Bestimmung von Diffusionskonstanten

Einführung

Der Effekt der Diffusionsverbreiterung kann genutzt werden, um Diffusionskonstanten mit der Analytischen Ultrazentrifuge zu bestimmen. Dieser Abschnitt unterscheidet dabei zwei Kategorien:

- *Etablierte Verfahren* nutzen ein eigens zu diesem Zweck entwickeltes Experiment, das besondere Zellen erfordert. Diesen Verfahren sind in der Praxis gewisse Grenzen gesetzt. So versagen sie i. d. R. bei polydispersen Systemen, d. h. sie scheitern an der Überlagerung von Polydispersität und Diffusion, die *beide* zu einer Verbreiterung der Grenzfläche führen.
- *Neue Verfahren* nutzen ein normales Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment und erfordern keine besondere Ausstattung. Sie sind allerdings noch wenig in der Praxis erprobt. Erste Ergebnisse sind in einer Publikation und in meiner Promotionsschrift nachzulesen, auf die Sie über die Publikationsseite Zugriff haben.

Der folgende Abschnitt beschreibt zunächst das klassische *synthetic-boundary-Experiment*, dessen Auswertungsverfahren z. T. auch bei der neuen Methode genutzt werden.

Durchführung des synthetic-boundary-Experiments

Bei niedriger Drehzahl wird das Lösemittel in einer besonderen Meßzelle mit Lösung überschichtet. Mit fortschreitender Zeit wird sich die Grenzfläche verbreitern. Diese Verbreiterung wird optisch registriert und in den Fickschen Diffusionskoeffizienten umgerechnet. Die dafür verwendeten Verfahren werden weiter unten beschrieben.

Bei diesem Experiment ist die Sedimentation unerwünscht; man erhält also keine Informationen über die Sedimentationsgeschwindigkeit oder die Molmasse. Der Diffusionskoeffizient kann jedoch verwendet werden, um aus einem *unabhängigen* Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment die Molmasse des Teilchens zu berechnen.

Diffusion an einer bewegten Grenzfläche

Bei einem *synthetic-boundary*-Experiment wird versucht, die Bewegung der Partikel auf Diffusion zu beschränken. Zwar dreht sich der Rotor, die Fliehkraft wird jedoch möglichst klein gehalten, damit die Partikel so langsam wie möglich sedimentieren. Die AUZ wird eigentlich nur hinsichtlich ihrer optischen Systeme genutzt.

Im Prinzip läßt sich die Verbreiterung der Grenzfläche jedoch auch an *sedimentierenden* Partikeln beobachten. So kann ein normales Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment anhand einer zusätzlichen Auswertung auch hinsichtlich der Diffusionsverbreiterung interpretiert werden. Diese Vorgehensweise hat mehrere Vorteile:

- Es ist keine besondere Ausstattung (Zellen) erforderlich.
- Auch schwere Partikel, die in einem *synthetic-boundary*-Experiment (unerwünschterweise) sedimentieren würden, können untersucht werden.
- Im gleichen Experiment wird eine s-Verteilung erhalten.
- Aus der Kombination der Ergebnisse bezüglich der *Sedimentation* und der *Diffusion* aus einem einzigen Experiment sind im Prinzip weitere Ergebnisse zugänglich. Dabei ist eine Vergleichbarkeit in besonderer Weise gegeben, da alle experimentellen Parameter identisch sind.

Zur Berechnung der Diffusionskonstanten aus UZ-Geschwindigkeitsläufen existieren mehrere Möglichkeiten. Alle Verfahren werten die Diffusionsverbreiterung der Sedimentationsfront aus. Die gemeinsame Annahme besteht darin, daß die Partikel in der Sedimentationsfront gauß-verteilt sind. Die Sedimentationsfront selbst läßt sich demzufolge mit der Gaussschen Fehlerfunktion beschreiben.

Zur Auswertung bestehen prinzipiell folgende Möglichkeiten:

1. *klassisch:* Auswerten der Rohdaten (Gauß)
2. *klassisch:* Auswerten der differentiellen s-Verteilung (Gauß)
3. *klassisch:* Auswertung der $G(s)$ nach Van Holde und Weischet

4. *Neuer Ansatz:* Isolierung der Diffusionsverbreiterung von der Polydispersität, dann Auswertung als „*synthetic-boundary*-Experiment“
   (a) nach CHERVENKA
   (b) aus der Steilheit der Sedimentationsfront

Bei den ersten drei Verfahren wird der Einfluß der Polydispersität auf die Verbreiterung der Sedimentationsfront nicht von der Diffusion abgekoppelt, daher werden Diffusionskoeffizienten nach diesen Methoden meist zu groß gefunden. Ein neuer Ansatz trennt die Diffusion von der Polydispersität und wird im vierten Verfahren realisiert.

Auswerten der Rohdaten (Gauß)

Aus der zeitlichen Verbreiterung der Sedimentationsfront läßt sich die Diffusionsverbreiterung direkt ablesen. Eine Auftragung der quadrierten Standardabweichung der GAUSS-Verteilung gegen die Laufzeit ergibt in der Steigung den Diffusionskoeffizienten. Diese Auswertung entspricht der im folgenden Abschnitt beschriebenen, nur daß diese im Ortsraum und jene im s-Raum durchgeführt wird.

Auswerten der differentiellen s-Verteilung (Gauß)

Eine monomodale Sedimentationskoeffizientenverteilung läßt sich mit einer GAUSS-Funktion gut beschreiben. Ermittelt wird die Standardabweichung σ in Abhängigkeit von der Laufzeit t. Die Rohdaten zeigen die scheinbare Abnahme der Diffusionsverbreiterung. Zur Auswertung wird die Standardabweichung aus dem s-Raum σ_s wieder in den r-Raum ($\rightarrow \sigma_s$) zurückgerechnet,

$$\sigma_r(s,\,\sigma_s) = r_m \left[\exp\left((s+\sigma_s)\cdot\int\omega^2 dt\right) - \exp\left(s\cdot\int\omega^2 dt\right),\right] \tag{1}$$

was in der Auftragung der quadrierten Standardabweichung über t das tatsächliche Fortschreiten der Diffusion mit der Zeit zeigt.

Das 2. FICKsche Gesetz

$$\left(\frac{\partial c_i}{\partial t}\right)_x = D\left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2}\right) \tag{2}$$

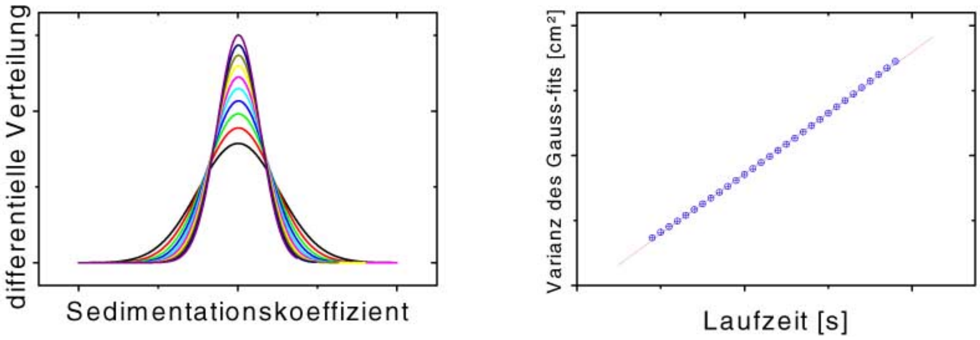

Abbildung 1: Diffusionsverbreiterung in der ausgewerteten s-Verteilung (links). Mit längerer Laufzeit wird die Verteilung schmaler, weil die Sedimentation die Diffusion überwiegt. Rechts: In den r-Raum transformierte Varianzen der GAUSS-Anpassungen an die s-Verteilungen als Funktion der Laufzeit t.

besagt, daß die zeitliche Veränderung der Konzentration c_i vom Diffusionskoeffizienten D und dem Konzentrationsgradienten bestimmt wird. Aus der Lösung dieser Differentialgleichung läßt sich der mittlere Betrag des Weges $\bar{x}$ berechnen, den ein Teilchen mit dem Diffusionskoeffizienten D nach t Sekunden zurückgelegt hat:

$$\bar{x} = \sqrt{\langle x^2 \rangle} = \sqrt{\int_0^\infty \frac{c_2}{c_{02}}\ x^2\ \mathrm{d}x} = \sqrt{2Dt} \tag{3}$$

Identifiziert man die Varianz der GAUSS-Verteilung mit dem quadratisch gemittelten Erwartungwert für den Abstand der Partikel vom Mittelpunkt der Sedimentationsfront aus Gl. (3), so ergibt sich der Diffusionskoeffizient als die Hälfte der Steigung einer Auftragung von σ^2 über die Zeit (Abb. 1).

$$\sigma^2 = \overline{x^2} = 2\,D\,t \tag{4}$$

Auch bei absoluter Monodispersität (Abb. 1 zeigt simulierte Daten) handelt es sich eigentlich um eine Parabel, die in der linearen Regression in diesem Fall einen um 17% zu hohen Diffusionskoeffizienten ergibt. Die Ableitung der Auftragung ist jedoch linear und liefert als Achsenabschnitt einen Diffusionskoeffizienten von 1,003 $\cdot\ 10^{-7}$ cm^2/s (vorgegeben: 1 $\cdot\ 10^{-7}$ cm^2/s).

Auswertung nach VAN HOLDE/WEISCHET

Die vorigen Auswertungsmethoden versagen bei polydispersen Systemen, weil die Polydispersität der Verbreiterung infolge Diffusion zugeschlagen wird.

Die Auswertung nach VAN HOLDE und WEISCHET liefert einen mittleren Diffusionskoeffizienten für eine monomodale Verteilung, die vom Ansatz her durchaus *polydispers* sein darf. Zur Auswertung wird die auf Werte zwischen 0 und 1 normierte Verteilung $G(s)$ in horizontale Scheiben unterteilt, die getrennt ausgewertet werden. Der y-Wert des Schnittes wird mit w bezeichnet; es handelt sich um eine relative Konzentration, da $G(s)$ der Konzentration proportional ist. Zu jedem Schnitt w werden die zugehörigen s-Werte al-

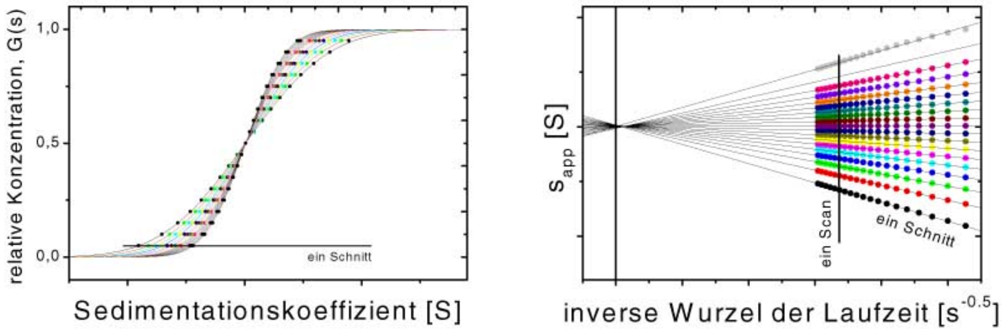

Abbildung 2: Analyse der s-Verteilungen nach VAN HOLDE/WEISCHET

ler aufgenommenen Messungen ermittelt und über die reziproke Wurzel der Meßdauer aufgetragen. Auf diese Weise wird mit allen w verfahren. Abb. 2 zeigt die $G(s)$ und die daraus erhaltene VAN HOLDE/WEISCHET-Auftragung für simulierte Daten.

Für unendliche Laufzeit verschwindet die Diffusion gegenüber der Sedimentation, und die apparenten Sedimentationskoeffizienten s^* fallen in einem Punkt zusammen, da es sich hier um ein monodisperses System handelt. Die Diffusionsverbreiterung ist von der relativen Konzentration w abhängig. Aus der Regression der s^* über die reziproke Wurzel der Laufzeit der ausgewerteten Scans ist der Diffusionskoeffizient nach der folgenden Gleichung zugänglich:

$$s_w^* = s - \frac{2\sqrt{D}}{r_m\omega^2} \cdot \Phi^{-1}(1-2w) \cdot \frac{1}{\sqrt{t}} \tag{5}$$

Dabei ist Φ^{-1} die inverse GAUSSsche Fehlerfunktion, die die Form der Sedimentationsfront beschreibt. Das modifizierte Argument sorgt dafür, daß sie auf Argumente zwischen 0 und 1 normiert ist. r_m ist der Meniskus, ω die Winkelgeschwindigkeit des Rotors und w die relative Konzentration des jeweiligen Schnittes. Gl. (5) wird aus einer auf FUJITA zurückgehenden Beschreibung der Sedimentationsfront erhalten.

Trägt man die Steigungen für alle w über die Konzentration auf, so kann man die inverse Fehlerfunktion anpassen und erhält als Streckungsparameter den Faktor $2\sqrt{D}/r_m\omega^2$, aus dem der Diffusionskoeffizient berechnet werden kann:

$$Steigung = \frac{2\sqrt{D}}{r_m\omega^2} \cdot \Phi^{-1}(1-2w) \tag{6}$$

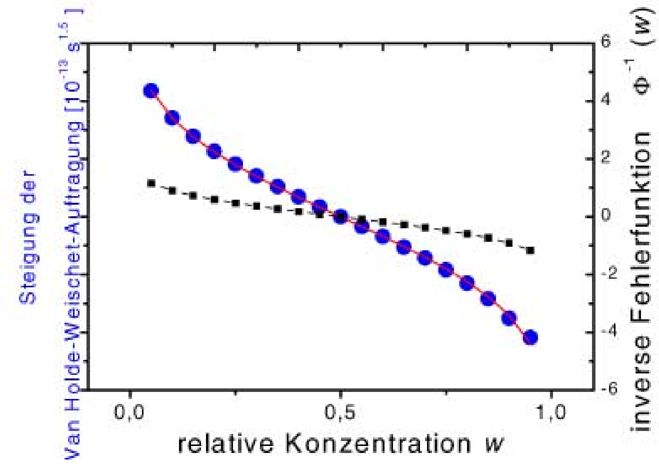

Abbildung 3: Fit die Steigungen der VAN HOLDE-WEISCHET-Auftragung.

Abb. 3 zeigt die Steigungen der 19 Schnitte mit dem Fit der inversen Fehlerfunktion (linke Achse). Auf der rechten Achse ist die inverse Fehlerfunktion selbst dargestellt.

Als zusätzlichen Fit-Parameter benötigt man eine Verschiebung der Kurve in y-Richtung. Dieser Fall tritt dann auf, wenn die typische Fächerstruktur der VAN HOLDE-WEISCHET-Auftragung nicht symmetrisch zum korrigierten s-Wert ist.

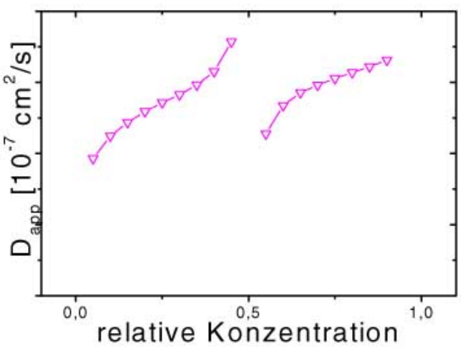

Abbildung 4: Ergebnis der klassischen VAN HOLDE-WEISCHET- Auswertung

Obwohl dieser Fit naheliegend ist, wird er in der Literatur nicht diskutiert. Für monodisperse Daten liefert er jedoch recht genaue Ergebnisse. Für diese simulierten Daten wird ein Fehler von 4% erhalten.

In der klassischen Auswertung wird aus der Steigung jedes Schnittes nach Gl. (6) ein Diffusionskoeffizient berechnet. Damit wird zwar theoretisch eine D-Verteilung über die w bestimmt, in der Praxis sind die mittleren Werte jedoch durch die Singularität bei $w = 0$ derartig verfälscht, daß nur das Weglassen der mittleren Werte und die Mittelung über die restlichen ein sinnvolles Ergebnis liefert. Dies zeigt die Abb. 4. In diesem Fall erhält man einen Fehler von nur 2%. Der Mittelwert hängt jedoch stark von der Auswahl der Datenpunkte ab. Im zuvor beschriebenen Verfahren werden stets *alle* Datenpunkte verwendet.

Das Verfahren scheitert für den oben diskutierten Fall, in dem die apparenten s-Verteilungen nicht symmetrisch um den Erwartungswert verteilt sind.

Auswertung der diffusionskorrigierten s-Verteilung

Als weiteres Resultat der Van Holde/Weischet-Auswertung erhält man die auf unendliche Zeit extrapolierte, diffusionskorrigierte s-Verteilung. Rechnet man diese Verteilung für jede Meßkurve entsprechend dem Laufzeitintegral in den r-Raum zurück und bildet die Differenz zu den Rohdaten, so wird die Information der Messung auf die reine Diffusion reduziert. Die Motivation besteht in der Anwendung auf polydisperse Systeme. Die gewonnenen Daten entsprechen prinzipiell einem *synthetic-boundary*-Experiment. Ihre Akquisition erfordert jedoch weder spezielle Zellen noch ein entsprechend ausgelegtes Experiment. Vielmehr werden die Daten aus einem normalen Geschwindigkeitslauf gewonnen. Zu ihrer Auswertung bieten sich die für *synthetic-boundary*-Experimente üblichen Verfahren an.

Diese Auswertungsverfahren nutzen die Tatsache, daß die diffundierenden Teilchen gaußverteilt vorliegen. Dies bedeutet, daß die in der Abbildung 5 dargestellten Kurven der Gaussschen Fehlerfunktion (oder Summen daraus) folgen.

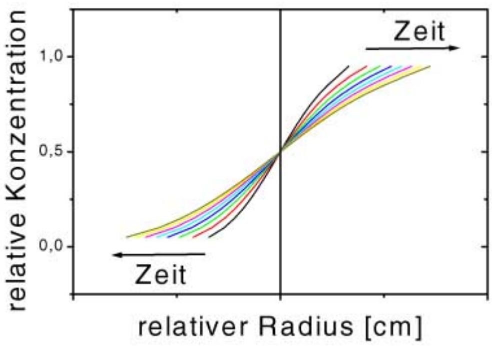

Abbildung 5: Polydispersitätsbereinigte Diffusionsverbr. aus der Van-Holde/Weischet-Auftragung

Die üblichen Verfahren beschränken die Auswertung auf einen bzw. zwei Punkte, anhand derer die gesamte Gauss-Kurve konstruiert wird. Abb. 5 zeigt die mit fortschreitender Laufzeit sich verbreiternden Verteilungen der simulierten Daten.

Zwei x-Werte einer Gauss-Kurve schließen eine Fläche ein, die sich als Differenz der Funktionswerte der Fehlerfunktion ergibt. Über diese Fläche läßt sich die Varianz der Gauss-Funktion eindeutig bestimmen. Besonders einfach ist die Rechnung dann, wenn die beiden Werte symmetrisch um 0 verteilt sind. Mit der Gauss-Funktion

$$\phi(r) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2}(r/\sigma)^2} \tag{7}$$

und der Fehlerfunktion

$$\Phi(r) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \int_0^r e^{-y^2} \mathrm{d}y, \tag{8}$$

welche Funktionswerte zwischen -1 und 1 annimmt und abgeleitet eine Gauss-Kurve der Fläche 2 und der Varianz $\sqrt{2}$ ergibt, erhält man für die Fläche A zwischen den x-Werten -r und r

$$A = \frac{\Phi(r)+1}{2} - \frac{\Phi(-r)+1}{2} = \Phi(r), \tag{9}$$

und für die Standardfunktion läßt sich die Proportionalität zwischen r und σ ermitteln:

$$\sigma = x \cdot r = \sqrt{2} \tag{10}$$

Damit ist

$$\sigma^2 = \frac{2}{\left[\Phi^{-1}(A)\right]^2} \cdot r^2 = 2\,D\,t \tag{11}$$

wobei A als Differenz der gewählten y-Werte vorgegeben ist. Üblich ist die Wahl der Radien bei $G(s) = 0{,}25$ bzw. 0,75, wobei die Steigung der Auftragung dem 0,227fachen des Diffusionskoeffizienten entspricht. Dieses Auswertungsverfahren geht auf Chervenka zurück.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Varianz der Gauss-Verteilung anhand ihres Maximums zu bestimmen. Für $r = 0$ hat die Gauss-Funktion in Gl. (7) den Wert $1/\sigma\sqrt{2\pi}$, welcher identisch mit der Steigung von $G(s)$ im Wendepunkt ist:

$$\left(\frac{\mathrm{d}c}{\mathrm{d}r}\right)_{r=0} = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \qquad \Rightarrow \sigma = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot \left(\frac{\mathrm{d}r}{\mathrm{d}c}\right)_{r=0} \tag{12}$$

Hieraus ergibt sich, daß die Steigung einer Auftragung der reziproken Steigung bei $r = 0$ das 4π-fache des Diffusionskoeffizienten ergibt.

Wie die vorangegangen GAUSS-Fits sind auch diese Auftragungen eigentlich nicht linear, sondern parabolisch. Der *lineare* Fit ergibt eine um etwa 15% zu hohe Diffusionskonstante. Auch hier ergibt die Extrapolation der Ableitung auf Null den korrekten Wert. An realen Daten ist dieses Verfahren jedoch häufig nicht praktikabel. Die Stärke dieser Methode liegt in der Abtrennung der Polydispersität. Dabei ist auch die Standardabweichung der diffusionskorrigierten Verteilung eine wertvolle Information. Wenn die Extrapolation auf $1/\sqrt{t} = 0$ keine sinnvolle Verteilung liefert, liegen zusätzliche Wechselwirkungen vor, die auf diese Weise untersucht werden können. Demgegenüber ist eine in der Literatur beschriebene Methode, über $1/t$ zu extrapolieren, kein geeignetes Mittel zur Ermittlung einer diffusionskorrigierten Verteilung.

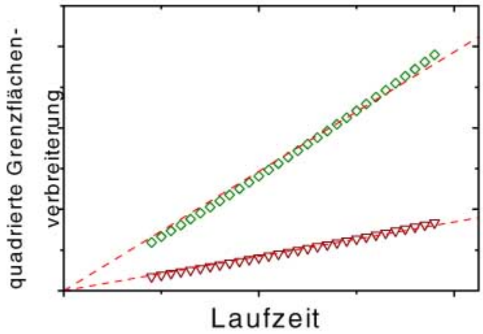

Abbildung 6: *Synthetic-boundary*-analoge Auswertung der Daten aus Abb. 5

In jedem Falle erfordert die Anwendung des *pseudo-synthetic-boundary*-Verfahrens sehr gute Meßdaten. Seine Stärke liegt in der Trennung von Diffusion und Polydispersität. Eine interessante Anwendung besteht in der Untersuchung der Diffusionskonstanten *bewegter* Partikel. So können sich Teilchen in der AUZ in einer Sekunde durchaus um ein Mehrtausendfaches ihres Durchmessers bewegen und erleiden dabei möglicherweise Deformationen, die anhand des Diffusionskoeffizienten und der Sedimentationskonstante zugänglich werden.