

Untersuchung der Polydispersität von Huminstoffsystemen durch analytische Ultrazentrifugation und Gelchromatographie

EGBERT RIETZ

Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. Flaig in Verehrung gewidmet

Einleitung

Die analytische Ultrazentrifugation zur Bestimmung von Molekulargewichten und Teilchengewichtsverteilungen ist für die Untersuchung von natürlichen Biopolymeren, wie z. B. von Proteinen, Nukleinsäuren, Virus- und Zellbestandteilen zu einer bedeutenden Meßmethode geworden. In einigen Fällen wurden mit ihrer Hilfe sogar zuvor unbekannte Biopolymere entdeckt und isoliert.

Bisherige Anwendungen der Ultrazentrifugenmethoden zur Verfolgung des Sedimentationsverlaufs von hoch- und niedermolekularen organischen Bodensubstanzen, waren vor allem bei schlierenoptischen Meßverfahren durch die Eigenfärbung der isolierten Substanzen erheblich eingeschränkt. Aus diesem Grunde konnte in früheren Arbeiten (Beutelspacher, 1950; Cameron und Posner, 1974; Cameron et al., 1972; Flaig und Beutelspacher, 1968; Piret et al., 1960; Posner und Creeth, 1972; Robachuk und Maksimov, 1972; Rochus, 1979, 1981; Scheffer et al., 1958; Sipos et al., 1972, 1977) mit dieser Methode lediglich der hochpolymere Charakter der Huminstoffe, nicht jedoch der jeweilige Grad ihrer Polydispersität nachgewiesen werden, wie er sich durch verschiedene andere Fraktionierungsverfahren, so z. B. bei der Elektrophorese, Ultrafiltration oder Gelchromatographie erkennen läßt (Zusammenf. in: Flaig et al., 1975; Hayes und Swift, 1978; Schnitzer und Khan, 1972, 1978).

Mit dieser Arbeit soll gezeigt werden, daß extrahierte organische Bodensubstanzen durch absorptionsphotometrische Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit im Schwerfeld der Ultrazentrifuge, direkt als polydisperses System fraktioniert und charakterisiert werden können (Rietz, 1979). Eine automatische Meßwerterfassung und computerunterstützte Datenauswertung vereinfacht dabei das Analyseverfahren.

1 Material und Methoden

1.1 Prinzip der Methode

Durch Ultrazentrifugation bei Drehzahlen von 60.000 Upm werden kolloidal gelöste hochmolekulare Teilchen mit einer ihrem Molekulargewicht entsprechenden Sedimentationsgeschwindigkeit bei 290.000-facher Erdbeschleunigung vom Rotationszentrum weg in Richtung Zellenbo-

den bewegt. Dadurch lassen sich Polymergemische mit unterschiedlichen Molekulargewichtsanteilen und verschiedenen Teilchengrößen infolge ihrer unterschiedlichen Sedimentationsraten vom Lösungsmittel trennen und in Fraktionen zerlegen. Die Sedimentationsgeschwindigkeit wächst mit dem Molekulargewicht und der Teilchengröße und wird weiterhin durch die Viskosität des Lösungsmittels und die Teilchenform beeinflusst.

Rüstet man nach Svedberg und Pedersen (1940, 1960) eine analytische Ultrazentrifuge mit einer lichtdurchlässigen Meßzelle und einer zur Absorptionsmessung geeigneten optischen Meßeinrichtung aus, dann lassen sich bei gefärbten Polymerlösungen die während des Sedimentationslaufes auftretenden Konzentrationsstufen als charakteristisch wandernde S-Kurven der Lichtabsorption messen und daraus die Sedimentationskoeffizienten errechnen.

Gegenüber der schlierenoptischen Methode, bei der die in differentieller Form als Peaks dargestellten Brechungsindexunterschiede als Konzentrationsänderungen während der Sedimentation gemessen werden, können durch Anwendung der Absorptionsphotometrie auch stärker verdünnte Lösungen noch ausreichend genau analysiert werden. Bei bekanntem Abstand r des Teilchenmaximums vom Rotationszentrum und der durch die Rotationsgeschwindigkeit definierten Zentrifugalkraft $\omega^2 \cdot r$ gilt dann für den Sedimentationskoeffizienten s_{20} unter Standardbedingungen (20 °C):

$$s_{20} = \frac{1}{\omega^2 \cdot r} \cdot \frac{dr}{dt} \quad (1)$$

mit der radialen Geschwindigkeit dr/dt . Der Sedimentationskoeffizient wird allgemein als Vielfaches der Einheit $10E-13$ sec ausgedrückt, die man auch als Svedberg-Einheit (S) bezeichnet. Bei bekanntem Diffusionskoeffizienten D , partiellem spezifischem Volumen V^* und der Dichte ρ_L des Lösungsmittels errechnet sich unter Berücksichtigung des Sedimentationskoeffizienten s das Molekulargewicht nach der Gleichung:

$$M = \frac{R \cdot T}{(1 - V^* \cdot \rho_L)} \cdot \frac{s}{D} \quad (2)$$

R = allgemeine Gaskonstante
 $= 8,3166 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$
 T = Temperatur K

Bei Relativmessungen genügt als charakteristische Kenngröße für das Sedimentationsverhalten der hochmolekularen Verbindungen in den meisten Fällen die Angabe der Sedimentationskoeffizienten.

1.2 Meßanordnung und Auswertung

Für die Messung der Sedimentationseigenschaften gefärbter organischer Bodenextrakte wurde eine kommerzielle präparative Ultrazentrifuge (Omega II, Heraeus-Christ, Osterode) durch einen analytischen Zusatz in Form einer absorptionsphotometrischen Abtasteinrichtung modifiziert.

Danksagung

Der Verfasser dankt Herrn Prof. Dr. Horst Söchtig für seine Anregung zu dieser Untersuchung und die Ausführung der gelchromatographischen Fraktionierung sowie Herrn Prof. Dr. Dieter Sauerbeck für wertvolle Diskussionsbeiträge. Herrn Karl-Heinz Pracejus und Herrn Reiner Schulze gebührt Dank für die zuverlässige Durchführung der Versuche und die Hilfe bei der Auswertung.

Die Sedimentationsläufe wurden bei konstanter Drehzahl von 60.000 Upm (290.000 g) durchgeführt. Mit Hilfe einer speziellen Quarzoptik wird hierbei die Meßzelle auf eine Bildebene projiziert und durch einen dahinter angebrachten beweglichen Spalt mit einem Photomultiplier horizontal abgetastet (Abb. 1). Die im Photomultiplier als Folge der Konzentrationsunterschiede in der Meßzelle auftretenden Intensitätsänderungen der UV-Strahlung werden verstärkt und entweder direkt auf Kurvenschreibern registriert, oder zur späteren Auswertung auf Magnetplatte im Computer (Abb. 1(1)) oder auf Tonband (Abb. 1(2), (3)) zwischengespeichert.

Die Auswertung der digitalisierten Meßkurven zur Bestimmung der Meßzellenparameter und der Geschwindigkeitskoordinaten der einzelnen Fraktionen erfolgte computergestützt durch direkte Vermessung auf einem Speicherbildschirm mit einem x/y-Koordinatenaufnehmer und nachfolgender Ausgleichsrechnung. Ebenso wurden die relativen Konzentrationen der sedimentierenden Komponenten durch Ausmessen der Stufenhöhe der jeweiligen S-Kurve und nachfolgender Berechnung des Mittelwertes zusammengehöriger Stufen ermittelt.

Das während der Ultrazentrifugation eines homogen verteilten monomolekularen Polymers unmittelbar nach der Startzeit t_0 und nach zwei folgenden Zeitpunkten t_1 und t_2 auftretende Erscheinungsbild der Meßzelle in der Bildebene ist schematisch in Abb. 2 (A) dargestellt. Durch photoelektrische Abtastung erhält man zwischen den Referenzlinien am Meniskus (RLM) und dem Zellenboden (RLB) entsprechend der fortschreitenden Sedimentation unterschiedliche Konzentrationsdiagramme (Abb. 2 (B)). Beim Start t_0 tritt nur ein geringer Anteil Licht zwischen RLM und dem Luftspalt oberhalb des Meniskus (M) durch die Meßzelle hindurch und im Bereich der Meßlösung findet fast vollständige Lichtabsorption statt. Nach den Zeiten t_1 und t_2 zeigen die s-förmigen Abtastdiagramme zwischen dem Peak des Meniskus (M) und des Zellenbodens (RLB) die fortschreitende Sedimentation des Polymers unter Abtrennung vom Lösungsmittel an. Die Abstände r_1 und r_2 der Wendepunkte der Konzentrationsdiagramme (G_1 und G_1') zur Rotationsachse dienen dann nach Berücksichtigung weiterer Korrekturen für die in der sektorförmigen Zelle auftretenden radialen Verdünnungen entsprechend der Gleichung (1) zur Berechnung der Sedimentationskoeffizienten mittels linearer Regression (vgl.: Elias, 1961, S. 64).

1.3 Probenvorbereitung und Chromatographie

Für die Vergleichsuntersuchung des Sedimentationsverhaltens wurden nach Flaig et al. (1954) aus Schwarzerde (Schöppenstedt) und aus einem stark zersetzten Schwarztorf (Neuendorf) nach Vorbehandlung mit 0.1M HCl und dreimaligem Auswaschen mit Wasser durch Extraktion mit 0.1M NaOH Huminsäurehextrakte gewonnen und gefriergetrocknet. Von diesen Proben wurden jeweils 3g in 11 1M NaOH gelöst und die Fulvosäuren durch wiederholte Fällung mit 2M HCl bei pH 3.8 durch Dekantieren und Zentrifugieren (20 min, 5000 Upm) abgetrennt, bis die überstehende Lösung farblos war. Lösliche Salze wurden durch Dialyse bis zum Erreichen eines Leitfähigkeitsminimums entfernt. Von diesen Proben wurden für die Ultrazentrifugation 0.06%ige Stammlösungen mit N-Methylacetamid/Wasser (20 : 80) hergestellt.

Für die Vergleichsuntersuchung zwischen Gelchromatographie und Ultrazentrifugation wurde die Stammlösung der Schwarzerdehuminsäure zur vollständigen Reinigung von adsorbierten Ionen bei 30V/cm bis zur Konstanz des pH- und Leitfähigkeitswertes einer 69-stündigen Elektrodialyse unterworfen.

Die gelchromatographische Fraktionierung der elektrodialysierten Schwarzerdehuminsäure erfolgte über Sephadex G100 mit Wasser als Elutionsmittel. Der Verlauf der Trennung wurde mit Hilfe eines registrierenden Photometers bei 400 nm verfolgt und 16 Fraktionen mit einem Fraktionssammler in konstanten Zeitabschnitten und Volumina aufgefangen. Diese Fraktionen wurden anschließend durch Ultrazentrifugation weiter aufgetrennt. Vor der Messung wurden die Proben auf annähernd gleiche Ausgangskonzentrationen eingestellt.

2 Ergebnisse

2.1 Sedimentation der Huminstoffextrakte aus Schwarztorf und Schwarzerde

Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge sind in Abb. 3 die einzelnen Absorptionsmeßkurven des zu verschiedenen Zeiten registrierten stufenweisen Sedimentationsverlaufs eines Huminstoffpräparats aus Schwarztorf dargestellt.

Nach einer Zentrifugationszeit von 20 Minuten (Abb. 3, oben links) läßt sich bereits die beginnende Abtrennung der hochmolekularen Lösung vom Lösungsmittel dadurch erkennen, daß sich der Meniskuspeak ausbildet. Stufen, die auf eine Differenzierung nach Teilchengewichten hindeuten, treten jedoch erst nach 100 Minuten in Form einer schnell wandernden Komponente G_1 und einer langsameren Fraktion G_2 auf. Achtzig Minuten danach (Abb. 3, Mitte links) ist die Fraktion G_1 schon am Zellenboden angelangt, während die Komponente G_2 sich in zwei weitere Fraktionen, eine schneller wandernde Komponente G_3 und eine langsamere G_4 , aufzutrennen beginnt. Weitere 80 Minuten später (Abb. 3, Mitte rechts) ist auch die Fraktion G_3 nicht mehr nachweisbar und G_2 hat unter Abtrennung einer neuen Fraktion G_5 bereits ebenfalls fast den Zellenboden erreicht. Nach einer Gesamtlaufzeit von 380 Minuten ist ca. 60% der eingesetzten Probenmenge sedimentiert und man kann nur noch die zwei langsam wandernden Konzentrationsstufen der Fraktionen G_4 und G_5 erkennen.

Die Gesamtdynamik der während der Ultrazentrifugation auftretenden Sedimentationsverhältnisse läßt sich am besten durch Übereinanderkopieren der Einzeldiagramme (Abb. 3, unten rechts) erkennen. Aus dieser Darstellung läßt sich ableiten, daß die schnell wandernden höhermolekularen Anteile mehr im oberen Teil der Diagramme, die langsamen niedermolekularen Komponenten im unteren Teil der Absorptionsmeßkurven registriert werden. Eine vollständige Zusammenstellung aller Meßkurven dieses Präparates zeigt als Gesamtbild auch die Abb. 4, oben links.

Eine eindeutige Zuordnung identischer Kurvenscharen zu den einzeln auftretenden Fraktionen konnte jedoch erst nach der Computerauswertung durch eine Auftragung der entsprechenden Abstandskordinaten r der Wendepunkte der Konzentrationsstufen zum Rotationszentrum als Funktion der Zeit, im sog. Sedimentationsgeschwindigkeits-

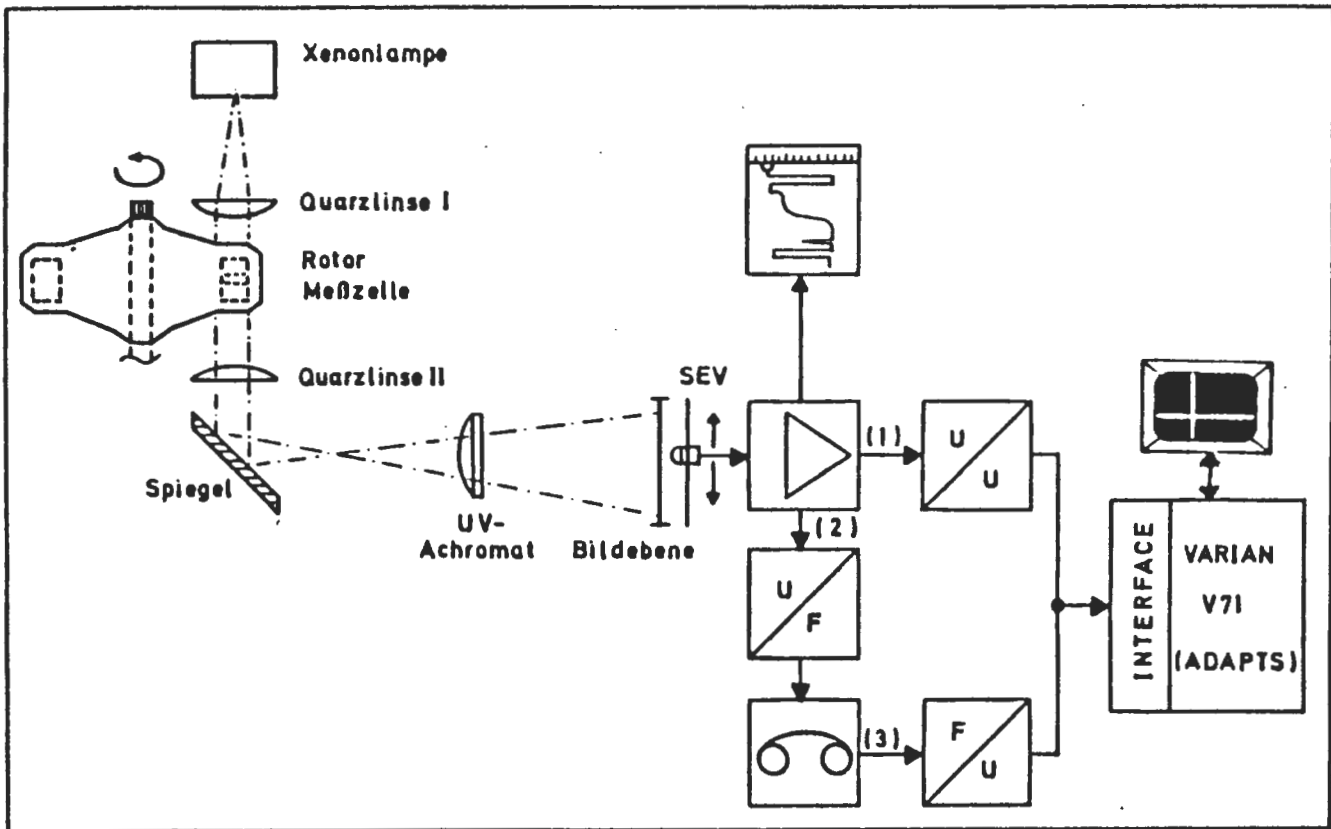


Abbildung 1: Absorptionsphotometrisches Abtastsystem und Meßwerterfassung der analytischen Ultrazentrifuge

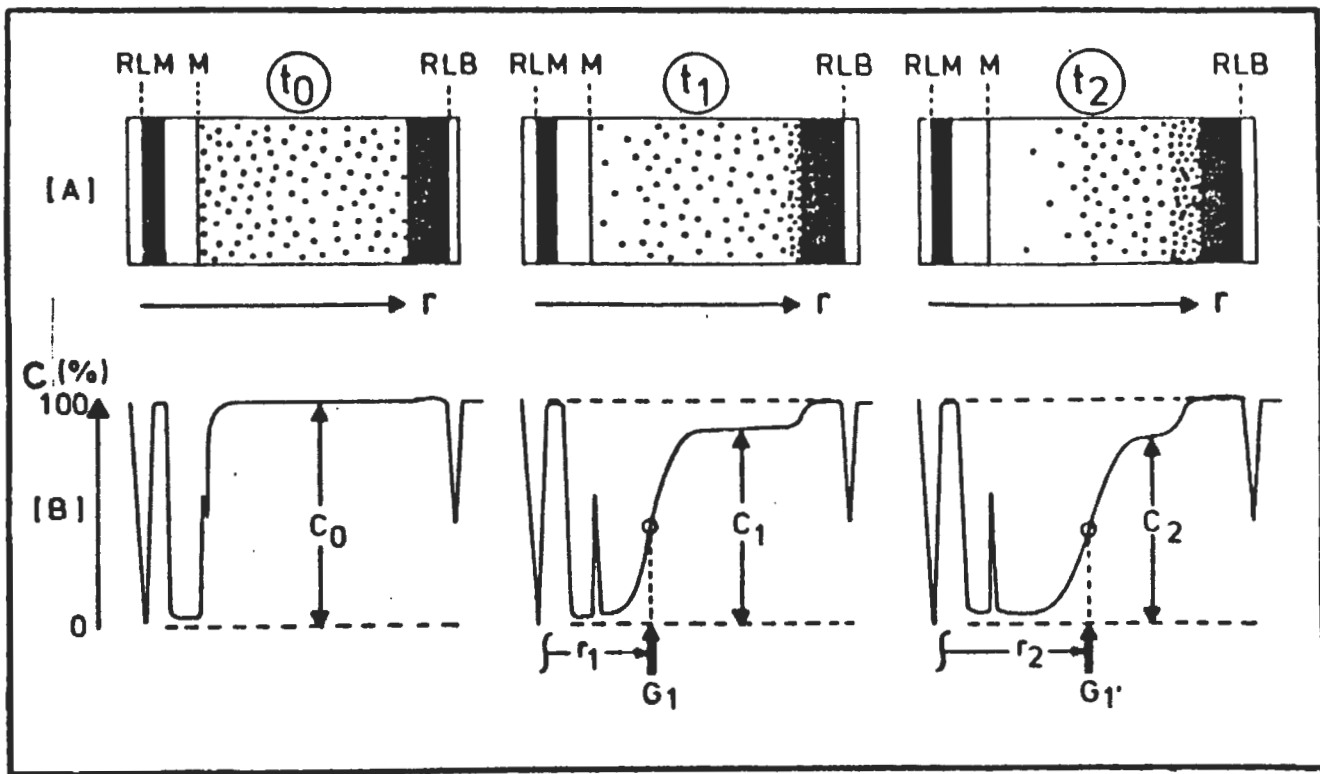


Abbildung 2: Schema der Sedimentation von Polymerteilchen in der Meßzelle (A) und entsprechende Abtastphotogramme (B)

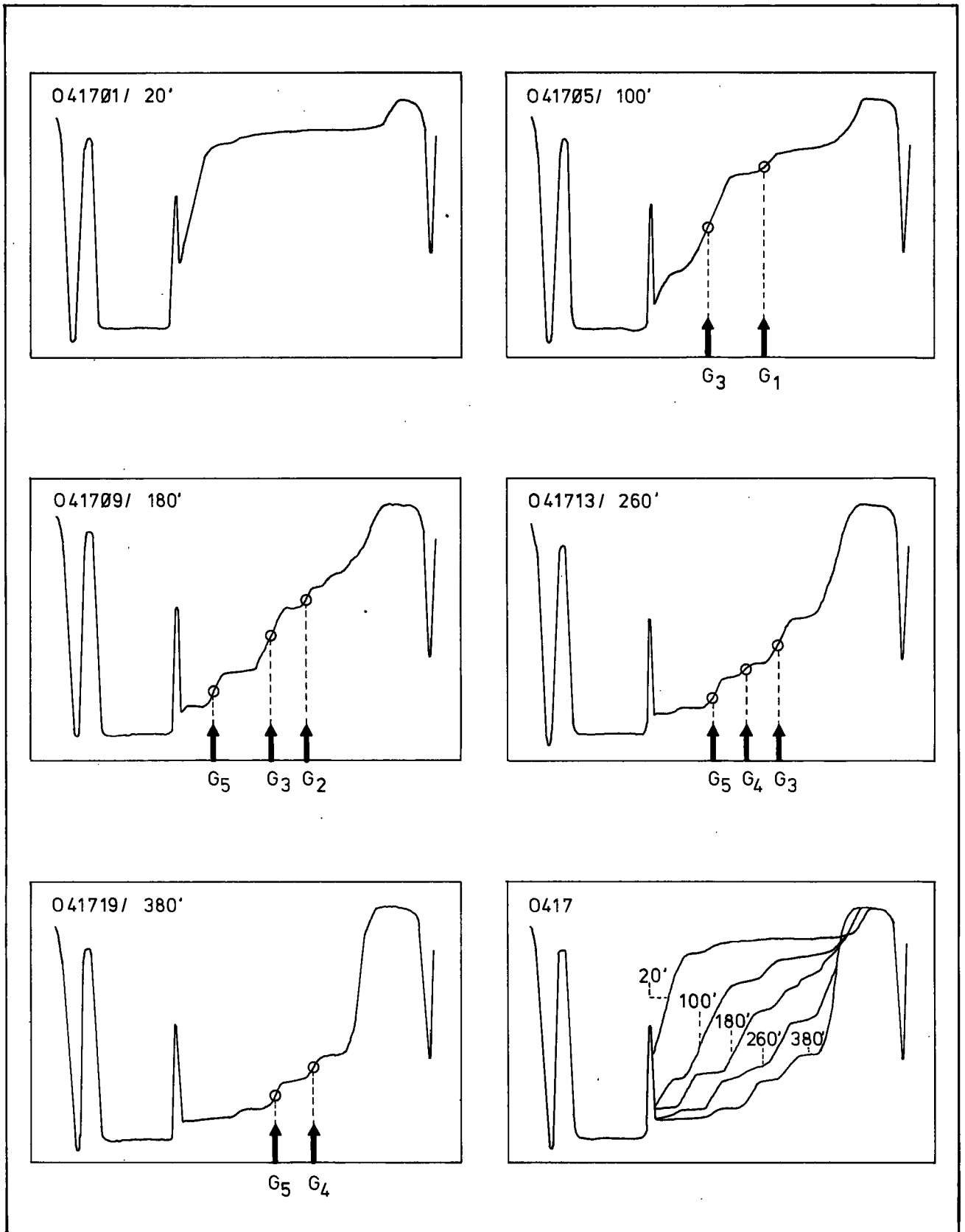


Abbildung 3: Absorptionsphotometrische Meßkurven eines Huminstoffextraktes aus Schwarztorf zu verschiedenen Zeiten der Sedimentation

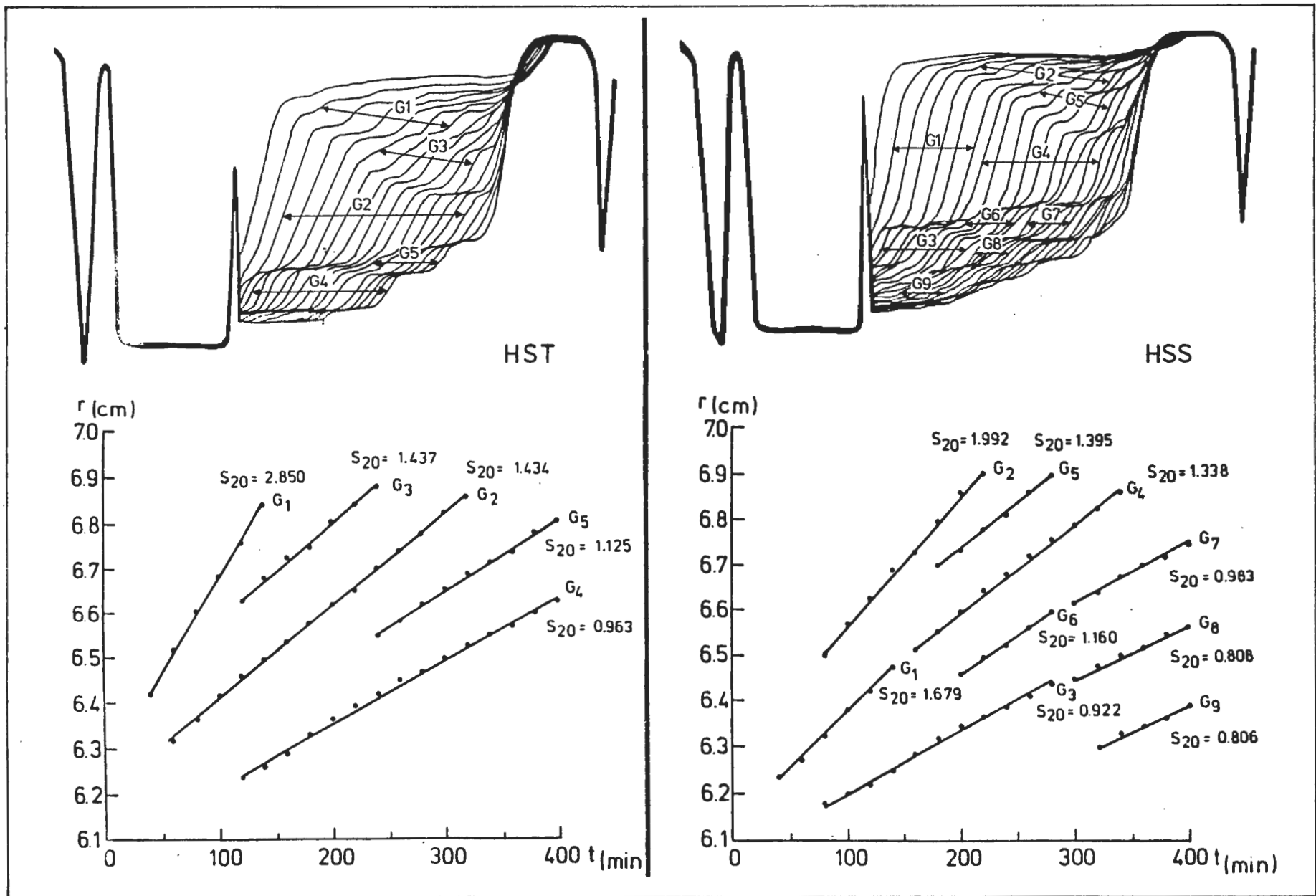


Abbildung 4: Absorptionsmeßkurven und Sedimentationsdiagramme von Huminstoffextrakten aus Schwarztorf (HST) und Schwarzerde (HSS)

diagramm (Abb. 4, unten) vorgenommen werden. Demnach verläuft die Sedimentation der einzelnen Fraktionen streng linear, mit nur geringen Abweichungen der Rohdaten von der Linearität. Im Schwerfeld der Ultrazentrifuge schnell wandernde hochmolekulare Anteile zeichnen sich hierbei gegenüber den langsam wandernden Komponenten durch stärkere Steilheiten der Sedimentationsgeschwindigkeitsgeraden aus.

Beim Vergleich der Sedimentationsdiagramme der Extrakte aus Schwarztorf (HST, Abb. 4, links) und aus Schwarzerde (HSS, Abb. 4, rechts) ist erkennbar, daß die in der Schwarzerde vorkommenden Fraktionen ähnliche Sedimentationskoeffizienten besitzen, wie die Komponenten des Torfextraktes. Allerdings scheint der niedermolekulare Anteil im Schwarzerdepräparat größer zu sein. Ebenso ist deutlich, daß die Gesamtzahl der Polymerfraktionen im Huminsäurekomplex der Schwarzerde größer ist. In beiden Extrakten treten allerdings auch Fraktionen mit fast gleichen Sedimentationskoeffizienten auf, so z. B. G2 und G3 im Schwarztorf- sowie G8 und G9 im Schwarzerde-Extrakt, deren Sedimentationseigenschaften nach diesem Verfahren fast identisch sind. Geht man davon aus, daß durch unterschiedliche Sedimentationskoeffizienten auch unterschiedliche Polymere charakterisiert werden, dann sind im Schwarztorfpräparat mindestens vier, im Schwarzerdeextrakt jedoch wenigstens acht Komponenten unterscheidbar.

2.2 Sedimentationsverhalten gelchromatographischer Fraktionen von Huminstoffen aus Schwarzerde

Bisherige Versuche organische Bodenextrakte durch den Einsatz der Gelchromatographie zu charakterisieren (Alyabina et al., 1975; Danneberg, 1977; Mori et al., 1987; Söchtig, 1966, 1977), basieren auf der Annahme, daß die gelösten Polymere nach abnehmender Molekülgröße und damit auch nach abnehmendem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Je nach den Optimierungsbedingungen der Trennsäule oder der Verwendung unterschiedlicher Pufferlösungen zur Elution wurden jedoch hierbei meist nur zwei bis drei unterschiedlich große und teilweise relativ breite Verteilungsmaxima nachgewiesen.

Die gelchromatographische Fraktionierung des in diesem Fall untersuchten elektrodialysierten Huminstoffextraktes zeigt daher ebenfalls dieses typische Trennverhalten unter Ausbildung von nur drei Absorptionsmaxima (vgl. Abb. 5, oben rechts). Entsprechend dieser chromatographischen

Trennung kann man im Bereich der Fraktionen 1 bis 3 eine scharfe Bande der hochmolekularen Verbindungen mit ca. 20% Anteil an der eingesetzten Gesamtmenge erkennen. Die „niedermolekularen“ Anteile verteilen sich dagegen mit 68% auf die Fraktionen 4 bis 11 des zweiten chromatographischen Maximums und zu verbleibenden 12% auf den Bereich des dritten Peaks innerhalb der Fraktionen 12 bis 16.

Die Auftragung der Sedimentationskoeffizienten aller Sedimentationsläufe entsprechend ihrer chromatographischen Fraktionierungsabfolge (vgl. Abb. 5) zeigt jedoch, daß die Gelchromatographie nur grob nach fallenden Teilchengewichten bzw. entsprechend abnehmender Sedimentationskoeffizienten erfolgt. Die Fraktionen 5 und 15 im jeweiligen Peakmaximum stehen hierzu sogar im deutlichen Widerspruch. Anhand dieses Diagramms (Abb. 5) und der Detaildarstellung entsprechend Abb. 6 läßt sich weiterhin nachweisen, daß die Trennung nicht molekular-einheitlich erfolgt, da auch die vermeintlich hochmolekularen Fraktionen 2 und 3 (vgl. Abb. 6, oben) noch erhebliche Anteile mit niedrigen Sedimentationskoeffizienten enthalten, die sich zudem im späteren Verlauf der Sedimentation, erkennbar an der Stufe G4 in Fraktion 2 oder an G2 in Fraktion 3, noch weiter auftrennen.

Bei den Fraktionen 2 und 3 bestätigt das Sedimentationsverhalten das erste Maximum der chromatographischen Verteilung unter gleichzeitiger Abnahme der Anteile mit hohen Sedimentationskoeffizienten. Entgegen der Erwartung, treten in den chromatographischen Fraktionen 5 und 15 nicht nur niedermolekulare Verbindungen sondern, erkennbar an dem erneuten Anstieg der Sedimentationskoeffizienten gegenüber den vorhergehenden Fraktionen, nochmals beträchtliche hochmolekulare Anteile auf. Als Erklärung hierfür muß angenommen werden, daß während der chromatographischen Trennung mehrmals stärker adsorbierte Huminstofffraktionen mit höheren Teilchengewichten von der Gelsäule freigesetzt werden. Dies schränkt die bisherige allgemeine Annahme, daß bei der Gelchromatographie von Huminstoffen zwischen dem Molekulargewicht und der Retentionszeit, bzw. der Position des Eluats in der Fraktionierungsreihe, eine eindeutige Beziehung besteht, erheblich ein.

Betrachtet man entsprechend Tab. 1 die Ergebnisse der halbquantitativen Konzentrationsbestimmung der einzelnen Sedimentationsstufen, so läßt sich errechnen, daß nur zwischen 60 und 80% der Gesamtmenge auswertbar erfaßt werden, wenn man die zusammengesetzten Stufen zu Beginn der Sedimentation unberücksichtigt läßt. Der Rest ist

Tabelle 1: Sedimentationskoeffizienten und relative Stufenhöhe der gelchromatographischen Fraktionen 2, 3, 5 und 15 des elektrodialysierten Huminstoffextraktes aus Schwarzerde

Stufe	Fraktion 2		Fraktion 3		Fraktion 5		Fraktion 15	
	$s_{20} \times 10^{-13}$	Höhe (%)	$s_{20} \times 10^{-13}$	Höhe (%)	$s_{20} \times 10^{-13}$	Höhe (%)	$s_{20} \times 10^{-13}$	Höhe (%)
G 1	28.33	6.0	17.10	8.4	4.43	86.6	8.11	7.6
G 2	16.77	6.7	6.22	39.1	7.79	6.5	6.27	11.5
G 3	13.20	6.7	10.40	11.9	5.96	31.0	1.22	50.5
G 4	6.08	21.8	3.49	7.0	4.35	24.0	3.13	12.3
G 5	40.43	6.3	12.20	8.1	3.28	19.9	1.65	7.9
G 6	20.52	6.1	8.13	10.4			0.94	8.7
G 7	9.80	7.8	6.76	5.9			1.40	12.1
G 8	7.00	9.7	5.50	17.3			1.19	14.6
G 9	2.48	8.1	4.28	3.0			0.92	10.3

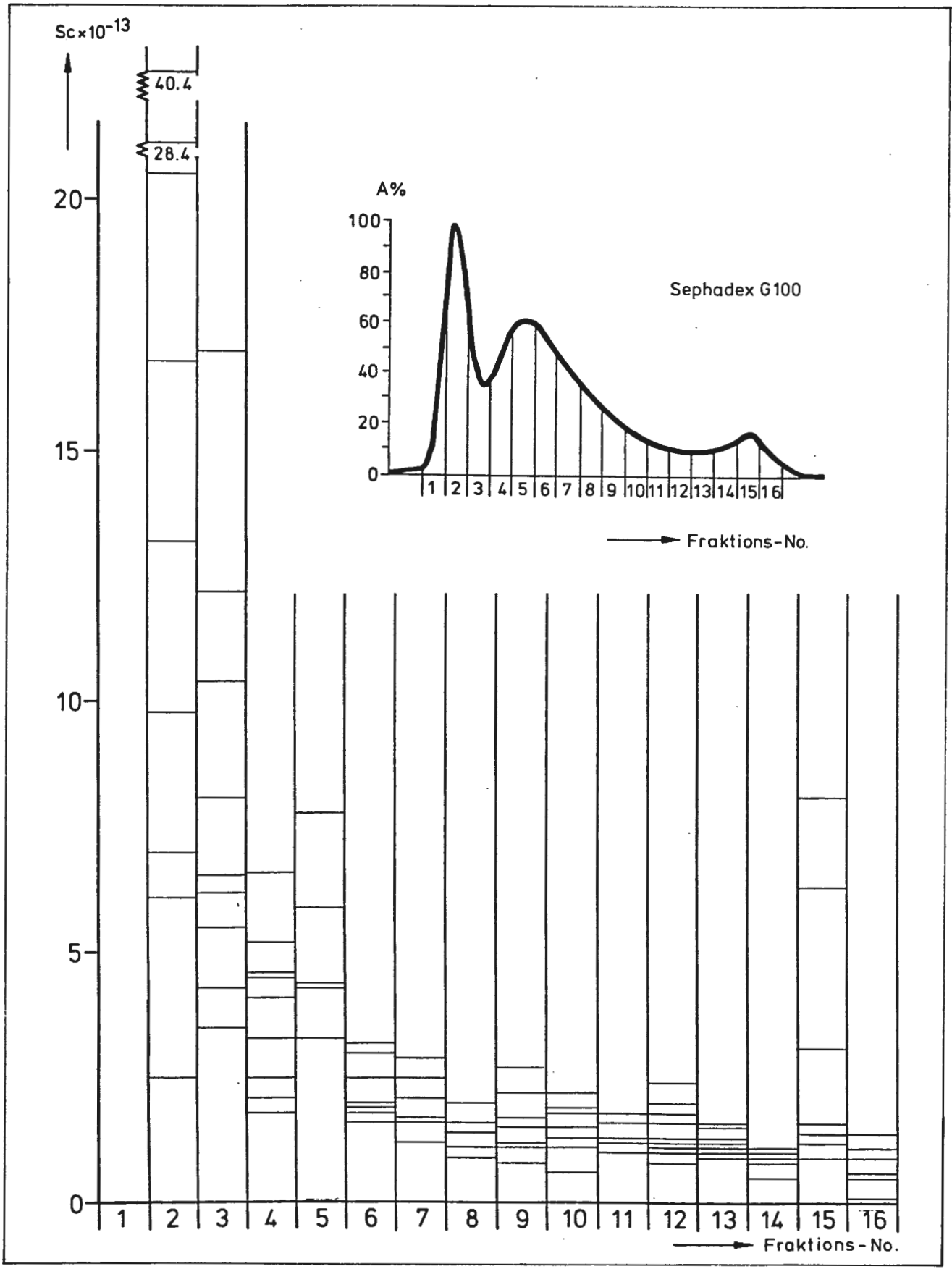


Abbildung 5: Gelchromatogramm (Sephadex G100) und Sedimentationskoeffizienten der gelchromatographischen Fraktionen eines elektrodialysierten Huminstoffextraktes aus Schwarzerde

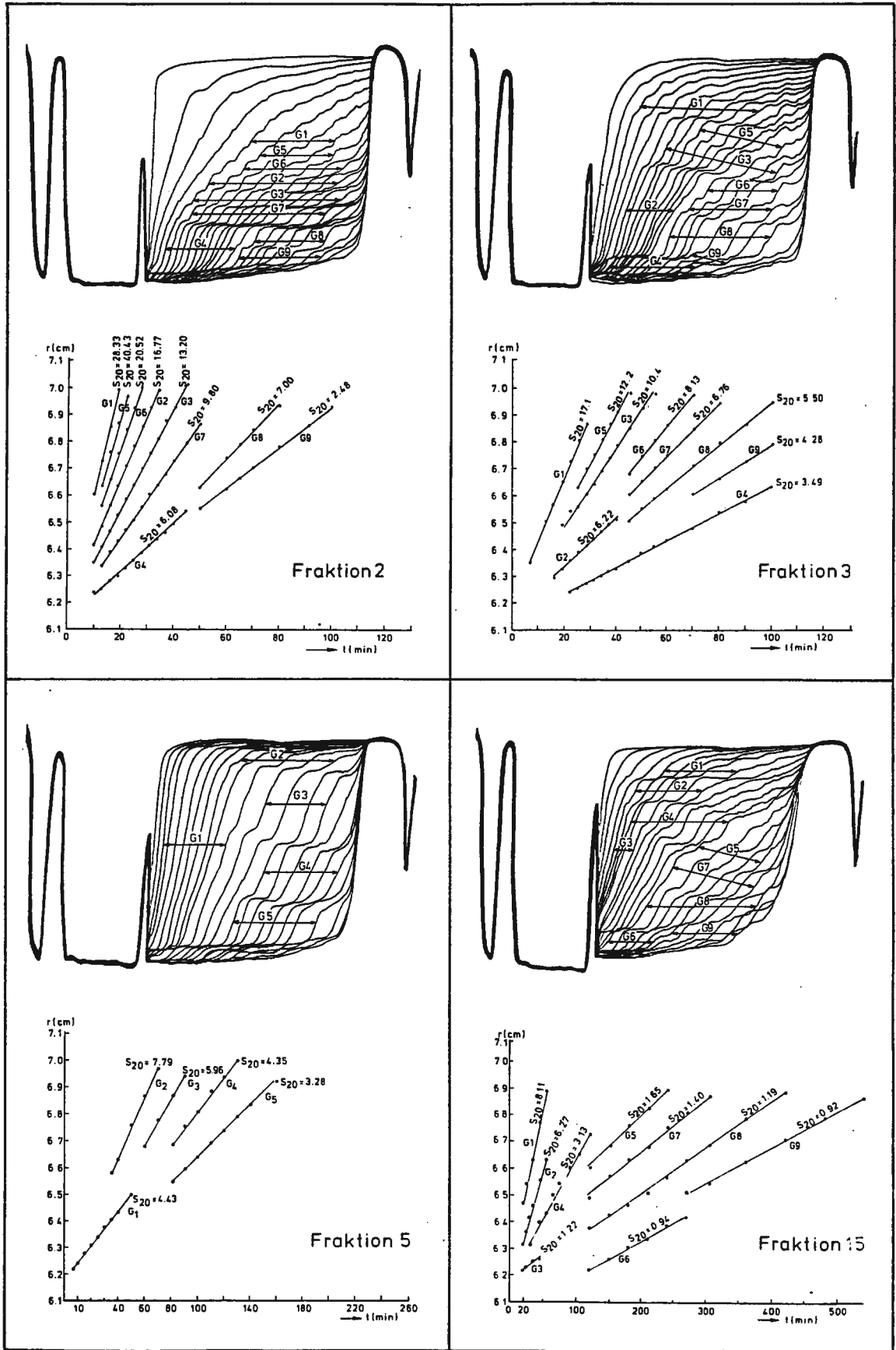


Abbildung 6: Sedimentationsdiagramme der gelchromatographischen Fraktionen 2, 3, 5 und 15 des elektrolysierten Huminstoffextraktes aus Schwarzerde

aufgrund fehlender Stufenausbildung im hoch- oder niedermolekularen Teil der Sedimentationsdiagramme unbestimmbar. Läßt man in Fraktion 2 die Stufe G4 unberücksichtigt, dann verteilen sich die restlichen Stufen mit je 6 bis 10% am Gesamtanteil auf alle sedimentierten Unterfraktionen ziemlich gleichmäßig. In Fraktion 3 ist die Stufe G2 mehrfach überlagert. Neben geringen Anteilen der Komponenten G9 (3.0%) und G7 (5.9%) treten hier Hauptanteile bei G8 (17.3%) und G6 (10.4%) auf. In Fraktion 5 geht die nur 40 Minuten lang vorhandene Stufe G1 anschließend in die 4 Unterfraktionen, G2 (6.5%), G3 (31.0%), G4 (24.0%) und G5 (19.9%) über. In Fraktion 15 ist G3 die Ausgangsstufe für die weiteren Unterfraktionen G4 (12.3%), G5 (7.9%) sowie G7 (12.1%) und G8 (14.6%) ohne erkennbare Ausbildung eines Verteilungsmaximums.

Bemerkenswert ist, daß bei der Aufspaltung in Unterfraktionen, die neuen Komponenten teilweise höhere Sedimentationskoeffizienten als die Ausgangsstufe erkennen lassen. Hierfür könnte möglicherweise bis zu einem gewissen Grade die Abnahme der Viskosität der Sedimentationslösung mit zunehmender Verdünnung verantwortlich sein. Als Beispiel kann hier die Stufe G1 in Fraktion 5 dienen, die vor ihrer Auftrennung einen S-Wert von 4.4 hatte, während die Komponenten G2 und G3 mit S-Werten von 7.8 und 5.9 erheblich darüber liegen. Eine quantitative Aussage über die durch die Ultrazentrifugation erreichte Unterfraktionierung der hier verglichenen gelchromatographischen Fraktionen ist wegen der erschwerten Zuordnung gleichartiger Konzentrationsstufen nur schwierig durchführbar und sollte auch nicht Gegenstand dieses Methodenvergleichs sein.

3 Diskussion

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse zeigen, daß mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation unter Anwendung eines photometrischen Meßverfahrens in Huminstoffextrakten eine Vielzahl von Komponenten erkennbar werden. Das Auftreten unterscheidbarer Konzentrationsstufen in den Sedimentationsdiagrammen ist ein Indiz dafür, daß mehrere molekulareinheitliche Verbindungen in den Extrakten vorhanden sind. Das läßt den Schluß zu, daß diese Methode das physikalisch-chemische Verhalten und die qualitative Zusammensetzung polydisperser Huminstoffsysteme besser charakterisiert, als es bisher mit anderen Fraktionierungstechniken gelang. Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche und reproduzierbare Durchführung der Sedimentationsläufe scheint allerdings die vorherige Entsalzung der Extrakte durch Dialyse oder Elektrodialyse zu sein. Die Tatsache, daß im Torfextrakt weniger Komponenten als im Extrakt aus Schwarzerde nachweisbar sind, könnte in einem pedogenetisch bedingten höheren Polymerisationsgrad des Torfes begründet sein. Eine Verallgemeinerung könnte jedoch erst nach weiteren Vergleichsuntersuchungen vorgenommen werden.

In manchen Fällen, wie z. B. bei der Ermittlung oder dem Vergleich geeigneter Extraktionsverfahren für Huminstoffe, ist die Anwendung der Ultrazentrifugentechnik ein wichtiges Hilfsmittel zur Feststellung substantieller Unterschiede der Extrakte. Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation müßte auch eine bessere Charakterisierung der unter natürlichen Bedingungen sich verändernden Huminstoffsysteme unterschiedlicher Bodentypen und Morphogenesen gelingen.

Wie hier am Beispiel des Schwarzerdeextraktes aufgezeigt, ist eine Untersuchung des Sedimentationsverhaltens der Fraktionen aus chromatographischen Trennverfahren für die Methodenentwicklung unerläßlich. Der Befund, daß auch nach der chromatographischen Vortrennung wiederholt Unterfraktionen mit höheren Sedimentationskoeffizienten nach vorangehenden Trennstufen mit niedrigeren Sedimentationsraten auftraten, widerlegt die Annahme einer nach abnehmenden Teilchengewichten geordneten Fraktionierungsabfolge bei der Chromatographie von Huminstoffen. Dies stellt bisherige gelchromatographische Untersuchungen dieser Substanzgruppe in Frage.

Zusammenfassung

Es wird eine kurze Einführung in das Prinzip der analytischen Ultrazentrifugation und des Einsatzes der Absorptionsphotometrie für die Messung der Sedimentationskoeffizienten der Fraktionen in organischen Bodensubstanzen gegeben. Zur Vereinfachung der Methode wird die automatische Meßwerterfassung in Verbindung mit rechnergestützter Parameterbestimmung und Auswertung vorgeschlagen. Die Untersuchung verdünnter Huminstoffextrakte aus Schwarzerde und Schwarztorf ergab ähnliche Sedimentationseigenschaften. Der Torfextrakt enthielt jedoch weniger sedimentierende Komponenten als der Schwarzerdeextrakt. Nach Ultrazentrifugation gelchromatographisch gewonnener Fraktionen wird am Beispiel eines elektrodialysierten Schwarzerdeextraktes das mehrfach wiederholte Auftreten hochmolekularer Unterfraktionen trotz der chromatographischen Vortrennung nachgewiesen. Damit wird die Anwendung gelchromatographischer Trennverfahren zur Kennzeichnung organischer Bodenextrakte teilweise in Frage gestellt.

Investigation of the Polydispersity of Humic Acid Systems by Analytical Ultracentrifugation and Gelchromatography

A short introduction to the principle of analytical ultracentrifugation and the application of absorption photometry for the determination of sedimentation coefficients of fractions from soil organic matter is given. The use of automatic data acquisition to simplify computer-aided parameter estimation and calculation is proposed. The investigation of diluted humic matter extracts from black soil and black peat revealed similar sedimentation properties. Less sedimenting components were detected in peat than in the organic matter extract from black chernozem soil. After ultracentrifugation of fractions prepared by gelchromatography from an electrodyalyzed chernozem soil extract, the repeated occurrence of high molecular weight subfractions in spite of the chromatographic pre-separation run is demonstrated. This shows the use of gelchromatographic separation techniques to be somewhat problematic for soil organic matter analysis.

Literatur

- Alyabina, G.A.; Zhigunov, A.V. und Shurukhina, S.I.: Use of gelchromatography in the study of soil humic substances. — In: *Pochvovedenie*, No. 9 (1975), S. 55–62.
- Beutelspacher, H.: unveröffentlicht, 1950. — loc. cit. in: M.M. Kononowa: *Die Humusstoffe des Bodens*. VEB Deutsch. Verl. Wiss., Berlin (1958), S. 72.
- Cameron, R.S. und Posner, A.M.: Molecular weight distributions of humic acids from density gradient ultracentrifugation profiles corrected for diffusion. — In: *Transactions, 10th Int. Congr. Soil Sci.*, II (1974), S. 325–331.
- Cameron, R.S.; Thornton, B.K.; Swift, R.S. und Posner, A.M.: Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. — In: *J. Soil Sci.* 23 (1972), S. 394–408.
- Danneberg, O.H.: Chromatography of humic substances on controlled pore glass. — In: *Soil Organic Matter Studies*. Vol. II. International Atomic Energy Agency, Wien (1977), S. 221–228.
- Elias, H.G.: *Ultrazentrifugen-Methoden*. — Beckman Instr., München (1961), 219 S.
- Flaig, W. und Beutelspacher, H.: Investigations of humic acids with the analytical ultracentrifuge. — In: *The Use of Isotopes and Radiation in Soil Organic Matter Studies*, International Atomic Energy Agency, Wien (1968), S. 23–30.
- Flaig, W.; Beutelspacher, H. und Rietz, E.: Chemical composition and physical properties of humic substances. — In: J.E. Gieseking (Ed.), *Soil Components*, Vol. 1, Springer-Verlag Berlin (1975), S. 1–211.
- Flaig, W.; Scheffer, F. und Klamroth, B.: Zur Kenntnis der Huminsäuren des Bodens. — In: *Z. Pflanzenern. Bodenkd.* 71 (1954), S. 33–37.
- Hayes, M.H.B. und Swift, R.S.: The chemistry of soil organic colloids. — In: *The Chemistry of Soil Constituents*, Greenland, D.J. und Hayes, M.H.B. (Ed.), Wiley, Chichester, UK (1978), S. 179–320.
- Mori, S.; Hiraide, M. und Thizuike, A.: Aqueous size-exclusion chromatography of humic acids on a sephadex gel column with diluted phosphate buffers as eluents. — In: *Anal. Chim. Acta*, 193 (1987), S. 231–238.
- Piret, E.L.; White, E.; Walther, H.C., Jr. und Madden, A.J., Jr.: Some physico-chemical properties of peat humic acids. — In: *Sci. Proc. Roy. Publ. Soc. A1* (1960), S. 69–79.
- Posner, A.M. und Creeth, J.M.: A study of humic acid by equilibrium ultracentrifugation. — In: *J. Soil Sci.* 23 (1972), S. 333–341.
- Rietz, E.: Ultracentrifugal analysis of humic substances with an photoelectric-scanning absorption method. — Vortrag Int. Symposium Humus et Planta VII, Studies about Humus, 19.–26. Aug. 1979, Brno, CSSR.
- Robachuk, N.M. und Maksimov, O.B.: Determination of molecular weight of humic acids using an ultracentrifuge. — In: *Novye Metody/Sled. Guminovykh Kislot*, 1972, S. 81–89.
- Rochus, W.: Physikalisch-chemische Charakterisierung der Huminsäuren-Fractionen einer Schwarzerde-Griserde-Sequenz unter Wald. — In: *Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.*, 29 (1979), S. 291–298.
- Rochus, W.: Löslichkeit und Aggregationsverhalten von Huminsäuren und Humaten. — In: *Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.*, 30 (1981), S. 37–48.
- Scheffer, F.; Ziechmann, W. und Schlüter, H.: Über die Sedimentation von Huminsäuren in der Ultrazentrifuge. — In: *Kolloid Z.* 160 (1958), S. 1–7.
- Schnitzer, M. und Khan, S.U.: *Humic Substances in the Environment*. Dekker-Verlag, New York (1972), 327 S.
- Schnitzer, M. und Khan, S.W. (Ed.): *Soil Organic Matter*. — In: *Developments in Soil Science Vol. 8*, Elsevier-Verlag, Amsterdam (1978), 318 S.
- Schnitzer, M. und Skinner, S.I.M.: Gelfiltration of fulvic acid, a soil humic compound. — In: *Isotopes and Radiation in Soil Organic Matter Studies*, International Atomic Energy Agency, Wien (1968), S. 41–55.
- Sipos, S.; Dekany, I.; Szanto, F. und Sipos, E.: Investigation of humic acids and metal humates with an analytical ultracentrifuge. — In: *Acta Phys. Chem.* 18 (1972), S. 231–238.
- Sipos, S.; Rochus, W. und Tombacz, E.: The particle weight of humic acids at different degrees of pH in aqueous solutions. — In: *International Workshop on Properties of Organic Peat Components and their Effect on Metabolism*, Braunschweig, Germany, 19.–23. Sept. 1977.
- Söchting, H.: Zur Fraktionierung von Humusstoffen durch Gelfiltration. 1. Mitt.: Das Verhalten von anorganischen Ionen aus der Asche und den Lösungen von Humusstoffen auf Sephadexgelen. — In: *Landbauf. Völkenrode*, 16 (1966), S. 25–30.
- Söchting, H.: Gelchromatography as a method for characterization of humic systems. — In: *Proc. Int. Meet. Humic Substances*. Nieuwersluis, Pudoc, Wageningen (1977), S. 321–335.
- Svedberg, T. und Pedersen, K.O.: *The ultracentrifuge*. — Clarendon Press, Oxford (1940, 1960), 423 S.
- Verfasser: Rietz, Egbert, Wiss. Oberrat, Chem., Phys., Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. D. Sauerbeck.