bei Berücksichtigung bestimmter experimenteller Vorbedingungen mit den gebräuchlichen Hilfsmitteln der PHILPOT-SVENSSON-Optik weniger stark mit systematischen und subjektiven Fehlern behaftet ist, sodass mit guter Reproduzierbarkeit Werte von s , D und daraus M berechnet werden können, die für die untersuchten Standard-Substanzen mit den Angaben in der Literatur gut übereinstimmen.

Theoretische Grundlage

Wenn eine ideale, monodisperse und nicht elektrolytische, bzw. beim isoelektrischen Punkt (IP) befindliche Lösung in einer Zelle mit "künstlicher Grenze" (synthetic boundary) bei konstanter Geschwindigkeit ω und konstanter Temperatur rotiert und wenn die Schichtzonen und die Gradientenkurve weder durch den Meniskus noch durch den Boden der Zelle beeinflusst sind, lässt sich der Gradient des Brechungsindex der Lösung $\partial n/\partial r$ bei jedem Abstand r vom Rotationszentrum und zu jeder Zeit t vom Beginn des Versuchs mit Hilfe der Näherungsgleichung

$$\frac{\partial n}{\partial r} = \frac{(\Delta n_0) e^{-2\beta t}}{(4\pi D \alpha t)^{\frac{1}{2}}} \cdot e^{-\frac{(r_0 e^{\beta t} - r)^2}{4D \alpha t}} \cdot \left(\frac{r_0 e^{\beta t}}{r}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

ausdrücken², mit: $\beta = s\omega^2$; s , Sedimentationskoeffizient; $\alpha = (e^{2\beta t} - 1)/(2\beta t)$; r_0 , Abstand der Schichtgrenze vom Rotationszentrum zur Zeit $t = 0$; D , Diffusionskoeffizient und Δn_0 , Differenz der Brechungsindices von Lösung und Lösungsmittel zur Zeit $t = 0$.

Da der Faktor $\left(\frac{r_0 e^{\beta t}}{r}\right)^{\frac{1}{2}}$ den im übrigen symmetrischen Ausdruck der Gl. (1) verzerrt, ersetzen wir den Gradienten $\frac{\partial n}{\partial r}$ durch eine neue Funktion $w = r^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\partial n}{\partial r}\right)$, die eine GAUSSsche Kurve darstellt. In w lässt sich dann folgendermassen formulieren:

$$\ln w = k - \frac{(r_0 e^{\beta t} - r)^2}{4D \alpha t}, \quad (2)$$

wobei $k = (\Delta n_0) e^{-2\beta t} \left(\frac{r_0 e^{\beta t}}{4\pi D \alpha t}\right)^{\frac{1}{2}}$ von r unabhängig ist. Aus zwei beliebigen Punkten der Gradientenkurve $P_i \left[r_i; \left(\frac{\partial n}{\partial r}\right)_i\right]$ und $P_j \left[r_j; \left(\frac{\partial n}{\partial r}\right)_j\right]$ lassen sich nun nach Gl. (2) Ausdrücke für die entsprechenden $\ln w_i$ und $\ln w_j$ ableiten, aus denen wir die folgende Funktion gewinnen:

$$g_{ji} = \frac{\ln w_j - \ln w_i}{r_j - r_i} = \frac{(r_0 e^{\beta t} - r_i)^2 - (r_0 e^{\beta t} - r_j)^2}{4D \alpha t (r_j - r_i)} = \frac{2 r_0 e^{\beta t} - r_j - r_i}{4D \alpha t}. \quad (3)$$

Nun gilt für den Maximalgradienten die Approximation²

$$H \approx \frac{(\Delta n_0) e^{-2\beta t}}{(4\pi D \alpha t)^{\frac{1}{2}}}; \quad (4)$$

daraus folgt

$$4D\alpha t = \frac{(\Delta n_0)^2 e^{-4\beta t}}{\pi H^2}, \quad (5)$$

sodass Gl. (3) in

$$f_{ji} = \frac{g_{ji} (\Delta n_0)^2}{2\pi H^2} = r_0 \cdot e^{5\beta t} - \bar{r}_{ji} \cdot e^{4\beta t} \quad (6)$$

transformiert werden kann, wobei $\bar{r}_{ji} = \frac{r_j + r_i}{2}$ den mittleren Radius der Punkte j und i darstellt.

Da bei nicht zu langer Versuchsdauer die Ungleichung

$$1 \gg 5\beta t \gg (5\beta t)^2 \gg \dots$$

gilt, kann in erster Näherung

$$e^{5\beta t} \approx 1 + 5\beta t \text{ und } e^{4\beta t} \approx 1 + 4\beta t$$

substituiert werden. Gl. (6) geht dann über in

$$f_{ji} = (r_0 - \bar{r}_{ji}) + (5r_0 - 4\bar{r}_{ji}) \beta t \quad (7)$$

und endlich in

$$\beta t = \frac{f_{ji} + (\bar{r}_{ji} - r_0)}{5r_0 - 4\bar{r}_{ji}} \quad (8)$$

Diese Beziehung liefert wegen $\beta = s\omega^2$ unmittelbar den Sedimentationskoeffizienten s .

Der Diffusionskoeffizient D resultiert in analoger Weise aus Gl. (3), indem bei kurzer Versuchsdauer

$$\frac{1}{\alpha} \approx e^{-\beta t} \approx 1 - \beta t$$

gilt, sodass Gl. (3) sich vereinfacht zu

$$g_{ji} = \frac{r_0 - \bar{r}_{ji} (1 - \beta t)}{2Dt} \quad (9)$$

Daraus

$$D = \frac{r_0 - \bar{r}_{ji} (1 - \beta t)}{2 g_{ji} t} \quad (10)$$

EXPERIMENTELLER TEIL

Die im vorigen abgeleiteten Gleichungen zur Bestimmung des Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten aus der Gradientenkurve in der Ultrazentrifuge wurden im Molekulargewichtsbereich zwischen 20,000 und 150,000 in der Spinco-Ultrazentrifuge Modell E experimentell geprüft.

Die dabei als notwendig erkannten experimentellen Voraussetzungen seien zusammen mit den angewandten Messmethoden, soweit sie von der Norm abweichen, im folgenden kurz angegeben.

Experimentelle Voraussetzungen

Die synchrone Bestimmung von s und D in der Ultrazentrifuge stellt auf Grund der grossen Empfindlichkeit der BROWNSchen Bewegung gegen äussere Störungen an die Mechanik, Elektronik und Optik der Ultrazentrifuge hohe Anforderungen. Diese beziehen sich (a) auf die Erschütterungsfreiheit des Systems, (b) auf die Konstanz der Winkelgeschwindigkeit, (c) auf den Ausschluss von Präzessions-

bewegungen des Rotors, (d) auf maximale Temperaturkonstanz, (e) auf die Exaktheit der Angabe des PHILPOT-Winkels φ und (f) auf optimale Verhältnisse bei der Abbildung der Gradientenkurve.

Alle diese Voraussetzungen, mit Ausnahme der letzten, können in der hier zugrundeliegenden Ultrazentrifuge unter bestimmten Bedingungen als hinreichend erfüllt angesehen werden. Die Einschränkung bzgl. der Abbildung der Gradientenkurve beruht dabei auf der systembedingten mangelhaften Lokalisierbarkeit der "theoretischen" Gradientenkurve in dem vom optischen System entworfenen photographischen Bild.

Die exakte Theorie der BROWNSchen Bewegung im Zentrifugalfeld bedürfte zu ihrer Bestätigung ebenso wie zu ihrer allgemeinen Anwendung einer sehr schmalen scharfen Gradientenkurve und Basislinie, die derzeit nur mit einer gewissen Willkür dem photographischen Bild entnommen werden kann, etwa durch Konstruktion der "Mittelpunkts-Kurve" zwischen äusserer und innerer Kante der Abbildung des Diaphragmas (Schneide, Phasenplatte, Spalt, Draht, Phasenkante) oder durch Wahl der die Diaphragma-Abbildung nach unten begrenzenden Kurve ("Tangenten-Kurve"). Die im folgenden mitgeteilten Messungen werden zeigen, dass die hier diskutierte Methode gegen derartige Fehlereinflüsse verhältnismässig unempfindlich ist, sodass sie mit allen heute gebräuchlichen optischen Hilfsmitteln angewandt werden kann.

Messmethode

Die für die hier mitgeteilten Messungen erforderliche Stabilität von Temperatur und Winkelgeschwindigkeit, sowie die Herabminderung der Präzession des Rotors lässt sich unter bestimmten experimentellen Bedingungen erreichen.

1. Es empfiehlt sich dabei, auf die Verwendung des Kühlaggregates oder der Thermoregulierung während der Messung zu verzichten, da diese Einrichtungen die voraussetzungsgemäss kurzen Messungen zu stören vermögen. Eher erscheint es ratsam, die Ergebnisse auf die gewünschte Temperatur zu korrigieren oder geraume Zeit vor Beginn des Versuches das System auf diese Temperatur zu bringen.

2. Bei der Wahl der Winkelgeschwindigkeit hat man unter Berücksichtigung der Grössenordnung des Molekulargewichts so zu verfahren, dass Sedimentation und Diffusion in einem vernünftigen Verhältnis zueinander stehen. Optimale Bedingungen sind dabei besonders im Hinblick auf mögliche Fehler im Falle polydisperser Systeme dadurch definiert, dass die Verbreiterung der Gradientenkurve durch Diffusion gross sein muss gegen die Verbreiterung durch Polydispersitätseinflüsse, sodass der Polydispersitätseffekt gegen den Diffusionseffekt vernachlässigt werden kann.

Die Einstellung der stationären Geschwindigkeit ohne Auftreten störender Bremsvorgänge gelingt in einfacher Weise so, dass man kurz vor Erreichen der Endgeschwindigkeit auf den Erfahrungswert der Spannung einstellt und dann durch kurzen Druck auf das "Beschleunigungs-Relais" am Getriebekasten verhindert, dass die Endgeschwindigkeit überschritten wird. Regulierung auf annähernd zeitgleiche Signale des Antriebsstromes führen dann zur Konstanz der Umdrehungsfrequenz in den vom Getriebe bedingten engen Grenzen, ohne dass Schaltvorgänge auftreten.

3. Die Präzession des Rotors, die sich bei Ausnutzung der grossen Unwucht-Toleranz vor allem bei kleinen Winkelgeschwindigkeiten in der Abbildung des Gradienten störend bemerkbar machen kann, lässt sich—soweit sie nicht durch die

Unwucht des Rotors selbst bedingt ist — durch Tarierung von Zelle und Gegengewicht auf < 20 mg weitgehend herabmindern. (Selbstverständlich lässt sich auf diesem Wege nur die statische Unwucht ausschliessen.)

Schwieriger als die zuvor angegebenen Möglichkeiten ist das Problem der exakten Bestimmung des PHILPOT-Winkels φ und in Verbindung damit die Angabe der genauen optischen Konstanten der Ultrazentrifuge, die sich insbesondere deshalb als notwendig erweisen, weil im Interesse scharf definierter Maxima und Basislinien, sowie möglichst horizontaler Lösungsmittel-Referenzen, meist im Bereich zwischen 70 und 90°, d.h. im Bereich maximaler Empfindlichkeit der Tangensfunktion gemessen wird*.

Eine Möglichkeit, den PHILPOT-Winkel und die optischen Konstanten (mit Ausnahme der Radialvergrösserung, die durch die Referenzabstände mit genügender Genauigkeit definiert ist) zu eliminieren, ist gegeben, wenn man am Ort der Zellmitte einen bekannten konstanten Gradienten δ in den Lichtweg der Ultrazentrifuge bringt, der auf der Photoplatte ein um den Betrag

$$\tilde{Z} = \delta/F$$

parallelverschobenes Bild des Diaphragmas liefert, wobei in

$$F = \operatorname{tg}\varphi/A \cdot f_y$$

der PHILPOT-Winkel φ , sowie der optische Hebelarm A und die Vergrösserung der Gradientenordinate am Ort des Diaphragmas durch Kamera- und Zylinderlinse f_y enthalten sind. Gelingt es also δ und \tilde{Z} mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen, so folgt F als Quotient dieser beiden Messgrössen.

Nun steht in den prismatischen Fenstern (wedge windows) der Ultrazentrifuge ein geeigneter konstanter Gradient zur Verfügung, dessen Betrag goniometrisch oder optisch kathetometrisch ohne Schwierigkeit bestimmt werden kann**. Bringt man ihn durch Vertauschen der Reihentolge von Mittelstück und Fenster mit Hilfe eines schmalen Distanzringes in Zellmitte und setzt die gesamte Anordnung zusammen mit einer leeren Normalzelle in den Rotor ein, so erhält man bei langsamter Rotation (< 4,000 Umdreh./min) zwei parallele Diaphragmabilder, deren $1/\operatorname{tg}\varphi$ proportionaler Abstand \tilde{Z} photographisch ermittelt werden kann. (Die notwendige Tarierung setzt dabei die Verwendung von Mittelstücken etwa gleicher Masse — Kel-F, Filled Epon — voraus). Etwaige Fehler beim Zusammenfügen oder Einsetzen der Zellen wirken sich nur wenig aus; sie liegen unter 5% in \tilde{Z} . Wesentlich kleiner kann der Fehler bei der Bestimmung von δ gehalten werden. Selbst für die kathetometrische Bestimmung liegt er im ungünstigsten Falle bei 2%. Für das von uns verwendete prismatische Fenster ergab sich bei einem Abstand von $l = 63.38 \pm 0.05$ cm eine Ablenkung $\alpha = 0.5429 \pm 0.0009$ cm und damit $\delta_{\text{rad}} = 8.5666 \cdot 10^{-3}$. Daraus folgt, wenn man auf

* Die Genauigkeit der Angabe von φ kann bei der Justage der Optik kaum über $\pm 10'$ hinausgetrieben werden. Das entspricht in dem hier betrachteten Winkelbereich Abweichungen in D resp. s/D in der Grössenordnung von 10%.

** Zur kathetometrischen Bestimmung, die auf eine Messung der Verschiebung α des Bildes einer sekundären Lichtquelle (Lochblende) bei Einbringen des prismatischen Fensters in den Lichtweg und auf die Messung des Abstandes l von Fenster und Bild der Lichtquelle hinausläuft, ist es zweckmässig, durch 180°-Drehung des Fensters um seine Achse die maximale Ablenkung 2α nach oben und unten zu bestimmen, da auf diese Weise mögliche Fehler der Normalität von Lichtstrahl und Prismafläche reduziert werden. Strichgitter und Monochromatfilter hinter der Abbildungslinse verbessern die Messmöglichkeit durch das Auftreten von sich überschneidenden Serienbildern der Lochblende.

eine Zellhöhe von $d = 1$ cm normiert bei Verwendung eines 1.2 cm-Mittelstücks

$$\tilde{\delta} = \frac{\delta_{\text{rad}}}{d} = (7.139 \pm 0.009) \times 10^{-3}$$

In der Konstante F erscheint damit auch die Dicke der Zelle d mit einbezogen

$$F_d = \frac{F}{d} = \frac{\text{tg}\varphi}{d \cdot A \cdot f_y}$$

sodass sich der in

$$f_{ji} = \frac{g_{ji} (\Delta n_0)^2}{2 \pi H^2} = \frac{2 g_{ji}}{4\pi \left[\frac{H}{(\Delta n_0)} \right]^2} = \frac{2 g_{ji}}{4\pi \left[\frac{F_d \cdot Z_{\max}}{(\Delta n_0)} \right]^2} \quad (6a)$$

enthaltene konstante Anteil K ergibt zu

$$K = \frac{4\pi F_d^2}{(\Delta n_0)^2} = \frac{4\pi \text{tg}^2 \varphi}{(d \cdot A \cdot f_y \cdot \Delta n_0)^2} \quad (11)$$

Praktisch geht man also zweckmäßig so vor, dass man dem eigentlichen Ultrazentrifugen-Versuch bei unverändertem PHILPOT-Winkel die photographische Aufnahme der Ablenkung \tilde{Z} folgen lässt, aus deren Betrag in Verbindung mit $\tilde{\delta}$ die Konstante F_d mit einem Fehler von $< 5\%$ folgt.

Auswertung

Zur Auswertung der Aufnahmen diente ein Leitz-Tischprojektor TP 200 bzw. 20-fach vergrösserte photographische Abzüge der Platten.

Prinzipiell ergeben sich auf Grund der unterschiedlichen Beugungerscheinungen an der Phasengrenze gewisse Unterschiede in der Ausmessung der Gradienten Z , je nachdem die Phasenkante, die Phasenplatte oder ein dünner Draht als Diaphragma dienen (Fig. 1 und 2); doch kann generell für die vorliegende Methode die "Mittelpunkts-Kurve", die mit dem Normalenlineal leicht exakt konstruiert werden kann

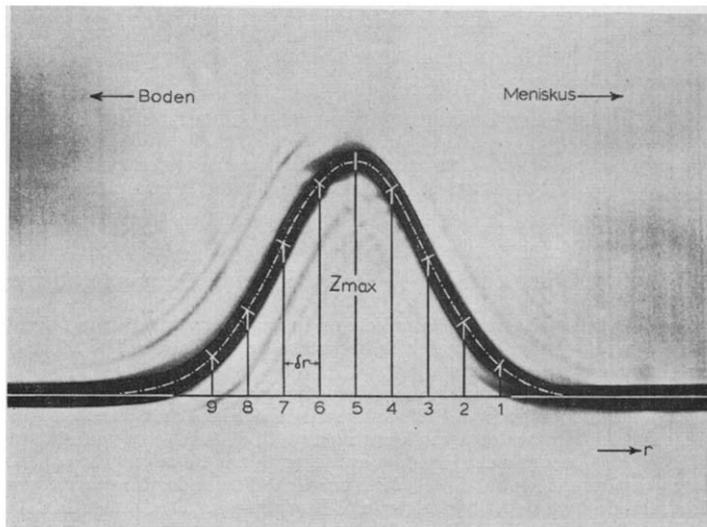


Fig. 1. Gradientenkurve mit Phasenkante als Diaphragma "Mittelpunkts-Kurve", $\varphi = 80^\circ$.

(vgl. Fig. 1), als hinreichende Approximation an die theoretische Gradientenkurve angesehen werden. Für Phasenplatte und Draht erweist sich allerdings die das Diaphragmabild innen begrenzende "Tangenten-Kurve" (Fig. 2) als zur Auswertung besser geeignet, da sie sich zumindest auf dem photographischen Abzug als Schwarz-Weiss-Grenze leichter ausmessen lässt als die innerhalb der schwarzen Zone liegende "Mittelpunkts-Kurve", sodass in diesem Falle eine höhere Genauigkeit der Vermessung und damit eine Verminderung des Fehlers von s und D bzw. s/D erreicht werden kann. (Vgl. die Fehlerangaben in Tabelle II, Seite 228/229). Sie stellt überdies für die beiden zuletzt erwähnten optischen Systeme eine wesentlich bessere Approximation bzgl. der theoretischen Kurve im Gradientenbild dar als die "Mittelpunkts-Kurve", während für den Fall der Phasenkante die "Mittelpunkts-Kurve" als der theoretischen Kurve sehr nahekommen angesehen werden kann.

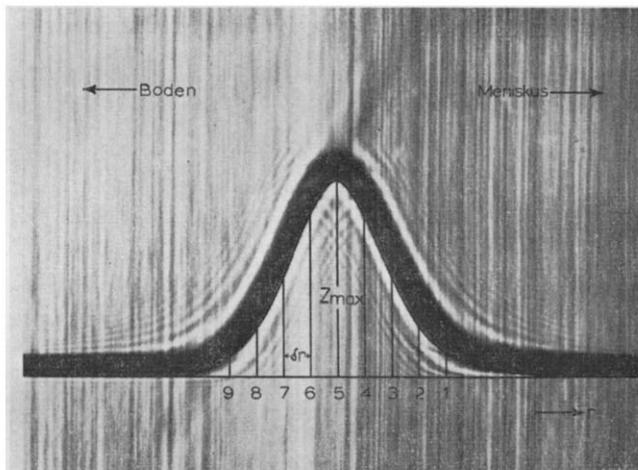


Fig. 2. Gradientenkurve mit Draht $0.08 \text{ mm } \varnothing$ als Diaphragma "Tangenten-Kurve" $\varphi = 80^\circ$.

Ermittelt man nämlich unter Zuhilfenahme zuverlässiger s - und D -Werte mit der Methode des maximalen Gradienten^{2,3} die theoretischen Z_{\max} und vergleicht sie mit den experimentellen Werten, so resultiert folgendes Schema, das zugleich einen Hinweis für die Wahl der richtigen Kurve bei der Anwendung der Maximalgradienten-Methode bietet:

| Diaphragma | "Tangenten-Kurve" | "Mittelpunkts-Kurve" |
|--------------------------------------|--|----------------------------|
| Draht $0.08 \text{ mm } \varnothing$ | Gute Übereinstimmung | Annähernde Übereinstimmung |
| Phasenplatte | Gute Übereinstimmung | Keine Übereinstimmung |
| Phasenkante | Keine Übereinstimmung (nur bedingt konstruierbar) | Sehr gute Übereinstimmung |

Eine auf Boden- oder Meniskus-Referenz senkrechte Radiuslinie wird zunächst in eine beliebige Anzahl (5 bis 15) äquidistante Zonen δr definierten Abstandes r vom Rotationszentrum geteilt und die zugeordneten Höhen Z mit grösstmöglicher Genauigkeit ausgemessen. Die Basislinie berücksichtigt dabei die Schräge der Lösungsmittel-Referenz in der Weise, dass sie—parallel der zuvor erwähnten Radiuslinie—

das Mittel darstellt zwischen der Höhendifferenz der Asymptoten der Gradientenkurve*.

Bei den vorliegenden optischen Hilfsmitteln scheinen die horizontale Basis, sowie die Exaktheit der Bestimmung der Höhen wesentlichste Voraussetzungen für die Genauigkeit der Auswertungsergebnisse zu sein. Sie vermindern den Gang in den aus einer Gradientenkurve resultierenden Sedimentationskoeffizienten, der als Folge einer falschen Basislinie anzusehen ist und reduzieren ihre Streuung, die auf Ungenauigkeiten bei der Bestimmung von r und Z zurückgeht. Dabei ist von zusätzlicher Bedeutung, dass hier—im Gegensatz zur wesentlich störungsempfindlicheren 3PM^{4,5}—das Maximum der Gradientenkurve, dessen Betrag ohnehin zur Bestimmung der Konstanten L (s.u.) ermittelt werden muss, zweckmässig als mittlerer r -Wert gewählt wird, da das Produkt $r^2 \cdot Z = w$ bei der Bildung des Ausdrucks $\Delta \log w_{11}$ im Falle nahezu gleicher Z für r und $r + \delta r$ (Zonenabstände vom Maximum = $X = \pm \frac{\delta r}{2}; \pm \frac{3\delta r}{2}; \pm \frac{5\delta r}{2} \dots$) Messfehler im Bereich des Maximums wesentlich verstärkt. (Vgl. Tab. II, S. 228/229).

Beispiele

Die numerische Auswertung sei im folgenden an Hand eines der Systeme, an denen die vorliegende Methode geprüft wurde, paradigmatisch erläutert.

Die Versuche wurden in einer Spinco-Ultrazentrifuge Modell E mit Philpot-Svensson-Optik ausgeführt. Dabei wurde angewandt: Filled-Epon Überschichtungszelle (Kapillartyp) 3°, $d = 12$ mm. Die erste Aufnahme wurde etwa 15 bis 25 Min nach Einstellung der Endgeschwindigkeit gemacht; Intervall 4'; Belichtung 20"; Versuchsdauer ca. 90 Min. Als Diaphragma diente (a) die Phasenkante von Spinco^{**}; (b) eine Phasenplatte (Möller, Wedel/Holstein) und (c) ein dünner Draht von 0.08 mm Durchmesser. Die Brechungsindex-Differenzen wurden in einem Differential-Refraktometer analog dem von Brice-Phoenix gemessen; die partiellen spezifischen Volumina V_p pyknometrisch und mit Hilfe der "magnetic-float-method"⁶. Die notwendigen Konzentrationsbestimmungen wurden durch Trockenwägung bis zur Gewichtskonstanz bei 106° C vorgenommen.

Als Standard-Systeme fanden nach jeweils 24 bis 40 stündiger Dialyse folgende Substanzen Verwendung (Temperatur, 20°C):

1. *α-Chymotrypsinogen*: "crystallized saltfree", Freehold, New Jersey. CG 450-1.

IP 9.45.

~ 0.8 % in Natriumborat-NaOH-Puffer. pH, 9.45; μ , 0.3.

$(\Delta n_0)_{20^\circ} = 1.5129 \cdot 10^{-3}$.

$V_{p20^\circ} = 0.722 \pm 0.004$.

2. *Serumalbumin vom Rind*: "trocken reinst", Behring-Werke, Marburg/L., Op. Nr. 23256. IP 4.4.

2a. ~ 0.8 % in Citronensäure-Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer. pH, 4.4; μ , 0.2.

$(\Delta n_0)_{20^\circ} = 1.6065 \cdot 10^{-3}$.

2b. ~ 1.0 % in Phosphat-Puffer nach SØRENSEN. pH, 7.0; μ , 0.1.

$(\Delta n_0)_{20^\circ} = 1.7523 \cdot 10^{-3}$.

* Diese Aussage kann nur für den hier angewandten Winkelbereich $70 < \varphi < 90$ gemacht werden.

** Fa. Beckman Instr. GmbH, München, sei auch an dieser Stelle für die leihweise Überlassung der Phasenkante gedankt.

2c. $\sim 0.6\%$ in Acetat-Puffer nach KEGELES⁷. pH, 4.4; 0.9% NaCl.

$$(\Delta n_0)_{20^\circ} = 1.5434 \cdot 10^{-3}$$

$$V_{p20^\circ} = 0.729 \pm 0.005$$

3. γ -Globulin vom Rind: "trocken reinst", Behring-Werke, Marburg/L., Op. Nr. 19854. IP 7.0.

$\sim 0.7\%$ in Phosphat-Puffer nach SØRENSEN. pH, 7.0; μ , 0.1.

$$(\Delta n_0)_{20^\circ} = 1.7985 \cdot 10^{-3}$$

$$V_{p20^\circ} = 0.741 \pm 0.005$$

Dem nun folgenden Rechenschema (Tabelle I) liegt Gl. (8) und (10) zugrunde. Es bedarf nur bzgl. der Konstanten näherer Erläuterung. Im übrigen kann es genügen, die Bedeutung der einzelnen Rubriken zu definieren (vgl. auch Fig. 1 und 2).

Spalte 1 gibt die Reihenfolge der δr -Zonen an in der Anordnung wachsenden Abstandes vom Rotationszentrum; Spalte 2, die auf die Zelldimension reduzierten Abstände Δr der Zonen von Meniskus- resp. Bodenreferenz in cm; Spalte 3, die Abstände vom Rotationszentrum in cm: $r = 7.3 - \Delta r$ (Bodenreferenz), $r = 5.7 + \Delta r$ (Meniskusreferenz); Spalte 4, deren Quadratwurzel auf 5 Stellen; Spalte 5, $\bar{r}_{ji} = \frac{r_j + r_i}{2}$; Spalte 6, $(\bar{r}_{ji} - r_0) \times 10^2$, mit r_0 als dem Ort des Gradienten zum Zeitpunkt t_0 , der — geringe Kompressibilität des Lösungsmittels vorausgesetzt — aus dem Photogramm des Meniskus vor der Überschichtung bei niedriger Umdrehungszahl, oder generell aus dem $\log r/t$ -Diagramm⁸ durch Extrapolation auf die Zeit Null folgt*; Spalte 7: $5r_0 - 4\bar{r}_{ji}$; Spalte 8, die den Zonen r zugeordneten Gradientenordinaten Z in mm, da auch \tilde{Z} in mm angegeben wird (vgl. S. 221); Spalte 9, $w = r^{\frac{1}{2}} \cdot Z$; Spalte 10, $\log w$ mit fünfstelligen Logarithmen; Spalte 11, $\Delta \log w_{ji} = \log w_j - \log w_i$ unter Berücksichtigung des Vorzeichens; Spalte 12, $f_{ji} = L \cdot \Delta \log w_{ji}$. Nach Gl. (3), (6) und (6a) ist

$$f_{ji} = \frac{\Delta \ln w_{ji}}{\delta r} \cdot \frac{(\Delta n_0)^2}{2\pi H^2} = \frac{2.3026 \cdot \Delta \log w_{ji}}{\delta r} \cdot \frac{2}{\frac{4\pi F_d^2}{(\Delta n_0)^2} \cdot Z_{\max}^2}$$

Daraus ergibt sich mit (11):

$$f_{ji} = \Delta \log w_{ji} \cdot \frac{4.6052}{\delta r \cdot K \cdot Z_{\max}^2},$$

wobei sich der Bruch zu einer neuen Konstante

$$L = \frac{4.6052}{\delta r \cdot K \cdot Z_{\max}^2}$$

zusammenfassen lässt. δr auf dem photographischen Abzug oder der Platte ist darin durch Berücksichtigung der Radialvergrößerung auf Zelldimensionen zu reduzieren: z.B. auf $20 \times$ Vergrößerung (Referenzenabstand = 32 cm) $\delta r = 0.5$ cm; daraus

* Als Anfangszeit t_0 wurde der Zeitpunkt der Überschichtung gewählt, mit dem die Diffusion einsetzt. Diese Grösse ist bzgl. der Sedimentation jedenfalls für kleine t korrekturbürtig, indem die Angabe der "wahren" Zeit⁹ bei maximaler Beschleunigung (14 A) und den hier angewandten $\omega^2 < 2 \cdot 10^7$ zu Abweichungen in t von ≤ 3 min, d.h. in r_0 von maximal $2 \cdot 10^{-3}$ cm führt. Da sich diese Diskrepanz aber bei der numerischen Berechnung von s nach der vorliegenden Methode im Mittel nur unbedeutend äussert, während die Bestimmung von D durch sie verhältnismässig stark beeinflusst wird, kann die obige Festlegung von t_0 als gerechtfertigter Kompromiss angesehen werden.

TABELLE

RECHENSCHEMA ZUR BESTIMMUNG VON s , D

Rinderserumalbumin (za)

0.08 mm

$$U = 29.500 \text{ Umdreh./min}; \quad \omega^2 = 9.542 \cdot 10^6 \text{ sec}^{-1}; \quad \varphi \approx 82.5^\circ;$$

Aufnahme 5: $t = 2.006 \cdot 10^3 \text{ sec}; \quad \delta r_{\text{Zelle}} = 2.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm};$

| <i>Nr.</i> | <i>2</i> Δr (Boden) | <i>3</i> r | <i>4</i> $r_{1/2}$ | <i>5</i> \bar{r} | <i>6</i> $(\bar{r} - r_0) \times 10^3$ | <i>7</i> $5r_0 - 4\bar{r}$ | <i>8</i> Z | <i>9</i> w | <i>10</i> $\log w$ | <i>11</i> $\Delta \log w$ |
|------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|---|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|------------------------------|
| 1 | 0.87325 | 6.42675 | 2.5351 | 6.43925 | — 1.085 | 6.4935 | 10.83 | 27.455 | 1.43862 | + 0.28905 |
| 2 | 0.84825 | 6.45175 | 2.5400 | 6.46425 | + 1.415 | 6.3935 | 21.03 | 53.416 | 1.72767 | + 0.19666 |
| 3 | 0.82325 | 6.47675 | 2.5450 | 6.48925 | + 3.915 | 6.2935 | 33.01 | 84.010 | 1.92433 | + 0.09950 |
| 4 | 0.79825 | 6.50175 | 2.5499 | 6.51425 | + 6.415 | 6.1935 | 41.43 | 105.642 | 1.02383 | - 0.08652 |
| 5 | 0.77325 | 6.52675 | 2.5548 | 6.53925 | + 8.915 | 6.0935 | 33.88 | 86.557 | 1.93731 | - 0.20015 |
| 6 | 0.74825 | 6.55175 | 2.5596 | 6.56425 | + 11.415 | 5.9935 | 21.33 | 54.596 | 1.73716 | - 0.31631 |
| 7 | 0.72325 | 6.57675 | 2.5643 | | | | 10.23 | 26.233 | 1.41885 | |

Aufnahme 16: $t = 4.648 \cdot 10^3 \text{ sec}; \quad \delta r_{\text{Zelle}} = 2.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm};$

| | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|--------|---------|----------|--------|-------|--------|---------|-----------|
| 1 | 0.83625 | 6.46375 | 2.5424 | 6.47625 | + 2.615 | 6.3455 | 7.75 | 19.704 | 1.29456 | + 0.20842 |
| 2 | 0.81125 | 6.48875 | 2.5473 | 6.50125 | + 5.115 | 6.2455 | 12.50 | 31.841 | 1.50298 | + 0.15435 |
| 3 | 0.78625 | 6.51375 | 2.5522 | 6.52625 | + 7.615 | 6.1455 | 17.80 | 45.429 | 1.65733 | + 0.11120 |
| 4 | 0.76125 | 6.53875 | 2.5571 | 6.55125 | + 10.115 | 6.0455 | 22.95 | 58.685 | 1.76853 | + 0.04914 |
| 5 | 0.73625 | 6.56375 | 2.5620 | 6.57625 | + 12.615 | 5.9455 | 25.65 | 65.715 | 1.81767 | - 0.02356 |
| 6 | 0.71125 | 6.58875 | 2.5668 | 6.60125 | + 15.115 | 5.8455 | 24.25 | 62.245 | 1.79411 | - 0.09052 |
| 7 | 0.68625 | 6.61375 | 2.5717 | 6.62625 | + 17.615 | 5.7455 | 19.65 | 50.534 | 1.70359 | - 0.13418 |
| 8 | 0.66125 | 6.63875 | 2.5766 | 6.65125 | + 20.115 | 5.6455 | 14.40 | 37.103 | 1.56941 | - 0.20090 |
| 9 | 0.63625 | 6.66375 | 2.5814 | | | | 9.05 | 23.362 | 1.36851 | |

$\delta r_{\text{Zelle}} = \frac{0.5}{20} = 2.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$; Spalte 13, die Summe von Spalte 6 und 12 unter Berücksichtigung des Vorzeichens; Spalte 14, βt als Quotient aus Spalte 13 und 7, entsprechend Gl. (8); Spalte 15, der Sedimentationskoeffizient aus Spalte 14 gemäß $s = \beta t / \omega^2 t$; Spalte 19: das Produkt $(N \cdot \Delta \log w_{14}) \times 10^{-5}$ mit $N = \frac{4.6052 \cdot t}{\delta r}$, das als Nenner in Gl. (10) resultiert, wenn man g_{14} durch $\frac{2.3026 \cdot \Delta \log w_{14}}{\delta r}$ ersetzt (Gl. (3)).

I

UND s/D NACH DER ZWEIPUNKT-METHODE

Draht-Diaphragma

Versuch Nr. 1

$$\tilde{Z} = 22.01 \text{ mm}; \quad F = 3.2435 \cdot 10^{-4}; \quad K = 5.1199 \cdot 10^{-1};$$

$$Z_{\max} = 41.43 \text{ mm}; \quad L = 2.0961 \cdot 10^{-1}; \quad N = 3.6952 \cdot 10^5.$$

| $\frac{I_2}{f_{ji} \times 10^2}$ | $\frac{I_3}{f_{ji} + (\bar{r}_0 - r_0) \times 10^2}$ | $I_4 \times 10^2$ | $I_5 \times 10^{13}$ | $I_6 \times \beta t$ | $\bar{r}(I - \beta t)$ | $I_7 \times 10^2$ | $I_8 \times 10^2$ | $I_9 \times 10^5$ | $NA \log w \times 10^{-5}$ | $D \times 10^7$ | $s/D \times 10^7$ |
|----------------------------------|--|-------------------|----------------------|----------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|
| + 6.05884 | 4.974 | 0.7660 | 4.00 | 0.99234 | 6.38993 | + | 6.02 | + 1.06810 | 5.64 | 7.09 | |
| + 4.12223 | 5.537 | 0.8661 | 4.52 | 0.99134 | 6.40826 | + | 4.18 | + 0.72670 | 5.75 | 7.86 | |
| + 2.08564 | 6.001 | 0.9535 | 4.98 | 0.99047 | 6.42738 | + | 2.27 | + 0.36767 | 6.17 | 8.07 | |
| - 1.81356 | 4.601 | 0.7429 | 3.88 | 0.99257 | 6.46586 | - | 1.58 | - 0.31971 | 4.94 | 7.85 | |
| - 4.19539 | 4.720 | 0.7746 | 4.05 | 0.99225 | 6.48860 | - | 3.85 | - 0.73960 | 5.21 | 7.77 | |
| - 6.67216 | 4.743 | 0.7913 | 4.13 | 0.99209 | 6.51231 | - | 6.22 | - 1.17622 | 5.29 | 7.81 | |

$$\langle s \rangle = 4.26 \cdot 10^{-13} \quad \langle D \rangle = 5.50 \cdot 10^{-7} \quad \langle s/D \rangle = 7.74 \cdot 10^{-7}$$

$$Z_{\max} = 25.65 \text{ mm}; \quad L = 5.4768 \cdot 10^{-1}; \quad N = 8.5620 \cdot 10^5.$$

| | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------|--------|------|---------|--------|---|-------|----------|------|------|--|
| + 11.4147 | 14.030 | 2.2110 | 4.98 | 0.97789 | 6.3330 | + | 11.71 | + 1.7845 | 6.56 | 7.59 | |
| + 8.4534 | 13.568 | 2.1724 | 4.90 | 0.97827 | 6.3600 | + | 9.01 | + 1.3215 | 6.82 | 7.18 | |
| + 16.0902 | 13.705 | 2.2301 | 5.03 | 0.97770 | 6.3807 | + | 6.45 | + 0.9521 | 6.77 | 7.43 | |
| + 2.6913 | 12.806 | 2.1183 | 4.78 | 0.97882 | 6.4125 | + | 3.76 | + 0.4207 | 8.95 | 5.34 | |
| - 1.2903 | 11.325 | 1.9048 | 4.29 | 0.98095 | 6.4510 | - | 0.09 | - 0.2017 | 4.46 | 9.62 | |
| - 4.9576 | 10.157 | 1.7376 | 3.92 | 0.98262 | 6.4865 | - | 3.64 | - 0.7750 | 4.70 | 8.34 | |
| - 7.3488 | 10.266 | 1.7868 | 4.03 | 0.98213 | 6.5079 | - | 5.78 | - 1.1489 | 5.03 | 8.01 | |
| - 11.0029 | 9.112 | 1.6150 | 3.64 | 0.98385 | 6.5438 | - | 9.37 | - 1.7201 | 5.45 | 6.68 | |

$$\langle s \rangle = 4.45 \cdot 10^{-13} \quad \langle D \rangle = 6.09 \cdot 10^{-7} \quad \langle s/D \rangle = 7.52 \cdot 10^{-7}$$

MESSERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse der Messungen mit den Angaben des mittleren Fehlers der für eine Kurve aus den einzelnen Zonen gemittelten $\langle s \rangle$ -, $\langle D \rangle$ - und $\langle s/D \rangle$ -Werte, sowie der Streuung der für jeweils drei Gradientenkurven gegen Anfang, Mitte und Ende eines Versuches gewonnenen Mittelwerte $\langle s \rangle$, $\langle D \rangle$ und $\langle s/D \rangle$ finden sich, zusammen mit den aus SM bzw. MGM ermittelten s_s bzw. D_s und den ergänzenden Angaben des

TABELLE
ZUSAMMENSTELLUNG

| Versuch Nr. | Substanz, Diaphragma | φ° | t_{sec} | U | $\langle s \rangle_{20^\circ} \times 10^{18}$ |
|----------------|------------------------------|-----------------|----------------------|--------|---|
| 1 | Serumalbumin 2a | 82.5 | 2006 2966 4648 | 29,500 | 4.26 ± 0.38 8.88 % 4.30 ± 0.53 12.38 4.45 ± 0.51 11.42 $\langle s \rangle = 4.34 \pm 0.06$ 1.33 % $s_s = 4.16 \pm 0.05$ 1.25 % |
| | Draht 0.08 mm | | | | 2006 2966 4648 $\langle s \rangle = 4.34 \pm 0.04$ 1.03 % |
| | | | | | 2006 4648 $\langle s \rangle = 4.27 \pm 0.05$ 1.17 % |
| 2 | Serumalbumin 2a | 85 | 1318 2998 3959 | 29,500 | 4.04 ± 0.88 21.75 % 4.17 ± 0.14 3.35 4.19 ± 0.43 10.33 $\langle s \rangle = 4.13 \pm 0.05$ 1.14 % $s_s = 4.10 \pm 0.05$ 1.20 % |
| 3 | Serumalbumin 2a | 87.5 | 1650 3090 4531 | 29,500 | 4.04 ± 0.29 7.28 % 4.29 ± 0.24 5.55 % 4.47 ± 0.31 7.00 $\langle s \rangle = 4.26 \pm 0.12$ 2.93 % $s_s = 4.05 \pm 0.08$ 2.0 % |
| | Draht 0.08 mm | | | | 1650 3090 4531 $\langle s \rangle = 4.27 \pm 0.14$ 3.19 % |
| 4 | Serumalbumin 2c | 80 | 2239 3690 | 29,500 | 3.89 ± 0.68 17.45 % 4.56 ± 0.39 8.54 $\langle s \rangle = 4.23 \pm 0.34$ 8.00 % $s_s = 4.26 \pm 0.39$ 9.15 % |
| | Phasenkante | | | | |
| 5 | Serumalbumin 2b | 85 | 1513 3435 5835 | 29,500 | 3.76 ± 1.08 28.63 % 4.63 ± 0.44 9.42 4.98 ± 0.28 5.54 $\langle s \rangle = 4.46 \pm 0.36$ 8.13 % $s_s = 4.42 \pm 0.08$ 1.81 % |
| | Draht 0.08 mm | | | | |
| 6 | α -Chymotrypsinogen 1 | 85 | 1144 2826 4507 | 50,740 | 2.26 ± 0.46 20.38 % 2.57 ± 0.26 10.10 2.96 ± 0.29 9.92 $\langle s \rangle = 2.60 \pm 0.20$ 7.79 % $s_s = 2.48 \pm 0.12$ 4.83 % |
| | Draht 0.08 mm | | | | |
| 7 | γ -Globulin 3 | 85 | 2305 3746 5188 | 16,200 | 6.47 ± 2.81 43.46 % 6.83 ± 1.79 26.19 7.09 ± 1.55 21.89 $\langle s \rangle = 6.79 \pm 0.18$ 2.67 % $s_s = 7.06 \pm 0.18$ 2.56 % |

II

DER MESSERGEBNISSE

| $\langle D \rangle \times 10^7$ | | $\langle s/D \rangle \times 10^7$ | | Auswertungsmethode | |
|--------------------------------------|---------|--|---------|--|-------------------|
| 5.50 ± 0.39 | 7.14 % | 7.74 ± 0.30 | 3.92 % | 2PM | Tangentialkurve |
| 5.92 ± 0.75 | 12.62 | 7.28 ± 0.58 | 7.90 | | |
| 6.09 ± 1.38 | 22.64 | 7.52 ± 1.17 | 15.53 % | X = 0; ± δr ; ± 2 δr ; ± 3 δr ... | |
| $\langle D \rangle = 5.84 \pm 0.18$ | 3.00 % | $\langle (s/D) \rangle = 7.51 \pm 0.13$ | 1.77 % | | |
| $D_s = 5.65 \pm 0.25$ | 4.5 % | | | SM | MGM |
| 5.59 ± 0.66 | 11.79 % | 7.75 ± 1.20 | 15.45 % | 2PM | Mittelpunktskurve |
| 5.45 ± 1.31 | 24.06 | 8.68 ± 3.38 | 38.92 | | |
| 5.00 ± 3.30 | 65.96 | 4.68 ± 9.12 | 195.0 | X = 0; ± δr ; ± 2 δr ; ± 3 δr ... | |
| $\langle D \rangle = 5.35 \pm 0.18$ | 3.33 % | $\langle (s/D) \rangle = 7.04 \pm 1.21$ | 17.16 % | | |
| 6.38 ± 0.67 | 10.48 % | 6.82 ± 1.73 | 25.29 % | 3PM | Tangentialkurve |
| 5.20 ± 1.06 | 20.30 | 8.44 ± 1.67 | 19.75 | | |
| $\langle D \rangle = 5.79 \pm 0.59$ | 10.19 % | $\langle (s/D) \rangle = 7.63 \pm 0.81$ | 10.60 % | X = 0; ± δr ; ± 2 δr ; ± 3 δr ... | |
| 5.65 ± 0.18 | 3.16 % | 7.13 ± 1.40 | 19.64 % | 2PM | Tangentialkurve |
| 5.22 ± 0.96 | 18.41 | 8.18 ± 1.35 | 16.50 | | |
| 5.69 ± 1.66 | 29.24 | 8.36 ± 3.77 | 45.14 | X = 0; ± δr ; ± 2 δr ; ± 3 δr ... | |
| $\langle D \rangle = 5.52 \pm 0.15$ | 2.72 % | $\langle (s/D) \rangle = 7.89 \pm 0.38$ | 4.86 % | | |
| $D_s = 6.01 \pm 0.48$ | 8.0 % | | | SM | MGM |
| 5.47 ± 0.28 | 5.12 % | 7.41 ± 0.34 | 4.50 % | 2PM | Tangentialkurve |
| 5.00 ± 1.02 | 20.38 | 9.01 ± 1.96 | 21.75 | | |
| 5.81 ± 1.57 | 27.04 | 8.13 ± 1.70 | 20.90 | X = 0; ± δr ; ± 2 δr ; ± 3 δr ... | |
| $\langle D \rangle = 5.43 \pm 0.23$ | 4.32 % | $\langle (s/D) \rangle = 8.18 \pm 0.47$ | 5.69 % | | |
| $D_s = 5.40 \pm 0.27$ | 5.0 % | | | SM | MGM |
| 5.00 ± 0.74 | 14.74 % | 8.28 ± 1.33 | 16.06 % | 2PM | Tangentialkurve |
| 7.32 ± 4.17 | 56.89 | 7.09 ± 2.59 | 36.50 | | |
| 7.74 ± 4.60 | 59.44 | 7.39 ± 2.76 | 37.35 | X = ± $\delta r/2$; ± 3 $\delta r/2$; ± 5 $\delta r/2$... | |
| $\langle D \rangle = 6.69 \pm 0.85$ | 12.74 % | $\langle (s/D) \rangle = 7.59 \pm 0.36$ | 4.71 % | | |
| 6.90 ± 0.68 | 9.91 % | 5.68 ± 1.05 | 18.56 % | 2PM | Mittelpunktskurve |
| 7.08 ± 0.21 | 30.12 | 7.03 ± 2.22 | 31.50 | | |
| $\langle D \rangle = 6.99 \pm 0.09$ | 1.27 % | $\langle (s/D) \rangle = 6.35 \pm 0.68$ | 10.62 % | X = 0; ± δr ; ± 2 δr ; ± 3 δr ... | |
| $D_s = 6.40 \pm 0.40$ | 6.25 % | | | SM | MGM |
| 6.19 ± 1.24 | 19.99 % | 6.56 ± 2.96 | 45.09 % | 2PM | Tangentialkurve |
| 6.73 ± 1.51 | 22.41 | 7.13 ± 1.25 | 17.52 | | |
| 5.06 ± 8.99 | 177.6 | 6.72 ± 5.26 | 78.21 | X = 0; ± δr ; ± 2 δr ; ± 3 δr ... | |
| $\langle D \rangle = 5.99 \pm 0.49$ | 8.21 % | $\langle (s/D) \rangle = 6.80 \pm 0.17$ | 2.50 % | | |
| | | | | SM | |
| 10.95 ± 0.71 | 6.50 % | 2.05 ± 0.35 | 16.91 % | 2PM | Tangentialkurve |
| 12.00 ± 5.37 | 44.77 | 3.25 ± 3.22 | 99.15 | | |
| 13.48 ± 16.15 | 119.8 | 1.57 ± 2.11 | 134.5 | X = 0; ± δr ; ± 2 δr ; ± 3 δr ... | |
| $\langle D \rangle = 12.14 \pm 0.73$ | 6.04 % | $\langle (s/D) \rangle = 2.29 \pm 0.50$ | 22.00 % | | |
| | | | | SM | |
| 4.47 ± 0.18 | 3.98 % | 14.28 ± 5.86 | 41.01 % | 2PM | Tangentialkurve |
| 4.55 ± 0.24 | 5.33 | 14.89 ± 3.40 | 22.86 | | |
| 4.62 ± 0.64 | 13.92 | 15.54 ± 3.44 | 22.11 | X = 0; ± δr ; ± 2 δr ; ± 3 δr ... | |
| $\langle D \rangle = 4.55 \pm 0.13$ | 2.92 % | $\langle (s/D) \rangle = 14.90 \pm 0.36$ | 2.41 % | | |
| | | | | SM | |

PHILPOT-Winkels, der Aufnahmezeit t , der gewählten Umdrehungszahl des Rotors U_{UPM} und des Auswertungsverfahrens in Tabelle II zusammengefasst. (Die Ziffern bei den Angaben über die Versuchssubstanzen verweisen dabei auf die Zusammenstellung der Standard-Systeme auf Seite 224/225).

Wie Tabelle II zeigt, resultiert für die verschiedenen angewandten Methoden befriedigende Übereinstimmung, die auch den Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Daten zulässt (Tabelle III)*.

Für mittlere Molekulargewichte ergibt sich insgesamt bei Zugrundelegung optimaler Bedingungen des Experiments und der Auswertung (Draht-Diaphragma, "Tangenten-Kurve"), wenn man die Ergebnisse verschiedener Messungen am gleichen System vergleicht, eine mittlere Abweichung der $\langle s \rangle$, $\langle D \rangle$ und $\langle s/D \rangle$ von $< 2\%$, während als maximaler Fehler (etwa für den Fall Phasenkante, "Mittelpunkts-Kurve") 10 % angenommen werden müssen.

TABELLE III
VERGLEICH DER MESSERGEBNISSE MIT LITERATUR-WERTEN

| Substanz | $s_{20^\circ} \cdot 10^{13}$ | $s_{Lit} \cdot 10^{13}$ | $D_{20^\circ} \cdot 10^7$ | $D_{Lit} \cdot 10^7$ | $M_{zPM} \cdot 10^{-3}$ | $M_{Lit} \cdot 10^{-3}$ |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| α -Chymotrypsinogen | 2.60 | 2.5 | 12.14 | 10.4 | 21.4 | 22 |
| Serumalbumin vom Rind | 4.26 | 4.28 | 5.66 | 6.15 | 68.6 | .68 |
| γ -Globulin vom Rind | 6.94 | 7 | 4.65 | 4.1 | 143 | (155)§ |

§ Berechnet aus s und D .

Es erscheint nicht angebracht, hier eine mehr ins Detail gehende Fehlerbetrachtung anzustellen, da sich bei den Berechnungen eine grosse Zahl systematischer Fehlerquellen mit den Subjektiven der Auswertung der photographischen Aufnahmen in unübersichtlicher Weise überlagert. Es sei nur angedeutet, dass ein Teil der erwähnten subjektiven Fehlerursachen einer falschen Basis bzw. ungenauer r - und Z -Bestimmungen durch Einführen von Fehlergewichten einer präzisen Fehlerberechnung zugänglich ist. Diese folgen daraus, dass maximale Genauigkeit im Bereich kleiner Steigung in der Nähe des Maximums der Gradientenkurve gewährleistet ist, während das Maximum selbst aus Gründen der Optik und die übrigen Kurventeile wegen der kleinen Absolutbeträge von Z resp. wegen der grösseren Steigung der Kurve weniger genau ausgemessen werden können. Ein diesen Sachverhalt quantitativ berücksichtigendes Verfahren zur Fehlerberechnung erweist sich allerdings für eine Routine-Methode als nicht sinnvoll und soll daher hier nicht näher diskutiert werden, zumal es die systematischen Fehler nicht einzubeziehen erlaubt, die aus dem Überschichtungsvorgang, der Feldänderung bei der Beschleunigung bis zum Erreichen der Endgeschwindigkeit und der Problematik der "wahren" Anfangszeit t_0 bzw. des exakten r_0 -Wertes etc. resultieren. Auf sie wird man in erster Linie die Beobachtung zurückführen können, dass sich entgegen der mathematischen Voraussetzung bei mittleren Zeiten die zuverlässigsten s - und D -Werte ergeben, da dann der Kompromiss

* Bei den in Tabelle II und III zusammengefassten Daten wurde Idealität der Lösungen angenommen. Der Einfluss von Konzentration und Kreuzkoeffizienten wurde also vernachlässigt. Im Falle stark konzentrationsabhängiger monodisperser Systeme lässt sich aus einem Versuch mit Hilfe der zPM ein Hinweis auf den Grad der Konzentrationsabhängigkeit gewinnen.—Die Literaturwerte stellen unter vergleichbaren Bedingungen gewonnene Mittelwerte dar $^{10-13}$.

vorliegt zwischen den Überschichtungs- und Beschleunigungseffekten und der Bedingung der Gl. (7), die zusammen mit unvermeidlichen Störungen der Diffusion durch Unregelmässigkeiten in den äusseren Versuchsbedingungen längere Messzeiten, bei denen der Fehler der "wahren" Zeit nicht mehr ins Gewicht fiele, verbieten.

Es soll im folgenden nicht versucht werden, den Einfluss von pH und Ionenstärke bei den oben aufgeführten Messungen zu interpretieren. Die diesbezüglichen orientierenden Versuche sollten nur die Grenzen erkennen lassen, wie weit die theoretische Voraussetzung nicht elektrolytischer bzw. im IP befindlicher Lösungen ernst genommen werden muss. Wie das Ergebnis zeigt, liegen die Abweichungen im Bereich der Messfehler (vgl. Versuch No. 4 mit No. 1, 2 und 3), sodass wenigstens für den Fall der hier verwendeten Ionenstärken (μ , 0.1–0.2) eine Beschränkung auf den isoelektrischen Bereich nicht als notwendig anzusehen ist*.

Fasst man nun die bisher mitgeteilten Methoden zur Bestimmung des Quotienten s/D zusammen, so ergeben sich für die vorliegenden optischen Hilfsmittel drei Möglichkeiten: (a) die Kombination der SVEDBERG-Methode (SM), die s liefert, mit der Maximalgradienten-Methode (MGM), aus der mit guter Genauigkeit D bestimmt werden kann**, (b) die Dreipunkt-Methode (3PM), aus der unmittelbar s/D resultiert und (c) die hier dargestellte Zweipunkt-Methode (2PM). Dabei ist die erste Möglichkeit mit einer gewissen Unsicherheit belastet, da die beiden zugrundeliegenden Methoden auf verschiedenen theoretischen Ableitungen beruhen; sie soll deshalb bei dem Vergleich der Methoden nicht ausführlicher betrachtet werden. Es sei nur hervorgehoben, dass die aus der SM resultierenden s_g sich im wesentlichen im Bereich der Fehlergrenzen mit den « s »-Werten der 2PM decken*** und dass bzgl. der Fehlermöglichkeiten die aus der MGM gewonnenen Diffusionskoeffizienten durch Unsicherheiten in Z empfindlich gestört werden, während im Falle der 2PM Zeitfehler stärker ins Gewicht fallen können.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der 3PM (s. auch GEHATIA UND HÜBNER⁵) mit denen der 2PM, so ergibt sich zunächst für die bisher untersuchten molekular-einheitlichen Systeme, dass der bei der 2PM auftretende mittlere Fehler nur etwa ein Drittel bis ein Viertel des Fehlers der 3PM ausmacht. Diese Erfahrung beruht im wesentlichen darauf, dass für die 3PM eine äusserst genaue Festlegung der Basishöhe erforderlich ist, da bei ihr direkt die Z -Beträge in die Rechnung eingehen, während im Falle der 2PM die Division durch den auf die gleiche Basis bezogenen Maximalgradienten (vgl. Gl. (6)) mögliche Basisfehler stark vermindert. Ebenso werden Fehler in der Neigung der Basis, die zu einem mehr oder weniger deutlichen Gang in den für die betreffende Kurve berechneten s/D -Werten führt, von der 3PM deutlicher registriert als von der 2PM.

In dieser Tatsache liegt zugleich eine gewisse Beeinträchtigung der Anwendbarkeit der 3PM zur Polydispersitätsbestimmung, die in anderer Weise auch für die 2PM gilt. Während nämlich die 3PM — eine sehr gute Optik vorausgesetzt — durch zonenweise Bestimmung von s/D gute Hinweise auf das Vorliegen von Polydispersität ermöglicht, die eben durch die zuvor erwähnte Basis-Empfindlichkeit eingeschränkt

* Eine Erklärung für die gerade bei Entfernung vom IP auftretenden grösseren Schwankungen in s und D kann sicher nicht in den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Teilchen gesucht werden.

** Der Ordinatenabschnitt der h -Funktion², der auch s/D direkt zu bestimmen erlaubt, kann nur als Näherung angesehen werden.

*** Die Abweichungen (< 2 %) sind wohl auf subjektive Fehler bei der 2PM zurückzuführen.

wird, indem bei falscher Neigung auch einheitliche Systeme als polydispers erscheinen können, führt die 2PM auf Grund der Division durch Z_{\max} zu s/D -Werten für die einzelnen Zonen, die nur relative Polydispersitätshinweise gestatten. Überdies führt das Beziehen auf Z_{\max} , das ja einem mittleren s/D äquivalent ist, zu einer Verminderung der Empfindlichkeit bei der Untersuchung der Polydispersität.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die vorliegende Methode in erster Linie zur Molekulargewichtsbestimmung molekulareinheitlicher Systeme mit nicht zu grosser Konzentrationsabhängigkeit von s und D herangezogen werden wird, wobei infolge der verhältnismässig geringen Empfindlichkeit gegenüber den Mängeln der optischen Analysenmethoden alle üblichen optischen Systeme angewandt werden können.

Bezüglich der Polydispersität, die mit den hier diskutierten Methoden selbstverständlich nur qualitativ angezeigt, nicht aber quantitativ bis zur Ermittlung der Verteilungsfunktion bestimmt werden kann, wird man, je nach dem Polydispersitätsgrad und der zugrundeliegenden Optik zweckmässig die 2PM oder die 3PM heranziehen, wie das folgende Schema angibt:

| System | Hilfsmittel | Methode |
|-----------------------|--|---------|
| Monodispers | Übliche optische Methoden | 2PM |
| Paucidispers | Übliche optische Methoden | 3PM |
| Polydispers (schwach) | Übliche optische Methoden | — |
| Polydispers (schwach) | Sehr gute optische Methoden (evtl. Rayleigh-Optik) | 3PM |
| Polydispers (stark) | Übliche optische Methoden | 2PM |
| Polydispers (stark) | Sehr gute optische Methoden (evtl. Rayleigh-Optik) | 3PM |

Über die so zu gewinnenden Hinweise hinaus kann die 2PM in Verbindung mit der Momenten-Methode² auch als Hilfsmittel zur quantitativen Polydispersitätsanalyse angesehen werden. Doch erweist sich dazu eine vervollkommnete Optik als unumgängliche Voraussetzung, da die höheren Momente—wie Versuche in dieser Richtung zeigten—mit den gebräuchlichen optischen Hilfsmitteln bisher kaum mit genügender Genauigkeit bestimmt werden können.

Abschliessend bleibt noch zu erwähnen, dass die vorliegende Methode die zur Bestimmung des Molekulargewichts notwendigen Daten aus sehr kurzen Messzeiten resp. aus wenigen photographischen Aufnahmen—im Grenzfall aus einer einzigen Kurve—zu gewinnen erlaubt. Sie kann daher beispielsweise auch zur Molekulargewichtsbestimmung instabiler Systeme dienen, die sich während längerer Messzeiten in irgendeiner Weise in ihrem Sedimentations—bzw. Diffusionsverhalten verändern und erlaubt es, derartige Veränderungen in ihrem Verlauf quantitativ messend zu verfolgen.

DANK

Wir wollen nicht versäumen, Herrn Prof. Dr. J. STAUFF auch an dieser Stelle sehr herzlich für seine überaus freundliche Förderung zu danken.

Ebenso gilt unser Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die die Arbeit durch Sach- und Personalmittel grosszügig unterstützte.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird—basierend auf der früher dargestellten Theorie der Brownschen Bewegung im Zentrifugalfeld—eine neue Möglichkeit angegeben, mit Hilfe der gebräuchlichen optischen Systeme Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten aus zwei Punkten und dem Maximum der experimentellen Gradientenkurve der Ultrazentrifuge zu gewinnen.

Die experimentellen Voraussetzungen und die Prüfung der Methode an Hand dreier Standard-Substanzen im Molekulargewichtsbereich zwischen 20,000 und 150,000 werden mitgeteilt. Es ergibt sich für die untersuchten Systeme gute Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Werten.

Der mittlere Fehler der Angaben von s und D beträgt für den Fall mittlerer Molekulargewichte unter optimalen Bedingungen des Experiments und der Auswertung 1 bis 3 %, d.h. nur *ca.* ein Drittel des an anderer Stelle für die 2PM mitgeteilten Wertes. Im Bereich kleiner Molekulargewichte liegt er unter 8 %. Die Schwankungen in s/D liegen für mittlere Molekulargewichte unter 5 %, für kleine um 20 %.

Durch Vergleich mit den bisher verwendeten Methoden lassen sich deren Anwendungsbereiche gegenüber der hier dargestellten 2PM abgrenzen. Danach erscheint die vorliegende Methode vorzugsweise für ideale, molekulareinheitliche Systeme geeignet oder aber für stark polydisperse, deren Uneinheitlichkeit sie qualitativ nachzuweisen erlaubt.

LITERATUR

- 1 M. GEHATIA UND E. KATCHALSKI, *J. Chem. Phys.*, 30 (1959) 1334.
- 2 M. GEHATIA, *Kolloid Z.*, 167 (1959) 1.
- 3 M. GEHATIA, *Naturwissenschaften*, 46 (1959) 108.
- 4 M. GEHATIA, *Symp. über Makromoleküle, Wiesbaden*, 1959, Sektion II, C4.
- 5 M. GEHATIA UND L. HÜBNER, *Z. Naturforsch.*, 15b (1960) 351.
- 6 J. STAUFF UND G. RÜMMLER, *Kolloid Z.*, 166 (1959) 152.
- 7 G. KEGELES UND F. J. GUTTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 3773.
- 8 H. K. SCHACHMAN, *Methods in Enzymology*, Vol. IV, Acad. Press Inc. Publ. N.Y. 1957, S. 54.
- 9 H. K. SCHACHMAN, *loc. cit.*, p. 62; vgl. auch H. G. ELIAS, *Makromol. Chem.*, XXIX (1959) 30.
- 10 K. O. PEDERSEN, *Les Protéines* 9. Conseil de Chimie Solvay, 1953, R. Stoops. Bruxelles, 1953, p. 39.
- 11 E. L. SMITH, D. M. BROWN UND M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 639.
- 12 J. M. CREETH, *Biochem. J.*, 51 (1952) 10.
- 13 H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1956, S. 234.