

UZ-Lösemittelvariation

Einführung

Dieser Abschnitt beschreibt, wie Sedimentationskoeffizientenverteilungen ohne Kenntnis der Partikeldichte in Teilchengrößenverteilungen umgerechnet werden können. Diese Darstellung beschränkt sich auf globuläre Teilchen; das Konzept läßt sich jedoch auf Teilchen anderer Geometrie verallgemeinern. Prinzipiell läßt sich eine s -Verteilung wie folgt in eine Größenverteilung umrechnen:

$$d^2 = \frac{18 \eta_1 s}{\varrho_P - \varrho_1}, \quad (1)$$

worin d für den Partikeldurchmesser, s für seine Sedimentationskonstante und ϱ_P für seine Dichte steht. ϱ_1 bzw. η_1 stehen für Dichte und Viskosität des Lösemittels. Gl. (1) erhält man aus einer Kombination der SVEDBERG-Gleichung mit der STOKES-EINSTEIN-Beziehung.

Für die Umrechnung einer Sedimentationskoeffizientenverteilung in eine Teilchengrößenverteilung ist also nach Gl. (1) die Kenntnis der Dichte des sedimentierenden Partikels erforderlich. Ist diese nicht bekannt, so kann anhand eines zweiten Experiments in einem Lösemittel anderer Dichte aus den zwei Sedimentationskoeffizientenverteilungen eine Dichte- und eine Durchmesserverteilung berechnet werden. Das Verfahren der Lösemittelvariation, vorzugsweise in einem Lösemittel und dessen deuteriertem Analogon, ist sowohl für das Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment als auch für das Sedimentationsgleichgewicht schon vor Jahrzehnten beschrieben worden. Die folgende Darstellung beschränkt sich auf das Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment. Dieses ist in der Durchführung schneller und erreicht auf modernen Maschinen die Genauigkeit des Sedimentationsgleichgewichtes, das ohne Transportgrößen auskommt und daher im Prinzip exakter ist.

Mathematische Beschreibung

Das Sedimentationsverhalten einer Probe in zwei Lösemitteln unterschiedlicher Dichte ist in Abb. 1 dargestellt. Im Lösemittel *höherer* Dichte weist ein Partikel in der Regel den *kleineren* s -Wert auf. Die Methode beruht auf

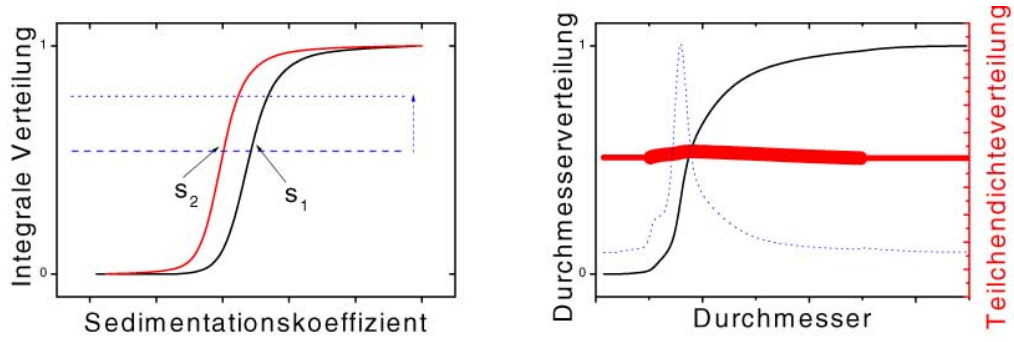


Abbildung 1: Sedimentationskoeffizientenverteilung einer Probe in zwei Lösemitteln unterschiedlicher Dichte (links) und (rechts) daraus erhaltene Dichte- (rechte Ordinate) und Durchmesserverteilung (linke Ordinate).

dem Vergleich der korrespondierenden s -Werte, wie es in der Abbildung dargestellt ist: Zu jedem s_a (der Index a steht für das Lösemittel niedrigerer Dichte) existiert ein s_b mit dem gleichen $G(s)$. Die gesamte Verteilung wird für die Integralwerte von 0 bis 1 wie folgt ausgewertet:

Jedes Wertepaar (s_a, s_b) muß beim Einsetzen in Gl. (1) mit den entsprechenden Lösemittelparametern die gleiche Partikeldichte und den gleichen Durchmesser ergeben. Damit existiert eine ganze Verteilung von Sätzen mit zwei Gleichungen und zwei Unbekannten:

$$d_i^2 = \frac{18 \eta_{1,a} s_{i,a}}{\varrho_{i,P} - \varrho_{1,a}} = \frac{18 \eta_{1,b} s_{i,b}}{\varrho_{i,P} - \varrho_{1,b}} \quad (2)$$

bzw.

$$\frac{\eta_{1,a} s_{i,a}}{\varrho_{i,P} - \varrho_{1,a}} = \frac{\eta_{1,b} s_{i,b}}{\varrho_{i,P} - \varrho_{1,b}}. \quad (3)$$

Nach Umformen der Gleichung erhält man die Dichte

$$\varrho_{i,P} = \frac{\eta_{1,a} s_{i,a} \varrho_{1,b} - \eta_{1,b} s_{i,b} \varrho_{1,a}}{s_{i,a} \eta_{1,a} - s_{i,b} \eta_{1,b}} \quad (4)$$

oder den Durchmesser

$$d_i = \sqrt{\frac{18 (\eta_{1,a} s_{i,a} - \eta_{1,b} s_{i,b})}{\varrho_{1,b} - \varrho_{1,a}}} \quad (5)$$

der beim entsprechenden Integralwert beobachteten Spezies. Anschließend wird das Integral und die Dichteverteilung über die berechneten Durchmesser aufgetragen. In Abb. 1 ist das Ergebnis der Auswertung im rechten Bild dargestellt.

Dichtevariation an gequollenen Systemen

Ein gequollenes Partikel, z. B. ein Polymerknäuel in einem guten Lösemittel, enthält mitsedimentierendes Lösemittel. Dieses leistet zwar keinen Beitrag zur effektiven Masse des Gesamtpartikels, da seine Masse gleich seiner Auftriebsmasse ist. Über sein Volumen bestimmt es aber den Durchmesser und damit den Reibungsterm des Knäuels. Anhand der Dichtevariation sollte also die Trockendichte des Polymeren erhalten werden; für die korrekte Durchmesserverteilung müssen weitere Annahmen gemacht werden. Im folgenden wird ein einfacher Ansatz zur Behandlung dieses zusätzlichen Freiheitsgrades gegeben.

Da Gl. (1) nur für kompakte Kugeln gilt, muß der Ansatz (2) entsprechend erweitert werden. Berücksichtigt man den Anteil mitsedimentierenden Lösemittels in Form des Parameters Φ , der den Volumenanteil des gesamten sedimentierenden Partikels an Lösemittel beschreibt, so ist dessen Dichte unter Annahme der Volumenadditivität durch

$$\varrho_{sed} = \Phi \cdot \varrho_1 + (1 - \Phi) \cdot \varrho_{02} \quad (6)$$

gegeben. Darin ist ϱ_1 die Dichte des Lösemittels und ϱ_{02} die Trockendichte des Polymeren. ϱ_{sed} ist die mittlere Dichte des sedimentierenden Knäuels. Setzt man Gl. (6) als Partikeldichte in den Ansatz für die Dichtevariation (2) ein, so erhält man für alle Paare ($s_a; s_b$)

$$\frac{\eta_{1,a} s_a}{[\Phi \varrho_{1,a} + (1 - \Phi) \varrho_{02}] - \varrho_{1,a}} = \frac{\eta_{1,b} s_b}{[\Phi \varrho_{1,b} + (1 - \Phi) \varrho_{02}] - \varrho_{1,b}} \quad (7)$$

Durch Vereinfachung ergibt sich die unveränderte Gl. (3)

$$\frac{\eta_{1,a} s_a}{\varrho_P - \varrho_{1,a}} = \frac{\eta_{1,b} s_b}{\varrho_P - \varrho_{1,b}} \quad , \quad (8)$$

womit gezeigt ist, daß bei Knäueln und anderen gequollenen Partikeln die aus der Dichtevariation erhaltene Dichte die Trockendichte des Polymeren *ohne* Lösemittelbeitrag ist. Anders verhält es sich mit dem Durchmesser, der aus dem Ansatz

$$d_h = \sqrt{\frac{18 \eta_{1,a} s_a}{\varrho_{2,sed} - \varrho_{1,a}}} = \sqrt{\frac{18 \eta_{1,b} s_b}{\varrho_{2,sed} - \varrho_{1,b}}} \quad (9)$$

mit Gl. (6) ein Ergebnis für d liefert, das von Φ bestimmt wird:

$$d_h = \sqrt{\frac{18 (\eta_{1,a} s_a - \eta_{1,b} s_b)}{(1 - \Phi) \cdot (\varrho_{1,a} - \varrho_{1,b})}} \quad (10)$$

Zum Auflösen der Gleichung ist also eine unabhängige Information entweder über den Quellungsparameter Φ oder über den Durchmesser erforderlich. Der Partikeldurchmesser kann aus einem entweder im gleichen Experiment oder mittels DLS bestimmten Diffusionskoeffizienten berechnet werden. Man sucht dann dasjenige Φ , das in Gl. (10) den korrekten Durchmesser liefert. Dies geschieht am einfachsten durch Ermittlung von ϱ_{sed} nach der umgestellten Gl. (1), wobei anstelle von ϱ_P nun ϱ_{sed} verwendet werden muß:

$$\varrho_{sed} = \frac{18 \eta_1 s}{d^2} + \varrho_1 \quad (11)$$

und Berechnen von Φ nach

$$\Phi = \frac{\varrho_{sed} - \varrho_{02}}{\varrho_1 - \varrho_{02}} \quad (12)$$

Zusammenfassend läßt sich über die Anwendung der Dichtevariation auf gequollene Partikel feststellen:

1. Das Dichtevariationsverfahren liefert ohne weitere Annahmen die *Trockendichte* des Polymeren.
2. Der *Durchmesser* des gequollenen Partikels muß unabhängig bestimmt werden, wobei jedoch der Parameter Φ erhalten wird, der sich bei komplizierten Systemen als nützliche Größe zur Beschreibung der Partikelarchitektur erweist.

Alternativ zum hier verwendeten Quellungsparameter Φ kann der zusätzliche Freiheitsgrad auch über die Molmasse M oder das Reibungskoeffizientenverhältnis f/f_0 beschrieben werden.

Dichtevariation an biologischen Systemen

Häufig sind Biomoleküle hinsichtlich ihrer Molmasse bereits gut charakterisiert. Von großem Interesse und mit Streumethoden schwer zugänglich sind jedoch Informationen über die Dichte und daraus erhältliche molekulare Parameter wie beispielsweise den Quellungsgrad. Diese Informationen sind häufig für ein Verständnis der Funktionsweise solcher Moleküle unentbehrlich.

Ein Verfahren zur Bestimmung des Quellungsgrades anhand der Charakterisierung in einem schlechten und in einem guten Lösemittel ist beschrieben worden. Dieses Verfahren ist präparativ aufwendig, da die Moleküle durch Dialyse vom schlechten in das gute Lösemittel übertragen werden müssen. Der Einsatz der Dichteveriation hat demgegenüber den Vorteil, daß **eine** Stammlösung nur mit deuteriertem Lösemittel *vermischt* werden muß.

Da das Hydratwasser keinen Beitrag zum Auftrieb leistet, erhält man bei der Dichteveriation die Trockendichte des Biomoleküls. Diese ist zwar auch über makroskopische Dichtemessungen zugänglich, doch werden dafür zu große Substanzmengen benötigt. Aus diesem Grunde sind Inkrementmethoden entwickelt worden, welche die Dichte aus der Aminosäuresequenz berechnen. Dies zeigt eine hinreichende Motivation für die Verwendung der Dichteveriation in der Biochemie.

Über Skalenbeziehungen sind aus der Dichte, dem Sedimentationskoeffizienten und der Molmasse, also aus Daten, die alle aus dem UZ-Geschwindigkeitsexperiment erhalten werden, weitere Eigenschaften zugänglich, unter anderem auch die Menge an Hydratwasser. Am Beispiel des Apoferritins ist dieses Verfahren in einer Publikation beschrieben worden, dessen Abstract Sie über die Publikationsseite einsehen können.

Dichteveriation an Systemen mit Exzeßgrößen

Viele Systeme weisen Exzeßdichten bzw. -volumina auf, welche die Auswertung von Dichteveriationsexperimenten erschweren und zusätzliche experimentelle Randbedingungen erforderlich machen. Am einfachsten zugänglich ist dazu die Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens des Gelösten anhand der KRATKY-Methode.

Für den Fall von Mizellen amphiphiler Blockcopolymere ist in meiner Promotion ein Verfahren beschrieben, nach dem aus der AUZ-Dichteveriation in Verbindung mit der dynamischen Lichtstreuung und der makroskopischen Dichtemessung wichtige Mizelldimensionen zugänglich werden. Tabelle 1 zeigt die erforderlichen Daten und die zugänglichen Größen.

Besonders nützlich ist dabei die Bestimmung des Mizellkerndurchmessers R_c , der experimentell sonst nur durch die aufwändige und teure Neutronenstreuung zugänglich ist. Aus der erweiterten Dichteveriationsmethode wird die

Eingabe		
$w_{lösl}$	Massenbruch des löslichen Blocks	Synthesedaten
R_h	hydrodynamischer Radius	DLS
ϱ_{dv}	mittlere Polymer-Trockendichte ¹	UZ-DV
$\varrho_2; \tilde{V}_2$	partielle spezifische Dichte ²	Dichteschwinger
$\varrho_1; \eta_1$	Dichte und Viskosität des Lösemittels	Literatur/Messung
$\varrho_{02,lösl}$	Trockendichte des lösl. Polymerblocks ³	Literatur/Messung
$\varrho_{02,unl}$	Trockendichte des unlösl. Polymerblocks ⁴	Literatur/Messung
Ausgabe		
R_c	Kerndurchmesser	
M_w	Molmasse (nur Polymer)	
m_{LM}	Masse anhaftendes Lösemittel pro Mizelle	
Φ	Gewichtungsparameter für mittransportiertes Lösemittel	
Φ_c	Polymeranteil des Kerns	
$\Phi_{LM,Cor}$	Lösemittelanteil der Korona	
ϱ_{Cor}	mittlere Dichte der Korona (Polymer und Lösemittel)	
ϱ_c	mittlere Dichte des Kerns	
Kontrolle/Vergleich		
M_w	Mizellen-Molmasse (nur Polymer)	SLS
M_w	Mizellen-Molmasse (mit LM-Beitrag)	UZ-GG
$\varrho_2; \tilde{V}_2$	partielle spezifische Dichte	UZ-Dichtegradient

Tabelle 1: Aus UZ-Messungen in Verbindung mit anderen Methoden zugängliche Mizellparameter. Fußnoten: (1) *mittlere* Dichte = nach Blocklängen gewichtet; $\varrho_{dv} = \varrho_{02}$ bei Systemen ohne Exzeßvolumen; (2) erforderlich bei Systemen mit Exzeßvolumen; (3) zur Berechnung von R_c ; (4) zur Berechnung von Φ_c .

Trockendichte und die Masse des Polymeranteils der Mizelle erhalten. Daraus läßt sich bei Kenntnis des Blocklängenverhältnisses und der Trockendichte des löslichen Blocks der Kerndurchmesser berechnen.

Für *haarige Latices* kann auf diese Weise der „nackte“ Durchmesser berechnet werden. Als „Haare“ werden die sterischen Stabilisatoren angesehen, als „Kern“ der Latex selbst. Der Massenanteil an Stabilisator muß aus der Präparation bekannt sein.

Tabelle 2 zeigt wesentliche Zusatzinformationen, die bei zunehmender Komplexität des sedimentierenden Partikels unter Hinzunahme weiterer Methoden aus der Ultrazentrifugation gewonnen werden können. Die gute Ergän-

Partikel	Methode	Information
kompakte Kugel	AUZ-DV	Dichte, Masse, Größe
Knäuel	+ DLS	+ Φ , Dicke der LM-Schale
	dito	Φ , Masse, Dichte
haariger Latex	+ $w_{lösl}$	+ R_c
Mizelle	+ \tilde{V}_2 -Bestimmung	+ LM-Beitrag

Tabelle 2: Erforderliche Methoden bei zunehmender Komplexität des kolloidalen Partikels

zung der Methoden untereinander beruht auf der Tatsache, daß der normale Sedimentationslauf, die Dichteveriations-Auswertung und die makroskopische Dichtebestimmung jeweils andere Dichtebilanzen aufstellen:

In der **makroskopischen Messung** geht die *Masse*, in der **Sedimentation** die *effektive Masse* aus dem Exzeßbeitrag in die Dichtebilanz ein. Im **AUZ-DV-Experiment** wird nur der *effektive* Anteil der *Differenz zwischen leichtem und schwerem Lösemittel* berücksichtigt, der andere Anteil wird eliminiert.

Einfluß von Konzentration und Diffusion

Eine gute Qualität des Datenmaterials ist für die Anwendung der Dichteveriations-Auswertung unerläßlich. Es gibt jedoch zwei Effekte, die auch die Auswertung qualitativ guter Verteilungen erheblich verfälschen können:

- Die Konzentrationsabhängigkeit der s -Verteilung
- Die Diffusionsverbreiterung

Messungen an Latices und anderen harten Kugeln verursachen in der Regel keinerlei Probleme, so daß in der bisherigen Literatur keine entsprechenden Korrekturen vorgenommen wurden. Dies liegt daran, daß

- k_s ¹ für harte Kugeln sehr klein ist und
- die Diffusionsverbreiterung durch hohe Drehzahlen klein gehalten werden kann, da die meisten derartigen Partikel mit der Interferenzoptik, also in kleinen Scanintervallen, detektiert werden können.

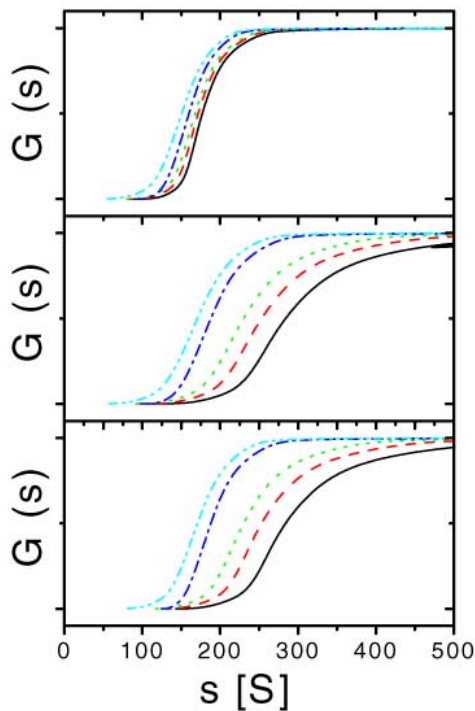


Abbildung 2: Auswirkungen der Korrekturen auf s -Verteilungen. Rohdaten (oben), Konzentrationskorrektur (Mitte), dazu Diffusionskorrektur (unten).

Die Diffusionskorrektur, soweit erforderlich, wird anhand eines unabhängig bestimmten Teilchendurchmessers vorgenommen. Die

¹ k_s gibt den Einfluß der Konzentration auf die Sedimentationsgeschwindigkeit an.

Bei anderen Systemen kann der Konzentrations- und Diffusionseinfluß erheblich sein. Es ist grundsätzlich sinnvoll, die Messungen in den beiden Lösemitteln unter gleichen Konzentrations- und Diffusionsbedingungen durchzuführen. Der Fehler geht so in beide s -Verteilungen gleich ein, wodurch der Fehler im Ergebnis zwar nicht eliminiert, aber doch klein gehalten wird. Bei großen k_s und bei starker Diffusionsverbreiterung können die Fehler jedoch auch bei gleichen Bedingungen für beide Messungen erheblich sein.

Die Verfälschung der Ergebnisse durch die Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten ist der deutlich stärkere Effekt. k_s sollte also bekannt sein, was die Messung einer Konzentra-

s -Verteilung wird dabei nach der VAN-HOLDE/WEISCHET-Methode korrigiert. Diese Methode wird im Abschnitt über Diffusion beschrieben.

Bei bestimmten Systemen können die Korrekturen erhebliche Auswirkungen haben. In Abb. 2 sind die Auswirkungen der Korrektur für ein mizellares System in fünf verschiedenen Mischungen von protoniertem und deuteriertem Lösemittel dargestellt. Die Konzentrationskorrektur verschiebt die s -Verteilungen zu höheren s und weitet sie auf. Die Diffusionskorrektur verengt die Verteilung.

Abb. 3 zeigt im linken Bild die Auswertung ohne Korrektur. Die Dichte wird viel zu hoch und dispers, der Durchmesser entsprechend zu klein gefunden. Im rechten Bild ist eine nahezu konstante Dichteverteilung und eine enge Teilchengrößenverteilung zu erkennen. In diese Auswertung wurde noch keine Diffusionskorrektur einbezogen!

Rechnerisch läßt sich zeigen, daß die Konzentrationskorrektur zu gleichen Dichten führt, wenn die Konzentration beider Lösungen gleich ist. Zwar verschiebt sie die s -Verteilungen, der Korrekturterm läßt sich jedoch aus der Gleichung für die Dichte eliminieren. Der Durchmesser wird in jedem Fall von der Korrektur beeinflusst.

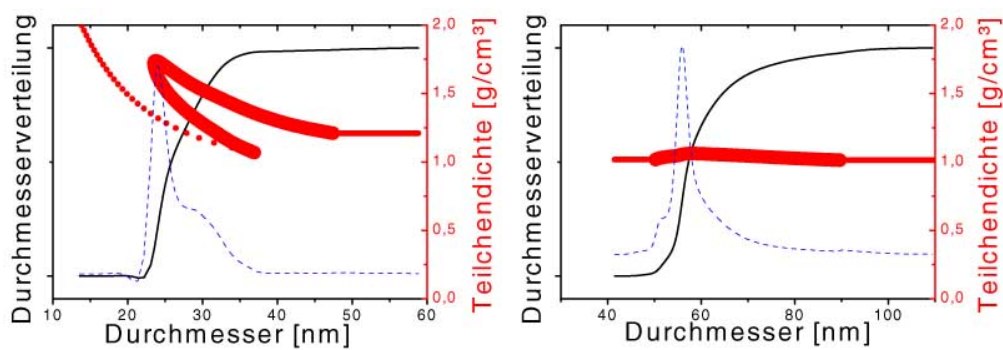


Abbildung 3: Auswirkungen der Konzentrationskorrektur auf die Dichteverteiler-Auswertung. Links: ohne, rechts: mit Korrektur auf die Konzentrationsabhängigkeit von s .