

Messungen der Absolutintensität der diffusen Röntgenkleinwinkelstreuung durch mechanische Schwächung des Primärstrahls bei Anwendung der Impulszähltechnik

Von

O. Kratky und H. Wawra

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Universität Graz

(Eingegangen am 26. August 1963)

In der Röntgenkleinwinkelanalyse ist die Bestimmung des Verhältnisses der gestreuten Energie zu der des Primärstrahls ein Weg, um Massenbestimmungen (Molekulargewicht, Masse pro Längeneinheit bei gestreckten Teilchen, mittleres Schwanungsquadrat der Elektronendichte) vorzunehmen. Zur Messung des Primärstrahls auf dem Wege der Impulszählung muß dieser in definierter Weise um mehrere Größenordnungen geschwächt werden, was mittels einer mechanischen Vorrichtung geschehen kann, die wir als „Rotator“ bezeichnen. Prinzip, Fehlerquellen und notwendige Korrekturen werden besprochen. Die mit diesem Gerät in unserem Arbeitskreis durchgeführten Absolutmessungen werden kurz aufgeführt.

Die Absolutmessung der Röntgenkleinwinkelstreuung, d. h. die Bestimmung des Verhältnisses der Streuintensität zu der Intensität des Primärstrahls, ist ein Verfahren, um Gewichtsbestimmungen an makromolekularen Stoffen vorzunehmen. In verdünnten Systemen kann bei korpuskularen Partikeln die Gesamtmasse¹, bei sehr langgestreckten Teilchen die Masse pro Längeneinheit^{2, 3} und bei großflächigen Teilchen die Masse pro Flächeneinheit⁴ gemessen werden. Überdies ist die

¹ O. Kratky, G. Porod und L. Kahovec, Z. Elektrochem. **55**, 53 (1951).

² O. Kratky und G. Porod, in: Die Physik der Hochpolymeren, Band 2, herausgeg. von H. A. Stuart, Springer-Verlag, Berlin 1953.

³ O. Kratky, Z. Elektrochem. **60**, 245 (1956).

⁴ O. Kratky, X-Ray Small Angle Scattering with Substances of Biological Interest in Diluted Solutions, in: Progress in Biophysics, Pergamon-Press, London, Vol. 13.

im absoluten Maß gegebene Invariante^{5, 6} mit dem mittleren Schwankungsquadrat der Elektronendichte verknüpft, das seinerseits eine wichtige Größe für die Aufklärung der Zusammensetzung aus Phasen verschiedener Elektronendichte (etwa Anteile an kristalliner und amorpher Phase) darstellt.

Wir haben in unserem Arbeitskreis für die Absolutmessung in den letzten Jahren eine Vorrichtung entwickelt, die wir als „Rotator“ bezeichnen. Ihre Wirkungsweise ist bisher anlässlich der Mitteilung von Meßergebnissen nur kurz skizziert worden⁷. Da sich die Methode bei vielen Präzisionsmessungen dieser Art sehr bewährt hat, scheint es angebracht, eine genauere Beschreibung zu geben.

1. Prinzip des Rotatorverfahrens

Die Schwierigkeit der Absolutmessung liegt in der Tatsache begründet, daß der Primärstrahl bei mittleren Aufnahmebedingungen einen Energiefluß von 10^7 bis 10^8 Impulsen/sec darstellt, während man wegen der Totzeit der Meßanordnung bei den meisten Zählleinrichtungen höchstens 10^3 Impulse/sec zählen kann. Somit ist eine Schwächung des Primärstrahls um 4 bis 5 Größenordnungen notwendig. Diese Aufgabe wird — ohne Veränderung der spektralen Zusammensetzung der Strahlung — von einer Vorrichtung erfüllt, die als Weiterentwicklung einer Sektorblende angesehen werden kann. Knapp vor dem Zählrohr ist eine Scheibe angebracht, deren Fläche normal zur Fortpflanzungsrichtung des Röntgenstrahls steht und diesen abschirmt. Die Scheibe besitzt eine Anzahl kleiner Löcher — bei unseren Messungen waren es vier —, die sich bei ihrer Rotation quer über den bandförmigen Querschnitt des Primärstrahls bewegen. Es ist nun notwendig und auch technisch durchaus möglich, die Dimensionen der Scheibe und der Löcher sowie die Tourenzahl so zu wählen, daß nicht bei jedem Vorbeigang eines Loches ein Röntgen-Lichtquant durchtritt, also die Zahl der Quanten pro Vorbeigang im Durchschnitt wesentlich kleiner als 1 ist. (Würde nämlich bei jedem Vorbeigang mindestens ein Quant durchtreten, so wäre die Impulzzählung gleichbedeutend mit einer Bestimmung der Tourenzahl.) Natürlich muß bis zum Vorbeigang des nächsten Loches die Anlage bereits wieder zählbereit sein.

Zunächst sei durch eine Abschätzung gezeigt, daß sich die genannten Bedingungen tatsächlich erfüllen lassen.

Der Querschnitt des Primärstrahls in der Registrierebene liegt bei mittleren Aufnahmebedingungen in der Größenordnung von $20 \text{ mm} \times 0,4 \text{ mm}$, beträgt also 8 mm^2 ; durch diesen mögen $3 \cdot 10^7$ Quanten/sec

⁵ P. Debye und A. M. Bueche, J. appl. Physics **20**, 518 (1949).

⁶ G. Porod, Kolloid-Z. **124**, 83 (1951); **125**, 51 (1951).

⁷ O. Kratky, Makromol. Chem. **35 A**, 12 (1960); Kolloid-Z. **182**, 7 (1962).

treten, eine Zahl, die etwa einen Mittelwert bei Verwendung käuflicher Röntgenanlagen darstellt.

Ein Loch des Rotators hat eine Fläche von etwa 10^{-3} mm^2 , ist also $8 \cdot 10^3$ mal kleiner als der Primärstrahlquerschnitt. Würde das Loch im Primärstrahl verweilen, so würde es pro Sekunde von $3 \cdot 10^7/8 \cdot 10^3 \approx 0,4 \cdot 10^4$ Quanten durchsetzt.

Nun laufen aber die Löcher des Rotators auf einem Umfang von etwa 200 mm mit etwa 50 Touren/sec. Der Vorbeilauf eines Loches dauert daher $\frac{1}{50} \cdot \frac{0,4}{200} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ sec}$. In dieser Zeit werden unter den gegebenen Bedingungen nur $0,4 \cdot 10^4 \times 4 \cdot 10^{-5} \approx 1/6$ Quanten durch das Loch treten. Die Bedingung, daß die Quanten einzeln gefangen werden, ist also erfüllt. Da ein Umlauf $1/50$ Sekunde dauert und am Rotator vier Löcher angebracht sind, vergeht zwischen zwei Vorbeigängen $1/200$ Sekunde. Diese Zeit ist länger als die Totzeit, die Anordnung ist also beim nächsten Loch wieder zählbereit.

Eine einfache Überlegung zeigt nun, daß die Energie P_0 pro Längeneinheit des strichförmigen Primärstrahls gegeben ist durch

$$P_0 = p \frac{U}{f_4} \quad (1)$$

wo p die gemessene Zahl der Impulse/sec, f_4 die Summe der Flächen aller 4 Löcher und U den Umfang bedeutet, auf welchem sich die Löcher bewegen.

2. Korrekturen und Fehlerquellen

Bei sehr genauen Messungen sind verschiedene Korrekturen durchzuführen und einige Fehlerquellen sorgfältig zu beachten:

a) Lochgröße

Die Löcher sind durch je zwei Schneidenpaare aus Platin-Iridium begrenzt. Wegen ihrer Kleinheit (Kantenlänge etwa 0,03 mm) ist eine Vermessung unter dem Mikroskop nicht genügend genau. Es hat sich daher als notwendig erwiesen, einen zweiten Rotator mit einem wesentlich größeren Loch, nämlich etwa $0,012 \text{ mm}^2$, herzustellen, das sich hinreichend genau messen läßt, und nun durch vergleichende Messung mit einem beliebigen Primärstrahl das Flächenverhältnis festzustellen.

Bei dem für zahlreiche Messungen verwendeten Rotator war $f_4 = 0,00276 \text{ mm}^2$.

b) Koinzidenzen

Sehr wichtig ist die Beachtung des Umstandes, daß trotz der Seltenheit eines Quantendurchtrittes doch gelegentlich Koinzidenzen auftreten, d. h. zwei oder mehr Quanten bei ein und demselben Vorbeigang

ein Loch durchsetzen. Sie werden nur als *ein* Quant gezählt, weil, wie oben erwähnt, ein Loch nur wenige 10^{-5} sec vor dem Primärstrahl bleibt.

Zunächst erhalten wir aus der Zahl p der Impulse/sec die Zahl n pro Vorbeigang, indem wir — bei Rotatoren mit 4 Löchern — p durch die vierfache Umlaufszahl $4u$ dividieren

$$n = p/4u \quad (2a)$$

Nach bekannten Prinzipien der Statistik (*Poissonsche Formel*) ergibt sich dann die Zahl der tatsächlich pro Vorbeigang aufgetretenen Impulse n_{korr} gemäß

$$n_{\text{korr}} = n + \frac{n^2}{2} + \frac{n^3}{3} = -\ln(1-n) \quad (3)$$

Es ist klar, daß man aus n_{korr} zunächst

$$p_{\text{korr}} = n_{\text{korr}} \cdot 4u \quad (2b)$$

bestimmt und schließlich durch Einsetzen in (1) die Primärenergie erhält.

c) Umlaufzahl

Zur genauen Bestimmung der Umlaufzahl u , die wir in (2a) gebrauchen, verwenden wir eine einfache lichtelektrische Einrichtung. Auf der einen Seite der Scheibe ist ein kleines Glühlämpchen angebracht. Durch ein größeres, in der Scheibe vorhandenes Loch gelangt bei jeder Umdrehung ein kurzer Lichtblitz in eine auf der gegenüberliegenden Seite montierte Photozelle und erzeugt einen elektrischen Impuls. Dieser wird nach entsprechender Formung und Verstärkung einem Zählgerät zugeführt.

d) Besonderheiten bei der Messung mit Zählrohren verschiedener Art

Die Beziehungen (1) bis (3) führen bei jeder Zählrohrtype unmittelbar zur gesuchten Primärenergie, wenn streng monochromatische Strahlung benützt wird. Wendet man zur Monochromatisierung das Filterdifferenzverfahren an und mißt die Streuung mit dem *Geiger-Müller-Zählrohr*, so sind die mit dem Ni- und Co-Filter bei Gebrauch des Rotators gemessenen Impulse getrennt nach (3) zu korrigieren und die erhaltenen Werte voneinander zu subtrahieren. Auf diese Weise erhält man den monochromatischen Anteil der Primärenergie.

Etwas komplizierter ist die Messung und Auswertung, wenn die Streuung mittels des Proportionalzählrohrs in Verbindung mit einem auf einen engen Kanal eingestellten Impulshöhendiskriminator gemessen wird. In diesem Fall kommt es bei der Koinzidenz zweier K_{α} -Impulse oder eines K_{α} -Impulses mit einem Bremsstrahlimpuls zu einer Addition beider Impulse, der Gesamtimpuls fällt aus dem Kanal heraus, wird

somit unterdrückt, und man hat den monochromatischen bzw. die beiden koinzidierenden monochromatischen Impulse verloren. Diese Fehlerquelle wird auf folgende Weise vermieden. Man entfernt zunächst die obere Kanalgrenze und macht zwei Messungen unter Benützung des Filterdifferenzverfahrens. Die Absorptionskanten befinden sich dann knapp rechts und links von der monochromatischen Linie, und die Differenz der beiden Messungen entspricht dem monochromatischen Anteil allein. Bei jeder der beiden Messungen treten Koinzidenzen auf, die durch Summierung der beiden Impulse zu einem größeren Impuls führen. Da man aber jetzt von einer langwelligen Grenze an alle Impulse mißt, sind bei den Einzelmessungen auch diese Doppelimpulse erfaßt, und es genügt, jede einzelne Messung im Sinne von Beziehung (3) zu korrigieren. Die Differenz muß notwendig auf den monochromatischen Anteil führen, wie er bei jeder Filterdifferenzmessung erhalten wird.

Um eine quantitative Beziehung zur Diskriminatoremessung herzustellen, nimmt man die Streukurve zu Hilfe. Man stellt bei Verwendung eines beliebigen Präparates auf einen passenden Streuwinkel ein und macht eine Vergleichsmessung, indem man die gestreute Intensität einmal wie bei der Rotatormessung mit dem Filterdifferenzverfahren und entfernter oberer Kanalgrenze mißt, das zweite Mal mit der üblichen Diskriminatoreinstellung. Mit dem Quotienten aus den beiden Intensitäten wird der Wert der mit dem Filterdifferenzverfahren ausgeführten Rotatormessung multipliziert. Diesen Korrekturfaktor kann man bei unveränderten Betriebsbedingungen (Spannung) als Konstante betrachten, sofern man stets das gleiche Filterpaar benützt, an der Diskriminatorstellung nichts ändert und auch die Impulsverstärkung durch Zählrohr und nachfolgende Schaltung gleichbleibt. Die letztere Bedingung ist erfahrungsgemäß über sehr lange Zeit erfüllt, so daß nur ab und zu eine Kontrollmessung der oben beschriebenen Art erforderlich ist.

e) Berücksichtigung der relativen Lage der Rotatorebene und der Zählrohrspaltblenden

Es wären keine weiteren Korrekturen erforderlich, wenn die Blendenpaare, die den Zählrohrspalt begrenzen, in einer Ebene lägen, die ihrerseits mit der Rotatorebene zusammenfielen. Die exakte Realisierung dieser Forderung ist aus konstruktiven Gründen nicht möglich, was gewisse leicht verständliche geometrische Korrekturen erfordert. Beträgt der Abstand der Rotatorebene von dem die Längsbegrenzung des Primärstrahls am Röhrenfenster bewirkenden Blendenpaar a , der Abstand der Registrierebene vom gleichen Blendenpaar b , so hat man die Lochfläche mit b/a zu multiplizieren, um sie auf die Registrierebene zu beziehen. Nun beinhaltet jede Absolutmessung die Bestimmung des Verhältnisses einer gestreuten Intensität zur Primärenergie. Die erste Größe ist die

durch die Flächeneinheit in der Registrierebene einfallende Streuung. Tatsächlich wird diese durch zwei verschiedene Schneidenpaare begrenzt. Die Breitenbegrenzung liegt in der Regel in der Registrierebene selbst, so daß keine Korrektur erforderlich ist. Die Längsbegrenzung erfolgt aber bei unserer Anordnung knapp vor dem Zählrohr, also erst hinter der Registrierebene. Beträgt der Abstand des entsprechenden Schneidenpaars vom Schneidenpaar am Röhrenfenster c , so ist die tatsächlich eingestellte Zählrohrspaltlänge mit b/c zu multiplizieren. Das Produkt aus der Breite des Zählrohrspaltes und der korrigierten Länge stellt die wirksame Fläche in der Registrierebene dar. Dividiert man die gemessenen Impulszahlen durch diese Fläche, so erhält man die Streuintensitäten, die ihrerseits mit der Energie pro Längeneinheit des Primärstrahls in Beziehung zu setzen sind.

3. Hinweise auf bisherige Anwendungen des Rotatorverfahrens

Die folgenden Ausführungen sollen keine Diskussion der Ergebnisse darstellen; sie sind lediglich als Beleg für vielfache, zum überwiegenden Teil bereits publizierte Anwendungen des Rotatorverfahrens anzusehen.

Es sind vor allem Molekulargewichtsbestimmungen an Proteinen zu nennen, und zwar an Edestin⁸, *Bence-Jones*-Protein⁹, Tabakmosaikvirus-Protein¹⁰, Ferritin¹¹ und γ -Globulin¹². Das Molekül des letztgenannten Proteins ist langgestreckt; daher konnte aus der Absolutmessung außer dem Molekulargewicht auch die Masse pro Längeneinheit bestimmt werden. Daß das Verfahren auch herunter bis zu Molekulargewichten von etwa 2000 anwendbar ist, haben die Studien des Assoziationsverhaltens am Farbstoff All-4-Kupfer-Phthalocyanin-tetrasulfonsaures Natrium in verdünnter Lösung (mit oder ohne Salzzusatz) gezeigt¹³.

⁸ Die ersten Molekulargewichtsbestimmungen an gelösten Proteinen mittels der Absolutintensität sind die an α_2 -Globulin (O. Kratky und W. Kreutz, Z. Elektrochem. **64**, 880 (1960)) und am Edestin (J. C. Cleeman und O. Kratky, Z. Naturforsch. **15 b**, 525 [1960]). Die erste Messung wurde mit einem photographischen Verfahren durchgeführt, bei der zweiten hat bereits das Rotatorverfahren Anwendung gefunden. Später haben auch Luzzati et al. Absolutmessungen, und zwar unter Verwendung eines Filterschwächungsverfahrens, durchgeführt, und zwar am Lysozym (V. Luzzati, H. Witz und A. Nicolaijeff, J. Molec. Biol. **3**, 367 [1961]) und am Rinderserumalbumin (V. Luzzati, H. Witz und A. Nicolaijeff, J. Molec. Biol. **3**, 379 [1961]).

⁹ H. Holasek, O. Kratky, P. Mittelbach und H. Wawra, J. Molec. Biol., in Druck; Biochim. Biophys. Acta, in Druck.

¹⁰ F. A. Anderer, R. Lö und O. Kratky, in Vorbereitung.

¹¹ H. J. Bielig, O. Kratky, S. Steiner und H. Wawra, Mh. Chem. **94**, 989 (1963) (Dezemberheft).

¹² O. Kratky, I. Pilz, P. J. Schmitz und R. Oberdorfer, Z. Naturforsch. **18 b**, 180 (1963).

¹³ O. Kratky, P. Mittelbach, H. Wawra und P. J. Schmitz, in Vorbereitung.

Die ersten Bestimmungen der Masse pro Längeneinheit sind an Cellulosenitratlösungen im Rahmen einer gesamten Kleinwinkelanalyse durchgeführt worden¹⁴. An Desoxyribonukleinsäure ergaben die Absolutmessungen eine mit dem *Crick—Watson*-Modell übereinstimmende Masse pro Längeneinheit¹⁵. Bei der Bildung einer Komplexverbindung mit Actinomycin kann aus der mittels der Absolutintensität gemessenen Massenzunahme pro Längeneinheit das Molverhältnis der beiden Partner festgestellt werden¹⁶.

Bei micellaren Systemen ließ sich nach entsprechender Auflockerung die Masse pro Längeneinheit der stäbchenförmigen übermolekularen Teilchen ermitteln, wie Messungen an regenerierter Cellulose¹⁷ gezeigt haben. Auch der Absolutwert der Invariante wurde in diesem Fall (teilweise durch Messungen bis zu Streuwinkeln von 35°, *Braggschen* Werten von etwa 9000 Å entsprechend) bestimmt und zur Ermittlung des „Clusteranteils“ verwertet. Aus der Invariante im absoluten Maß von Polyäthylen¹⁸ wurde der kristalline und amorphe Anteil berechnet.

¹⁴ Mit dem photographischen Verfahren: *O. Kratky* und *H. Sembach*, Makromol. Chem. **18/19**, 463 (1956); *O. Kratky* und *R. Breiner*, Makromol. Chem. **25**, 134 (1958); mit dem Rotatorverfahren: *S. Heine*, *O. Kratky*, *G. Porod* und *P. J. Schmitz*, Makromol. Chem. **44/46**, 682 (1961).

¹⁵ *R. Lo*, Dissertation Graz, Jänner 1962. Diese Messungen erstrecken sich bis zu besonders kleinen Konzentrationen (0,1%). Als diese Untersuchung bereits abgeschlossen war, erschien die Arbeit von *V. Luzzati*, *A. Nicolaieff* und *F. Mason*, J. Molec. Biol. **3**, 185 (1961), worin ebenfalls über Absolutmessungen mittels der Filterschwächungsmethode an der gleichen Substanz berichtet wird.

¹⁶ *O. Kratky*, *W. Müller* und *H. Wawra*, in Vorbereitung.

¹⁷ *O. Kratky* und *G. Miholic*, Mh. Chem. **94**, 151 (1963); J. Polymer. Sci., **C2**, 449 (1963).

¹⁸ *O. Kratky* und *K. Schwarzkopf-Schier*, Mh. Chem. **94**, 714 (1963).