

# Analytische Ultrazentrifugation - Übersicht

Kristian Schilling  
Nanolytics GmbH

## Inhaltsverzeichnis

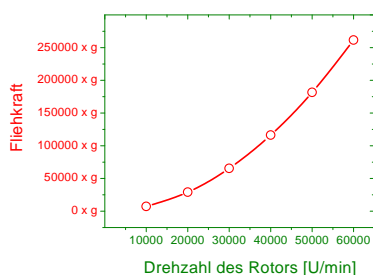
<b>1 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)</b>	<b>2</b>
<b>2 Prinzip der AUZ</b>	<b>3</b>
<b>3 Die AUZ - ein vielseitiges Instrument</b>	<b>5</b>
<b>4 Mit der AUZ zugängliche Eigenschaften</b>	<b>6</b>
4.1 Die Primäraussage: Sedimentationsgeschwindigkeit . . . . .	7
4.2 Teilchengrößen . . . . .	7
4.3 Teilchendichten und -verteilungen . . . . .	8
4.4 Molmassen und Molmassenverteilungen . . . . .	8
4.5 Teilchenform und Teilchenquellung . . . . .	9
4.6 Wechselwirkungen . . . . .	10
4.7 Diffusion . . . . .	10
4.8 ... und vieles mehr . . . . .	11
<b>5 Kombination mit anderen Methoden</b>	<b>12</b>
<b>6 AUZ als Auftragsmessung</b>	<b>14</b>
<b>7 Unsere Kompetenz</b>	<b>15</b>
<b>8 Kontakt</b>	<b>16</b>

## 1 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

### Mächtiges Werkzeug der Kolloid- und Polymeranalytik

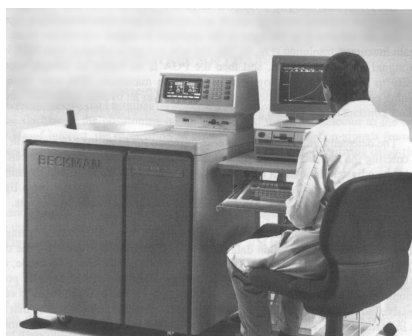
Seit mehr als 70 Jahren leistet die Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) unschätzbare Dienste in der Biochemie und in den Kolloidwissenschaften. Das Anwendungsfeld der AUZ in Chemie, Biochemie und Pharmazie ist breit gestreut: die Methode gestattet u. a. die Bestimmung von Molmassen, Molmassenverteilungen, Teilchengrößenverteilungen und Teilchendichteverteilungen.

Untersucht werden können Partikel, Knäuel, Mizellen - letztlich alle dispergierten oder gelösten Teilchen beliebiger Art, die im Schwerfeld sedimentieren oder flotieren.



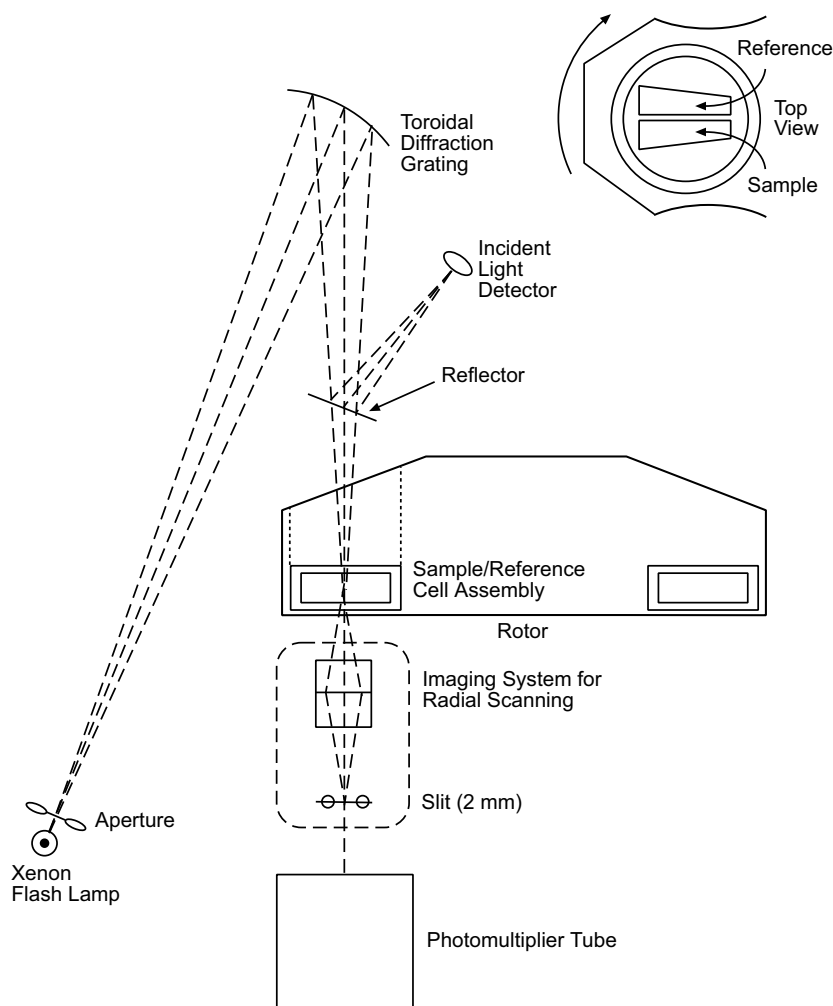
Bei einer maximalen Drehzahl von 60000 U/min entwickelt die Analytische Ultrazentrifuge ein Schwerfeld, das dem 260000fachen der Erdbeschleunigung entspricht. Unter dem Einfluß dieses Feldes werden nahezu beliebige Partikel zum Sedimentieren oder Flotieren gezwungen. Dieser Vorgang wird optisch detektiert und interpretiert.

Wir verwenden ein modernstes Gerät des marktführenden Herstellers Beckman Coulter, eine Optima XL-A/XL-I. Sie ist mit zwei optischen Systemen zur Detektion ausgestattet und repräsentiert den höchsten, derzeit verfügbaren Stand der Technik. Die radiale Auflösung beträgt 0.01 mm, die des Monochromators 1 nm. Der Rotor ist von 0 bis 40°C temperierbar.



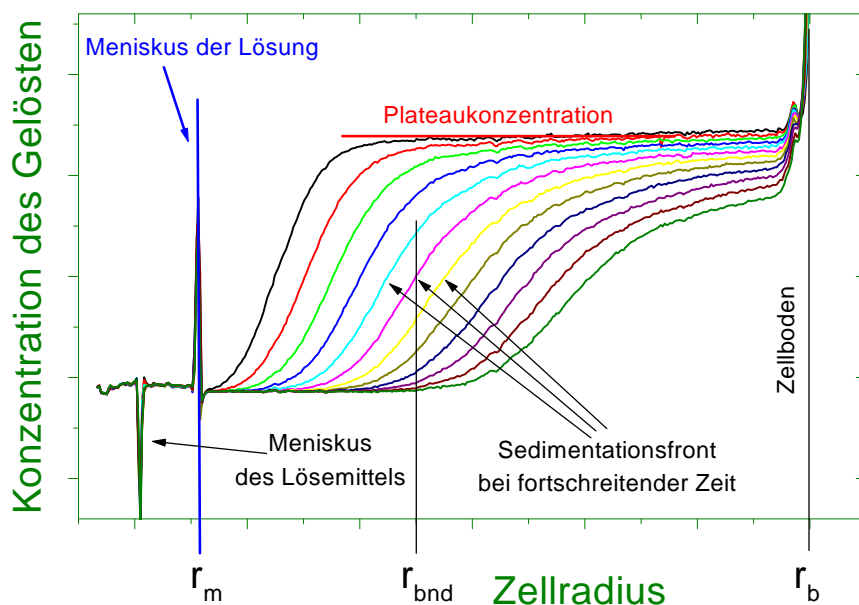
## 2 Prinzip der AUZ

Die Analytische Ultrazentrifugation besteht durch die Anschaulichkeit ihres Meßprinzips: So wie eine große Kugel im Wasser schneller zu Boden sinkt als eine kleinere, eine Stahlkugel schneller als eine ebenso große aus Aluminium, eine Kugel schneller als ein Stäbchen oder Knäuel gleicher Masse, so fraktioniert die AUZ nach Teilchengröße, Teilchendichte und Form.



Während der Sedimentation wird die Meßzelle parallel zur Rotationsachse von optischen Systemen durchstrahlt. Unsere Anlage ist mit einer Absorptionsoptik und einer Rayleigh-Interferenzoptik ausgestattet, wodurch eine große Bandbreite an Partikeln detektierbar wird. Man erhält ein ortsaufgelöstes Konzentrationsprofil über den radialen Verlauf der Meßzelle; diese Messung wird während des Experiments wiederholt, wodurch auch ei-

ne zeitaufgelöste Information erhalten wird. Unterschiedliche Komponenten fraktionieren im Verlauf der Sedimentation. Die Konzentrationsprofile werden hinsichtlich der gewünschten Information ausgewertet.



Das Bild zeigt orts aufgelöste Konzentrationsprofile innerhalb der Meßzelle, wie sie von den optischen Systemen der AUZ detektiert werden. Vom Meniskus her verarmt die Lösung an Partikeln; am Zellboden reichern sie sich an. An der sogenannten Sedimentationsfront steigt die Konzentration an Partikeln stark an.

Im zeitlichen Verlauf der Sedimentation wandert die Sedimentationsfront zum Zellboden; aus der Geschwindigkeit dieser Wanderung sind Partikeleigenschaften zugänglich. Bei Anwesenheit mehrerer Partikelsorten werden ebenso viele Sedimentationsfronten beobachtet.

Außer der Sedimentation sind die Teilchen auch der Diffusion ausgesetzt. Mit der Anreicherung des Materials am Zellboden wird diese Rückdiffusion stärker, so daß sich am Ende des Experiments ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion ausbildet. Dieses sogenannte Sedimentations-Diffusions-Gleichgewicht bietet eigene Auswertungsmöglichkeiten, da hier keine Transportprozesse mehr stattfinden. Oft werden jedoch schon aus dem Verlauf des Sedimentationsprozesses die gewünschten Informationen erhalten.

### 3 Die AUZ - ein vielseitiges Instrument

Die AUZ ist eine Absolutmethode und erfordert keine Kalibrierung. Es treten keine Wechselwirkungen mit einer stationären Phase auf. Nahezu beliebige Lösemittel sind einsetzbar. Die benötigten Probenmengen sind sehr klein, was den Einsatz insbesondere in der Biochemie attraktiv macht. Auch das Lösemittel wird nur in kleinen Mengen benötigt.

Allein eine Aufzählung der Basisexperimente verdeutlicht die vielseitige Einsetzbarkeit der AUZ:

- Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment
- Sedimentationsgleichgewichtsexperiment
- Dichtegradient
- Überschichtungsexperiment

Dazu existieren Varianten zu allen Basisexperimenten, die je nach Fragestellung zum Einsatz kommen.

Die Ausstattung mit zwei optischen Systemen macht eine große Bandbreite an Partikeln detektierbar. Wenn hier von Partikeln die Rede ist: bedenken Sie, daß auf nanoskopischer Skala die Begriffe der Lösung und der Dispersion nahe beieinander liegen. . . Molmassen von wenigen Tausend bis zu etlichen Millionen können auf der AUZ untersucht werden.

Auch organische Lösemittel, saure oder basische Systeme, hochviskose Proben stellen kein prinzipielles Problem dar. Die Zellenkörper lassen wir eigens aus Titan herstellen; die Küvettenfenster bestehen aus Saphir. Wechselwirkungen mit einer stationären Phase treten im durchstrahlten Bereich nicht auf.

Dennoch kann die Methode an bestimmten Systemen scheitern, das kann man vorher nicht immer wissen. Um das Risiko für Sie zu minimieren, bieten wir Ihnen einen besonders preisgünstigen Probelauf an, um festzustellen, ob Ihre Partikel mit unseren Systemen detektierbar sind. Die Kosten hierfür rechnen wir Ihnen bei einer späteren Verwendung der Meßergebnisse an.

## 4 Mit der AUZ zugängliche Eigenschaften

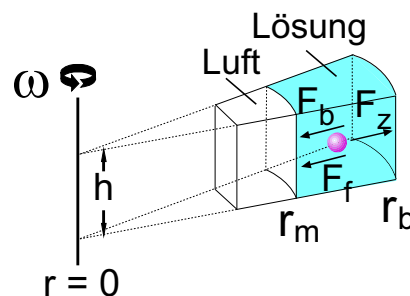
In der Analytischen Ultrazentrifuge finden zwei Transportprozesse statt: **Sedimentation** und **Diffusion**. Die Sedimentation wird durch die Partikeldichte und die Partikelreibung bestimmt. Die Diffusion hingegen ist von der Partikeldichte unabhängig. Die relevanten Partikeleigenschaften sind also die Dichte, das Reibungskoeffizientenverhältnis und die Masse.

Alle Prozesse in der Analytischen Ultrazentrifuge beschreibt die bereits seit 1929 bekannte LAMMSche Differentialgleichung:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[ r \cdot D \frac{\partial c}{\partial r} - s \omega^2 r^2 c \right] \quad (1)$$

Diese ist nicht geschlossen lösbar, stellt jedoch die Basis für alle weiteren Auswertungsverfahren dar. In ihr sind die oben erwähnten Transportgrößen in Form der Sedimentationskonstanten  $s$  und der Diffusionskonstanten  $D$  enthalten.  $r$  ist eine Ortskoordinate, die Entfernung von der Rotationsachse.

Ein Partikel im Sedimentationsfeld unterliegt drei Kräften: der Fliehkraft, dem Auftrieb und der Reibung. Während die Fliehkraft von Partikeleigenschaften unabhängig ist, wird der Auftrieb von Volumen und Dichte des Partikels bestimmt. Die Reibung wiederum hängt von Größe und Form des Partikels ab. Dieser Variablensatz beschreibt also die gerichtete Bewegung eines Partikels im Sedimentationsfeld.



Die Verknüpfung der Transportgrößen  $s$  und  $D$  mit den Partikeleigenschaften Masse und Dichte erfolgt anhand der SVEDBERG-Gleichung:

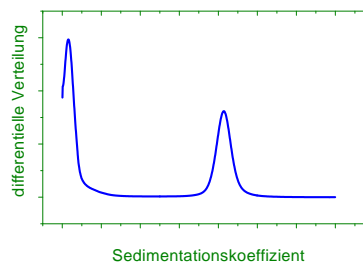
$$M = \frac{s R T}{D (1 - \bar{v} \rho)} \quad (2)$$

Dabei sind die Reibungseigenschaften des Partikels im Diffusionskoeffizienten enthalten. Die SVEDBERG-Gleichung stellt die Grundlage für die meisten Auswertungen von AUZ-Experimenten dar.

## 4.1 Die Primäraussage: Sedimentationsgeschwindigkeit

Beim Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wird eine Konzentrationsverteilung innerhalb der Meßzelle registriert, die direkt und ohne weitere Annahmen in eine Sedimentationskoeffizientenverteilung ( $s$ -Verteilung) umgerechnet werden kann.

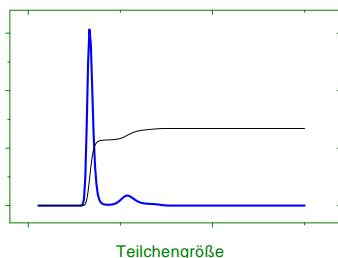
Der Sedimentationskoeffizient sagt aus, wie schnell das Partikel im Einheitsfeld um eine bestimmte Wegstrecke sedimentiert. Es handelt sich um die primäre Meßgröße; es wird nicht interpretiert, aufgrund welcher Partikeleigenschaften die Sedimentation mit dieser Geschwindigkeit erfolgt.



Die Sedimentationskoeffizientenverteilung liefert bereits eine Fülle an Informationen: so sind u. a. Anzahl und Konzentration der Komponenten, Homogenität der Probe, Aggregate und Verteilungsbreiten zugänglich. Für die Lösung eines analytischen Problems reichen diese Ergebnisse oftmals schon aus.

## 4.2 Teilchengrößen

Eine der wichtigsten Kenngrößen in den Kolloidwissenschaften ist die Teilchengrößenverteilung (TGV), die man direkt aus der  $s$ -Verteilung errechnen kann.



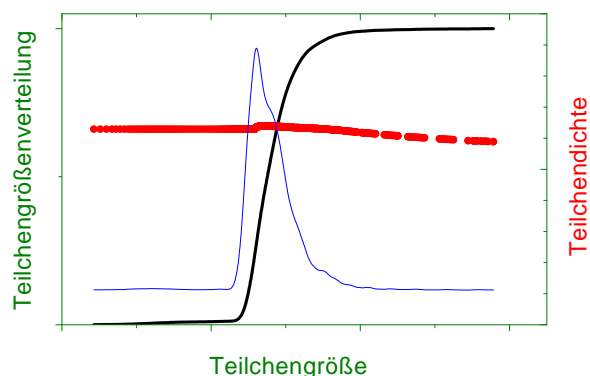
Hierzu muß die Partikeldichte bekannt sein. Ist dies nicht der Fall, so kann sie anhand der Dichteveriationsmethode mit der AUZ oder mit einer unabhängigen Methode bestimmt werden. Besonders unkompliziert ist diese Auswertung für globuläre und nicht gequollene Partikel. Ansonsten sind zusätzliche Annahmen bzw. Informationen erforderlich.

Selbst kleinste Kolloide können in Ångström- Auflösung charakterisiert werden.

### 4.3 Teilchendichten und -verteilungen

Auch bei uneinheitlicher Partikeldichte oder ohne Kenntnis derselben lassen sich Teilchengrößenverteilungen berechnen. Dabei wird zusätzlich eine Dichteverteilung über alle detektierten Partikel erhalten. Hierzu wird das Verfahren der Dichtevariation eingesetzt, bei dem die zu untersuchenden Partikel in zwei Lösemitteln unterschiedlicher Dichte sedimentieren.

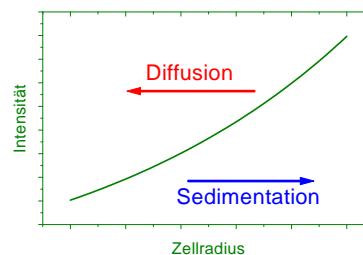
Das Verfahren existiert sowohl für Sedimentationsgleichgewichtsexperimente als auch für Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente. Im ersten Fall werden Gewichtsmittel für die Dichte und die Molmasse erhalten, das zweite Experiment ermöglicht das simultane Bestimmen einer Teilchendichte- und einer Teilchengrößenverteilung.



### 4.4 Molmassen und Molmassenverteilungen

Die Bestimmung von Molmassen ist eine klassische Anwendung der AUZ. Hierzu existieren zwei Varianten: das Sedimentationsgleichgewicht liefert gewichtsgemittelte Molmassen, die Sedimentationsgeschwindigkeit ergibt Molmassenverteilungen.

Das Sedimentationsgleichgewicht stellt sich ein, wenn die Rückdiffusion vom Zellboden und die Sedimentation zum Zellboden hin sich in einem stationären Zustand ausgleichen. Dann finden keine Transportprozesse mehr statt, und die Molmasse wird *unabhängig von Sedimentations- und Diffusionskonstante* erhalten.



Daher ist diese Bestimmungsmethode sehr genau, der Fehler liegt unter 3%. Allerdings kann diese Genauigkeit auch mit Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten erreicht werden. Das Gleichgewicht ist besonders für sehr kleine Teilchen geeignet, die rasch diffundieren, so daß sich das Gleichgewicht

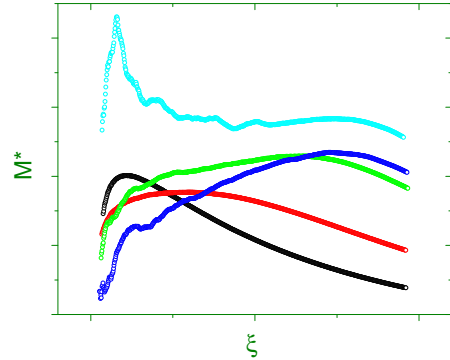


schnell einstellt.

Da sich im Gleichgewichtsprofil mehrere Spezies überlagern können, sind zur Anpassung meist Annahmen erforderlich, z. B. hinsichtlich der Anzahl und relativen Konzentration der Spezies.

Wir verwenden daher zur Auswertung vorzugsweise die modellunabhängige  $M^*$ -Funktion, aus der geeignete Modelle abgeleitet werden können, ohne daß zu unsichere Annahmen über die Natur des Systems zur Auswertung erforderlich sind.

Im Sedimentationsgleichgewicht müssen stets Konzentrationsreihen untersucht werden. Dabei wird auch der Zweite Osmotische Virialkoeffizient erhalten.



Aus dem *Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment* werden ganze *Molmassenverteilungen* erhalten. Dazu muß jedoch für jede Spezies deren Dichte und Reibungskoeffizientenverhältnis bekannt sein.

## 4.5 Teilchenform und Teilchenquellung

Die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Teilchens bietet einen Zugang zu dessen Reibungseigenschaften, die durch das Reibungskoeffizientenverhältnis  $f/f_0$  beschrieben werden. Aus Meßgrößen der AUZ berechnet sich dieses nach

$$\frac{f}{f_0} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho_0)}{N_A \cdot 6\pi\eta_0 s_{20,w}^2} \cdot \sqrt[3]{\frac{4\pi N_A}{3\bar{v}M}} \quad (3)$$

Für eine kompakte Kugel ist  $f/f_0$  Eins; für nichtglobuläre Partikel kann anhand des Reibungskoeffizientenverhältnisses das Achsenverhältnis eines Ellipsoides berechnet werden, wenn die Molmasse bekannt ist. So kann ein derartiges Partikel durch Kombination von Sedimentationsgeschwindigkeit und -gleichgewicht charakterisiert werden.

Auch für gequollene Partikel ist  $f/f_0$  größer als Eins, so daß auf diese Weise der Hydratationsgrad berechnet werden kann. Je komplexer das Partikel, um so größer ist der Bedarf an Informationen zu einer vollständigen Charakterisierung. Die verschiedenen Meßverfahren der AUZ und die Kombination mit

anderen Methoden bieten zahlreiche Optionen, einen vollständigen Variablenatz zu erhalten und auch komplexe Partikel umfassend zu beschreiben.

## 4.6 Wechselwirkungen

Interpartikuläre Wechselwirkungen äußern sich in der AUZ

- in der Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten ( $k_s$ , Sedimentationsgeschwindigkeit),
- in der Konzentrationsabhängigkeit der apparenten Molmasse ( $A_2$ , Sedimentationsgleichgewicht).

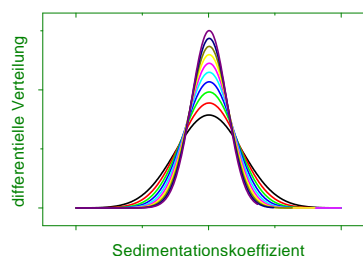
Durch Aufnehmen von Konzentrationsreihen werden wertvolle Informationen über die Wechselwirkungen gewonnen. Die erhaltenen Parameter lassen sich auch mit einschlägigen Parametern anderer Methoden kombinieren.

Auch Dissoziationskonstanten aggregierender Systeme sind auf diese Weise zugänglich.

## 4.7 Diffusion

Wie die LAMMSche Differentialgleichung zeigt, treten die Transportprozesse der Sedimentation und der Diffusion immer gekoppelt auf. Häufig ist die Diffusion ein störendes Phänomen, da sie zu einer Verbreiterung der gemessenen Verteilungen führt. Ihr Einfluß kann durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen und durch spezielle Auswertungsverfahren unterdrückt werden.

Mit der Laufzeit eines Experiments tritt der Einfluß der Diffusion gegenüber dem der Sedimentation immer weiter zurück, da beiden unterschiedliche Zeitgesetze zugrunde liegen. Durch geeignete Auswertungsverfahren können die beiden Vorgänge separiert werden. Andere Verfahren beziehen  $D$  in die Auswertung anhand globaler Anpassungen ein, die alle Partikeleigenschaften gleichzeitig berücksichtigen.



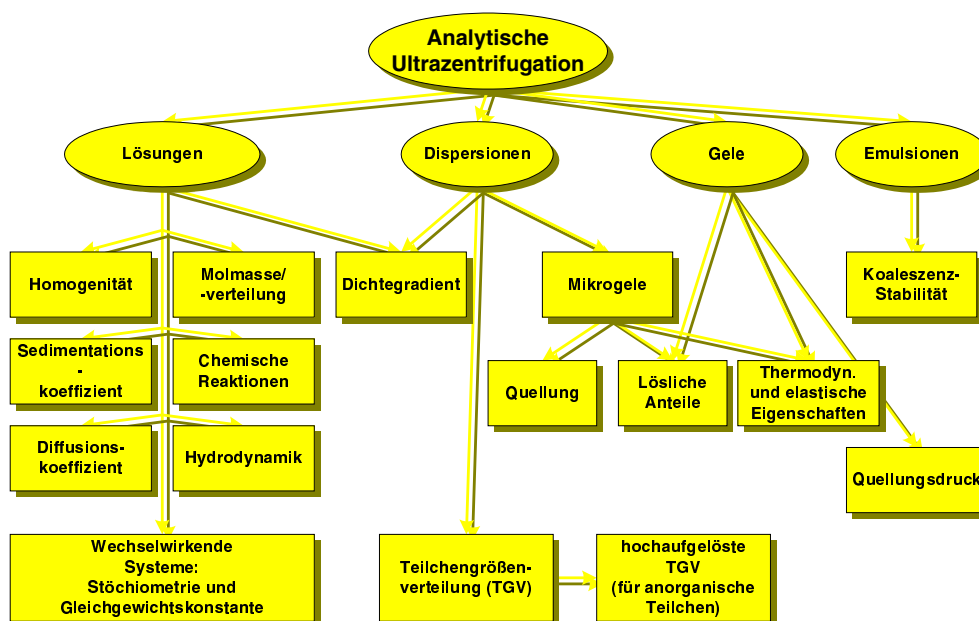
Wenn auch Diffusionskoeffizienten anhand der Dynamischen Lichtstreuung oder der Feldflußfraktionierung mit geringerem Aufwand bestimmt werden können, gibt es Fälle, bei denen die AUZ auch heute noch zur Messung von  $D$  herangezogen wird.

### 4.8 ... und vieles mehr

Der versatile Einsatz der AUZ bedingt, daß weit mehr Fragestellungen bearbeitet werden können als die zuvor genannten. So läßt sich die AUZ als Druckgenerator nutzen, um Emulsionen unter hohen Drücken zu entmischen und damit Stabilitäten wesentlich schneller zu bestimmen als nach herkömmlichen Verfahren. Ebenso kann die Entquellung von Gelen erzwungen und thermodynamisch ausgewertet werden.

Auch die optischen Systeme der AUZ können sehr variabel eingesetzt werden. So können verschiedene Spezies mit unterschiedlichem Absorptions- oder Refraktionsverhalten in ein und demselben Experiment getrennt registriert werden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, während der Fraktionierung Wellenlängenspektren einzelner Spezies aufzunehmen. Der Fantasie des Experimentators bietet die AUZ viel Raum.



## 5 Kombination mit anderen Methoden

Bei komplexen Systemen kann keine Methode allein eine vollständige Beschreibung liefern. Auch die AUZ ist keine Wunderwaffe. Ob aus Notwendigkeit oder zur Ergänzung - Kombinationen mit anderen analytischen Methoden liefern weit mehr Informationen über Ihr System als beide Methoden zusammen.

Aus diesem Grunde betreiben wir - in eigener Regie oder in Kooperation mit Forschungsinstituten - unter anderem auch folgende Methoden:

- Transmissions-Elektronenmikroskopie
- Viskosimetrie
- Densimetrie
- Rheologie
- Feldflußfraktionierung
- Dynamische Lichtstreuung auf hohem Standard

Besonders ergiebig ist die Kombination mit der Viskosimetrie. So können anhand hydrodynamischer Formfunktionen die Achsenverhältnisse nichtglobulärer Partikel bestimmt werden. Als Beispiele seien die Funktionen  $\nu$ ,  $P$  und  $R$  genannt:

$$\nu = \frac{[\eta]}{v_s} \quad (4)$$

$$P = \frac{M(1 - \bar{v}\rho_0)}{N_A \cdot 6\pi\eta_0 s_{20,w}^0} \cdot \sqrt[3]{\frac{4\pi N_A}{3\bar{v}M}} \cdot \sqrt[3]{\frac{1}{\frac{w}{\bar{v}\rho} + 1}} \quad (5)$$

$$R = \frac{k_s}{[\eta]} \approx \frac{2(1 + P^3)}{\nu}, \quad (6)$$

Diese Funktionen nehmen für bestimmte Achsenverhältnisse definierte Werte an. Der verwendete Variablensatz ist vollständig aus der AUZ zugänglich, außerdem wird die intrinsische Viskosität  $[\eta]$  aus der Viskosimetrie verwendet. Weiterhin tritt das mittlere partielle spezifische Volumen eines gequollenen Partikels  $v_s$  bzw. die Hydratisierung  $w$  auf. Für ein nicht gequollenes

Partikel ist dieser Parameter gleich  $\bar{v}$ , dem partiellen spezifischen Volumen. Für gequollene Partikel kann dieser Parameter eingesetzt werden, oder man verwendet hydratisierungsunabhängige Funktionen wie die Berechnung der Molmasse nach LAVRENKO oder die  $\Pi$ -Funktion:

$$M = N_A \cdot \sqrt{\left(\frac{6\pi\eta s}{1 - \bar{v}\rho}\right)^3} \cdot \sqrt{\frac{3k'[\eta]\bar{v}}{4\pi k_s} \left(\frac{k_s}{2\bar{v}} - \frac{k'[\eta]}{k_s}\right)}; \quad \frac{v_s}{\bar{v}} = \frac{k'[\eta]}{k_s}, \quad (7)$$

$$\Pi \approx \frac{2A_2 M}{[\eta]}, \quad (8)$$

die andere Parameter verwenden, um den Variablensatz zu vervollständigen. So kann die Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentation  $k_s$  oder der Zweite Osmotische Virialkoeffizient  $A_2$  ebenfalls mit geeigneten AUZ-Experimenten bestimmt werden.

Es existieren also beliebig viele Möglichkeiten, durch Kombination der AUZ mit der Viskosimetrie auch komplexe Partikel umfassend zu charakterisieren. Natürlich eignen sich auch andere Methoden zur Kombination. Je nach gewünschten oder bereits vorhandenen Informationen über Ihr System - wir beraten Sie in der Auswahl geeigneter Experimente und führen die nötigen Auswertungen für Sie durch.

## 6 AUZ als Auftragsmessung

**Eine Analytische Ultrazentrifuge ist teuer. Ihr Einsatz lohnt sich nur bei hohem Probenaufkommen. Wir bündeln die Nachfrage nach der Methode und bieten Ihnen Messungen zu einem erschwinglichen Preis. So erhalten Sie eine mächtige Methode weit günstiger, als wenn Sie sie in eigener Regie betreiben würden.**

Darüber hinaus bieten wir Ihnen unsere Expertise hinsichtlich der Versuchsführung und der Auswahl geeigneter Experimente. Auch die Ergebnisse weisen Interpretationsbedarf auf; dabei profitieren Sie von unseren Erfahrungen. Die AUZ ist keine plug'n play-Methode, bei der standardisierte Software die Auswertung übernimmt.

Die Meßergebnisse erhalten Sie in Form übersichtlicher Plots und - wenn gewünscht - auch in maschinenlesbarer Form zur weiteren Verarbeitung.

Wir erarbeiten Ihnen aus unseren Ergebnissen Trennungsvorschriften, wenn Sie die Zentrifugation zur präparativen Trennung nutzen wollen.

Wenn Widersprüche zu Ihren Erwartungen auftreten - wir stehen dazu. Wir schwindeln nicht. Was wir messen, das geben wir Ihnen auch. Ihre Messungen und Ergebnisse werden vertraulich behandelt; wir sind unabhängig und gehören keinem Ihrer Mitbewerber.

## 7 Unsere Kompetenz

**Nanolytics ist eingebunden in das Kompetenzzentrum Nanotechnologie. Darüber hinaus unterhalten wir Kooperationen mit anderen, meist kleineren Unternehmen der Kolloid- und Polymeranalytik und öffentlichen Forschungseinrichtungen; vernetzte Kompetenz, von der Sie profitieren, wenn Sie es wünschen.**

Der Firmengründer hat am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung promoviert. In seiner Dissertation hat er sich auf die AUZ spezialisiert und die Methoden der Dichtevariation und der Diffusionsverbreiterung weiterentwickelt.

Wir betreiben weiterhin Grundlagenforschung, um Ihnen das Potenzial der Methode noch weiter zu erschließen und wachsen auch an den vielseitigen Fragestellungen unserer Kunden. Also: immer her damit!

## 8 Kontakt

Nanolytics

Gesellschaft für Kolloidanalytik mbH

Am Mühlenberg 11

14476 Potsdam

Tel. 0331 5818 360

Fax 0331 5818 361

E-Mail: [info@nanolytics.de](mailto:info@nanolytics.de)

[www.nanolytics.de](http://www.nanolytics.de)

Diese Einführung können Sie sich von unserer Website im PDF-Format herunterladen: <http://nanolytics.de/pdf/de/AUZ-Einfuehrung.pdf>