

VERGLEICHENDE DIFFUSIONSMESSUNGEN IN VERSCHIEDENEN SCHWEREFELDERN

W. K. HORNING und G. TRÄXLER

Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland

Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D ist eines der wichtigsten Mittel zur Kennzeichnung von makromolekularen Stoffen. Nicht nur über die Molekülgröße sagt die Diffusionsmessung etwas aus, sondern auch über die molekulare Verteilung. Bei molekulareinheitlichen Substanzen kann in vielen Fällen der Diffusionskoeffizient als Reinheitskriterium dienen, und die Größe der Verunreinigung durch nieder-molekulare Anteile wie Salze oder freies Monomeres etc. läßt sich daraus mit guter Genauigkeit bestimmen.

Diffusionsmessungen sind allerdings nicht einfach durchzuführen. Die meisten Messungen werden auch heute noch mit selbstgebauten Geräten vorgenommen, jedoch sind den in letzten Jahren einige industriell hergestellte Geräte in den Handel gekommen, die sich vor allem durch die bequeme und sichere Bedienungsmöglichkeit auszeichnen. Das Prinzip all dieser Geräte ist dasselbe : In einer sog. „Zelle“ wird die zu untersuchende Lösung mit reinem Lösungsmittel überschichtet und die Wanderung der Grenzschicht mittels eines geeigneten optischen Verfahrens beobachtet oder registriert. An Meßzellen steht eine ganze Anzahl verschiedener Konstruktionen zur Verfügung. Zu erwähnen sind die Scherzellen nach Tiselius, verschiedene Varianten der Schieberzellen und nicht zuletzt die Kapillarzellen [7, 14, 15, 18]. Alle diese verschiedenen Konstruktionen erzeugen eine scharfe Grenze zwischen Lösung und Lösungsmittel, wie es die Fick'schen Gesetze erfordern. Ihre Anwendung ist allerdings durch das erforderliche Volumen an Lösung begrenzt, das je nach Type zwischen 2 und 20 ml beträgt.

Der Verlauf der Diffusion wird meist mit einer der Abwandlungen der Töpler'schen Schlierenmethode [16] verfolgt, wie sie z.B. Svensson und Philpot [9, 12] beschrieben haben. Labhart und Straub [6], Philpot und Cook [10] sowie Lotmar [8] haben auch interferometrische Verfahren angegeben, die zum großen Teil auf den Arbeiten von Rayleigh, Thovert und Guy fussend, außerordentlich gute Ergebnisse liefern und die eine Zeitlang die Meßmethodik beherrschten. Auch Wiedemann [19] hat entsprechende Systeme angegeben. Seit Wolter [21] und [1, 20] die Entwicklung sog. Phasenplatten eingeleitet hat, ist jedoch das Schlierenverfahren nach Philpot

und Svensson wieder in den Vordergrund getreten. Damit lassen sich an jeder Stelle des Gradienten sehr genaue Konzentrationsmessungen durchführen.

Will man besonders genau messen, dann muß allerdings ein ziemlicher Aufwand getrieben werden. Der Aufstellungsort muß äußerst sorgfältig ausgewählt werden, wenn möglich so, daß die Verankerung der Apparatur im gewachsenen Felsen vorgenommen wird, oder zumindest auf einer entsprechend großen Maße aus massivem Stein oder Beton, damit keine Schwingungen die Apparatur erreichen können, die Grenzschicht stören und damit das Meßergebnis verfälschen. Manche Gebäude sind infolge ihrer Verkehrslage nicht dazu geeignet, eine Diffusion durchzuführen. Weiterhin ist es nicht einfach, die für genaue Messungen erforderliche Temperaturkonstanz zu erreichen. Gostings u. Mitarbeiter bestimmten die höchst zulässige Abweichung mit $\pm 0,05^\circ\text{C}$ [4]!

Es ist müßig, darauf hinzuweisen, daß ein solches Gerät nicht einfach gebaut sein kann und daß die Anschaffung und Aufstellung erhebliche Mittel erfordern, die nur dann gerechtfertigt sind, wenn äußerst genaue Messungen gebraucht werden.

Eine große Anzahl Laboratorien verfügen jedoch heute über eine analytische Ultrazentrifuge. Kurzzeitige aperiodische Schwingungen wie sie sich in einem Gebäude niemals ganz dämpfen lassen, ergeben Kräfte, die in Vergleich zu dem von einem laufenden U-Z Rotor erzeugten Schwerfeld und seiner Stabilität als Kreisel sehr klein sind. Vorgänge, die in einem solchen Rotor ablaufen, können deshalb als von außen ungestört angenommen werden.

Es lag also nahe, experimentell zu prüfen, ob in einer laufenden Ultrazentrifuge Diffusionsmessungen ausgeführt werden können, und welchen Einfluß das Schwerfeld auf die Diffusion hat und damit auf die Ermittlung des Diffusionskoeffizienten oder der Diffusionskonstanten. Wir verwendeten eine Beckman/Spinco Ultrazentrifuge Modell E mit Philpot-Svensson-Optik und Phasenplatte [17]. Neben der sehr guten optischen Ausrüstung zeichnet diese Maschine vor allem die äußerst genaue Drehzahlsteuerung und die hervorragende Regelung der Rotortemperatur aus. Die von Gostings geforderte Temperaturkonstanz kann ohne weiteres erreicht werden.

Unsere Untersuchungen beschränkten sich auf Polyäthylenglykole und Polyvinylpyrrolidone verschiedenen Molekulargewichts, hauptsächlich wegen der besseren Kontrollierbarkeit der Versuche. Alle Substanzen waren polymolekular mit verschiedenen molekularen Verteilungsbreiten. Wir haben absichtlich solche Stoffe gewählt, um den Einfluß der Polymolekularität auf die Versuche ebenfalls zu erfassen. Als Lösungsmittel diente Wasser, die Meßtemperatur betrug bei allen Versuchen $25,0^\circ\text{C}$.

Die Messungen wurden sowohl in Übersichtungszellen nach Kegeles,

Klainer und Schachmann [3, 5] als auch in normalen Sektorzellen (4°) durchgeführt. Die der Aufnahmen erfolgte bei einer 20–25fachen Vergrößerung und in der Sedimentationsrichtung.

Zur Berechnung der apparenten Diffusionskoeffizienten wurde die Fläche unter der Philpot-Svensson-Kurve F und die maximale Höhe H_{\max} nach der Gleichung

$$D_{\text{app}} = \frac{1}{4\pi t_{\text{corr}}} \cdot \left(\frac{F}{H_{\max}} \right)^2 \cdot (1 - s\omega^2 t)$$

benutzt. Da sich bei den meisten Versuchen zeigte, daß der Korrekturfaktor $(1 - s\omega^2 t)$ sehr klein ist, und wie sich zeigte, nicht den experimentellen Ergebnissen entspricht, wurde er vernachlässigt, d.h. gleich 1 gesetzt*.

Die theoretische Diffusionszeit t_{corr} wird meist aus der wahren Versuchszeit durch Extrapolation t gegen $1/H_{\max}^2$, d.h. gegen die unendliche Höhe ermittelt. In der Ultrazentrifuge ist diese Bestimmung schwierig. Sie setzt voraus, dass der Philpot-Winkel während des ganzen Versuchs konstant gehalten wird, da rechnerische Korrekturen einzelner Höhen bei verschiedenen Winkeln sicher durch die mechanische Genauigkeit der Winkeleinstellung beeinträchtigt werden. Allerdings wird die Abnahme der Höhe durch den Verdünnungseffekt in sektorförmigen Zellen bei konstantem Winkel ebenfalls beeinflusst, da ja dabei gleichzeitig sich die Fläche verkleinert.

Deshalb ermittelten wir t_{corr} durch Extrapolation von $(F/H_{\max})^2$ gegen $t(F/H_{\max})^2$ ist unabhängig vom Philpot-Winkel und wird in seinem zeitlichen Ablauf nicht vom Verdünnungseffekt beeinflusst. Von manchen Autoren wurde schon vorgeschlagen, D_{app} gegen $1/t$ (unendliche Versuchszeit) zu extrapolieren, wenn sich eine Abhängigkeit von D_{app} von der Versuchszeit t zeigt. Dieser Wert soll dann als Diffusionskoeffizient D_c bei der Konzentration c bezeichnet werden. Zweck dieses Verfahrens sollte es sein, die Anfangsstörungen aus der Berechnung zu entfernen, die sich durch den Übersichtungsvorgang einstellen. Nach unseren Erfahrungen erscheint diese Methode nicht zweckmäßig, da besonders bei stark konzentrationsabhängigen Systemen mit fortschreitender Versuchszeit ein Ansteigen von D_{app} beobachtet wird. Extrapolationen solcher Werte gegen $1/t$ sind dann sehr ungenau und ergeben sogar oft für D_c den Wert unendlich.

Wir ermittelten aus diesem Grund D_c durch Extrapolation von D_{app} auf die Zeit $t_{\text{corr}} = 0$. Dadurch wird der Verdünnungseffekt ausgeschlossen, der ja durch die Verbreiterung der Diffusionszone große Teile des Gradienten

* Wir haben bewußt in dieser Arbeit verzichtet, die glänzende Methode zur Auswertung zu verwenden, die Fujita [2] kürzlich veröffentlicht hat, da sie für den Routinebetrieb zuviel Rechenarbeit bringt und daher wesentlich langsamer ist und mehr Fehlermöglichkeiten birgt.

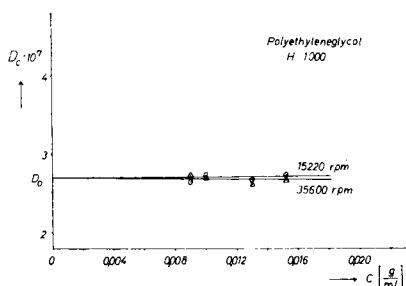


Abb. 1.

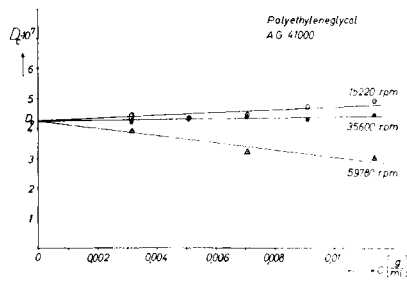


Abb. 2.

Abb. 1.—Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D_c von der Konzentration c bei verschiedenen Drehzahlen; Polyäthylenglykol $\bar{M}_n = 1045$ in H_2O ; $T = 25,0^\circ C$.

Abb. 2.—Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D_c von der Konzentration c bei verschiedenen Drehzahlen; Polyäthylenglykol $\bar{M}_n = 41.000$ in H_2O ; $T = 25,0^\circ C$.

in ihrem Verhalten bei der Diffusion beeinflusst. Mögliche Störungen bei Beginn des Versuchs lassen sich bei unserer Methode leicht erkennen aus den Abweichungen der D_{app} -Werte von der Kurve. Solche Werte berücksichtigen wir bei der Auswertung nicht. Die so erhaltenen Diffusionskoeffizienten D_c bei der Konzentration c wurden gegen unendliche Verdünnung extrapoliert. So ergibt sich die Diffusionskonstante D_0 .

Beim Vergleich von Ergebnissen aus Diffusionsmessungen, die mit Spezialapparaturen erzielt wurden und solchen, die aus Messungen in der analytischen Ultrazentrifuge bei Schwerfeldern von einigen hundert g stammen, zeigt sich, daß das Schwerfeld auf die Resultate keinen Einfluß hat. Die Werte der Diffusionskoeffizienten werden mit 2% Reproduzierbarkeit erhalten und stimmen auch in diesen Grenzen mit denen der freien Diffusion überein.

Solche Schwerfelder herrschen in der analytischen Ultrazentrifuge bis ca 4000 UpM . Bis zu dieser Drehzahl treten auch keine „Anfangsstörungen“ auf. Man erhält bei Aufzeichnung von D_{app} gegen t_{corr} eine Gerade.

Daraus kann man schliessen, daß die in der Literatur beschriebenen gleichartigen Effekte nicht allein auf eine gestörte Grenzschicht zurückzuführen sind, sondern auch auf das Schwerfeld im Zusammenhang mit der Überschichtungsstörung.

Betrachtet man nun den Verlauf von Diffusionsmessungen in sehr großen Schwerfeldern bei verschiedenen Molekülgrößen und polydispersen Systemen, so zeigt sich, daß bei sehr niedermolekularen Substanzen mit Molekulargewichten von einigen Tausend bei Erhöhung des Schwerfelds kaum meßbare Abweichungen von der freien Diffusion erhalten werden. Die Bestimmung von t_{corr} bereitet keine Schwierigkeiten und D_{app} ist unabhängig von der Versuchszeit. Trägt man D_c gegen c auf (Abb. 2), so zeigt sich, daß mit steigenden Schwerfeldern D_c niedriger gefunden wird und damit die

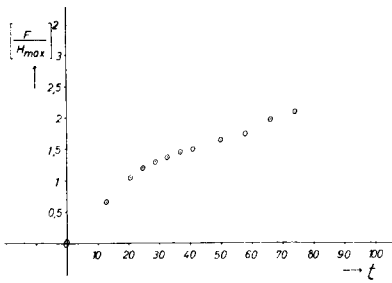


Abb. 3.

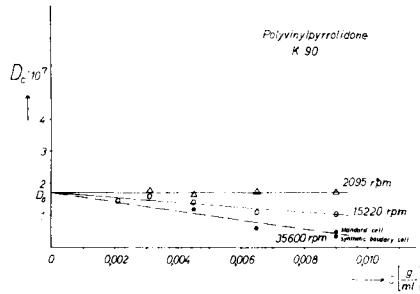


Abb. 4.

Abb. 3.—Abhängigkeit von (F/H_{\max}) von der Versuchszeit t zur Ermittlung von t_{corr} ; Polyvinylpyrrolidon K 90 0,003 g/ml in H_2O ; $T = 25,0^\circ C$.

Abb. 4.—Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D_c von der Konzentration c bei verschiedenen Drehzahlen; Polyvinylpyrrolidon K 90 in H_2O ; $T = 25,0^\circ C$.

Neigung der Geraden sich ändert. Der Effekt ist jedoch so klein, daß er beinahe in den Fehlergrenzen der Methode verschwindet. Als Substanz wurde Polyäthylenglykol H 1000 mit einem Molekulargewicht von 1045 verwendet. [11] (Abb. 1). Wesentlich ausgeprägter werden die Abweichungen von D_c bei höherem Molekulargewicht. Wir verwendeten für diese Versuche ein Polyäthylenglykol mit einem Molekulargewicht von 41000. D_c wird bei konstanter Konzentration auch hier mit größer werdendem Schwerefeld kleiner (Abb. 2). Diese Beobachtung machten wir bei allen ähnlichen Versuchen. Bei diesem System treten jedoch weitere Effekte auf, die charakteristisch sind für Diffusionsmessungen an hochmolekularen Substanzen in grossen Schwerefeldern:

1. Die Differenz von t_{corr} minus wirklicher Versuchszeit wird bei konstanter Konzentration mit steigendem Schwerefeld in der gleichen Meßzelle größer. Bei Drehzahlen über 10 000 UpM hängt dieser Effekt auch von der Konzentration ab. Mit steigender Konzentration wird die Differenz der theoretischen Versuchszeit von der experimentellen größer (Tab. I).

2. Bei konstantem Schwerefeld und konstanter Konzentration steigt D_{app} mit größer werdender Versuchszeit an. Der Anstieg wird bei niederen Konzentrationen stärker gefunden als bei höheren.

3. Die Abhängigkeit des Wertes $(F/H)^2$ von der Versuchszeit t weicht von der üblichen Geraden ab. Die Abweichung führt je nach Konzentration und Schwerefeld zu zu großen als auch zu zu kleinen $(F/H)^2$ Werten.

4. Bei der Auftragung der Versuchsdaten gegen die Versuchszeit zeigen sich die bereits in der Literatur bekannten Anfangsstörungen.

Eine qualitative Erklärung dieser Effekte ist durchaus möglich, jedoch dürfte eine quantitative Erfassung recht schwierig sein.

Die von uns untersuchten Systeme waren polymolekular. Aufgrund dieser

TABELLE I. Differenz zwischen der wirklichen und der theoretischen Versuchszeit bei Polyäthylenglykol 41 000 in Minuten bei verschiedenen Drehzahlen und Konzentrationen.

Polyethyleneglycol AG 41000		
c [g/ml]	$t_{\text{corr}} - t$ for boundary start $t = 0$	
	15220	35600
0,003142	2,50	2,20
0,005102	2,50	2,50
0,007640	3,25	6,25
0,009100	4,00	6,00
0,011344	4,00	7,50

Tatsache verändert sich der Verlauf der Gradientenkurve nicht nur durch die Diffusion, sondern auch durch die Sedimentation der einzelnen Molekülgrößen. Dies kann einmal eine zusätzliche Verbreiterung der Diffusionszone bedingen, d.h. eine Abnahme der Höhe bei konstanter Fläche, zum anderen durch „boundary sharpening“ Effekte einer Verbreiterung der Diffusionszone entgegenwirken. Da die Sedimentationskoeffizienten unserer Substanzen stark von der Konzentration abhängen, konnten beide Effekte innerhalb einer Messreihe je nach gewählter Konzentration und Schwerfeld beobachtet werden.

Um diese Ergebnisse weiter zu festigen, führten wir Messungen an einem Polyvinylpyrrolidon K 90, Molekulargewicht ca. 400.000 durch. Diese Substanz besitzt eine sehr große molekulare Verteilungsbreite. Dabei zeigte sich, daß bei der Vermessung unter einem Schwerfeld von ca 300 g bei der Auswertung keine außergewöhnlichen Schwierigkeiten zu beobachten waren. Bei Drehzahlen von 15.000 bzw. 35.000 war es jedoch nicht mehr möglich, t_{corr} aus dem zeitlichen Ablauf von $(F/H)^2$ oder $(1/H^2)$ zu ermitteln. Diese Kurven waren so stark gekrümmt, daß sie eine sichere Extrapolation der Werte von $(F/H)^2$ gegen 0 nicht mehr ermöglichten (Abb. 3). Derartige Extrapolationen ergaben Größenordnungen der theoretischen Versuchszeit, die wenig sinnvoll erschienen. Deshalb setzten wir für t_{corr} einen aus den Erfahrungen mit unserer Meßzelle gewonnenen empirischen Wert ein. Dieser ergab sich zu: Versuchszeit + 2 Minuten = t_{corr} . Das Resultat zeigt die Abb. 4. Wie man sieht, ergibt sich wieder ein mit steigendem Schwerfeld kleiner werdendes D_c . Bei 35.000 UpM lassen sich niedere Konzentrationen nicht mehr vermessen, da der Fehler, hervorgerufen durch die abschätzende Bestimmung von t_{corr} , zu sehr ins Gewicht fällt. Unter diesen Schwerfeldern zeigt sich auch, daß D_c , nach unseren, Verfahren ermittelt, in einem größeren Konzentrationsbereich nicht mehr linear von c abhängt. Deshalb sind derartige Untersuchungen etwas problematisch.

Bemerkenswert ist, daß bei allen unseren Messungen unter verschiedenen Schwerefeldern die Extrapolation von D_c -Werten im konstanten Schwerefeld gegen die Konzentration c dasselbe mit der freien Diffusion identische D_0 ergibt.

Man kann derartige Diffusionsmessungen auch in normalen Sektorzellen am freisedimentierenden Gradienten durchführen. Die Ermittlung der Versuchszeit geschieht dabei analog den Überschichtungszellen. Die erhaltene t_{corr} -Zeit ist in diesen Fällen immer kleiner als die experimentelle Versuchszeit. Die Diffusionskoeffizienten D_c wurden von uns identisch mit denen der Überschichtungszelle unter konstantem Schwerefeld gefunden.

Bei den wesentlich molekular einheitlichen Proteinen, die in ihrem Sedimentationsverhalten nur wenig konzentrationsabhängig sind, werden die oben beschriebenen Störungen verschwindend gering und sind meist unmeßbar.

Es ist nicht möglich, im Rahmen eines solchen Referates mehr experimentelles Material vorzulegen und zu diskutieren. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es möglich ist, die Ultrazentrifuge zur Messung des Diffusionskoeffizienten heranzuziehen, wenn man die Meßbedingungen so wählt, daß sie einer sauberen Auswertung genügen. Wie aus unseren Versuchen hervorgeht, kann der Diffusionskoeffizient niedermolekularer Substanzen direkt aus den Diagrammen der Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung unter sehr großen Schwerefeldern ermittelt werden. Hochmolekulare Substanzen können meist im Drehzahlbereich bis 10 000 UpM vermessen werden, ohne daß die Wirkung des herrschenden Schwerefeldes durch zusätzliche Korrekturen berücksichtigt werden muss. Aber auch bei höheren Drehzahlen ist es möglich, Diffusionskonstanten solcher Substanzen zu erhalten. Dabei ist jedoch einige Erfahrung nötig, um störende Effekte, wie „boundary sharpening“, zu erkennen und durch geeignete Wahl der Konzentration und kritische Betrachtung der Meßpunkte Fehler auszuschliessen.

Da in der Ultrazentrifuge Diffusionsmessungen mit sehr kleinen Mengen ausgeführt werden können, ist dieses Verfahren insbesondere für Biochemiker bedeutungsvoll. Deshalb wollten wir unsere Ergebnisse von Diffusionsmessungen im Schwerefeld mit diesem Referat einem größeren Kreis zugänglich machen, noch ehe wir unsere Arbeiten auf diesem Gebiet ganz abgeschlossen haben.

Wir danken Frau G. Köhler für die sorgfältige Durchführung der Versuche.

LITERATUR

1. ARMBRUSTER, O., KOSSEL, W. und STROHMAIER, K., *Z. Naturforsch.* 6a, 510 (1951).
2. FUJITA, H., *J. Phys. Chem.* 63, 1092 (1959).
3. GINSBURG, A., APPEL, P. und SCHACHMAN, H. K., *Arch. Biochem. Biophys.* 65, 545 (1956).

4. GOSTING, L. J. und MORRIS, M. S., *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 1998 (1949).
5. KLAINER, S. M. und KEGELES, G., *J. Phys. Chem.* **59**, 952 (1955).
6. LABHART, H. und STAUB, H., *Helv. Chim. Acta* **30**, 1954 (1947).
7. LONGSWORTH, L. G., *Chem. Rev.* **30**, 323 (1942).
8. LOTMAR, W., *Helv. Chim. Acta* **32**, 1847 (1949).
9. PHILPOT, J. ST. L., *Nature* **141**, 283 (1938).
10. PHILPOT, J. ST. L. und COOK, G. H., *Research* **1**, Suppl. 5, 234 (1948).
11. RITSCHER, TH. A. und ELIAS, H. G., *Makromol. Chem.* **30**, 48 (1955).
12. SVENSSON, H., *Kolloid Z.* **87**, 181 (1939).
13. — *ibid.* **90**, 141 (1940).
14. — *Arkiv Kemi* **22**, A, No. 10, 1 (1946).
15. TISELIUS, A., *Koll. Z.* **85**, 129 (1938).
16. TOEPLER, A., *Ann. Physik u. Chem.* **131** (V, 11) 33, 180 (1867).
17. TRAUTMANN, H. und BURNS, V. W., *Biochim. et Biophys. Acta* **14**, 26 (1954).
18. WIEDEMANN, E., *Helv. Chim. Acta* **31**, 2037 (1948).
19. — *Helv. Chim. Acta* **35**, 82 (1952).
20. — *ibid.* **40**, 2074 (1957).
21. WOLTER, H., *Ann. Physik* **7**, 341 (1950).