

**МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПРИБОР ДЛЯ ВИЗУАЛЬНОГО
ИЗМЕРЕНИЯ СВЕТОРАССЕЯНИЯ В РАСТВОРАХ ПОЛИМЕРОВ
И БЕЛКОВ**

B. Я. Черняк

Измерение рассеяния света в растворах полимеров и белков для определения их молекулярного веса, а также размеров и формы макромолекул производится в настоящее время как при помощи фотоэлектрической техники, так и методами визуальной фотометрии. Приборы с фотоумножителями при надлежащем выполнении более совершенны, обладают высокой чувствительностью и способны обеспечить большую, чем визуальные, точность измерений. Их, однако, значительно труднее изготовить и особенно наладить, и поэтому продолжают находить широкое применение различные варианты приборов с готовыми визуальными фотометрами. При этом не всегда учитывается в должной мере специфика субъективного метода наблюдений, чем, по-видимому, и объясняется известное расхождение между накопленными за последние десятилетия экспериментальными данными о светорассеянии (абсолютном) чистых жидкостей [1].

В настоящей статье описывается модификация прибора со ступенчатым фотометром Пульфриха, обладающая некоторыми преимуществами по сравнению с аналогичными приборами, применявшимися ранее [2—4]; приводится вывод расчетных формул и сообщаются краткие сведения о технике эксперимента и результатах контрольных измерений светорассеяния водой, четыреххлористым углеродом, а также определения молекулярного веса γ -глобулина человека.

Описание прибора

Принципиальная схема прибора показана на рис. 1. Осветитель I с ртутной лампой 1, расположенной в фокальной плоскости длиннофокусного объектива 3, посылает параллельный световой пучок через светофильтр 4 в рабочую часть прибора II. Светофильтры (комбинации интерференционных со стеклянными) крепятся в двух гнездах ($\lambda = 546$ и 436 мкм) револьверного держателя, одно гнездо которого остается открытым для наблюдений в белом свете. При входе в кожух II световой пучок ограничивается первой прямоугольной диафрагмой D_1 и затем попадает в призматическую кювету 5. Последняя фиксирована в специальном термостатирующем гнеаде (на схеме не показано), наполнена какой-либо стабильной жидкостью с подходящим рассеянием и играет роль «эталона мутности». Для контроля температуры в кювету вставлен термометр T_1 , шарик которого находится значительно выше освещенной части жидкости. Далее свет попадает в термостат 7, на входное окно которого 6 наклеена вторая (меньшая) прямоугольная диафрагма D_2 . Термостат представляет собой открытый сверху фасонный сосуд, тщательно изготовленный из листовой латуни, с хорошо зачерненными поверхностями. К его дну приклеена плоская резиновая шайба 9 с отверстием 10, под которым припаян штуцер, проходящий через дно кожуха II и связывающий термостат с водоструйным

насосом. На резиновую шайбу ставится измерительная ячейка, и разрежение, создаваемое водоструйным насосом, удерживает ее в фиксированном положении. Помимо входного, термостат снабжен стеклянными окнами 11, 12 и 13 для наблюдения поперечно рассеянного света и асимметрии

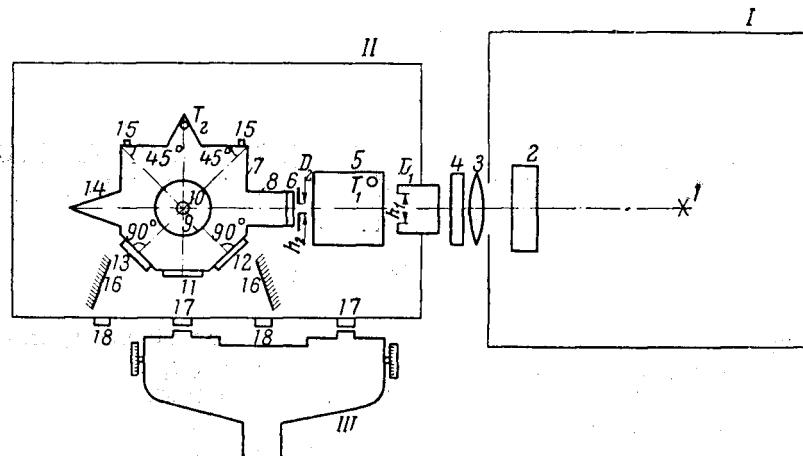


Рис. 1. Принципиальная схема прибора (пояснения в тексте)

светорассеяния под углами 45 и 135° к направлению падающего света. Форма термостата такова, что биссектрисы его задних углов совпадают с нормалями к противолежащим окнам и пересекаются все в одной точке, лежащей на оси падающего светового пучка; эта ось является также осью кругового конуса 14 (ловушки). Плоскость горизонтального сечения термостата делится указанными прямыми, как это показано на рис. 1, на восемь равных углов с общей вершиной над отверстием 10. В результате достигается достаточно хорошее гашение световых пучков, рассеянных в стороны, противоположные направлению наблюдения, а также прошедшего через всю систему первичного пучка. Блики от диафрагмы D_2 и окна 6, а вместе с ними косые пучки от предыдущих частей прибора в основном задерживаются во входном патрубке 8. В задних стенках термостата имеются штуцера 15 для подключения его к обычному ультратермостату. Термостатирующей жидкостью является обычная дистиллированная вода; для очистки от грубых загрязнений она пропускается перед поступлением в термостат через пористый стеклянный фильтр № 2. Освещенная падающим светом вода находится вне поля зрения фотометра, и ее рассеяние не оказывается заметным образом на измерениях. Поглощение света в этой воде благодаря малым размерам термостата невелико и в пределах точности измерений остается от опыта к опыту неизменным (при условии еженедельной смены воды в ультратермостате). В одном из углов



Рис. 2. Измерительная ячейка

термостата крепится термометр T_2 с ценой деления $0,5^\circ$. Зеркала 16 (наружное алюминирование) служат для определения асимметрии светорассеяния. Фотометр Пульфриха III устанавливается для этого против окон 18^1

¹ Осветитель I, кожух II и все несущие детали конструкции прибора заимствованы нами из нефелометра, описанного в [4].

Измерительная ячейка представляет собой тонкостенную коническую двухгорлую колбу (рис. 2). Коническая форма и тонкие стенки улучшают оптические свойства ячейки, а два горлышка существенно облегчают все манипуляции с ней.

Относительный способ измерений не предъявляет особо жестких требований к стабилизации ртутной лампы. Однако, как показывает опыт, для более спокойной работы некоторые меры должны быть приняты. Простая схема, показанная на рис. 3, с феррорезонансным стабилизатором напряжения 2 (СНЭ-220-0,5), регулировочным автотрансформатором 3, барретторами 4 (1Б5-9) и реостатом 6 в достаточной для данного прибора степени сглаживает броски светового потока лампы 1. Ключ 5 служит для шунтирования барретторов и амперметра (до 5 а) на время пускового режима. Налаживание прибора сводится в основном к юстировке его измерительной части, т. е. к определению правильного положения зеркал 16 и фотометра относительно термостата. Для этого удобно воспользоваться следующим приемом: перед окуляром фотометра устанавливается фотографический софит с перекальной 500-ваттной лампой, зажигается ртутная лампа прибора и в термостат напускают немного папиросного дыма. Если все источники света хорошо прикрыты и свет от ртутной лампы ослаблен одним из светофильтров, в термостате можно отчетливо видеть ход всех лучей. Это позволяет быстро находить такое положение зеркал и фотометра, при котором все световые пучки пересекаются в одной точке и попадают точно в углы термостата, в чем и заключается условие правильной юстировки прибора.

Теория визуальных измерений светорассеяния

Для нахождения релеевской постоянной рассеяния R_{90} визуальными методами необходимо выразить эту величину через отвечающие визуальной фотометрии понятия яркости источника (каковым здесь является поверхность рассеивающего объема жидкости в измерительной ячейке) и освещенности сетчатки глаза наблюдателя. Воспользовавшись определением яркости B как силы света с единицы поверхности в нормальном к ней направлении, можно показать, что для частиц, малых по сравнению с длиной волны падающего света и при равномерной облученности рассеивающего объема, яркость последнего в направлении, перпендикулярном к направлению первичного пучка, B_{90} равна

$$B_{90} = R_{90} I_0 h, \quad (1)$$

где I_0 — облученность (т. е. поверхностная плотность светового потока, $\text{эрг}\cdot\text{сек}^{-1}\cdot\text{см}^{-2}$) рассеивающего объема первичным световым потоком; h — глубина этого пучка, измеренная в направлении наблюдения. Чтобы найти зависимость освещенности E сетчатки глаза от B_{90} , примем во внимание, что выходной зрачок фотометра Пульфриха меньше зрачка глаза, адаптированного к темноте, а сам фотометр состоит из двух зрительных труб, наведенных на бесконечность, с одним общим окуляром [5]. Освещенность сетчатки E , создаваемая таким прибором, пропорциональна яркости выходящего из его окуляра пучка света B' и площади выходного зрачка S [6]:

$$E = k B' S = \frac{k}{\beta^2} B' S, \quad (2)$$

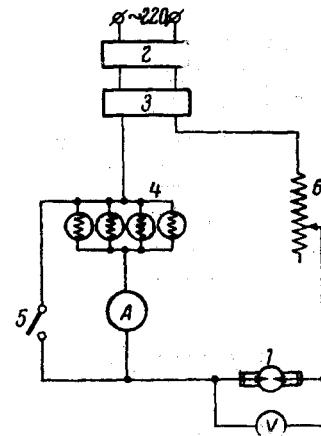


Рис. 3. Принципиальная электрическая схема питания ртутной лампы (пояснения в тексте)

где S — площадь входного зрачка, т. е. переменной квадратной диафрагмы фотометра; β — его линейное (постоянное) увеличение; k — коэффициент, учитывающий оптические параметры глаза.

Если высота диафрагм D_1 и D_2 превышает линейные размеры поля зрения фотометра, то яркость пучка в воздухе B' может быть выражена через яркость B_{90} следующим образом:

$$B' = Q(n) B_{90}/n^2. \quad (3)$$

Здесь n — показатель преломления рассеивающей среды, $Q(n)$ — коэффициент пропускания системы на пути от рассеивающего объема до глаза наблюдателя, являющийся функцией n ; яркость поверхности рассеивающего объема в пределах малого угла зрения фотометра принята равной B_{90} . Множитель n^2 отвечает изменению яркости пучка при переходе из рассеивающей среды в воздух (промежуточная среда не играет роли) [7]. Подставив это соотношение в (2) и заменив одновременно площадь S пропорциональными ей показаниями N на шкале светопропусканий отсчетного барабана фотометра, получаем:

$$E = KQ(n)B_{90}N/n^2 \quad (4)$$

или с учетом (1)

$$E = KQ(n)R_{90}I_0hN/n^2, \quad (4')$$

где K — новая постоянная, одинаковая для обеих половин фотометра. Написав выражения, аналогичные (4') как для исследуемой жидкости, так и для «эталона мутности», и приравняв их друг другу при некоторых N и N^* , находим:

$$R_{90} = \Gamma' \frac{n^2}{Q(n)} \frac{I_0^* N^*}{I_0 N}, \quad (5)$$

где звездочкой отмечены величины, относящиеся к «эталону мутности», а Γ' — постоянная, в которую вошла часть неизменяющихся от опыта к опыту членов (4'). Отношение I_0^*/I_0 равняется коэффициенту пропускания первичного потока на участке между обоими наблюдаемыми рассеивающими объемами и, следовательно, является функцией как n , так и n^* . Обозначим этот коэффициент через $Q'(n, n^*)$ и заметим, что

$$Q(n) = aq(n); \quad Q'(n, n^*) = a'(n^*) q'(n), \quad (6)$$

где a и $a'(n^*)$ — коэффициенты пропускания постоянных компонентов прибора, а $q(n) = q'(n)$ — коэффициент пропускания внутренней поверхности измерительной ячейки («истинным» поглощением и вторичным рассеянием в исследуемых жидкостях мы, как обычно, пренебрегаем). Следовательно, вместо (5) имеем:

$$R_{90} = \Gamma \frac{n^2}{q^2(n)} \frac{N^*}{N}, \quad (7)$$

где

$$\Gamma = \frac{\Gamma'}{a \cdot a'(n^*)} = \text{const}$$

при неизменном n^* .

Поскольку наклон и кривизна стенки ячейки невелики и в первом приближении могут не приниматься во внимание, величину $q^2(n)$ можно оценить по формуле Френеля для нормального падения неполяризованного света. Такая оценка показывает, что для ячейки из молибденового стекла с $n_D \approx 1,49$ (наши измерения), при $1,33 < n < 1,66$ $q^2(n) \approx 0,992$, т. е. отличается от единицы менее чем на 1 %. Как известно, точность визуальных относительных измерений R_{90} не превышает $\pm 5-10\%$. Это позволяет принять $q^2(n) = 1$, не внося добавочной заметной ошибки, и

переписать расчетную формулу прибора в окончательном виде:

$$R_{90} = \Gamma n^2 x, \quad (8)$$

где через x обозначено отношение показаний отсчетных барабанов фотометра, $x = N^*/N$. Постоянная Γ находится, как обычно, путем калибровки прибора по какой-либо жидкости, рассеяние которой измерено абсолютным способом.

При исследовании растворов формула (8) применяется как для вычисления постоянной рассеяния раствора $R_{90,c}$ при данной концентрации c , так и $R_{90,0}$ — релеевской константы чистого растворителя. Необходимое для расчета молекулярного веса полимера «избыточное» рассеяние, очевидно, равно

$$R_{90} = R_{90,c} - R_{90,0} = \Gamma (n_c^2 x_c - n_0^2 x_0) \quad (9)$$

или для разбавленных растворов, когда $n_c \approx n_0$,

$$R_{90} \approx \Gamma n_0^2 (x_c - x_0). \quad (10)$$

Калибрация и проверка прибора. В качестве калибровочной жидкости был взят бензол¹, который перегоняли под атмосферным давлением непосредственно в ячейку. Для бензола, согласно [8], $[R_{90}]_{\text{бенз}}^{25^\circ} = 16,3 \cdot 10^{-6}$ и $[R_{90}]_{\text{бенз}}^{43^\circ} = 48,5 \cdot 10^{-6}$. При таком выборе релеевских констант бензола постоянная прибора Γ колеблется в зависимости от измерительной ячейки в пределах $\Gamma_{546} = (26,1 \div 28,6) \cdot 10^{-6}$ и $\Gamma_{43^\circ} = (92,2 \div 100,5) \cdot 10^{-6}$. Согласно (8) относительная ошибка в определении этой величины, $\Delta\Gamma/\Gamma = \Delta x/x + [\Delta R_{90}/R_{90}]_{\text{бенз}}$, может достигать $\pm 5\text{--}6\%$, так как $[\Delta R_{90}/R_{90}]_{\text{бенз}} \approx \pm 3\text{--}4\%$ (см., например, [9]), а $\Delta x/x$ в наших измерениях составляет примерно $\pm 1,5\text{--}2\%$ при $[R_{90}]_{\text{бенз}} \geq 10 \cdot 10^{-6}$ и $[R_{90}]_{\text{бенз}} \geq 30 \cdot 10^{-6}$. (Порядок измерений: все наблюдения производят постоянно один и тот же оператор в хорошо затемненном помещении; N выбирается, по возможности, так, чтобы N^* лежало между 25 и 50, и делается 20 отсчетов N^* , среднеарифметическое из которых и берется в расчет). При меньших x ошибка $\Delta x/x$ возрастает, достигая для $x = 0,02$ примерно $\pm 5\%$. В приематической юнионе (5 на рис. 1) находится толул, выполняющий здесь функцию «эталона мутности». Его рассеяние близко к бензолу, однако благодаря большей ширине диафрагмы D_1 яркость «эталона» приблизительно в 4 раза превышает яркость бензола в измерительной ячейке. В результате глаз сохраняет контрастную чувствительность вплоть до $x \approx 0,01$; этому, согласно (8), соответствуют (расчетно, для $n = 1,34$) $[R_{90}]_{\text{бенз}}^{25^\circ} \approx 0,5 \cdot 10^{-6}$ и $[R_{90}]_{\text{бенз}}^{43^\circ} \approx 1,5 \cdot 10^{-6}$. Сопоставление этих величин с приводимыми далее данными для воды и четыреххлористого углерода показывает, что собственное (паразитное) рассеяние прибора по крайней мере не преувеличивает эти минимальные значения; наши измерения дали для воды $[R_{90}]_{\text{воды}}^{25^\circ} = (0,90 \pm 0,10) \cdot 10^{-6}$ и $[R_{90}]_{\text{воды}}^{43^\circ} = (2,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$, а для четыреххлористого углерода $[R_{90}]_{\text{ЧХУ}}^{25^\circ} = (5,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$ и $[R_{90}]_{\text{ЧХУ}}^{43^\circ} = (15,7 \pm 1,1) \cdot 10^{-6}$. Расчет производили по формуле (8) без каких-либо добавочных поправок; результаты хорошо совпадают с данными других авторов [8, 9]. Химически чистый четыреххлористый углерод перегоняли под атмосферным давлением непосредственно в измерительную ячейку. Воду для этих измерений готовили иначе. В специально изготовленный герметизированный стеклянный перегонный аппарат через пористый стеклянный фильтр № 4 наливали бидистиллированную воду. После промывки системы следующую порцию воды кипятили в вакууме до полного уда-

¹ Криоскопический бензол, подвергнутый дополнительной очистке и обезвоженный, любезно предоставлен нам С. А. Павловой, за что выражаем ей свою признательность.

ления воздуха и затем перегоняли в измерительную ячейку. Из наполненной ячейки воду переводили обратно в кипятильник и перегонку повторяли. Все эти операции производили без нарушения вакуума. Трижды перегнанная таким образом вода оказывалась в достаточной мере чистой от пыли и служила объектом измерений. Критерием чистоты от пыли во всех опытах с чистыми жидкостями (как и с растворами полимеров, молекулярный вес которых не превосходил $1 \cdot 10^6$) являлась асимметрия светорассеяния z . Измерения производили лишь при $z \leq 1,02$.

При выводе расчетных соотношений (7) — (9) мы преенебрегли влиянием кривизны и конусности ячейки на форму первичного пучка и связанным с этим отступлением от равномерной поверхностной плотности как падающего, так и рассеянного светового потока.

Экспериментальным подтверждением малости этого эффекта являлось хорошее постоянство величины x для данной жидкости при различных возможных N , поскольку различным N и N^* соответствуют разные размеры полей зрения прибора. Прямое доказательство было получено путем одновременных измерений x для одних и тех же жидкостей в обычной ячейке и в специально изготовленной прямоугольной кювете. Эти опыты показали, что обе формы практически неразличимы: относительное расхождение $\Delta x/x < \pm 2\%$, т. е. лежит в пределах указанной выше точности наших измерений.

Для окончательной проверки прибора на нем были произведены измерения молекулярного веса γ -глобулина человека. Чистоту белка¹ проводили электрофоретически² в вероналовом буфере (рН 8,6) на аппарате по Лонгсворту и на воздушной ультрацентрифуге при 50 000 об/мин. в 0,15 M NaCl. Константа седиментации, поправленная на температуру, $S_0^{20} = 7,2 S$.

Для измерения светорассеяния γ -глобулин растворяли в 0,15 M NaCl, рН 5—6 (для приготовления всех растворов бидистиллированную воду перегоняли еще раз в цельностеклянном аппарате). Начальные концентрации белка определяли рефрактометрически на прецизионном лабораторном рефрактометре с терmostатированными бипризмами; последующие разведения производили весовым путем. Значения удельного инкремента показателя преломления γ -глобулина заимствовали для всех расчетов из таблиц, приведенных в [10]:

$$[\Delta n/\Delta c]_{546 \text{ мкм}}^{25^\circ} = 0,1890 \text{ мл/г. и } [\Delta n/\Delta c]_{436 \text{ мкм}}^{25^\circ} = -0,1960 \text{ мл/г.}$$

Для очистки от пыли каждый раствор пропускали под небольшим давлением последовательно через стеклянные фильтры № 3 и № 5 (Шотт, Иена) непосредственно в измерительную ячейку. Последнюю предварительно продували сжатым воздухом через стеклянный фильтр № 4. Асимметрия светорассеяния растворов не превышала 1,10. Результаты измерений представлены на рис. 4. Молекулярный вес γ -глобулина оказался в этих опытах равным 151 000 — ($K_{546 \text{ мкм}}^{25^\circ} = 2,343 \cdot 10^{-7}$, деполяризация не учитывалась), что совпадает с данными [11].

Выводы

Списанная в статье модификация прибора для визуальных относительных измерений светорассеяния позволяет получать достаточно надежные результаты. Рациональный выбор конструктивных элементов прибора

¹ γ -Глобулин получен для этих опытов в лиофильно высушеннном виде из Московского НИИ эпидемиологии, микробиологии и гигиены.

² Опыт поставлен Н. Д. Папуш, за что выражаем ей свою признательность.

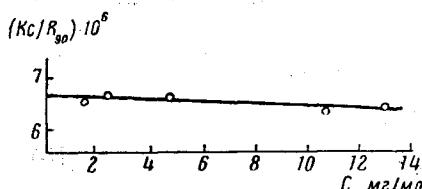


Рис. 4. Зависимость величины $K_c/R_{90} \cdot 10^6$ от c для γ -глобулина человека (пояснения в тексте)

кувете. Эти опыты показали, что обе формы практически неразличимы: относительное расхождение $\Delta x/x < \pm 2\%$, т. е. лежит в пределах указанной выше точности наших измерений.

Для окончательной проверки прибора на нем были произведены измерения молекулярного веса γ -глобулина человека. Чистоту белка¹ проводили электрофоретически² в вероналовом буфере (рН 8,6) на аппарате по Лонгсворту и на воздушной ультрацентрифуге при 50 000 об/мин. в 0,15 M NaCl. Константа седиментации, поправленная на температуру, $S_0^{20} = 7,2 S$.

Для измерения светорассеяния γ -глобулин растворяли в 0,15 M NaCl, рН 5—6 (для приготовления всех растворов бидистиллированную воду перегоняли еще раз в цельностеклянном аппарате). Начальные концентрации белка определяли рефрактометрически на прецизионном лабораторном рефрактометре с терmostатированными бипризмами; последующие разведения производили весовым путем. Значения удельного инкремента показателя преломления γ -глобулина заимствовали для всех расчетов из таблиц, приведенных в [10]:

$$[\Delta n/\Delta c]_{546 \text{ мкм}}^{25^\circ} = 0,1890 \text{ мл/г. и } [\Delta n/\Delta c]_{436 \text{ мкм}}^{25^\circ} = -0,1960 \text{ мл/г.}$$

Для очистки от пыли каждый раствор пропускали под небольшим давлением последовательно через стеклянные фильтры № 3 и № 5 (Шотт, Иена) непосредственно в измерительную ячейку. Последнюю предварительно продували сжатым воздухом через стеклянный фильтр № 4. Асимметрия светорассеяния растворов не превышала 1,10. Результаты измерений представлены на рис. 4. Молекулярный вес γ -глобулина оказался в этих опытах равным 151 000 — ($K_{546 \text{ мкм}}^{25^\circ} = 2,343 \cdot 10^{-7}$, деполяризация не учитывалась), что совпадает с данными [11].

Выводы

Списанная в статье модификация прибора для визуальных относительных измерений светорассеяния позволяет получать достаточно надежные результаты. Рациональный выбор конструктивных элементов прибора

¹ γ -Глобулин получен для этих опытов в лиофильно высушеннном виде из Московского НИИ эпидемиологии, микробиологии и гигиены.

² Опыт поставлен Н. Д. Папуш, за что выражаем ей свою признательность.

сводит его собственное рассеяние к пренебрежимо малой величине, в результате чего точность производимых на нем измерений лимитируется лишь погрешностью в значении калибровочных констант и принципиальными возможностями визуального метода. Модификация повысила также стабильность прибора, выражющуюся в воспроизводимости результатов измерений. Прибор относительно мало чувствителен к смене измерительных ячеек. Сами ячейки просты в изготовлении и значительно облегчают все манипуляции с ними, включая наполнение их исследуемыми растворами через фильтры.

Расчетные формулы прибора, выведенные исходя из понятий яркости и освещенности, содержат единственный поправочный фактор, а именно, n^2 (точнее $(n/n_k)^2$, где n_k — показатель преломления жидкости, применяемой для калибровки). Вывод формулы справедлив и для случая, когда перед входными диафрагмами фотометра Пульфриха установлены добавочные линзы, если только их передние фокальные плоскости находятся в пределах падающего светового пучка.

Автор глубоко признателен Г. Я. Розенбергу за постоянный интерес и ряд ценных советов и замечаний, сделанных им в ходе этой работы.

Центральный институт
гематологии и переливания
крови

Поступила в редакцию
20 IV 1960

ЛИТЕРАТУРА

1. И. Л. Фабелинский, Успехи физ. наук, 63, 355, 1957.
2. С. Я. Френкель, Биохимия, 17, 535, 1952.
3. R. Stein, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc., 68, 159, 1946.
4. И. Г. Соболева, Нефелометр для измерения молекулярного веса и размера молекул полимера, Институт технико-экономической информации АН СССР, М., 1956.
5. C. Pulfrich, Z. f. Instrumentenkunde, 45, 35, 61, 1925.
6. Г. Г. Слюсарев, Геометрическая оптика, М., 1946.
7. А. И. Тудоровский, Теория оптических приборов, ч. 1, М., 1948.
8. C. Carg, B. Zimm, J. chem. Phys., 18, 1616, 1950.
9. K. A. Stacev, The Light-Scattering, New York, 1956.
10. «Белки», под ред. Г. Нейрата и К. Бейли, т. 2, М., 1956.
11. M. Schönenberger, Naturwissenschaften, 10B, 474, 1955.

MODIFIED INSTRUMENT FOR THE MEASUREMENT OF LIGHT SCATTERING IN SOLUTIONS OF POLYMERS AND PROTEINS

V. Ya. Chernyak

Summary

The most important parts of the well known instrument for comparative light scattering measurements employing a Pulfrich photometer, namely, the measuring cell and its thermostat and the «reference line» have been modified. This led to improvement of the sensitivity and the accuracy and reproducibility of its results as well as to simplification of some of the laborious ancillary operations without making the apparatus more involved. By a sufficiently strict account of the specific features of the visual instrument a simple formula has been obtained for calculating R_{90} , containing only one «correction» factor n^2 . Simplified procedures for adjusting the instrument and for its calibration have been described. Results of test measurements of R_{90} for H_2O and CCl_4 as well as of determinations of the molecular weight of human γ -globulin have been presented.