

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.

1934, Nr. 11.

— Abteilung A (Vereinsnachrichten) —

7. November.

The Svedberg:**Die Ultrazentrifuge und ihr Verwendungsgebiet.**

[Zusammenfassender Vortrag, gehalten auf Veranlassung der Deutschen Chemischen Gesellschaft auf der 93. Versammlung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte in Hannover am 20. September 1934; eingegangen am 27. September 1934.]

Die Ausdehnung der Wahrnehmungs- und Meßmöglichkeit kleiner Objekte über die vom gewöhnlichen Mikroskop gesetzten Grenzen hinaus ist im Ultra-mikroskop realisiert, und so wird die Abtrennung — und evtl. auch die Messung — von Teilchen, welche gewöhnliche Filter passieren, durch das Ultra-filter ermöglicht. In Analogie mit diesen Bezeichnungen wurde vom Verfasser der Name Ultra-zentrifuge für einen neuen Instrumenten-Typus vorgeschlagen, der unter Ausnutzung der Zentrifugalkraft die Messung von Teilchengrößen in hochdispersen Solen und die Bestimmung von Molekulargewichten in Lösungen hochmolekularer Stoffe bezwecken sollte (2, 3) *).

Drei Hauptkennzeichen charakterisieren die Ultra-zentrifuge gegenüber den gewöhnlichen Zentrifugen: Konvektions-Freiheit, Anordnungen für die genaue Messung der Sedimentation während der Rotation, Zentrifugal-Felder hoher Intensität und Homogenität. In den meisten Laboratoriums-Zentrifugen bilden sich in den relativ langen Flüssigkeits-Säulen infolge der Reibung der Gefäße an der umgebenden Luft und wegen der Lagerwärme starke Konvektions-Ströme aus, welche eine regelmäßige Sedimentation sehr kleiner Teilchen verhindern. Die Milch- und Öl-Separatoren, sowie die Winkel-Zentrifugen vermeiden durch verminderte Fallhöhe zum Teil diese schädliche Konvektion. Wenn es sich aber um genaue Messungen handelt, müssen Konvektions-Ströme vollkommen ausgeschlossen sein. Dies wird bei unseren Ultra-zentrifugen durch Herabsetzung der Gas-Reibung und guten Wärme-Ausgleich (Wasserstoff-Vakuum), durch Öl-Spülung der Lager und durch Beschränkung der zu studierenden Flüssigkeitsmengen auf sehr kleine Volumina (0.1—1.0 ccm) erreicht. Die Messung der Sedimentation wird unter Verwendung plan-paralleler, durchsichtiger Sedimentations-Zellen und besonderer Beleuchtungs- und Beobachtungs-Anordnungen (meistens auf photographischem Wege) gemacht. Hohe Zentrifugalkraft wird durch schnelle Rotation bei relativ kleinem Radius erreicht. Die Inhomogenität des Zentri-

*) s. Literatur-Verzeichnis auf S. 128/129.

fugal-Feldes soll etwa 25% nicht überschreiten, was bei vorgeschriebener Schichthöhe nur unter Innehalten eines hinreichend großen Abstandes von der Rotations-Achse zu erreichen ist. Die hohe Intensität des Zentrifugal-Feldes erfordert schnelle Rotation und hohe mechanische Widerstandsfähigkeit des Rotors. Die Grenze der zu erreichenden Intensität wird von den Festigkeits-Eigenschaften des legierten Stahles gesteckt.

Nach einigen mit J. B. Nichols (1) ausgeführten Vorversuchen (Zentrifugalkraft = 500-faches der Erdschwere) wurde vom Verfasser, H. Rinde und E. G. Bergström (2, 5, 11) die erste eigentliche Ultra-zentrifuge konstruiert. Bei einem Radius von 45 mm wurde dabei das 5000-fache der Erdschwere erreicht (Tourenzahl bis zu 10000 pro Min.). Anfang 1926 konnte die vom Verfasser, F. Ljungström und A. Lysholm gebaute Ölturbinen-Ultra-zentrifuge, welche bei einem Radius von 52 mm und einer Schichthöhe von 12—15 mm eine Zentrifugalkraft vom 100000-fachen der Erdschwere lieferte (Tourenzahl bis 45000 pro Min.), in Betrieb genommen werden (7, 8, 9, 10). Dieser Zentrifugen-Typus stellte sich als sehr leistungsfähig heraus und wurde in den folgenden Jahren vom Verfasser und G. Boestad weiter entwickelt. Schon im Sommer 1929 waren vom Verfasser und A. Lysholm einige Versuche bei dem 165000-fachen der Erdschwere (55000 Uml./m; Radius 50 mm) gemacht worden. Im Frühling 1931 konnten regelmäßige Bestimmungen beim 200000-fachen der Erdschwere (54000 Uml./min.; Radius 65 mm) ausgeführt werden (Verfasser und G. Boestad, 18, 19). Mit gleichem Radius erhielten wir Neujahr 1932 das 260000-fache, im Frühling 1932 das 300000-fache (20) und im Frühling 1933 das 400000-fache der Erdschwere (27, 28, 29). Schließlich konnten im Herbst 1933 Sedimentations-Messungen in einem Felde vom 600000-fachen der Erdschwere (30) und in diesem Sommer Bestimmungen beim 900000-fachen der Erdschwere ausgeführt werden. Dabei mußte jedoch der Radius auf 36 mm und die Schichthöhe auf 8 mm reduziert werden (Tourenzahl 145000 pro Min.) (31).

Aus den zahlreichen, in Upsala gebauten Versuchs-Modellen sind schließlich zwei Standard-Typen von Ultra-zentrifugen hervorgegangen. Der erste Typus umfaßt das Zentrifugal-Beschleunigungsgebiet von 500—15000-fachen der Erdschwere, der zweite Typus liefert Zentrifugalfelder vom 15000- bis 900000-fachen der Schwerkraft. Für das niedere Geschwindigkeits-Gebiet (bis etwa 20000 Uml./min.) können Kugellager mit Vorteil benutzt werden; der Kraftbedarf ist dementsprechend klein, und der Rotor kann deshalb direkt mit einem elektrischen Hochfrequenz-Motor gekuppelt werden. Vakuum ist nicht erforderlich, die Rotation kann, ohne daß schädliche Erwärmung eintritt, in Wasserstoff von Atmosphärendruck vor sich gehen. Für die höheren Geschwindigkeiten (bis 150000 Uml./min.) müssen Gleitlager benutzt werden; der Antrieb geschieht am besten mittels Ölturbinen. Um die Gas-Reibung nach Möglichkeit herabzusetzen, muß man die Rotation in Wasserstoff mit reduziertem Druck (Optimum etwa 25 mm) vor sich gehen lassen. Der Rotor muß aus sorgfältig ausgewähltem Stahl-Material hergestellt sein und eine mechanisch möglichst günstige Form haben. Genaue statische und dynamische Balancierung ist erforderlich.

Die Figuren 1 und 2 zeigen die Apparatur für niedere Geschwindigkeiten (14, 18, 20, 27, 28, 29, 30). Der Nickelstahl-Rotor mit der Zelle für die zu untersuchende Lösung (Fig. 1, Fig. 2, R und C) ruht auf der vertikalen Welle eines speziellen elektrischen Drehstrom-Motors (Fig. 2, M), dessen Geschwin-

digkeit durch Regulierung der Frequenz des Stromes verändert werden kann. Der Flüssigkeits-Raum der Zelle ist (wenigstens bei Messung der Sedimen-

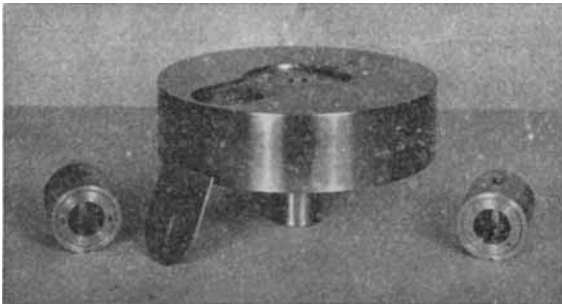


Fig. 1: Rotor für Zentrifugal-Felder bis zum 15000-fachen Betrage der Schwerkraft; die beiden Zellen für die zu untersuchende Lösung und eine Sektor-Blende sind herausgenommen.

tations-Geschwindigkeit), um radiale Sedimentation der Moleküle zu gewährleisten, sektor-förmig. Bei Sedimentationsgleichgewichts-Bestimmungen ist es, wenn man eine möglichst schnelle Einstellung des Gleichgewichts erzielen will, nach A. Tiselius und K. O. Pedersen vorteilhafter, eine Zelle mit parallelen Wänden zu benutzen. Zwei planparallele Bergkrystall-Platten begrenzen die Lösung senkrecht zur Richtung der Sedimentation, Boden und Seitenwände sind aus Bakelit. Um den Zentrifugen-Rotor und den Rotor des elektrischen Motors zirkuliert Wasserstoff von Atmosphärendruck. Der Stator des Zentrifugen-Motors wird mit Wasser gekühlt, und das Rotor-Gehäuse der Zentrifuge ist von einem Thermostaten umgeben. Ein Lichtbündel von der Quecksilberlampe, Fig. 2, L, passiert die Lichtfilter F_1, F_2, F_3 und wird, nach Reflexion an dem Prisma P, durch die Zelle C geführt. Die Kamera K, welche mit einem Objektiv von 100 cm Brennweite versehen ist, um parallaktische Fehler zu vermeiden, ermöglichte das Photographieren der Lösung während der Rotation. Die Bilder werden mit Hilfe eines Mikrophotometers registriert und die so erhaltenen Kurven für die Berechnung des Molekulargewichtes oder die Sedimentations-Konstante verwendet. Statt sich in dieser Weise mit Hilfe der Absorption des Lichtes durch die gelöste Substanz ein direktes kolorimetrisches Bild der Sedimentation zu verschaffen, ist es, wie O. Lamm gezeigt hat, in vielen Fällen vorteilhafter, die infolge der Konzentrations-Änderung eingetretene Variation in der Lichtbrechung auszunutzen (12, 15, 24). Dies kann z. B. in der Weise geschehen, daß eine

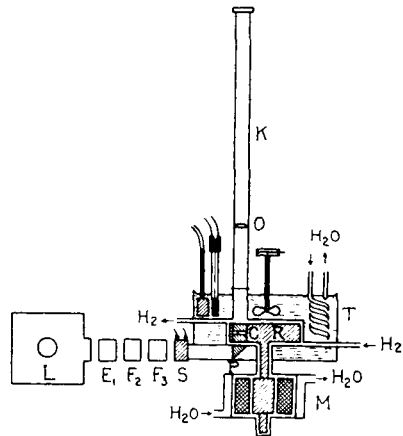


Fig. 2: Diagramm der Ultra-zentrifuge für niedrige Geschwindigkeiten (bis 18000 Uml./min.); Antrieb mittels direkt gekoppelten Dreiphasen-Motors.

fein geteilte Skala durch die rotierende Lösung mit Licht solcher Wellenlänge photographiert wird, daß keine Absorption stattfindet. Infolge der Refraktions-Änderung mit der Konzentration tritt eine Verschiebung der Skalen-Striche ein, und man kann durch sorgfältige Ausmessung dieser Verschiebung den Konzentrations-Gradienten sehr genau bestimmen.

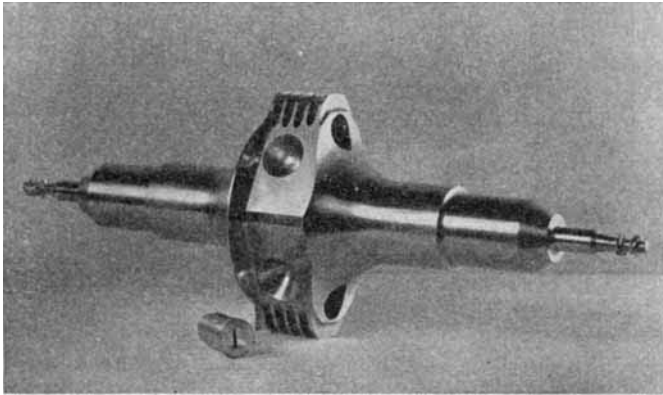


Fig. 3: Rotor für Zentrifugal-Felder bis zum 90000-fachen Betrage der Schwerkraft, mit Zelle. An den Enden der Rotorwelle sind Doppelturbinen angebracht (größter Durchmesser des Rotors 10,4 mm, äußerer Durchmesser der Zelle 14 mm).

Die Apparatur für höhere Geschwindigkeiten ist in den Figuren 3 und 4 abgebildet (20, 27, 28, 29, 30). Der Rotor (Fig. 3 und 4R) aus Chromnickelstahl (Bruchgrenze 170 kg/qmm, Streckgrenze 145 kg/qmm) ruht in horizontalen Gleitlagern B_1 und B_2 und wird mittels zweier kleinen Ölturbinen, T_1

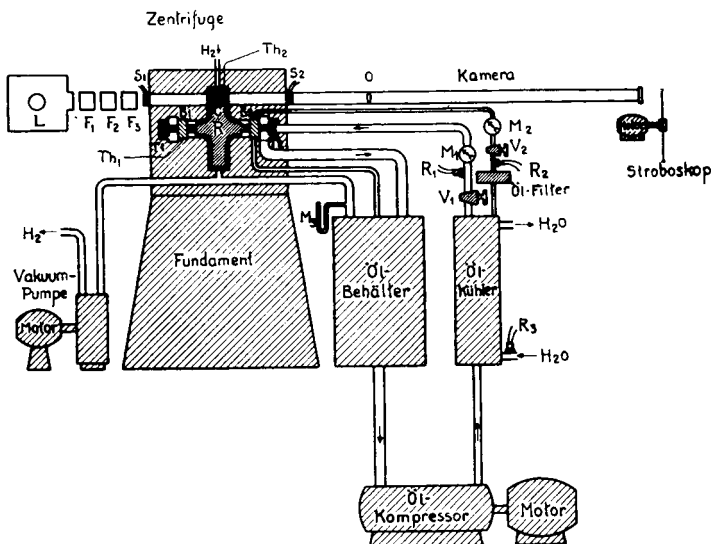


Fig. 4: Diagramm der Gesamtapparatur der Ölturbinen-Ultrazentrifuge.

und T_2 (die für höchste Geschwindigkeiten als Doppelturbinen ausgebildet sind), eine an jedem Ende der Welle angetrieben. Wasserstoff wird an der Peripherie eingelassen und fortlaufend abgepumpt, so daß ein Druck von etwa 25 mm aufrechterhalten bleibt. Es ist wichtig, daß eine reine Wasserstoff-Atmosphäre von annähernd diesem Druck im Zentrifugen-Gehäuse herrscht, denn schon eine Beimengung von wenigen Prozenten Luft genügt, um Konvektions-Ströme hervorzurufen. Das Wärmeleitungs-Vermögen des Wasserstoff-Gases hat bei 25 mm noch nicht abzusetzen begonnen, andererseits ist die Gas-Reibung genügend reduziert. Die Thermo-elemente Th_1 und Th_2 in den Lagern und in den inneren Mantelflächen des Zentrifugen-Gehäuses dienen zur Temperatur-Kontrolle. Die Temperatur-Differenz zwischen der rotierenden Zelle und dem Gehäuse bei verschiedenen Tourenzahlen wird durch Beobachtung des Schmelzens von gewissen, in der Zelle eingeführten Standard-Substanzen ermittelt. Diese Differenz übersteigt auch bei den höchsten Touren-Zahlen nicht 15° . Ein Lichtbündel von der Quecksilberlampe L, filtrierte durch die Filter F_1, F_2, F_3 , passiert die Zelle C in dem Rotor und erreicht schließlich die Kamera. Die Expositionen werden mittels zweier elektro-magnetischer Verschlüsse S_1 und S_2 gemacht. Die Messung der Tourenzahl erfolgt auf stroboskopischem Wege. Das Drucköl für die Turbinen wird von einem eigens dafür konstruierten Kompressor geliefert und vor dem Eintreten in die Turbinen-Kammern gekühlt. Das Schmieröl für die Lager wird sorgfältig filtrierte und sein Druck mittels des Ventils V_2 auf 2 kg/qcm einreguliert. Die Tourenzahl hängt vom Druck des Turbinenöls ab, der durch Variieren der Geschwindigkeit des Kompressors, sowie durch Verstellen des Ventils V_1 von 0 bis 19 kg/qcm verändert werden kann. Die Widerstands-Thermometer R_1, R_2, R_3 und die Manometer M_1, M_2, M_3 dienen zur Kontrolle der Temperatur und des Druckes in den verschiedenen Teilen der Apparatur.

Zweierlei Messungen können mit der Ultra-zentrifuge gemacht werden (3): Erstens kann man die Konzentrations-Änderung mit der Höhe in einer kleinen Säule der Lösung bestimmen, die so lange der Wirkung des Zentrifugal-Feldes ausgesetzt wird, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion eingestellt hat (Sedimentations-Gleichgewichts-Methode, 4, 5).

Für jede Molekelart gilt dabei die Formel:

$$M = \frac{2RT \ln c_2/c_1}{(1-V\rho)\omega^2(x_2^2 - x_1^2)} \dots \dots \dots (1)$$

in der: M = Molekulargewicht, R = Gaskonstante, T = absol. Temperatur, c = Konzentration, V = partielles spezif. Volumen der gelösten Substanz, ρ = Dichte des Lösungsmittels, x = Abstand von der Rotations-Achse, ω = Winkelgeschwindigkeit der rotierenden Lösung bedeutet.

In dieser Weise bekommt man also direkt das Molekulargewicht. Wenn mehrere Molekelarten gleichzeitig in der Lösung vorhanden sind, so erhält man bei der Berechnung der Molekulargewichte in verschiedenen Abständen von der Rotations-Achse einen Gang in den Werten. Die Abwesenheit eines Ganges ist demnach ein sicheres Kriterium für Einheitlichkeit, also für gleich große Moleküle. Wenn eine gemischte Lösung Zentrifugal-Feldern verschiedener Intensität ausgesetzt wird und die einzelnen Molekulargewichte nicht sehr benachbart sind, läßt sich ein Überwiegen der einen oder der anderen Komponente am Boden oder an der Decke der Flüssigkeitssäule erreichen und auf diesem Wege eine, wenn auch unvollständige, Molekulargewichts-Analyse durchführen.

Die zweite Meßmöglichkeit liegt in der Bestimmung der Sedimentations-Geschwindigkeit (3, 7, 9). Wird diese Geschwindigkeit auf das Einheitsfeld umgerechnet, d. h. durch ω^2x geteilt, so erhält sie die Benennung Sedimentations-Konstante. Diese Konstante ist für jede Molekelart bei einer gewissen Temperatur (z. B. 20⁰) und in einem gewissen Lösungsmittel (z. B. Wasser) charakteristisch.

Eine Reduktion auf Normal-Bedingungen kann nach folgender Formel durchgeführt werden:

$$s = dx/dt \cdot 1/\omega^2x \cdot \eta/\eta_0 \cdot \frac{1 - V\rho_0}{1 - V\rho} \dots\dots\dots (2)$$

in der: s = Sedimentations-Konstante, dx/dt = Sedimentations-Geschwindigkeit, η = Viskosität des Lösungsmittels, η_0 = Viskosität des Wassers bei 20⁰ bedeutet. Die übrigen Zeichen haben die früher angegebene Bedeutung.

Wenn die Gewichte der in Lösung vorhandenen Molekelarten nicht zu nahe beisammen liegen und ein Zentrifugal-Feld genügender Intensität angewendet wird, kann die Sedimentations-Konstante für jede Molekelart bestimmt werden. Die Molekulargewichte berechnen sich aus den Sedimentations-Konstanten nach der Formel:

$$M = \frac{RTs}{D(1 - V\rho)} \dots\dots\dots (3)$$

in der D die Diffusions-Konstante bedeutet.

Die Diffusions-Konstante kann in gewissen Fällen direkt aus Zentrifugierungs-Versuchen bestimmt werden (9), in der Regel sind jedoch die so erhaltenen Werte unsicher. Man muß daher die Diffusions-Konstanten für die in der Lösung vorhandenen Molekelarten außerhalb des Zentrifugal-Feldes bestimmen (A. Tiselius und D. Gross, 26) oder sich mit den Sedimentations-Konstanten begnügen. In vielen Fällen geben diese in der Tat genügenden Aufschluß über die Natur der verschiedenen Molekelarten.

Durch die Kombination einer Messung des Sedimentations-Gleichgewichts und einer Messung der Sedimentations-Geschwindigkeit kann man ein Maß für die Abweichung der Moleküle von der sphärischen Form erhalten (13, 14). Das Verhältnis:

$$\frac{M(1 - V\rho)}{s} \dots\dots\dots (4)$$

$$\frac{1}{6\pi\eta N \left(\frac{3MV}{4\pi N}\right)^{1/3}}$$

in welchem N die Avogadro'sche Konstante bedeutet, muß = 1 sein, wenn die Moleküle sphärisch sind. Abweichungen von der sphärischen Gestalt geben sich durch höhere Werte des angegebenen Bruchs zu erkennen.

Sind die sedimentierenden Moleküle elektrolytisch dissoziiert, so treten gewisse Komplikationen auf. Wenn die Dissoziation in der Bildung eines schweren, sedimentierenden und eines (oder mehrerer) leichten, nicht oder nur langsam sedimentierenden Ions besteht, so findet man zu tiefe Werte für die Molekulargewichte. Die Sedimentation der schweren Ionen wird nämlich auf Grund der elektrostatischen Anziehung durch die leichteren herabgesetzt. Dieser Effekt läßt sich indessen durch Zusatz eines in dem betreffenden Zentrifugal-Felde nicht sedimentierenden Elektrolyten leicht eliminieren (A. Tiselius, 6, 21; K. O. Pedersen, 22).

Sedimentations-Messungen in der Ultra-zentrifuge können ferner zur Bestimmung der Häufigkeits-Verteilung der Teilchengrößen in hochdispersen Kolloiden dienen (2, 3, 11). Es gilt für annähernd sphärische Teilchen, vorausgesetzt, daß die Sedimentation so rasch verläuft, daß die Diffusion vernachlässigt werden kann:

$$dc/dr = \frac{dc/dx}{dr/dx} \cdot (x_2/x_1)^2; \quad r = \sqrt{\frac{9 \tau \ln x_2/x_1}{2(\rho_p - \rho) \omega^2 (t_2 - t_1)}} \dots \dots (5)$$

hier ist r = Teilchen-Radius und ρ_p = Teilchen-Dichte, während die übrigen Zeichen ihre frühere Bedeutung haben.

Das Verwendungsgebiet der Ultra-zentrifuge ist ziemlich umfassend (7). Es lassen sich mit diesem Instrument Molekulargewichts-Bestimmungen an hochmolekularen Stoffen niedriger Dichte von 600000 bis etwa 1000 herunter und an niedrigmolekularen Stoffen höherer Dichte bis etwa 200 herunter machen. Ferner kann man Teilchengrößen-Verteilungen in hochdispersen kolloiden Lösungen damit registrieren. Von ganz besonderem Interesse ist die Möglichkeit, mittels der Ultra-zentrifuge eine Analyse der in einer Mischung vorhandenen Molekel-Arten ausführen zu können. Die Sedimentations-Konstante ist eine sehr charakteristische Molekül-Konstante, und mit deren Hilfe ist es oft möglich, empfindliche Aggregations- und Dissoziations-Reaktionen in biologischen Medien zu verfolgen. Das Kombinieren von Gleichgewichts- und Geschwindigkeits-Messungen erlaubt, wie schon hervorgehoben wurde, gewisse Schlüsse bezüglich der Gestalt der Moleküle zu ziehen. Dies ist bei Untersuchungen über hochmolekulare Stoffe oft von Bedeutung.

Bisher wurden folgende Körperklassen studiert: Proteine, Polysaccharide, Poly-styrole, Farbstoffe und andere synthetische hochmolekulare organische Verbindungen, sowie einige anorganische Kolloide und anorganische Salze. Am eingehendsten sind die Proteine untersucht worden. Einige der Hauptergebnisse der Eiweiß-Studien mögen erwähnt werden (16, 27): Die nativen Eiweißkörper sind im Gegensatz zu den synthetischen Kolloiden außerordentlich homogen. Dies gibt sich dadurch kund, daß bei rascher Sedimentation, bei der sich die Diffusion nur schwach bemerkbar macht, die Grenzfläche zwischen Lösung und Lösungsmittel scharf bleibt. Als Beispiel sei angeführt (nach Verfasser und E. Chirnoaga) die Sedimentation von Hämocyanin aus Schneckenblut ($M = 6600000$, $s = 100 \cdot 10^{-13}$) in einem Zentrifugal-Felde von der 37000-fachen Größe der Schwerkraft in Zeit-Intervallen von 3 Min. (Fig. 5, oberes Bild) und zum Vergleich damit die Sedimentation eines Gold-Kolloids unter ähnlichen Bedingungen (Fig. 5, unteres Bild). Im ersteren Falle ist die Grenzlinie zwischen Lösung und Lösungsmittel vollkommen scharf, einen hohen Grad von Homogenität anzeigend, im zweiten Falle verwischt sich diese Grenze mit der Zeit infolge Verschiedenheiten in der Größe der Goldteilchen.

Für die Prüfung der Homogenität von Substanzen mit wenig hohem Molekulargewicht muß man die Zentrifugalkraft entsprechend erhöhen. Fig. 6 zeigt die Sedimentation von Hämoglobin aus Menschenblut ($M = 69000$; $s = 4.4 \cdot 10^{-13}$) in einem Felde vom 900000-fachen der Erdschwere (Zeit-Intervall 3 Min.) nach Svedberg und Inga-Britta Eriksson-Quensel. Die Grenzlinie ist scharf und die gelöste Substanz folglich homogen.

Auch durch Bestimmungen des Sedimentations-Gleichgewichtes kann, wie schon hervorgehoben wurde, eine, wenn auch weniger scharfe, Prüfung der

Homogenität ausgeführt werden. Fig. 7 gibt die Gleichgewichtskonzentrations-Verteilung eines homogenen Stoffes, Phyko-erythrin, mittels der Refraktionsmethode gemessen, sowie die daraus berechnete Molekulargewichtskurve (I.-B. Eriksson-Quensel).

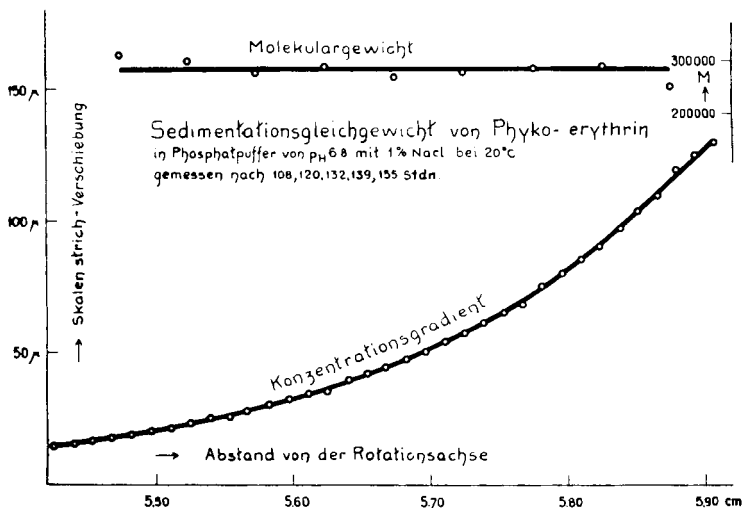


Fig. 7: Sedimentations-Gleichgewicht von Phyko-erythrin, refraktometrisch gemessen; das Diagramm gibt sowohl die Konzentrations-Verteilung beim Gleichgewicht als auch die daraus berechneten Molekulargewichte in ihrer Abhängigkeit vom Abstände von der Rotations-Achse wieder (Inga-Britta Eriksson-Quensel).

Die molekulare Einheitlichkeit eines Eiweißkörpers bleibt auch bei Veränderung des p_H der Lösung innerhalb gewisser Grenzen unverändert. Jeder Eiweißkörper hat sein eigenes, wohldefiniertes p_H -Stabilitäts-Gebiet. Beim Überschreiten der Stabilitäts-Grenzen tritt Zerfall des Moleküls in kleinere Bruchstücke oder Aggregation zu größeren Teilchen ein.

Die Molekulargewichts-Analyse mittels der Ultra-zentrifuge hat in vielen Fällen nahe an der Stabilitäts-Grenze die Existenz von einem oder mehreren Dissoziationsprodukten wohldefinierter Molekulargewichte, neben den unveränderten Molekülen, zutage gefördert. Dies gilt vor allem für die nativen Eiweißkörper von hohem Molekulargewicht. Die Dissoziation ist reversibel. Als Beispiele dieses Phänomens mögen die Hämocyane von *Helix* und *Limulus* angeführt werden. In einer Lösung von *Helix*-Hämocyanin an der alkalischen Stabilitäts-Grenze sind neben den unveränderten Molekülen ($M = 660000$) zwei Dissoziationsprodukte vom Gewicht $1/2$ und $1/8$ des ursprünglichen Moleküls vorhanden. Fig. 8 zeigt in ähnlicher Weise die Sedimentation von *Limulus*-Hämocyanin am iso-elektrischen Punkt (nach I.-B. Eriksson-Quensel). Hier koexistieren, wie es das Konzentrationsverteilungs-Diagramm deutlich zeigt, 4 Komponenten, welche wahrscheinlich die Molekulargewichte 330000, 160000, 40000 und 10000 besitzen, und deren Massen also etwa im Verhältnis $1 : 1/2 : 1/8 : 1/32$ stehen. In Fig. 9 sind die vollständigen p_H -Stabilitäts-Kurven für *Helix*- und *Limulus*-Hämocyanin wiedergegeben. Man ersieht daraus, wie regelmäßig der Zerfall dieser Moleküle

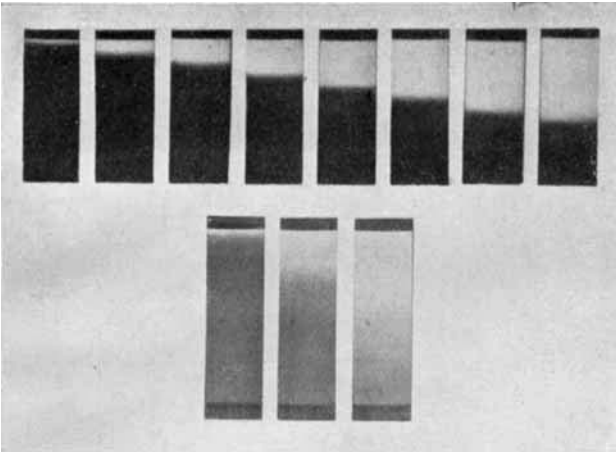


Fig. 5 (nebenstehend) : Oberes Bild: Sedimentation von Hämocyanin in einem Zentrifugal-Felde vom 37000-fachen Betrage der Erdschwere; Zeit zwischen den Aufnahmen 3 Min.; monodisperse Lösung (F. Chirnoaga). — Unteres Bild: Sedimentation eines Gold-Kolloids unter ähnlichen Bedingungen; polydisperse Lösung (H. Rinde).



Fig. 6: Sedimentation von Hämoglobin in einem Felde vom 900000-fachen Betrage der Erdschwere (145000 Uml./min.); Zeit zwischen den Aufnahmen 3 Min. (Inga-Britta Eriksson - Quenscl).

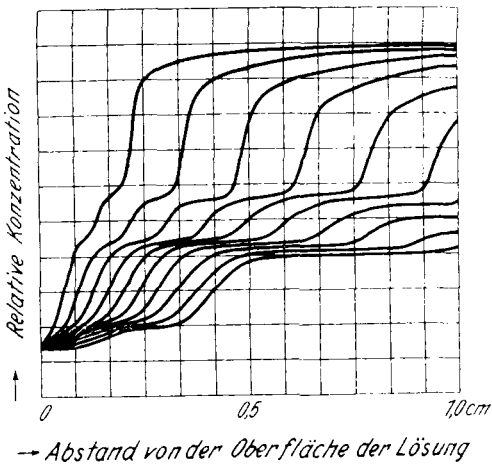
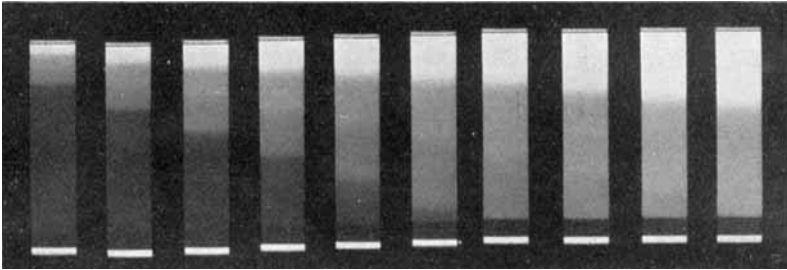


Fig. 8: Sedimentations-Analyse von Limulus-Hämocyanin am iso-elektrischen Punkte; Zentrifugal-Feld 100000-faches der Erdschwere; Zeit zwischen den Aufnahmen 5 Min.; es sind Moleküle von vier verschiedenen Gewichten anwesend (Inga-Britta Eriksson - Quenscl).

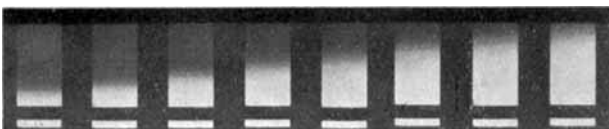


Fig. 14: Negative Sedimentation eines polydispersen Poly-styrols vom durchschnittlichen Molekulargewicht 80000, in Chloroform gelöst. Zentrifugal-Feld 130000-faches der Erdschwere (43000 Uml./min.); Zeit zwischen den Aufnahmen 15 Min. (R. Signer u. H. Groß).

bei einer Veränderung des p_H verläuft. Ein Helix-Molekül zerfällt an der alkalischen Seite des Stabilitäts-Gebietes zuerst in 2 Hälften und jede Hälfte in 4 Teile. An der sauren Seite gelingt es nicht, die Dissoziation weiter als bis zu den Halbmolekülen zu verfolgen. Die beiden höheren Limulus-Hämocyanine geben an der sauren Seite Moleküle vom Gewicht 24×34500 , die also ebenso schwer sind wie die Moleküle des Endprodukts vom Helix-Hämocyanin.

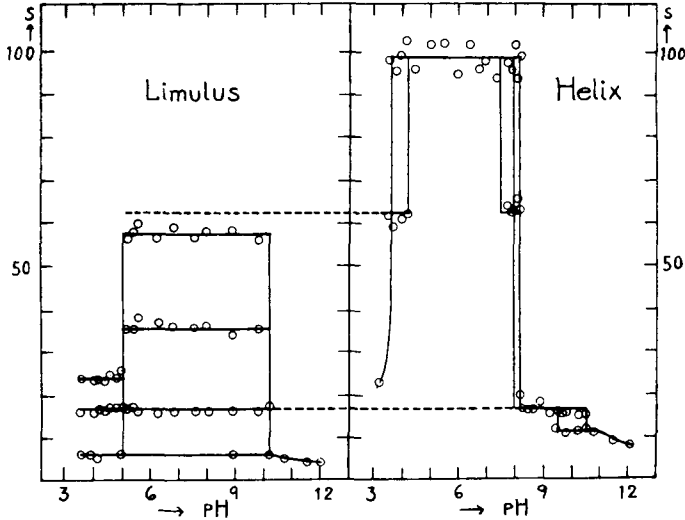


Fig. 9: Die p_H -Stabilitäts-Kurven der Hämocyanine von Limulus und Helix (Inga-Britta Eriksson-Quensel).

In gewissen Fällen ist der Assoziations-Zustand des Eiweiß-Moleküls auch von der Verdünnung und von der Anwesenheit anderer Proteine abhängig. So hat man vor kurzem durch Untersuchungen mit der Ultra-zentrifuge nachweisen können, daß das Serum-Globulin je nach der Konzentration des gleichzeitig anwesenden Serum-Albumins in verschiedener Molekülgröße auftritt (A. S. McFarlane, unpublizierte Untersuchungen). Pathologische Zustände des Organismus bedingen charakteristische Veränderungen in dem Eiweiß-Bilde (Fig. 10), was die Hoffnung erweckt, daß die Ultra-Zentrifuge sich vielleicht in der Zukunft als Instrument zur Diagnostizierung von Krankheiten ausnutzen lassen wird.

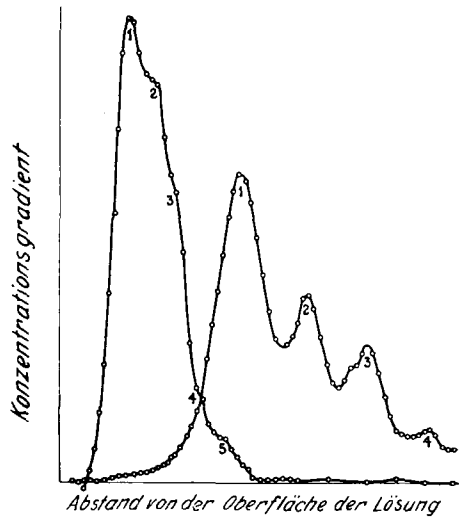


Fig. 10: Refraktometrisches Sedimentations-Diagramm von verdünntem Blutplasma eines Myelom-Patienten nach $\frac{1}{4}$ -stdg. bzw. 1-stdg. Sedimentation in einem Zentrifugal-Felde vom 260000-fachen der Erdschwere (A. S. McFarlane).

Die ultra-zentrifugalen Untersuchungs-Ergebnisse anderer Körperklassen seien hier nur andeutungsweise gegeben. Von Kohlenhydraten wurden Cellulose und Stärke studiert. Die erstere Substanz in Kupfer-tetramminsalz-Lösungen wurde in Upsala von A. J. Stamm (17), in Wilmington von E. O. Kraemer und W. D. Lansing (32) untersucht. Wegen der Empfindlichkeit solcher Lösungen gegenüber Sauerstoff (wobei Abbau eintritt) ist es schwierig, genaue Molekulargewichts-Werte zu bekommen. Kraemer und Lansing finden für native Cellulose durch Extrapolation etwa 300000. Lösungen von Stärke zeigen nach Untersuchungen von O. Lamm (34), je nach der Vorgeschichte, ein sehr verschiedenes Verhalten in der Ultra-zentrifuge. Poly-dispersität ist fast immer vorherrschend. Kaltbereitete Lösungen in $ZnCl_2$ sind niedrig-dispers, $M \sim 100000$, überhitzte wäßrige Lösungen geben Molekulargewichte von der Größenordnung 100000, während säure-behandelte Präparate zwei deutliche Maxima, etwa $M = 60000$ und $M = 200000$, zeigen, die von Amylose und Amylo-pektin herrühren (Fig. 11). Der Dis-

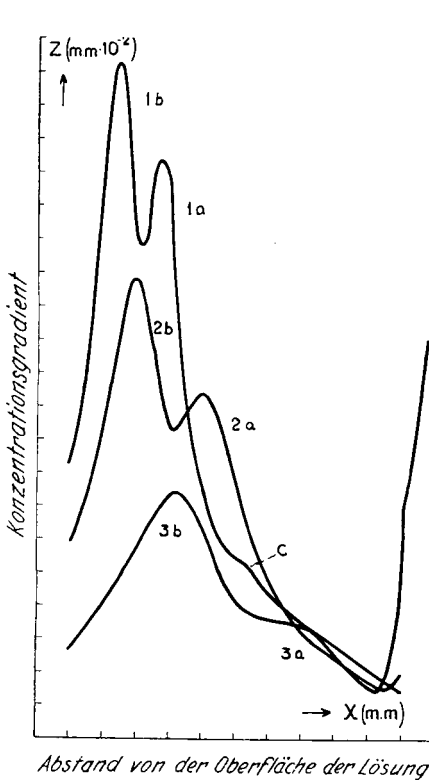


Fig. 11: Refraktometrisches Sedimentations-Diagramm einer Lösung von säure-behandelter Stärke in einem Zentrifugal-Felde vom 145000-fachen Betrage der Erdschwere; das rasch sedimentierende Maximum rührt von Amylo-pektin, das langsam sedimentierende von Amylose her (O. Lamm).

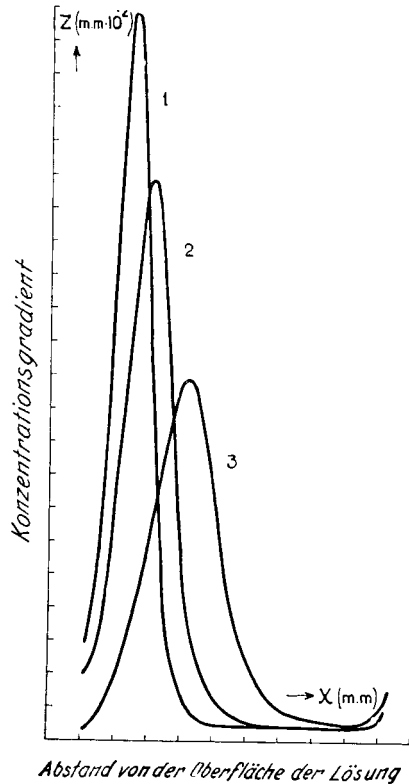


Fig. 12: Refraktometrisches Sedimentations-Diagramm der Stärke-Lösung von Fig. 11 nach Entfernung der Amylopektin-Komponente durch Elektrodialyse (O. Lamm).

persitätsgrad des Amylo-pektins hängt von der Art der Säure-Behandlung stark ab. Durch Elektro-dialyse wird das stark poly-disperse Amylo-pektin entfernt und nur das schärfere Amylose-Maximum ($M = 60000$) bleibt zurück (Fig. 12). Eine Molekulargewichts-Analyse mittels der Sedimentationsgleichgewichts-Methode gab die in Fig. 13 gezeichnete Verteilung. Folglich ist auch die Amylose poly-dispers.

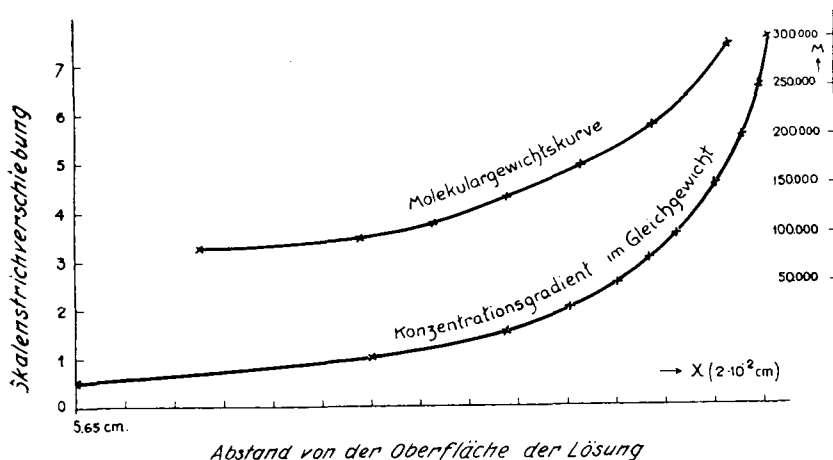


Fig. 13: Sedimentations-Gleichgewicht von Amylose, refraktometrisch gemessen; das Diagramm gibt sowohl die Konzentrations-Verteilung beim Gleichgewicht als auch die daraus berechneten Molekulargewichte in ihrer Abhängigkeit vom Abstände von der Rotations-Achse wieder (O. Lamm).

Aus den Untersuchungen über hochmolekulare organische Verbindungen sei erwähnt die Bestimmung des Molekulargewichts von polymerer ω -Oxydecansäure (E. O. Kraemer und W. D. Lansing, 25) durch Messung des Sedimentations-Gleichgewichtes. Gefunden wurde dabei $M = 27000$, während die Titration mit Alkali 25000 ergab. Über das Verhalten der Poly-styrole in der Ultra-zentrifuge liegen umfassende Arbeiten von R. Signer und H. Gross (33) vor. Von besonderem Interesse ist, daß es gelang, eine Reihe von verschiedenen organischen Lösungsmitteln zu verwenden, wobei sogar eine Umkehrung der Sedimentation beobachtet werden konnte. Es zeigte sich, daß solche Faden-Moleküle in konzentrierter Lösung stark verfilzt sind, so daß die freie Beweglichkeit nur bei hoher Verdünnung gewährleistet ist. Deutliche Parallelität zwischen Molekulargewicht und Viscosität wurde gefunden. Dank der jetzt in Upsala verfügbaren, intensiven Zentrifugal-Felder können quantitative Poly-dispersitäts-Analysen leicht ausgeführt werden. Die meisten Poly-styrol-Fractionen stellten sich dabei als ziemlich inhomogen heraus. Fig. 14 gibt die (negative) Sedimentation eines Poly-styrols vom durchschnittlichen Molekulargewicht 80000 wieder. Die Grenzlinie verwischt sich mit der Zeit infolge Inhomogenität der gelösten Substanz. Die Poly-dispersitäts-Analyse zeigte, daß nur etwa 25 Gew.-% zwischen $M = 75000$ und $M = 85000$ fallen.

Anorganische Kolloide waren die ersten Objekte ultra-zentrifugaler Dispersitäts-Untersuchungen. Ausgedehnte Messungen an Gold-Solen von

H. Rinde, Upsala (2, 11) liegen vor, ferner in Wilmington von J. B. Nichols, E. O. Kraemer und E. D. Bailey (23) ausgeführte Studien über Teilchengröße und Konstitution von Eisenoxyd-Solen.

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß in Upsala vor kurzem von K. O. Pedersen (35) Lösungen von anorganischen Salzen in der Ultra-zentrifuge studiert worden sind, und zwar mittels der Sedimentationsgleichgewichts-Methode. In den meisten bisher untersuchten Fällen (CsJ , KJO_3 , TlNO_3 , HgCl_2) stimmen die gefundenen Molekulargewichte sehr gut mit den aus der chemischen Formel berechneten überein (mittlerer Fehler etwa 10%); Abweichungen wurden bei CsJ und CdJ_2 gefunden. Die Untersuchung wird von C. Drucker fortgesetzt, um zu sehen, ob die Ultra-zentrifuge sich auch für die Messung der thermodynamischen Aktivität resp. der Assoziation in Salzlösungen eignen wird.

Die angeführten Beispiele mögen genügen, um das Verwendungs-Gebiet der Ultra-zentrifuge zu charakterisieren. Dispersitäts- und Molekulargewichts-Analysen in Lösungen hochmolekularer Stoffe bilden das Hauptthema. Dabei ist es oft von Vorteil, daß solche Studien an Originalproben gemacht werden können, die von chemischen Eingriffen verschont bleiben. Auch die Gestalt der gelösten Moleküle kann bis zu einem gewissen Grade durch ultra-zentrifugale Untersuchungen beleuchtet werden. Dank der verhältnismäßig großen Präzision der verwendeten optischen Meßmethoden, speziell der refraktometrischen, ist die Genauigkeit der mittels der Ultra-zentrifuge gewonnenen Daten recht befriedigend. Mit der Inanspruchnahme der jetzt in Upsala angestrebten, sehr intensiven Zentrifugal-Felder (von der Größenordnung = 1000000-faches der Erdschwere), wird sich wohl auch die Sedimentations-Analyse auf gelöste Stoffe von niedrigerem Molekulargewicht ausdehnen lassen.

Literatur-Verzeichnis.

- 1) T. Svedberg u. J. B. Nichols, Journ. Amer. chem. Soc. **45**, 2910 [1923].
- 2) T. Svedberg u. H. Rinde, Journ. Amer. chem. Soc. **46**, 2677 [1924].
- 3) T. Svedberg, Kolloid-Ztschr., Erg.-Bd. zu **36**, 53 [1925].
- 4) T. Svedberg u. R. Fåhræus, Journ. Amer. chem. Soc. **48**, 430 [1926].
- 5) T. Svedberg, Ztschr. physikal. Chem. **121**, 65 [1926].
- 6) A. Tiselius, Ztschr. physikal. Chem. **124**, 449 [1926].
- 7) T. Svedberg, Kolloidchem. Beih. **26**, 230 [1927].
- 8) T. Svedberg u. A. Lysholm, Nova Acta Reg. Soc. Sc. Upsaliensis **1927**.
- 9) T. Svedberg, Ztschr. physikal. Chem. **127**, 51 [1927].
- 10) T. Svedberg u. J. B. Nichols, Journ. Amer. chem. Soc. **49**, 2920 [1927].
- 11) H. Rinde, The Distribution of the Sizes of Particles in Gold Sols, Dissertat., Upsala 1928.
- 12) O. Lamm, Ztschr. physikal. Chem. **138 B**, 313 [1928].
- 13) T. Svedberg, Nature, 8. Juni 1929.
- 14) T. Svedberg u. B. Sjögren, Journ. Amer. chem. Soc. **51**, 3594 [1929].
- 15) O. Lamm, Ztschr. physikal. Chem. **143 B**, 177 [1929].
- 16) T. Svedberg, Kolloid-Ztschr. **51**, 1 [1930].
- 17) A. J. Stamm, Journ. Amer. chem. Soc. **52**, 3047, 3667 [1930].

- 18) T. Svedberg, Journ. Physique [7] **2**, 227 [1931].
- 19) T. Svedberg u. Inga-Britta Eriksson, Journ. Amer. chem. Soc. **54**, 3998 [1932].
- 20) T. Svedberg, Forhandl. 4: de Nordiske Kjemikermöte, Oslo 1932.
- 21) A. Tiselius, Kolloid-Ztschr. **59**, 306 [1932].
- 22) K. O. Pedersen, Forhandl. 4: de Nordiske Kjemikermöte, Oslo 1932.
- 23) J. B. Nichols, E. O. Kraemer u. F. D. Bailey, Journ. Phys. Chem. **36**, 326, 505 [1932].
- 24) O. Lamm, Nature **132**, 820 [1933].
- 25) E. O. Kraemer u. W. D. Lansing, Journ. Amer. chem. Soc. **55**, 4319 [1933].
- 26) A. Tiselius u. D. Gross, Kolloid-Ztschr. **66**, 11 [1934].
- 27) T. Svedberg, Kolloid-Ztschr. **67**, 1 [1934].
- 28) T. Svedberg, Chem. Rev. **14**, 1 [1934].
- 29) T. Svedberg, Science **79**, 327 [1934].
- 30) T. Svedberg, Naturwiss. **22**, 15 [1934].
- 31) T. Svedberg, G. Boestad u. Inga-Britta Eriksson-Quensel, Nature **134**, 98 [1934].
- 32) E. O. Kraemer u. W. D. Lansing, Nature **123**, 870 [1934].
- 33) R. Signer u. H. Gross, Helv. chim. Acta **15**, 59, 335, 726 [1934].
- 34) O. Lamm, Kolloid-Ztschr. **69**, 44 [1934].
- 35) K. O. Pedersen, Ztschr. physikal. Chem. **170 A**, 41 [1934].

Walter Hückel: Molekülbau und Reaktionsgeschwindigkeit.

[Zusammenfassender Vortrag, gehalten auf Veranlassung der Deutschen Chemischen Gesellschaft auf der 93. Versammlung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte in Hannover am 19. September 1934; eingegangen am 16. Oktober 1934.]

Allgemeines.

Wie wichtig eine Kenntnis der Zusammenhänge zwischen Molekülbau und Reaktionsgeschwindigkeit ist, ergibt sich schon aus der Tatsache, daß eine Ergründung der Struktur organischer Verbindungen nur deswegen möglich ist, weil die einzelnen Stellen eines Moleküls von verschiedenen Reagenzien mit verschiedenen Geschwindigkeiten angegriffen werden. Gegen welche Bindung sich unter gegebenen Versuchs-Bedingungen der Angriff eines bestimmten Reagens vorzugsweise richtet, ist zunächst nur auf Grund eines reichen, durch Erfahrung gewonnenen Materials vorherzusehen. Es läßt sich keine allgemein gültige Einordnung der einzelnen funktionellen Gruppen oder Atom-Bindungen in ein Schema vornehmen, das die Abstufung der Reaktionsgeschwindigkeiten gegenüber den einzelnen Reagenzien wiedergibt. Denn dieselbe funktionelle Gruppe kann je nach den konstitutiven Eigentümlichkeiten einer Verbindung ganz verschiedene Geschwindigkeiten gegenüber demselben Reagens zeigen. Als Beispiel sei eine kürzlich von Skrabal gegebene Zusammenstellung der Geschwindigkeiten, mit der die durch das Wasserstoff-Ion katalysierte Spaltung von -C-O-C-Bindungen, also die Hydrolyse von äther-artigen Bindungen, verläuft, angeführt.