

STRUKTURUNTERSUCHUNGEN VON
BIOMOLEKÜLEN UND STIMULI-SENSITIVEN
POLYMEREN UNTER HOHEN HYDROSTATISCHEN
DRÜCKEN

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT VON

SEBASTIAN GROBELNY

GEBOREN AM 02. FEBRUAR 1985 IN LOSLAU

EINGEREICHT BEI DER
FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND CHEMISCHE BIOLOGIE
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

Dortmund

24. April 2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2010 bis April 2014 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Winter angefertigt.

Prüfungskommission:

Prof. Dr. R. Winter	(Erstgutachter)
Prof. Dr. H. Rehage	(Zweitgutachter)
Dr. S. Zühlke	(Wissenschaftlicher Mitarbeiter)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst danke ich **Herrn Prof. Dr. Roland Winter** für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Zudem möchte ich mich für die Betreuung während der Promotionszeit und die stetige Diskussionsbereitschaft bedanken. Weiterhin möchte ich mich bedanken für die spannenden Projekte sowie Kooperationen und die Möglichkeit an zahlreichen externen Instituten im In- und Ausland forschen zu können.

Herrn Prof. Dr. Heinz Rehage danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Weiterhin gilt mein Dank **Herrn Dr. Sebastian Zühlke** für die Übernahme der Position als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Prüfungskommission.

Bei **Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik** bedanke ich mich für seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Werner Horstmann und **Frau Andrea Kreusel** danke ich für die Hilfe bei allen organisatorischen und administrativen Tätigkeiten.

Ich bedanke mich bei **allen Mitarbeitern sowie ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls Physikalische Chemie I** für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei meinem Studienkollegen und guten Freund **M. Sc. Mirko Erlkamp** bedanke ich mich für die Unterstützung sowie die zahlreichen Erlebnisse während des gesamten Studiums. Danke, dass wir die unzähligen Herausforderungen gemeinsam bestreiten durften!

Meinem guten Freund und Bürokollegen **M. Sc. Christopher Rosin** danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielen Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit und die sehr gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Christian Hofmann von der RWTH Aachen danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn **Dr. Johannes Möller** danke ich für die Unterstützung und die gute Kooperation während der gemeinsamen Messaufenthalte.

Bei der Feinmechanikwerkstatt unter Leitung von **Herrn Holger Konopka** und der Elektronikwerkstatt unter Leitung von **Herrn Ralf Maserski** möchte ich mich für die schnelle Lösung zahlreicher mechanischer oder elektrischer Probleme bedanken.

Meiner **Familie** danke ich für ihr Vertrauen und ihren Rückhalt.

Bei meiner Verlobten **Sabrina Schremmer** bedanke ich mich von ganzem Herzen für die Unterstützung in allen Lebenslagen während der letzten zehn Jahre. Danke für die gemeinsame Zeit!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Experimentelle Methoden	5
2.1	FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie	5
2.1.1	Grundlagen	5
2.1.2	Experimentelles	14
2.2	Röntgen-Kleinwinkelstreuung	16
2.2.1	Grundlagen	16
2.2.2	Experimentelles	23
3	Ergebnisse und Diskussion	27
3.1	Stimuli-sensitive Polymere	27
3.1.1	Einleitung	27
3.1.2	Materialien und Methoden	32
3.1.3	Ergebnisse Mikrogele	36
3.1.4	Ergebnisse lineare Polymere	86
3.1.5	Zusammenfassung	98
3.2	Hochkonzentrierte Proteinlösungen	101
3.2.1	Einleitung	101
3.2.2	Materialien und Methoden	107
3.2.3	Ergebnisse	109
3.2.4	Zusammenfassung	115
3.3	Lipidsysteme	118
3.3.1	Einleitung	118

Inhaltsverzeichnis

3.3.2	Materialien und Methoden	121
3.3.3	Ergebnisse	121
3.3.4	Zusammenfassung	129
4	Zusammenfassung	133
5	Anhang	135
5.1	Stimuli-sensitive Polymere	135
	Literaturverzeichnis	XVII
	Publikationsliste	XIX
	Lebenslauf	XXI

1 Einleitung

Anwendungen von Hochdruckuntersuchungen haben in den letzten Jahren einen rasanten Aufschwung erfahren, da mit Hilfe dieses Parameters eine Vielzahl an Systemen aus den unterschiedlichsten Disziplinen studiert werden kann, um neue Informationen über diese Systeme zu erhalten. Durch Druck wird im Gegensatz zu temperaturabhängigen Messungen nur Volumenarbeit am System verrichtet. Für die Änderung der GIBBS-Energie ΔG zwischen dem Anfangsdruck p_0 und dem Enddruck p ergibt sich:^[1]

$$\Delta G = \int_{p_0}^p V dp \quad (1.1)$$

Dabei werden nur Dichteänderungen beobachtet, die kinetische Energie der Teilchen wird nicht beeinflusst. Gemäß dem Prinzip von LE CHÂTELIER werden Zustände, die ein kleineres Volumen einnehmen, unter Druck bevorzugt. Die Druckabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten (VAN'T HOFF'sche Reaktionsisotherme) K wird wie folgt beschrieben:^[2]

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V}{RT} \quad (1.2)$$

ΔV bezeichnet die Änderung des Volumens bei der Reaktion, R ist die ideale Gaskonstante und T die Temperatur. Analog kann durch Druck auch das Aktivierungsvolumen einer chemischen Reaktion ΔV^\ddagger beeinflusst werden:^[2]

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (1.3)$$

k ist die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion.

Druck ist vergleichsweise ein milder Parameter. Es werden bis zu einem Druck von circa 10 kbar keine kovalenten Bindungen gebrochen oder Bindungswinkel verändert; allerdings verstärkt Druck Wasserstoffbrückenbindungen und schwächt elektrostatische sowie hydrophobe Wechselwirkungen. Druck hat beispielsweise Einfluss auf die Struktur und Dynamik von Molekülen, da durch die Änderung des spezifischen Volumens die Hydratation und die Packungsdichte des Systems beeinflusst werden. Zudem ist mit Druck die Stabilisierung energetisch höher liegender Konformere möglich, die experimentell nur schwer zugänglich sind. Die Hochdruckforschung ist darüber hinaus von großer Bedeutung für das Verständnis von Lebensformen, die unter extremen Bedingungen leben.^[3-7] Beispielsweise sind psychro- und piezophile Tiefseeorganismen in der sogenannten Abyssalebene von circa 3000 m Tiefe einem mittleren Druck von 300 bar bei einer Temperatur von 2 °C ausgesetzt.^[8,9] In der tiefsten Stelle des Ozeans, dem Marianengraben mit 11000 m Tiefe, herrscht sogar ein maximaler Druck von 1.1 kbar. Zusätzlich müssen einige Organismen in der Tiefsee, die an hydrothermalen Quellen leben (sogenannte „schwarze und weiße Raucher“), Temperaturen bis 100 °C bewältigen. In der Pharmaindustrie gelten diese Extremophile als potenzielle Kandidaten für neue Wirkstoffe.^[10] Ein weiteres Forschungsgebiet, das Untersuchungen unter hohen Drücken durchführt, widmet sich der Biochemie von präbiotischen Molekülen und somit der Entstehung des Lebens.^[3] In der Lebensmitteltechnologie gibt es bereits seit Jahren zahlreiche Hochdruckanwendungen, die unter dem Begriff „Pascalisation“ zusammengefasst werden. Die Behandlung von Lebensmitteln mit Druck dient dazu, diese länger haltbar zu machen, da durch Druck Mikroorganismen abgetötet werden, während die Konsistenz, der Geschmack, das Aroma und die Nährstoffe nicht beeinträchtigt werden.^[11-13] Bei der Weinherstellung verhindert Druckapplikation auf Traubenmost die Bildung von Hefen und Schimmel ohne die Eigenschaften des Weins zu verändern.^[14] Großtechnisch wird Druck unter anderem für die längere Haltbarkeit von Käse, Konfitüren, Krustentieren, Fruchtsäften und Guacamole eingesetzt.^[15-17] Für andere Lebensmittel gibt es bereits zahlreiche Studien, wie die Auswirkung hoher hydrostatischer Drücke auf Getreidemahlprodukte oder die Hochdruckbehandlung mariniertes Geflügelfleischprodukte.^[18,19]

Da der Einfluss von Druck in vielen Forschungsbereichen immer noch unbekannt ist,

werden in dieser Arbeit drei verschiedene Systeme studiert, die mit Hilfe der Hochdruck-FTIR-Spektroskopie sowie der Hochdruck-Röntgen-Kleinwinkelstreuung Aussagen über Strukturänderungen sowie Wechselwirkungen zwischen den Molekülen erlauben. Im ersten Projekt werden stimuli-sensitive Polymere auf der Basis von Acrylamidderivaten druckabhängig untersucht. Es ist bekannt, dass diese Polymere ein besonderes temperaturabhängiges Phasenverhalten zeigen und damit einhergehend ihre Größe und die Stärke ihrer Hydratation variieren können. Daher sollen neben den thermo-responsiven auch die piezo-responsiven Eigenschaften erforscht werden. Das zweite Projekt beschäftigt sich mit hochkonzentrierten Proteinlösungen. Hier wird der Einfluss von Druck auf die Wechselwirkungen zwischen den Teilchen untersucht werden. Dadurch wird ein besseres Verständnis von zellähnlichen Konzentrationen unter hohen hydrostatischen Drücken erhalten, wie sie beispielsweise in Organismen im Lebensraum der Tiefsee vorzufinden sind. Das dritte Projekt widmet sich dem druckabhängigen Phasenverhalten von Lipidmischungen, da Lipidmembranen zu den biologischen Molekülen gehören, die die stärkste Drucksensitivität aufweisen. Insbesondere bizellare Systeme aus Zwei- und Fünf-Komponenten-Mischungen stehen hierbei im Fokus dieser Arbeit, die als Matrix für die Untersuchung von membranassoziierten Proteinen und Peptiden dienen sollen.

2 Experimentelle Methoden

2.1 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Die FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) ist eine leistungsstarke Methode zur Analyse von Molekülschwingungen. Sie ist in der Chemie und den Materialwissenschaften vielseitig einsetzbar. Beispielsweise eignet sich diese Methode in der biophysikalischen Chemie zur Charakterisierung von Proteinen, da Aussagen über die Sekundärstrukturelemente sowie das Aggregationsverhalten getroffen werden können. Bei Lipidmembranen können mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie Phasenübergänge beobachtet werden. In den Polymerwissenschaften liefert diese Methode wichtige Erkenntnisse über das Hydratisierungsverhalten sowie Konformationsänderungen von Molekülen. Im Folgenden werden kurz die Grundlagen der FTIR-Spektroskopie vorgestellt, die für die Untersuchung der Systeme in dieser Arbeit notwendig sind. Eine tiefer gehende Beschreibung dieser vielseitig einsetzbaren Methode wird in der Literatur ausführlich dargestellt.^[20-30]

2.1.1 Grundlagen

Die IR-Spektroskopie gehört zum Bereich der Schwingungsspektroskopie und umfasst einen Wellenlängenbereich zwischen $0.8 \mu\text{m}$ und $1000 \mu\text{m}$.^[30] Dabei werden drei Teilbereiche unterschieden: Im nahen Infrarot (NIR) zwischen $0.8 \mu\text{m}$ und $2.5 \mu\text{m}$ werden hauptsächlich Oberschwingungen beobachtet, im mittleren Infrarot (MIR) zwischen $2.5 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$ treten Grundschiebungen auf und im fernen Infrarot (IR) zwischen $50 \mu\text{m}$ und $1000 \mu\text{m}$ kommen Gerüstschwingungen vor. Gemessen wird die Transmission T ($T=(I/I_0)\cdot 100 \%$) oder Extinktion E bzw. Absorption A ($E=\lg(1/T)$) der einfallenden Strahlung als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu} = 1/\lambda$. Die Wellenzahl ist dabei

proportional zur Energiedifferenz der Schwingungsniveaus bei den jeweiligen Übergängen. Voraussetzung für IR-Aktivität ist die Änderung des elektrischen Dipolmomentes $\vec{\mu}_{\text{el}}$ während des Schwingungsvorgangs um eine Auslenkung r :^[1,30]

$$\frac{\partial \vec{\mu}_{\text{el}}}{\partial r} \neq 0 \quad (2.1)$$

Die Auslenkung um eine Gleichgewichtslage ($\Delta r = r - r_0$) während einer Schwingung wird zum Beispiel durch das HOOKEsche Gesetz beschrieben:

$$F_{\text{rück}} = -k \Delta r \quad (2.2)$$

$F_{\text{rück}}$ bezeichnet die rücktreibende Kraft und k ist die Kraftkonstante (Federkonstante), die als Maß für die Stärke einer chemischen Bindung angesehen werden kann. Eine Integration von Gleichung 2.2 liefert die potenzielle Energie E_{pot} des schwingenden Systems und wird durch das Modell des harmonischen Oszillators beschrieben (Abbildung 2.1, links).^[1,30]

$$E_{\text{pot}} = \frac{1}{2} k \cdot \Delta r^2 \quad (2.3)$$

Eine quantenchemische Betrachtung durch Lösen der SCHRÖDINGER-Gleichung zeigt, dass nur bestimmte Energieeigenwerte angenommen werden können:^[30]

$$E_v = h\nu_0 \left(v + \frac{1}{2} \right) = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (2.4)$$

v ist die Schwingungsquantenzahl und kann die Werte 0,1,2,3... annehmen. ν_0 definiert die Eigenschwingung des Systems und μ ist die reduzierte Masse, die für ein zweiatomiges Molekül mit den Massen m_1 und m_2 wie folgt beschrieben wird:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (2.5)$$

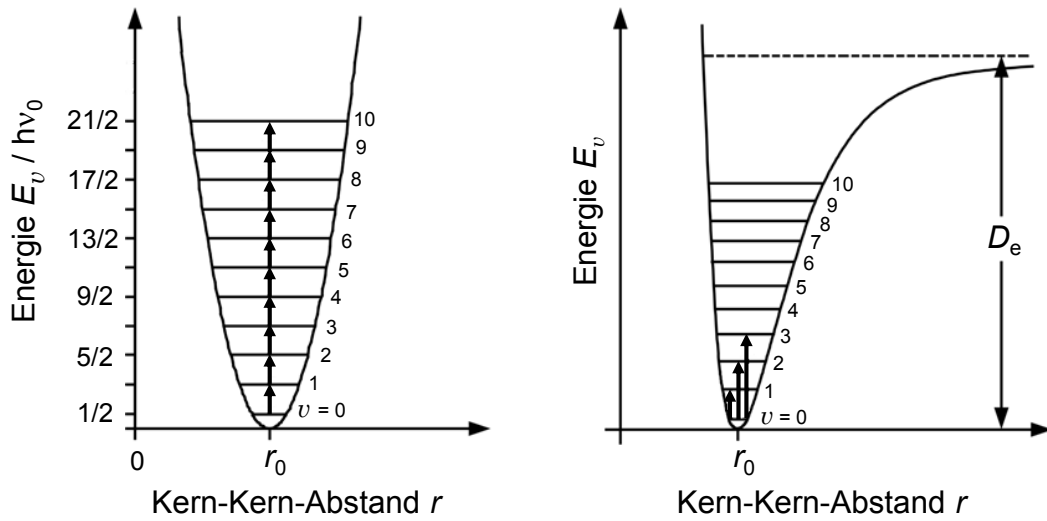


Abbildung 2.1: Energieübergänge im harmonischen Oszillator (links) und anharmonischen Oszillator (rechts).^[30]

Ein weitergehendes Modell zur Beschreibung einer Schwingung gibt der anharmonische Oszillator wieder, der durch Anwendung des empirischen MORSE-Potenzials $V_{\text{Morse}}(r)$ die Pauli-Abstoßung bei Stauchung der Bindung sowie die Dissoziation der Bindung bei großen Abständen berücksichtigt (Abbildung 2.1, rechts). Für $V_{\text{Morse}}(r)$ gilt:^[1]

$$V_{\text{Morse}}(r) = D_e [1 - e^{-a(r-r_e)}]^2 \quad (2.6)$$

mit:

$$a = \sqrt{\frac{1}{2D_e} \left(\frac{\partial^2 V_{\text{Morse}}}{\partial r^2} \right)_{r=r_e}} \approx \sqrt{\frac{k}{2D_e}} \quad (2.7)$$

D_e ist die spektroskopische Dissoziationsenergie ($D_e = D_0 + \frac{1}{2}h\nu_0$), D_0 die chemische Dissoziationsenergie, a die Tiefe des Potenzials und r_e der Atomabstand im Potentialminimum. Für die Energieeigenwerte ergibt sich demnach folgender Zusammenhang:

$$E_v = \tilde{\nu}_e \left(v + \frac{1}{2} \right) - \tilde{\nu}_e \frac{hc\tilde{\nu}_e}{4D_e} \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (2.8)$$

Die Schwingungsmuster mehratomiger Moleküle sind sehr komplex, da sie aus der Überlagerung (Linearkombination) der einzelnen Atomschwingungen mit gleicher Frequenz bestehen. Die Anzahl dieser sogenannten Normalschwingungen (Eigenschwingungen)

ist abhängig von der Anzahl der Atome im Molekül sowie dessen geometrischen Aufbau.^[30] Es wird dabei zwischen Valenzschwingungen, bei denen die Auslenkung entlang der Bindungsachse erfolgt, und Deformationsschwingungen, bei denen sich der Bindungswinkel periodisch verändert, unterschieden. Für lineare Moleküle mit N Atomen existieren $3N-5$ Normalschwingungen mit $N-1$ Valenz- und $2N-4$ Deformationsschwingungen; für nicht-lineare Moleküle treten $3N-6$ Normalschwingungen auf, die sich auf $N-1$ Valenz- und $2N-5$ Deformationsschwingungen aufteilen.

Spektrenaufnahme

Die Detektion der Schwingungsspektren erfolgt heutzutage mit leistungsfähigen FTIR-Spektrometern. Diese bieten gegenüber herkömmlichen IR-Spektrometern mit dispersiven Elementen den Vorteil den gesamten Frequenzbereich simultan zu vermessen. Ermöglicht wird dies mit Hilfe eines sogenannten MICHELSON-Interferometers (Abbildung 2.2), bei dem alle Wellenlängen gleichzeitig erfasst werden.^[20,30]

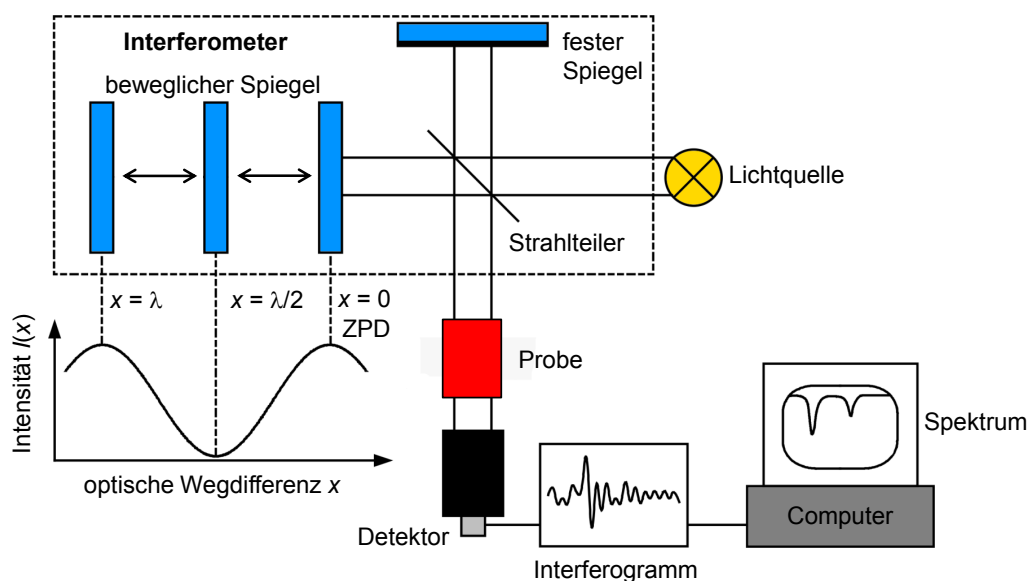


Abbildung 2.2: Aufbau eines FTIR-Spektrometers mit MICHELSON-Interferometer.^[30]

Die Hauptkomponenten des MICHELSON-Interferometers bestehen aus einem halbdurchlässigen Strahlteiler sowie einem festen und beweglichen Spiegel, die senkrecht zueinander angeordnet sind. Der einfallende Lichtstrahl wird durch den Strahlteiler

aufgespalten und in zwei Richtungen abgelenkt. Ein Teil der Strahlung trifft auf den festen Spiegel und wird dort reflektiert, während der andere auf den beweglichen Spiegel gelenkt wird. Ist der Abstand des beweglichen und des festen Spiegels vom Strahlteiler gleich groß, interferieren die beiden Teilstrahlen konstruktiv am Strahlteiler, was zu einer maximalen Intensität der Strahlung führt. Die optische Wegdifferenz x ist dabei gleich Null (engl.: Zero Path Difference, ZPD). Bei einer optischen Wegdifferenz, die ungleich Null ist, schwingen die beiden Teilstrahlen nicht in Phase und interferieren (teil-)destruktiv, was zu einer Verringerung der Intensität führt. Die Intensität des IR-Spektrums in Abhängigkeit der Wegdifferenz $I(x)$ kann durch einen kosinusförmigen Verlauf beschrieben werden:^[30]

$$I(x) = \int_0^{\infty} 2I_0(\tilde{\nu}) R(\tilde{\nu}) T(\tilde{\nu}) [1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x)] d\tilde{\nu} = \int_0^{\infty} A(\tilde{\nu}) [1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x)] d\tilde{\nu} \quad (2.9)$$

I_0 ist die Intensität des einfallenden Strahls, $T(\tilde{\nu})$ bezeichnet die Transmission und $R(\tilde{\nu})$ die Reflektivität des Strahlteilers. Für die Interferogramm-Funktion $F(x)$ folgt unter Berücksichtigung der Intensität $I(\infty)$ bei großer optischer Weglänge:^[30]

$$F(x) = I(x) - I(\infty) = \int_0^{\infty} A(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) d\tilde{\nu} \quad (2.10)$$

Durch FOURIER-Transformation von Gleichung 2.10 wird die spektrale Intensität als Funktion der Wellenzahl $A(\tilde{\nu})$ erhalten:

$$A(\tilde{\nu}) = 4 \int_0^{\infty} F(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx \quad (2.11)$$

Auf Grund der instrumentellen Begrenzung der optischen Weglänge x kommt es zu Abbrucheffekten am Rand des Interferogramms, die durch sogenannte Apodisationsfunktionen unterdrückt werden können. Eine häufig verwendete Funktion ist die HAPPEL-FUNKTION $D_{\text{HG}}(x)$:^[20]

$$D_{\text{HG}}(x) = \begin{cases} 0.54 + 0.46 \cos\left(\frac{\pi x}{x_{\text{max}}}\right) & |x| \leq x_{\text{max}} \\ 0 & |x| > x_{\text{max}} \end{cases} \quad (2.12)$$

x_{\max} bezeichnet die maximale Wegdifferenz des beweglichen Spiegels, bei der die HAPPGENZEL-Funktion langsam gegen Null läuft. Der wesentliche Vorteil der FTIR-Methode liegt, bedingt durch den oben beschriebenen Aufbau sowie der Anwendung mathematischer Operationen, darin, dass ein einzelnes Spektrum innerhalb von wenigen Sekunden aufgenommen werden kann, wodurch sogar die Durchführung schneller kinetischer Messungen möglich ist (Multiplex-/FELLGETT-Vorteil).^[20,30] Ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis wird dadurch erreicht, dass keine Blenden oder Spalte verwendet werden, die den Energiedurchsatz verringern (Lichtleitwert-/JACQUINOT-Vorteil).^[20,30] Zudem wird durch den Einsatz eines Lasers als internen Kalibrierstandard eine sehr hohe Präzision der Wellenzahlen erreicht. Diese ist nötig, da während der Messung eine Mittelung über einige hundert Einzelmessungen stattfindet (CONNES-Vorteil).^[20,30]

Spektrenauswertung

Bei der Analyse eines IR-Spektrums wird meist ein bestimmter Teil des Spektrums betrachtet, der charakteristisch für ein Schwingungsmuster einer bestimmten Gruppe ist. Beispiele sind unter anderem die Amid-I-Bande, die zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} auftritt und die Schwingung einer Carbonylgruppe beschreibt oder die symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingungen von CH_2 -Gruppen, die im Bereich von ca. 2850 cm^{-1} und 2920 cm^{-1} zu finden sind. Letztere werden oft für die Untersuchung des Phasenverhaltens von Lipidsystemen oder der Konformationsänderung von Polymeren herangezogen. Dabei wird die Verschiebung (engl.: shift) des Bandenmaximums (engl.: peak) in Abhängigkeit verschiedener physikalisch-chemischer Parameter beobachtet. Die Analyse der Amid-I-Bande erweist sich als komplexer, da sie aus einer Superposition von sogenannten Subbanden besteht, die spezifisch für die Schwingung der Carbonylgruppe in einer gewissen chemischen Umgebung, Konformation oder beispielsweise bei Proteinen in einem bestimmten Sekundärstrukturelement ist. Die Änderung der Form der Amid-I-Bande in Abhängigkeit diverser physikalisch-chemischer Parameter geht damit auf die Änderung dieser Subbandenanteile zurück, die spektral nicht aufgelöst werden können. Um diese aus der überlagerten Gesamtbande zu extrahieren, sind einige mathematische Operationen, wie die Bildung der 2. Ableitung oder die FOU-

RIER-Selbstenfaltung (engl.: FOURIER Self Deconvolution, FSD), notwendig.^[26,31-33] Dazu wird zunächst der untersuchte spektrale Bereich zur besseren Vergleichbarkeit sowie zu einer quantitativen Auswertung auf die Fläche normiert. Die Ermittlung der Anzahl sowie der genauen Position der jeweiligen Subbanden erfolgt mit Hilfe der Derivativspektroskopie. Dazu wird die 2. Ableitung des Spektrums gebildet:^[20,22,32]

$$\frac{d^2 A(\tilde{\nu})}{d\tilde{\nu}^2} = \int_{-\infty}^{\infty} (2\pi i x)^2 I(x) \cos(2\pi \tilde{\nu} x) dx \quad (2.13)$$

Aus den Positionen der Minima des Derivativspektrums lassen sich die Subbanden genauer zuordnen. Da durch die Wichtungsfunktion $(2\pi i x)^2$ auch das spektrale Rauschen verstärkt wird, wird das Ergebnis der 2. Ableitung mit einer SAVITZKY-GOLAY-Funktion geglättet.^[34] Bei der FOURIER-Selbstentfaltung erfolgt die Verstärkung der einzelnen Subbanden dadurch, dass das gemessene Spektrum als Faltung mit einer Funktion wiedergegeben wird, die charakteristisch für die Linienbreite einer IR-Bande ist. Meist wird dazu eine LORENTZ-Funktion verwendet:^[32]

$$A(\tilde{\nu}) = \sum_{i=1}^N A_i^o \frac{\gamma_i^2}{\gamma_i^2 (\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_i^o)^2} \quad (2.14)$$

A_i^o ist die maximale Absorption der Bande i , $\tilde{\nu}_i^o$ ist die Wellenzahl für A_i^o und γ_i die Halbwertsbreite der Bande auf halber Höhe (engl.: half-width at half-maximum, HWHM). Wird die LORENTZ-Funktion in Gleichung 2.10 eingesetzt, ergibt sich für das Interferogramm:^[31,32]

$$F(x) = \int_0^{\infty} A_i(\tilde{\nu}) \cos(2\pi \tilde{\nu} x) d\tilde{\nu} = \frac{1}{2} A_i^o \gamma_i \cos(2\pi \tilde{\nu}_i^o x) e^{-2\pi x \gamma_i} \quad (2.15)$$

Die Stärke des exponentiellen Abfalls wird durch γ_i bestimmt; je breiter die Bande ist, desto schneller erfolgt der Abfall der FOURIER-Transformierten. Daher wird das Interferogramm $F(x)$ mit einer ansteigenden Exponentialfunktion multipliziert, um eine Bande mit geringer Halbwertsbreite zu erhalten. Aus Gleichung 2.15 folgt:

$$F'(x) = F(x) \cdot e^{2\pi \gamma' x} = \frac{1}{2} A_i^o \gamma_i \cos(2\pi \tilde{\nu}_i^o x) e^{-2\pi x (\gamma_i - \gamma')} \quad (2.16)$$

Da mit dieser Methode auch das spektrale Rauschen verstärkt wird und Abschneideeffekte am Rand des Interferogramms auftreten, wird Gleichung 2.16 mit einer Apodisationsfunktion $D(x)$ multipliziert.^[20,31,32] Für die anschließende inverse FOURIER-Transformation ergeben sich die Halbwertsbreiten (HWHM) der Subbanden nach Entfaltung zu $(\gamma_i - \gamma')$.^[31] Das Verhältnis der Halbwertsbreiten der Original- und der entfalteten Bande wird als Verstärkungsfaktor der Auflösung K bezeichnet:

$$K = \frac{\gamma_i}{\gamma'} \quad (2.17)$$

Typische Werte für K , die einen guten Kompromiss zwischen Verstärkung der Banden und Unterdrückung des spektralen Rauschens bieten, liegen zwischen 1.8 und 2.5 bei einer HWHM von 8 cm^{-1} bis 15 cm^{-1} .^[32] Stimmen die Anzahl sowie die Lage der jeweiligen Subbanden aus der FSD sowie der 2. Ableitung überein, kann eine Funktionsanpassung (Subbanden-/Curve-Fitting) dieser Banden vorgenommen werden. Dazu stehen mehrere Möglichkeiten zur Auswahl. Die Subbanden können zum einen mit Hilfe einer GAUß-Funktion $G(\tilde{\nu})$ beschrieben werden:

$$G(\tilde{\nu}) = \frac{2A}{\gamma_0} \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi}} e^{-4 \ln 2 \left(\frac{\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_0}{\gamma_0}\right)^2} \quad (2.18)$$

$\tilde{\nu}_0$ bezeichnet die Wellenzahl am Intensitäts-Maximum, γ_0 die Halbwertsbreite (HWHM) der Bande und A ist Bandenfläche. Zum anderen ist es auch möglich, eine LORENTZ-Funktion $L(\tilde{\nu})$ zu verwenden:

$$L(\tilde{\nu}) = \frac{2A}{\pi \gamma_0} \cdot \frac{1}{1 + 4 \left[(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_0) / \gamma_0 \right]^2} \quad (2.19)$$

In dieser Arbeit wurde eine pseudo-VOIGT-Funktion $V_{\text{pseudo}}(\tilde{\nu})$ verwendet, die eine gewichtete Funktion aus einer GAUß- und einer LORENTZ-Funktion darstellt:^[27]

$$V_{\text{pseudo}}(\tilde{\nu}) = f \cdot L(\tilde{\nu}) + (1 - f) \cdot G(\tilde{\nu}) \quad (2.20)$$

f ist hierbei der Wichtungsfaktor. Eine reine VOIGT-Funktion ergibt sich aus der Faltung einer GAUß- und einer LORENTZ-Funktion, die für die Funktionsanpassung jedoch

weniger geeignet ist.^[27]

Hochdruck-FTIR-Spektroskopie

Für FTIR-Messungen unter hohen hydrostatischen Drücken haben sich Diamantstempelzellen als nützliches Werkzeug etabliert (Abbildung 2.4).^[35–43] Der Druck wird generiert, indem eine Schraube gegen eine Stahlfeder gedreht wird. Die Druckübertragung auf die Diamanten erfolgt über einen Hebelarm auf eine Stahlplatte, die mit den Diamantstempeln verbunden ist. Es werden brilliant-geschliffene Diamanten des Typs Iia mit einem Oberflächendurchmesser von circa 0.6 mm verwendet.* Mit diesen Diamanten kann ein spektraler Bereich zwischen 38500 cm^{-1} und 2500 cm^{-1} sowie 1800 cm^{-1} und 50 cm^{-1} genutzt werden.^[38] Zwischen den Diamantstempeln befindet sich ein Abstandhalter aus rostfreiem Stahl, der unter Druck fließt und die Probenflüssigkeit gegen die Diamanten abdichtet. Zur Druckbestimmung wird eine geringe Menge eines Druckindikators zur Probe hinzugefügt. Zum einen eignet sich Bariumsulfat (BaSO_4), das eine charakteristische, symmetrische Sulfatstreckschwingung bei etwa 983 cm^{-1} aufweist.† Die Druckabhängigkeit der Wellenzahl dieser Bande lässt sich wie folgt ausdrücken:^[45]

$$p = 2.097 \cdot \Delta\tilde{\nu} + 0.031 \cdot (\Delta\tilde{\nu})^2 \quad (2.21)$$

Zum anderen kann α -Quarz verwendet werden, das charakteristische Schwingungsbanden bei etwa 801 cm^{-1} , 780 cm^{-1} und 695 cm^{-1} besitzt. Für die Druckindikation können die druckabhängigen Verschiebungen der Banden bei 695 cm^{-1} sowie 801 cm^{-1} verwendet werden.^[46] Für Erstere gilt folgender Zusammenhang:

$$p = 1.2062 \cdot \Delta\tilde{\nu} + 0.015054 \cdot (\Delta\tilde{\nu})^2 \quad (2.22)$$

Die Bande bei 801 cm^{-1} zeigt folgende Druckabhängigkeit:

$$p = 1.168 \cdot \Delta\tilde{\nu} + 0.0158 \cdot (\Delta\tilde{\nu})^2 - 0.1660 \quad (2.23)$$

* Die Klassifizierung der Diamanten erfolgt auf Grund der Menge ihrer Verunreinigungen.^[44]

† Der genaue Wellenzahl bei einem Druck von 1 bar hängt von der chemischen Umgebung sowie von der Temperatur ab. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einer bathochromen Verschiebung der Wellenzahlen.

2.1.2 Experimentelles

Die temperaturabhängigen Messungen wurden mit Hilfe eines Nicolet 5700-Spektrometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Es wurde ein MCT-Detektor (HgCdTe, Quecksilber-Cadmium-Tellur) verwendet, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Die temperierbare Messzelle ist in Abbildung 2.3 abgebildet. Die Probe wurde zwischen zwei runden Calciumfluoridfenstern (Maße: 25 x 4 mm, Pike Technologies, Madison, WI, USA) gefüllt, die durch einen Abstandshalter aus Mylarfolie mit einer Stärke von 50 μm und einem Innendurchmesser von 10.5 mm getrennt wurden. Das Probenvolumen liegt typischerweise zwischen 10 μL und 20 μL . Die Temperierung der Zelle (Genauigkeit: $\pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$) erfolgte in einem Stahlmantel, der mit einem externen Wasserbad verbunden war. Die Equilibrierungszeit vor jeder Messung betrug 15 min. Der Probenraum wurde kontinuierlich mit trockener Luft (Adsorptionstrockner Typ 15, Zander, Essen, Deutschland) gespült. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit dem Softwarepaket „OMNIC 7.3“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Um ein möglichst gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu gewährleisten, wurden 256 Spektren pro Messpunkt mit einer spektralen Auflösung von 1 cm^{-1} aufgenommen. Der gemessene Wellenzahlbereich erstreckte sich zwischen 4000 cm^{-1} und 1100 cm^{-1} , wobei die Bandenpositionen mit zwei signifikanten Dezimalstellen ermittelt wurden. Die Apodisation wurde mit Hilfe einer HAPP-GENZEL-Funktion (Gleichung 2.12) durchgeführt.^[20]

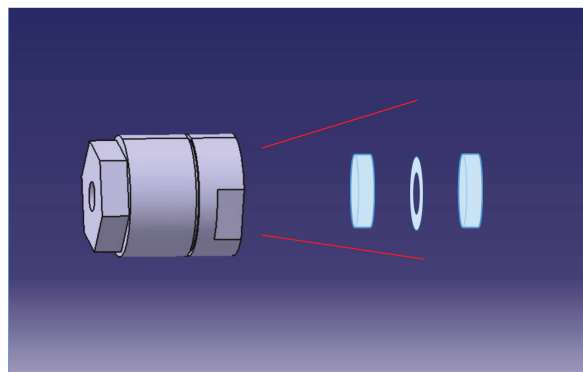


Abbildung 2.3: Temperierbare Messzelle der FTIR-Spektroskopie. Die Probe befindet sich zwischen zwei Calciumfluoridfenstern, die durch einen Abstandshalter separiert werden.

Die druckabhängigen Spektren wurden mit Hilfe eines Nicolet MAGNA 550-Spektrometers (Nicolet Instrument, Offenbach, Deutschland) durchgeführt, wobei ein mit flüssigem Stickstoff gekühlter MCT-Detektor verwendet wurde. Als Druckzelle diente eine Diamantstempelzelle (P-Series, High Pressure Diamond Optics, Tucson, USA) mit Typ IIa-Diamanten, die einen Oberflächendurchmesser (Durchmesser der Deckfläche des Kegelstumpfes) von 0.6 mm besitzen (Abbildung 2.4).^[43] Als Abstandshalter zwischen den Diamanten wurde ein Dichtungsring aus rostfreiem Stahl mit einer Stärke von 50 μm , einem Außendurchmesser von 12.5 mm sowie einem Innendurchmesser 0.45 mm verwendet. Typische Probenvolumina lagen zwischen 7 μL und 10 μL , wobei das effektive Volumen zwischen den Diamanten nur etwa 10 nL betrug. Als Druckindikator wurde BaSO_4 verwendet, das eine charakteristische, drucksensitive Schwingung der Sulfatgruppe bei ungefähr 983 cm^{-1} aufweist. Die Druckgenauigkeit kann so auf $\pm 150\text{ bar}$ (15 MPa) bestimmt werden (siehe Kapitel 2.1.1).^[45] Es wurden Spektren in einem Wellenzahlbereich zwischen 4000 cm^{-1} und 650 cm^{-1} aufgenommen, wobei zwischen den einzelnen Messungen eine Equilibrierungszeit von 15 min eingehalten wurde. Alle weiteren Messparameter waren analog zu den temperaturabhängigen FTIR-Messungen.

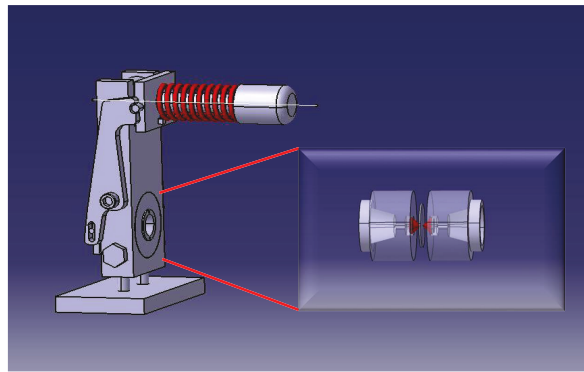


Abbildung 2.4: Diamantstempelzelle der Hochdruck-FTIR-Spektroskopie. Die Probe befindet sich zwischen den beiden Diamanten auf den Diamantstempeln, die durch einen Abstandshalter (Gasket) voneinander getrennt werden.

Die Prozessierung der Daten erfolgte mit der Software „GRAMS/AI 9.1“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Spektren wurden zunächst um den Beitrag des spektralen Rauschens sowie des Lösungsmittels der jeweiligen Proben korrigiert. Um eine Vergleichbarkeit der Spektren zu gewährleisten, wurde eine Normierung auf die Fläche durchgeführt. Eine quantitative Aussage über eine Bandenveränderung konnte durch die Analyse der einzelnen Subbanden, aus deren Superposition sich die gemessene Bande ergibt, getroffen werden. Dazu wurden aus den normierten Spektren die 2. Ableitung sowie die FOURIER-Selbstentfaltung (FSD) gebildet, um die Anzahl sowie die Position der jeweiligen Subbanden zu erhalten. Für die Anpassung der Subbanden wurde eine pseudo-VOIGT-Funktion verwendet (siehe Kapitel 2.1.1).

2.2 Röntgen-Kleinwinkelstreuung

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuung (engl.: small-angle X-Ray scattering, SAXS) ist eine Streumethode zur Strukturbestimmung von Molekülen in der Größenordnung von einigen Ångström bis zu hunderten Nanometern. Deshalb eignet sich diese Methode insbesondere für die Untersuchung von Polymeren und Proteinen. Während für die Durchführung einer Kristallstrukturanalyse die Fähigkeit des Moleküls vorausgesetzt wird, genügend große Einkristalle zu bilden, können mit Hilfe der Kleinwinkelstreuung Strukturen in Lösung bestimmt werden. Obwohl mit SAXS daher im Gegensatz zur Diffraktion an Kristallen keine atomare Auflösung erreicht werden kann, besteht der entscheidende Vorteil dieser Methode darin, dass beispielsweise Proteine in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden können. Im Folgenden werden kurz die Grundlagen der Röntgen-Kleinwinkelstreuung vorgestellt, die für die Untersuchung der Systeme in dieser Arbeit maßgeblich sind. Eine weitergehende Beschreibung dieser leistungsstarken Methode sowie deren vielseitige Anwendung wird in der Literatur ausführlich geschildert.^[30,47–56]

2.2.1 Grundlagen

Streuprozess

Das Prinzip des Streuprozesses bei der Röntgen-Kleinwinkelstreuung wird in Abbil-

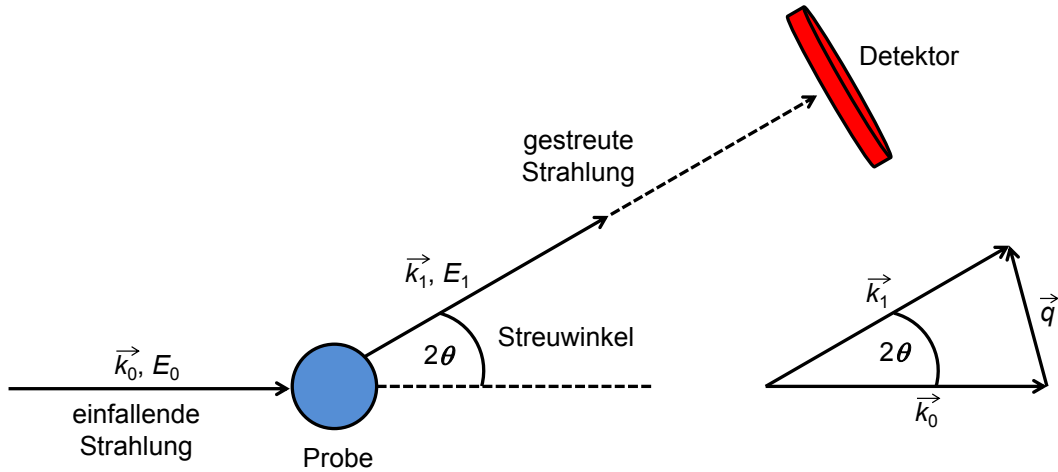


Abbildung 2.5: Geometrie des Streuprozesses. Die einfallende Strahlung wird unter dem Streuwinkel, 2θ , gestreut. Die Richtungsänderung der gestreuten Strahlung wird durch den Streuvektor \vec{q} angegeben.^[30]

Abbildung 2.5 dargestellt. Der einfallende Strahl \vec{k}_0 mit der Energie E_0 trifft als eine ebene, monochromatische, elektromagnetische Welle mit der Wellenlänge λ_0 auf das Probensystem. Der Betrag des Wellenvektors \vec{k}_0 ist wie folgt definiert:

$$|\vec{k}_0| = \frac{2\pi}{\lambda_0} \quad (2.24)$$

Für die Energie E_0 ergibt sich:

$$E_0 = \hbar\omega_0 = \frac{\hbar c}{\lambda_0} \quad (2.25)$$

\hbar ist das PLANCKSche Wirkungsquantum und c die Lichtgeschwindigkeit.

Die gestreute Strahlung breitet sich als Kugelwelle aus und wird unter dem Streuwinkel 2θ im Raumwinkelement $\Delta\Omega$ detektiert.^[30] Somit gilt für den Streuvektor (Wellenvektorübertrag) \vec{q} :

$$\vec{q} = \vec{k}_1 - \vec{k}_0 \quad (2.26)$$

Es wird vorausgesetzt, dass es sich bei der Streuung um einen elastischen, kohärenten Prozess handelt, sodass $\Delta E = 0$, $|\vec{k}_0| = |\vec{k}_1|$ und $\lambda_0 = \lambda_1 = \lambda$ gilt. Für den Betrag des

Streuvektors \vec{q} ergibt sich somit:

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta) \quad (2.27)$$

Intrapartikulärer Strukturfaktor

In verdünnten Systemen, bei denen angenommen wird, dass keine Wechselwirkungen zwischen den Teilchen auftreten und somit keine Interferenzen zwischen den gestreuten Partialwellen entstehen, ergibt sich die Gesamtstreuintensität als Summe der Streuintensitäten der einzelnen Teilchen. Da die Orientierungen der Teilchen in Lösung auf Grund der BROWNSchen Molekularbewegung verschieden sind, gilt für die resultierende Partikelstreu Kurve folgende Beziehung:^[30]

$$I(q) = N_p \left\langle \left| \int_{V_p} \rho(\vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.28)$$

N_p gibt die Anzahl der streuenden Teilchen wieder, $\langle \dots \rangle$ die Mittelung über alle Orientierungen, $|\dots|^2$ das Betragsquadrat der Streuwelle, da die Streuintensität zum Amplitudenquadrat der Streuwelle proportional ist und $\rho(\vec{r})$ ist die Elektronendichte innerhalb des Teilchens am Ort \vec{r} .^[30] Da mit SAXS keine atomare Auflösung erreicht werden kann, wird die Elektronendichte des streuenden Teilchens ρ_p als konstant angesehen. Um jedoch einen Streuprozess beobachten zu können, muss sich die Elektronendichte des Teilchens von der Elektronendichte des Lösungsmittels ρ_s unterscheiden (Kontrast). Für Gleichung 2.28 ergibt sich somit:

$$I(q) = N_p (\rho_p - \rho_s)^2 \left\langle \left| \int_{V_p} e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.29)$$

Der Kontrastfaktor K wird dabei wie folgt definiert:

$$K = V_p (\rho_p - \rho_s) \quad (2.30)$$

V_p gibt dabei das Volumen des Teilchens wieder.

Für den Formfaktor $F(\vec{q})$, der nur von der äußeren Teilchengeometrie abhängt, gilt:

$$F(\vec{q}) = \frac{1}{V_p} \int_{V_p} e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (2.31)$$

Damit folgt für Gleichung 2.29:

$$I(q) = N_p K^2 \langle |F(\vec{q})|^2 \rangle = N_p K^2 \langle P(\vec{q}) \rangle = N_p K^2 P(q) \quad (2.32)$$

$P(q)$ wird als intrapartikulärer Strukturfaktor bezeichnet und ist der über alle Orientierungen gemittelte Formfaktor eines Teilchens. Diese Mittelung kann über folgende Beziehung ausgedrückt werden:^[30]

$$\langle e^{i\vec{q}\vec{r}} \rangle = \frac{\sin(qr)}{qr} \quad (2.33)$$

Dadurch ist es möglich, den intrapartikulären Strukturfaktor $P(q)$ für verschiedene Teilchengeometrien zu berechnen.^[30,51]

GUINIER-Näherung

Mit Hilfe der GUINIER-Näherung ist es möglich, den sogenannten Gyrationradius (Streumassenradius) R_G eines Teilchens aus einer Kleinwinkelstreu Kurve bei kleinen q -Werten zu berechnen. Er ist definiert als der quadratisch gemittelte Abstand aller Streuzentren innerhalb eines Teilchens von dessen Schwerpunkt:^[30,47,51]

$$R_G^2 = \frac{\int_{V_p} r^2 \rho(\vec{r}) d\vec{r}}{\int_{V_p} \rho(\vec{r}) d\vec{r}} \approx \frac{1}{V_p} \int_{V_p} r^2 d\vec{r} \quad (2.34)$$

Bei kleinen q -Werten kann die Streuintensität $I(q)$ näherungsweise wie folgt ausgedrückt werden:

$$I(q) = I(0) \left[1 - \frac{1}{3} q^2 R_G^2 \right] \approx I(0) e^{-q^2 R_G^2 / 3} \quad (2.35)$$

$$\ln I(q) = \ln I(0) - q^2 R_G^2 / 3 \quad (2.36)$$

Die GUINIER-Näherung ist gültig für $qR_G < 1$. Eine Auftragung von $\ln I(q)$ gegen q^2

(GUINIER-Auftragung) liefert aus der Anfangssteigung $-R_G^2/3$ den Gyrationradius R_G .^[30,51]

Abstandsverteilungsfunktion

Mit Hilfe der Abstandsverteilungsfunktion $p(r)$ ist es möglich, die Größe und Form eines Teilchens zu beschreiben. Sie ergibt sich aus der FOURIER-Transformation der gemessenen Streukurve $I(q)$:^[51,52,56]

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q) q r \sin(qr) dq \quad (2.37)$$

Diese Funktion gibt die Häufigkeit an, Abstände von Streuzentren im Molekül zwischen r und $(r+dr)$ zu finden. Dafür müssen die Inhomogenitäten innerhalb eines Teilchens klein sein. Eine Auftragung von $p(r)$ gegen r liefert am Schnittpunkt mit der r -Achse die maximale Größe des streuenden Teilchens D_{\max} . Der Gyrationradius R_G ist mit der Abstandsverteilungsfunktion über folgende Beziehung verknüpft:^[57]

$$R_G^2 = \frac{\int_0^\infty r^2 p(r) dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (2.38)$$

Aus dem Verlauf der $p(r)$ -Funktion lassen sich zudem Aussagen über die Form des Teilchens treffen, die für verschiedene geometrische Körper charakteristisch sind.^[30,51,56]

Interpartikulärer Strukturfaktor

Bei konzentrierten Lösungen ($c > 1$ % w/w) müssen Wechselwirkungskräfte zwischen den streuenden Teilchen berücksichtigt werden. Diese werden durch den interpartikulären Strukturfaktor $S(q)$ zum Ausdruck gebracht. Für Gleichung 2.32 ergibt sich damit:

$$I(q) = N_p K^2 P(q) S(q) \quad (2.39)$$

Für den interpartikulären Strukturfaktor $S(q)$ gilt:^[30,51]

$$S(q) = 1 + 4\pi \frac{N_p}{V} \int_0^\infty r^2 (g(r) - 1) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (2.40)$$

N_p/V bezeichnet die Teilchenzahldichte; $g(r)$ ist die interpartikuläre Paarkorrelationsfunktion und wird durch FOURIER-Transformation von $S(q)$ erhalten:

$$g(r) = 1 + \frac{V}{N_p} \frac{1}{4\pi^2} \int_0^\infty q^2 (S(q) - 1) \frac{\sin(qr)}{qr} dq \quad (2.41)$$

$g(r)$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein Teilchen im Abstand r von einem zentralen Teilchen zu finden. Für große Werte von q bzw. r , gehen $S(q)$ bzw. $g(r)$ gegen einen Wert von 1. Im Fall von nicht zentro-symmetrischen Teilchen wird der interpartikuläre Strukturfaktor $S(q)$ durch den effektiven interpartikuläre Strukturfaktor $S_{\text{eff}}(q)$ ersetzt. Für diesen gilt:^[58,59]

$$S_{\text{eff}}(q) = 1 + \frac{[F(q)]_\Omega^2}{P(q)} (S(q) - 1) \quad (2.42)$$

Streuung an (teil-)geordneten Systemen

Bei Systemen, die eine periodische Nah- und Fernordnung aufweisen, treten Reflexe in der Streukurve auf. Diese entstehen durch Beugung an den Netzebenen eines Kristallgitters und können mit Hilfe der BRAGGSchen Gleichung beschrieben werden:^[30]

$$n\lambda = 2d \sin(\theta) \quad (2.43)$$

mit $n=1,2,3,\dots$. d bezeichnet den Netzebenenabstand im Kristallgitter. Die Wegdifferenz zweier Strahlen, die an benachbarten Netzebenen reflektiert werden, ist dabei das n -fache der Wellenlänge λ . Wird Gleichung 2.27 mit der BRAGGSchen Gleichung verknüpft, so kann der Abstand d zwischen zwei streuenden Teilchen bestimmt werden:

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (2.44)$$

Neben der BRAGGSchen Gleichung, die die Reflexion von Strahlung an Kristallgit-

tern im realen Raum beschreibt, kann dieser physikalische Vorgang auch im reziproken Raum durch die LAUE-Gleichung dargestellt werden. Für einen Streuvektor $\vec{s}_{h,k,l}$ im reziproken Gitter gilt:^[30]

$$\vec{s}_{h,k,l} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^* \quad (2.45)$$

mit:

$$s_{h,k,l}^2 = h^2 a^{*2} + k^2 b^{*2} + l^2 c^{*2} \quad (2.46)$$

h, k, l sind ganze Zahlen und werden als MILLER-Indices bezeichnet. a^*, b^*, c^* sind die reziproken Gitterkonstanten eines Kristallgitters. Für den Betrag des Streuvektors gilt:

$$|\vec{s}_{h,k,l}| = \frac{1}{d_{h,k,l}} \quad (2.47)$$

Für nicht-kristalline Systeme, wie beispielsweise homogene Lipiddispersionen, ist die BRAGGSche Gleichung auch erfüllt, da diese ähnlich wie ein Pulver als zufällig orientierte „Mikrokristalle“ angesehen werden können und somit eine periodische Ordnung aufweisen.^[60] Für lamellare Strukturen gilt beispielsweise folgende Beziehung:

$$\frac{q}{2\pi} = s = n \frac{1}{d} \quad (2.48)$$

mit $n=1,2,3\dots$. Bei hexagonalen Strukturen ergibt sich:

$$\frac{q}{2\pi} = s = n \frac{2}{\sqrt{3}a} \sqrt{h^2 + k^2 + hk} \quad (2.49)$$

a ist die Gitterkonstante des hexagonalen Gitters. Bei einer lamellaren Phase ist es möglich, aus der Halbwertsbreiten des Peaks q_{FWHM} bei einem Streuvektorbetrag q ungefähr die Anzahl der übereinanderliegenden Schichten N_{Schicht} abzuschätzen:^[61]

$$N_{\text{Schicht}} \approx \frac{q}{q_{\text{FWHM}}} \quad (2.50)$$

Wenn die Lipiddispersion keine periodische Anordnung aufweist, wird nur eine diffuse Streuung beobachtet.^[60]

2.2.2 Experimentelles

Die Hochdruckexperimente mittels Synchrotron-Röntgen-Kleinwinkelstreuung wurden an externen Forschungsinstituten mit verschiedenen Hochdruckzellen durchgeführt. Die Strahlungsquellen sowie die eingesetzten SAXS-Zellen werden im Folgenden näher beschrieben.

ESRF

Die SAXS-Messungen an der ESRF (**E**uropean **S**ynchrotron **R**adiation **F**acility, Grenoble, Frankreich) wurden an der Hoch-Brillanz-Beamline ID02 durchgeführt.^[62] Die Energie der Röntgenstrahlung betrug 12.4 keV, was einer Wellenlänge λ von 0.1 nm entspricht. Mittels zweier Undulatoren konnte ein Teilchenfluss von $4 \cdot 10^{13}$ Photonen $\text{s}^{-1} \text{mm}^{-2}$ erzielt werden. Der verwendete Röntgenstrahl hatte eine Größe von $0.37 \times 0.21 \text{mm}^2$. Die Streubilder wurden mit einem CCD-Detektor (engl.: charged-coupled device) aufgenommen, der eine Belichtungsfläche von 100mm^2 (2048×2048 Pixel, Pixelgröße $80 \times 80 \mu\text{m}^2$) besaß (FReLoN Kodak Detektor). Es wurde ein 4×4 Binning mit einer Bildrate von 10 Bildern s^{-1} verwendet. Die Messzeiten lagen typischerweise zwischen 0.05 s und 0.5 s, wobei vor jeder Messung dreimal der Dunkelstrom des Detektors mit gleicher Messzeit aufgenommen wurde. Der Abstand zwischen dem Detektor und der Probe lag in Abhängigkeit des gewünschten q -Bereichs bei 1 m bzw. 5 m, was einem Streuvektorbetrag q von 0.01nm^{-1} bis 2nm^{-1} bzw. 0.001nm^{-1} bis 0.95nm^{-1} entspricht. Die Prozessierung der Streubilder in 1-dimensionale Streukurven erfolgte mit Hilfe einer auf MATLAB basierenden Software („SAXSutilities“, entwickelt von Dr. Michael Sztucki, Grenoble, Frankreich).^[63]

DESY

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente am DESY (**D**eutschen **E**lektronen-**S**ynchrotron, Hamburg, Deutschland) erfolgten an der Beamline BW4 am HASYLAB (**H**amburger **S**ynchrotronstrahlungs-**L**abor).^[64] Es wurde Röntgenstrahlung mit einer Energie vom 8.98 keV verwendet, was einer Wellenlänge λ von 0.138 nm entspricht. Die Wiggler lieferten einen Teilchenfluss von $6.5 \cdot 10^{10}$ Photonen $\text{s}^{-1} \text{mm}^{-2}$. Der erzeugte Röntgenstrahl hatte eine Größe von $0.4 \times 0.4 \text{mm}^2$. Die Belichtungsfläche des CCD-

Detektors (MARCCD 165 Detektor) hatte einen Durchmesser von 16.5 cm (2048×2048 Pixel, Pixelgröße $79.1 \times 79.1 \mu\text{m}^2$). Die Dauer einer Messung betrug 20 min, wobei vor jeder Messung dreimal ein Dunkelstrom aufgenommen wurde. Der Abstand zwischen Probe und Detektor lag in Abhängigkeit des gewünschten q -Bereichs zwischen 2.55 m und 12.4 m, sodass q -Werte zwischen 0.001 nm^{-1} und 2 nm^{-1} realisiert werden konnten. Die Prozessierung der 2-dimensionalen Streubilder in 1-dimensionale Streukurven erfolgte mit Hilfe der Software „Fit2D“.^[65]

Diamond

Am Diamond (Diamond Light Source, Didcot, UK) erfolgten die SAXS-Messungen an der Beamline I22. Die Energie der Röntgenstrahlung betrug 18 keV, was einer Wellenlänge λ von 0.069 nm entspricht. Die Streubilder wurden mit einem CCD-Detektor aufgenommen, der eine Belichtungsfläche von $254 \text{ mm} \times 289 \text{ mm}$ (1475×1679 Pixel, Pixelgröße $172 \times 172 \mu\text{m}^2$) besaß (PILATUS 2M Detektor). Die Belichtungszeit der Probe lag bei 15 s. Der Abstand zwischen Probe und Detektor betrug 5.2 m, sodass ein q -Bereich zwischen 0.2 nm^{-1} und 4.5 nm^{-1} erfasst wurde. Die Prozessierung der 2-dimensionalen Streubilder in 1-dimensionale Streukurven erfolgte mit Hilfe der Software „Fit2D“.^[65]

DELTA

Die SAXS-Messungen am DELTA (**D**ortmunder **E**lektronenspeicherring-**A**nlage, Dortmund, Deutschland) wurden an der Beamline BL9 durchgeführt.^[66] Die Energie der Röntgenstrahlung betrug 10 keV, was einer Wellenlänge λ von 0.124 nm entspricht. Der typische Teilchenfluss am DELTA betrug $5 \cdot 10^9$ Photonen $\text{s}^{-1} \text{ mm}^{-2}$. Die Belichtungsfläche des eingesetzten Detektors (MAR345 Image Plate Detektor) hatte einen Durchmesser von 34.5 cm (2048×2048 Pixel, Pixelgröße $100 \times 100 \mu\text{m}^2$). Die Belichtungszeit der Probe lag bei 20 min. Die Probe wies einen Abstand von 1 m zum Detektor aus, sodass ein q -Bereich von 0.3 nm^{-1} bis 3.5 nm^{-1} erreicht wurde. Die Prozessierung der 2-dimensionalen Streubilder in 1-dimensionale Streukurven erfolgte mit Hilfe der Software „Fit2D“.^[65]

Verwendete Hochdruckzellen

Die erste Hochdruckzelle wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Winter (Lehrstuhl für Physikalische Chemie I) an der Technischen Universität Dortmund von Dr. Jürgen Woenckhaus gebaut.^[67,68] Sie besteht aus rostfreiem Stahl einer Ni-Cr-Co-Legierung (NIMONIC 90) und ist für Drücke bis 4 kbar (400 MPa) und Temperaturen bis 80 °C ausgelegt. Als Fenstermaterial, das nach dem POULTER-Prinzip konstruiert wurde, dienen zwei flache Diamanten (Typ IIa) mit einer Stärke von 1 mm und einem Durchmesser von 6 mm.^[69–71] Der Probenhalter besteht aus einem Teflonring (PTFE, **P**oly**t**etra**f**luoro**e**thyl**e**n), auf dessen Vorder- und Rückseite Mylar- bzw. Kaptonfolie geklebt wird. Das Probenvolumen beträgt 25 μL . Der hydrostatische Druck wird mittels kommerzieller Hochdruck-Spindelpumpen (Hochdruck-Pumpe, NovaSwiss, Effretikon, Schweiz) generiert.

Die zweite Hochdruckzelle wurde von Dr. Christina Krywka im Arbeitskreis von Prof. Dr. Tolan (Lehrstuhl für Experimentelle Physik I) an der Technischen Universität Dortmund konstruiert.^[72] Der Zellkörper ($9 \times 9 \times 8 \text{ cm}^3$) basiert auf rostfreiem Stahl einer Ni-Cr-Legierung (INCONEL 718). Mit dieser Zelle können Drücke bis 4 kbar (400 MPa) ohne Probleme erreicht werden. Der Probenhalter besteht ebenso aus rostfreiem Stahl, auf dessen beiden Seiten Folie aus Kapton bzw. Mylar geklebt wird. Das Probenvolumen liegt bei 55 μL . Der große Vorteil dieser Zelle besteht in einer separaten Öffnung für den Probenwechsel. Auf diese Weise bleibt die Position der beiden Diamantfenster unverändert. Der Druckaufbau erfolgt mit kommerziellen Hochdruck-Spindelpumpen (Hochdruck-Pumpe, NovaSwiss, Effretikon, Schweiz).

Die Hochdruckzelle von Dr. Nick Brooks entstand aus einer Kollaboration zwischen dem Imperial College London und der Beamline I22 der Diamond Light Source.^[73] Die Zelle besteht aus rostfreiem, gehärtetem Stahl (17-4PH, H900 wärmebehandelt) und ist für Drücke bis 5 kbar (500 MPa) ausgelegt. Als Fenstermaterial wird Saphir verwendet. Der Probenhalter besteht aus Teflon, auf dessen Vorder- und Rückseite Kaptonfolie geklebt wird. Das Probenvolumen beträgt 20 μL . Der Druck wird mittels einer Software gesteuert und mit einem Motor hydraulisch aufgebaut (Sitec-Sieber, Zürich, Schweiz).

Drucksprungexperimente können mit Hilfe von pneumatischen Ventilen durchgeführt werden, die durch ein elektronisches Signal der Beamline geregelt wurden, sodass der Drucksprung und die Datenaufnahme synchronisiert werden und eine Messung innerhalb einer Zeit von 5 ms realisierbar ist. Das mit Druckluft betriebene Ventil zwischen der Hochdruckzelle und einem Flüssigkeitsreservoir ermöglicht es zudem, variable Drucksprungamplituden zu vermessen, sodass sowohl ein plötzlicher Druckaufbau als auch eine spontane Druckrelaxation in einem großen Druckbereich durchgeführt werden können.^[67,68]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Stimuli-sensitive Polymere

Das Ziel dieses Projektes besteht in einer umfassenden Untersuchung des Effektes von Temperatur, Druck und Lösungsmittelzusammensetzung auf das Lösungsverhalten von linearen Ketten und Mikrogelen bestehend aus den Homopolymeren PNiPAm und PDEAm sowie deren Copolymere. FTIR-Messungen ermöglichen dabei die Detektion des Hydratisierungszustandes der Polymere. Korrespondierende SAXS-Messungen im Fall der Mikrogele zeigen die Veränderungen der Größe und Struktur und geben so weiteren Aufschluss über das Verhalten von stimuli-sensitiven Polymeren. Diese Studie basiert auf der Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Richtering (Lehrstuhl für Physikalische Chemie II) an der RWTH Aachen. Insbesondere durch die Zusammenarbeit mit Dr. Christian Hofmann konnte dieses Projekt erfolgreich abgeschlossen werden.*

3.1.1 Einleitung

Stimuli-sensitive weiche Materialien spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von sogenannten intelligenten Verbindungen (engl.: smart materials). Einer der bekanntesten Vertreter ist **Poly-(*N*-isopropylacrylamid)** (PNiPAm) (Abbildung 3.1). Wie eine Reihe weiterer *N*-alkyl-substituierter Polyacrylamide zeigt es eine temperaturabhängige Löslichkeit in Wasser (Thermoresponsivität).^[76–78] Oberhalb der unteren kritischen Lösungstemperatur (engl.: lower critical solution temperature, LCST) ändert sich der Grad der Hydratisierung drastisch und das Polymer präzipitiert, das durch eine starke

* Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in den Referenzen^[74,75] publiziert, (Stand 24. April 2014).

Turbidität der Polymerlösung oberhalb des Trübungspunktes zu beobachten ist. Einer der Gründe für das große Interesse an PNiPAm ist die LCST von circa 32 °C, die nahe an der Körpertemperatur liegt und somit für biologische und medizinische Untersuchungen von Bedeutung ist.^[79,80] Zudem ist die LCST über einen weiten Bereich unabhängig vom Molekulargewicht.^[81] Dieser ausgeprägte Rückgang der Hydratisierung führt üblicherweise zu einer Phasentrennung zwischen Polymer und Lösungsmittel. Die Polymerketten gehen oberhalb von 32 °C von einem Zufallsknäuel in eine kollabierte, kompakte Konformation über. Die Ketten aggregieren und fallen aus.^[82]

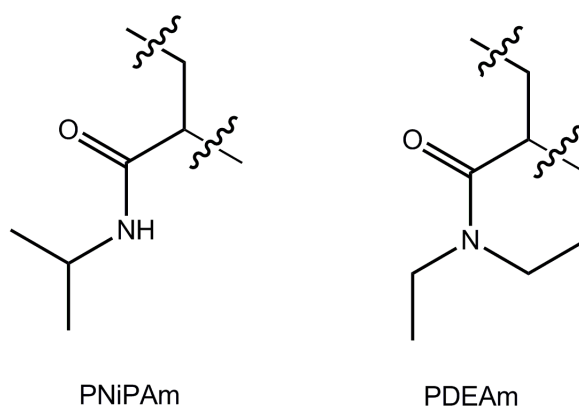


Abbildung 3.1: Strukturformeln von Poly-(*N*-isopropylacrylamid) (PNiPAm) und Poly-(*N,N*-diethylacrylamid) (PDEAm)

Die Phasenseparation kann jedoch durch chemische Vernetzung einzelner Ketten während der Synthese verhindert werden. Es entstehen dann sogenannte Hydrogele. Die Reaktion dieser Gele beim Überschreiten der LCST äußert sich in einer Verringerung des Volumens, da Wasser aus dem Polymernetzwerk austritt. Daher wird bei Gelen die Phasenübergangstemperatur auch Volumenphasenübergangstemperatur genannt (engl.: volume phase transition temperature, VPTT). Der Nachteil der Hydrogele liegt auf Grund ihrer Größe in einer langsamen Antwort auf äußere Veränderungen. Durch die Synthese von sogenannten Nano- oder Mikrogele mit hydrodynamischen Radien, die im Bereich von 10 nm - 1 µm liegen, kann die Reaktion auf äußere Impulse beschleunigt werden.^[83,84] Im Gegensatz zu linearen Ketten erfolgt der Phasenübergang nicht abrupt, sondern verläuft kontinuierlich.^[85,86] Darüber hinaus sind die Mikrogele kolloidal stabil^[87,88] und eignen sich daher unter anderem als vielversprechende Materialien in der Wirkstofffreisetzung^[89] oder als temperatursensitive Stabilisatoren von

Emulsionen.^[90]

Eine andere Eigenschaft von PNiPAm ist, dass es neben der Temperatur auch auf andere Reize wie beispielsweise den pH-Wert, die Ionenstärke oder die elektrische Spannung reagiert.^[79,91,92] In dieser Arbeit ist neben der Temperatur insbesondere der Druckparameter von Interesse. Es ist bekannt, dass hoher hydrostatischer Druck dem Kollaps der Teilchen entgegenwirkt.^[93] Durch Druck können Hydrogele wieder in den gequollenen Zustand überführt werden (Piezoresponsivität).^[94,95] *Pühse, Keerl* und *Meersman* konnten mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie zeigen, dass lineare Polymerketten aus PNiPAm durch hohen hydrostatischen Druck wieder rehydratisiert werden können.^[95–97] Bei einem ähnlichen thermoreversiblen Polymer bestehend aus Poly(2-dimethylamino-ethyl-methacrylat) wurde gezeigt, dass ein Druck von 100 bar (10 MPa) einen Temperatureffekt von 1 K kompensieren kann.^[98]

Eine besondere Möglichkeit, die Größe oder Hydratisierung von PNiPAm zu beeinflussen, besteht in der Variation des Lösungsmittels. Durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Methanol, zu wässrigen PNiPAm-Lösungen kann die LCST deutlich herabgesetzt werden. Das Polymer fällt aus, obwohl PNiPAm in reinem Methanol löslich ist.^[99–102] Dieses Phänomen wird als Cononsolvency-Effekt bezeichnet. Oft wird es auch als Wieder-Eintritts-Phasenverhalten (engl.: re-entrant phase behaviour) beschrieben, da das Polymer durch weitere Zugabe von Methanol wieder in Lösung gebracht werden kann. In wässriger Lösung fällt die LCST von PNiPAm bis zu einem Stoffmengenanteil von Methanol von 20 mol% und steigt dann schnell wieder bis zur Verdampfungstemperatur des Lösungsmittelgemisches an. Dieses Phänomen ist nicht nur auf Methanol beschränkt, sondern ist auch für andere Alkohole^[103,104] und sogar aprotische Lösungsmittel bekannt.^[105,106]

Ein weiteres stimuli-responsives Polymer aus der Gruppe der Acrylamidderivate ist **Poly-(*N,N*-Diethylacrylamid)** (PDEAm) (Abbildung 3.1). Wie PNiPAm ist es thermoreversibel und besitzt eine LCST von circa 30 °C.^[77] Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu PNiPAm ist das Phasenverhalten und die Kompaktheit der kollabierten Teilchen oberhalb der LCST verschieden.^[82,107] Diese Unterschiede haben ihren Ursprung sehr wahrscheinlich im Fehlen des Wasserstoffatoms in der Amid-Gruppe, wodurch keine H-Brückenbindungen ausgebildet werden können.^[107] Bei PDEAm tritt zu-

dem kein Cononsolvency-Effekt auf. Durch Zugabe eines Cosolvens zu einer wässrigen PDEAm-Lösung steigt die LCST kontinuierlich bis zu einer bestimmten Cosolvenskonzentration, ab der die Löslichkeit temperaturunabhängig wird.

Interessant ist daher im Zusammenhang mit dem Cononsolvency-Effekt die Untersuchung von Copolymeren, die aus den Monomeren NiPAm sowie DEAm aufgebaut sind. Die LCST dieser statistischen Copolymere liegt immer unterhalb der LCST der jeweiligen Homopolymere. Das Minimum der Phasenübergangstemperatur wird für Copolymere beobachtet, die aus äquimolaren Einheiten aus NiPAm und DEAm aufgebaut sind.^[108] Die Ursache für diese synergistische Herabsetzung der LCST liegt womöglich in einem idealen, strukturellen Aufbau, da NiPAm sowohl als Protonendonator sowie -akzeptor fungieren kann, während DEAm nur H-Brücken über den Carbonylsauerstoff aufbauen kann. Gestützt wird diese Begründung durch die Untersuchung von Copolymeren, die aus NiPAm und *N*-isopropylmethacrylamid (NiPMAM) aufgebaut sind. Hier steigt die LCST linear von einem Homopolymer zum anderen, da beide Einheiten über ein freies Amid-Proton verfügen, über das sie H-Brücken bilden können.^[109]

Die Ursachen für die verschiedenen stimuli-sensitiven Reaktionen sind bis heute Gegenstand verschiedener Diskussionen. Die Temperatursensitivität wird allgemein auf das empfindliche Gleichgewicht zwischen der Energie der Wasserstoffbrückenbindungen und der Entropie durch Freisetzung von Lösungsmittelmolekülen zurückgeführt, da der Übergang vom gequollenen in den weniger hydratisierten Zustand endotherm verläuft. Das Verständnis dieser Vorgänge ist wichtig, da PNiPAm oft auch als einfaches Modellsystem für die Kältedenaturierung von Proteinen verwendet wird.^[81,89,110]

Wird der Cononsolvency-Effekt mit einbezogen, so wird das Verständnis über die stimuli-responsiven Reaktionen komplizierter, da sehr ähnlich aufgebaute Polyacrylamide, wie zum Beispiel das PDEAm, zwar eine LCST besitzen, aber keinen Cononsolvency-Effekt zeigen. In der Literatur gibt es zwei verschiedene Ansätze für eine molekulare Erklärung dieses Effektes. Der erste bezieht sich auf die Eigenschaften der verschiedenen Lösungsmittelgemische. Für bestimmte Mischungsverhältnisse wird die Bildung von Clustern angenommen, da verschiedene Anomalien für binäre Systeme, wie Wasser/Methanol-Gemische, bekannt sind.^[111] Diese Cluster werden als „schlechte“ Lösungsmittel für PNiPAm angesehen.^[91,112] Die andere mögliche Erklärung basiert auf

der Annahme, dass direkte Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Polymer eine zentrale Rolle spielen.^[113–115] Dieser Ansatz erscheint besonders vielversprechend, da er möglicherweise das Fehlen des Cononsolvency-Effektes im Fall von PDEAm erklären kann, da es im Vergleich zu PNiPAm kein Amid-Proton besitzt.^[116–118]

Für die Detektion der direkten Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Polymer hat sich die FTIR-Spektroskopie als eine sehr nützliche Methode herausgestellt.^[95,97,109,119] Die Analyse der Amid-I'-Bande gibt Auskunft über die Hydratisierung der Carbonyl-Gruppe des Polymers. Sie resultiert aus einer Superposition von verschiedenen Subbanden und liegt je nach Art und Zusammensetzung des Polymers in einem Wellenzahlbereich zwischen 1570 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} .^[120–122] Subbanden bei höheren Wellenzahlen beziehen sich auf eine hydrophobere Umgebung, das heißt, intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Wasserstoff der Amid-Gruppe und dem Sauerstoff der Carbonylgruppe, H-Brücken zu Methanol und freie, nicht gebundene Carbonylgruppen. Subbanden bei kleineren Wellenzahlen werden einem hydrophileren Bereich zugeordnet, das heißt, Carbonylgruppen, die über Wasserstoffbrücken mit einem oder zwei Wassermolekülen verbunden sind.^[95,108,121] Bei Mikrogelen stehen die beobachteten Effekte auf molekularer Ebene in direkter Beziehung zu der Größe und Konformation des Polymers. Lösungsmittel-, temperatur- sowie druckabhängige Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung (engl.: dynamic light scattering, DLS),^[85,123,124] Neutronen-Kleinwinkelstreuung (engl.: small-angle neutron scattering, SANS)^[125,126] und Röntgen-Kleinwinkelstreuung (engl.: small-angle X-Ray scattering, SAXS)^[74] können darüber Aufschluss geben. *Stieger* hat mit Hilfe von SANS-Experimenten gezeigt, dass PNiPAm nicht nur einen Übergang von einem geschwollenen in einen kollabierten Zustand durchläuft, sondern dass gleichzeitig auch die interne Struktur des Mikrogels verändert wird. Die kollabierten Teilchen werden dabei als Kugeln mit einer konstanten Dichte charakterisiert. Im Gegensatz dazu besteht das Mikrogel im geschwollenen Zustand aus einem inneren Kern mit konstanter Dichte, der durch eine äußere Schicht mit radial abnehmender Dichte (engl.: *fuzzy layer*) umgeben wird. Die Abnahme der Dichte wird dabei mit einem GAUß-Profil beschrieben.^[126]

3.1.2 Materialien und Methoden

Die Synthese der linearen Ketten sowie der Mikrogele erfolgte mittels einer radikalischen Emulsions-Polymerisation im Arbeitskreis von Prof. Dr. Richtering (Lehrstuhl für Physikalische Chemie II) an der RWTH Aachen. Tabelle 3.1 zeigt die Bezugsquellen der jeweiligen Chemikalien für die Synthese sowie die Lösungsmittel für die anschließende Charakterisierung der Polymere.

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
<i>N</i> -isopropylacrylamid (NiPAm)	Sigma Aldrich
<i>N,N</i> -Diethylacrylamid (DEAm)	Polysciences
Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN)	Fluka
1,4-Dioxan	VWR
deutერიertes Chloroform	Sigma Aldrich
<i>N,N'</i> -methylen-bis-acrylamid (BIS)	Merck
Kaliumperoxodisulfat (KPS)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Deuteriumoxid (D ₂ O)	Sigma Aldrich
Aluminiumoxid (Al ₂ O ₃)	Sigma Aldrich
deutერიertes Methanol (CD ₃ OD)	Sigma Aldrich

NiPAm wurde umkristallisiert, während bei DEAm das stabilisierende Agens mit Hilfe von Aluminiumoxid entfernt wurde. Für die Herstellung der linearen Ketten wurden die Monomere in 1,4-Dioxan in den entsprechenden molaren Verhältnissen gelöst. Die Lösung wurde entgast und auf 70 °C erhitzt. In 1,4-Dioxan gelöstes AIBN mit einem molaren Verhältnis von 0.17 % bezogen auf den gesamten Monomergehalt wurde zu der Lösung zugefügt. Nach 7 Stunden wurde das Gemisch abgekühlt und gegen Was-

ser dialysiert. Das Endprodukt wird mittels Lyophilisieren erhalten. Die Reinheit des Produktes sowie das Monomerverhältnis wurden in deuteriertem Chloroform durch NMR-Spektroskopie bestimmt. Bei der Synthese der Mikrogele wurden die Monomere zusammen mit dem Quervernetzer BIS (1.5 % w/w) und SDS in Wasser gelöst und auf 70 °C erhitzt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von KPS (gelöst in Wasser) eingeleitet und nach 6 Stunden beendet.^[127] Anschließend wurde analog zu den linearen Polymerketten verfahren.

Die temperaturabhängigen FTIR-Messungen wurden mit einem Nicolet 5700-FTIR-Spektrometer durchgeführt, wobei die experimentellen Parameter verwendet wurden, die in Kapitel 2.1.2 beschrieben werden. Das gemessene Temperaturintervall erstreckte sich von 5 °C bis 40 °C, um einen möglichst breiten Bereich unterhalb und oberhalb der LCST bzw. VPTT zu umschließen. Die Konzentration des jeweiligen Acrylamids betrug bei allen FTIR-Messungen 3 % w/w. Die druckabhängigen FTIR-Messungen erfolgten mit einem Magna 550-FTIR-Spektrometer. Es wurde bei ausgewählten Temperaturen zwischen 10 °C und 40 °C bis zu einem Druck von 10 kbar (1 GPa) gemessen, um so das Druckverhalten der verschiedenen Polymerzusammensetzungen oberhalb und unterhalb ihrer jeweiligen Phasenübergangstemperatur zu untersuchen. Weitere experimentelle Details sind in Kapitel 2.1.2 zu finden. Die Untersuchung der Amid-I'-Bande erfolgte mit Hilfe der Software „GRAMS 9.0“. Die Zuordnung der einzelnen Subbanden ist in Tabelle 3.2 dargestellt und basiert auf bereits bekannten Daten aus der Literatur, die durch Vergleichsmessungen von Homo- und Copolymeren in verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen ergänzt wurden.^[96,108,121] Dabei wurde auf Grund der teilweisen Überlagerung der einzelnen Subbanden die Amid-I'-Bande in drei Bereiche unterteilt. Des Weiteren ist die genaue Position der jeweiligen Subbande in Folge der temperatur- und druckabhängigen Verschiebung des Übergangsdipolmomentes während einer Messung nicht exakt bestimmbar ist. Daher kennzeichnet das erste Segment zwischen 1580 cm⁻¹ und 1610 cm⁻¹ den hydrophilen Bereich und wird starken intermolekularen H-Brücken zwischen der Carbonylgruppe des Polymers und Wasser zugeordnet, wobei mehrere H-Brücken ausgebildet werden können. Der zweite Bereich wird als gemischt hydrophiler/hydrophober Teil bezeichnet. Zwischen 1618 cm⁻¹ und

1625 cm^{-1} sind starke Bindungen des Methanols zur Carbonylgruppe des Acrylamids zu finden. Der Bereich zwischen 1620 cm^{-1} und 1630 cm^{-1} ist etwas komplexer und umfasst neben intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zum Wasser und/oder Methanol auch intramolekulare Wechselwirkungen sowie „freie“ Carbonylgruppen, wie sie beispielsweise verstärkt im PDEAm-Homopolymer vorliegen. Das hydrophobe Segment beinhaltet intramolekulare H-Brücken zwischen der Carbonylgruppe und dem Amid-Proton (1638 cm^{-1} - 1650 cm^{-1}) sowie intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Methanol und der C=O-Gruppe (1648 cm^{-1} - 1670 cm^{-1}).

Tabelle 3.2: Zuordnung der einzelnen Bereiche der Amid-I'-Bande der verschiedenen linearen Ketten und Mikrogele bei unterschiedlichen Lösungsmittelzusammensetzungen. ^[108,121]

Bandenzuordnung	Wellenlängenbereich / cm^{-1}
Hydrophiler Bereich	
Intermolekulare H-Brücken zwischen der Carbonylgruppe und D_2O	1560 - 1615
Gemischt hydrophiler / hydrophober Bereich	
Intermolekulare H-Brücken zwischen der Carbonylgruppe und CD_3OD	1618 - 1625
Intermolekulare H-Brücken zwischen der Carbonylgruppe und/oder $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ z.T. auch intramolekulare Wechselwirkungen	1620 - 1630
Hydrophober Bereich	
Intramolekulare H-Brücken zwischen der Carbonylgruppe und dem Amid-Proton	1638 - 1650
Intermolekulare H-Brücken zwischen der Carbonylgruppe und CD_3OD	1648 - 1670

Die SAXS-Messungen wurden an der ESRF (ID02) sowie am DESY (Hasylab BW4) mit den Hochdruckzellen von *Woenckhaus*^[67] bzw. *Krywka*^[72] durchgeführt. Die Details der einzelnen Beamlines sowie der Messzellen sind in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Die Konzentration des Mikrogeles betrug 0.5 % w/w. Es wurde in einem Temperaturbereich zwischen 10 °C und 50 °C gemessen, um Bereiche unter- und oberhalb der VPPT im jeweiligen Lösungsmittelgemisch abzudecken. Die druckabhängigen Messungen erfolgten

in 100 bar Schritten (10 MPa) bis zu einem Maximaldruck von 2500 bar (250 MPa). Die Datenprozessierung wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Eine quantitative Beschreibung der Streukurven mittels einer Funktionsanpassung erfolgte mit Hilfe eines von *Stieger et al.* beschriebenen Modells für Mikrogel.^[126] Mit diesem Modell ist es möglich, sowohl die Gesamtteilchenform als auch die interne, inhomogene Struktur des Mikrogelnetzwerkes zu charakterisieren. Abbildung 3.2 zeigt die Struktur eines Mikrogels im hydratisierten Zustand.

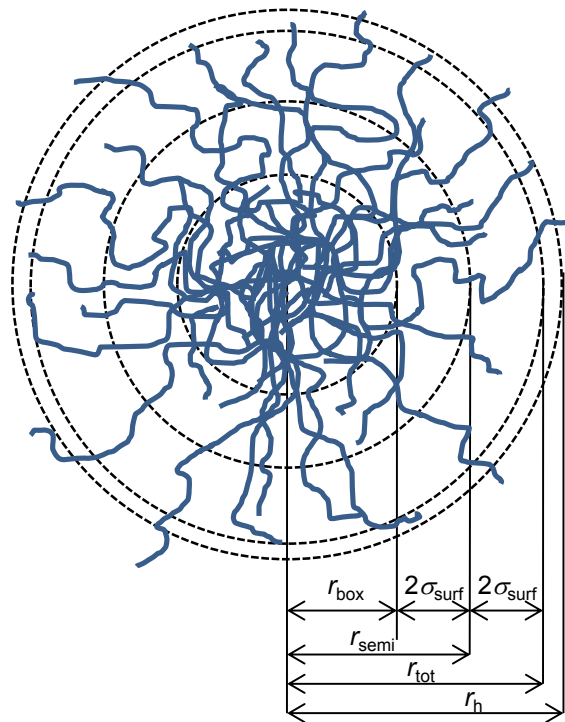


Abbildung 3.2: Modell der Struktur eines Mikrogels im hydratisierten Zustand. r_{box} : Radius des Kerns, r_{semi} : Radius bei halber Dichte des Kerns, r_{tot} : Gesamtradius, r_{h} : hydrodynamischer Radius, σ_{surf} : kennzeichnet die diffuse Schicht.^[126]

Ein stark quervernetzter Kern wird durch ein radiales Kasten-Profil r_{box} beschrieben. Die Vernetzerdichte nimmt mit steigendem Abstand vom Kern ab und wird durch eine diffuse Schicht σ_{surf} charakterisiert. Bei r_{semi} ist die Dichte des Kerns bereits um die Hälfte abgefallen. Die Gesamtgröße r_{tot} ergibt sich aus $r_{\text{tot}} = r_{\text{box}} + 4 \cdot \sigma_{\text{surf}}$; r_{tot} ist dabei etwas kleiner als der hydrodynamische Radius r_{h} , der aus DLS-Messungen erhalten wird. Mathematisch wird das Profil P_{inhom} mit dem Formfaktor eines sphärischen Teilchens beschrieben, dessen inhomogene Dichte mit einer radial abnehmenden

GAUSS-Funktion wiedergegeben werden kann:

$$P_{\text{inhom}}(q) = \left[\frac{3 [\sin(qr) - qr \cos(qr)]}{(qr)^3} \cdot e^{-\frac{(\sigma_{\text{surf}}q)^2}{2}} \right]^2 \quad (3.1)$$

3.1.3 Ergebnisse Mikrogele

Die stimuli-sensitiven Mikrogele wurden neben der FTIR-Spektroskopie auch mit Hilfe von Röntgen-Kleinwinkelstreuung druckabhängig untersucht. Dadurch ist es möglich, den Grad der Hydratisierung direkt mit der Struktur und Größe der Teilchen zu korrelieren. Insbesondere das Druckverhalten des Cononsolvency-Effektes stand bei dieser Untersuchung im Vordergrund.

FTIR-Spektroskopie

Mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie wurden die Mikrogele bestehend aus den Homopolymeren PNiPAm und PDEAm sowie dem Copolymer PNiPAm/PDEAm (molares Verhältnis 1:1) in Abhängigkeit der Temperatur und des Drucks in verschiedenen Wasser/Methanol-Gemischen untersucht. Dabei wurde die Amid-I'-Bande untersucht, da sie durch das H-Brückennetzwerk des Mikrogels Informationen über verschiedene Hydratisierungszustände bereitstellt.

PNiPAm-Mikrogel

Die normierten Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande des PNiPAm-Mikrogels in Abhängigkeit der Temperatur sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Es wurde in einem Temperaturbereich zwischen 5 °C und 40 °C gemessen, sodass sowohl der hydratisierte als auch der kollabierte Zustand des Mikrogels eingeschlossen wurden. Aus dem Verlauf der Spektren wird deutlich, dass mit zunehmender Temperatur eine hypsochrome Verschiebung der Maxima erfolgt, was auf eine Zunahme der hydrophoben Strukturen im Mikrogel schließen lässt. Zudem ist aus dem temperaturabhängigen Verlauf der Spektren ein isobestischer Punkt erkennbar, was ein gemeinsames Merkmal aller Mikrogel-Spektren ist. Dies deutet auf ein Zwei-Zustandsmodell hin, das bei diesem System mit dem hydratisierten bzw. kollabierten Zustand in Verbindung gebracht werden kann. Eine quantitative Analyse der Amid-I'-Bande erfolgt durch eine Funktionsanpassung

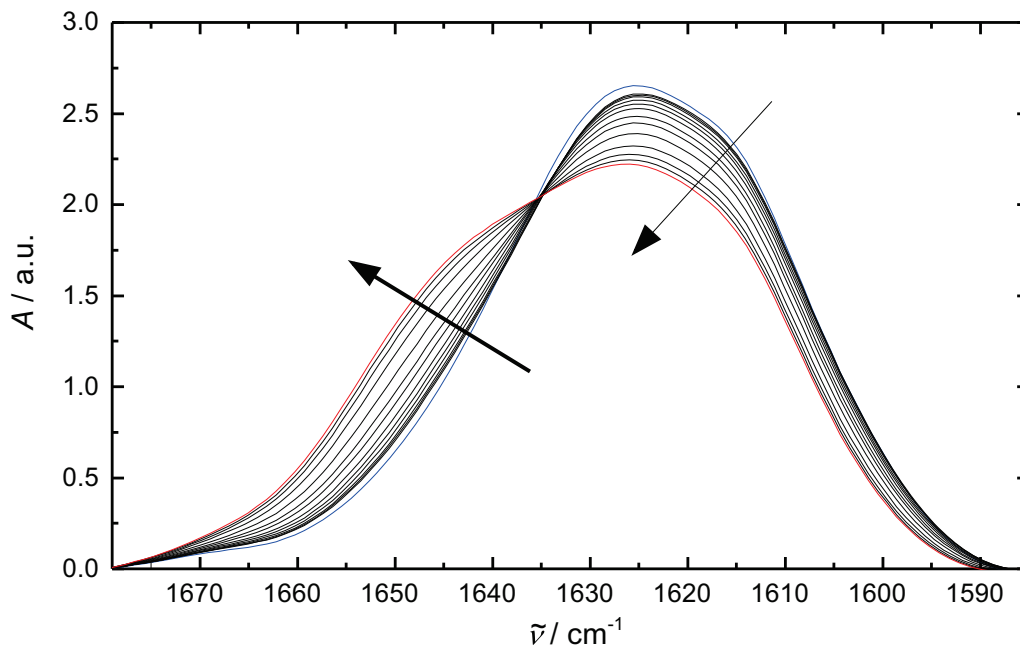


Abbildung 3.3: Normierte Spektren der Amid-I'-Bande des PNiPAM-Mikrogels in D_2O zwischen $5\text{ }^\circ\text{C}$ und $40\text{ }^\circ\text{C}$. Der Verlauf der Spektren (Richtung der Temperaturerhöhung) wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei $5\text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $40\text{ }^\circ\text{C}$.

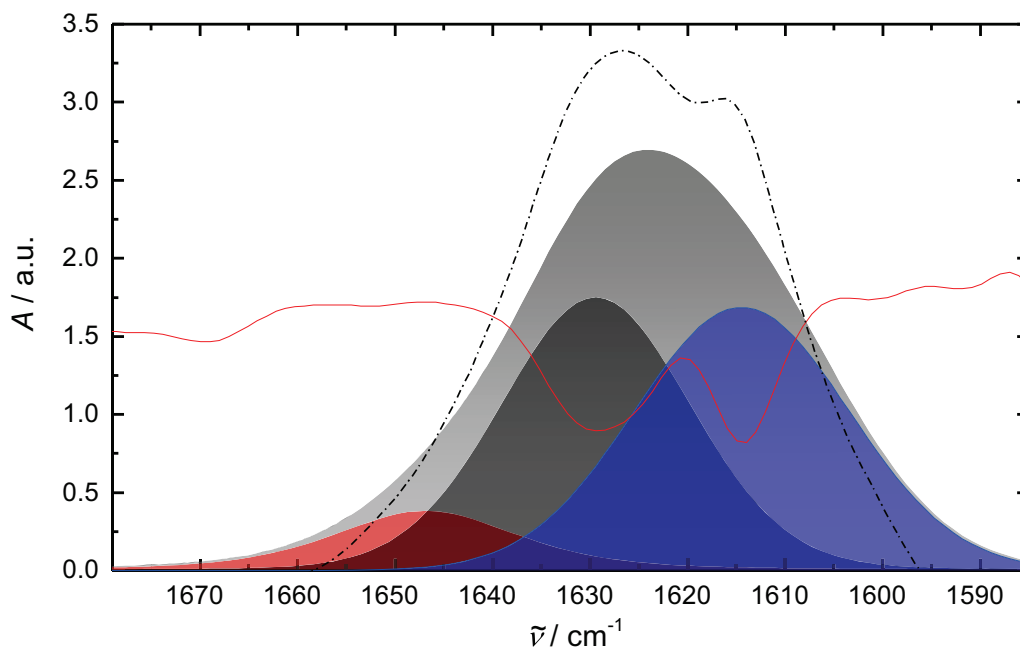


Abbildung 3.4: Analyse der Amid-I'-Bande des PNiPAM-Mikrogels bei $5\text{ }^\circ\text{C}$. Die normierte Gesamtbande (grau) wird durch drei Subbanden charakterisiert: hydrophiler Bereich (blau), gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich (dunkelgrau), hydrophober Bereich (rot). Die rote Linie repräsentiert die 2. Ableitung und die schwarze, gestrichelte Linie das FSD-Spektrum.

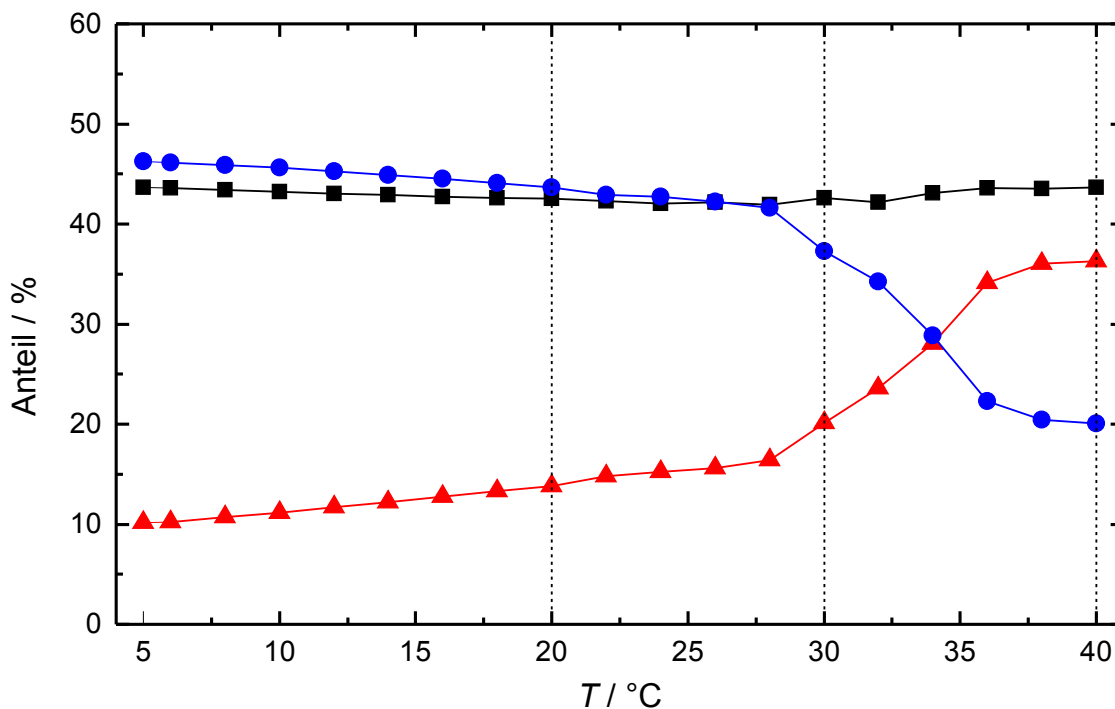


Abbildung 3.5: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in D_2O in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

mit Hilfe von drei Subbanden, deren Fläche den relativen, prozentualen Anteil an der Gesamtbande widerspiegeln (Abbildung 3.4). Die Zuordnung der einzelnen Subbanden basiert auf der in Tabelle 3.2 aufgeführten Bereiche. Die Informationen, der genauen Bandenposition stammen aus der Bildung der 2. Ableitung sowie der FOURIER-Selbstentfaltung des normierten Spektrums. Wie in Abbildung 3.4 zu sehen, müssen für eine eindeutige Bestimmung der Anzahl und Position der Subbanden die Minima der 2. Ableitung mit den Maxima aus dem FSD-Spektrum übereinstimmen. Bei einer Temperatur von 5 °C sind zwei Banden sehr scharf ausgeprägt, die dem hydrophilen Segment im Spektrum zugeordnet werden. Der hydrophobe Bereich hingegen ist in diesem Zustand nur ganz schwach ausgebildet, sodass die Subbande bei einer Wellenzahl von ca. 1650 cm^{-1} nur sehr klein ist. Eine temperaturabhängige Analyse der Flächenanteile der drei Subbanden ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Hier ist klar zu sehen, dass der hydrophobe Teil mit 10.1 % gegenüber dem gemischt hydrophilen/hydrophoben und hydrophilen Bereich mit 43.6 % bzw. 46.2 % nur einen geringen Anteil ausmacht. Das

bedeutet, dass das Mikrogel vollständig hydratisiert vorliegt. Die Bindungen des Amid-Protons zur Carbonylgruppe (Bande bei 1650 cm^{-1}) stammen höchstwahrscheinlich aus dem Kern des Mikrogel, wo die Dichte der quervernetzten Ketten relativ hoch ist (vgl. Modell von *Stieger*^[126], Kapitel 3.1.2). Mit steigender Temperatur nimmt der Anteil dieser Subbande kontinuierlich zu, während die Bande bei 1600 cm^{-1} , der die starken Bindungen zum Wasser zugeordnet werden, kleiner wird, was auf eine temperaturinduzierte Dehydratisierung des Mikrogels schließen lässt. Der Volumenphasenübergang findet bei circa 32 °C statt und liegt damit in guter Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur.^[79,80] Oberhalb der VPTT steigt der Anteil der Bande bei 1650 cm^{-1} auf 36.3% an, während der Anteil des hydrophilen Bereichs auf 20.1% bei 40 °C fällt. Die gemischte Bande fällt zunächst kontinuierlich ab und steigt nach dem Phasenübergang wieder leicht an. Dies lässt darauf schließen, dass auch hier Wasser, das nur eine H-Brücke zur Carbonylgruppe ausbildet, das System verlässt. Nach dem Phasenübergang dominieren die hydrophoben Anteile, aber das Mikrogel bleibt immer noch leicht hydratisiert, da es im Gegensatz zu linearen Ketten kolloidal stabil ist und nicht ausfällt.

Um den Einfluss von Druck auf verschiedene Zustände des Systems zu untersuchen, wurden Druckmessungen bei 20 °C , 30 °C und 40 °C durchgeführt, wobei sich der Druckbereich von 1 bar bis 10 kbar erstreckte. Die korrespondierenden FTIR-Spektren sind in Abbildung 5.1 (siehe Anhang) zu sehen. Aus dem druckabhängigen Verlauf der Spektren ist bereits zu sehen, dass diese im Gegensatz zur Temperaturmessung zu kleineren Wellenzahlen verschoben werden, was auf eine stärkere Hydratisierung des Mikrogels hindeutet. Die Funktionsanpassung der Subbanden erfolgte bei den Druckspektren analog zu den temperaturabhängigen Messungen. Die Fitergebnisse der druckabhängigen Messungen bei den jeweiligen Temperaturen sind in den Abbildungen 3.6 - 3.8 dargestellt. Bei einer Temperatur von 20 °C und Atmosphärendruck liegen die Anteile der drei Segmente bei 13.8% für den hydrophoben, bei 45.7% für den gemischten und bei 42.6% für den hydrophilen Bereich, und stehen daher im Einklang zu den Ergebnissen aus den temperaturabhängigen Messungen. Mit Druckapplikation wird das PNIPAm-Mikrogel bei dieser Temperatur noch stärker hydratisiert, was einem Anstieg der hydrophilen Bande auf etwa 47% bei einem Druck von circa 1 kbar zu entnehmen

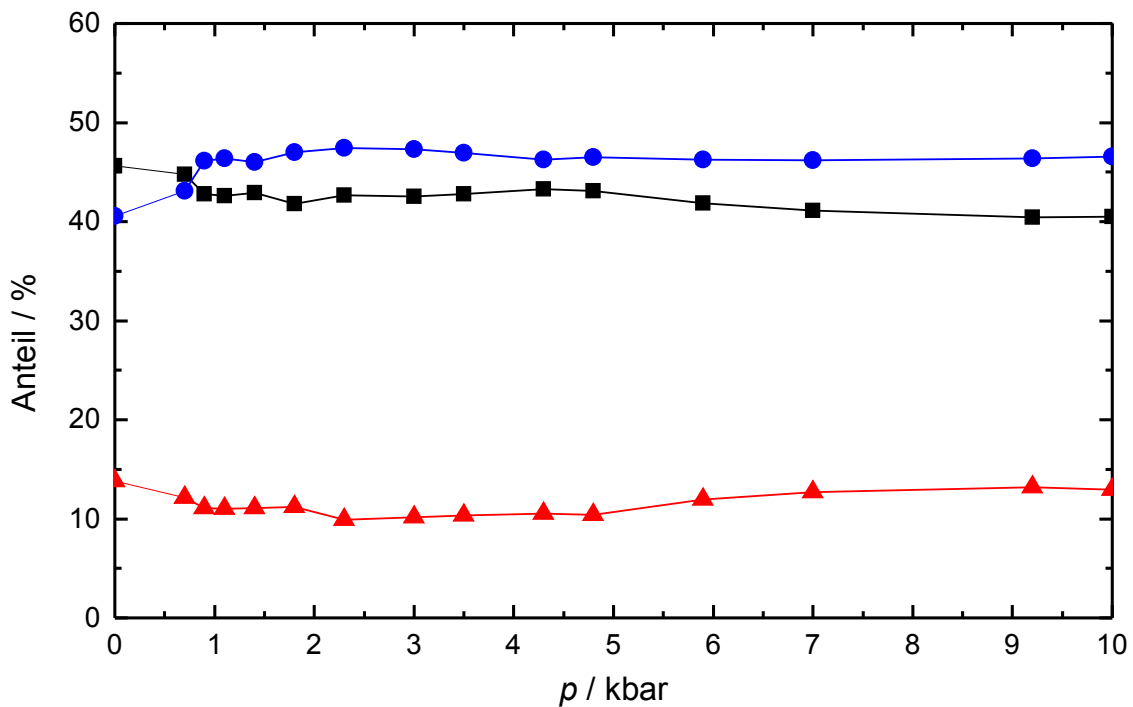


Abbildung 3.6: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in D₂O bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

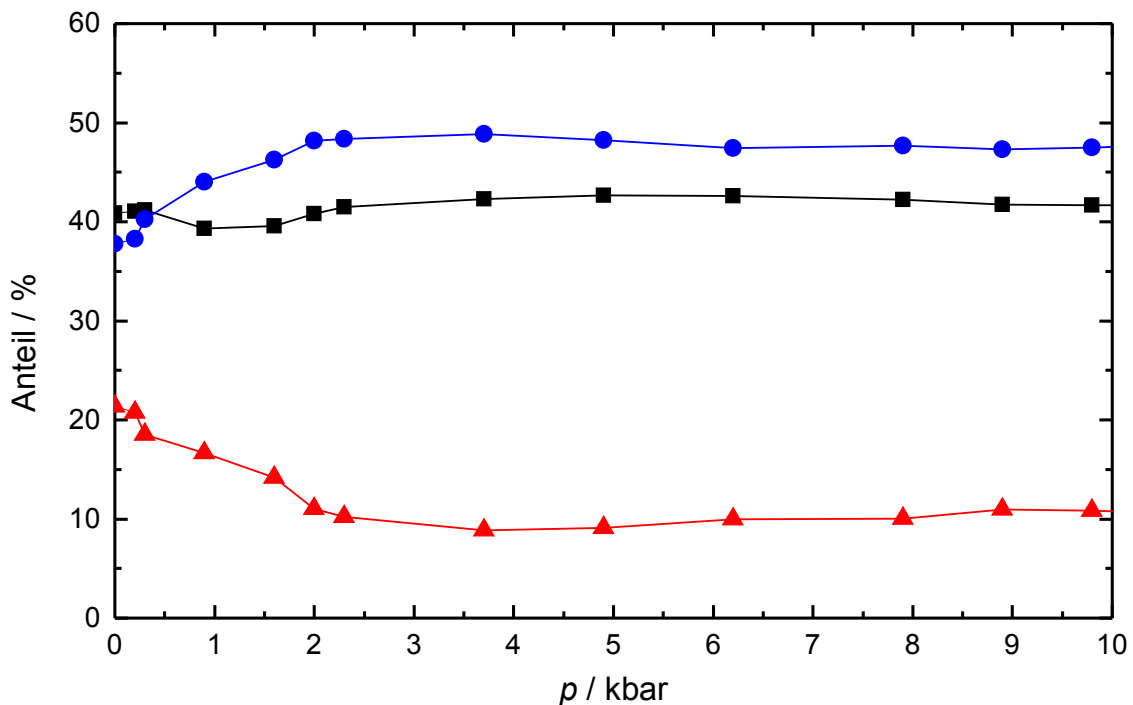


Abbildung 3.7: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in D₂O bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

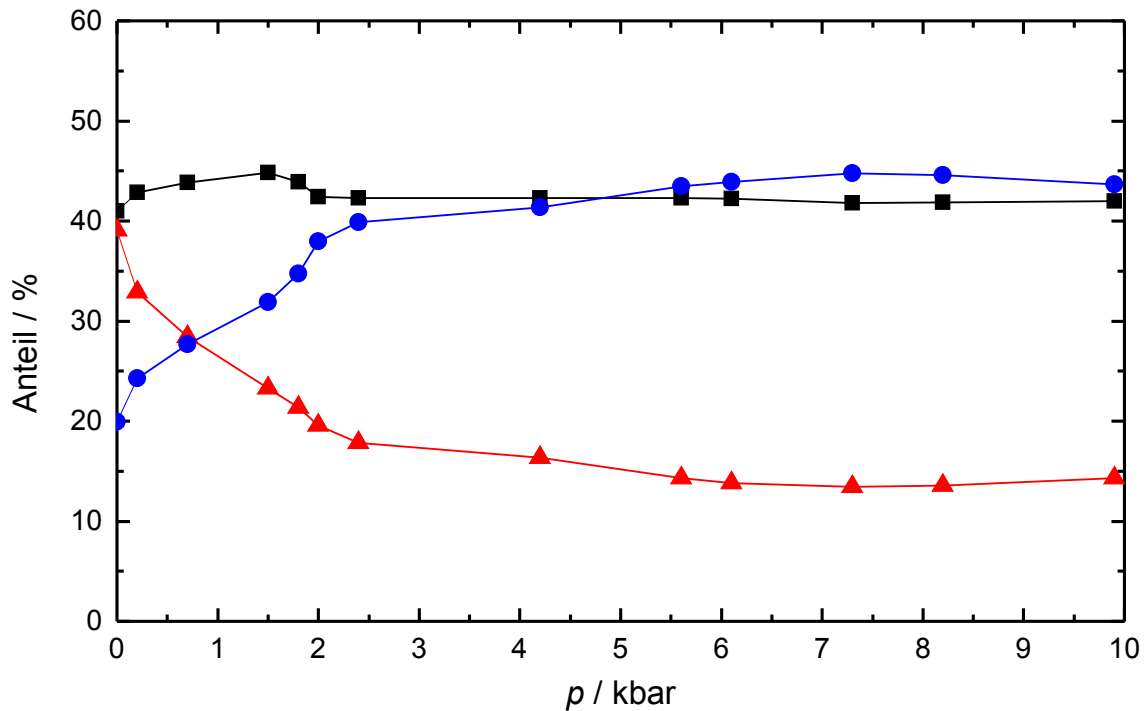


Abbildung 3.8: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAm-Mikrogels in D₂O bei 40 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

ist, während der hydrophobe Anteil simultan abnimmt. Diese Werte bleiben über einen großen Druckbereich hin konstant und ändern sich erst bei sehr hohen Drücken (> 5 kbar) leicht, was auf eine mögliche Kompression des Mikrogels zurückgeführt werden kann. Bei einer Temperatur von 30 °C befindet sich PNiPAm nahe am Übergang zum kollabierten Zustand. Hier liegt der hydrophobe Anteil bereits bei 21.4 %, während die Bande zum Wasser auf 37.8 % gesunken ist. Der Applikation von Druck folgt das System mit einer spontanen Antwort. Es wird erneut eine Hydratisierung des Mikrogels beobachtet, die bei 2 kbar einen Plateauwert erreicht. Bereits bei einem Druck von 1 kbar beträgt der Anteil der hydrophilen Bande circa 44 %, was einem Wert in der Temperaturmessung von etwa 20 °C entspricht. Damit ergibt sich eine CLAYPERONSche Steigung dp/dT , die die Phasengrenzlinie zwischen dem gequollenen und kollabierten Zustand angibt, von circa 100 bar K^{-1} . Dieser Wert steht im Einklang mit einer Neutronenreflektivitätsstudie, die die Druckabhängigkeit eines ähnlichen Polymers auf einer adsorbierten Oberfläche behandelt.^[98] Die Plateauwerte bei 30 °C entsprechen den Resultaten bei 20 °C und zeigen damit, dass durch Druck eine Hydratisierung des Mi-

krogels stattfindet, die durch den molekularen Aufbau auf Grund der Vernetzerdichte begrenzt wird. Zudem steht dem Hydratisierungseffekt der Beitrag durch die druckinduzierte Kompression des Mikrogels gegenüber. Ein kleiner Unterschied besteht jedoch bei der Druckmessung bei 40 °C. Auch hier erzeugt Druck eine Hydratisierung des Systems, allerdings fallen die Plateauwerte für die Bande bei 1600 cm⁻¹ etwas geringer bzw. bei 1650 cm⁻¹ höher aus als bei den Messungen unterhalb der VPTT. Offenbar kann Druck den Temperatureffekt nicht vollständig umkehren, wie es bereits bei ersten Messungen mit linearem PNiPAm unter Druck vermutet wurde.^[95]

Um zusätzlich den Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf das PNiPAm-Mikrogel zu studieren, wurden die temperatur- sowie druckabhängigen FTIR-Messungen bei verschiedenen Methanolkonzentrationen durchgeführt. Es ist bekannt, dass mit steigendem Methanolgehalt (bis 20 mol%) die Phasenübergangstemperatur gesenkt wird, was als Cononsolvency-Effekt bezeichnet wird.^[99–102] Allerdings gibt es bisher noch keine Studie zur Druckabhängigkeit dieses Verhaltens. In Abbildung 3.9 sind daher zunächst die Ergebnisse für die temperaturabhängigen Messungen in 5 mol% Methanol dargestellt (korrespondierende, normierte Spektren in Abbildung 5.2). Aus dem Verlauf der Banden wird das typische Verhalten des Mikrogels bei Temperaturerhöhung beobachtet. Das Mikrogel fällt aus, allerdings liegt die Phasenübergangstemperatur nicht mehr bei 32 °C, sondern bei circa 26 °C. Der Einfluss des Methanols ist im Vergleich zu reinem D₂O auch in den jeweiligen Bandenanteilen erkennbar. So steigt der Wert der hydrophoben Bande auf 13.5 %, da hier neben der Bindung des Amid-Protons auch die H-Brücken des Methanols zur Carbonylgruppe vertreten sind. Dementsprechend sinkt der Beitrag der hydrophilen Bande auf ≈ 39 % bei 5 °C und ≈ 19.5 % bei 40 °C, da sich weniger Wasser im System befindet.

Die druckabhängigen Spektren bei 20 °C, 30 °C sowie 40 °C sind in den Abbildungen 3.10 - 3.12 dargestellt. Die Startwerte bei einem Druck von 1 bar entsprechen den Ergebnissen aus der korrespondierenden Temperaturmessung. Bei 20 °C ist zu erkennen, dass Druck erneut eine stärkere Hydratisierung des Mikrogels hervorruft. Die Bande bei 1600 cm⁻¹ steigt stark an und erreicht bei ca. 2 kbar einen Plateauwert von 45.1 %. Bei einem Druck von etwa 1 kbar liegt der Wert für die Bande bei ungefähr 40 %, was in etwa 10 °C in der Temperaturmessung entspricht und somit erneut die

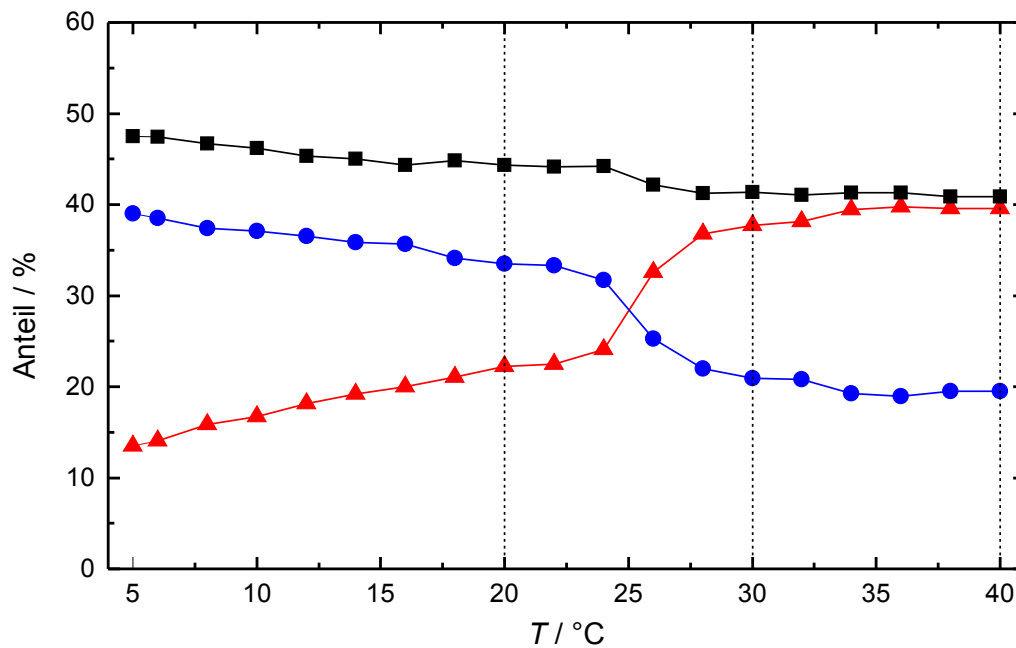


Abbildung 3.9: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 5 mol% CD₃OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

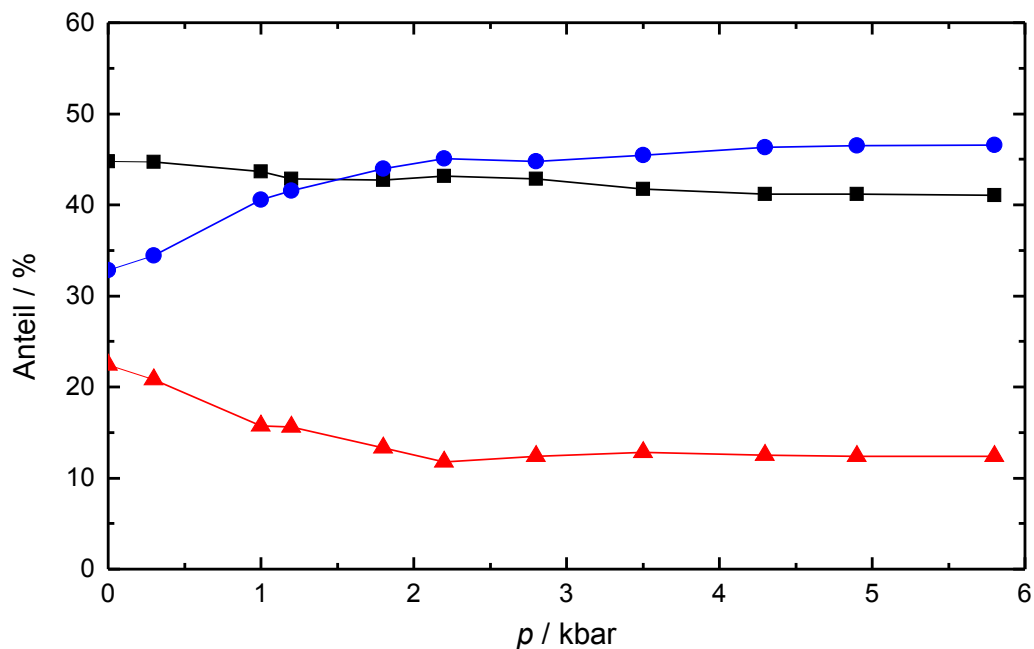


Abbildung 3.10: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 5 mol% CD₃OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 5.8 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

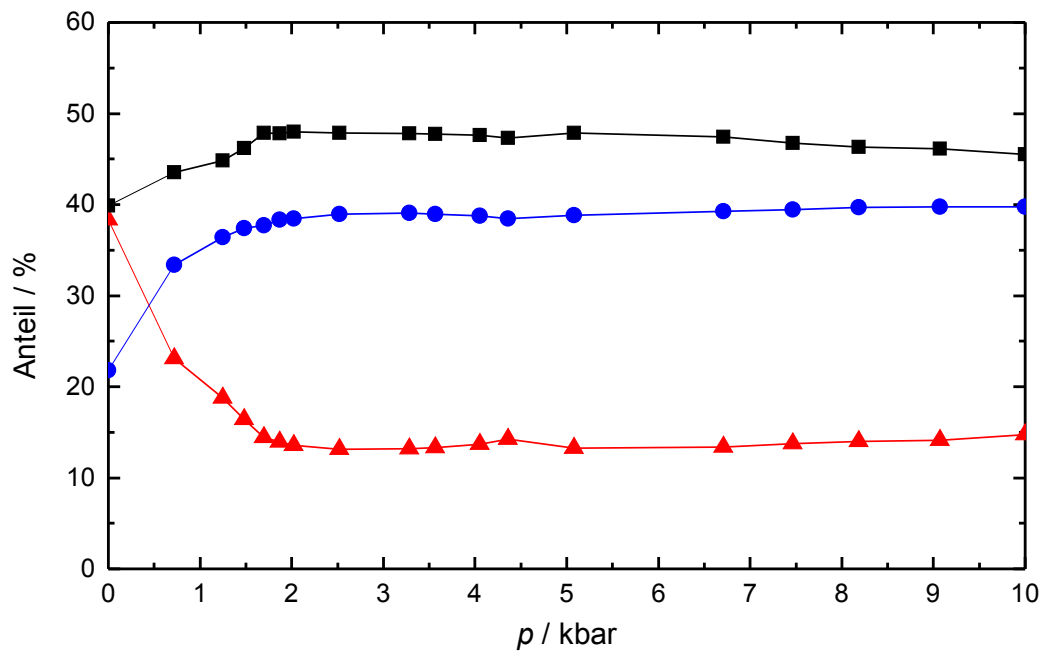


Abbildung 3.11: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAM-Mikrogels in 5 mol% CD_3OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich).

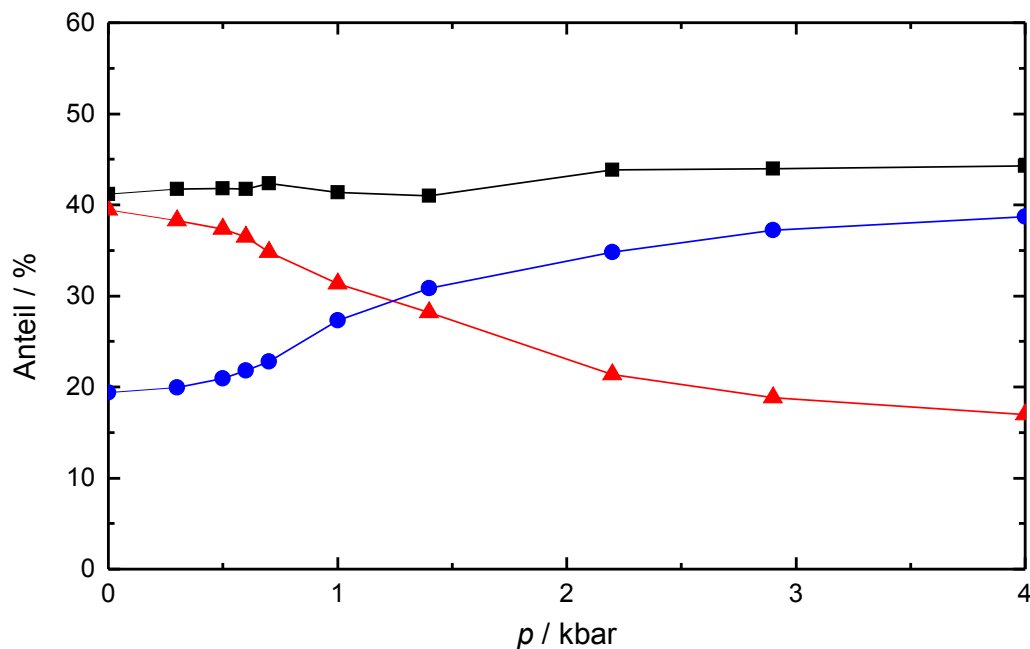


Abbildung 3.12: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAM-Mikrogels in 5 mol% CD_3OD bei 40 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 4 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich).

CLAPEYRONsche Steigung von 100 bar K^{-1} bekräftigt. Dieser Trend wird auch bei den druckabhängigen Messungen oberhalb der VPTT beobachtet. Bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ fällt der Wert für die hydrophobe Bande von 38.3% auf $\approx 13 \%$, was ungefähr dem hydratisierten Zustand von PNiPAm in Wasser entspricht. Dies deutet darauf hin, dass mit Druck Methanol das System verlässt und eine Hydratisierung mit Wassermolekülen erfolgt, da Druck zur einer Verstärkung von H-Brücken führt, während hydrophobe Wechselwirkungen geschwächt werden. Da Methanol im Gegensatz zu Wasser einen hydrophoben Anteil durch die CH_3 -Gruppe besitzt, wird eine wasserbasierte Hydratisierung bevorzugt. Ähnlich sieht das druckinduzierte Verhalten bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ aus. Wie an den normierten Spektren zu sehen ist, tritt ein gemeinsamer Schnittpunkt der Spektren bei circa 1630 cm^{-1} auf (isosbestischer Punkt), der ein Zweizustandsmodell zwischen dem hydratisierten und kollabierten System nahelegt. Allerdings beginnt der Hydratisierungsvorgang des Mikrogels nicht direkt nach Druckapplikation, sondern es wird ein Mindestdruck von circa 300 bar benötigt, um einen signifikanten Anstieg im hydrophilen Segment zu beobachten. Auch die Plateauwerte weichen geringfügig von einem vollständig hydratisierten Zustand ab, da die Anteile der hydrophilen Bande unter 40% bzw. die hydrophobe Bande oberhalb von 15% liegen. Dies ist ein Indiz dafür, dass sich Druck zwar antagonistisch zur Temperatur verhält, jedoch kann Druck den Temperatureffekt nicht vollständig kompensieren, wenn die Druckmessung bei einer Temperatur stattfindet, die weit oberhalb der VPTT liegt.

Wird die Konzentration des Methanols auf $10 \text{ mol}\%$ verdoppelt, so fällt die Phasenübergangstemperatur auf $24 \text{ }^\circ\text{C}$, wie es aus der Analyse der Subbanden (Abbildung 3.13) hervorgeht. Der Übergang verläuft mit steigender Methanolkonzentration nicht mehr scharf wie in reinem Wasser, sondern ist stark verbreitert. Die Anfangswerte der jeweiligen Anteile spiegeln die erhöhten Anteile der Methanolkonzentration wider. Der hydrophobe Bereich steigt in diesem Temperaturbereich von 18.8% auf 40.1% an. Die Differenz des Anteils der Bande bei 1600 cm^{-1} fällt hier deutlich geringer aus. Sie sinkt von 27.5% auf 17.1% . Die Dehydratisierung wird hier zudem durch die gemischt hydrophile/hydrophobe Bande charakterisiert. Diese sinkt signifikant beim Phasenübergang und gibt den Anteil der schwach gebundenen Wassermoleküle im Mikrogel wieder. Auch bei dieser Konzentration wurden drei Druckmessungen durchgeführt, die den Einfluss

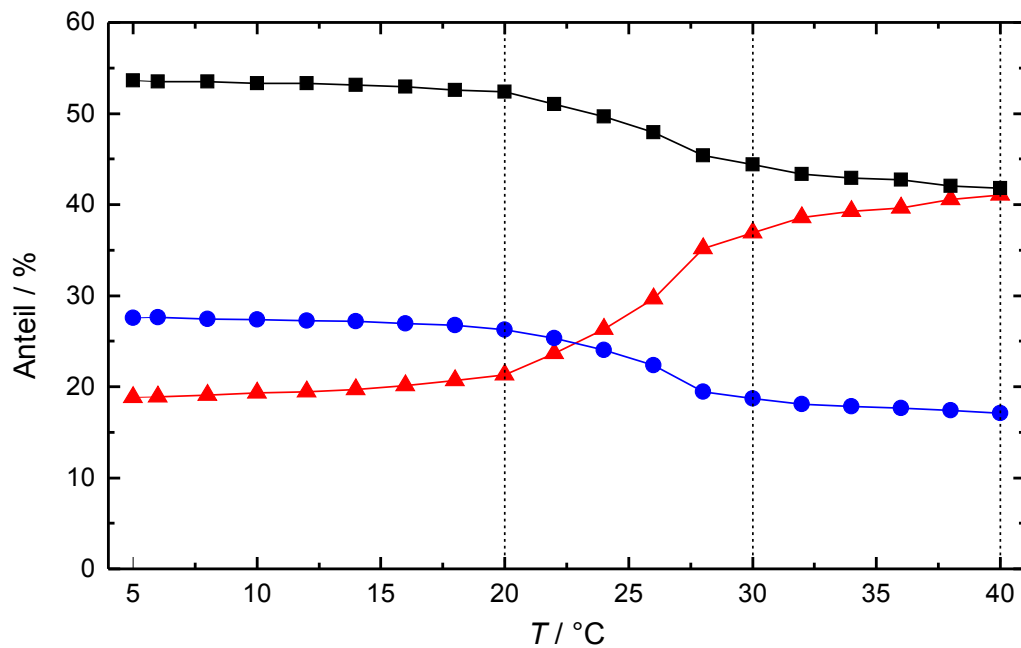


Abbildung 3.13: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

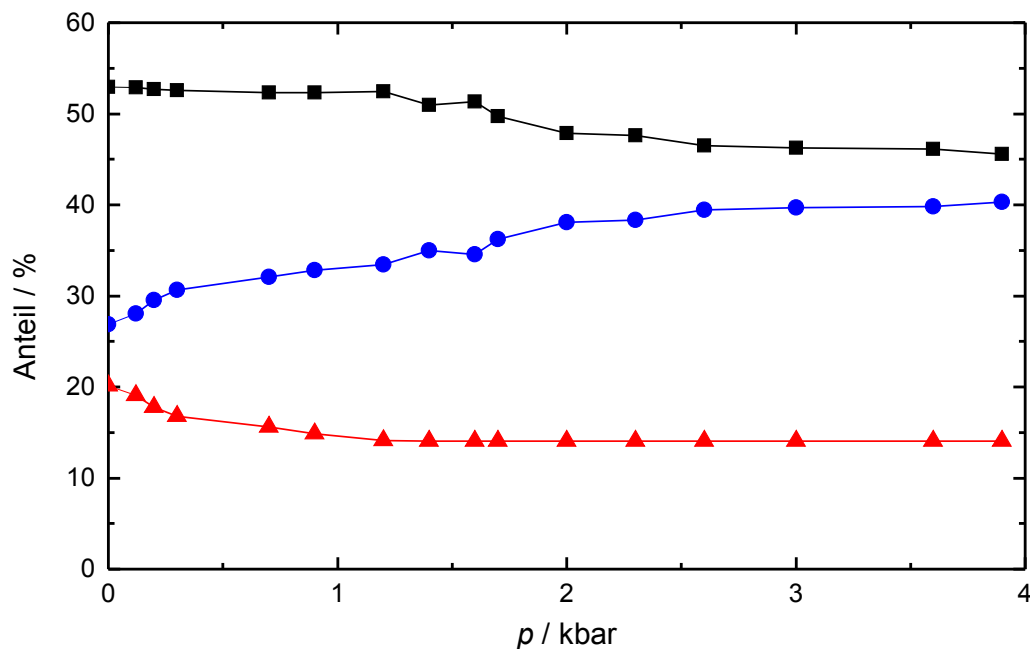


Abbildung 3.14: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 3.9 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

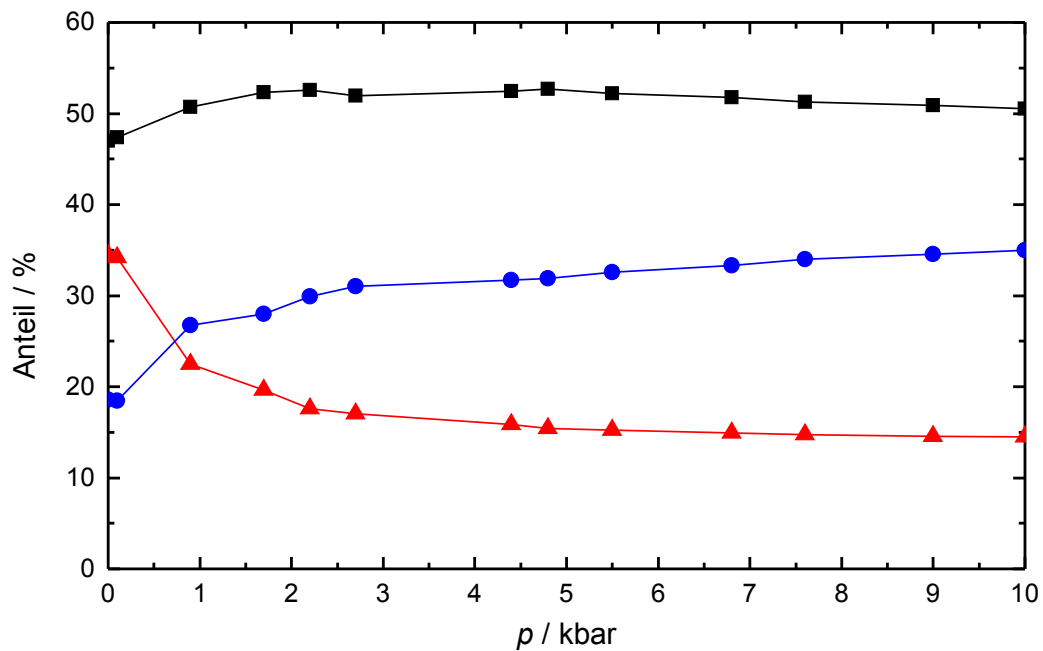


Abbildung 3.15: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

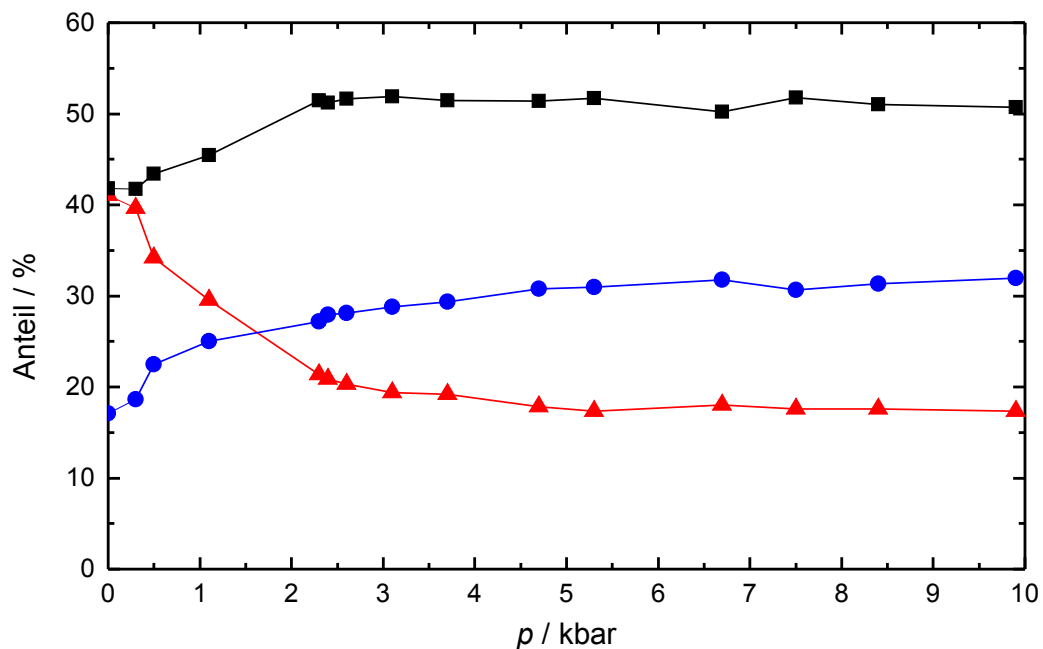


Abbildung 3.16: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD bei 40 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 9.9 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

des Drucks unter- und oberhalb des Phasenübergangs aufzeigen sollen.

Aus den normierten Spektren ist bei allen Messreihen eine bathochrome Verschiebung mit einem isosbestischen Punkt erkennbar, die auf eine druckinduzierte Hydratisierung des Zweizustandssystems hindeutet (Abbildung 5.3). Unterhalb der VPTT bewirkt eine Druckapplikation eine stärkere Hydratisierung des gequollenen Zustandes, sodass die Bande bei 1600 cm^{-1} auf über 40 % bei 4 kbar steigt. Im kollabierten Zustand bei 30 °C wird erneut ein geringer „Mindest-Schwellendruck“ ($\approx 200\text{ bar}$) benötigt, bevor Wasser in das Polymer gelangt. Erst dann steigt der hydrophile Bereich an bzw. das hydrophobe Segment fällt ab. Interessanterweise ist auch eine schwache Hydratisierung am Anstieg der gemischt hydrophilen/hydrophoben Bande erkennbar. Ein Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Endwerte der jeweiligen Anteile zeigt, dass mit steigender Temperatur der Hydratisierungseffekt durch Druckapplikation geringer ausfällt. Der hydrophobe Anteil steigt von $\approx 14\%$ bei 20 °C auf $\approx 18\%$ bei 40 °C an, was erneut zeigt, dass Druck den temperaturbedingten Kollaps weit oberhalb der VPTT nicht vollständig umkehren kann.

Wie bereits aus Trübungsmessungen bekannt ist, erreicht PNiPAM bei einer Konzentration von 20 mol% Methanol ein Minimum der Phasenübergangstemperatur, die bei den temperaturabhängigen FTIR-Messungen bei circa 20 °C liegt (Abbildung 3.17).^[99–102] Eine weitere Erhöhung des Methanolgehalts führt erneut zu einer Erhöhung der VPTT. Der Phasenübergang ist in dieser Lösungsmittelzusammensetzung sehr breit. Die Flächenanteile des hydrophilen Segments ändern sich nur geringfügig. Stattdessen ist die Änderung der Bande bei 1620 cm^{-1} ein Indikator für die temperaturabhängige Dehydratisierung des PNiPAM-Mikrogels. Der hohe Methanolgehalt ist an der Bande bei 1650 cm^{-1} erkennbar, die von 30.3 % auf 52.9 % ansteigt. In diesem Konzentrationsbereich wird eine druckbedingte Hydratisierung, die durch Wasser hervorgerufen wird, limitiert. Das belegen die druckabhängigen FTIR-Spektren, aus deren Verlauf diesmal ein hypsochromer Shift zu beobachten ist (Abbildung 5.4). Die Subbande bei 1670 cm^{-1} , die der Bindung zum Methanol zugeordnet werden kann, macht einen erheblichen Anteil am hydrophoben Segment aus. Die Abbildungen 3.18 - 3.19 zeigen die Subbandenanteile bei 20 °C bzw. 30 °C in Abhängigkeit des Drucks. Es ist zu erkennen, dass Druck diesmal nicht nur zu einem signifikanten Anstieg der hydrophilen, sondern auch der

hydrophoben Bande führt, die die H-Brücken des Methanols zur Carbonylgruppe beinhaltet. Die gemischt hydrophile/hydrophobe Bande, die bei der temperaturabhängigen Messung gefallen ist, fällt unter Druck ebenso, was darauf hindeutet, dass schwach gebundenes Wasser eine stärkere H-Brückenbindung eingeht und sich in der Bande bei 1600 cm^{-1} wiederfindet. Durch diese druckinduzierte Solvatisierung mit zwei Komponenten ist es auch nicht mehr möglich, das Zweizustandsmodell des Mikrogels mit einer CLAPEYRONschen Steigung zu charakterisieren, da die beiden Parameter Temperatur und Druck die FTIR-Spektren in die gleiche Richtung zu größeren Wellenzahlen verschieben.

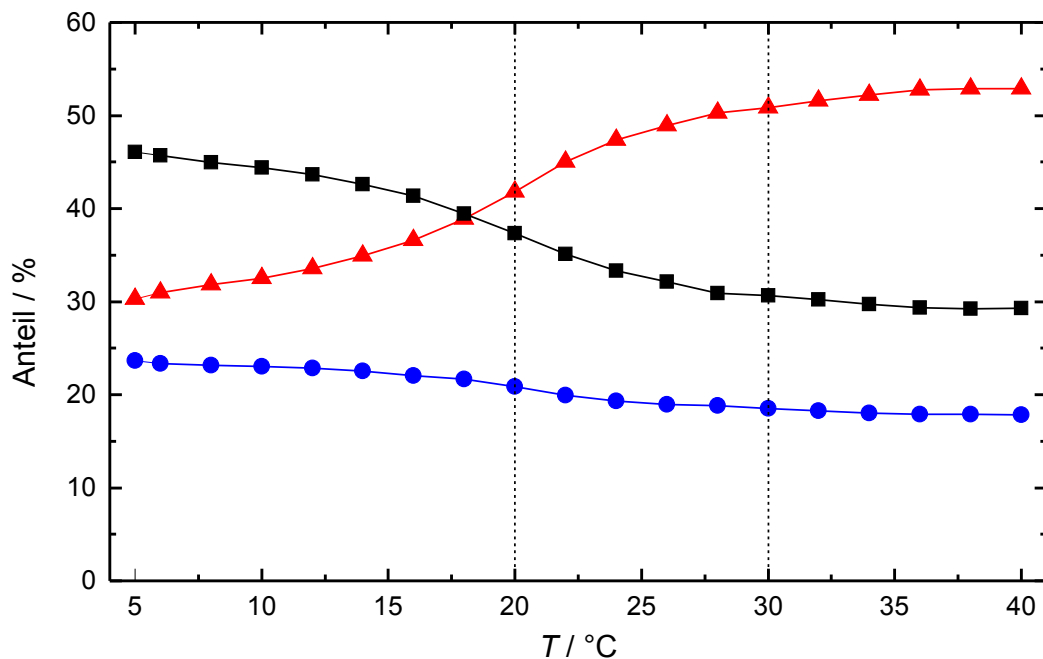


Abbildung 3.17: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 20 mol% CD_3OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

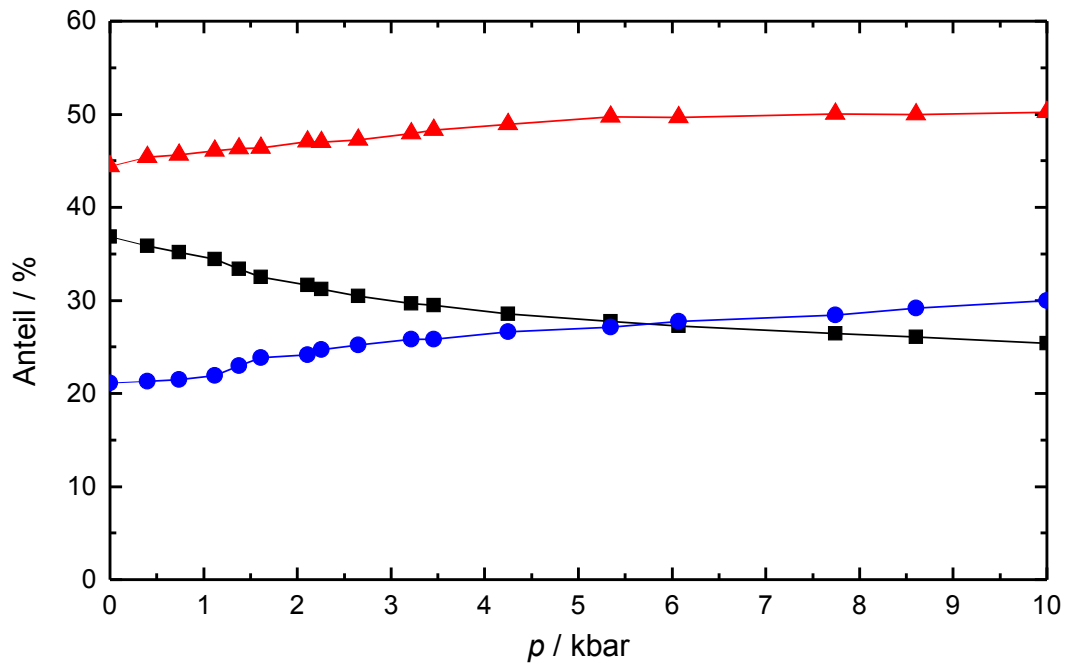


Abbildung 3.18: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAM-Mikrogels in 20 mol% CD₃OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

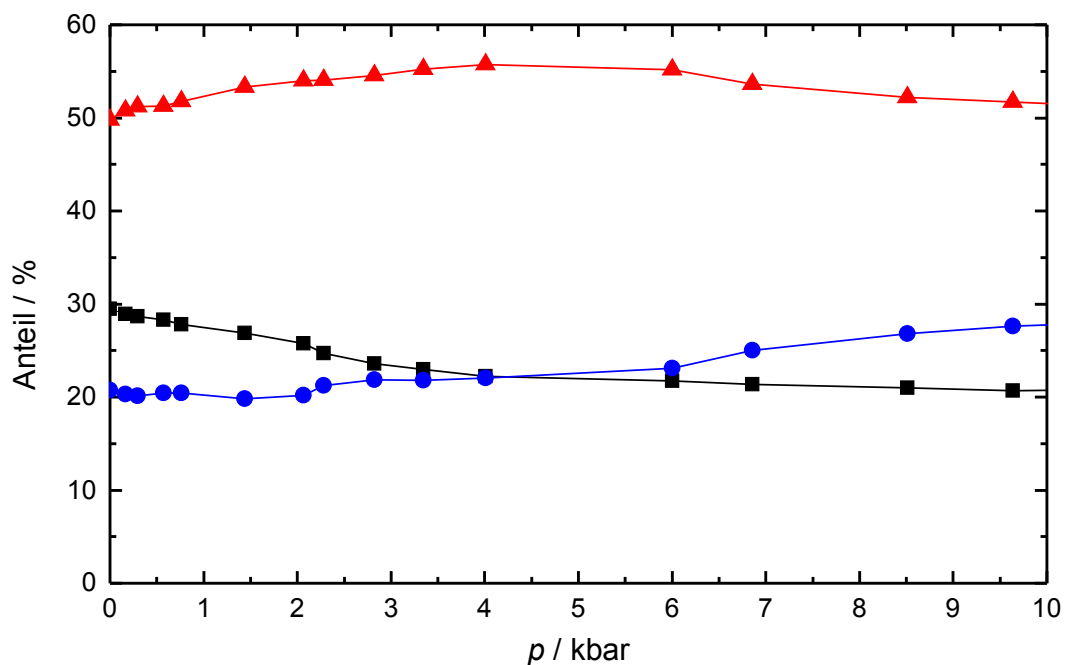


Abbildung 3.19: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAM-Mikrogels in 20 mol% CD₃OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

Um das Verhalten des PNiPAm-Mikrogels in reinem Methanol zu studieren, wurden analog zu den Lösungsmittelgemischen temperatur- sowie druckabhängige FTIR-Spektren aufgenommen. Es zeigt sich, dass PNiPAm im gesamten Temperaturbereich zwischen 5 °C und 40 °C in Lösung vorliegt und nicht ausfällt (Abbildung 3.20). Die Auswertung der Amid-I'-Bande wurde hier nur mit zwei Subbanden durchgeführt, da das hydrophile Segment, das die Bindungen des Wassers zur Carbonylgruppe beschreibt, in 100 mol% Methanol dementsprechend wegfällt. Dabei zeigt sich ein 70:30 Verhältnis der beiden Banden bei $\approx 1620 \text{ cm}^{-1}$ bzw. $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$, das in dem untersuchten Temperaturbereich nur wenig fluktuiert. Zudem wurde die Abhängigkeit des Drucks bei zwei verschiedenen Temperaturen analysiert (Abbildungen 3.21 - 3.22). Sowohl bei 20 °C als auch bei 40 °C führt Druck bis circa 1 kbar zu einem steilen Anstieg der Bande bei $\approx 1620 \text{ cm}^{-1}$. Diese charakterisiert starke H-Brücken des Methanols zur Carbonylgruppe des Mikrogels und demonstriert somit erneut, dass Druck die Bildung von starken Wasserstoffbrücken präferiert.

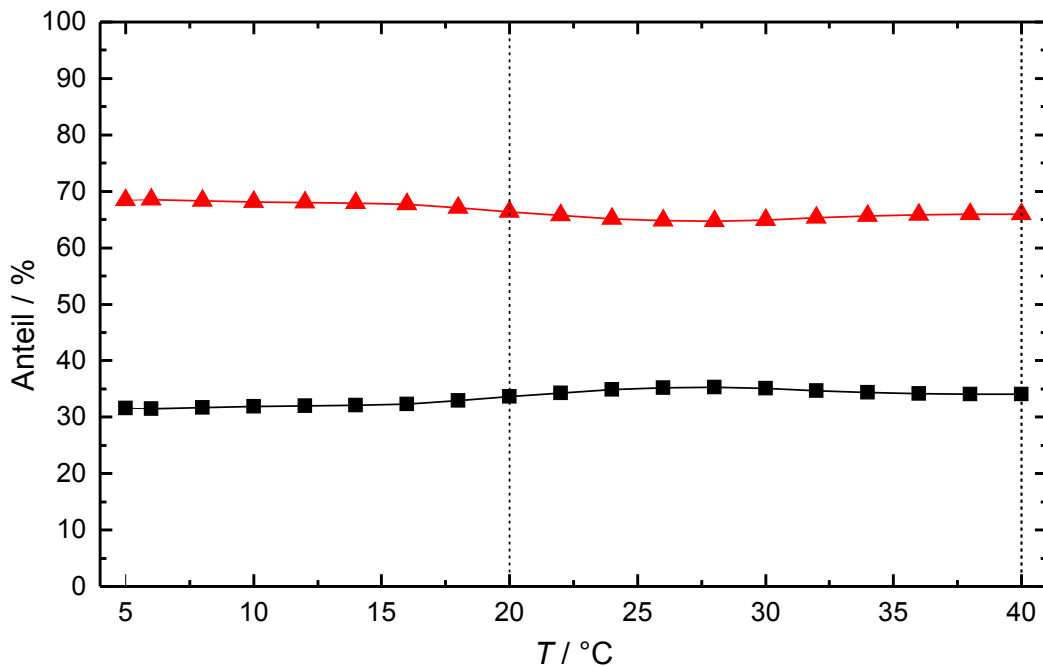


Abbildung 3.20: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAm-Mikrogels in 100 mol% CD_3OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

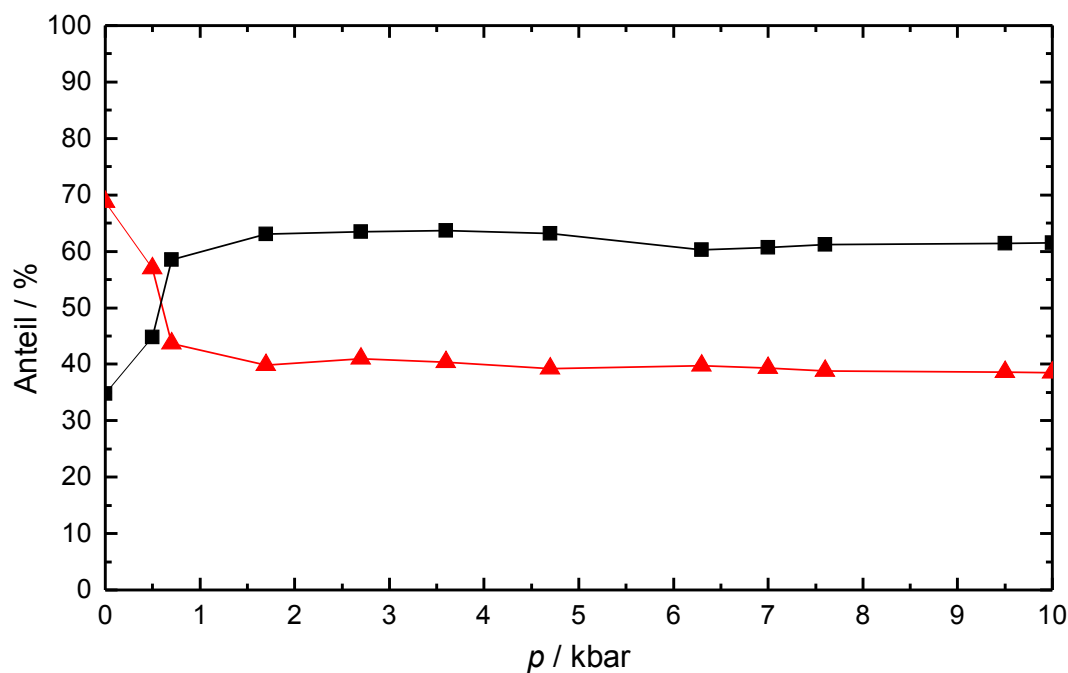


Abbildung 3.21: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 100 mol% CD₃OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich).

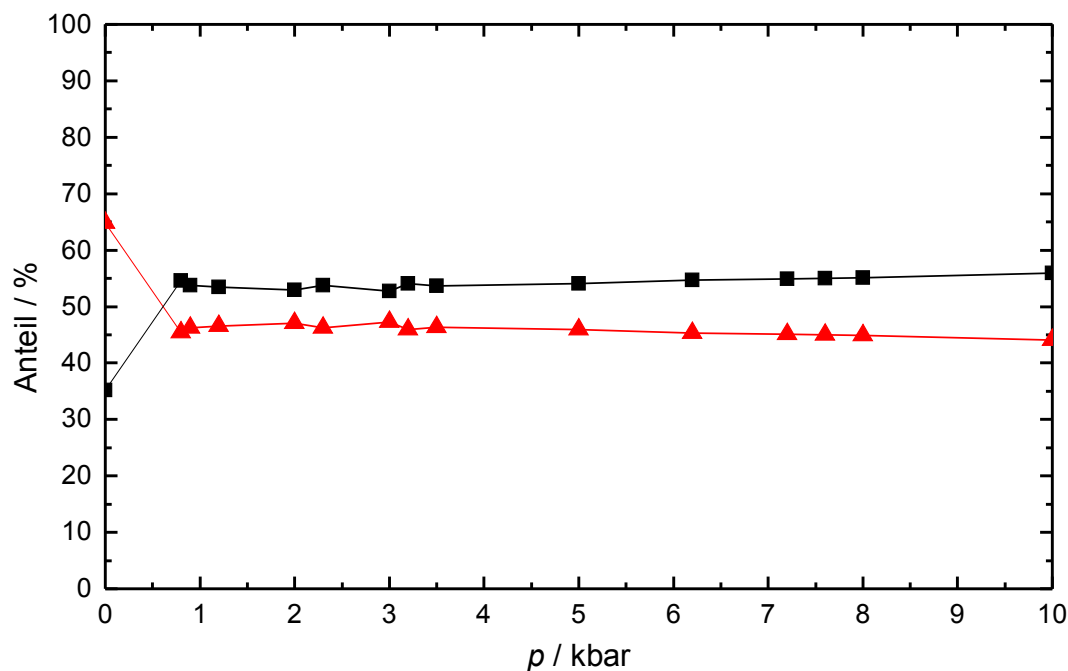


Abbildung 3.22: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 100 mol% CD₃OD bei 40 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich).

Den Einfluss des Methanols in Abhängigkeit der Temperatur und des Drucks auf das FTIR-Spektrum des Mikrogels zeigen die Verläufe der 2. Ableitungen der jeweiligen normierten Spektren. In Abbildung 3.23 sind die temperaturabhängigen 2. Ableitungen für das PNiPAM-Mikrogel bei verschiedenen Methanolkonzentrationen dargestellt. Aus dem Vergleich der Spektren ist in Kombination mit den Messungen in reinem Methanol eine genaue Zuordnung der Methanolsubbanden möglich. Diese sind bei den Wellenzahlen von $\approx 1670 \text{ cm}^{-1}$, $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$ und $\approx 1620 \text{ cm}^{-1}$ zu finden und stehen für unterschiedlich starke H-Brücken zur Carbonylgruppe des Mikrogels. Zudem fällt mit steigender Methanolkonzentration eine signifikante Änderung im hydrophilen Segment zwischen 1580 cm^{-1} und 1615 cm^{-1} auf, die für die H-Brücken des Wassers zur Carbonylgruppe stehen.

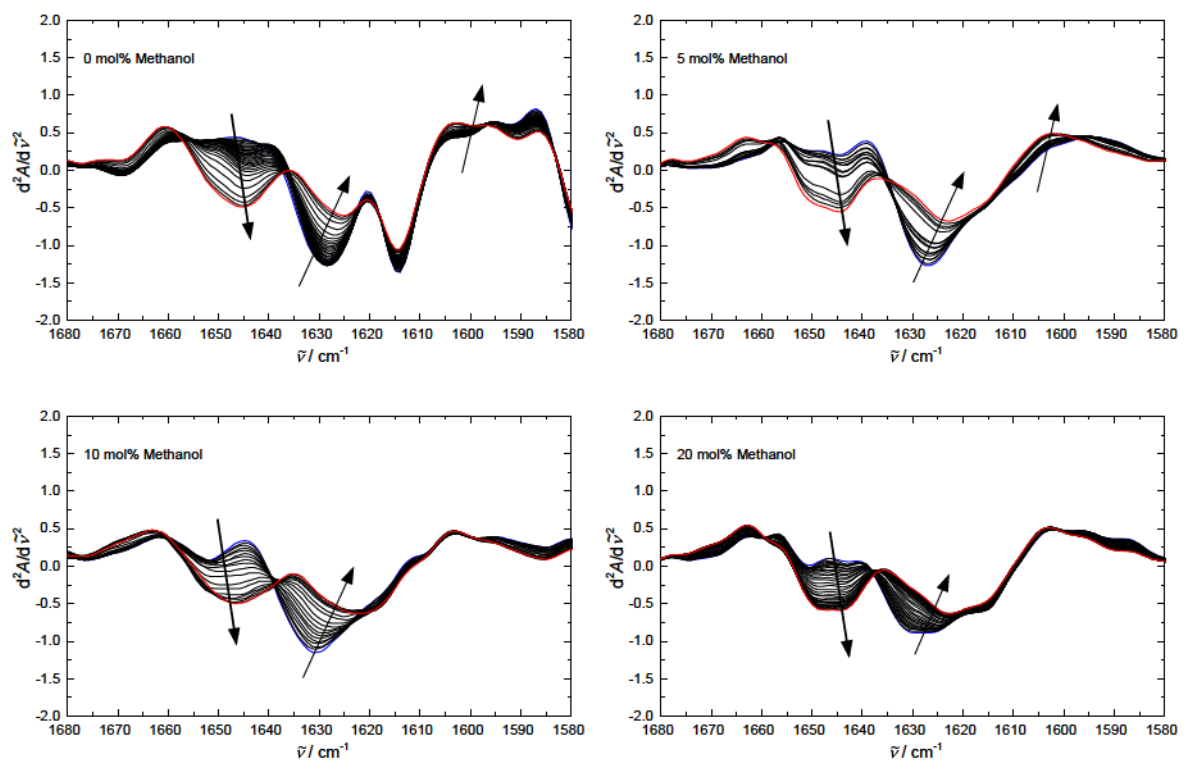


Abbildung 3.23: Derivativspektren des PNiPAM-Mikrogels bei unterschiedlichen Methanolkonzentrationen in Abhängigkeit der Temperatur von $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Anfangs- bzw. Endtemperatur.

Um den Einfluss von Druck auf diese Systeme zu zeigen und damit das H-Brückenmuster mit dem Cononsolvency-Effekt in Verbindung zu bringen, zeigt Abbildung 3.24 die 2. Ableitungen bei 5 mol% sowie 10 mol% Methanol und 40 °C in Abhängigkeit des Drucks. Mit steigendem Druck bilden sich signifikante Minima im hydrophilen Segment aus, die eine Hydratisierung der beiden Systeme kennzeichnen. Es sind jedoch keine druckinduzierten Minima bei 1650 cm^{-1} bzw. 1620 cm^{-1} erkennbar, die auf ein H-Brückenmuster der Carbonylgruppe zum Methanol hindeuten. Daraus lässt sich ableiten, dass mit Druck eine Solvatisierung des Mikrogels hauptsächlich mit Wasser erfolgt, während Methanol aus dem System verdrängt wird. Dadurch wird der Cononsolvency-Effekt unter Druck aufgehoben und das Mikrogel geht wieder in Lösung.

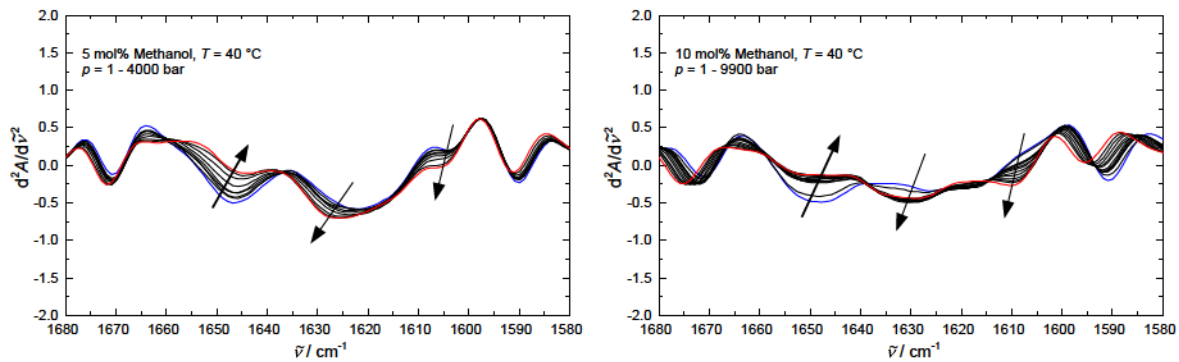


Abbildung 3.24: Derivativspektren des PNiPAm-Mikrogels bei unterschiedlichen Methanolkonzentrationen in Abhängigkeit des Drucks bei 40 °C . Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum beim Anfangs- bzw. Enddruck.

PDEAm-Mikrogel

Das zweite Mikrogel, das mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie untersucht wurde, ist PDEAm (Abbildung 3.1). Im Gegensatz zur PNiPAm besitzt es kein Amid-Proton, sodass die Subbande im hydrophoben Segment nur schwach ausgeprägt ist. Diese wird hauptsächlich durch Bindungen der Carbonylgruppe mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs gebildet sowie durch „freie“ Carbonylgruppen, die jedoch nur im kollabierten Zustand eine signifikante Rolle spielen. Die temperaturabhängigen Spektren sind in Abbildung 3.25 zu sehen. Aus dem Verlauf ist analog zum PNiPAm-Mikrogel eine Verschiebung zu größeren Wellenzahlen zu beobachten, die auf einen Anstieg des hydrophoben Segments hindeutet. Zusätzlich ist bei hohen Temperaturen eine Schulter bei $\approx 1570 \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen, die in den hydrophilen Bereich fällt. Dies ist auf eine sehr starke H-Brückenstruktur zurückzuführen, die von mehreren H-Brücken des Wasser zur Carbonylgruppe oder des freien Stickstoffelektronenpaars stammen kann.

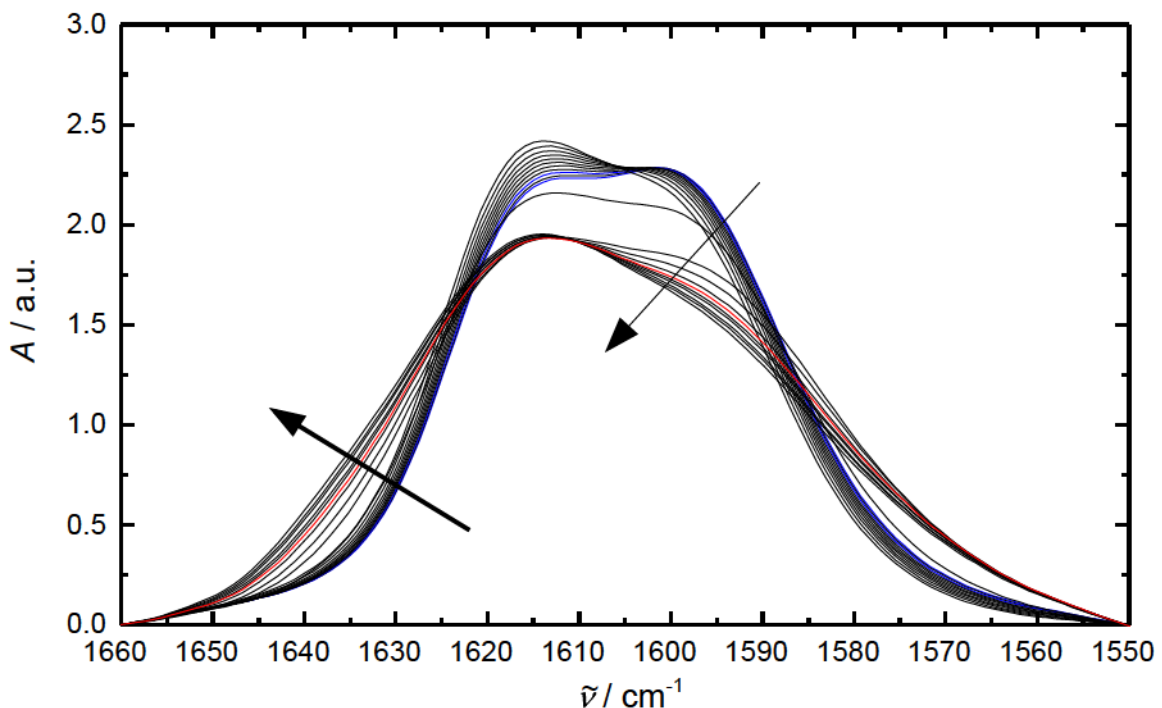


Abbildung 3.25: Normierte Spektren der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in D_2O zwischen $5 \text{ }^\circ\text{C}$ und $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

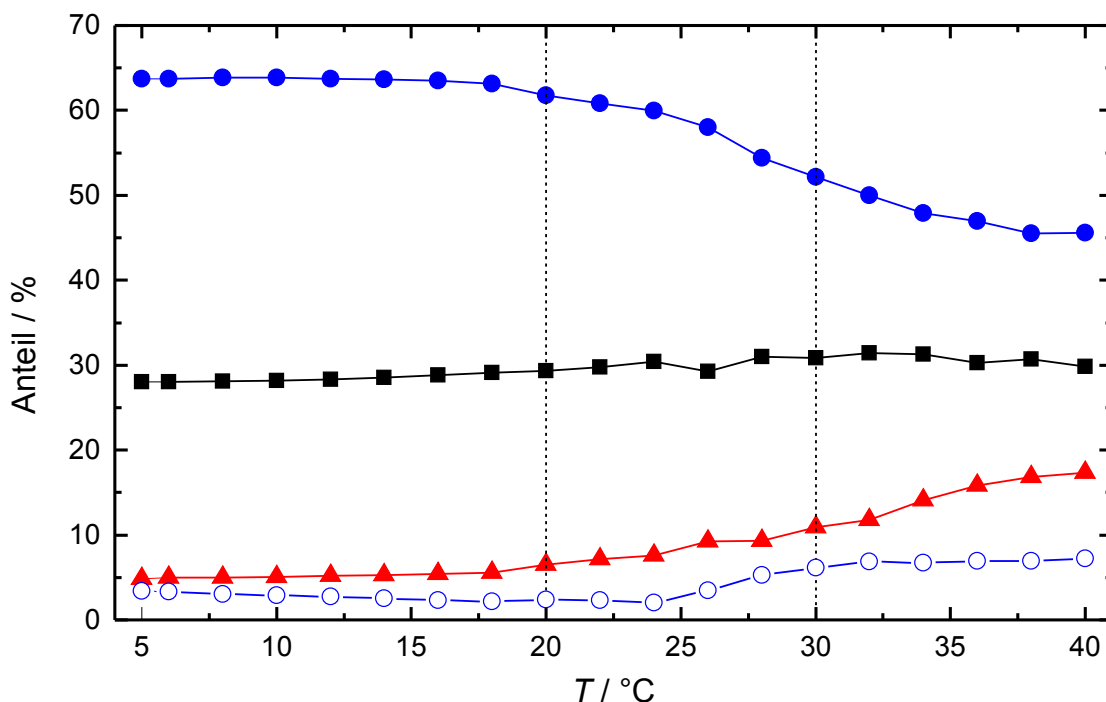


Abbildung 3.26: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in D_2O in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich, ○ hydrophiler Bereich, Bande bei 1570 cm^{-1}). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

Eine Quantifizierung der jeweiligen Anteile ist in Abbildung 3.26 zu sehen. Hier wurde die Bande bei 1570 cm^{-1} diesmal nicht zum hydrophilen Segment zusammengefasst, sondern einzeln dargestellt, um die Besonderheit des temperaturinduzierten Kollaps bei diesem Mikrogel darzustellen. Sie nimmt zunächst, wie erwartet, bis zur Volumenphasenübergangstemperatur von $\approx 28\text{ °C}$ ab und steigt danach wieder leicht an, während das hydrophile Segment im gemessenen Temperaturbereich von 63.7 % auf 45.6 % abfällt und der hydrophobe Bereich von 4.8 % auf 17.3 % ansteigt. Der gemischt hydrophile/hydrophobe Bereich ändert sich jedoch nicht signifikant. Eine Anwendung hoher hydrostatischer Drücke auf dieses System führt, wie schon beim PNIPAm-Mikrogel, zu einer Hydratisierung des Systems. Die Analyse der jeweiligen Subbandenanteile zeigt, dass sich das Polymer unterhalb seiner VPTT in Abhängigkeit des Drucks nur wenig ändert. Es wird nur eine geringe Zunahme der Bande bei 1600 cm^{-1} beobachtet, die stellvertretend für die Zunahme der H-Brücken von Wasser steht. Bei einer Temperatur von 30 °C, bei der sich PDEAm oberhalb des Phasenübergangs befindet, findet eine

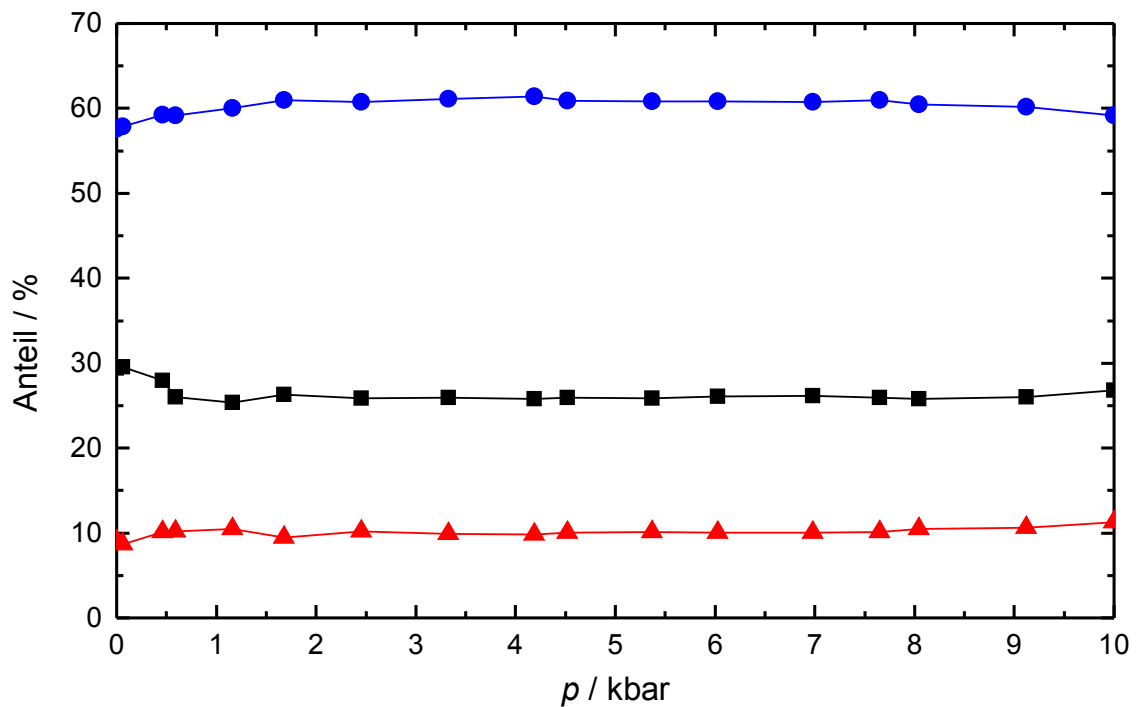


Abbildung 3.27: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in D_2O bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich).

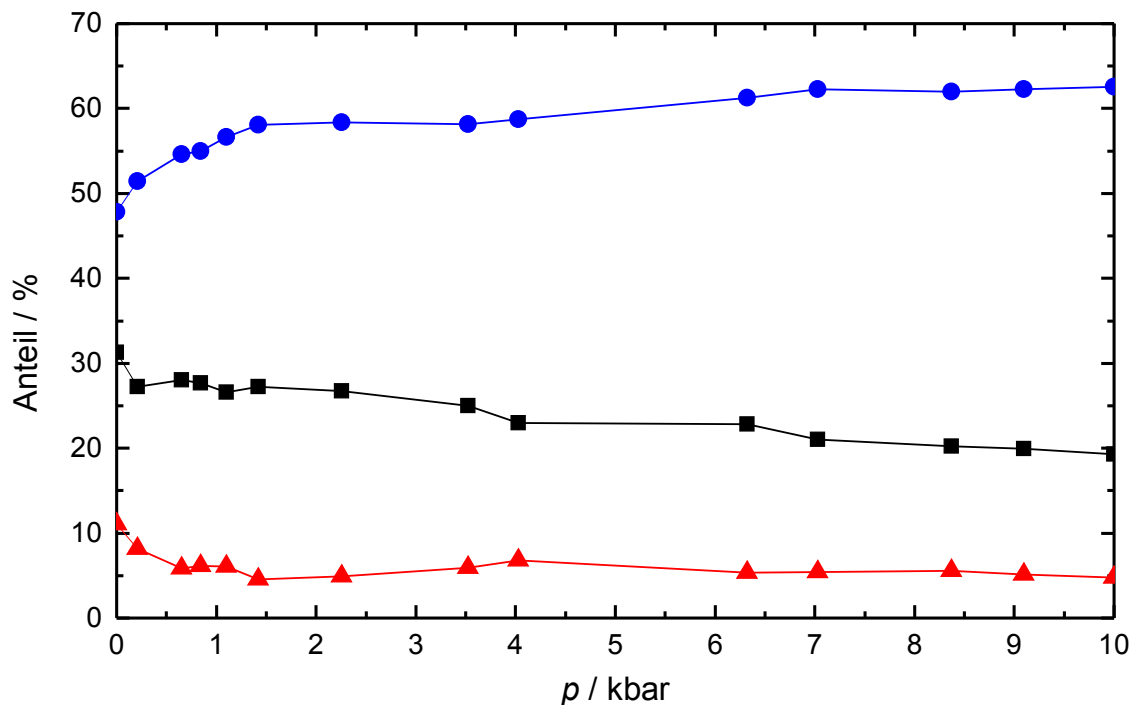


Abbildung 3.28: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in D_2O bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich).

Umkehr des Temperatureffektes statt. Das hydrophile Segment steigt erneut auf über 60 % an, was auf eine vollständige Hydratisierung hinweist, während die hydrophoben Wechselwirkungen unter Druck abnehmen. Im Gegensatz zu PNiPAm ist bei PDEAm kein Einfluss von Methanol auf die Phasenübergangstemperatur zu beobachten, das heißt, es tritt bei diesem ähnlich aufgebauten Acrylamid kein Cononsolvency-Effekt auf. Die Analyse der temperaturabhängigen Spektren bei einem Stoffmengenanteil von 10 mol% Methanol zeigt, dass die VPTT ebenfalls bei ungefähr 28 °C liegt. Der Einfluss von Methanol auf die Anteile der jeweiligen Subbanden ist auch hier wieder zu erkennen. Das hydrophile Segment startet im Vergleich zu reinem Wasser bei 57.9 %, während die beiden anderen Anteile, die die Bindungen zum Methanol repräsentieren, auf 8.3 % beim hydrophoben bzw. 31.7 % beim gemischten Bereich ansteigen. Der temperaturabhängige Verlauf ähnelt dem in reinem D₂O, wobei die Bande bei 1570 cm⁻¹ geringere Endwerte aufweist. Dies deutet darauf hin, dass hier unter anderem H-Brücken zum Wasser in dem kollabierten Zustand des Mikrogels eine zentrale Rolle spielen.

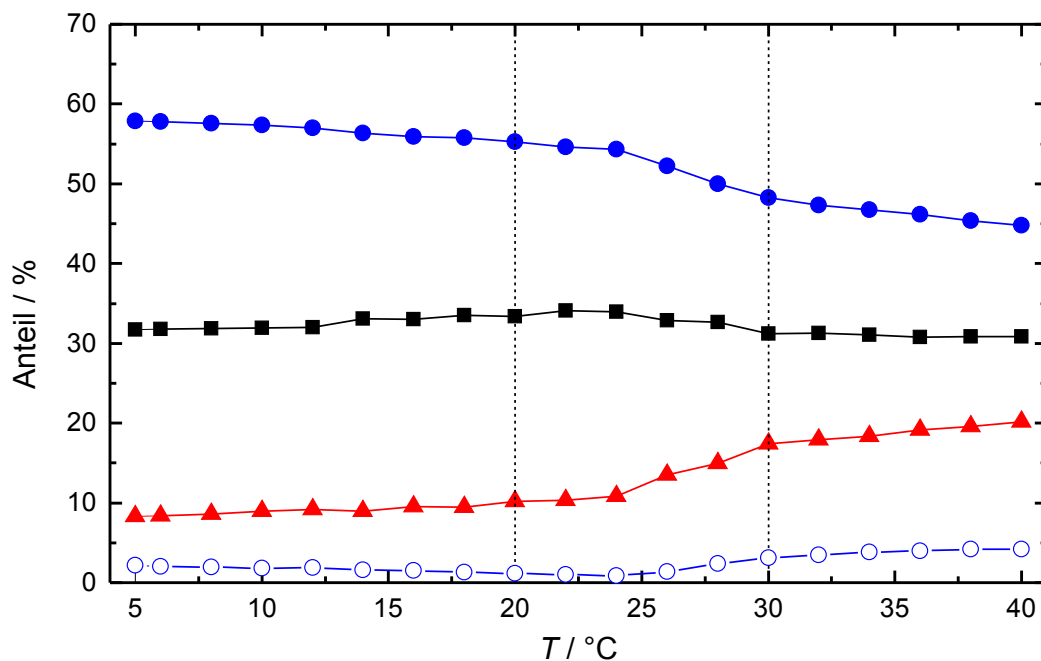


Abbildung 3.29: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich, ○ hydrophiler Bereich, Bande bei 1570 cm⁻¹). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

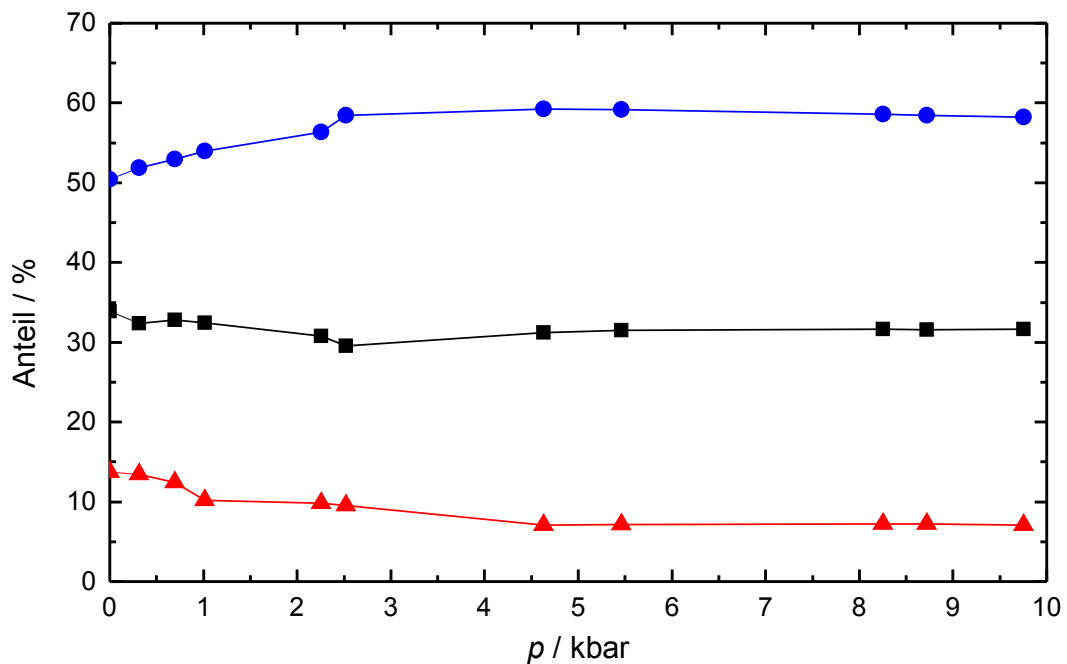


Abbildung 3.30: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 9.8 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

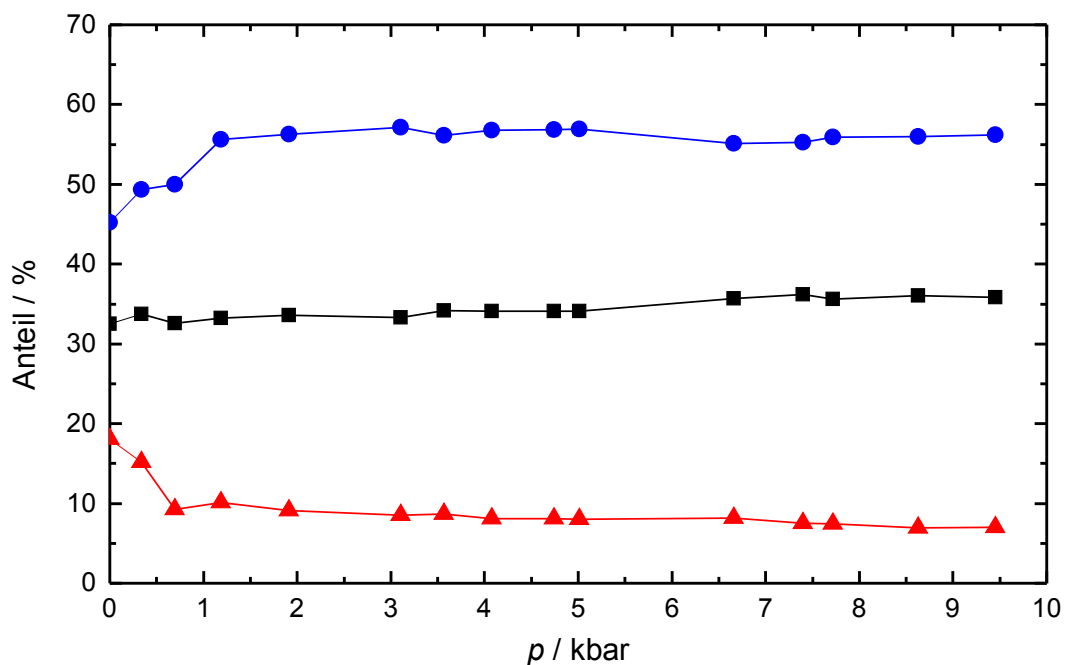


Abbildung 3.31: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 9.5 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

Hoher Druck führt auch bei diesem System in Kombination mit einem Lösungsmittelanteil des Methanol von 10 mol% zu einer Hydratisierung (Abbildungen 3.30 - 3.31). Diese ist am Anstieg der hydrophilen Bande zu erkennen, die durch starke H-Brücken des Wassers zur Carbonylgruppe des PDEAm hervorgerufen wird. Im Gegensatz dazu sinkt der Anteil des hydrophoben Bereichs und somit der Einfluss der H-Brücken des Methanols. Wie bei PNiPAm ist auch bei PDEAm eine CLAPEYRONsche Steigung von 100 bar K^{-1} festgestellt worden, die die Steigung der Phasengrenzlinie zwischen dem gequollenen und dem kollabierten Zustand des Polymers charakterisiert. In reinem Methanol finden im untersuchten Temperaturbereich keine wesentlichen Änderungen der beiden Bereiche statt, was bedeutet, dass PDEAm unabhängig von der Temperatur vollständig solvatisiert bleibt (Abbildung 3.32).

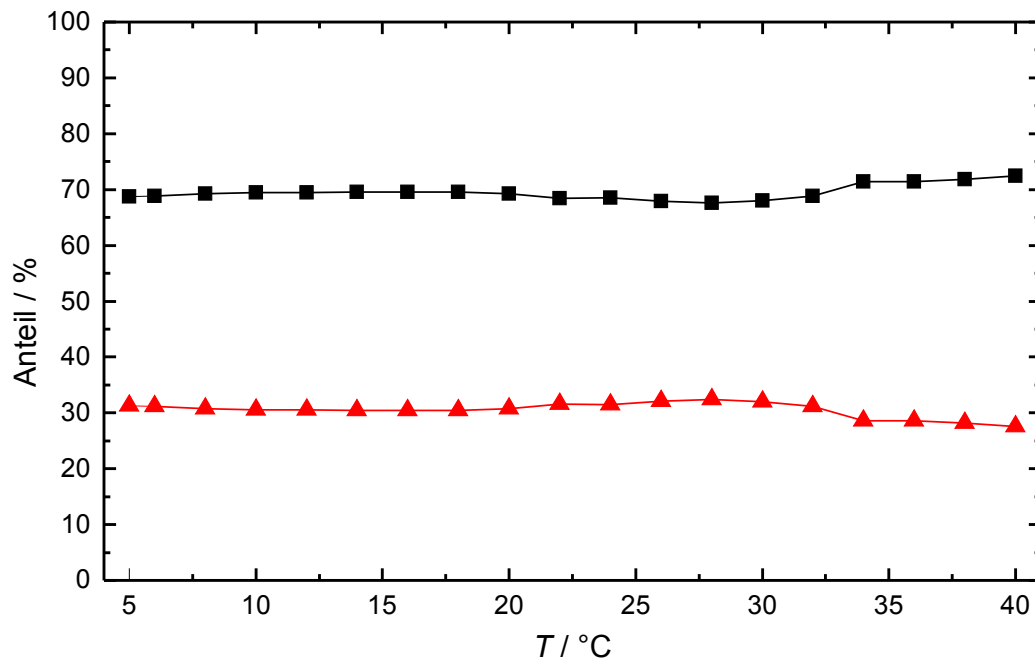


Abbildung 3.32: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in 100 mol% CD_3OD in einem Temperaturintervall zwischen $5 \text{ }^\circ\text{C}$ und $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich).

PNiPAm/PDEAm-Mikrogel

Das Copolymer, bestehend aus einem äquimolaren Verhältnis der Homopolymere PNiPAm sowie PDEAm, die statistisch im Mikrogel eingebaut sind, verbindet die Eigenschaften der jeweiligen Einzelkomponenten. Ein typischer temperaturabhängiger Verlauf der FTIR-Spektren ist in Abbildung 3.33 (links) zu sehen. Mit steigender Temperatur ist eine hypsochrome Verschiebung zu erkennen, die bei $\approx 1627 \text{ cm}^{-1}$ einen isobestischen Punkt aufweist. Dies lässt auf die Existenz von zwei Zuständen schließen, die sich analog zu den beiden Homopolymeren in einem geschwollenen und kollabierten Zustand äußern. Die Bildung von Differenzspektren bezogen auf das Spektrum bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$ zeigt diese Entwicklung ganz deutlich (Abbildung 3.33, rechts). Die Intensität oberhalb von 1627 cm^{-1} nimmt stark zu, während es unterhalb von 1627 cm^{-1} zu einer Intensitätsabnahme kommt. Dies verdeutlicht die Zunahme des hydrophoben Segments mit steigender Temperatur und weist auf den Kollaps des Copolymers hin. Die quantitative Analyse der Subbanden zeigt, dass mit steigender Temperatur der hydrophobe Bereich kontinuierlich ansteigt und oberhalb der VPTT, die bei $\approx 28 \text{ }^\circ\text{C}$ liegt, einen Wert von 36.9% erreicht (Abbildung 3.34). Im Vergleich zu den reinen Copolymeren liegen die hydrophoben Anteile beim Copolymer zu Beginn höher, was auf eine günstigere Anordnung der H-Brücken zwischen dem Amid-Proton des PNiPAm-Anteils und einer Carbonylgruppe hinweist. Nach dem Phasenübergang sinkt der hydrophile Anteil auf $\approx 20 \%$ und liegt damit im Bereich des kollabierten PNiPAm-Mikrogels.

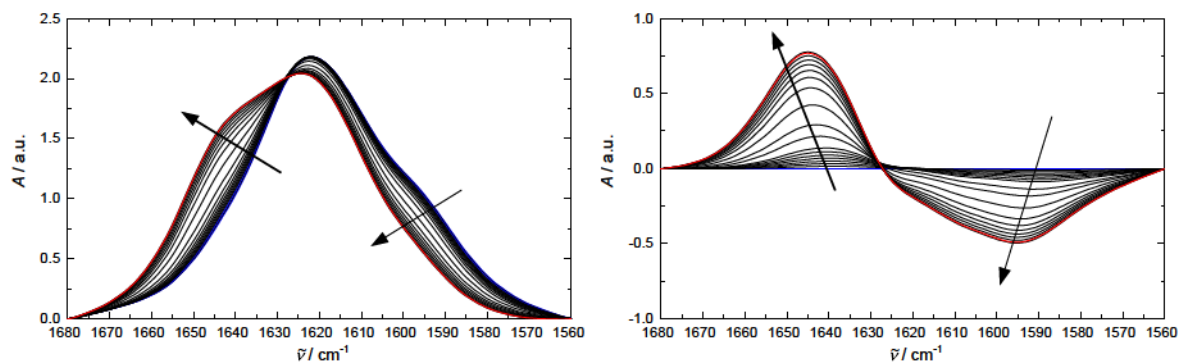


Abbildung 3.33: Normierte Spektren der Amid-I'-Bande des PNiPAm/PDEAm-Mikrogels (links) sowie Differenzspektren (rechts) in D_2O zwischen $5 \text{ }^\circ\text{C}$ und $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

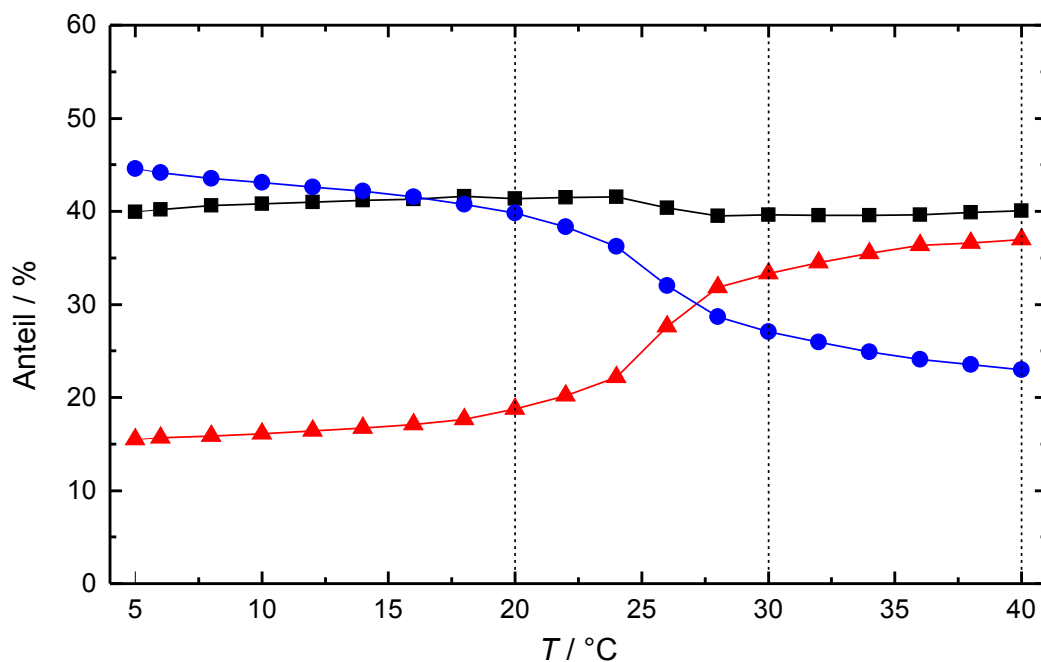


Abbildung 3.34: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in D_2O in einem Temperaturintervall zwischen $5\text{ }^\circ\text{C}$ und $40\text{ }^\circ\text{C}$ (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

Die korrespondierende Druckspektren wurden bei Temperaturen von $20\text{ }^\circ\text{C}$, $30\text{ }^\circ\text{C}$ sowie $40\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen, die den Bereich zwischen einem vollständig hydratisierten und einem dehydratisierten Mikrogel einschließen. Bei $20\text{ }^\circ\text{C}$ führt Druckapplikation zu einem weiteren Aufquellen des Copolymer, wie am Verlauf der hydrophilen Bande erkennbar ist. Diese erreicht bei circa 1.5 kbar einen Plateauwert von etwa 47 %, wohingegen der hydrophobe Bereich sogar auf unter 10 % sinkt. Eine Druckapplikation bei einer Temperatur von $30\text{ }^\circ\text{C}$, die am Ende des Phasenübergangs liegt, führt ebenso zu einer Hydratisierung des Mikrogels. Der hydrophile Anteil steigt hier auf 47 % an, wobei der hydrophobe auf 11 % abfällt. Der gemischt hydrophile/hydrophobe Bereich ändert sich im Wesentlichen nicht. Die einzelnen Fluktuationen basieren auf der Umorientierung der schwachen H-Brücken des Wasser, die unter Druck verstärkt werden. Das bedeutet, dass die ursprünglich schwachen Wechselwirkungen des Wassers verstärkt werden und im hydrophilen Segment auftauchen, was zu einer Abnahme dieser Bande führt.

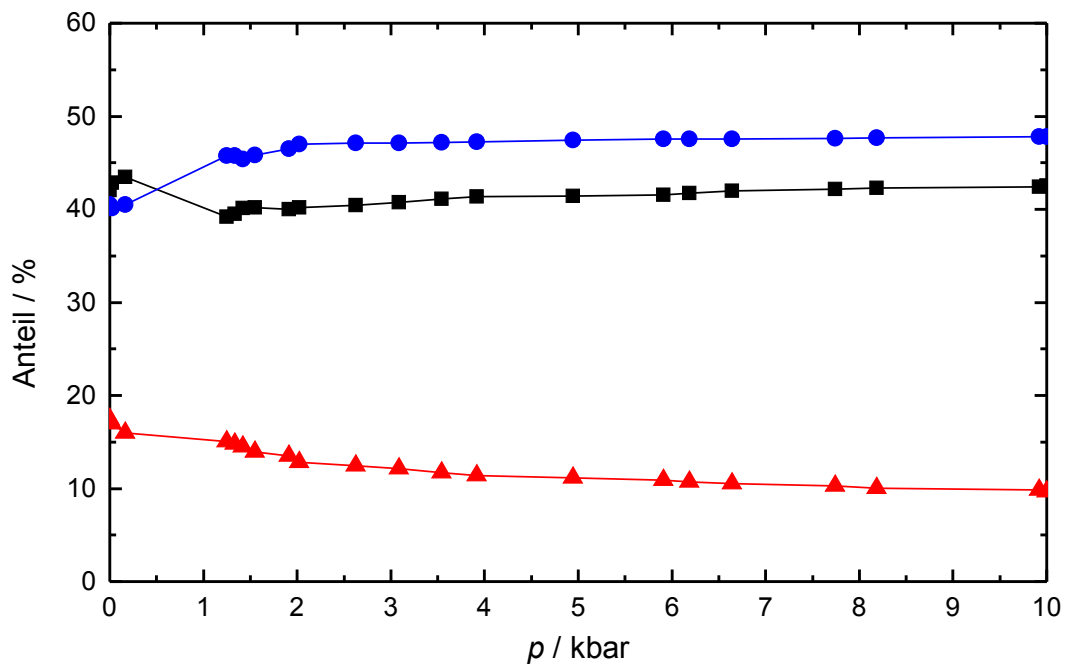


Abbildung 3.35: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in D₂O bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

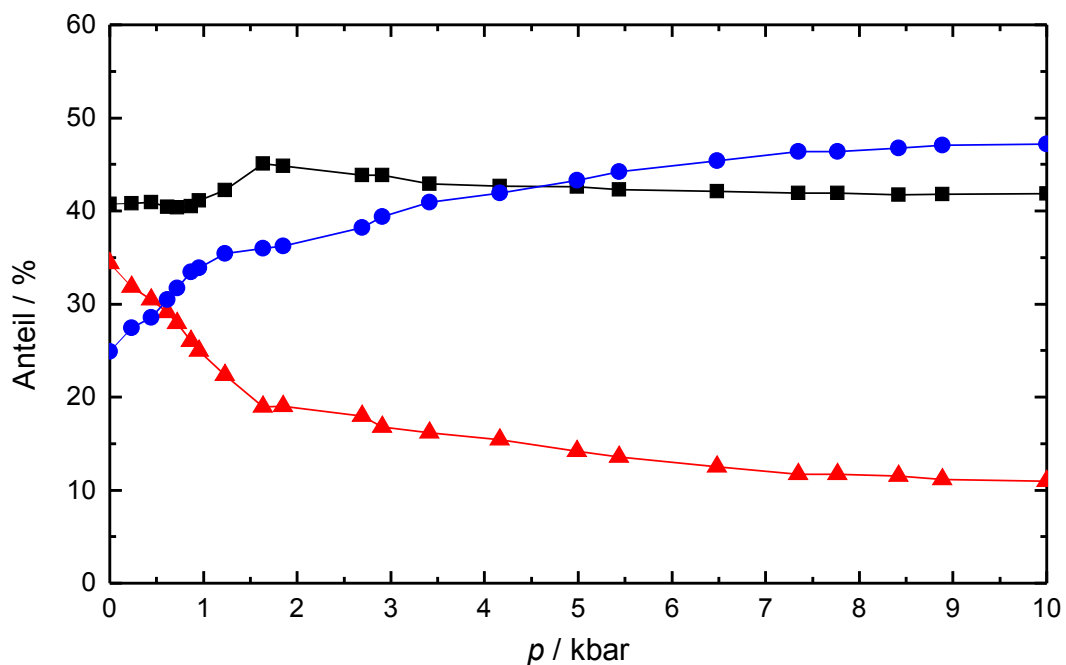


Abbildung 3.36: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in D₂O bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

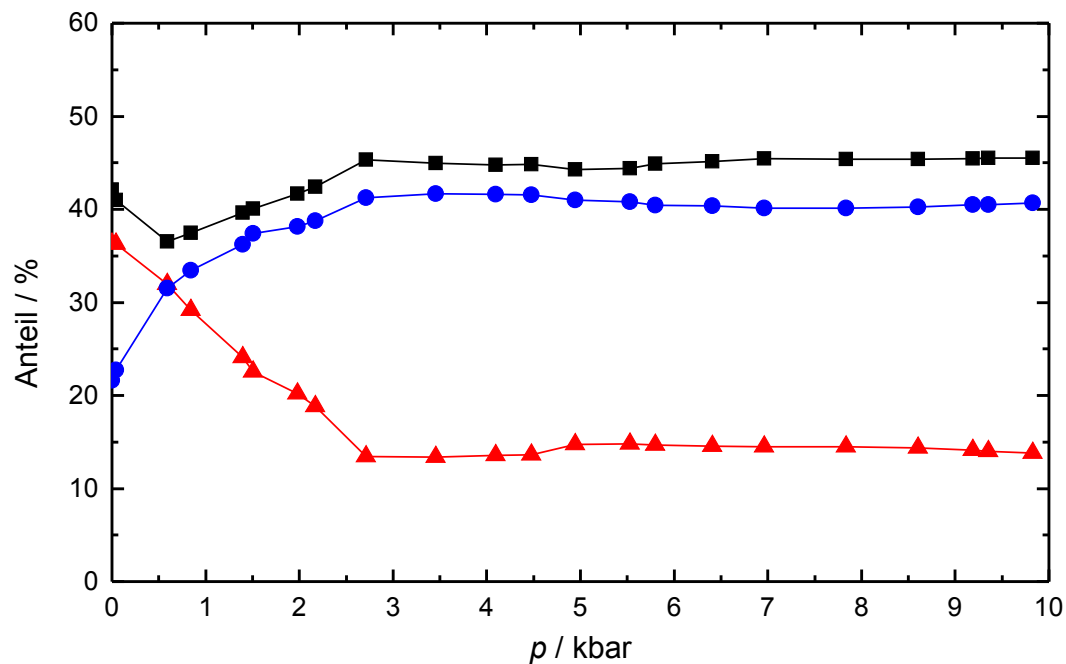


Abbildung 3.37: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAm/PDEAm-Mikrogels in D_2O bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 9.8 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

Gleichzeitig werden neue druckinduzierte H-Brücken durch Wasser gebildet, die wiederum zu einem Ansteigen der Bande führt. Bei einer Temperatur von $40\text{ }^\circ\text{C}$ zeigt sich erneut eine druckinduzierte Hydratisierung. Das hydrophile Segment steigt hier allerdings nur auf $40.7\text{ }%$ an, während der hydrophobe Anteil mit $13.8\text{ }%$ im Vergleich zu der Druckapplikation bei $20\text{ }^\circ\text{C}$ sowie $30\text{ }^\circ\text{C}$ etwas höher liegt. Dies verdeutlicht wiederum, dass Druck den Temperatureffekt nicht vollständig aufheben kann, obwohl auch hier eine Steigung an der Phasengrenze mit 100 bar K^{-1} beobachtet wird. Bei ungefähr 2.5 kbar wird ein Plateau erreicht, bei dem eine weitere Hydratisierung durch die entgegenwirkende Kompression, die Begrenzung durch die Quervernetzer sowie den Temperatureffekt verhindert wird.

Eine Zugabe von 5 mol% Methanol führt zu einer Herabsetzung der VPTT auf $\approx 24\text{ }^\circ\text{C}$ und liegt damit, wie schon in reinem Wasser, tiefer als beim PNiPAm-Mikrogel. Aus dem Verlauf der Spektren lässt sich auch in Methanolgemischen bei dem Copolymer ein Zweizustandssystem erkennen (Abbildung 5.10). Die Subbandenanteile zeigen den Einfluss des Methanols auf das H-Brückennetzwerk in diesem Mikrogel. Das hydropho-

be Segment liegt am Anfang der Messung bei 18.1 %, der hydrophile Teil hingegen bei 41.3 %. Letzterer fällt auf 21.1 % im kollabierten Zustand, während der hydrophobe Bereich auf über 41 % steigt. Dieser Bereich umfasst nicht nur die H-Brücken zum Amid-Proton, sondern auch die schwachen H-Brücken des Methanols zur Carbonylgruppe, die selbst im kollabierten Zustand vorhanden sind. Die gemischt hydrophile/hydrophobe Bande ist in diesem Fall nicht sehr aussagekräftig, da sie neben schwachen Bindungen zum Wasser auch H-Brücken zum Methanol beinhaltet. Die Abbildungen 3.39 - 3.41 zeigen die korrespondierenden druckabhängigen FTIR-Messungen. Die Startwerte der Subbanden bei den jeweiligen Temperaturen stimmen auch hier mit den entsprechenden Werten aus der temperaturabhängigen FTIR-Messung überein. Bei 20 °C steigen die beiden Banden bei 1600 cm⁻¹ und 1620 cm⁻¹ kontinuierlich mit Druck an. Diese zeigen erneut die druckbedingte Hydratisierung mit Wasser und erreichen Werte von 41 % bzw. 44 %. Oberhalb der VPTT bei 30 °C ist ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Die hydrophile Bande steigt anfangs stark an und erreicht einen Endwert von 39.8 % bei 9.5 kbar. Bei Temperaturen weit oberhalb des Phasenübergangs ist wieder das Phänomen zu beobachten, dass Druck nicht zur einer vollständigen Hydratisierung führt. Das hydrophile Segment liegt bei hohem Druck und einer Temperatur von 40 °C nur bei 32.8 % und der hydrophobe Anteil bei 24.3 %. Die gemischt hydrophile/hydrophobe Bande zeigt bei allen Druckmessungen nur einen leichten Anstieg.

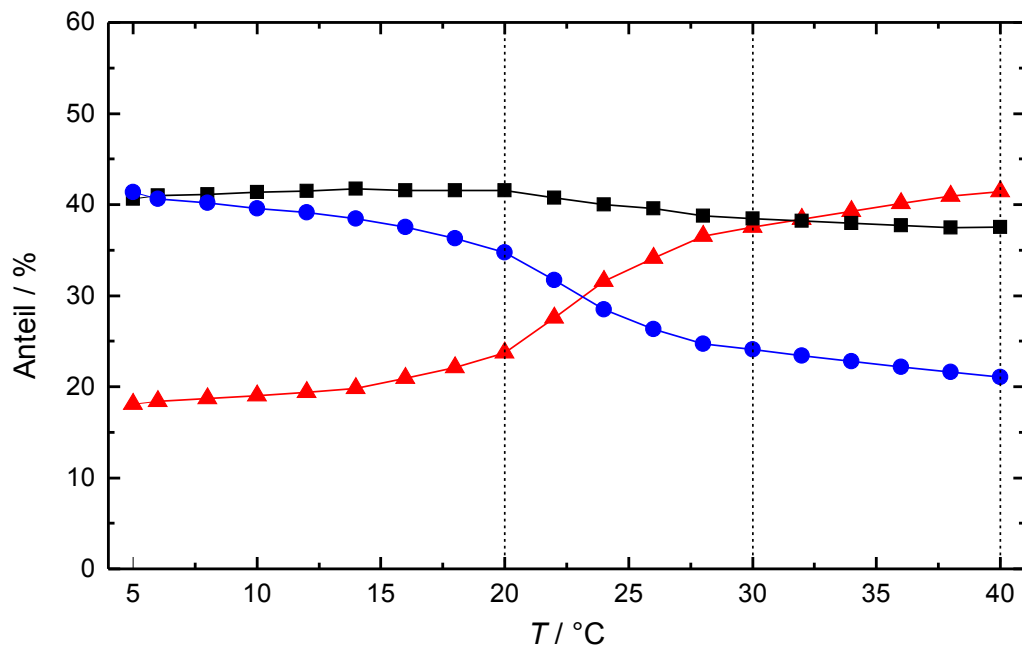


Abbildung 3.38: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAm/PDEAm-Mikrogels in 5 mol% CD₃OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich); die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

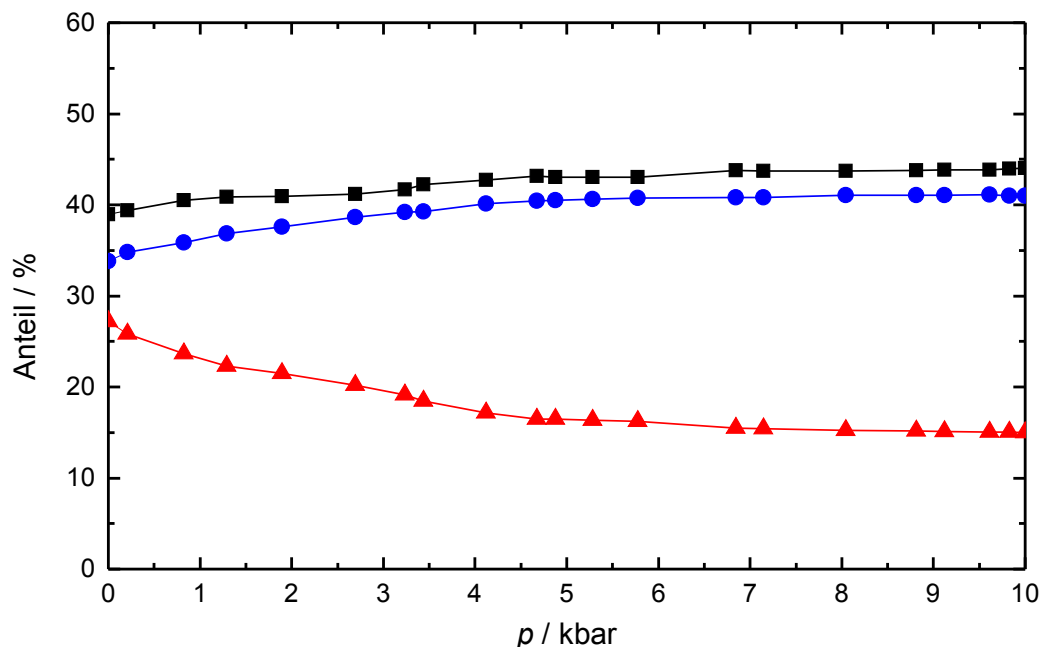


Abbildung 3.39: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAm/PDEAm-Mikrogels in 5 mol% CD₃OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

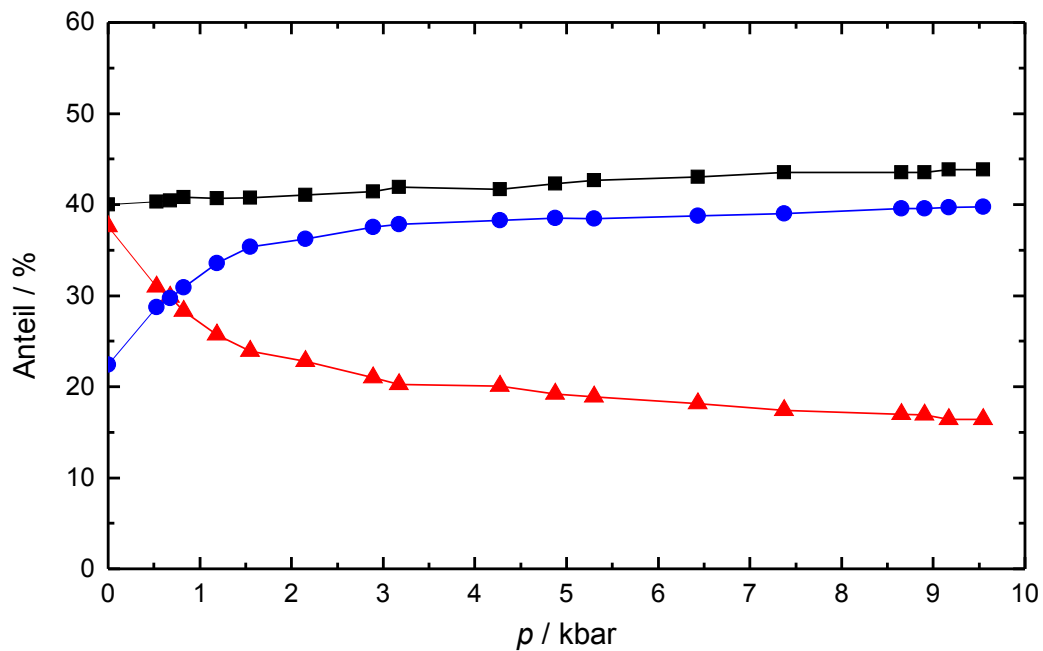


Abbildung 3.40: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 5 mol% CD₃OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 9.5 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

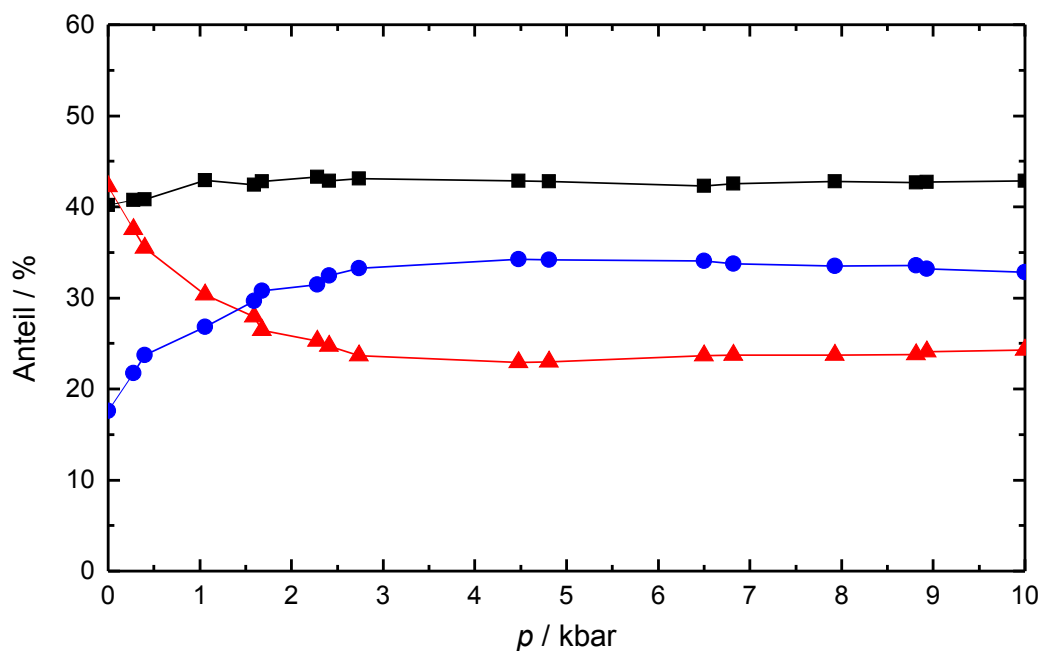


Abbildung 3.41: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 5 mol% CD₃OD bei 40 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

Eine Verdoppelung der Methanolkonzentration auf 10 mol% führt zu einer Herabsetzung der Volumenphasenübergangstemperatur auf 18 °C. Der Verlauf der temperaturabhängigen Spektren verhält sich analog zu den Spektren bei einer Methanolkonzentration von 5 mol% sowie in reinem D₂O (Abbildung 5.11). Auch hier bestätigt der gemeinsame Schnittpunkt bei 1627 cm⁻¹ das Zweizustandsmodell des Copolymers. Wie schon beim PNiPAm-Mikrogel führt die Zugabe von Methanol zu einem breiteren Phasenübergang. Der Anteil des hydrophilen Segments liegt zu Beginn der Messung nur noch bei 34.2 % und nimmt kontinuierlich bis zu einem Wert von 19.4 % bei 40 °C ab. Der gemischt hydrophile/hydrophobe Bereich fällt analog zum hydrophilen Segment, während die hydrophoben Anteile auf 47.9 % anwachsen.

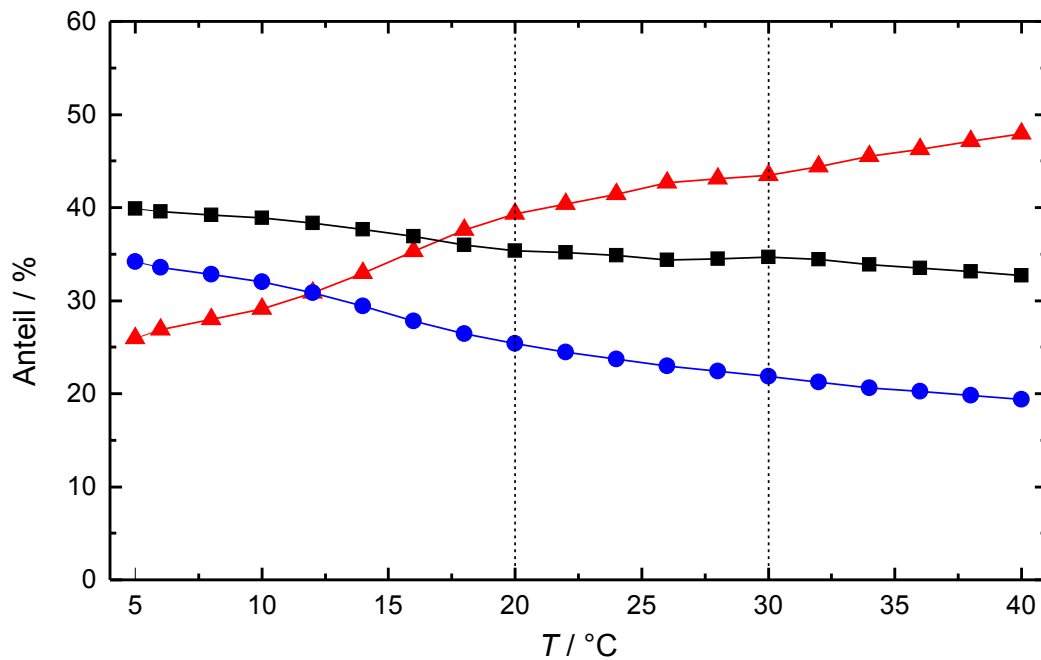


Abbildung 3.42: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNiPAm/PDEAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

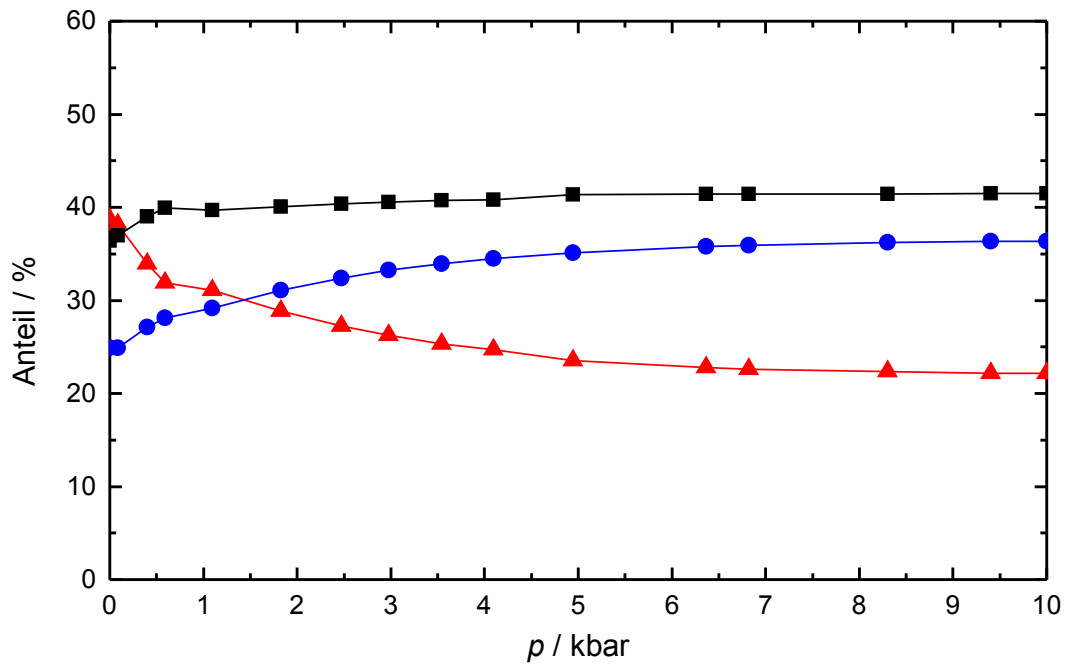


Abbildung 3.43: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

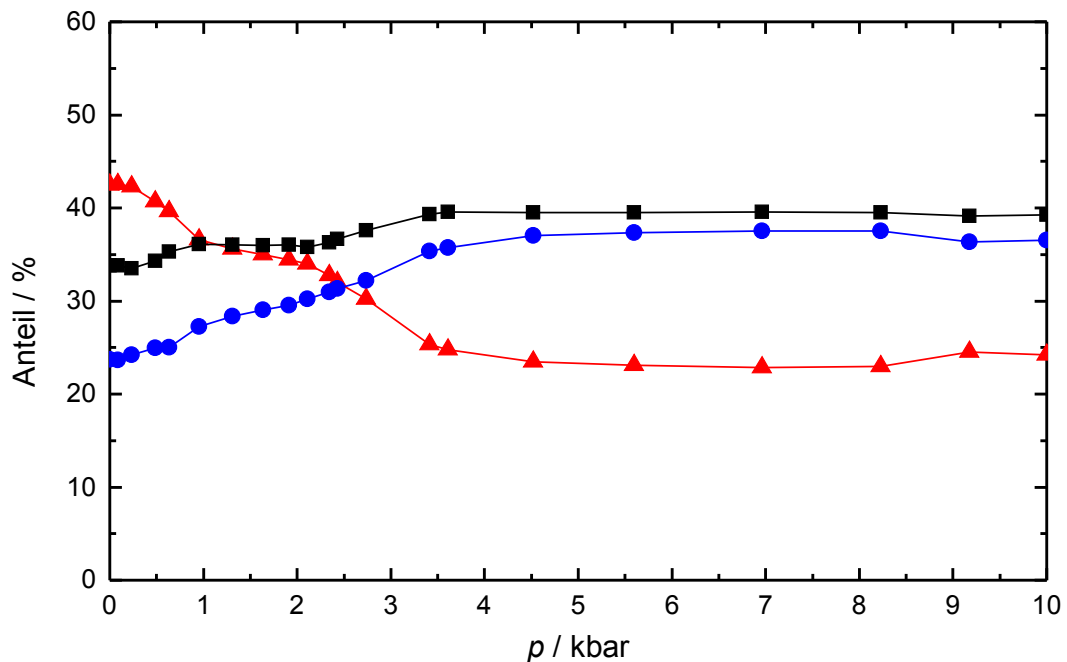


Abbildung 3.44: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

Die Abbildungen 3.43 - 3.44 zeigen die Entwicklung der Subbandenanteile in Abhängigkeit des Drucks. Bei beiden Temperaturen von 20 °C bzw. 30 °C ist eine druckinduzierte Hydratisierung des Copolymers zu sehen. Die hydrophile Bande steigt auf 36.5 % an, was ungefähr dem Hydratisierungsgrad des Mikrogels bei 5 °C und Atmosphärendruck entspricht. Der Unterschied besteht, wie schon beim PNiPAm-Mikrogel, darin, dass bei hohen Temperaturen, die weit oberhalb der VPTT liegen, ein Mindestdruck benötigt wird, um eine Hydratisierung des Mikrogels einzuleiten. In diesem Fall liegt der Druck bei circa 500 bar.

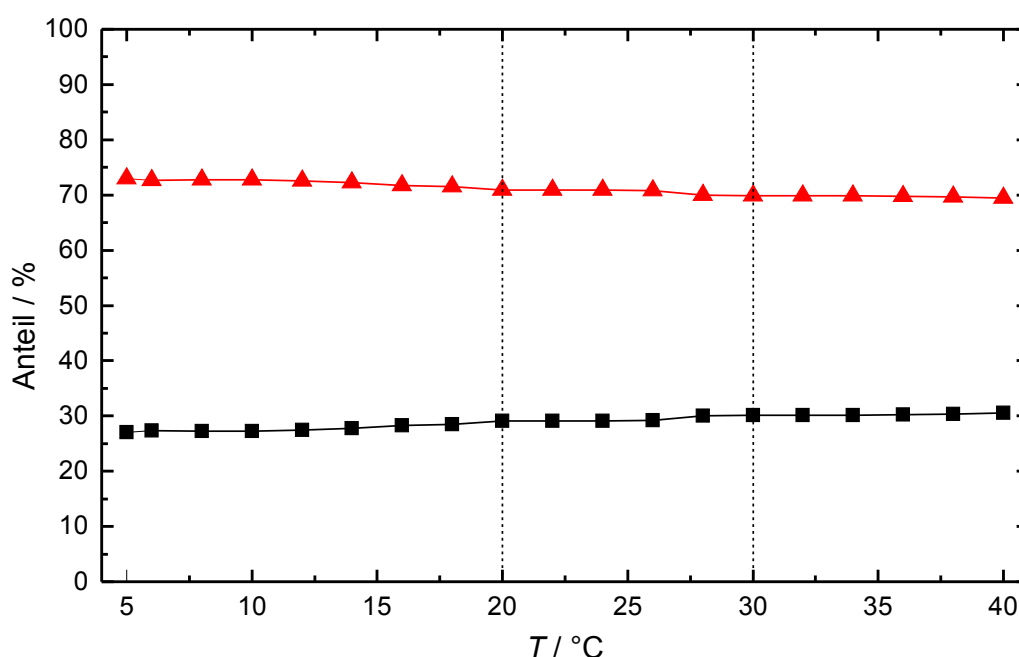


Abbildung 3.45: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 100 mol% CD₃OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich); die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

Zur Vervollständigung der Studie wurde das Copolymer auch in reinem Lösungsmittel in Abhängigkeit des Drucks sowie der Temperatur untersucht. Die korrespondierenden FTIR-Spektren sind in Abbildung 5.12 dargestellt. Analog zu den beiden Homopolymeren zeigt auch das Copolymer bei der Analyse der Subbanden keine signifikanten Veränderungen. Das Copolymer bleibt im gesamten Temperaturintervall in Lösung und fällt nicht aus. Die Bande bei 1650 cm⁻¹ liegt bei ≈ 70 %, die Bande bei 1620 cm⁻¹ bei ≈ 30 %. Durch Druckapplikation werden stärkere H-Brücken gebildet, sodass die Bande

bei 1620 cm^{-1} dementsprechend leicht ansteigt.

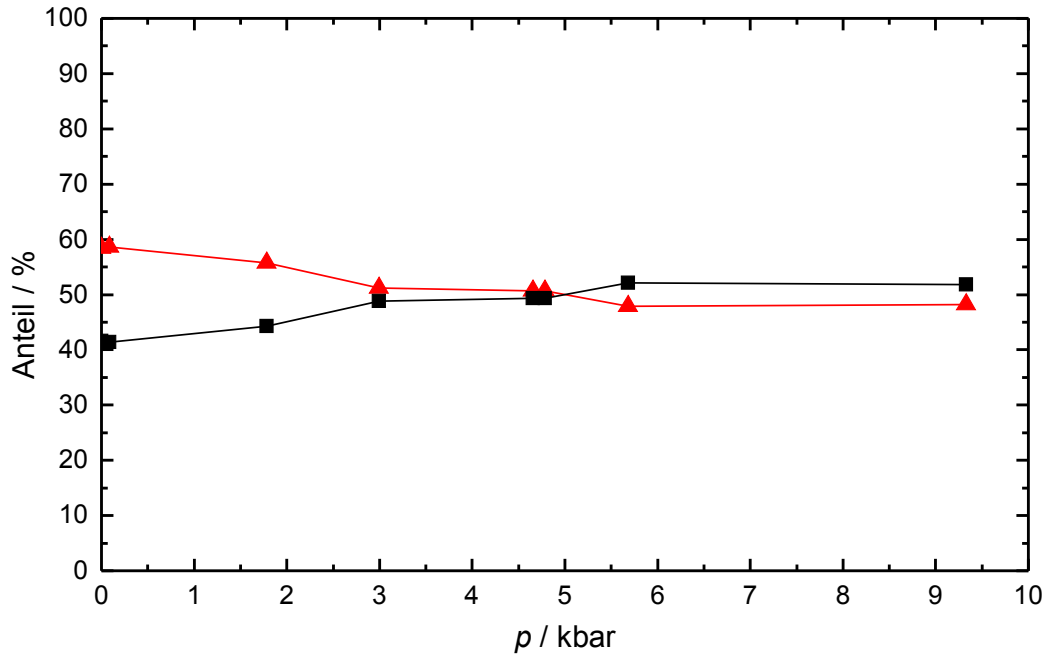


Abbildung 3.46: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 100 mol% CD_3OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 9.3 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich).

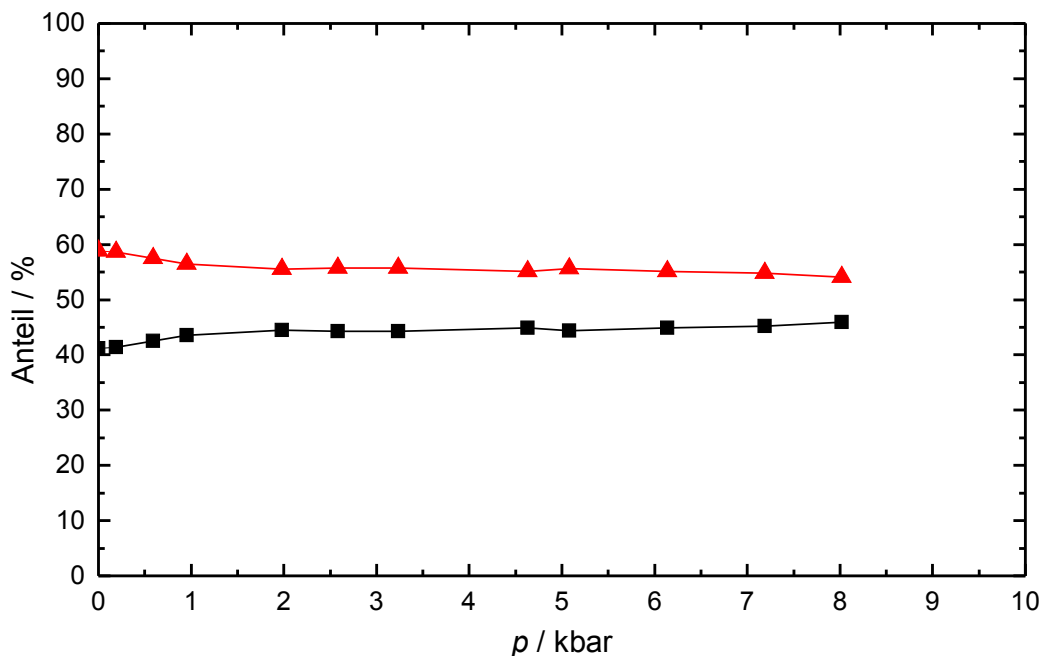


Abbildung 3.47: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 100 mol% CD_3OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 8 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich).

Röntgen-Kleinwinkelstreuung

Die Untersuchung des Cononsolvency-Effekts unter hohen hydrostatischen Drücken wurde mit Hilfe der Röntgen-Kleinwinkelstreuung am Mikrogel PNiPAm in verschiedenen Methanolkonzentrationen bei Temperaturen zwischen 10 °C und 50 °C durchgeführt. Dadurch konnte der Einfluss von Druck auf die Struktur und die Größe des Polymers im kollabierten und hydratisierten Zustand studiert werden. In Abbildung 3.48 sind repräsentative Streukurven des PNiPAm-Mikrogels in 10 mol% Methanol bei 30 °C in Abhängigkeit des Drucks dargestellt. Alle Streukurven weisen einen Anstieg bei kleinen q -Werten auf, der auf eine geringe Aggregation der Teilchen hindeutet. Die Ursache liegt möglicherweise darin begründet, dass während der Synthese das oberflächenaktive Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet wurde, das vor der Messung entfernt wurde, da nur das Verhalten des reinen Polymers in verschiedenen Lösungsmittelgemischen untersucht werden sollte.

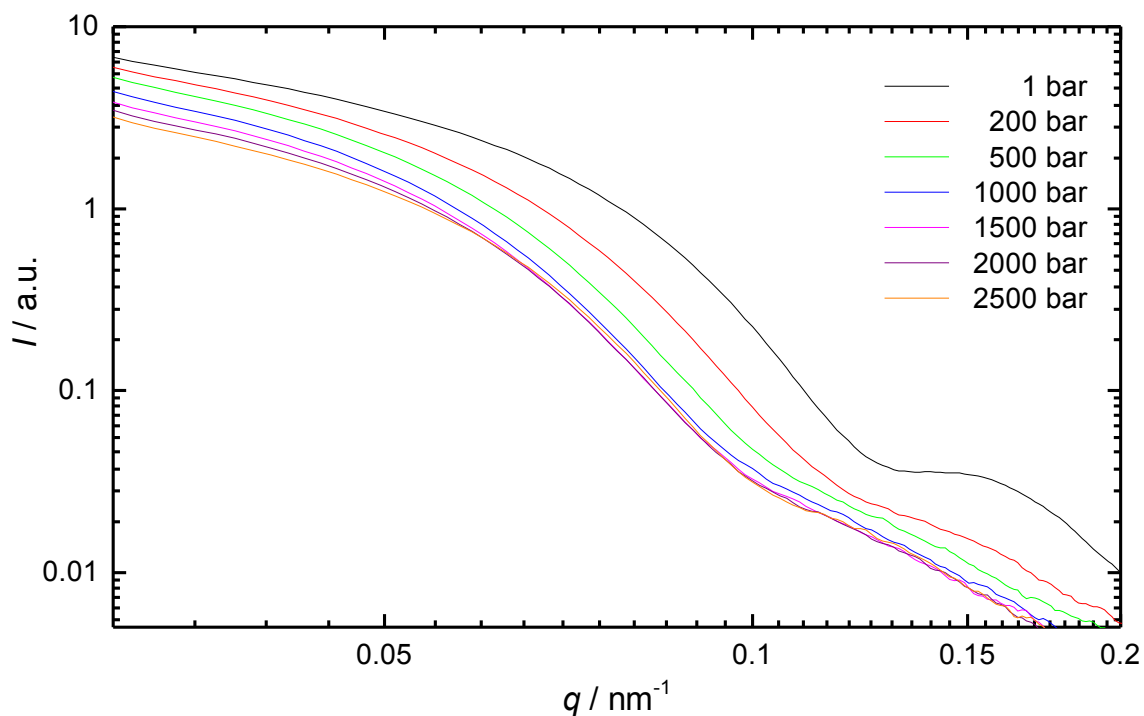


Abbildung 3.48: Repräsentative Streukurven des PNiPAm-Mikrogels in 10 mol% Methanol in Abhängigkeit des Drucks bei 30 °C.

Trotz dieses gemeinsamen Merkmals zeigen die Streukurven in Abhängigkeit des Drucks im mittleren und hohen q -Bereich signifikante Unterschiede. Der Verlauf der Streukurve

bei einem Druck von 1 bar lässt auf eine sphärische Teilchenform schließen. Das Minimum liegt bei einem q -Wert von etwa 0.135 nm^{-1} , das in erster Näherung auf einen Durchmesser des Mikrogels von 46.5 nm schließen lässt. Allerdings ist dieses Minimum nicht scharf ausgeprägt, das auf zwei mögliche Ursachen zurückzuführen ist. Zum einen kann eine Polydispersität der Teilchen einen solchen Effekt verursachen. Zum anderen kann die Form der Teilchen von einer idealen Kugel abweichen. Letzteres konnte durch eine detaillierte Analyse der Streukurven bestätigt werden. Dies bedeutet, dass das Mikrogel bereits bei Atmosphärendruck eine inhomogene Dichte aufweist. Diese Inhomogenität wird durch Druckapplikation verstärkt. Bereits bei 2000 bar ist kein Minimum mehr erkennbar, sondern nur noch ein schwach ausgeprägter Wendepunkt sichtbar. Mit steigendem Druck verschiebt sich das Minimum zu kleineren q -Werten, was auf eine größere Struktur des Polymers schließen lässt. Ab einem Druck von etwa 1000 bar verändern sich die Streukurvenverläufe nicht mehr signifikant, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das PNiPAm-Mikrogel bereits seine maximale Größe erreicht hat. Eine aussagekräftige, quantitative Analyse der Messungen bietet das Modell von *Stieger*, mit dem eine Funktionsanpassung (Fit) der temperatur- und druckabhängigen Streukurven durchgeführt wurde.^[126] Das Modell geht von einem Kern der Mikrogele mit konstanter Dichte aus, der von einer äußeren Schicht mit abnehmender Dichte umgeben wird. Als Anpassungsparameter werden der Radius des homogenen Kerns r_{box} und die Dicke der äußeren Oberflächenschicht des Mikrogels σ_{surf} erhalten. Diese Dicke bildet ein Viertel der äußeren, inhomogenen Schicht, sodass sich der Gesamtradius r_{tot} zu $r_{\text{tot}} = r_{\text{box}} + 4 \sigma_{\text{surf}}$ ergibt (vgl. Kapitel 3.1.2). In Abbildung 3.49 sind die experimentell gemessenen Streukurven von PNiPAm in 10 mol% Methanol bei 30 °C und einem Druck von 1 bar bzw. 1000 bar zusammen mit dem Formfaktor, der sich aus dem Anpassungsmodell ergibt, dargestellt.[†] Aus dem Verlauf der Anpassungsfunktion wird deutlich, dass das Modell sehr gut zur Beschreibung der Größe und Form der Mikrogele geeignet ist. Abweichungen der Anpassung von den experimentellen Daten sind nur bei sehr kleinen q -Werten ($q < 0.03 \text{ nm}^{-1}$) zu beobachten. Dies kann, wie bereits erwähnt, auf eine geringe Aggregation der Teilchen zurückgeführt werden. Bei hohen

[†] Weitere druckabhängige Streukurven mit entsprechender Funktionsanpassung gemäß dem Anpassungsmodell für PNiPAm in 5 mol% bzw. 10 mol% Methanol sind im Anhang in den Abbildungen 5.22 - 5.23 illustriert.

Drücken weichen die berechneten Daten des Formfaktors im Bereich großer q -Werte ($q > 0.2 \text{ nm}^{-1}$) von den experimentellen Streukurven ab. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die Streuintensität des Mikrogels in diesem Bereich nicht sehr stark vom Lösungsmittel unterscheidet, sodass der Fehler nach Abzug des Lösungsmittelbeitrages von der Streukurve relativ hoch ist. Dieser Effekt wird durch Druckapplikation verstärkt, da die Teilchen, wie später gezeigt wird, stärker hydratisiert werden und damit der Kontrast weiter verringert wird.

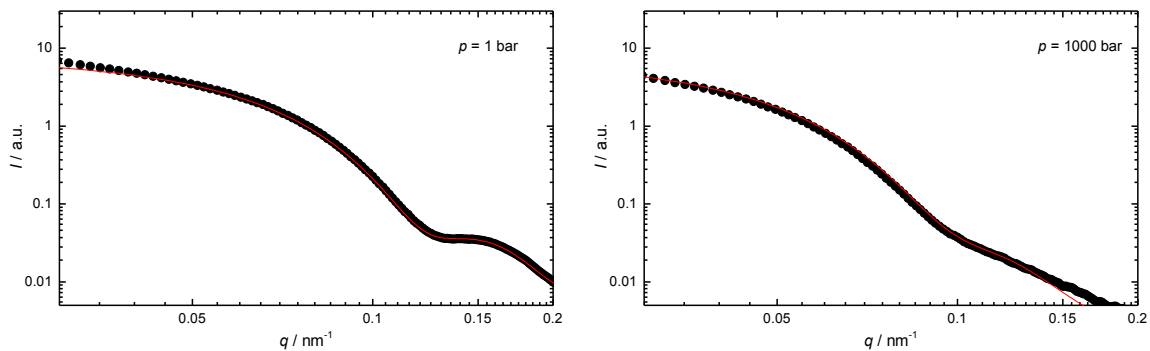


Abbildung 3.49: Streukurven des PNiPAM-Mikrogels in 10 mol% Methanol bei 30 °C und 1 bar (links) bzw. 1000 bar (rechts). Die rote Kurve zeigt den Verlauf des Fits aus dem Modell von *Steiger*.^[126]

Die Abwesenheit eines scharfen Minimums in der Streukurve ist auf die diffuse Schicht des Mikrogels zurückzuführen. Die Anpassungsergebnisse zeigen, dass bereits bei Atmosphärendruck die Form des Mikrogels nicht als eine harte Kugel beschrieben werden kann. Für die diffuse, äußere Schicht von PNiPAM in 10 mol% Methanol bei einer Temperatur von 30 °C ergibt sich für σ_{surf} ein Wert von 2.3 nm. Der Radius des Mikrogelkerns r_{box} beträgt 29.4 nm, das zu einem Gesamtradius r_{tot} von 38.6 nm führt (Abbildung 3.50). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung zu den Messwerten, die aus der dynamischen Lichtstreuung (DLS) erhalten wurden. Hier beträgt der Wert für den hydrodynamischen Radius r_{h} 42.0 nm (Abbildung 5.21). Durch Druckapplikation findet ein starker Anstieg der Gesamtgröße des Mikrogels r_{tot} bis zu einem Druck von 500 bar statt und erreicht ab etwa 1000 bar einen Plateauwert von 53 nm. Dabei zeigt sich, dass der Anteil der diffusen Schicht an der Gesamtgröße mit größer werdendem Druck steigt und bei 1000 bar einen Wert von 6.5 nm annimmt.

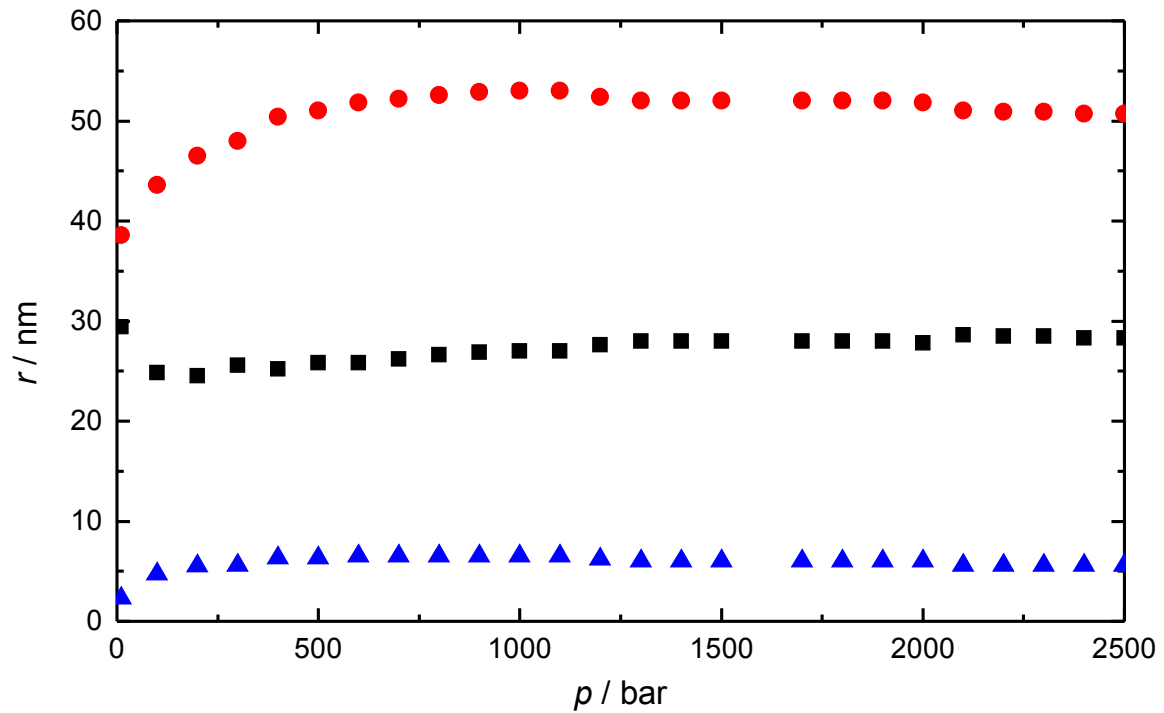


Abbildung 3.50: Anpassungsergebnisse aus dem Modell von *Stieger* für das PNIPAM-Mikrogel in 10 mol% Methanol bei 30 °C in Abhängigkeit des Drucks (\bullet r_{tot} , \blacksquare r_{box} , \blacktriangle σ_{surf}).

Der anfängliche Abfall von r_{box} bei Anwendung von Druck auf das System ist darauf zurückzuführen, dass der äußere Teil des homogenen Kerns in die diffuse Schicht übergeht. Nach der Bildung dieser druckinduzierten diffusen Schicht steigt r_{box} kontinuierlich von 24.8 nm bei 100 bar auf 28 nm bei 1500 bar an. σ_{surf} steigt dagegen bis zu einem Druck von 500 bar stark an und bleibt dann konstant bei einem Wert von circa 6.5 nm. Die Ergebnisse zeigen, dass der Vorgang des druckinduzierten Aufquellens des Mikrogels inhomogen verläuft. Mit steigendem Druck wird zunächst die diffuse Schicht des Polymers beeinflusst, während der innere Teil unberührt bleibt. Ab circa 300 bar tritt auch eine Schwellung des Mikrogelkerns auf, die jedoch an der Zunahme der Gesamtgröße r_{box} nur einen kleinen Teil ausmacht. Die Ursache für die Limitierung der druckinduzierten Hydratisierung des inneren Bereiches des Mikrogels liegt am Gradienten der Vernetzerdichte, die nach außen hin abnimmt.^[128] σ_{surf} trägt hingegen vierfach zur Radiusgesamtgröße r_{box} bei. Bei Drücken oberhalb von 1500 bar wird ein leichter Rückgang von r_{box} beobachtet, der auf eine Kompression des Mikrogels zurückgeführt werden kann. Dabei ist maßgeblich die äußere diffuse Schicht σ_{surf} verantwortlich. Die

Kompression bei Druckapplikation auf Mikrogel wurde auch bei SANS-Messungen von *Liétor-Santos et al.* beobachtet.^[125] Allgemein stehen sich bei Druckanwendungen auf diese Art von Polymeren Hydratisierungs- und Kompressionseffekte gegenüber, sodass dies auch ein Grund dafür ist, dass ab einem gewissen Druck ein Plateauwert für die maximale Ausdehnung des Mikrogels beobachtet wird. Wie aus DLS-Messungen hervorgeht (Abbildung 5.21), liegt die Volumenphasenübergangstemperatur (VPTT) des PNiPAM-Mikrogels in 10 mol% Methanol bei 23.5 °C, das heißt, dass die signifikante Größenänderung zwischen 20 °C und 30 °C abläuft. Daher befindet sich das Mikrogel in dieser Lösungsmittelzusammensetzung bei 30 °C im kollabierten Zustand. Aber bereits geringe Drücke reichen aus, um das Mikrogel in den hydratisierten Zustand zu bringen, wie es unterhalb der VPTT vorliegt. Als Vergleich sind in Abbildung 3.51 die Fitergebnisse für PNiPAM in 10 mol% Methanol bei 20 °C in Abhängigkeit des Drucks dargestellt.

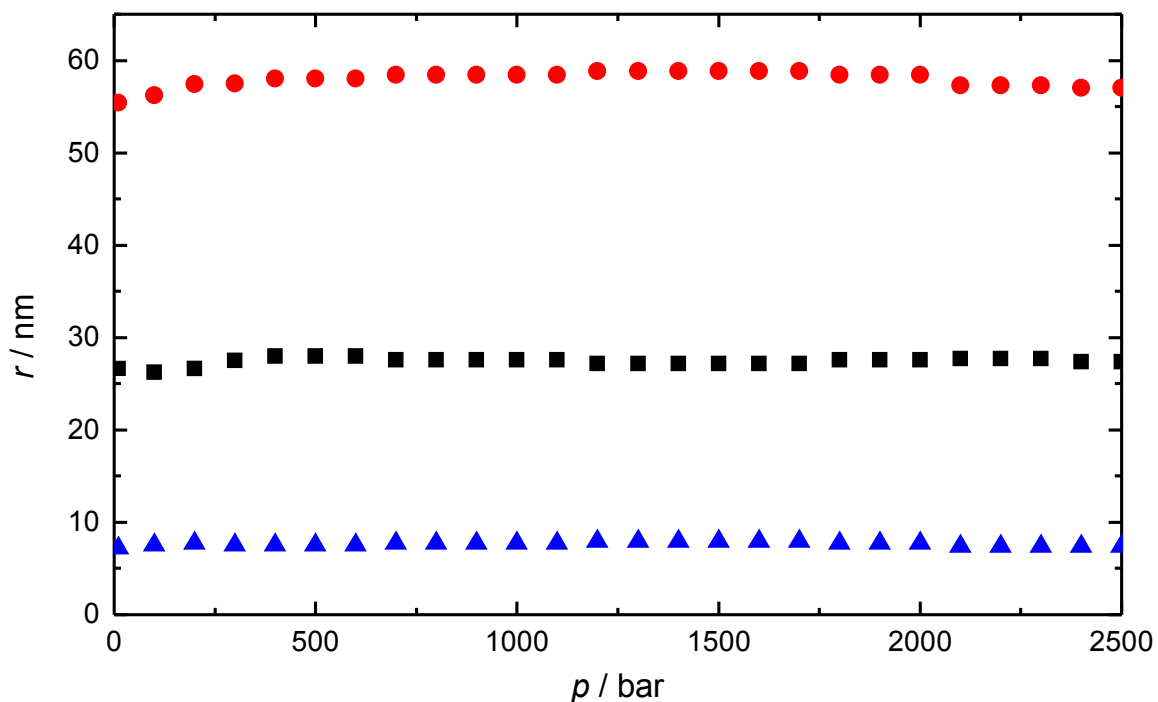


Abbildung 3.51: Fitergebnisse aus dem *Stieger*-Modell für das PNiPAM-Mikrogel in 10 mol% Methanol bei 20 °C in Abhängigkeit des Drucks (● r_{tot} , ■ r_{box} , ▲ σ_{surf}).

Bei Atmosphärendruck beträgt der Radius r_{tot} für das hydratisierte Mikrogel 55.4 nm. Bei Druckapplikation ändert sich die Größe nur wenig und steigt bei 1500 bar auf einen

Wert von 58.8 nm an. Die Begrenzung der Ausdehnung wird durch den Vernetzer bestimmt, da Druck keine Bindungen brechen kann und sich die Größe bei maximaler Hydratisierung nicht mehr ändert. Ein Vergleich der Größen bei 20 °C und 30 °C zeigt, dass für das kollabierte Mikrogel ein Druck von etwa 1000 bar benötigt wird, um die Größe des Mikrogels bei 20 °C und Atmosphärendruck zu erreichen, was einer Steigung der Phasengrenzlinie im p, T -Diagramm gemäß der CLAPEYRONschen Gleichung von 100 bar K^{-1} entspricht. Die maximale druckinduzierte Größe des Mikrogels liegt bei 30 °C jedoch unterhalb der Messwerte bei 20 °C. Bei Drücken über 2000 bar ist wieder eine geringe Kompression des Mikrogels zu beobachten.

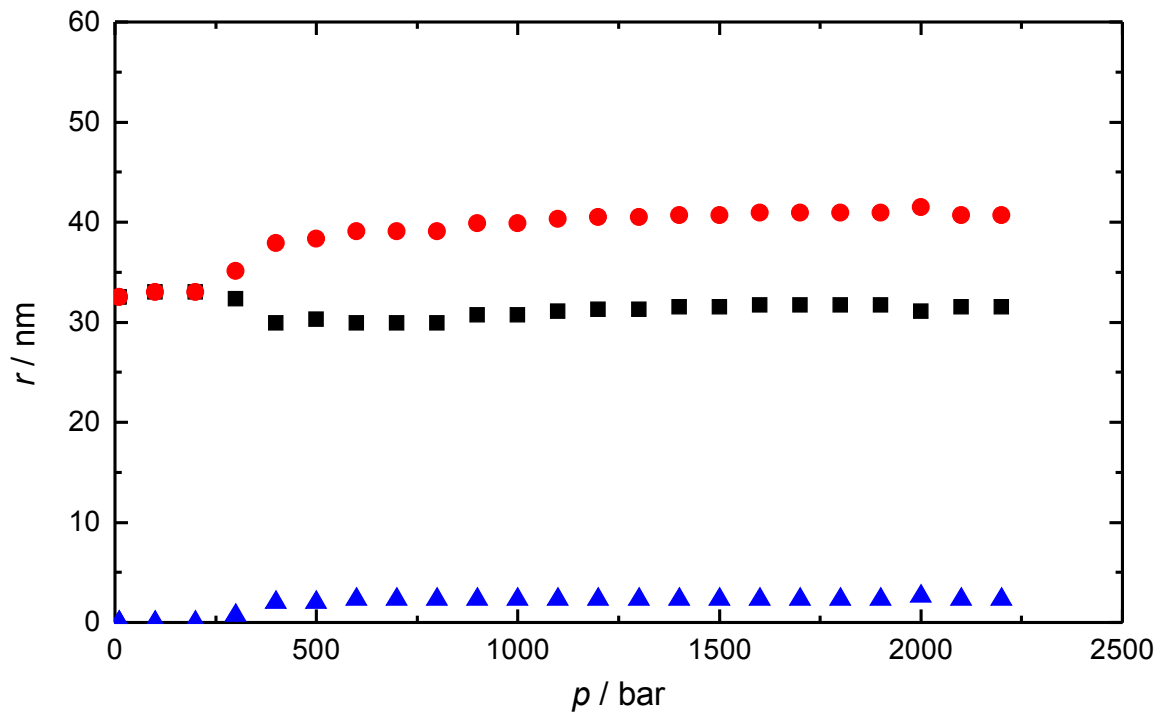


Abbildung 3.52: Fitergebnisse aus dem *Stieger*-Modell für das PNiPAm-Mikrogel in 10 mol% Methanol bei 40 °C in Abhängigkeit des Drucks (\bullet r_{tot} , \blacksquare r_{box} , \blacktriangle σ_{surf}).

Bei 40 °C befindet sich das PNiPAm in 10 mol% Methanol weit oberhalb der VPTT und liegt daher im kollabierten Zustand vor. Dies belegen auch die Fitergebnisse, die aus den Streukurven des Mikrogels erhalten wurden (Abbildung 3.52). Der Gesamtradius r_{tot} bei einem Druck von 1 bar liegt unterhalb des Wertes bei 30 °C, was zeigt, dass der Volumenphasenübergang bei 30 °C noch nicht abgeschlossen ist. Die Teilchen besitzen keine diffuse äußere Schicht mehr, sondern zeigen eine homogene Dichte, die

vergleichbar mit derjenigen eines sphärischen Partikels ist. Bei 30 °C wurde bei Druckapplikation eine spontane Antwort des stimuli-sensitiven Systems beobachtet, die sich in einer signifikanten Zunahme der Größe der diffusen Schicht äußerte. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei 40 °C bis zu einem Druck von etwa 300 bar kaum eine messbare Veränderung des Systems. Erst oberhalb dieses „Schwellendrucks“ verändert sich die Struktur des Mikrogels von einem kollabierten Teilchen mit homogener Dichte zu einem leicht geschwollenen Partikel mit inhomogener Dichte. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen aus den druckabhängigen FTIR-Messungen (vgl. Abbildung 3.12 und 3.16). Auch hier wurde unterhalb eines Drucks von circa 300 bar bei 5 mol% bzw. 10 mol% Methanol bei einer Temperatur von 40 °C keine Hydratisierung festgestellt. Die Gesamtgröße des Mikrogels bei 40 °C erreicht jedoch in diesem Druckbereich nicht die Werte, die bei 20 °C bzw. 30 °C gemessen wurden. Dies zeigt eindeutig, dass Druck nur bedingt den temperaturinduzierten Kollaps der Teilchen aufheben kann. Je weiter die Temperatur von der VPTT entfernt liegt, desto geringer fällt der Einfluss des Drucks auf den Schwellungsgrad des Mikrogels aus.

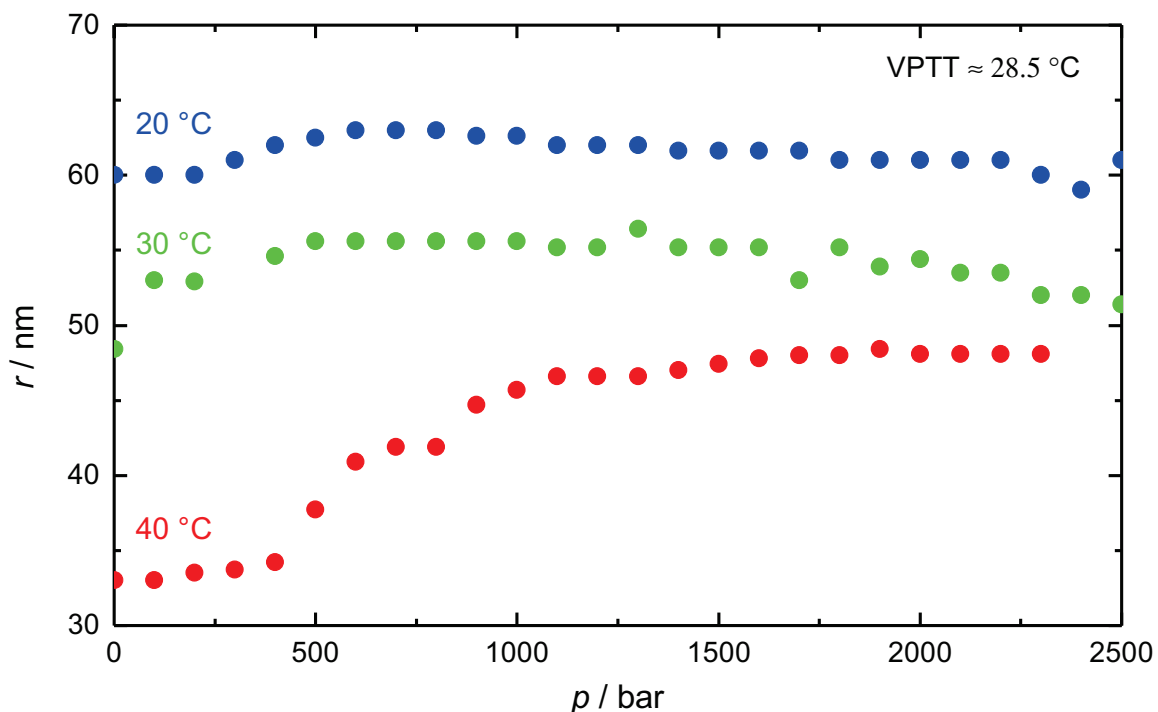


Abbildung 3.53: Vergleich des Gesamtradius $r = r_{\text{tot}}$ des PNiPAm-Mikrogels in 5 mol% Methanol bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Drucks.

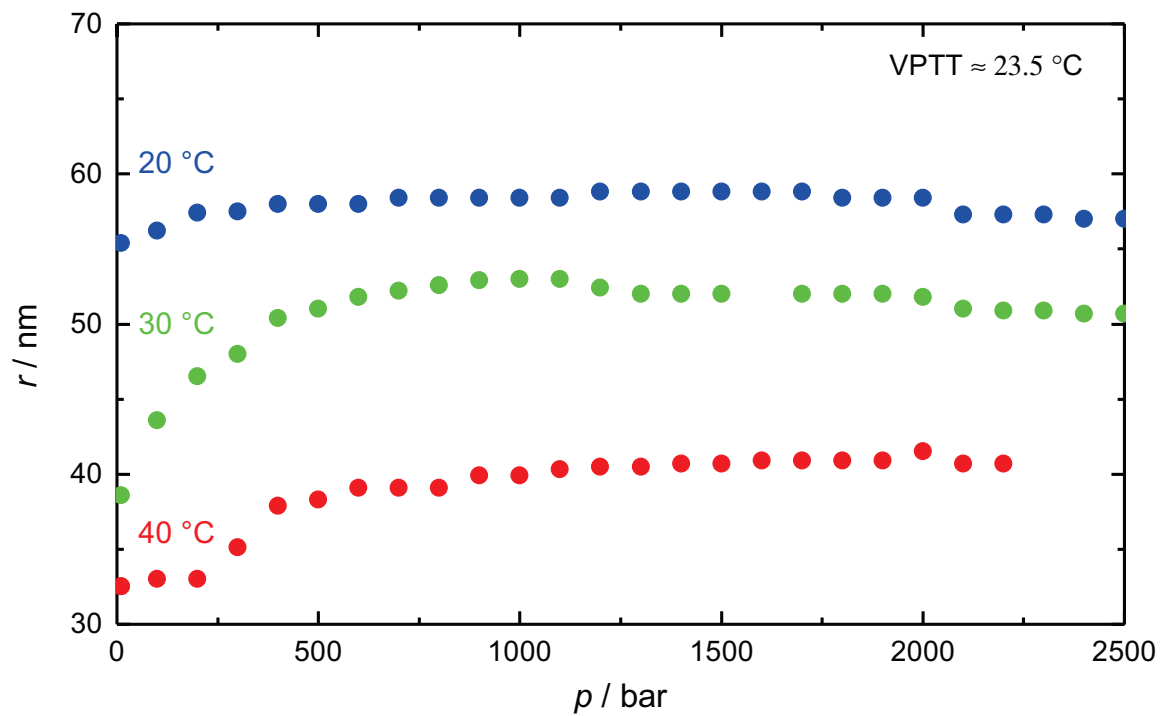


Abbildung 3.54: Vergleich des Gesamtradius $r = r_{\text{tot}}$ des PNIPAm-Mikrogels in 10 mol% Methanol bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Drucks.

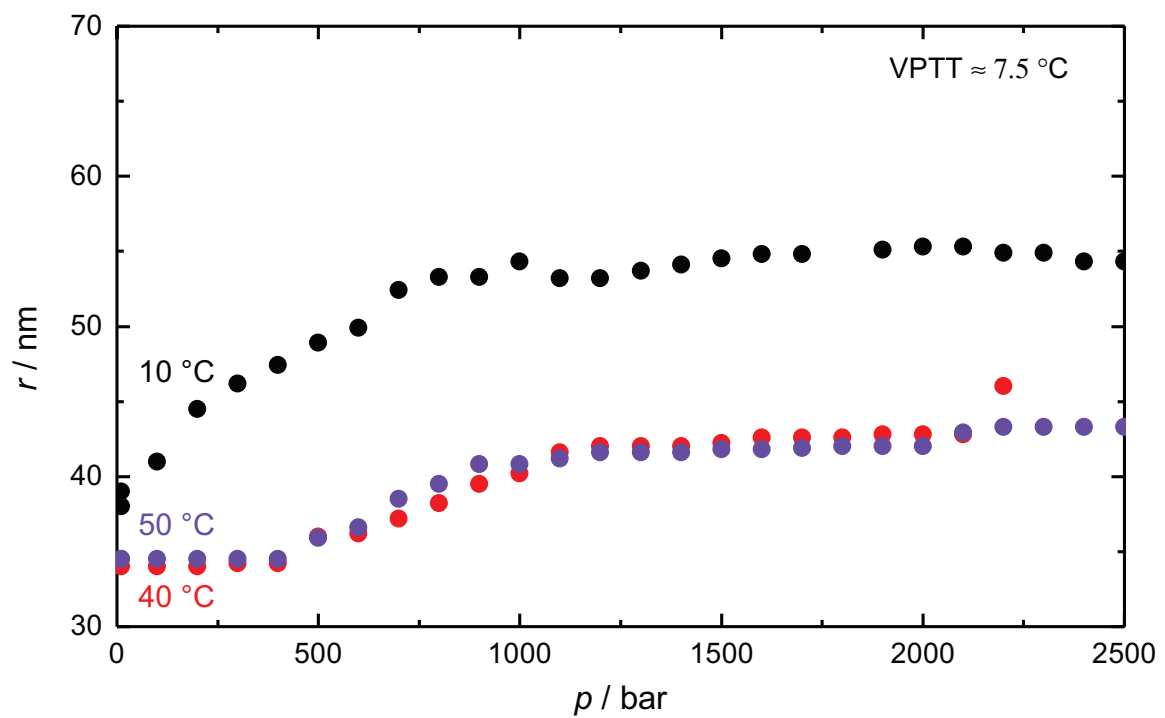


Abbildung 3.55: Vergleich des Gesamtradius $r = r_{\text{tot}}$ des PNIPAm-Mikrogels in 20 mol% Methanol bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Drucks.

Um diese Aussage zu bestätigen, sind in den Abbildungen 3.53 - 3.55 der Gesamtradius r_{tot} in verschiedenen Lösungsmittelgemischen bei Temperaturen unter- sowie oberhalb der VPTT in Abhängigkeit des Drucks dargestellt. Wie schon den FTIR-Messungen zu entnehmen ist, verringert eine Zugabe von Methanol die VPTT. Bei Temperaturen unterhalb der Phasenübergangstemperatur wird nur eine geringe druckinduzierte Quellung des Mikrogels beobachtet, während hohe Drücke eine leichte Kompression verursachen. Ein starker Anstieg der Gesamtgröße r_{tot} bei Druckapplikation ist bei denjenigen Temperaturen zu erkennen, die nur wenig oberhalb der VPTT liegen. Diese Vergrößerung wird überwiegend auf das Schwellen der Polymeroberfläche, das heißt, der diffusen Schicht σ_{surf} zurückgeführt. Bei geringen Drücken ist die Größenzunahme des PNiPAM-Kerns nur minimal, zeigt jedoch eine signifikante Steigerung bei höheren Drücken (vgl. Abbildungen 3.50 - 3.52).[‡] Ein druckbedingtes Quellen des Mikrogels wird auch bei Temperaturen weit oberhalb der VPTT observiert. Es treten jedoch einige maßgebliche Unterschiede auf. Unterhalb von 500 bar tritt keine Quellung des Polymers auf. Diese Besonderheit eines erforderlichen „Mindestschwellendrucks“ ist bei allen Lösungsmittelgemischen erkennbar, deren Temperatur weit oberhalb der VPTT liegt und möglicherweise mit einer veränderten Oberflächenmorphologie des Mikrogels im kollabierten Zustand zusammenhängt. Da PNiPAM hier eine homogene Dichteverteilung aufweist, hat es auch eine wohldefinierte Grenzfläche zum Lösungsmittel und damit eine gewisse Oberflächenspannung im Gegensatz zu Temperaturen nahe des Volumenphasenübergangs, bei dem das Polymer nach wie vor leicht hydratisiert ist und somit noch über eine ausgeprägte diffuse Außenschicht verfügt. Daher ist ein gewisser „Schwelldruck“ notwendig, der die Oberflächenenergie überwindet und zu einer signifikanten Schwächung der hydrophoben Wechselwirkungen führt. Oberhalb dieses Druckes steigt die Größe des Gels an und erreicht einen Plateauwert bei circa 1100 bar. Auch hier erfolgt der überwiegende Anteil an der Gesamthydratisierung in der diffusen Schicht. Wie aus Abbildung 3.52 zu erkennen ist, liegt die maximale Gesamtgröße nach Druckapplikation bei hohen Temperaturen zudem deutlich unterhalb der Werte bei Atmosphärendruck im hydratisierten Zustand. Bei Temperaturen von 40 °C und 50 °C in einer

[‡] Die korrespondierenden Fitergebnisse für die übrigen Temperaturen und Mischungsverhältnisse des Lösungsmittels sind im Anhang in der Abbildung 5.24 dargestellt.

20 mol%-igen Methanollösung (VPTT ≈ 7.5 °C) hat PNiPAm im gesamten Druckbereich nahezu die gleiche Größe und verhält sich somit ähnlich wie PNiPAm in 10 mol% bei 40 °C.

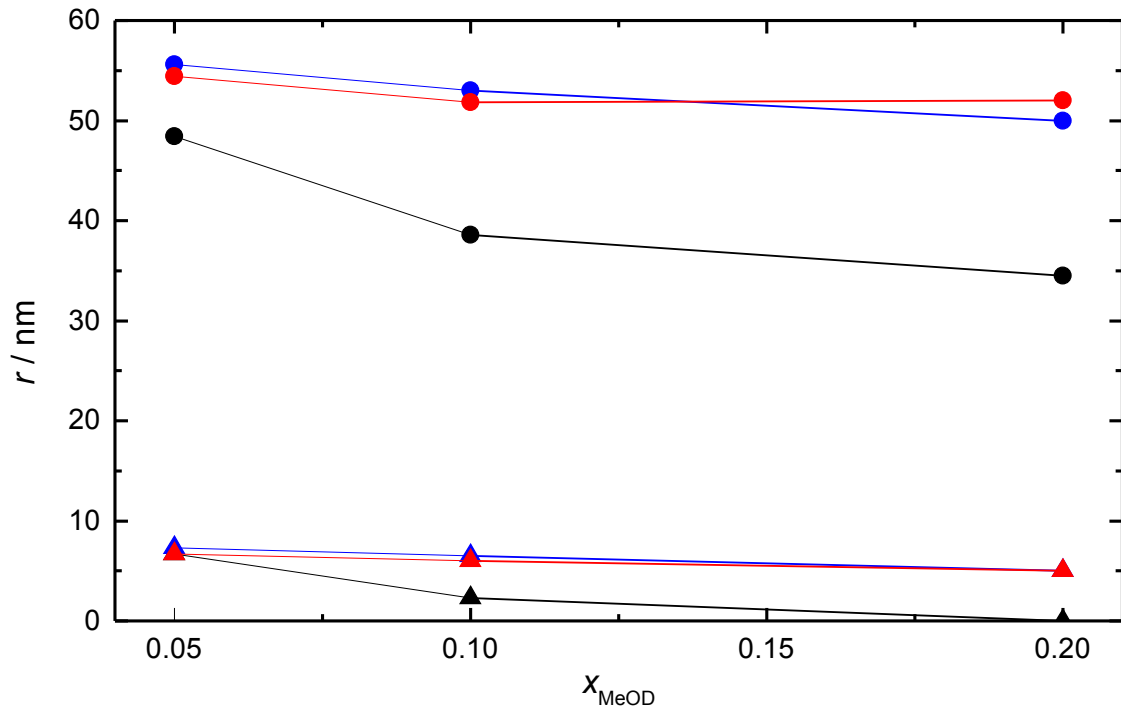


Abbildung 3.56: Gesamtgröße r_{tot} und diffuse Schicht σ_{surf} in Abhängigkeit der Methanolkonzentration (MeOD) bei 30 °C und unterschiedlichen Drücken (● r_{tot} 1 bar, ● r_{tot} 1000 bar, ● r_{tot} 2000 bar, ▲ σ_{surf} 1 bar, ▲ σ_{surf} 1000 bar, ▲ σ_{surf} 2000 bar).

Die SAXS-Ergebnisse belegen, dass die Anwendung von hohen hydrostatischen Drücken dem temperaturinduzierten Kollaps des Mikrogels entgegenwirkt, und stehen somit im Einklang zu den druckabhängigen FTIR-Messungen, die eine druckinduzierte Hydratisierung des Polymers zeigen.^[95] In dieser Studie ist zudem zu sehen, welchen Einfluss die Lösungsmittelzusammensetzung auf die Größe und Form des Mikrogels in Abhängigkeit des Drucks bei verschiedenen Temperaturen hat, um dadurch Aussagen über das druckabhängige Verhalten des Cononsolvency-Effekts zu treffen. Dazu werden die Parameter aus dem Anpassungsmodell in Abhängigkeit des Methanolgehaltes verglichen. In Abbildung 3.56 sind die Werte für r_{tot} und σ_{surf} in Abhängigkeit der Methanolkonzentration bei 30 °C und drei verschiedenen Drücken dargestellt. Der Vergleich der Gesamtradien r_{tot} bei verschiedenen Drücken zeigt deutlich, dass Druck dem Cononsolvency-Effekt entgegenwirkt bzw. ihn sogar ganz aufhebt. Bei einem Druck von 1 bar ist ein signi-

fikanter Abfall der Größe des Mikrogel r_{tot} mit steigender Methanolkonzentration zu erkennen. Bei 1000 bar ist dieser Abfall immer noch vorhanden, allerdings nicht mehr so ausgeprägt. Schließlich werden bei 2000 bar im untersuchten Konzentrationsbereich annähernd die gleichen Werte für r_{tot} erhalten, sodass die Größe des Mikrogels unabhängig von der Methanolkonzentration ist. Die Überschneidung der Werte bei 1000 bar und 2000 bar ist auf die Kompression der Teilchen zurückzuführen, die bei sehr hohen Drücken die Hydratisierung überlagert. Auf Grund dessen ist der Gesamtradius r_{tot} bei 2000 bar geringer als bei 1000 bar, solange das Polymer vollständig hydratisiert ist. Bei einer Methanolkonzentration von 20 mol% ist selbst bei einem Druck von 1000 bar immer noch ein durch das Lösungsmittel verursachtes Schrumpfen des Mikrogels zu erkennen, sodass hier der Wert für r_{tot} bei 2000 bar höher liegt. Ein Vergleich der diffusen Schicht in Abhängigkeit der Methanolkonzentration zeigt, dass diese mit steigendem Methanolgehalt kleiner wird und schließlich bei einer Konzentration von 20 mol% vollständig kollabiert. Dieser Trend wird selbst bei Druckapplikation beobachtet, jedoch ist zu sehen, dass unter Druck der Wert für σ_{surf} mit steigender Methanolkonzentration nur leicht abnimmt und daher die Größe der diffusen Schicht bei hohen Drücken als unabhängig vom Alkoholgehalt angesehen werden kann. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass bei hohen Drücken die Phasenübergangstemperatur zu höheren Temperaturen verschoben wird. Daher werden in den Abbildungen 3.57 und 3.58 r_{tot} und σ_{surf} in Abhängigkeit des Methanolgehaltes bei einem konstanten Druck von 1 bar bzw. 2000 bar bei zwei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Bei Atmosphärendruck zeigen die Daten das erwartete Verhalten. Bei kleinen CD_3OD -Konzentrationen wird ein signifikanter Abfall der Mikrogelgröße beobachtet, der auf den Kollaps der diffusen Oberflächenschicht zurückgeführt wird, da σ_{surf} bei 40 °C auf Null absinkt. Mit steigendem Methanolgehalt geht der Wert für σ_{surf} auch bei 30 °C gegen Null, sodass bei 20 mol% Methanol zwischen diesen Temperaturen kein Unterschied mehr besteht. Anders sieht es bei einem Druck von 2000 bar aus, bei dem ein Temperatureffekt im gesamten Konzentrationsbereich sichtbar ist und σ_{surf} nicht auf Null abfällt. Daher kann konstatiert werden, dass eine Unterdrückung des Temperatureffektes bei hohen Methanolgehalten durch Applikation von hohen hydrostatischen Drücken nicht stattfindet bzw. der Conosolvency-Effekt nicht mehr in Erscheinung tritt.

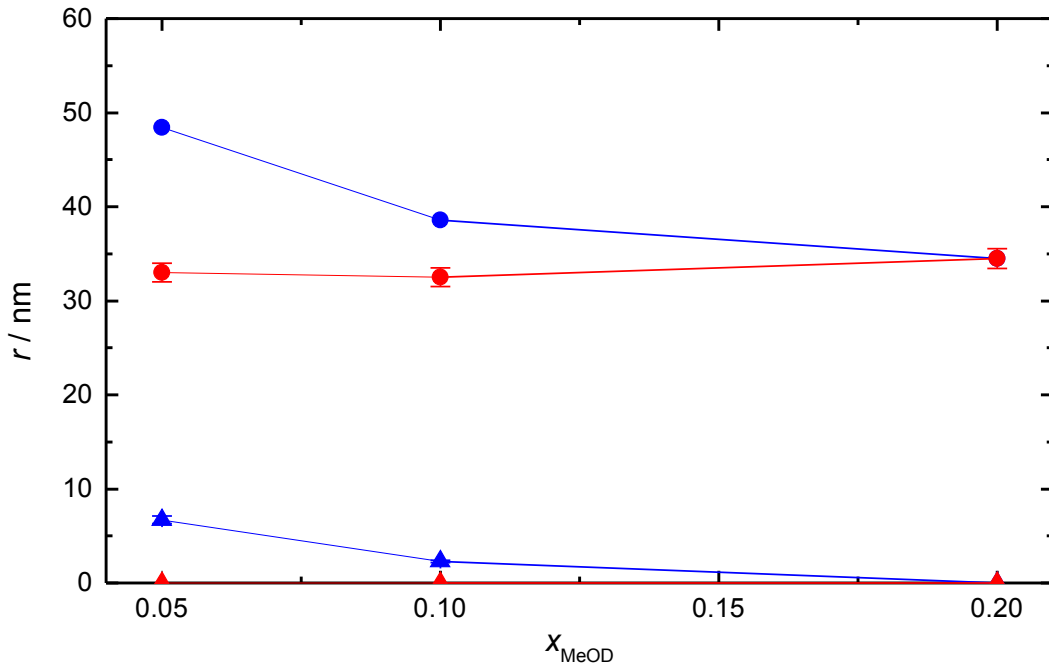


Abbildung 3.57: Gesamtgröße r_{tot} und diffuse Schicht σ_{surf} in Abhängigkeit der Methanolkonzentration (MeOD) bei 1 bar und unterschiedlichen Temperaturen (● r_{tot} 30 °C, ● r_{tot} 40 °C, ▲ σ_{surf} 30 °C, ▲ σ_{surf} 40 °C).

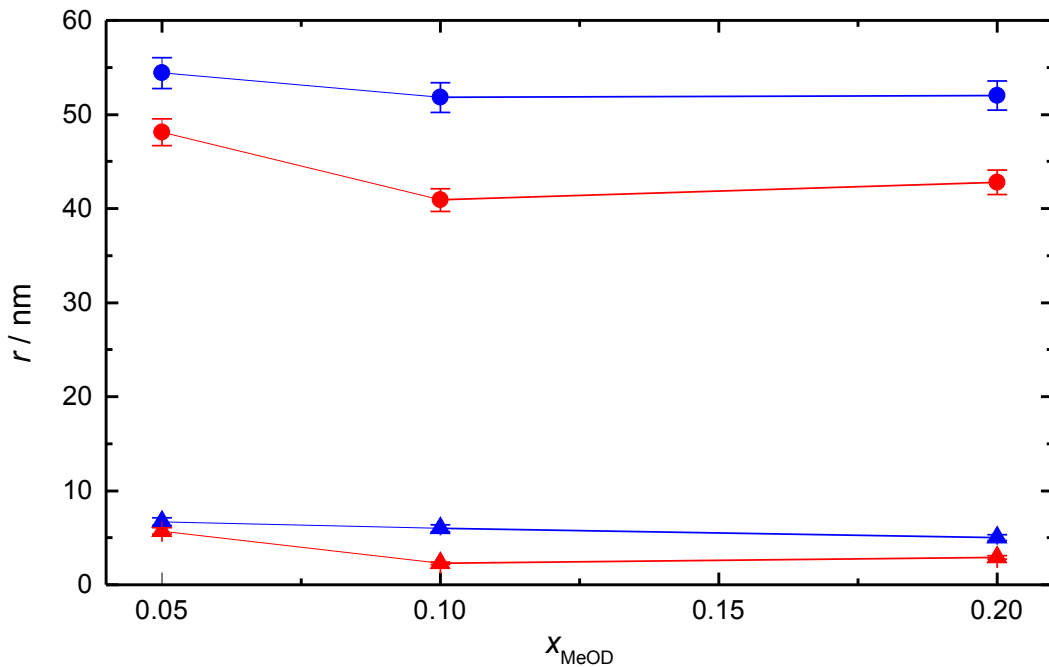


Abbildung 3.58: Gesamtgröße r_{tot} und diffuse Schicht σ_{surf} in Abhängigkeit der Methanolkonzentration (MeOD) bei 2000 bar und unterschiedlichen Temperaturen (● r_{tot} 30 °C, ● r_{tot} 40 °C, ▲ σ_{surf} 30 °C, ▲ σ_{surf} 40 °C).

Die Ursache für dieses Verhalten liegt in einer veränderten, druckinduzierten Solvatisierung des Mikrogels. In einer kürzlich veröffentlichten Neutronenreflektivitätsstudie konnte an einem ähnlichen System dieser Effekt quantifiziert werden. Dabei wurde eine CLAPEYRONsche Steigung (dp/dT) zwischen dem hydratisierten und kollabierten Zustand von 100 bar K^{-1} festgestellt, die in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit durchgeführten Hochdruck-SAXS- sowie Hochdruck-FTIR-Messungen für Methanolkonzentrationen bis 10 mol% steht.^[98] Eine Erhöhung der CD_3OD -Konzentration führt zu einer Konkurrenzsituation der Wasser- und Methanolkoleküle um die Solvatisierung des Mikrogels. Dies ist womöglich auch die Erklärung für die geringe druckinduzierte Hydratisierung von PNIPAm bei 20 mol% Methanol, da der Wassergehalt hier bereits signifikant reduziert ist, Druck aber die Solvatisierung mit Wasser im Vergleich zu Methanol begünstigt (Abbildung 3.55). Die Ursache liegt darin, dass die Wasserstoffbrückenbindungen zu Wasser unter Druck verstärkt werden, wohingegen bei Methanol zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle spielen, die wahrscheinlich unter Druck geschwächt werden.^[129] Zudem führt Druck zu einer Erhöhung der Anzahl an Wassermolekülen, die andere Wassermoleküle umgeben, und verringert die durchschnittliche Bindungsenergie.^[130] Durch Druckperturbation der tetraedrischen Symmetrie des Wasserstoffbrückennetzwerkes wird die Aktivierungsenergie für eine Insertion von Wasser in eine ungünstigere, unpolare Umgebung geringer. Auf Grund dessen resultiert durch Applikation hoher hydrostatischer Drücke das Eindringen von Wassermolekülen in das Innere von hydrophoben Domänen des kollabierten Polymers. Dieses Verhalten ähnelt der druckinduzierten Entfaltung von Proteinen, bei der Wasser in die Hohlräume (engl.: cavities) gelangt und so eine Hydratisierung von hydrophoben Gruppen erfolgt.^[97,131] Diese druckinduzierte Hydratisierung erfolgt bei Mikrogelen allerdings nur solange, bis es den kollabierten Zustand verlassen hat und vollständig solvatisiert ist. Eine weitere druckinduzierte Änderung der Konformation sowie des Schwellungsgrades wird durch die Quervernetzer im Mikrogel eingeschränkt. Dadurch wird ein Plateauwert bei der Hydratisierung beobachtet, im Gegensatz zur druckinduzierten Entfaltung von Proteinen, bei der eine weitere Hydratisierung von Sekundär- sowie Tertiärstrukturen stattfindet. Dies führt zu Unterschieden bei thermodynamischen Parametern, wie beispielsweise Änderungen des Volumens, der Entropie, der Kompress-

sibilität, der thermischen Expansion sowie der Wärmekapazität beim Entfaltungsprozess, was die unterschiedliche Form sowie den Verlauf des p, T -Phasendiagramms dieser beiden Systeme erklärt.^[132–134]

Hohe hydrostatische Drücke verstärken die Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen der Carbonylgruppe vom PNiPAm und Wasser gebildet wird, wodurch ursprünglich über eine H-Brücke gebundenes Methanol zum Polymer bei Druckapplikation durch Wasser substituiert wird. Als Folge wird eine Quellung des Polymers beobachtet, da die hydratisierten Ketten in eine gestrecktere Konformation übergehen. Diese druckbedingte Hydratisierung auf Kosten der Bindung zum Methanol ist wahrscheinlich auch die Ursache für den Verlust des Cononsolvency-Effekts bei hohen Drücken, sofern H-Brücken des Methanols als essentiell für diesen Effekt betrachtet werden.

3.1.4 Ergebnisse lineare Polymere

Die linearen Polymerketten wurden mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie temperatur- und druckabhängig untersucht. Dabei ist vor allem das Verhalten der Copolymere in verschiedenen Wasser/Methanol-Mischungen interessant. Das erste Copolymer besteht aus äquimolaren Anteilen von DEAm und NiPAM (im Folgenden als 1:1 Copolymer bezeichnet). Beim zweiten Copolymer beträgt das molare Verhältnis zwischen DEAm und NiPAM 3:1 (im Folgenden als 3:1 Copolymer bezeichnet). Die FTIR-Spektroskopie liefert wichtige Erkenntnisse über das Phasenverhalten der jeweiligen Polymermischungen in einem großen Temperatur- und Druckbereich.

FTIR-Spektroskopie

Die FTIR-Spektren der linearen Ketten der beiden Homopolymere PNiPAM sowie PDEAm bei verschiedenen Methanolkonzentrationen sind in den Abbildungen 5.13 - 5.14 zu sehen. Obwohl diese nicht im Fokus der Untersuchung standen, wurden die Messungen auf Grund der jeweiligen Zuordnungen der einzelnen Subbanden angefertigt. Zudem konnten die Ergebnisse aus der Literatur reproduziert werden, sodass diese die Basis für komplexere Studien bilden.^[95,108] Im Vergleich zu den Mikrogelen findet der Phasenübergang bei den linearen Ketten nicht kontinuierlich statt, sondern ist sehr scharf ausgeprägt. Der Verlauf der Spektren verhält sich im Wesentlichen analog zu den Mikrogelen.

1:1 Copolymer

In Abbildung 3.59 sind die normierten FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des 1:1 Copolymers in D₂O in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt. Aus dem Verlauf ist eine Verschiebung der Spektren zu größeren Wellenzahlen erkennbar, die mit der Ausbildung einer Schulter bei $\approx 1645 \text{ cm}^{-1}$ einhergeht. Dies bedeutet, wie schon bei dem Mikrogel-Copolymer, eine Zunahme von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten. Die Amid-I'-Bande wird auch hier in drei große Subbanden unterteilt, die einen hydrophilen, einen gemischt hydrophilen/hydrophoben sowie einen hydrophoben Anteil beschreiben.

Die Analyse der jeweiligen Segmente des 1:1 Copolymers in D₂O in einem Tempera-

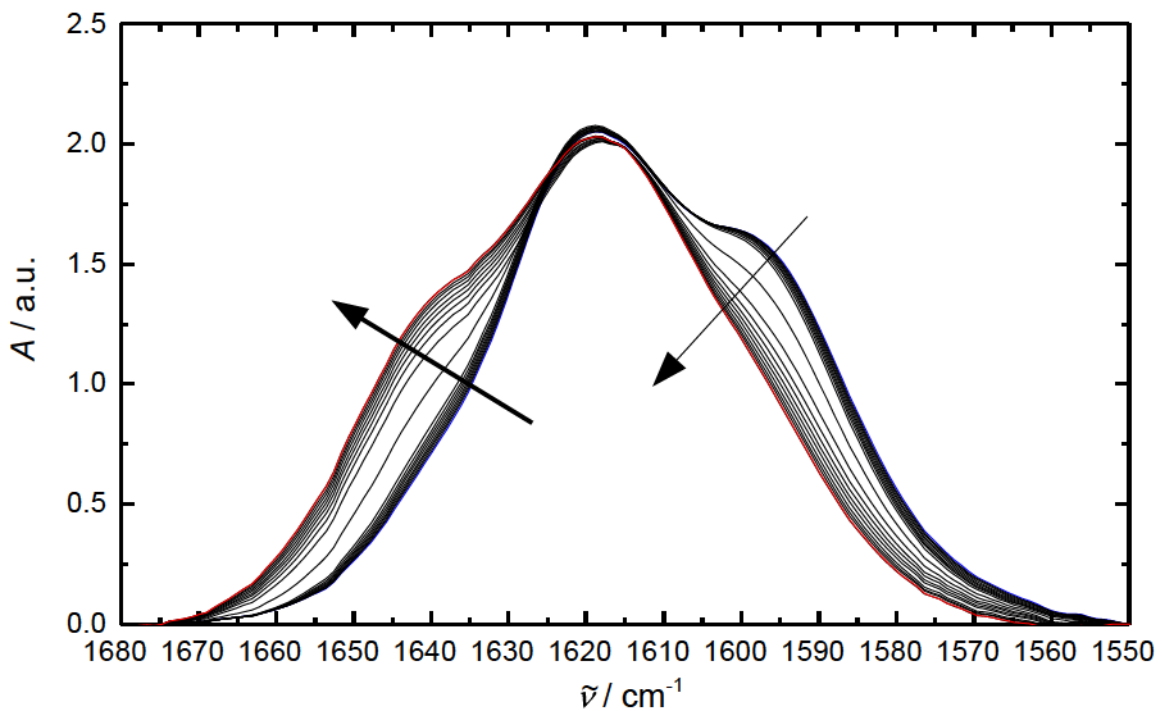


Abbildung 3.59: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des 1:1 Copolymers in D_2O zwischen $5\text{ }^\circ\text{C}$ und $40\text{ }^\circ\text{C}$. Der Temperaturverlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei $5\text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $40\text{ }^\circ\text{C}$.

turbereich zwischen $5\text{ }^\circ\text{C}$ und $40\text{ }^\circ\text{C}$ ist in Abbildung 3.60 dargestellt. Der Verlauf der Subbandenanteile zeigt, dass mit zunehmender Temperatur der hydrophobe Anteil von 10.1% auf 33.5% ansteigt, was eine Erhöhung der Bindungen zwischen dem Amid-Proton des PNiPAM-Anteils mit einer Carbonylgruppe beschreibt. Dies führt zu einer Präzipitation der Ketten, wobei Wasser das System verlässt und zu einer Erhöhung der Entropie führt, die die treibende Kraft des temperaturinduzierten Phasenübergangs ist. Die Phasenübergangstemperatur liegt bei diesem Copolymer bei ungefähr $21\text{ }^\circ\text{C}$. Oberhalb der LCST liegt der Anteil der starken H-Brücken, die von Wasser gebildet werden und im hydrophilen Segment lokalisiert sind, bei circa 21% . Die gemischte Bande ändert sich zwischen dem Anfangs- und Endzustand im Wesentlichen nicht. Bei einer Temperatur von $30\text{ }^\circ\text{C}$, bei der das Copolymer ausgefallen vorliegt, wurde das System in Abhängigkeit des Drucks untersucht. Die Spektren sind in Abbildung 5.15 zu sehen und zeigen eine druckinduzierte Verschiebung der Spektren zu kleineren Wellenzahlen, die diametral zu den Temperaturspektren verlaufen.

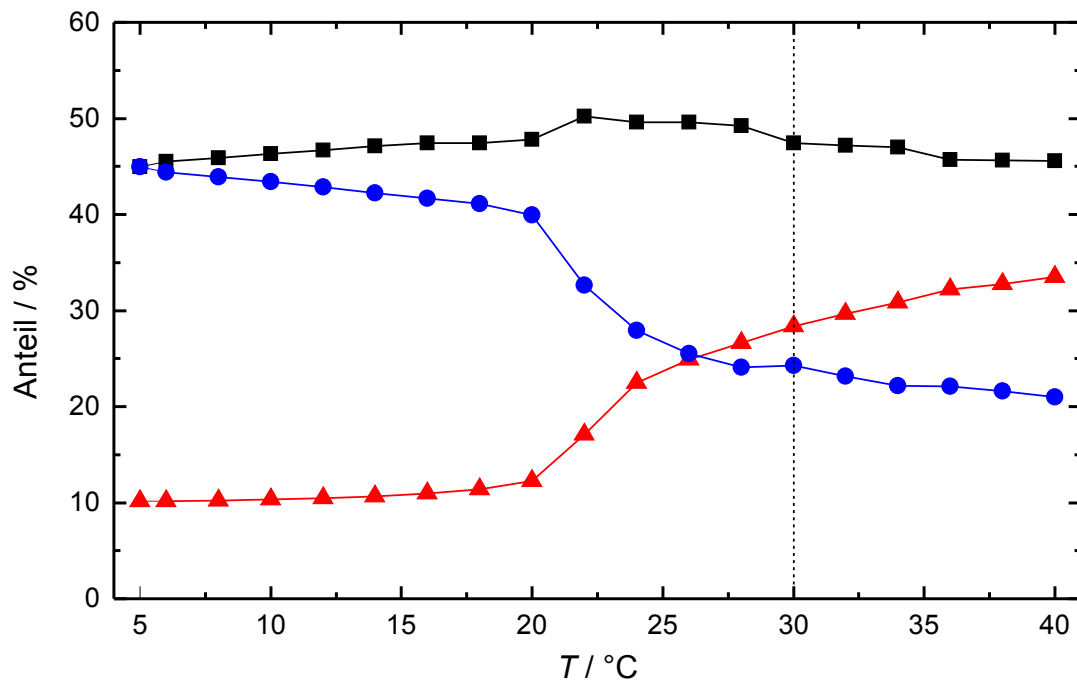


Abbildung 3.60: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 1:1 Copolymers in D_2O in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich). Die gestrichelte Linie zeigt die Temperatur der korrespondierenden Druck-FTIR-Messung an.

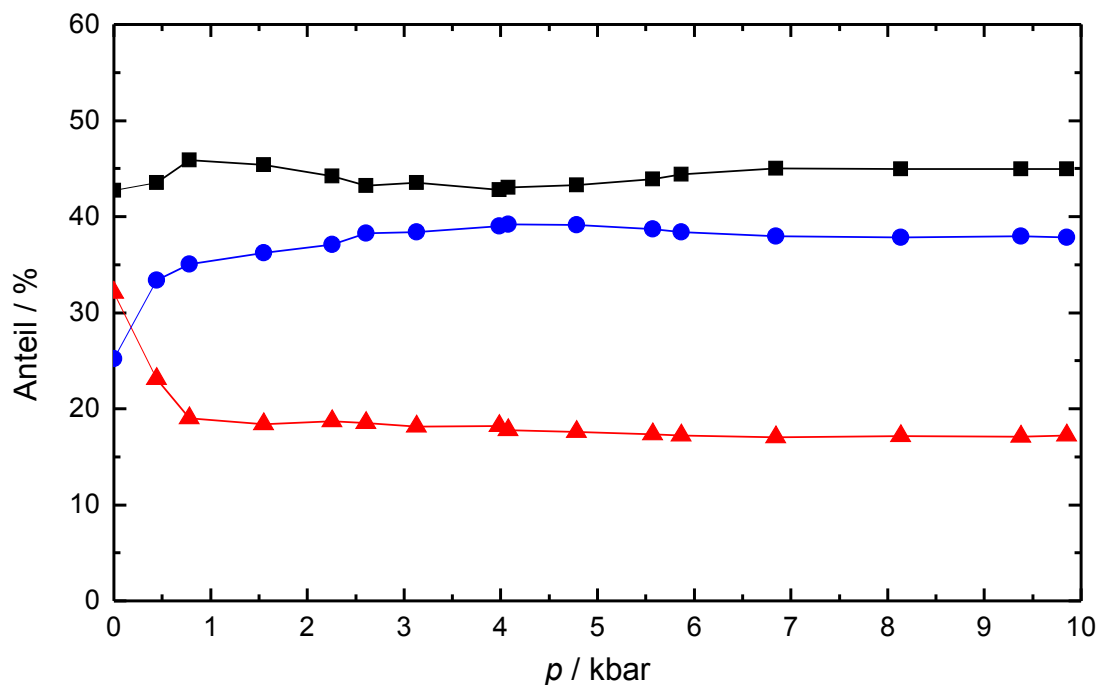


Abbildung 3.61: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 1:1 Copolymers in D_2O bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 9.9 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

Eine Aufspaltung der Amid-I'-Bande in drei Bereiche zeigt, wie schon beim Mikrogel-Copolymer, eine Zunahme der Bande bei 1600 cm^{-1} , die starke H-Brücken der Carbonylgruppe zum Wasser beschreibt. Die N-H-Wasserstoffbrücken werden hingegen gebrochen, das durch das hydrophobe Segment wiedergegeben wird. Dieser Anteil fällt von 32.1 % auf 17.2 % ab. Auch bei den linearen Ketten wird eine CLAPEYRONsche Steigung von 100 bar K^{-1} beobachtet. Bei einem Druck von circa 1 kbar weist das Copolymer einen hydrophilen Anteil von über 35 % auf, was ungefähr dem Hydratisierungszustand des Copolymers bei 20 °C und 1 bar entspricht.

Eine Zugabe von Methanol hat einen drastischen Einfluss auf die Phasenübergangstemperatur des 1:1 Copolymers. Die LCST fällt hier auf ungefähr 14 °C ab. Die Anteile der jeweiligen Subbanden zeigen, dass erneut eine Wechselwirkung des Methanols mit dem Polymer stattfindet, da die Bande bei 1650 cm^{-1} auf 16.1 % ansteigt. In der Literatur wird auch eine mögliche Clusterbildung zwischen Methanol und Wasser in Betracht gezogen, die als „schlechtes Lösungsmittel“ für PNiPAm und dessen Copolymere angesehen werden und deshalb zu einem starken Abfall der LCST führen.^[91] Dies erklärt allerdings nicht die Tatsache, dass der Cononsolvency-Effekt bei reinem PDEAm, das ähnlich zu PNiPAm aufgebaut ist, nicht beobachtet wird. Hier wird in allen Methanolmischungen keine reduzierte Phasenübergangstemperatur beobachtet. Die Ursache muss demnach in der Wechselwirkung des Amid-Protons mit der Carbonylgruppe liegen, die durch die Zugabe von Methanol zu Wasser begünstigt wird. Die hydrophobe Bande steigt hier von 16.1 % auf 25.9 % an, während die hydrophile Bande demgegenüber von 42.4 % auf 28.7 % abfällt. Die druckabhängigen FTIR-Messungen wurden bei Temperaturen von 15 °C sowie 30 °C durchgeführt; beide Temperaturen liegen oberhalb der LCST des Copolymers. Bei 15 °C wird erneut eine druckinduzierte Hydratisierung des Copolymers beobachtet, die durch starke Bindungen des Wassers zur Carbonylgruppe hervorgerufen wird. Die Bindungen zum Methanol werden unter Druck hingegen nicht bevorzugt. Die Bande sinkt auf 10.4 % ab und ist damit mit dem vollhydratisierten Zustand des 1:1 Copolymers in reinem Wasser vergleichbar (Abbildung 3.59). Bei Temperaturen, die weit oberhalb der LCST liegen, ist der Einfluss des Drucks limitiert. Erst bei einem Druck von 9.7 kbar wird ein Wert für das hydrophi-

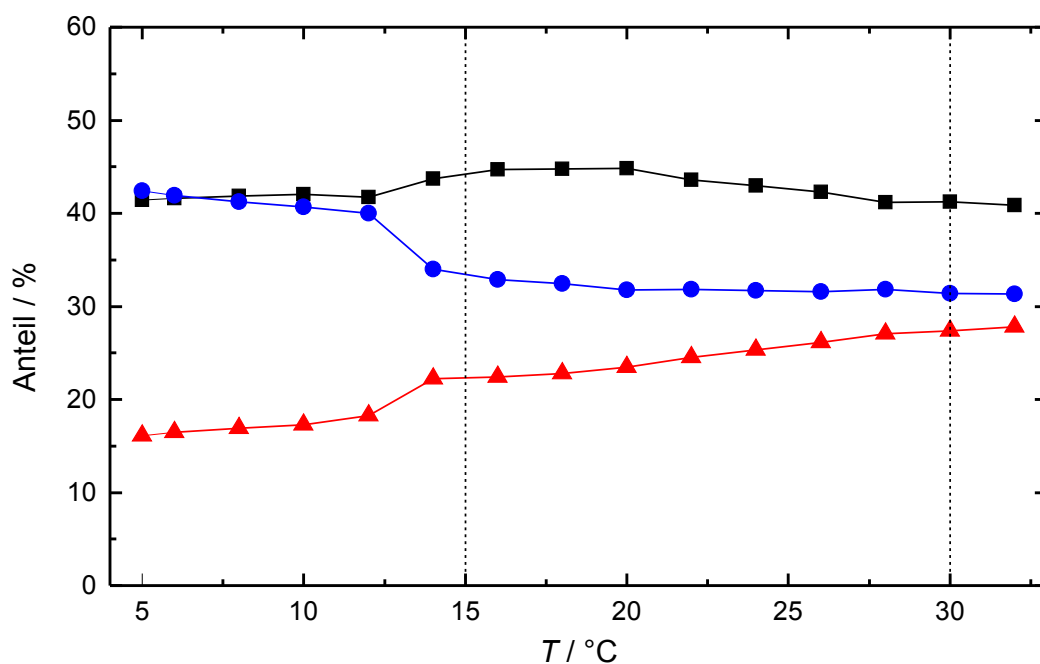


Abbildung 3.62: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 1:1 Copolymer in 10 mol% CD_3OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

le Segment von ungefähr 40 % erreicht, während bei niedrigeren Temperaturen eine spontane Antwort der stimuli-sensitiven Polymere auf Druck erfolgt. Der hydrophobe Anteil beträgt hier immerhin noch 15.3 %, was zeigt, dass selbst unter hohem Druck eine erhebliche Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen des Amidprotons zu den Carbonylgruppen erhalten bleiben. Dies zeigt wiederum den stärkeren Einfluss des Temperatureffektes, den Druck nicht vollständig kompensieren kann, wenn bei Temperaturen weit oberhalb der Phasengrenze gemessen wird.

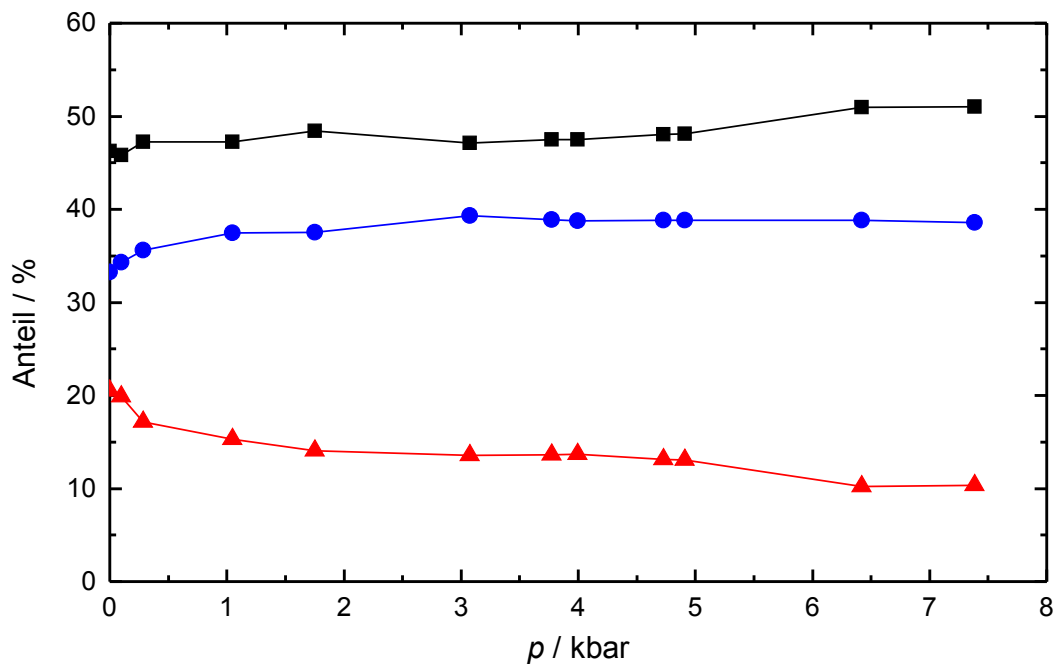


Abbildung 3.63: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 1:1 Copolymers in 10 mol% CD₃OD bei 15 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 7.4 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

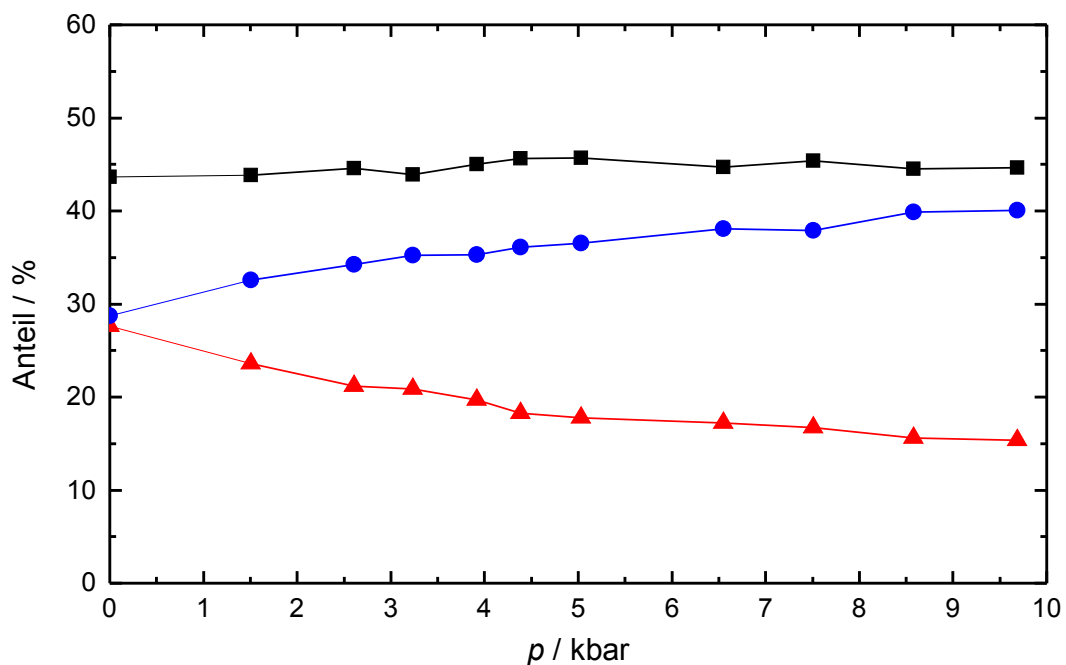


Abbildung 3.64: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 1:1 Copolymers in 10 mol% CD₃OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 9.7 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

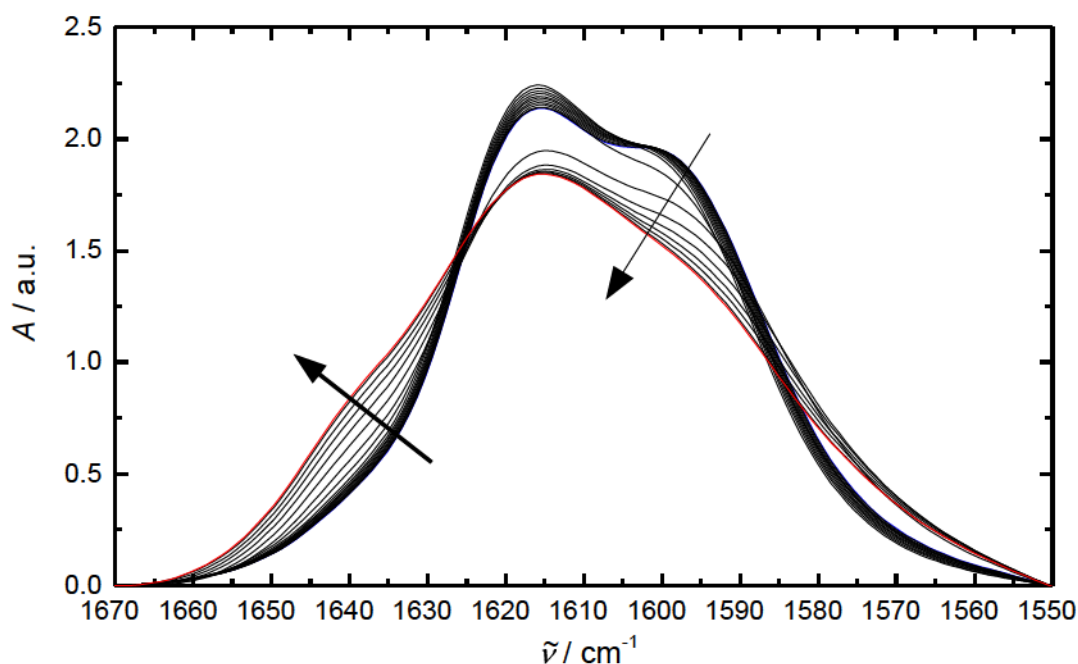


Abbildung 3.65: Normierte Spektren der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymers in D₂O in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C. Der Temperaturverlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei 5 °C bzw. 40 °C.

3:1 Copolymer

Das 3:1 Copolymer besteht nur zu einem Viertel aus dem Homopolymer PNiPAm, sodass der Einfluss und die Eigenschaften der PDEAm-Einheiten bei den temperatur- sowie druckabhängigen FTIR-Messungen überwiegen. In Abbildung 3.66 sind die relativen Anteile der Subbanden des 3:1 Copolymers in D₂O in einem Temperaturbereich zwischen 5 °C und 40 °C dargestellt. Hier wird eine temperaturabhängige Verschiebung der Spektren zu größeren Wellenzahlen beobachtet, die auf eine hydrophobere Umgebung der Carbonylschwingung hindeutet. Gleichzeitig wird die Ausbildung einer Schulter bei $\approx 1570 \text{ cm}^{-1}$ registriert, die den Einfluss des PDEAm-Anteils im Copolymer beim Übergang in den kollabierten Zustand demonstriert (vgl. Abbildung 3.25). Auch beim 3:1 Copolymer erfolgte die Quantifizierung der jeweiligen Subbanden auf Basis der Bildung der 2. Ableitung sowie der FSD der normierten Spektren. Die Amid-I'-Bande wurde in drei Segmente gegliedert, deren temperaturabhängiger Verlauf in Abbildung 3.66 dargestellt ist. Bei einer Temperatur von 5 °C ist das System vollständig hydratisiert, wie an dem hohen Anteil der starken H-Brücken des Wassers mit

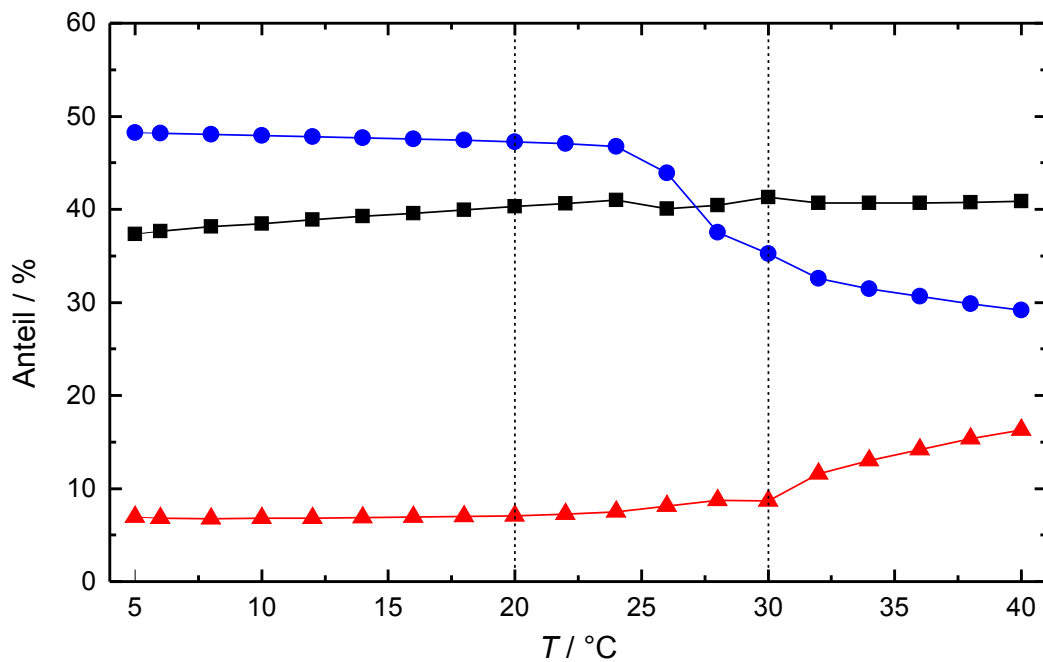


Abbildung 3.66: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymers in D_2O in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

48.2 % zu sehen ist. Der Anteil der Bande bei $\approx 1570 \text{ cm}^{-1}$ ist hier nicht dargestellt. Dieser fällt analog zu reinem PDEAm von 7.5 % auf 4.6 % bis zum Phasenübergang ab, was den Austritt von Wasser aus dem Polymer beschreibt, und steigt dann auf 13.7 % an. Dieses atypische Verhalten steht im Einklang mit der Ausbildung von mehreren starken H-Brücken zu einer Carbonylgruppe, die von wenigen Wassermolekülen im kollabierten Zustand ausgebildet werden. Der Phasenübergang liegt bei $\approx 27 \text{ °C}$, der am Abfall der hydrophilen Bande zu sehen ist. Interessanterweise findet der Anstieg des hydrophoben Segments erst bei 32 °C statt, was der Übergangstemperatur von PNiPAm entspricht, bei der es zur Ausbildung der intramolekularen H-Brücken kommt.

Der Einfluss von hohen hydrostatischen Drücken wurde bei 20 °C und 30 °C untersucht (Abbildungen 3.67 - 3.68). Unterhalb der LCST führt Druck zu einem Aufquellen der Ketten. Der Wert für das hydrophile Segment steigt auf ungefähr 55 % bei 1.7 kbar an und liegt damit höher als bei der Temperaturmessung bei Atmosphärendruck. Bei 30 °C befindet sich das System nur leicht oberhalb des Phasenübergangs.

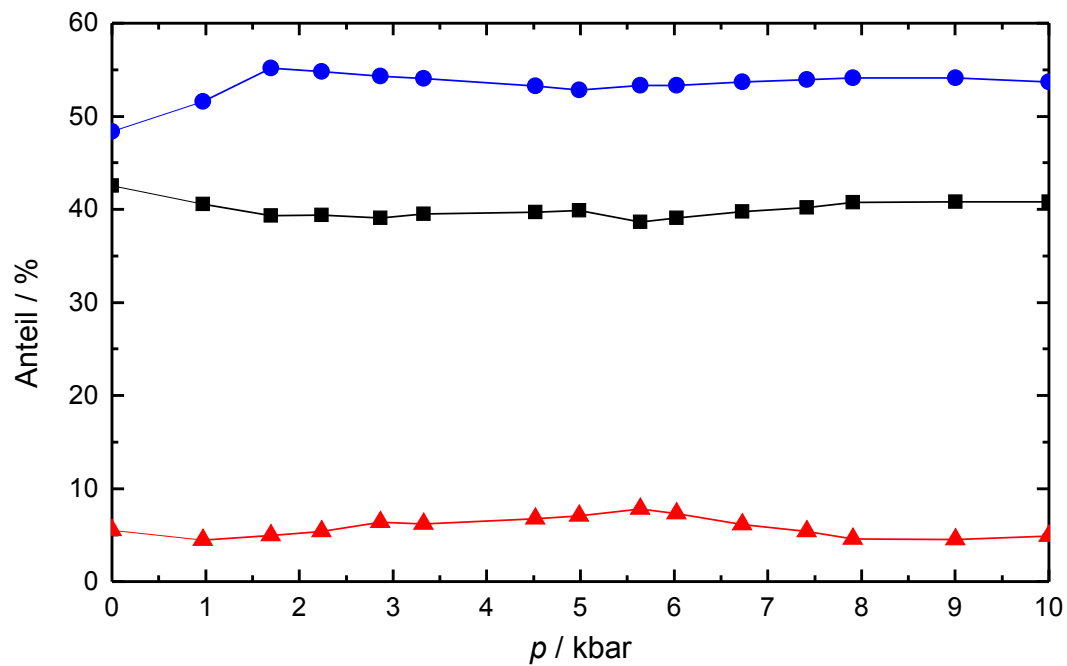


Abbildung 3.67: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymer in D_2O bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich).

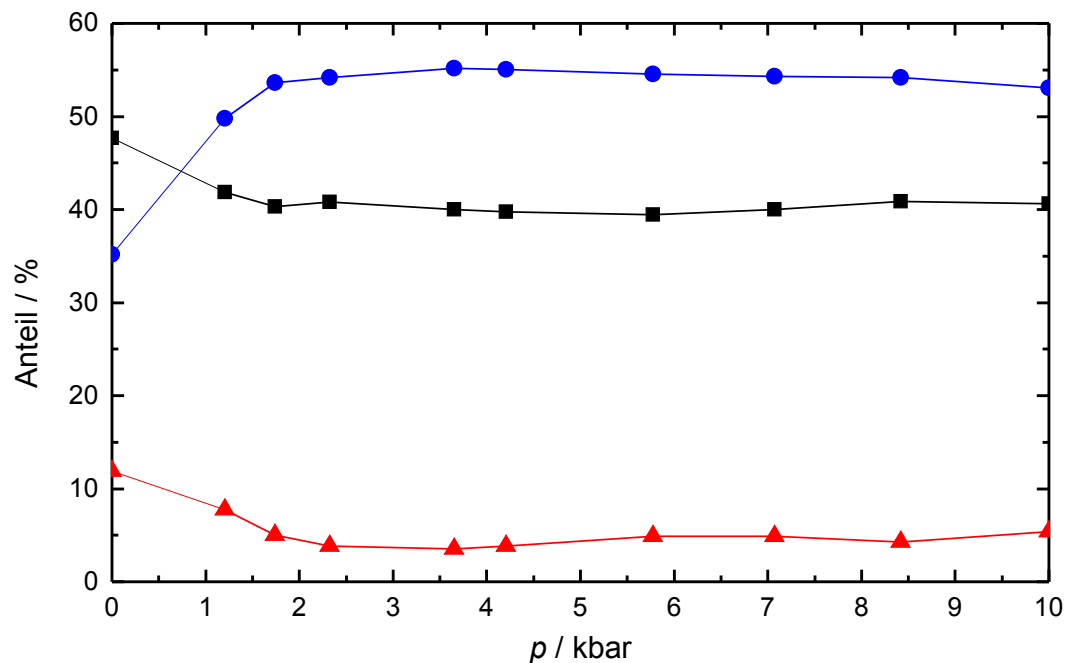


Abbildung 3.68: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymer in D_2O bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich).

Eine Druckapplikation führt hier zu einem starken Anstieg des Hydratisierungsgrades. Ebenso wurde bei circa 1.7 kbar eine maximale Hydratisierung der Ketten erreicht, die am Anteil des hydrophilen Segmentes abgelesen werden kann. Da die hydrophoben Wechselwirkungen unter Druck geschwächt werden, sinkt der Anteil der intramolekularen H-Brücken auf unter 5 % ab. Auch bei diesem Copolymer wurde der Einfluss des Lösungsmittel auf das Phasenverhalten in Abhängigkeit des Drucks sowie der Temperatur untersucht. Die jeweiligen FTIR-Spektren sind im Anhang in den Abbildungen 5.16 - 5.17 aufgeführt. Die Messungen wurden in 10 mol% bzw. 20 mol% Methanol durchgeführt. Die Phasenübergangstemperatur sinkt mit steigendem Methanolgehalt auf 25 °C bzw. 22 °C und liegt damit deutlich oberhalb der des 1:1 Copolymers bei vergleichbarer Methanolkonzentration (Abbildung 3.69 und 5.18). Die Ursache für dieses Verhalten liegt am Anteil des eingebauten PNiPAm-Polymers, der auf Grund des Cononsolvency-Effektes die Phasenübergangstemperatur bestimmt und beim 3:1 Copolymer nur 25 % ausmacht.

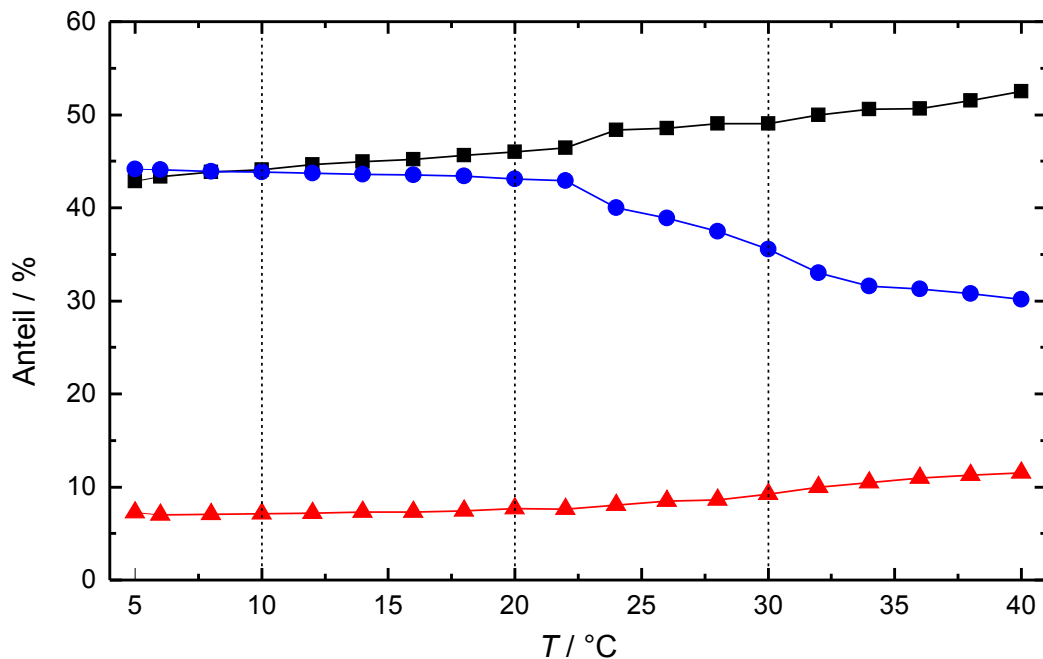


Abbildung 3.69: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymers in 10 mol% CD_3OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

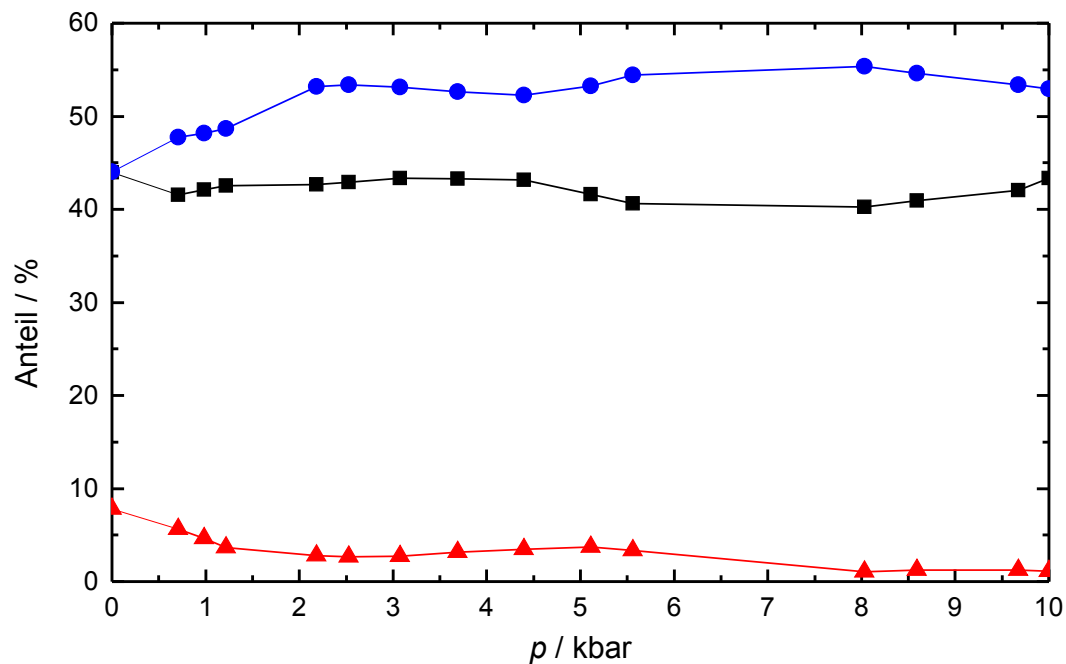


Abbildung 3.70: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymer in 10 mol% CD_3OD bei 10 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich).

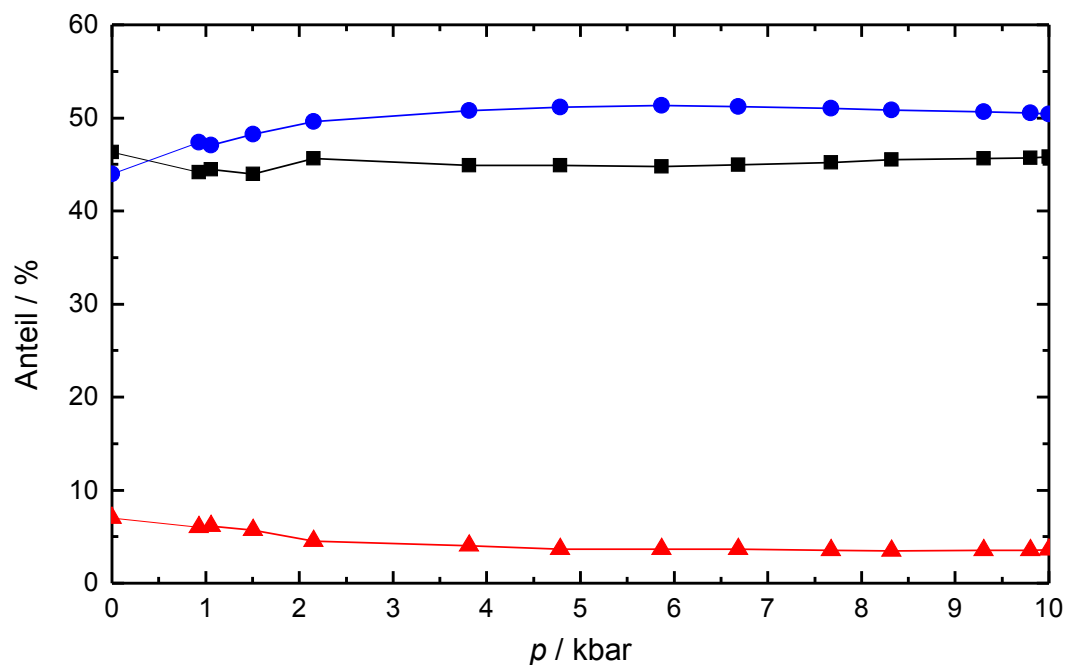


Abbildung 3.71: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymer in 10 mol% CD_3OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich).

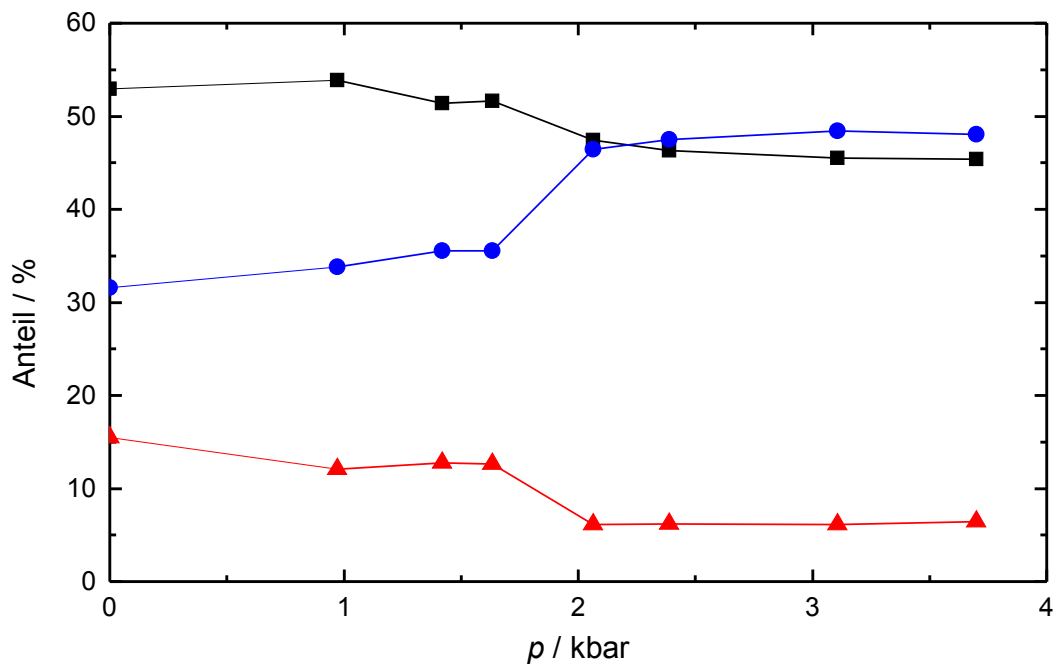


Abbildung 3.72: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymers in 10 mol% CD_3OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 3.7 kbar (\blacktriangle hydrophober Bereich, \blacksquare gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, \bullet hydrophiler Bereich).

Die Verläufe der jeweiligen Subbandenanteile in Abhängigkeit der Temperatur sind analog zu den oben gezeigten Messungen der Mikrogele sowie des 1:1 Copolymers. Sie zeigen den temperaturinduzierten Kollaps der Ketten, der durch Druckapplikation wieder aufgehoben werden kann. Die Anteile der intramolekularen Wechselwirkungen werden mit steigendem Druck geringer und sinken auf unter 5 % ab. In diesem Bereich fallen auch die H-Brücken des Methanols, die unter hohen hydrostatischen Drücken in Anwesenheit von Wasser nicht präferiert werden. Wie aus Abbildung 3.72 hervorgeht, kann auch hier Druck nicht den temperaturbedingten Kollaps vollständig kompensieren, sofern die Druckanwendung bei Temperaturen durchgeführt wurde, die nicht nahe an der LCST liegen. Zudem ist bei diesen Temperaturen ein gewisser Mindestdruck erforderlich, der eine Hydratisierung der Polymere erst einleitet.

3.1.5 Zusammenfassung

In diesem Projekt wurde der Einfluss von Temperatur und Druck auf das Phasenverhalten stimuli-sensitiver Mikrogele sowie linearer Ketten aus PNiPAm, PDEAm sowie deren Copolymere bei verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die PNiPAm-basierten Polymere nicht nur ein thermo-, sondern auch ein piezoresponsives Verhalten zeigen. Abbildung 3.73 zeigt das p, T -Phasendiagramm des PNiPAm-Mikrogels bei verschiedenen Stoffmengenanteilen an Methanol. Es ist zu sehen, dass bei hohen Temperaturen ein Kollaps des Mikrogeles induziert wird, der stark von der Konzentration des Methanol abhängig ist. Eine Applikation von hohen hydrostatischen Drücken wirkt diesem Temperatureffekt mit einer CLAPEYRONschen Steigung dp/dT von 100 bar K^{-1} entgegen. Die druckinduzierte Solvatisierung des (kollabierten) Mikrogeles ist allerdings auf Drücke bis circa 1.5 - 2 kbar beschränkt. Oberhalb dieses Bereiches ist der Hydratisierungsgrad unabhängig vom Druck, da Kompressionseffekte, der Einfluss der Temperatur und der Grad der Vernetzung des Polymers diesem entgegenwirken.

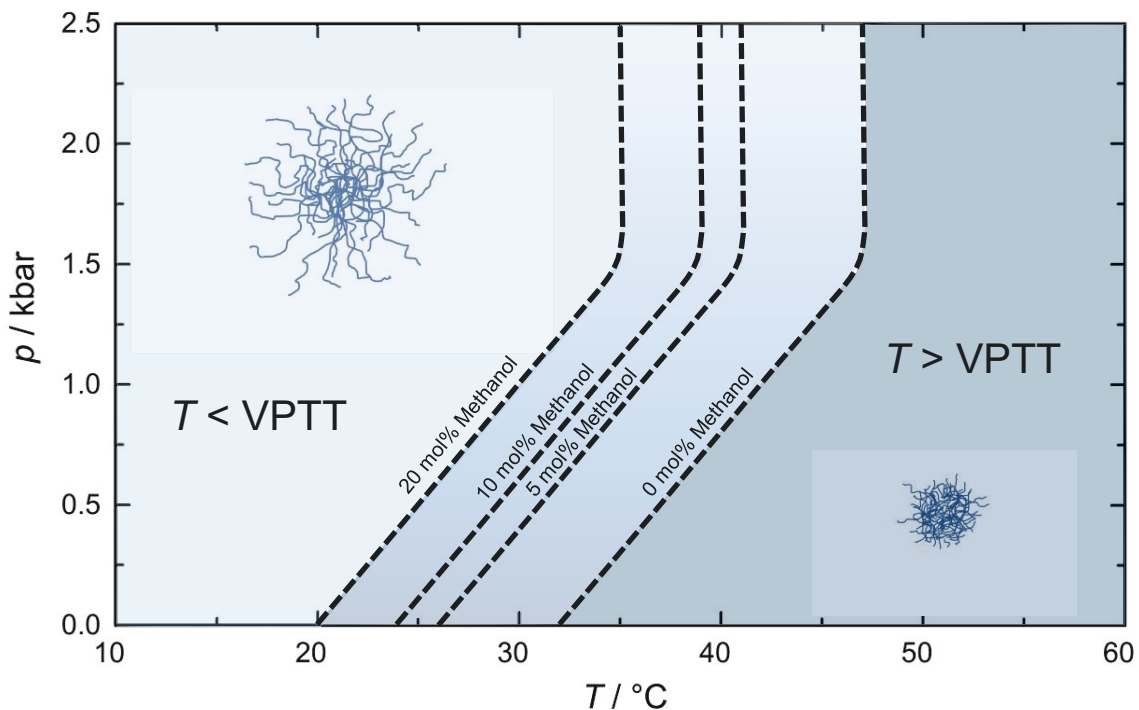


Abbildung 3.73: Schematisches p, T -Phasendiagramm des PNiPAm-Mikrogels.

Mit steigendem Methanolgehalt wird eine Verschiebung der Phasengrenzlinie mit unge-

fähr gleicher Steigung erhalten. Die Volumenphasenübergangstemperatur in Abhängigkeit des Stoffmengenanteils an Methanol ist in Abbildung 3.74 illustriert. Der Tiefpunkt der Phasengrenzlinie liegt bei einem Methanolgehalt von 20 mol%. Bis zu diesem Stoffmengenanteil konnte eine druckinduzierte Solvatisierung des PNiPAm-Mikrogels mit Wasser festgestellt werden. Bei höheren Konzentration wird Methanol in das System gedrückt, da der Anteil des Wassers signifikant abnimmt. Bei hohen Methanolgehalten wird dann bis zum Siedepunkt des Lösungsmittels nur eine Phase des Mikrogels beobachtet.

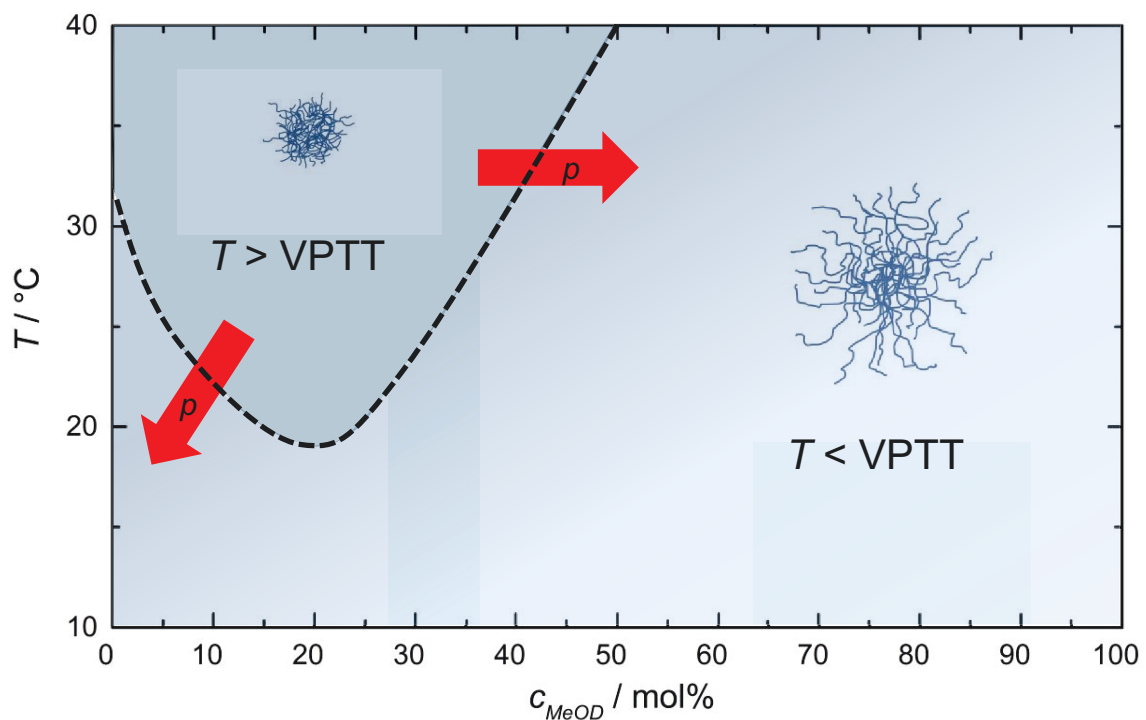


Abbildung 3.74: Schematisches T,c -Phasendiagramm des PNiPAm-Mikrogels.

Die übrigen Mikrogele sowie linearen Ketten zeigen ein ähnliches Verhalten bei Druckapplikation. Bei PDEAm ist jedoch auf Grund des Fehlens des Cononsolvency-Effektes keine Abhängigkeit der VPTT bzw. LCST von der Methanolkonzentration zu beobachten. Daher variiert der Phasenübergang bei den Copolymeren in Abhängigkeit der eingebauten PDEAm-Menge. Zudem wurde in dieser Studie aus der Kombination von Hochdruck-FTIR- sowie Hochdruck-SAXS-Messungen eine Korrelation zwischen der Struktur, dem Hydratisierungsgrad und der Größe des PNiPAm-Mikrogels hergestellt. Ein druckinduziertes Quellen des Mikrogels geht mit einer Größenzunahme sowie einer

Erhöhung der Hydratisierung einher. Um eine Umkehrung des Phasenverhaltens unter Druck zu erzielen, darf der Vorgang der Druckanwendung nicht bei Temperaturen durchgeführt werden, die sich weit oberhalb der VPTT bzw. LCST befinden, da Druck in diesem Bereich den Temperatureffekt nicht vollständig umkehren kann. Druck führt zudem bei methanolabhängigen Messungen zu einer Aufhebung des Cononsolvency-Effektes, da Methanol aus dem Polymersystem gedrückt wird und stattdessen die Ausbildung starker H-Brücken des Wassers zur Carbonylgruppe bevorzugt wird.

3.2 Hochkonzentrierte Proteinlösungen

In diesem Projekt werden die Wechselwirkungen zwischen Proteinen in hochkonzentrierten Lösungen unter hohen hydrostatischen Drücken mit Hilfe von Röntgen-Kleinwinkelstreuung am Beispiel des Modellproteins Lysozym untersucht. Die Ergebnisse tragen dazu bei, das *Crowding*-Verhalten von Proteinen hinsichtlich ihrer Struktur und Stabilität in dichtgepackten Systemen bei hohen Drücken besser zu verstehen, wie sie beispielsweise in Zellen von Tiefseeorganismen vorkommen.[§]

3.2.1 Einleitung

In den letzten Jahren stieg das Interesse an der Erforschung von Proteinen in hochkonzentrierten Lösungen stark an. Das Verhalten stellt nicht nur eine Herausforderung in der Flüssigkeitstheorie der weichen kondensierten Materie dar, sondern ist auch Voraussetzung für eine Reihe von biologischen und biotechnologischen Anwendungen. Aus biologischer Sicht sind diese Untersuchungen notwendig, da sie das Ziel verfolgen, die Situation in lebenden Zellen möglichst exakt nachzustellen. Daher wurden eine Reihe von Experimenten unter sogenannten *Crowding*- oder *Confinement*-Bedingungen durchgeführt, welche die intrazelluläre Umgebung widerspiegeln sollen.^[136] Allgemein versteht man unter dem Begriff *Crowding* (engl.: crowding - zusammendrängend) den Volumenausschluss von Biomolekülen in Anwesenheit einer großen Anzahl von anderen Makromolekülen (*Crowder*-Moleküle).^[137,138] Ist nur eine Spezies, wie zum Beispiel ein Protein, in einer sehr hohen Konzentration in einem begrenzten Volumen vorhanden, spricht man von *Self-Crowding*. *Confinement* (engl.: confined - begrenzt) bezieht sich auf eine eingeschränkte konformationelle Ausdehnung der Biomoleküle in einem dichtgepackten System. *Crowding* und *Confinement* ändern daher die konformationelle Stabilität sowie die biologische Aktivität von Proteinen.^[139–143] Die Kenntnis von Protein-Protein-Wechselwirkungen in kondensierten flüssigen Phasen ist entscheidend für das Verständnis der strukturellen sowie funktionellen Stabilität von Proteinen und gibt einen molekularen Einblick in Prozesse wie Proteinkristallisation, -aggregation sowie -fibrillation.^[134,144–149] Letztere spielt bei Krankheiten eine entscheidende Rolle, wie

[§]Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wird in der Referenz^[135] publiziert (Stand 24. April 2014).

beispielsweise der Bildung von Polymerfasern der Hämoglobinmoleküle bei der Sichelzellenanämie, der Aggregation von γ -Kristallin beim grauen Star oder der Entstehung von Amyloid-Fibrillen, wie sie bei Alzheimer, Parkinson, Creutzfeld-Jakob oder Typ-2-Diabetes mellitus auftreten.^[150,151] Um diese Krankheiten zu bekämpfen, müssen daher Strategien entwickelt werden, die die Keimbildung von Proteinaggregaten verhindern.

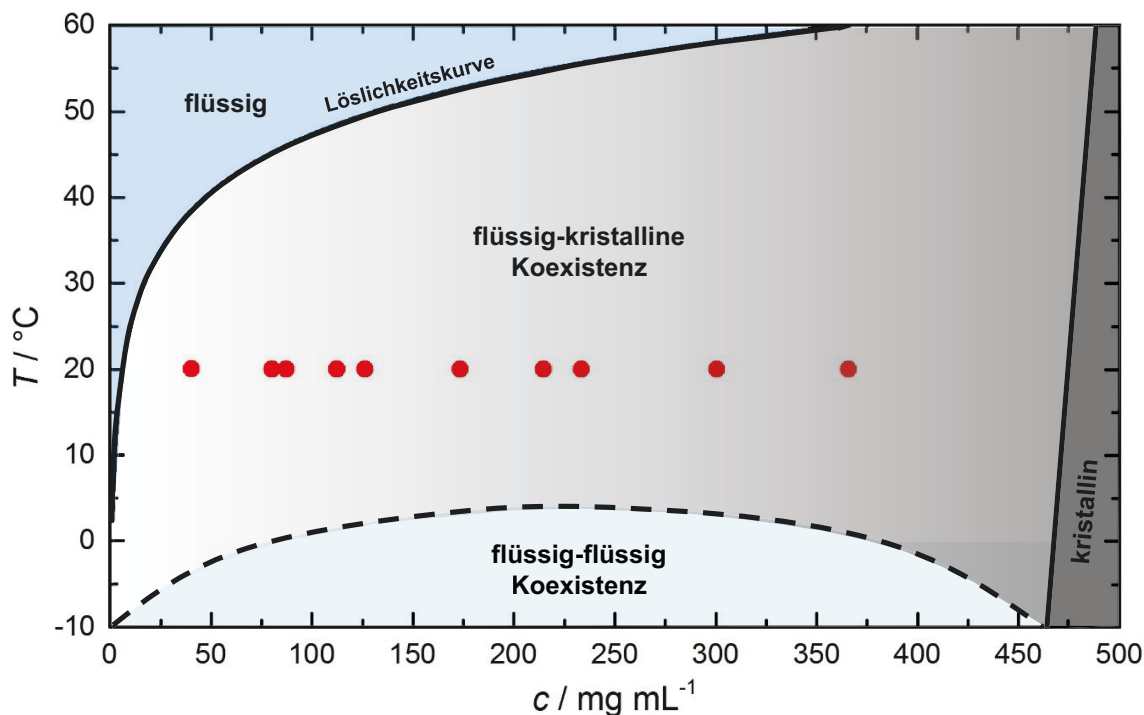


Abbildung 3.75: Temperatur-Konzentrations-Phasendiagramm von Lysozym.^[152,153] Die roten Punkte kennzeichnen die experimentellen Messpunkte in dieser Studie.

Die strukturellen Eigenschaften von hochkonzentrierten Proteinlösungen sowie das Phasendiagramm eines Proteins sind von zahlreichen Parametern wie Temperatur, Druck, pH-Wert, Ionenstärke oder Osmolytenkonzentration abhängig. Das intermolekulare Wechselwirkungspotenzial als Funktion dieser Parameter ist bisher kaum erforscht.^[153–165] Insbesondere die Abhängigkeit der Druckvariablen ist bislang wenig verstanden und steht daher im Fokus dieser Untersuchung. Abbildung 3.75 zeigt das Temperatur-Konzentrations-Phasendiagramm von Lysozym sowie die experimentellen Messpunkte innerhalb der metastabilen flüssig-kristallinen Koexistenzphase in dieser Studie. Unter den gewählten Bedingungen ermöglicht die langsame Kristallisationskinetik des Proteins eine Untersuchung der Protein-Protein-Wechselwirkungen in einer

hoch kondensierten flüssigen Phase. Eine Übersättigung der Lösung ist notwendig, um die hohe Aktivierungsenergie der Kristallbildung des Lysozyms zu überwinden. Abhängig von der Anfangskonzentration kann die Dauer für das Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts in Abwesenheit von Kristallkeimen bis zu einem Monat betragen.^[145,166] Die Entstehung von BRAGG-Reflexen deutet dabei den Beginn der Kristallisation an. Um die Struktur und das Wechselwirkungspotenzial der hochkonzentrierten Proteinlösungen zu bestimmen, wurden SAXS-Experimente bis zu einem Druck von 3 kbar durchgeführt. Die Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis des Druckeffektes auf das Phasenverhalten von kondensierten Proteinlösungen sowie von *Self-Crowding*-Bedingungen bei, wie sie in dichtgepackten, biologischen Zellen zu finden sind. Zudem wird das Hydratisierungsverhalten von Biomolekülen unter extremen Bedingungen aufgezeigt, wie es beispielsweise in der Tiefsee vorherrscht, wo Drücke im kbar-Bereich erreicht werden können.^[131]

Lysozym

Als Modellprotein für die Untersuchung von hochkonzentrierten Proteinlösungen wurde Hühnereiweiß-Lysozym verwendet (Abbildung 3.76). Es besitzt eine molare Masse von 14.3 kDa und ist aus 129 Aminosäuren aufgebaut. Darunter fallen 9 saure (7 Asp, 2 Glu) und 18 basische Aminosäuren (11 Arg, 1 His, 6 Lys) sowie 6 Tryptophan-Einheiten (Trp). Zur Sekundärstruktur zählen vier α -Helices, zwei 3_{10} -Helices sowie zwei antiparallele β -Faltblätter. Lysozym hat die Form eines Ellipsoids mit einer Größe von $3 \times 3 \times 4.5 \text{ nm}^3$. Der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von 11.1 vor. Bei pH 7 weist Lysozym eine Nettoladung von + 8 auf, wobei die geladenen Gruppen statistisch auf der Proteinoberfläche verteilt sind. Die hohe Stabilität mit einer Entfaltungstemperatur von circa 70 °C und einem Entfaltungsdruck von circa 7 kbar verdankt Lysozym hauptsächlich seinen vier intramolekularen Disulfid-Brücken. Die freie Standard-Entfaltungs-GIBBSenergie liegt bei circa 60 kJ mol⁻¹. Die Funktion des Lysozyms liegt in der enzymatischen Hydrolyse der 1,4-glykosidischen Bindung zwischen *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure. Dadurch ist es in der Lage, Zellwände von Bakterien zu zerstören und fungiert somit in vielen Organismen als natürliches Antibiotikum.

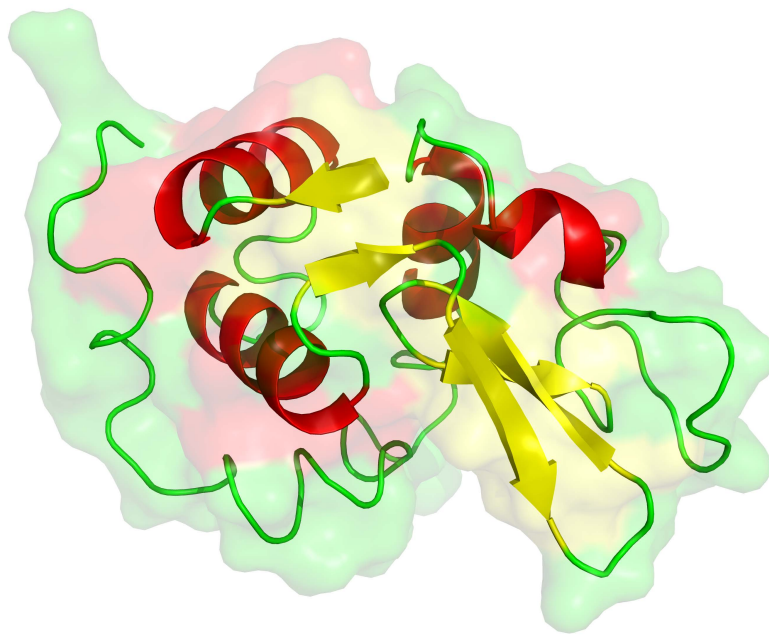


Abbildung 3.76: Hühnereiweiß-Lysozym mit korrespondierender Elektronendichteverteilung gemäß der Struktur aus der Proteindatenbank (PDB, protein data bank, 2LYZ)

Da die Eigenschaften von Lysozym sehr weitreichend untersucht wurden und es relativ leicht isoliert werden kann, stellt es für die Untersuchungen in diesem Projekt ein ideales Modellprotein dar.^[167–169]

DLVO-Potenzial

Bei der Messung von hochkonzentrierten Proteinlösungen mit Hilfe von Röntgen-Kleinwinkelstreuung tritt in der Streukurve ein Korrelationspeak auf, der den Strukturfaktor und damit die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen der gemessenen Probe beinhaltet. Die Beziehung zwischen dem Strukturfaktor $S(q)$ und dem Wechselwirkungspotenzial $V(r)$ basiert auf der Lösung der ORNSTEIN-ZERNIKE-Gleichung, in welcher die direkte Korrelationsfunktion $c(q)$ mit dem Strukturfaktor im reziproken Raum durch folgende Beziehung gegeben ist:^[170]

$$S(q) = \frac{1}{1 - nc(q)} \quad (3.2)$$

n gibt die Teilchenzahldichte wieder. Abhängig von der Art und Stärke der Wech-

selwirkung sowie der Teilchenzahldichte des Systems wurden verschiedene Annahmen getroffen (engl.: closure relations), die diese Korrelation lösen sollen.^[171,172] Bei der *random phase approximation* (RPA) besteht zwischen dem Strukturfaktor S_{RPA} und der FOURIER-transformierten des Wechselwirkungspotenzials $V(q)$ folgender Zusammenhang:^[151,156,173]

$$S(q) = S_0(q) \left[1 + \frac{n}{k_{\text{B}}T} S_0(q) V(q) \right]^{-1} \quad (3.3)$$

n gibt die Teilchenzahldichte wieder und $S_0(q)$ den Strukturfaktor des Referenzsystems, der gemäß dem Harte-Kugel-Modell (engl.: empty core model) wie folgt ausgedrückt werden kann:^[174]

$$\frac{1}{S_0(q)} = 1 - 12\eta \frac{(\eta(3 - \eta^2) - 2)}{(1 - \eta)^4} \cdot \frac{j_1(q\sigma)}{q\sigma} \quad (3.4)$$

η ist der Volumenanteil und σ der Durchmesser der Teilchen. $j_1(q\sigma)$ ist die sphärische BESSELFunktion erster Ordnung.

Die RPA wird für mittelstark geladene Teilchen verwendet, die sich nur schwach gegenseitig beeinflussen. Bei stärkeren Wechselwirkungen mit einer moderaten Teilchenzahldichte kann die *mean spherical approximation* (MSA) verwendet werden, die für viele Wechselwirkungspotenziale eine analytische Lösung besitzt:^[50,172]

$$c_{\text{MSA}}(r) = -\frac{1}{k_{\text{B}}T} V(r) \quad (3.5)$$

Allgemein kann die Wechselwirkung zwischen Proteinen in Abwesenheit von Salzen oder bei sehr geringen Ionenstärken unter der Annahme, dass die Proteine eine harte, sphärische Form annehmen, erfolgreich mit Hilfe des DLVO-Potenzials (DERJAGUIN-LANDAU-VERWEY-OVERBEEK) beschrieben werden.^[150,151,155–157,159,160,164,175–180] Dieses Modell beschreibt das Paarpotenzial $V(r)$ als Summe eines Harte-Kugel-Potenzials $V_{\text{HK}}(r)$, eines repulsiven COULOMB-Potenzials $V_{\text{C}}(r)$ sowie eines attraktiven YUKAWA-Potenzials $V_{\text{Y}}(r)$:

$$V(r) = V_{\text{HK}}(r) + V_{\text{C}}(r) + V_{\text{Y}}(r) \quad (3.6)$$

Der Term des Harte-Kugel-Potenzials $V_{\text{HK}}(r)$ berücksichtigt, dass sich die Proteine nicht durchdringen können:

$$V_{\text{HK}}(r) = \begin{cases} \infty & r \leq \sigma \\ 0 & r > \sigma \end{cases} \quad (3.7)$$

σ bezeichnet hier den Durchmesser des Proteins.

Der repulsive COULOMB-Term wird wie folgt beschrieben:

$$V_{\text{C}}(r) = \begin{cases} 0 & r \leq \sigma \\ \frac{Z^2 e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r(1+0.5\kappa\sigma)^2} \cdot \frac{e^{-\kappa(r-\sigma)}}{r} & r > \sigma \end{cases} \quad (3.8)$$

Z beschreibt die effektive Ladung des Proteins, e die Elementarladung, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums, ϵ_r die Dielektrizitätskonstante der Lösung und κ die reziproke DEBYE-HÜCKEL-Länge.

Das YUKAWA-Potenzial beschreibt den attraktiven Teil des Gesamtpotenzials, wobei J die Stärke des anziehenden Teils und d die Breite des Potenzials wiedergibt:

$$V_{\text{Y}}(r) = \begin{cases} 0 & r \leq \sigma \\ -J\sigma \frac{e^{-(r-\sigma)/d}}{r} & r > \sigma \end{cases} \quad (3.9)$$

3.2.2 Materialien und Methoden

Als Protein wurde Hühnereiweiß-Lysozym (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) eingesetzt. Die Aufkonzentrierung des Proteins erfolgte mittels Dialyse in einer Dialysekassette („Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes“, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), die ein Gesamtvolumen von 0.5 ml und eine molekulare Porengröße von 2 kDa aufwies, sodass nur die Diffusion von Wasser möglich war. Die Dialysekassetten wurden nach der Hydratisierung in Wasser mit einer Stammlösung von Lysozym mit der Konzentration $c = 80 \text{ mg mL}^{-1}$ in 50 mM Bis-Tris-Puffer (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) bei pH 7 befüllt und in einem Becherglas mit PEG-Lösung (Polyethylenglycol, $M = 35 \text{ kDa}$, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) definierte Zeiten gerührt (Abbildung 3.77). Die relativ hohe Konzentration des Puffers ist notwendig, da sich sonst bei sehr hohen Proteinkonzentrationen der pH-Wert der Lösung rapide verringern würde. Zudem hat Bis-Tris die Eigenschaft, den pH-Wert unter Druck stabil zu halten.^[181,182] Die PEG-Lösung mit einer Konzentration von 20 % w/w wurde ebenfalls in 50 mM Bis-Tris-Puffer gelöst und auf einen pH-Wert von 7 eingestellt, sodass der osmotische Druck nur durch die Konzentration der PEG-Lösung hervorgerufen wurde.

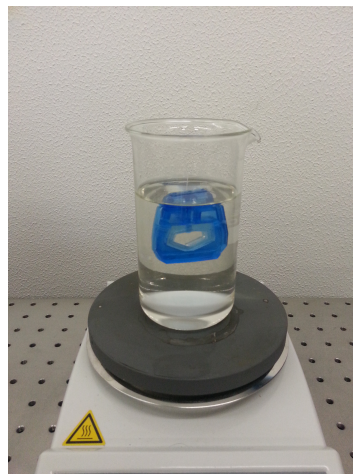


Abbildung 3.77: Dialyseprozess in einer Dialysekassette zur Aufkonzentrierung der Lysozymlösungen.

Durch die unterschiedliche Dauer des Osmoseprozesses konnten gezielt, auf eine schonende und gleichmäßige Weise, hohe Konzentrationen der Lysozymlösungen hergestellt werden.^[183] Die erzielte Konzentration in Abhängigkeit der Dialysezeit ist in Abbildung 3.78 dargestellt. Die Konzentration der jeweiligen Lysozymlösungen wurde

mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von Lysozym $\epsilon_{\text{Lysozym}}$ bei einer Wellenlänge λ von 280 nm beträgt $2.65 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.^[184]

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente wurden am Diamond an der Beamline I22 durchgeführt. Als Hochdruckzelle wurde die Zelle von *Brooks* verwendet (siehe Kapitel 2.2.2). Alle Messungen wurden in einem Druckbereich zwischen 1 bar und 3 kbar bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die Messzeit betrug 15 s. Nach jeder Druckapplikation wurde 15 min gewartet, um den Gleichgewichtszustand des Systems zu gewährleisten. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software „Fit2D“. ^[65]

Die Funktionsanpassung der Daten zur Berechnung des Wechselwirkungspotenzials wurde mit einer auf MATLAB-basierenden Routine durchgeführt, die auf der DLVO-Theorie mittels *mean spherical approximation* (MSA) basierte. ^[179] Der effektive (Harte-Kugel-) Durchmesser σ wurde auf 2.99 nm gesetzt und die Proteinladung Z bei pH 7 betrug 8. ^[185] Es wurde eine Breite des attraktiven Wechselwirkungspotenzials $V_Y(r)$ mit $d = 3 \text{ nm}$ verwendet. ^[163] Zudem wurde die Druck- sowie Temperaturabhängigkeit der Dielektrizitätskonstante der Lösung berücksichtigt. ^[186]

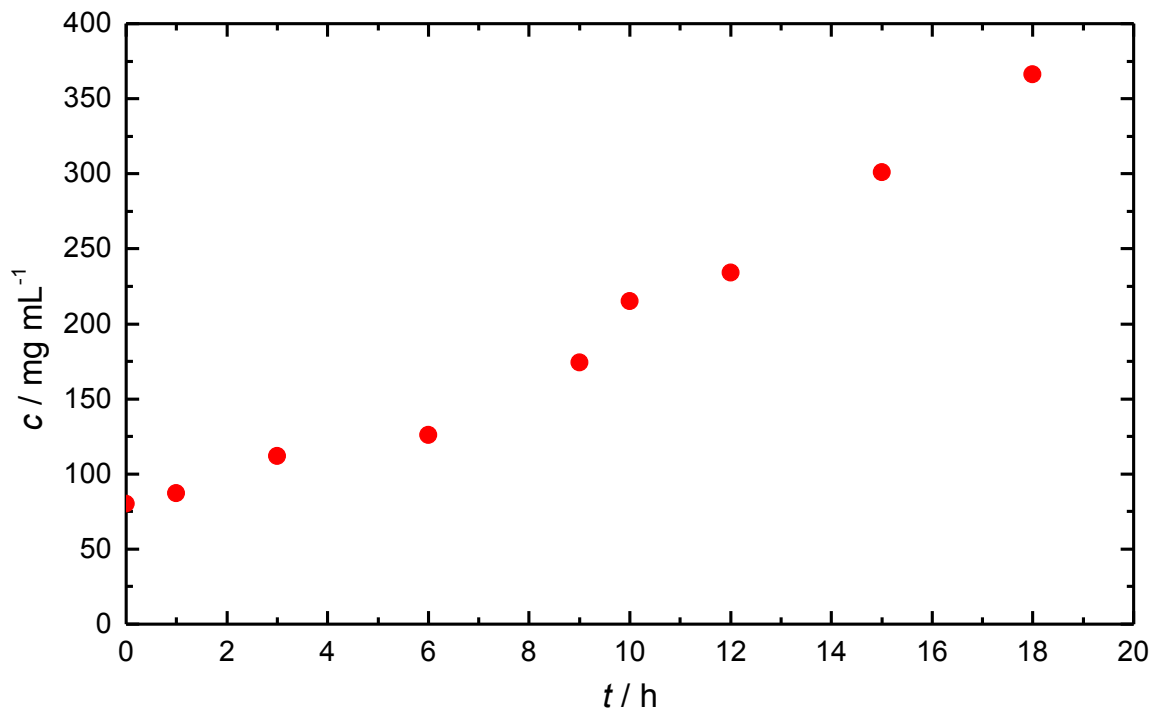


Abbildung 3.78: Konzentration c der Lysozymbilösung in Abhängigkeit der Dialysezeit t bei 20 °C. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie.

3.2.3 Ergebnisse

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente von Lysozym unter hohen hydrostatischen Drücken wurden bei einer Temperatur von 20 °C über einen weiten Konzentrationsbereich bis zu einer Konzentration von circa 370 mg mL⁻¹, die damit ungefähr doppelt so hoch ist, wie bei bisherigen Hochdruck-SAXS-Messungen unter diesen Bedingungen, durchgeführt.^[165]

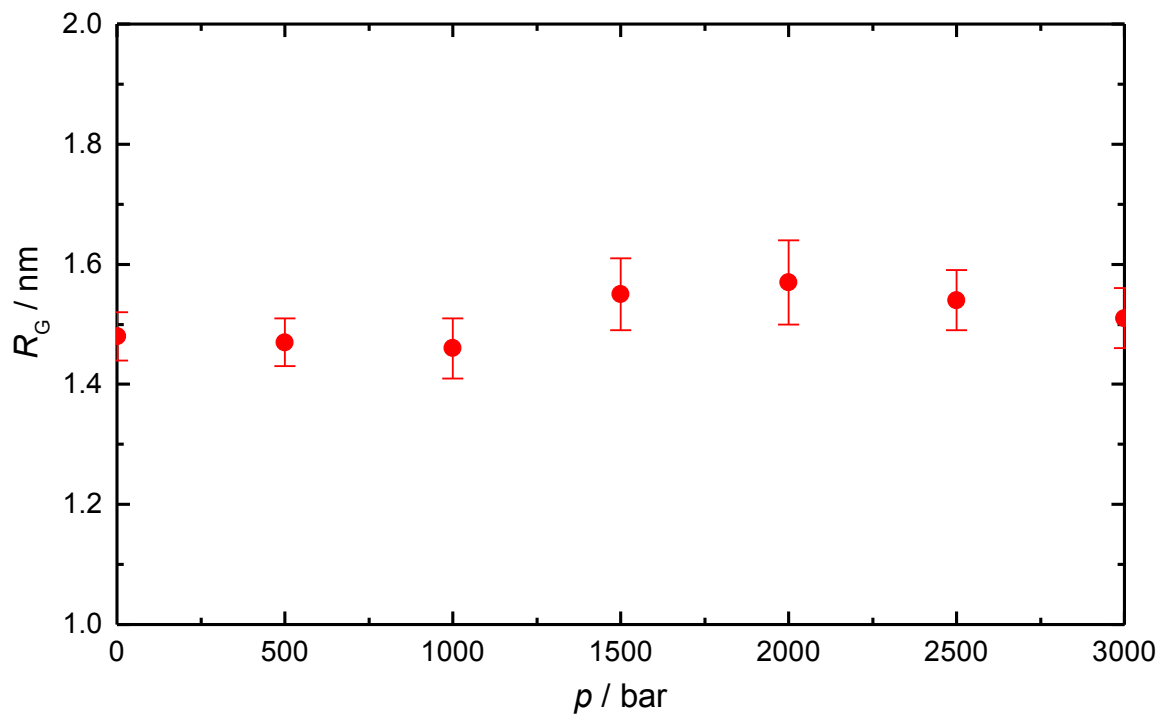


Abbildung 3.79: Gyrationsradien R_G von Lysozym bei einer Konzentration von 8.57 mg mL⁻¹ in einem Druckbereich zwischen 1 bar und 3000 bar bei 20 °C.

Zur Charakterisierung der Größe und Struktur von Lysozym wurden zunächst Messungen mit verdünnten Lösungen (8.57 mg mL⁻¹) unter hohen hydrostatischen Drücken durchgeführt, bei denen keine intermolekularen Wechselwirkungen auftreten. Dies diente zur Kontrolle, dass sich das Protein in seiner nativen Konformation befindet und keine Entfaltung bis zu einem Druck von 3 kbar eintritt. Die Größe und Form des Proteins wurden mit Hilfe der Paarabstandverteilungsfunktion $p(r)$ sowie der GUINIER-Auftragung bestimmt (Abbildung 3.79).^[51,160] Da Lysozym die Form eines Ellipsoids annimmt, wird der intrapartikuläre Strukturfaktor $P(q)$ des Proteins wie folgt beschrieben:^[51,187]

$$P(q) = \int_0^1 \frac{j_1 \left(q \sqrt{a^2 + x^2 (b^2 - a^2)} \right)^2}{\left(q \sqrt{a^2 + x^2 (b^2 - a^2)} \right)^4} dx \quad (3.10)$$

a und b beschreiben die Halbachsen des Ellipsoids; $j_1(x)$ ist die sphärische BESSELFUNKTION erster Ordnung.

Für den Gyrationradius R_G ergibt sich somit:

$$R_G = \sqrt{\frac{2a^2 + b^2}{5}} \quad (3.11)$$

Wie aus Abbildung 3.79 hervorgeht, beträgt der Gyrationradius R_G bei einem Druck von 1 bar 1.48 nm und steht damit in guter Übereinstimmung mit Werten aus der Literatur.^[158,188] Bis zu einem Druck von 3 kbar werden keine signifikanten Änderungen des Gyrationradius beobachtet, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das Lysozymmonomer nicht entfaltet ist, was ebenso konform mit früheren Hochdruck-FTIR-Messungen ist.^[160,189] Die im Folgenden untersuchten Protein-Protein-Wechselwirkungen bei hohen Konzentrationen treten daher nur zwischen nativen, nicht entfaltenen Lysozym-Molekülen auf.

Abbildung 3.80 (links) zeigt die Streukurven bei verschiedenen Konzentrationen bei einem Druck von 1 bar und einer Temperatur von 20 °C. Deutlich zu erkennen ist der Korrelationspeak bei q_{korr} , der auf den repulsiven Protein-Protein-Wechselwirkungen der positiv geladenen Lysozymmoleküle ($Z = 8$) basiert und im Bereich zwischen 0.48 nm^{-1} und 0.8 nm^{-1} liegt. Mit steigender Proteinkonzentration verschiebt sich der Korrelationspeak linear zu höheren q -Werten, was mit kleineren Abständen zwischen den Teilchen in Zusammenhang gebracht werden kann (Abbildung 3.80, rechts). Wird eine $c^{1/3}$ -abhängige Verschiebung von q_{korr} angenommen, die eine Näherung für stark repulsive Systeme darstellt, so kann der interpartikuläre Abstand der Proteinkomplexe zu $2\pi/q_{\text{korr}}$ grob abgeschätzt werden.^[147,153] Unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs entspricht eine Verschiebung von q_{korr} von 0.48 nm^{-1} zu 0.8 nm^{-1} einer Verringerung der Distanz von 13.1 nm auf 7.85 nm. Bei Proteinkonzentrationen über $\approx 150 \text{ mg mL}^{-1}$ ist keine signifikante Erhöhung von q_{korr} zu erkennen; q_{korr} sinkt stattdessen sogar leicht. Dieses Verhalten deutet auf eine Veränderung in den intermole-

kularen Wechselbeziehungen hin, wie beispielsweise dem Einsetzen der Bildung von (dynamischen) Lysozymclustern. Bei der höchsten Konzentration (366 mg mL^{-1}) wird eine partielle Kristallisation des Proteins sichtbar, deren BRAGG-Reflexe den Korrelationspeak überlagern, was typisch für die Bildung des flüssig-kristallinen Phasenkoexistenzgebietes in einer stark übersättigten Lösung ist.

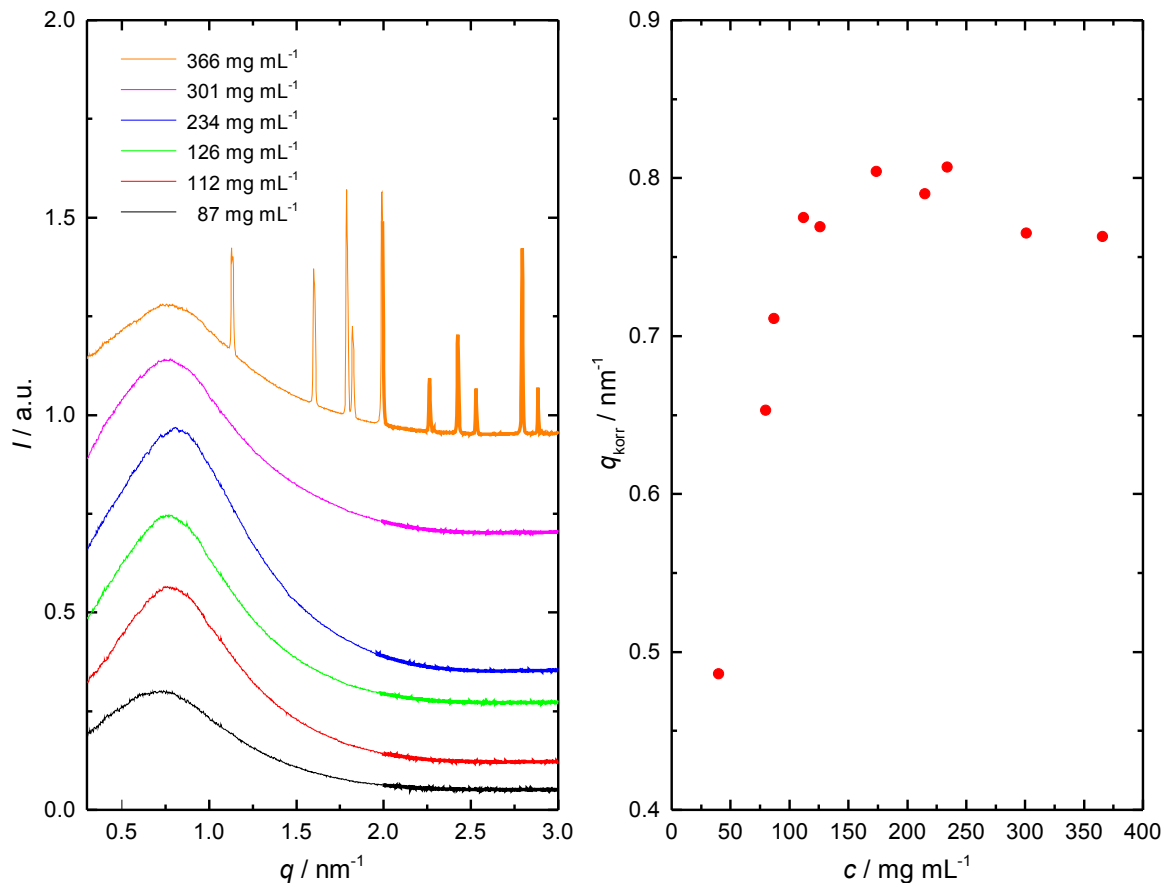


Abbildung 3.80: Röntgen-Kleinwinkelstreuungen von Lysozymlösungen unterschiedlicher Konzentration bei 20 °C und einem Druck von 1 bar (links); Korrelationspeaks q_{korr} in Abhängigkeit der Lysozymkonzentration bei 20 °C und einem Druck von 1 bar (rechts).

Typische druckabhängige SAXS-Kurven für eine Lysozymlösung der Konzentration 112 mg mL^{-1} bei 20 °C sind in Abbildung 3.81 (links) illustriert. Mit steigendem Druck wird, nach anfänglicher Zunahme, eine druckinduzierte Verschiebung des Korrelationspeaks zu kleineren Werten beobachtet. Die druckabhängige Verschiebung von q_{korr} bei verschiedenen Konzentrationen ist in Abbildung 3.81 (rechts) dargestellt. Bis zu

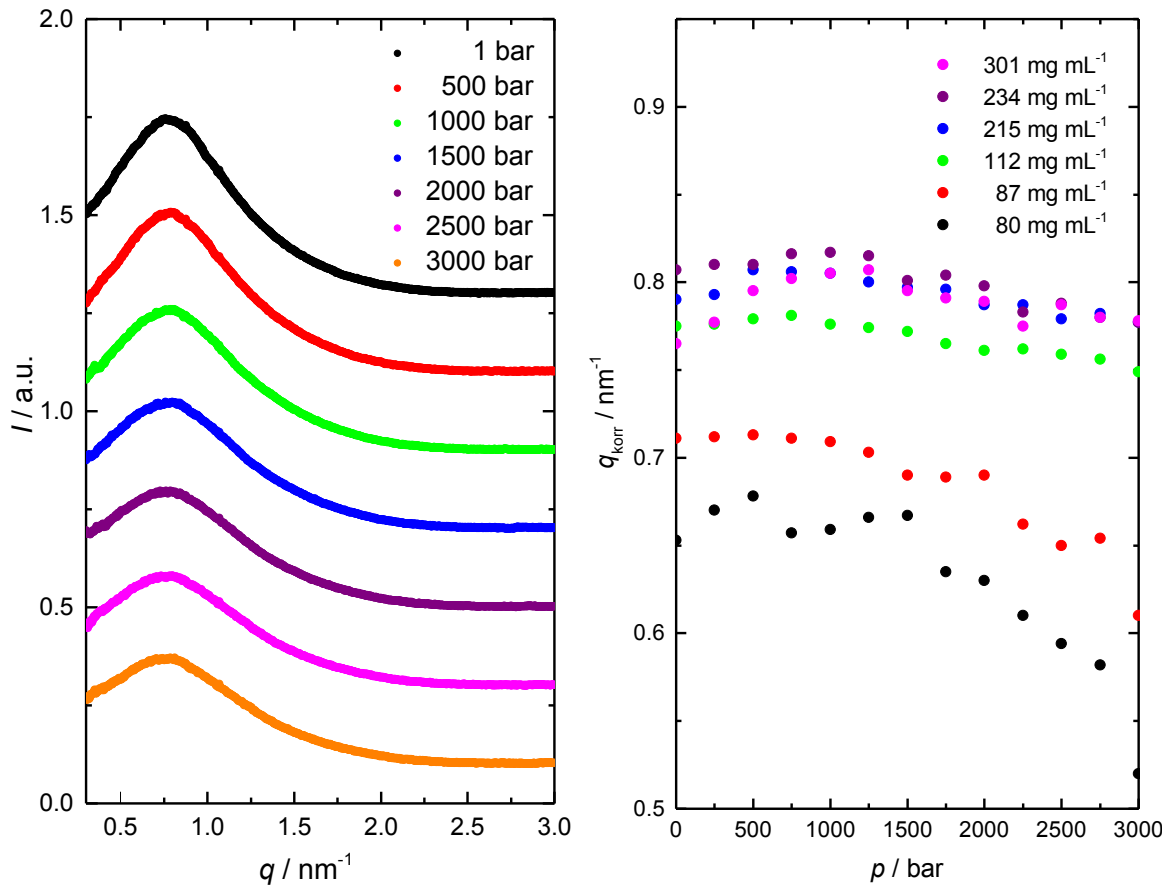


Abbildung 3.81: Röntgen-Kleinwinkelstreuungen einer Lysozymbilösung der Konzentration 112 mg mL^{-1} bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und unterschiedlichen Drücken. Zur besseren Übersicht sind die Streukurven vertikal verschoben (links); Korrelationspeaks q_{korr} in Abhängigkeit des Drucks bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und verschiedenen Lysozymkonzentrationen (rechts).

einem Druck von 1 kbar ist ein relativ flacher Verlauf des Korrelationspeaks für Konzentrationen bis circa 300 mg mL^{-1} zu sehen. Ein starker Abfall von q_{korr} bei hohen Drücken wird nur für Konzentrationen unterhalb von 100 mg mL^{-1} . Allgemein wird bei Druckapplikation durch die Kompression des Systems eine geringe Zunahme von q_{korr} erwartet. Der flache, druckabhängige Verlauf des Peakmaximums mit anschließendem Abfall bei sehr hohen Drücken kann auf Änderungen in den, durch das Lösungsmittel Wasser bedingten, intermolekularen Wechselwirkungen und auf die Bildung von (dynamischen) Clustern zurückgeführt werden.^[50,160] Einen tiefer gehenden Einblick in die druckabhängigen, strukturellen Änderungen gewährt das attraktive Potenzial J , wie es mit Hilfe der DLVO-Theorie näherungsweise berechnet werden konnte.

In Abbildung 3.82 (links) ist das attraktive Potenzial J in Abhängigkeit des Drucks

bei verschiedenen Lysozymkonzentrationen und einer Temperatur von 20 °C dargestellt. Mit steigender Proteinkonzentration sinkt der Wert für J auf Grund starker repulsiver Wechselwirkungen, da Lysozym, wie bereits erwähnt, unter diesen Bedingungen eine positive Nettoladung von +8 besitzt. Druckapplikation führt zunächst zu einer Erhöhung der Repulsion, wie es aus der Abnahme des attraktiven Potentials J zu sehen ist, da mit größerem Druck die Dichte der Lösung erhöht und der intermolekulare Abstand verringert wird. Bei höheren Drücken, zwischen 1500 bar und 2000 bar, steigt die Attraktivität des Potenzial erneut an. Aus früheren Studien mit geringer konzentrierten Lösungen wurde dieses nicht-lineare Verhalten mit einem Minimum von J auf den Kollaps der zweiten Hydratationshülle des Wassers und dem Eindringen von nicht über H-Brücken gebundenen Wassermolekülen in die erste Hydrathülle zurückgeführt.^[160] Die Potenzialänderungen in diesem Druckbereich sind demnach der Umorientierung und Neuordnung der Wasserstruktur geschuldet.^[190]

Interessanterweise wird das Minimum der J -Werte mit steigender Proteinkonzentration breiter und verschwindet bei Konzentrationen über 200 mg mL⁻¹. Bei diesen hohen Proteinkonzentrationen bleibt J bei Drücken oberhalb von circa 1500 bar nahezu druckinsensitiv, was darauf hindeutet, dass die druckinduzierte Änderung in der Wasserstruktur bei diesen hoch kondensierten Proteinlösungen weniger effektiv ist. Es ist dabei zu beachten, dass für Konzentrationen oberhalb von 200 mg mL⁻¹ die Funktionsanpassung der Streukurven nicht sehr genau ist und die Ergebnisse daher mit Vorsicht zu betrachten sind (vgl. Abbildung 3.82, rechts). Tatsächlich erweist sich das DLVO-Potenzial zur Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei sehr hohen Konzentrationen als weniger geeignet, da zusätzliche Wechselwirkungsterme (Hydratationsrepulsion, Wechselwirkungen von hydrophoben Fragmenten, Polarisationssterme etc.) sowie die einsetzende Clusterbildung von Proteinmolekülen möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen.^[164] Dennoch wird die Bildung von Clustern bei hohen Lysozymkonzentrationen in der Fachliteratur kontrovers diskutiert.^[147,191–197] Neutronenspinnecho- (NSE) sowie Neutronen-Kleinwinkelstreuexperimente (SANS) haben jedoch die Existenz von dynamischen Clustern bei hohen Proteinkonzentrationen bewiesen und den Übergang von einem Monomer zu einem Cluster-dominierten Lösungsbild gezeigt.^[195–197] Interessanterweise liegt der Konzentrationsbereich oberhalb

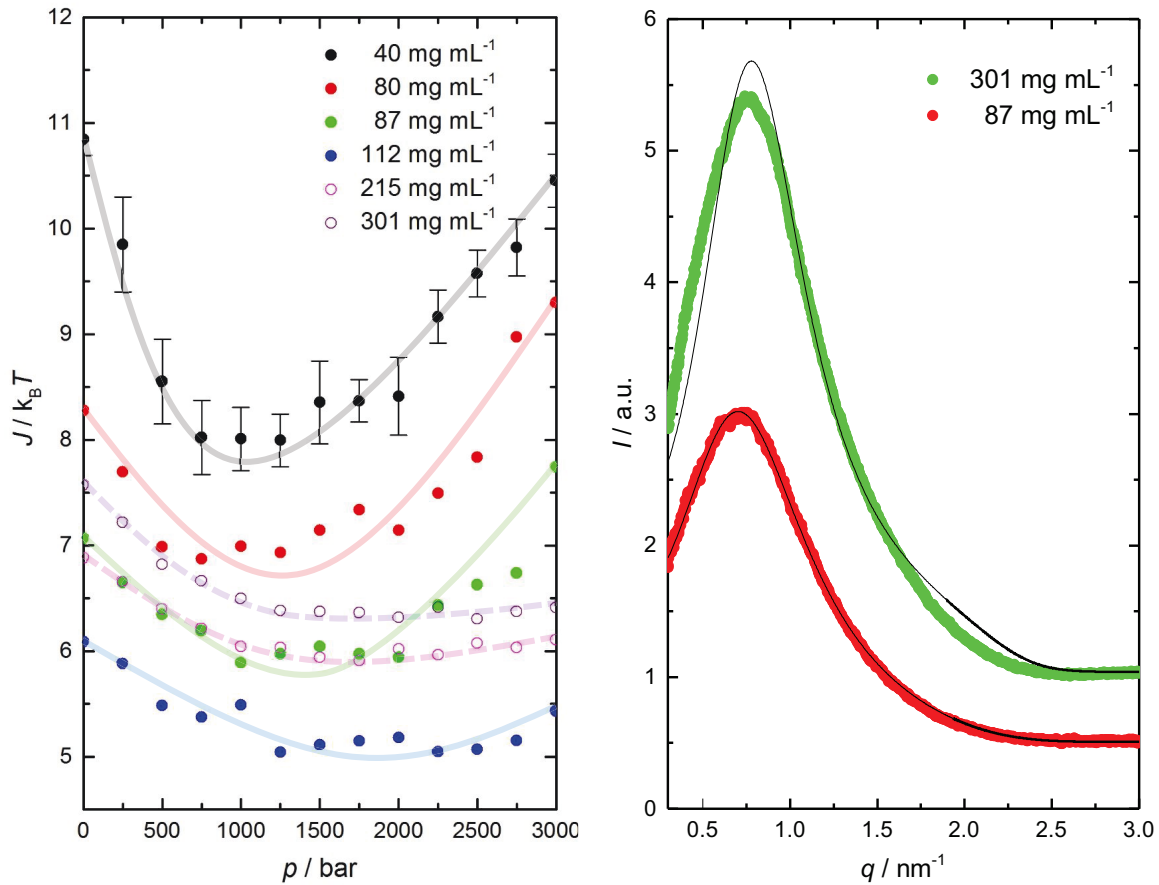


Abbildung 3.82: Tiefe des attraktiven Potentials J in Abhängigkeit des Drucks bei verschiedenen Lysozymkonzentrationen und einer Temperatur von 20 °C. Die durchgezogenen (gestrichelten) Linien dienen der optischen Führung (links); Streukurven des Lysozyms bei zwei Konzentrationen und einem Druck von 1 bar. Die durchgezogenen Linien beschreiben die Funktionsanpassung nach dem DLVO/MSA-Modell (rechts).

von 200 mg mL⁻¹, bei dem ein Maximum von $q_{\text{kor}}(c)$ und das Verschwinden des Minimums bei $J(p)$ auftreten, nahe an der kritischen Konzentration ($c_{\text{krit}} \approx 230 \text{ mg mL}^{-1}$) des flüssig-flüssig Koexistenzgebietes bei 5 °C, bei der eine Phasenseparation in eine kondensierte und gelöste Proteinlösung eintritt. Unter diesem Aspekt erscheint die Annahme der Bildung dynamischer Cluster in diesem Konzentrationsbereich bei 20 °C als sinnvoll.

Eine Erhöhung der Lysozymkonzentration auf 366 mg mL⁻¹ führt innerhalb der Zeitspanne des Experiments (circa 3 h) zu einer Nukleation sowie teilweiser Kristallbildung der übersättigten Lösung.^[158,198–201] Der q -Bereich, in dem bei dieser Messung BRAGG-Reflexe auftreten, ist in Abbildung 3.83 dargestellt. Aus der Indizierung dieser

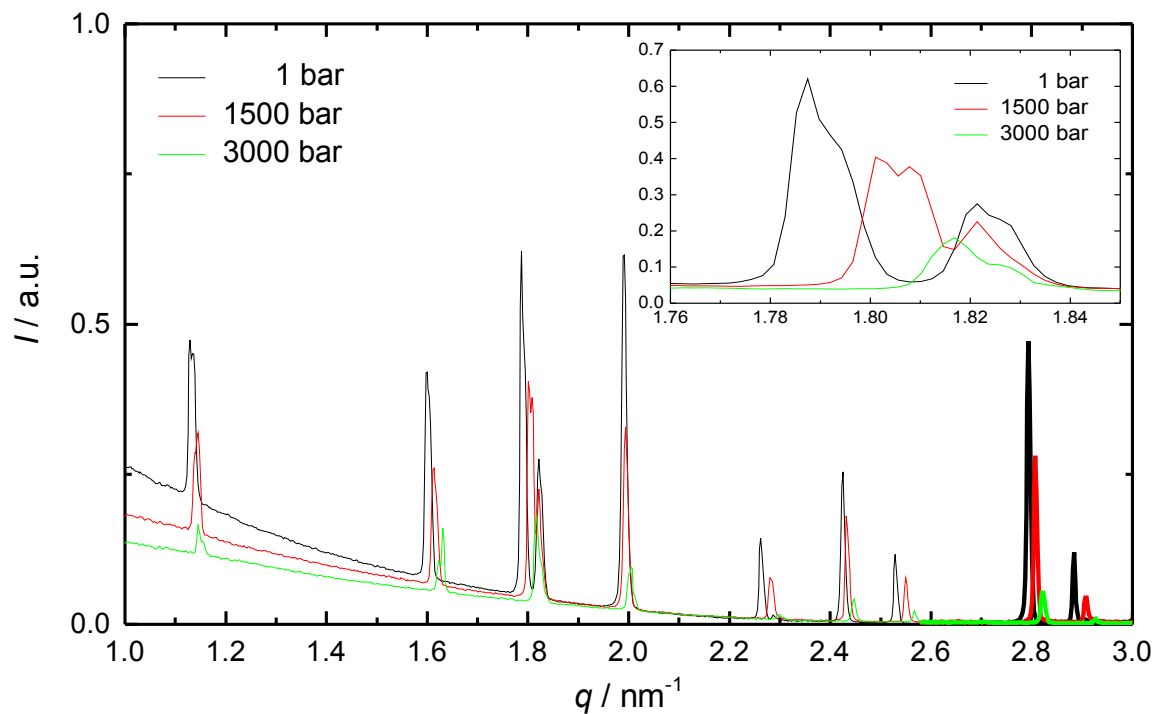


Abbildung 3.83: BRAGG-Reflexe bei der Streukurve von Lysozym der Konzentration 366 mg mL^{-1} bei drei verschiedenen Drücken.

Reflexe folgt eine primitive tetragonale Einheitszelle (Raumgruppe $P4_32_12$) mit den Abmessungen $a = b = 7.9 \text{ nm}$ und $c = 3.8 \text{ nm}$, die mit Literaturdaten in Übereinstimmung stehen.^[202–206] Die Anwendung von hohen hydrostatischen Drücken führt zu einer anisotropen Komprimierung entlang der Achsen der Einheitszelle, das heißt, zu einer Verkürzung der a -Seite, während die c -Seite nahezu unverändert bleibt.^[163] Dieses Verhalten wurde auch schon bei Druckuntersuchungen an reinen Lysozymkristallen beobachtet.^[203] Die Intensität der BRAGG-Reflexe nimmt unter Druck ab, was zeigt, dass durch Druckapplikation die Kristallbildung retardiert wird. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Bildung von Lysozymkristallen mit einer Volumenzunahme des Systems verbunden ist.

3.2.4 Zusammenfassung

Der Einfluss von hohen hydrostatischen Drücken auf die Struktur und das Protein-Protein-Wechselwirkungspotenzial von hochkonzentrierten Lysozymlösungen, die bis zu der doppelten kritischen Konzentration der flüssig-flüssigen Koexistenzphase beträgt,

wurde mit Hilfe der Röntgen-Kleinwinkelstreuung in Kombination mit dem DLVO-Ansatz aus der Flüssigkeitstheorie untersucht, wobei die höchsten Konzentrationen mit Hilfe des Dialyseprozesses durch Anwendung von osmotischem Druck erreicht wurden. Unter den gewählten Bedingungen waren die hochkonzentrierten Proteinlösungen für Tage stabil gegen Kristallisationsprozesse. Nur bei einer Konzentration von 366 mg mL^{-1} erfolgte eine partielle Kristallisation der metastabilen Lösung innerhalb des Zeitrahmens des Experiments.

Im Konzentrationsbereich unter 200 mg mL^{-1} besteht beim Wechselwirkungspotenzial der dichtgepackten Lysozymbösungen durch Applikation hoher Drücke ein nicht-linearer Zusammenhang, der durch die strukturellen Änderungen des Lösungsmittels hervorgerufen wird und bei Drücken zwischen 1.5 kbar und 2 kbar einsetzt.^[160] Bei diesen Bedingungen steigt die Koordinationszahl des Wassers signifikant an und führt zu einem Kollaps der zweiten Hydrathülle, was sich in einem veränderten Wechselwirkungspotenzial bemerkbar macht.

Oberhalb von 200 mg mL^{-1} wird für $J(p)$ kein Minimum mehr beobachtet und das Wechselwirkungspotenzial erweist sich in dieser Konzentrationsregion als nur wenig sensitiv gegenüber Druck, da sich die lösungsmittelbedingten Effekte auf die Protein-Protein-Wechselwirkungen verändert haben. Ausgehend von einer homogenen Verteilung der Proteinmoleküle betragen die intermolekularen Abstände zwischen den Teilchen nur noch 5 nm bei 200 mg mL^{-1} bzw. 4 nm bei 366 mg mL^{-1} . Dies entspricht einer Hydrathülle, die nur noch aus vier bzw. einem Wassermolekül aufgebaut ist. Bei derart dünnen Wasserschichten werden die strukturellen Eigenschaften des Lösungsmittels hauptsächlich durch Oberflächeneffekte (u.a. Elektrostriktion durch Hydratation der Oberflächenladungen) der Proteinmoleküle verursacht, während der Einfluss eines im Überschuss vorhandenen Lösungsmittels in den Hintergrund tritt. Auf Grund dessen wird hier auch kein Minimum bei $J(p)$ mehr erhalten. In diesem Gebiet steigt der repulsive Anteil des intermolekularen Wechselwirkungspotenzials mit steigender Proteinkonzentration auch nicht mehr an. Das Fehlen einer erhöhten SAXS-Intensität bei $q \rightarrow 0$ zeigt, dass keine irreversible Aggregation von Lysozym stattfindet. Vielmehr wird von einer transienten (dynamischen) Clusterbildung der Proteine ausgegangen, wie es auch aus dem Maximum von q_{kor}^* abgeleitet werden kann, was durch weitere

(druckabhängige) NSE-Messungen gestützt werden könnte.

Die Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass Druck die Nukleation, Aggregation und schließlich die Kristallisation des Proteins in übersättigten, kondensierten Systemen unterdrückt. Diese Beobachtungen sind daher von großer Bedeutung für das Verständnis der hohen Stabilität von hochkonzentrierten Proteinlösungen, wie sie intrazellulär bei Organismen in der Tiefsee vorherrschen, die hohen hydrostatischen Drücken bis in den kbar-Bereich ausgesetzt sind.^[3,5] In dichtgepackten Zellen, bei denen eine hohe Proteinkonzentration (bis zu 300 mg mL⁻¹) und makromolekulare *Crowder* mit einem Volumenanteil von 30 % vorgefunden werden, ist Druck ein effektives Mittel, das einer Proteinaggregation unter diesen *Crowding*-Bedingungen entgegenwirkt.^[136,207,208]

3.3 Lipidsysteme

In diesem Projekt wurde der Einfluss von Druck und Temperatur auf das Phasenverhalten ausgewählter Lipidmischungen mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung studiert. Die untersuchten Lipidsysteme wurden freundlicherweise vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. Kalbitzer (Lehrstuhl für Biophysik, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

3.3.1 Einleitung

Bizellare Lipidmischungen bestehend aus kurzkettigen 1,2-Dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DHPC) und langkettigen 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) haben sich als gutes Modellsystem für die Untersuchung von Biomembranen sowie membranassoziierten Biomolekülen etabliert (Abbildung 3.84). Abhängig vom Mischungsverhältnis der einzelnen Komponenten, der Gesamtkonzentration der Lipide sowie der Temperatur zeigen diese binären Phospholipidmischungen eine Vielzahl an verschiedenen Morphologien.^[209,210] Bei tiefen Temperaturen bildet das System scheibenförmige Mizellen, wobei sich die langkettigen DMPC-Moleküle bevorzugt in der planaren Ebene der Doppelschicht und die kurzkettigen DHPC-Lipide an der gekrümmten Seite am Rand der Aggregate anlagern.^[211] Auf Grund dessen werden diese Lipidmischungen als bizellare Mischungen bezeichnet.

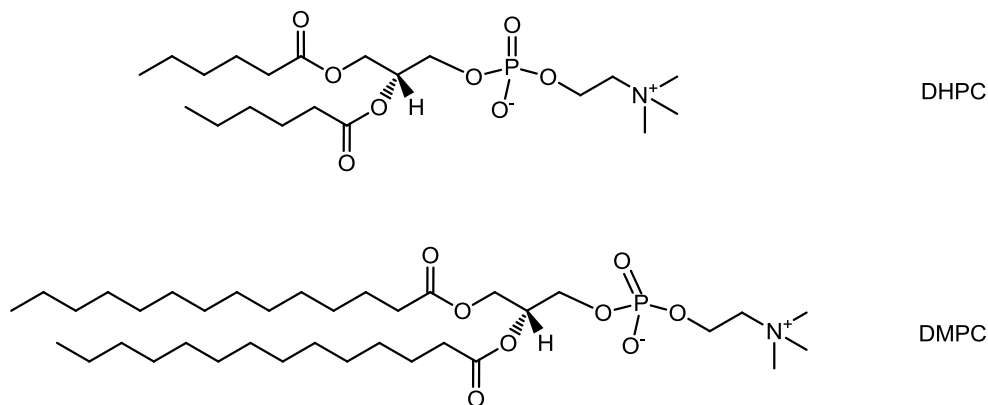


Abbildung 3.84: Strukturformeln von 1,2-Dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DHPC) und 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC).

Diese Mischungen sind von besonderem Interesse, da durch Anlegen eines Magnetfeldes entweder spontan oder durch Zugabe von Lanthanoid-Ionen die Bildung einer nematischen Phase induziert werden kann. Auf Grund dieser Eigenschaft hat sich das System als ideal für NMR-Studien herausgestellt, da dadurch die Ausrichtung von hydrophilen sowie hydrophoben Makromolekülen, wie membranassoziierten Proteinen und Peptiden, untersucht werden konnte.^[211–216] Bizellen bieten Proteinen eine weitestgehend krümmungsfreie, membranähnliche Struktur, sodass diese ihre enzymatische Aktivität erhalten können, im Gegensatz zu den meisten mizellaren Systemen, bei denen ein Verlust der Enzymaktivität beobachtet wird.^[217] Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass etwa 30 % aller Proteine an Membranen gebunden sind, erscheint die bizellare Lipidmischung umso wichtiger.^[218] Die Lipidzusammensetzung dieser Mischungen wird typischerweise durch das molare Verhältnis der lang- und kurzkettigen Lipide, $Q = [\text{DMPC}] / [\text{DHPC}]$, und dem Gewichtsprozentanteil der gesamten Lipidsuspension charakterisiert.^[211] Das System, das in der Literatur am meisten untersucht wurde, besitzt ein molares Verhältnis von $Q = 3.2 / 1$. Hier gibt es neben Hochdruck-NMR-Studien bereits Untersuchungen mit FTIR-Spektroskopie und Röntgen-Kleinwinkelstreuung unter hohen hydrostatischen Drücken.^[210,215] Kleinere Bizellen mit einem molaren Verhältnis von $Q = 0.5$ bilden eine isotrope Lösung, die für die Untersuchung von membrangebundenen Peptiden geeignet sind.^[213]

Eine weitere binäre Lipidmischung, die in dieser Arbeit als bizellares System verwendet wurde, besteht aus DPPC/DHPC (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, Abbildung 3.85). DPPC besteht ebenso wie DMPC aus einer Cholin-Kopfgruppe, hat jedoch eine um zwei Einheiten längere Alkyl-Kette. Im menschlichen Körper ist es die Hauptkomponente spezieller Zellen in der Lunge (Pneumozyten Typ II). Als „Surfactant“ (grenzflächenaktiver Stoff) hat DPPC hier die Aufgabe, die Oberflächenspannung so weit herabzusetzen, dass ein Kollaps der Lungenbläschen (Alveolen) verhindert wird.^[219]

Um den Einfluss von Druck und Temperatur auf eine möglichst biologisch ähnliche Membran zu studieren, wurden die binären Mischungen um die drei Komponenten Cholesterin, Sphingomyelin (SM) und Phosphoserin (PS) erweitert (Abbildung 3.86). Diese Zusammensetzung, die als Lipid-Raft-Mischung bezeichnet wird, stellt Mikrodomänen

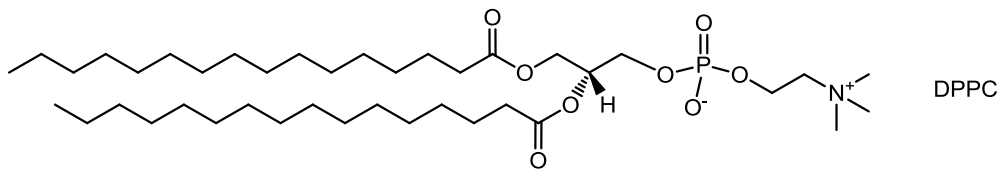


Abbildung 3.85: Strukturformel von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC).

in Zellmembranen nach, die reich an Cholesterin sind.^[220–223] Dabei bilden gesättigte Lipide zusammen mit Cholesterin eine geordnete Phase (engl.: liquid ordered, l_o), die sich innerhalb einer ungeordneten Phase (engl.: liquid disordered, l_d), hauptsächlich bestehend aus ungesättigten Lipiden, bewegt.^[224–226] Die Verwendung von Phosphoserin führt zu einer anionischen Lipidmembran. Allgemein spielen anionische Lipide eine wichtige Rolle im Körper, da sie an zahlreichen biochemischen Prozessen beteiligt sind.^[227–229] In diesem Projekt sollte der Einfluss von Druck und Temperatur mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung auf diese Lipidklassen, die ein bizellares System aus DMPC/DHPC bzw. DPPC/DHPC bilden, studiert werden. Das molare Verhältnis der lang- und kurzkettigen Lipide Q beträgt bei allen Mischungen 1.

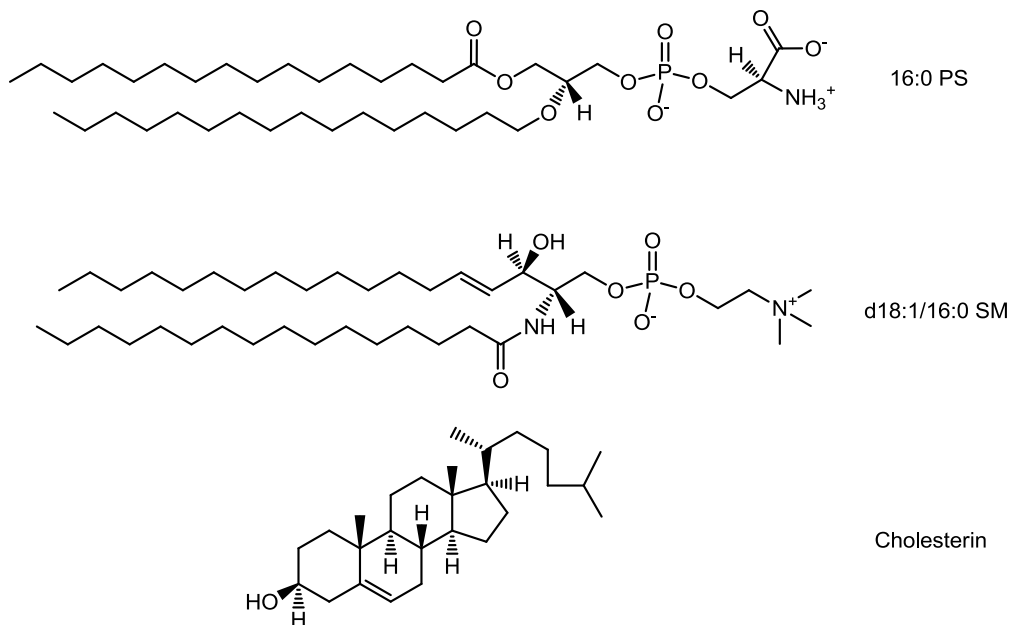


Abbildung 3.86: Strukturformeln von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin (16:0 PS), *N*-palmitoyl-D-*erythro*-sphingosylphosphorylcholin (d18:1/16:0 SM) und Cholesterin.

3.3.2 Materialien und Methoden

Die für die SAXS-Messungen verwendeten Proben wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. Kalbitzer (Lehrstuhl für Biophysik, Universität Regensburg) präpariert. Die tiefgefrorenen Proben wurden aufgetaut und für 5 min bei 40 °C erwärmt. Anschließend erfolgte für 2 min mittels Vortexer eine intensive Durchmischung. Insgesamt wurden vier Probensysteme verwendet:

- DHPC[¶]/DMPC^{||} (molares Verhältnis 1:1), $c = 140$ mM
- DHPC/DMPC/Cholesterin/SM^{**}/PS^{††}
- DHPC/DPPC (molares Verhältnis 1:1), $c = 140$ mM
- DHPC/DPPC^{‡‡}/Cholesterin/SM/PS

Der verwendete Puffer setzte sich aus 50 mM Natriumphosphat (pH = 7), 0.1 mM 2,2-Dimethyl-2-silanpentan-5-sulfonsäure (DSS), 0.2 mM Dioxan, 1 mM Natriumazid, 100 mM Natriumchlorid und 8 % D₂O zusammen. Die Röntgen-Kleinwinkelstreuexperimente wurden an der Beamline BL9 am DELTA in der Hochdruckzelle von *Krywka* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2). Die Messungen wurden in einem Druckbereich zwischen 1 bar und 2 kbar bei Temperaturen zwischen 5 °C und 55 °C durchgeführt. Nach jeder Druckapplikation bzw. Temperaturerhöhung wurde 5 min gewartet, um einen Gleichgewichtszustand des Systems zu gewährleisten. Alle weiteren technischen Daten sind in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

3.3.3 Ergebnisse

In Abbildung 3.87 sind die druckabhängigen Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven der binären Phospholipmischung DMPC/DHPC ($Q = 1$, $c = 140$ mM) in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C dargestellt. Es wurde in einem Druckbereich zwischen

[¶]1,2-Dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DHPC)

^{||}1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC)

^{**}Sphingomyelin (SM)

^{††}Phosphoserin (PS)

^{‡‡}1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC)

1 bar und 2000 bar gemessen. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei Temperaturen unterhalb von 10 °C bei einem Druck von 1 bar BRAGG-Reflexe auftreten, die zunächst auf eine Entmischung und damit auf eine Koexistenz der beiden Lipide hindeuten. Eine genaue Analyse zeigt, dass die ersten drei BRAGG-Reflexe bei q -Werten von 0.72 nm^{-1} , 1.45 nm^{-1} und 2.18 nm^{-1} auftreten (Abbildung 3.88). Diese stehen somit in einem Verhältnis von 1:2:3 und beschreiben ein lamellares Lipidsystem, das auf die Bildung von multilamellaren Vesikeln schließen lässt. Die Schichtdicke d einer Lipiddoppelschicht inklusive angrenzender Wasserschicht beträgt gemäß Gleichung 2.48 $8.7 \pm 0.05 \text{ nm}$. Im Vergleich zu einer reinen DMPC-Lipiddoppelschicht, die eine Schichtdicke von 6.2 nm besitzt, ist die Dicke der lamellaren Phase der binären Mischung DMPC/DHPC deutlich größer.^[230] Konzentrationsabhängige SANS- sowie ^{31}P -NMR-Messungen haben gezeigt, dass der Einbau von DHPC in die Lipiddoppelschicht von DMPC mit steigender Konzentration von DHPC begünstigt wird.^[231,232] Da in dem untersuchten System die beiden Komponenten in einem äquimolaren Verhältnis stehen, steigt die Wahrscheinlichkeit für den Einbau von DHPC. Zudem ist DHPC dafür bekannt, eine ineinandergreifende Phase (engl.: interdigitated phase) zu bilden, die durch tiefe Temperaturen und hohen Druck bevorzugt entsteht.^[233] Dadurch erhöht sich die Dicke der Lipiddoppelschicht auf Grund des größeren Wasseranteils in der multilamellaren Membran, da durch den Einbau des kurzkettigen Lipids porenähnliche Packungsdefekte entstehen, die eine Diffusion von Wassermolekülen in diese Hohlräume erleichtern.^[209,210] Gemäß Gleichung 2.50 kann die Anzahl der Lipidschichten aus der Halbwertsbreite des BRAGG-Reflexes näherungsweise bestimmt werden. Für eine DMPC/DHPC-Mischung bei 1 bar und 5 °C beträgt der Wert für N_{Schicht} ungefähr 20 Einheiten.

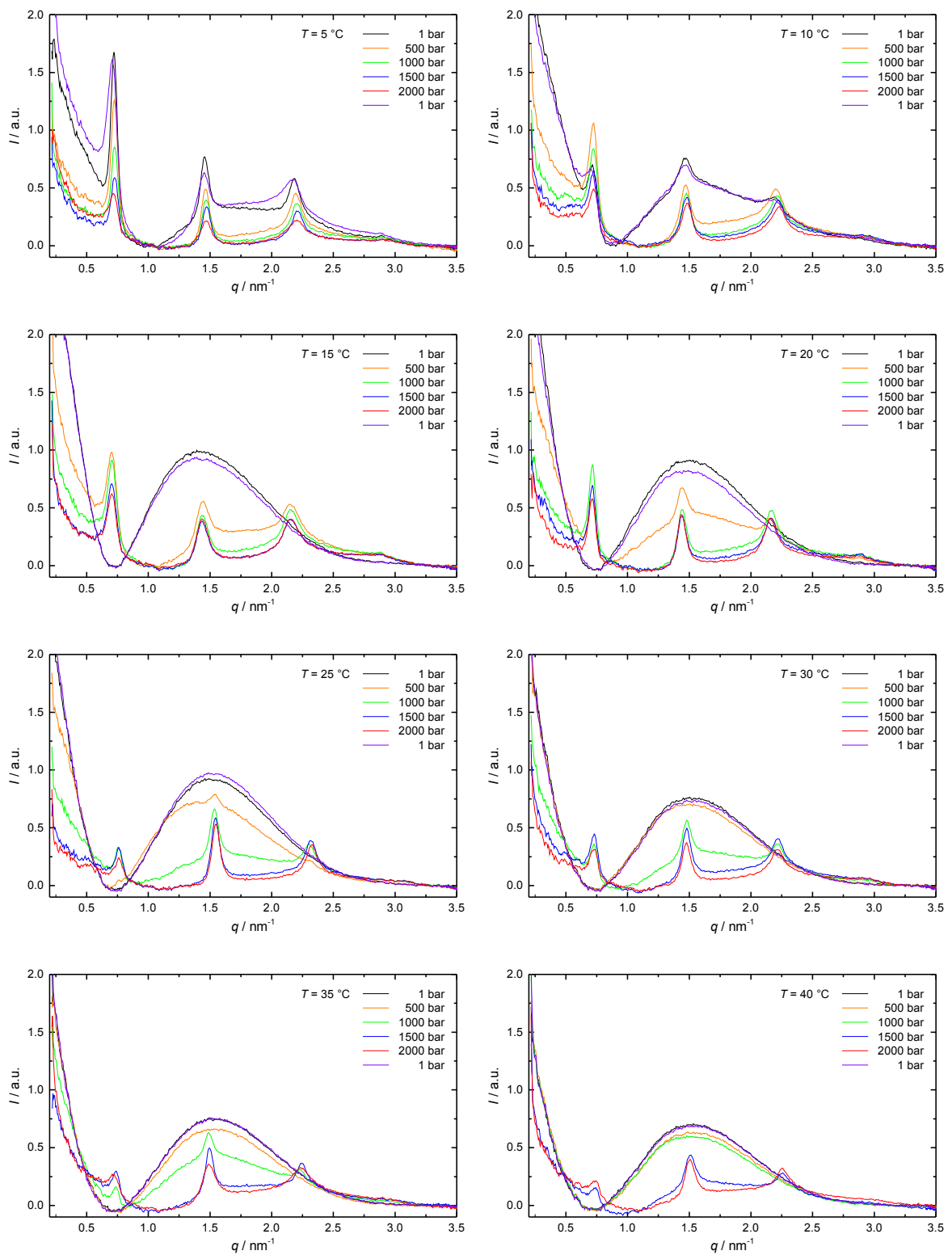


Abbildung 3.87: Röntgen-Kleinwinkelstreuungen der bizellaren Lipidmischung DMPC/DHPC (molares Verhältnis 1:1) in Abhängigkeit des Drucks von 1 bar bis 2000 bar bei Temperaturen von 5 °C bis 40 °C. Die jeweils letzte Messung bei 1 bar zeigt die Streukurve nach Druckentspannung.

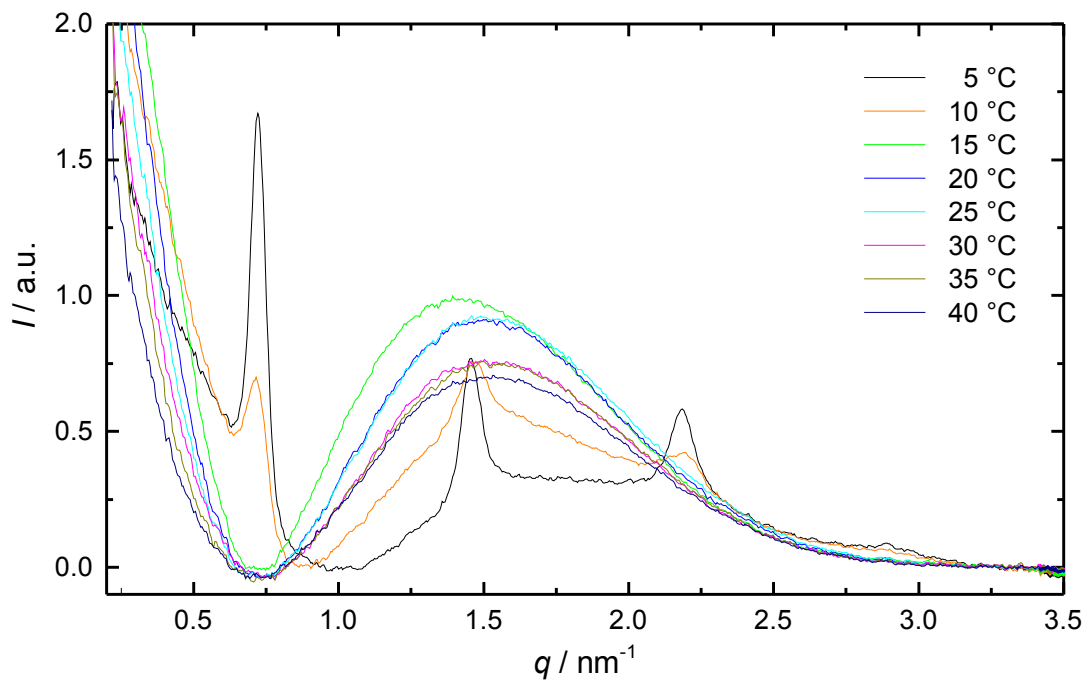


Abbildung 3.88: Röntgen-Kleinwinkelstreuksurven der bizellaren Lipidmischung DMPC/DHPC (molares Verhältnis 1:1) in Abhängigkeit der Temperatur von 5 °C bis 40 °C.

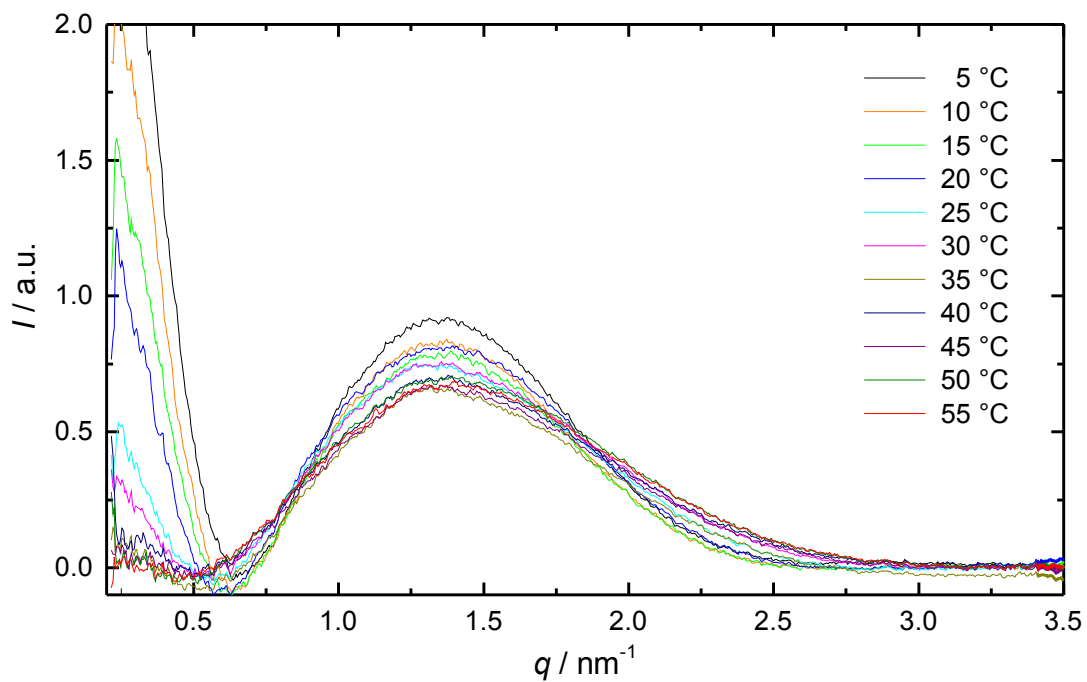


Abbildung 3.89: Röntgen-Kleinwinkelstreuksurven der bizellaren Lipidmischung DMPC/DHPC (molares Verhältnis 1:1) in Abhängigkeit der Temperatur von 5 °C bis 55 °C.

Bei Temperaturen oberhalb von 10 °C zeigt die Lipidmischung ein breites Maximum, das charakteristisch für ein bizellares System ist.^[210] Dieser Peak besitzt bei 25 °C ein Maximum bei $q \approx 1.50 \text{ nm}^{-1}$, was einem intrapartikulären Abstand von 4.2 nm entspricht. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten, die aus SAXS-Messungen erhalten wurden.^[210,232] Hier wurde ein d -Wert von 4.5 nm bzw. 4.82 nm für die Bizelle bei einem molaren Verhältnis von $Q = 2$ bzw. $Q = 3.2$ ermittelt. Bei kleiner werdendem Q -Wert sinkt allerdings auch die Größe der Bizelle. Durch den hohen Anteil an DHPC in der binären Mischung befinden sich die kurzkettigen Lipide nicht nur am Rand der Bizelle, sondern sind wahrscheinlich auch in der flachen DMPC-Schicht eingebaut. Diese Art der Bizellen wird auch als gemischte Bizelle bezeichnet (engl.: mixed bicell).^[231] Weiterhin wird deutlich, dass Druck die lamellare Phase begünstigt, da sich mit steigendem Druck BRAGG-Reflexe ausbilden, die eindeutig der lamellaren Phase zugeordnet werden können. Mit steigender Temperatur werden immer größere Drücke benötigt, um eine Umwandlung von der bizellaren in die lamellare Phase zu induzieren. Während bei 25 °C ein Druck von 1000 bar die lamellare Phase erzeugt, ist bei 40 °C bereits ein Druck von 1500 bar für die Phasenumwandlung notwendig. Alle gemessenen Systeme sind reversibel, da nach Druckrelaxation die Streukurve wieder in ihre ursprüngliche Form übergeht.

Interessanterweise zeigt eine zweite Probe, die aus derselben Stammlösung hergestellt wurde, bei tiefen Temperaturen ($< 10 \text{ °C}$) keine Entmischung der Lipide (Abbildung 3.89). Im gesamten Temperaturbereich zwischen 5 °C und 55 °C ist ein breiter Peak zu erkennen, dessen Intensität bei $q \approx 1.5 \text{ nm}^{-1}$ mit steigender Temperatur abnimmt, während die Intensität bei $q \approx 2.3 \text{ nm}^{-1}$ steigt. Dieses Verhalten deutet auf die Bildung einer nematischen Phase des binären Lipidgemisches hin, die oberhalb der Phasenübergangstemperatur T_m von DMPC auftritt. Diese liegt bei 23.5 °C und kann durch den Intensitätsabfall bei kleinen q -Werten beobachtet werden.^[230] Dieses Verhalten steht im Einklang mit früheren Studien, bei denen die nematische Phase als eine flexible, quasi-zylindrische, elongierte Mizelle charakterisiert wurde.^[209–211,234]

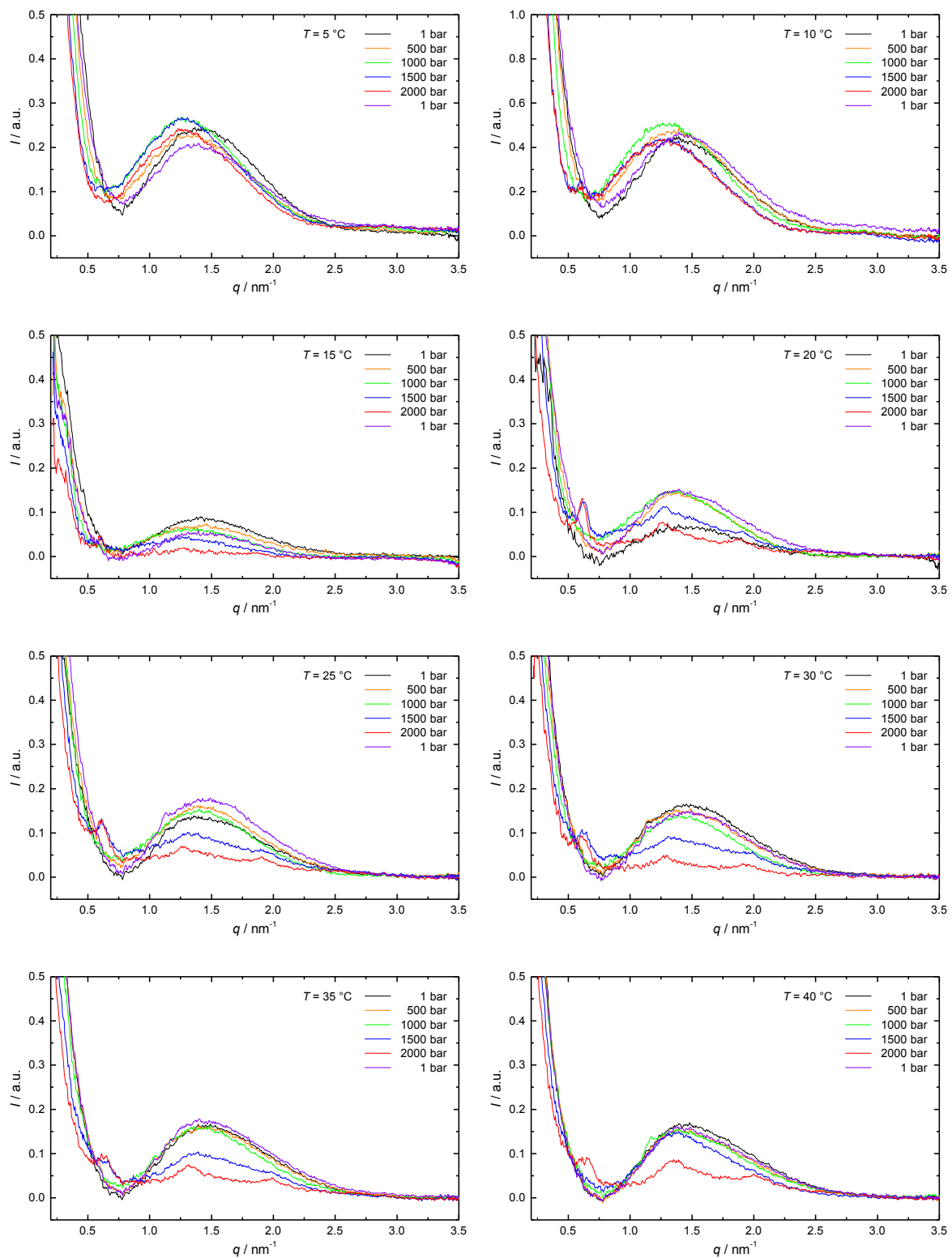


Abbildung 3.90: Röntgen-Kleinwinkelstreuungen der 5-Komponenten-Lipidmischung DMPC/DHPC/Cholesterin/SM/PS in Abhängigkeit des Drucks von 1 bar bis 2000 bar bei Temperaturen von 5 °C bis 40 °C. Die jeweils letzte Messung bei 1 bar zeigt die Streukurve nach Druckentspannung.

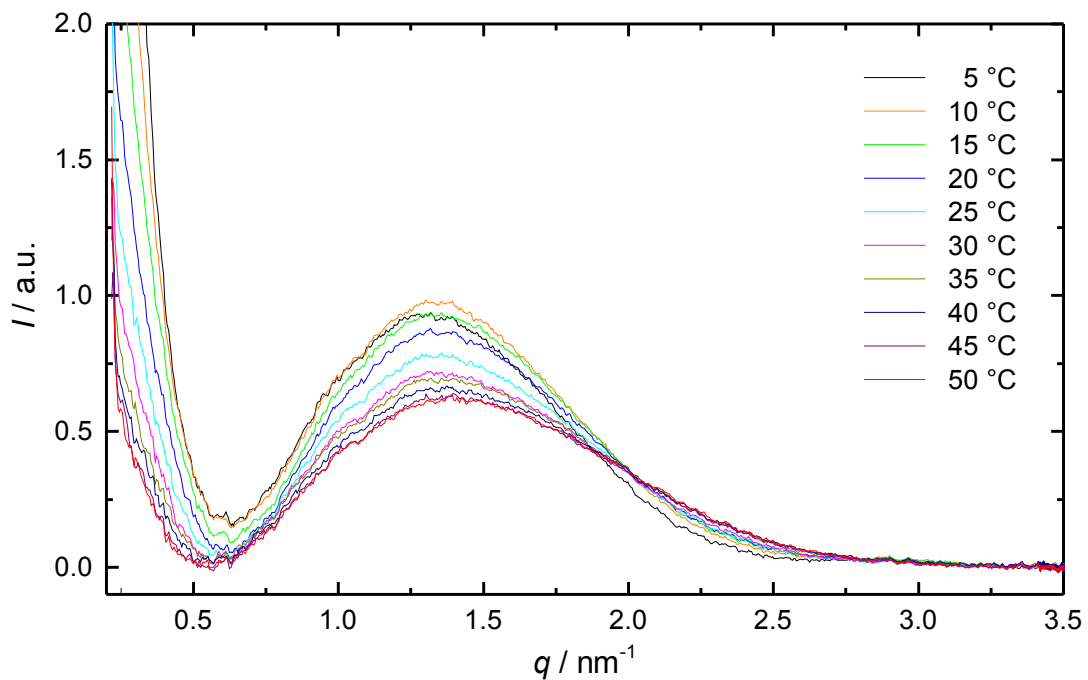


Abbildung 3.91: Röntgen-Kleinwinkelstreuungen der 5-Komponenten-Lipidmischung DMPC/DHPC/Cholesterin/SM/PS in Abhängigkeit der Temperatur von 5 °C bis 50 °C.

Um die Eigenschaften von Druck und Temperatur auf eine biologisch relevante Membran zu untersuchen, wurde ein 5-Komponentensystem aus DHPC/DMPC/Cholesterin/SM/PS gewählt. Ein Überblick der gemessenen Streukurven in einem Temperaturbereich zwischen 5 °C und 40 °C in Abhängigkeit des Drucks ist in Abbildung 3.90 dargestellt. Ein Vergleich dieser Streukurven bei einem Druck von 1 bar in Abhängigkeit der Temperatur (Abbildung 3.91) zeigt keine lamellare Phasenbildung. Stattdessen wird das für ein bizellares System typisch breite Maximum in der Streukurve beobachtet, das sich ab circa 25 °C noch verbreitert. Dies deutet wahrscheinlich auf die Bildung einer nematischen Phase hin. Durch die hohe Anzahl an verschiedenen Komponenten wird keine geordnete lamellare Phase gebildet.

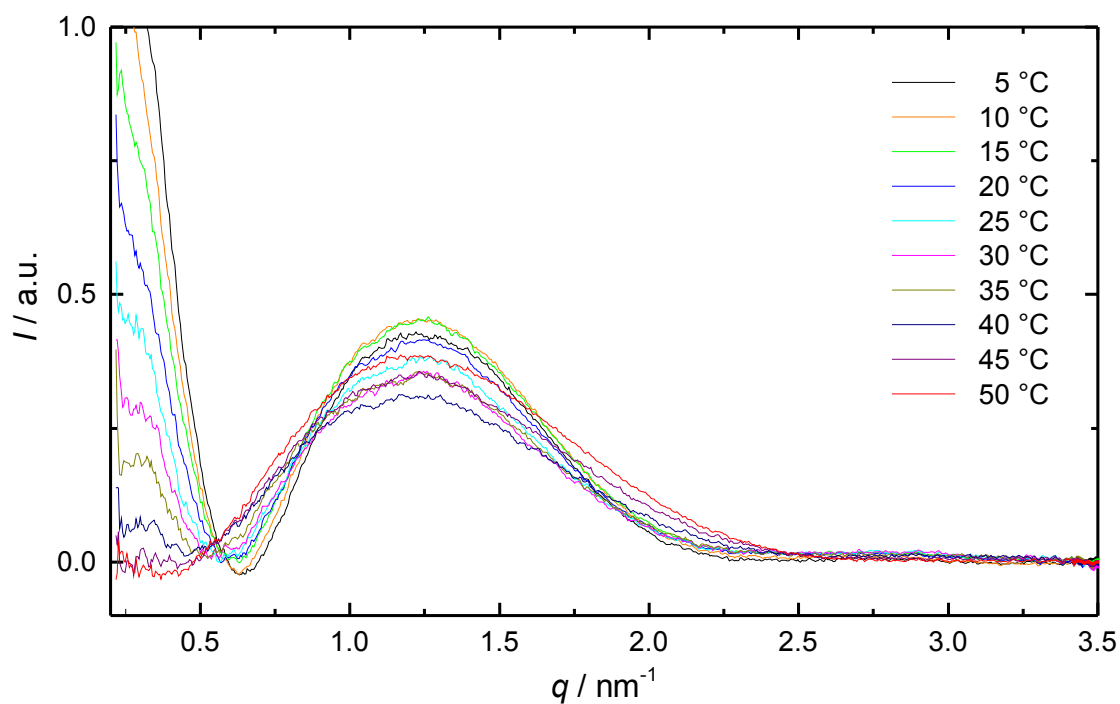


Abbildung 3.92: Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven der bizellaren Lipidmischung DPPC/DHPC (molares Verhältnis 1:1) in Abhängigkeit der Temperatur von 5 °C bis 50 °C.

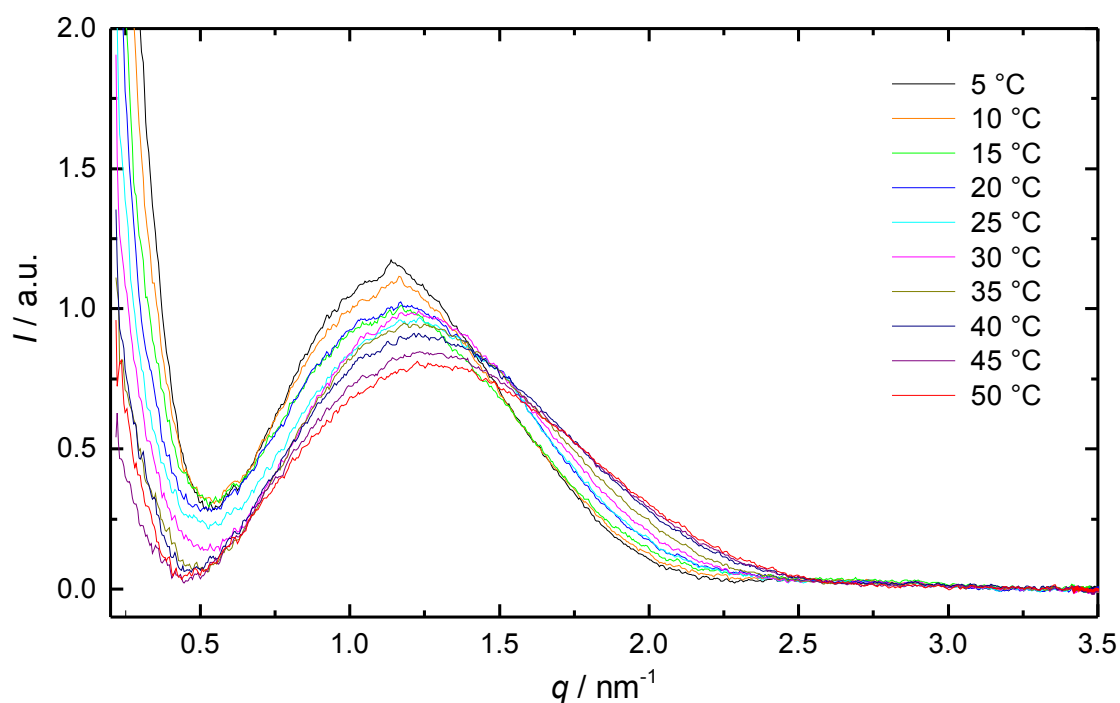


Abbildung 3.93: Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven der 5-Komponenten-Lipidmischung DPPC/DHPC/Cholesterin/SM/PS in Abhängigkeit der Temperatur von 5 °C bis 50 °C.

Erst durch Druckapplikation ist eine geringe Ausbildung von BRAGG-Reflexe erkennbar. Während bei 20 °C ein Druck von circa 1500 bar für die Bildung einer schwach ausgeprägten lamellaren Phase notwendig ist, beginnt die Phasenumwandlung bei 40 °C erst bei einem Druck von 2000 bar.

Neben dem allgemein bekannten bizellaren System DMPC/DHPC wurde auch ein ähnliches Phospholipidgemisch bestehend aus DPPC/DHPC in Abhängigkeit der Temperatur untersucht. DPPC besteht im Vergleich zu DMPC aus um zwei CH₂-Einheiten längeren Ketten. Dadurch steigt die Phasenübergangstemperatur auf 41.5 °C. Abbildung 3.92 zeigt die Röntgen-Kleinwinkelstreu曲ven von DPPC/DHPC in Abhängigkeit der Temperatur. Das Peakmaximum liegt bei 25 °C bei 1.25 nm⁻¹, was einer intrapartikulären Distanz der kürzeren Seite von 5.03 nm entspricht und im Vergleich zu DMPC/DHPC (4.2 nm), bedingt durch die längeren Acylketten, größer ist. Auch bei diesem System ist eine Verbreiterung der Streukurve oberhalb der Phasenübergangstemperatur von DPPC zu beobachten, die auf die Bildung einer nematischen Phase hindeutet. Das 5-Komponentensystem aus DPPC/DHPC/Cholesterin/SM/PS zeigt bei kleinen q -Werten im Vergleich zur binären Mischung keinen Intensitätsabfall, sodass durch den Einbau von cholesterinreichen Domänen in die DPPC-Doppelschicht kein scharfer Übergang von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase beobachtet werden kann (Abbildung 3.93). Zudem findet auch bei dieser Raft-Mischung eine Verbreiterung der Streukurven bei höheren Temperaturen statt, die erneut auf eine nematische Phasenbildung hindeutet.

3.3.4 Zusammenfassung

In diesem Projekt wurde das Phasenverhalten von DMPC/DHPC- bzw. DPPC/DHPC-basierten Lipidmischungen mit Hilfe von Röntgen-Kleinwinkelstreuung in Abhängigkeit von Temperatur und Druck studiert. Es konnte gezeigt werden, dass das System aus DMPC/DHPC in äquimolarer Zusammensetzung, abhängig von den untersuchten Parametern, verschiedene Morphologien aufweist. Das resultierende p, T -Phasendiagramm ist in Abbildung 3.94 zu sehen. Es zeigt, dass mit Druck eine lamellare Phase induziert werden kann. Die Phasengrenzlinie zwischen der bizellaren und lamellaren Phase verläuft mit einer inversen CLAPEYRONschen Steigung ($dT/dp = \Delta V/\Delta S$) von 22 K kbar⁻¹

und liegt damit etwas unterhalb der Steigung von 30 K kbar^{-1} , die für eine Mischung mit einem molaren Verhältnis Q von 3.2 gefunden wurde.^[210]

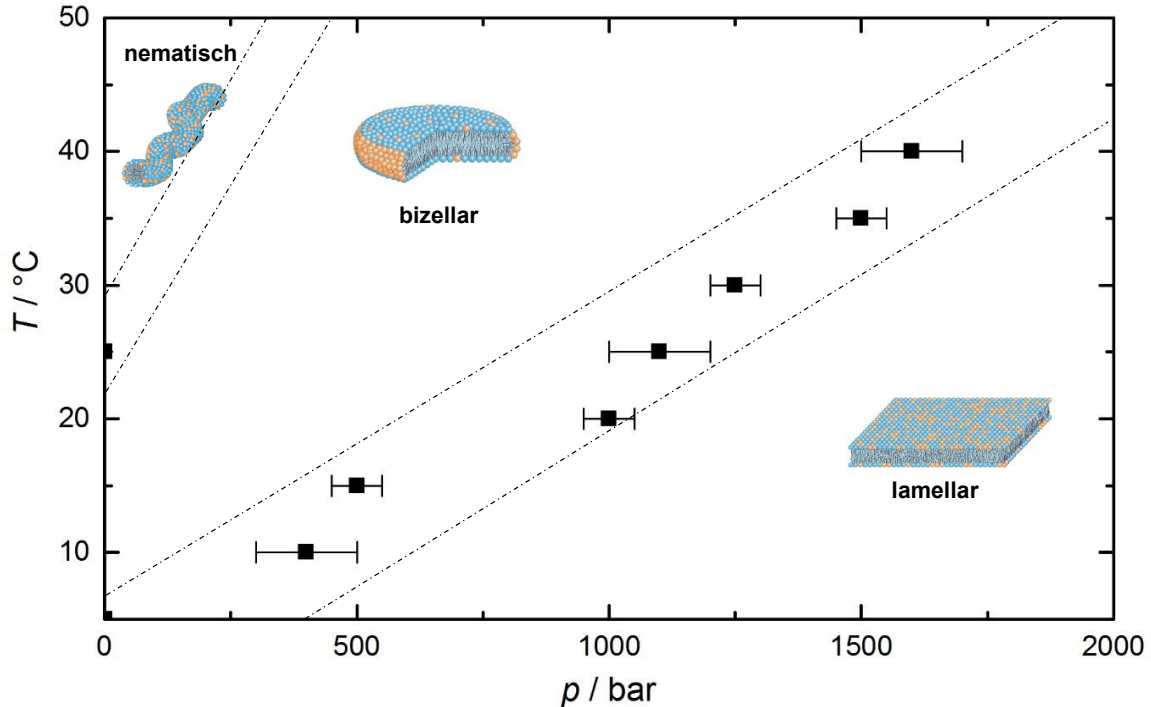


Abbildung 3.94: p, T -Phasendiagramm der binären Lipidmischung DMPC/DHPC bei $Q = 1$, $c = 140 \text{ mM}$.

Eine für biophysikalische Untersuchungen relevante Struktur ist das bizellare System, das scheibenförmige Mizellen ausbildet, da es als Matrix für membranassoziierte Proteine und Peptide verwendet werden kann. Dieses System ist über einen weiten Temperaturbereich stabil und bildet sich in diesem molaren Verhältnis spontan bei 20 °C . Oberhalb der Schmelztemperatur der langkettigen Komponente entstehen hingegen quasi-zylindrische, elongierte Mizellen. Daher kann durch Auswählen der entsprechenden Länge der Phospholipidkette der für die jeweilige Untersuchung gewünschte Temperaturbereich, in dem sich bizellare Strukturen bilden, festgelegt werden. Die Studie hat daher gezeigt, dass das System aus DMPC/DHPC bzw. DPPC/DHPC in einem äquimolaren Verhältnis ($Q = 1$) sehr gut geeignet ist, biologisch relevante Strukturen temperatur- und druckabhängig zu untersuchen. Dies konnte auch durch die druck- bzw. temperaturabhängigen Messungen der 5-Komponentensysteme, die als anionische RAFT-Membran eine natürliche Membran imitieren sollte, belegt werden. Die bizellare

Struktur blieb auch hier über einen weiten Druck- bzw. Temperaturbereich stabil, so dass das System auch für die Untersuchung von Membransystemen von Extremophilen, wie beispielsweise Tiefseeorganismen, genutzt werden kann.

4 Zusammenfassung

Anhand der drei durchgeführten Projekte konnte gezeigt werden, welchen vielseitigen Einfluss hohe hydrostatische Drücke auf stimuli-sensitive Polymere sowie biologisch relevante Molekülsysteme nehmen kann.

Bei den auf **Poly-(N-isopropylacrylamid)** (PNiPAm)-basierenden Polymeren führt die Anwendung hoher hydrostatischer Drücke zu einer piezoresponsiven Reaktion des Systems, die sich durch eine stärkere Hydratisierung der Polymerketten äußert. Während Temperatur zu einem Kollaps der Mikrogele bzw. linearen Ketten führt, kann Druck diesem Effekt entgegenwirken, solange dessen Applikation nicht weit weg oberhalb der Volumenphasenübergangstemperatur (VPTT) bzw. unteren kritischen Lösungstemperatur (LCST) liegt. Außerhalb dieses Bereiches wird erst ein bestimmter Schwellendruck benötigt, der die Hydratisierung einleitet. Die Ketten bzw. Mikrogele erreichen hier jedoch nicht den vollhydratisierten Zustand, wie er unterhalb der Phasengrenze vorliegt. Bei den Mikrogele, die selbst oberhalb des Phasenübergangs kolloidal stabil vorliegen, führt Druck zu einem Aufquellen des Systems, das sich in einer signifikanten Zunahme der Größe äußert. Die Kompensation des Temperatureffektes verläuft dabei bis zu Drücken von ca. 1.5 kbar bis 2 kbar mit einer CLAPEYRONschen Steigung (dp/dT) von 100 bar K^{-1} . Oberhalb dieses Druckbereiches wird kein signifikanter Druckeffekt mehr beobachtet, da der Temperatureffekt sowie die druckinduzierte Kompression im Gleichgewicht mit dem Hydratisierungseffekt stehen. In Methanollösungen führt die Anwendung hoher Drücke zudem zur Aufhebung des Cononsolvency-Effektes, da bevorzugt starke H-Brücken des Wassers zur Carbonylgruppe gebildet werden, während hydrophobe Wechselwirkungen geschwächt werden und Methanol aus dem Polymersystem getrieben wird. Erst bei hohen Methanolkonzentrationen erfolgt die Solvatisierung auch durch Methanol unter Druck.

Im zweiten Projekt wurden die Protein-Protein-Wechselwirkungen von hochkonzentrierten Lysozymlösungen im metastabilen flüssig-flüssig und flüssig-kristallin Koexistenzgebiet in Abhängigkeit des Drucks mit dem DLVO-Ansatz aus der Flüssigkeitstheorie untersucht. Bei Konzentrationen unterhalb von 200 mg mL^{-1} wird ein nicht-linearer Zusammenhang des Wechselwirkungspotenzials mit steigendem Druck beobachtet, der durch strukturelle Änderungen des Lösungsmittels Wasser hervorgerufen werden. Bei höheren Konzentrationen, bei denen die Hydrathülle aus weniger als vier Wassermolekülen aufgebaut ist, zeigt das Potenzial ein vom applizierten Druck unabhängiges Verhalten. Hier setzt bereits die Bildung von transienten (dynamischen) Proteinclustern ein. Die Ergebnisse zeigen, dass Druck in der Lage ist, die Protein-nukleation, -aggregation sowie -kristallisation in übersättigten kondensierten Lösungen zu unterdrücken. Die Untersuchungen von dichtgepackten Proteinlösungen unter hohen hydrostatischen Drücken sind von großer biologischer Bedeutung für das Verhalten von Organismen, die extremen Bedingungen ausgesetzt sind, wie beispielsweise Lebewesen in der Tiefsee.

Im letzten Projekt konnte aus den temperatur- sowie druckabhängigen Untersuchungen von DHPC/DMPC-basierten Lipidmischungen ein p, T -Phasendiagramm erstellt werden, aus dem unterschiedliche morphologische Strukturen der binären Lipidzusammensetzung hervorgehen. Die biologisch relevante Phase stellt hierbei das bizellare System dar, da es als Matrix für membranassoziierte Proteine und Peptide verwendet werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Bizellen über einen weiten Temperatur- sowie Druckbereich stabil bleiben und so die Untersuchungen (z.B. NMR-Messungen) unter verschiedenen physikalischen Bedingungen sowie unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen (z.B. Raft-Mischungen) ermöglichen. Eine Verschiebung der Phasengrenzen im p, T -Phasendiagramm ist dabei unter Variation des DHPC/DMPC-Verhältnisses möglich.

5 Anhang

5.1 Stimuli-sensitive Polymere

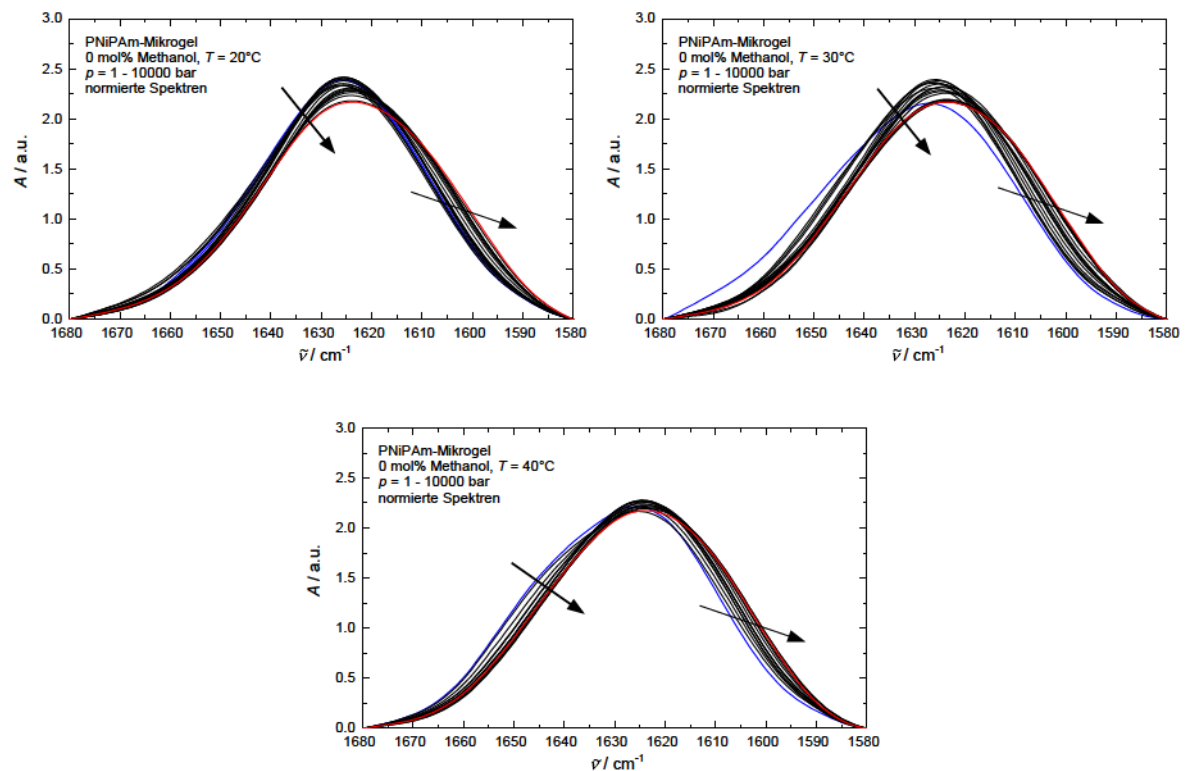


Abbildung 5.1: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in D₂O in Abhängigkeit des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum beim Anfangs- bzw. Enddruck.

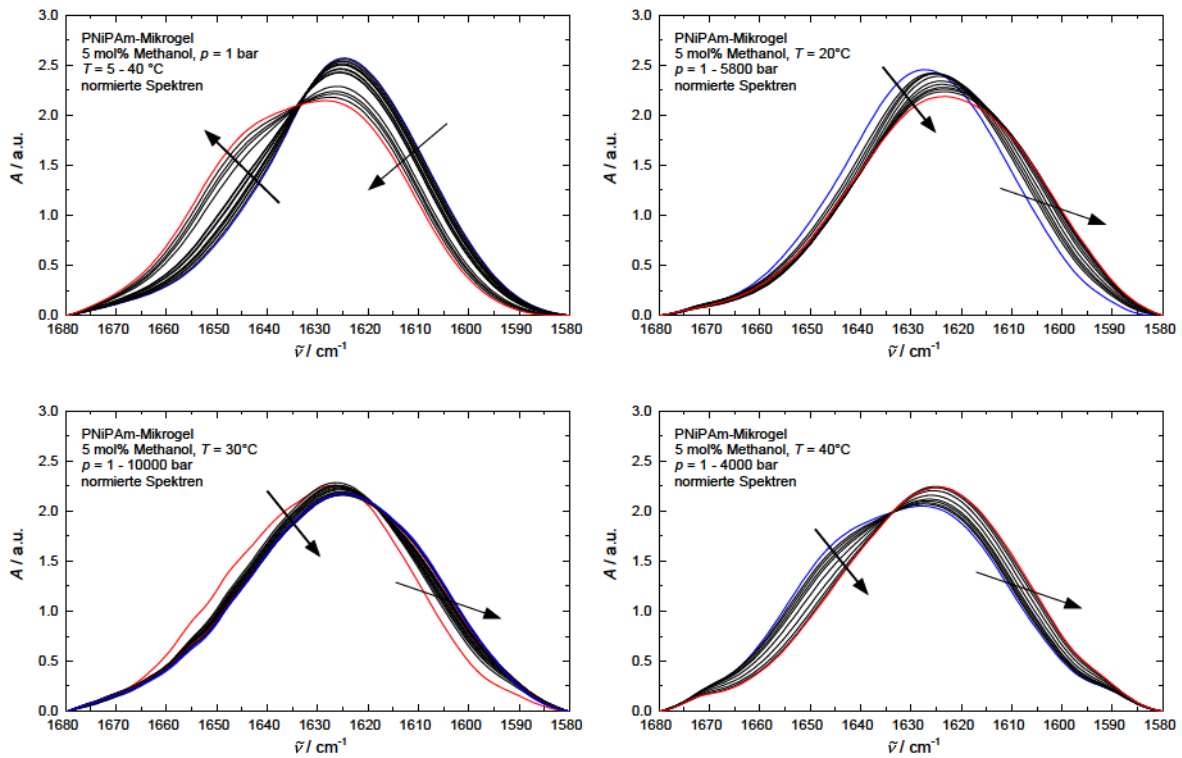


Abbildung 5.2: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 5 mol% CD₃OD in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

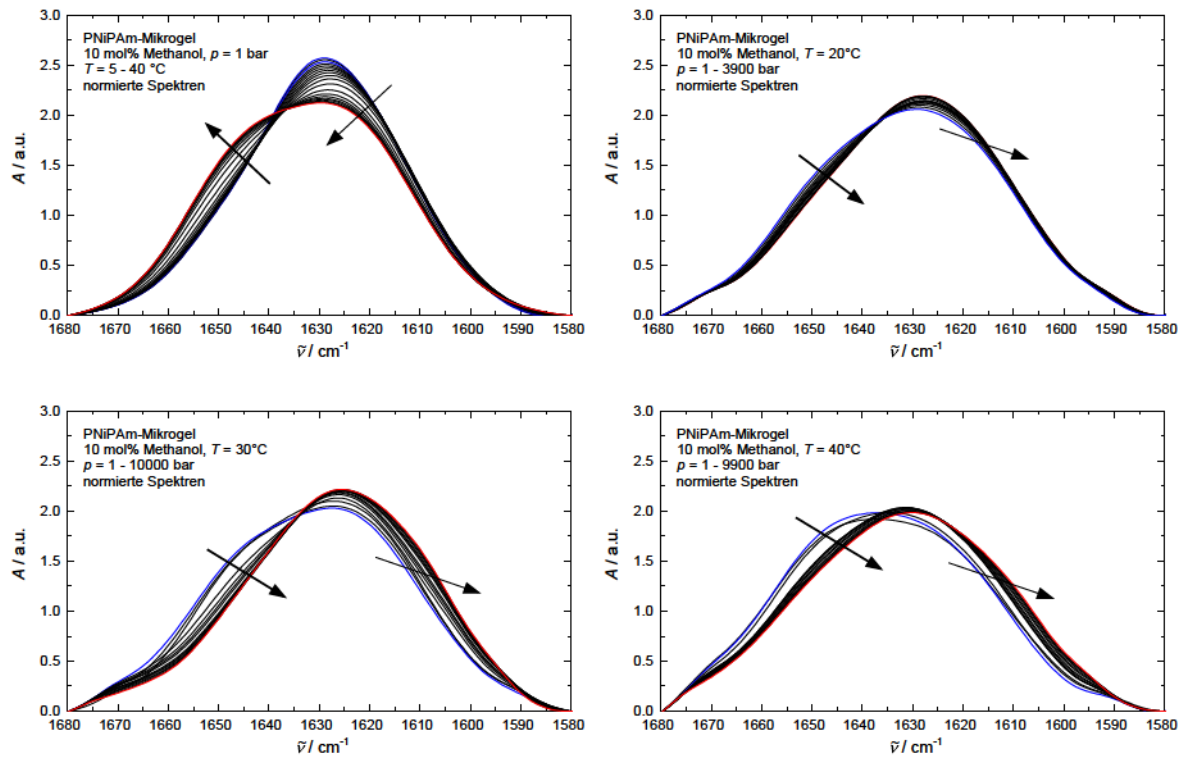


Abbildung 5.3: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 10 mol% CD_3OD in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

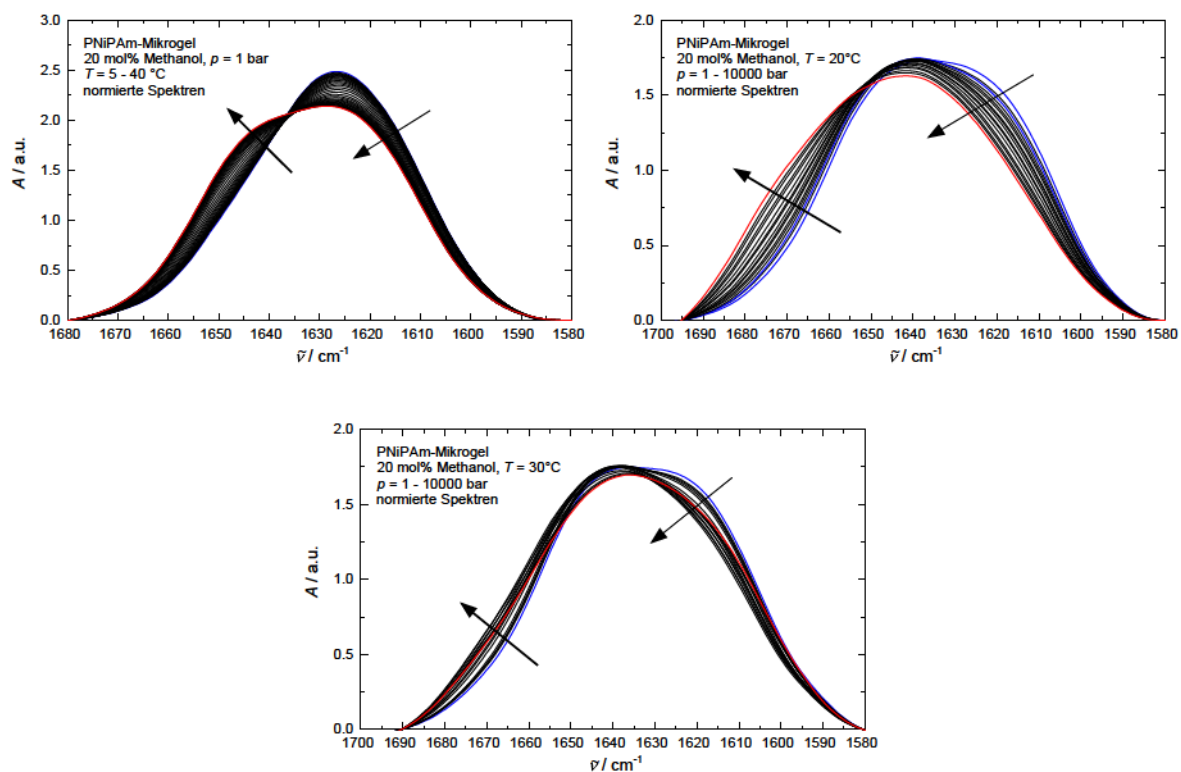


Abbildung 5.4: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 20 mol% CD₃OD in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

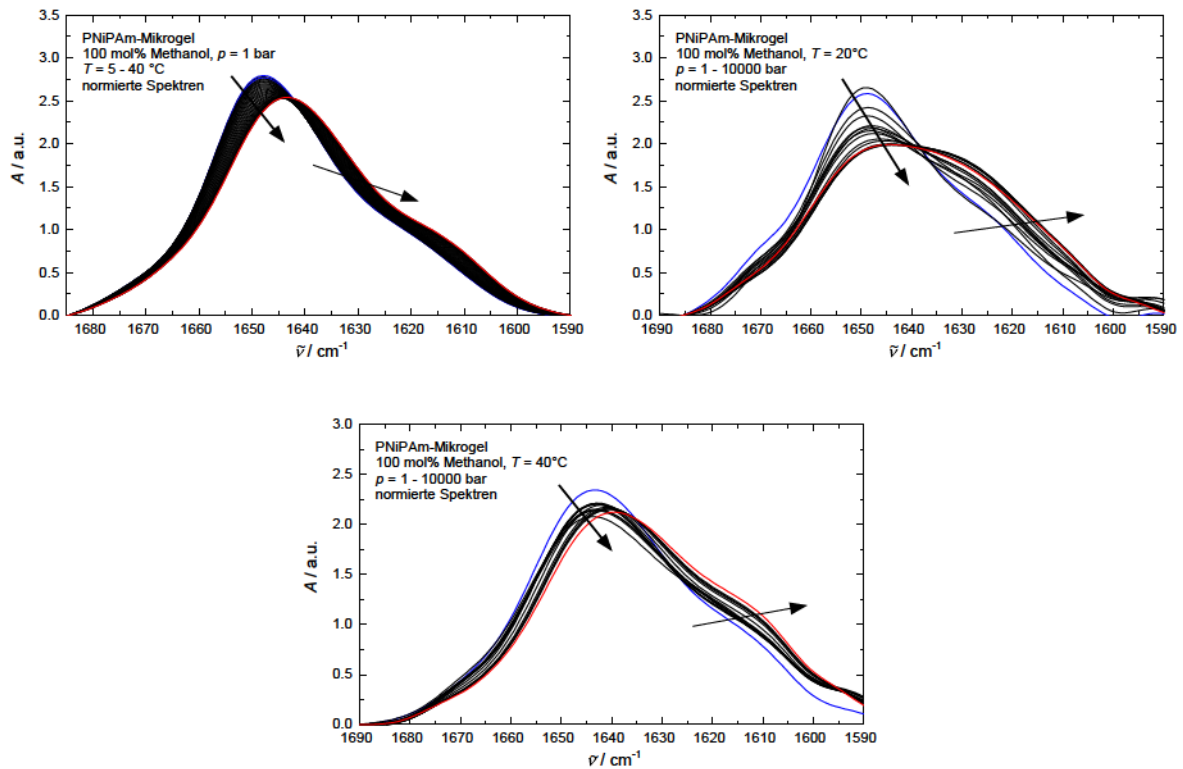


Abbildung 5.5: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PNIPAm-Mikrogels in 100 mol% CD_3OD in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

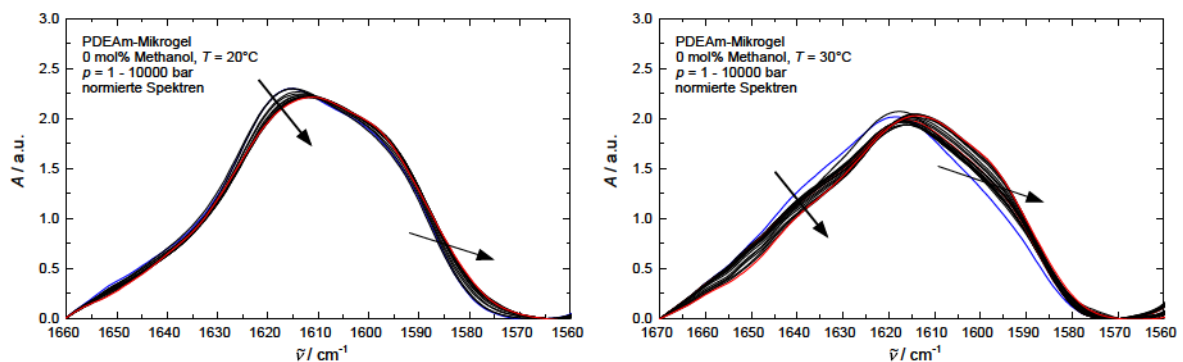


Abbildung 5.6: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in D_2O in Abhängigkeit des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei dem Start- bzw. Enddruck.

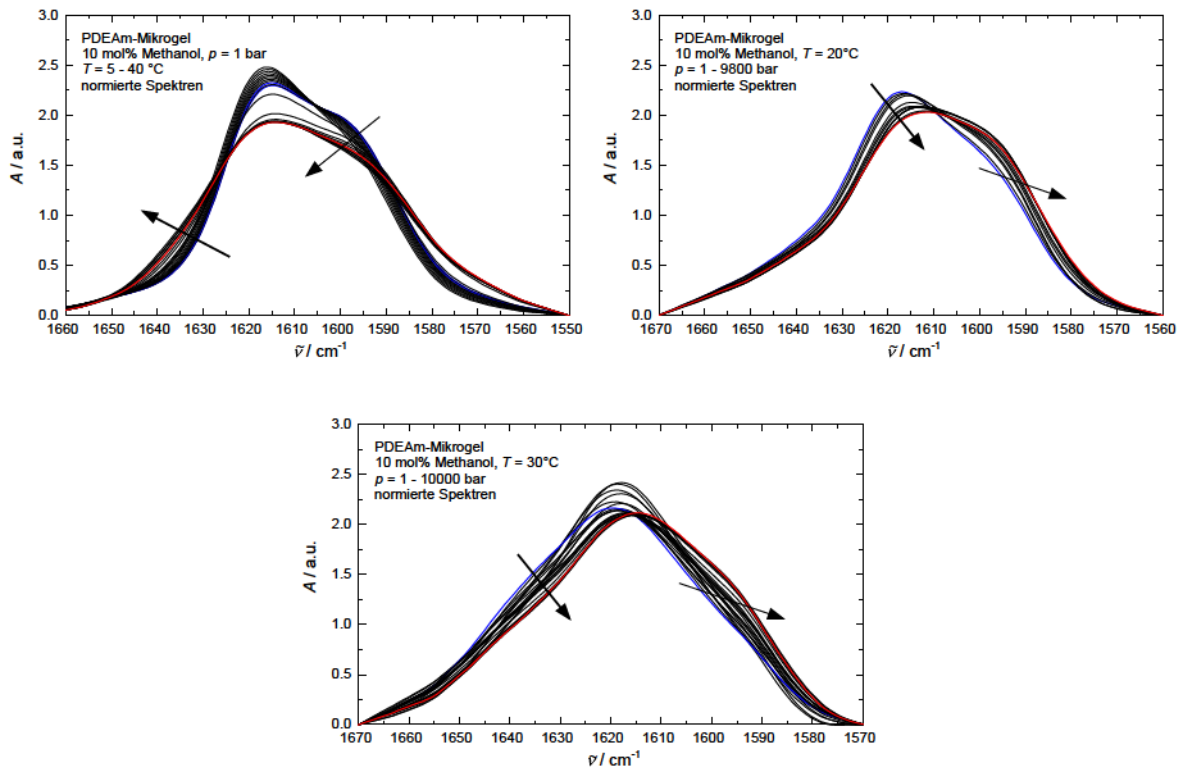


Abbildung 5.7: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in 10 mol% CD_3OD in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

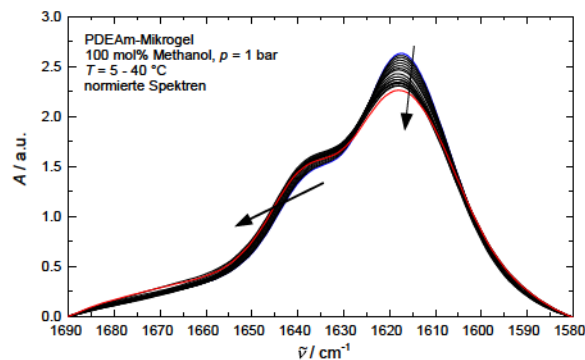


Abbildung 5.8: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PDEAm-Mikrogels in 100 mol% CD_3OD in Abhängigkeit der Temperatur. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Start- bzw. Endtemperatur.

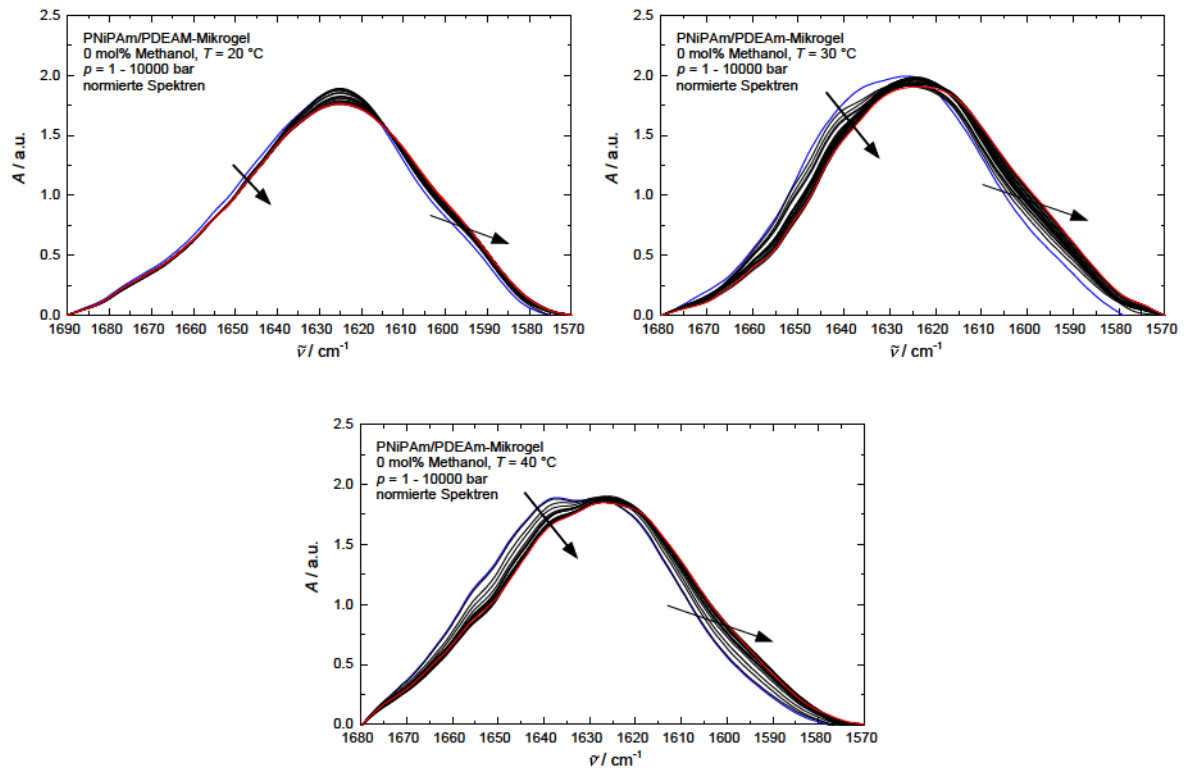


Abbildung 5.9: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in D₂O in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

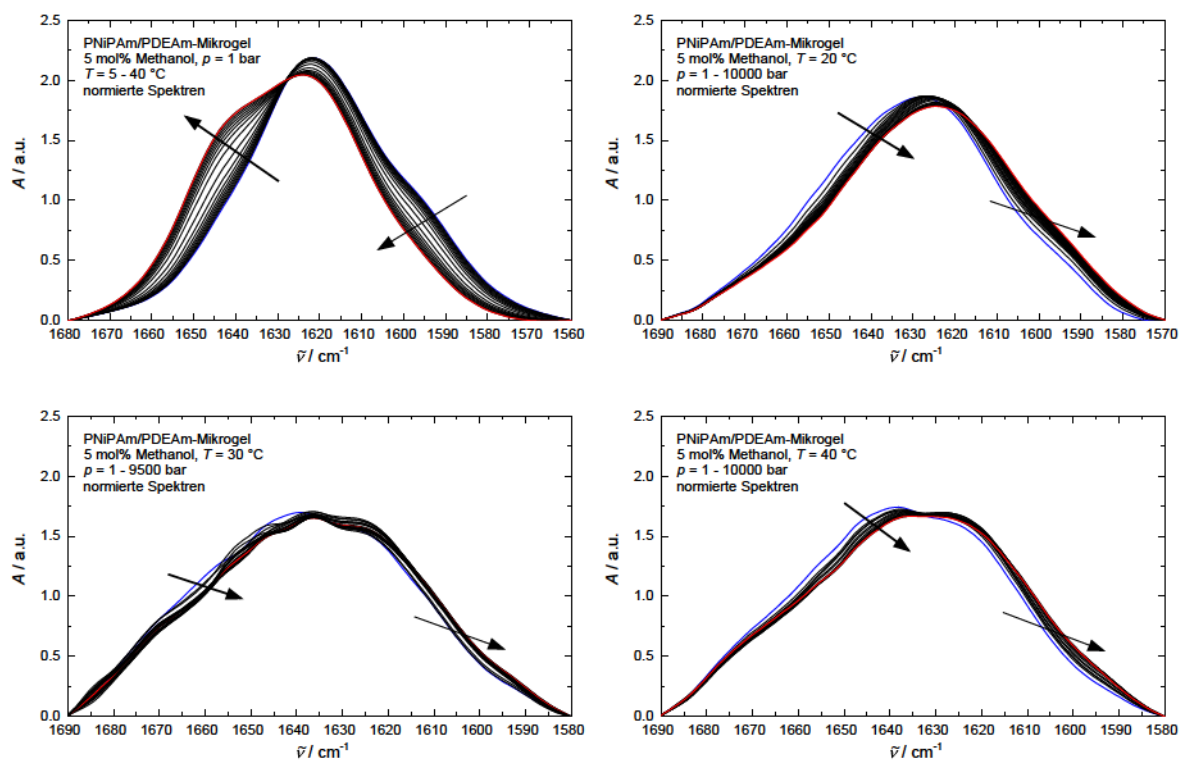


Abbildung 5.10: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 5 mol% CD_3OD in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

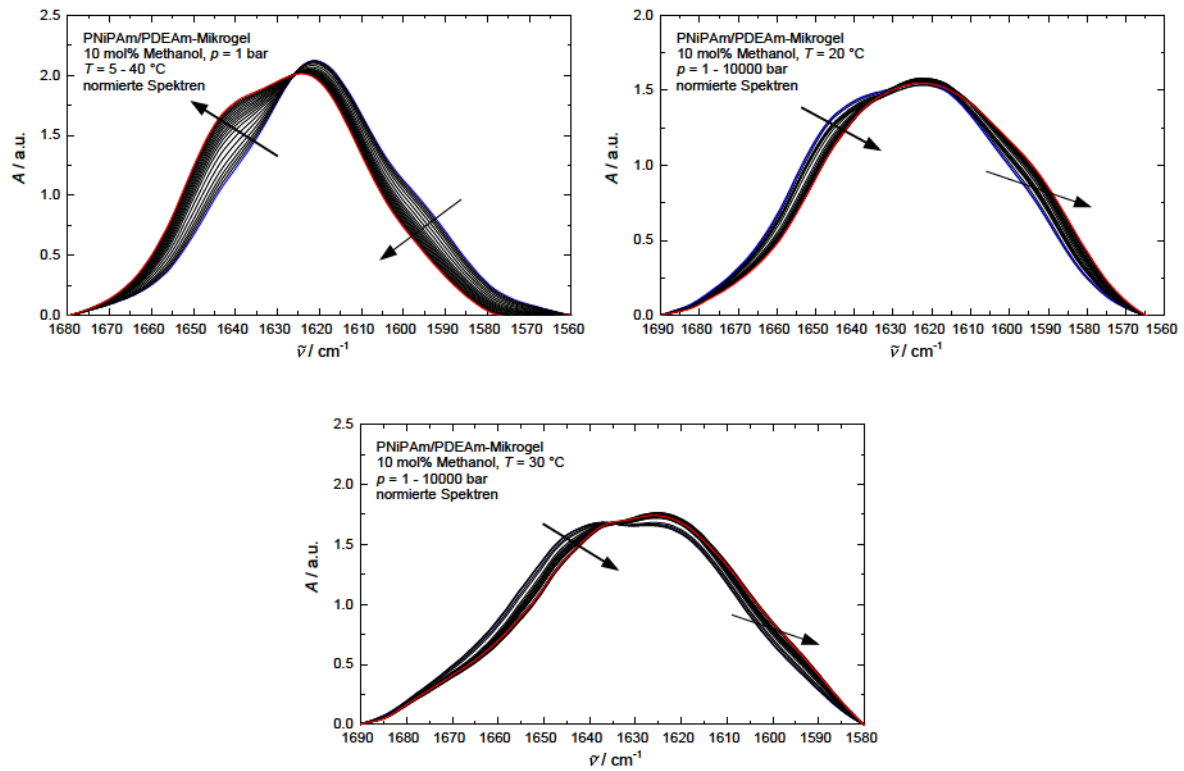


Abbildung 5.11: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 10 mol% CD₃OD in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

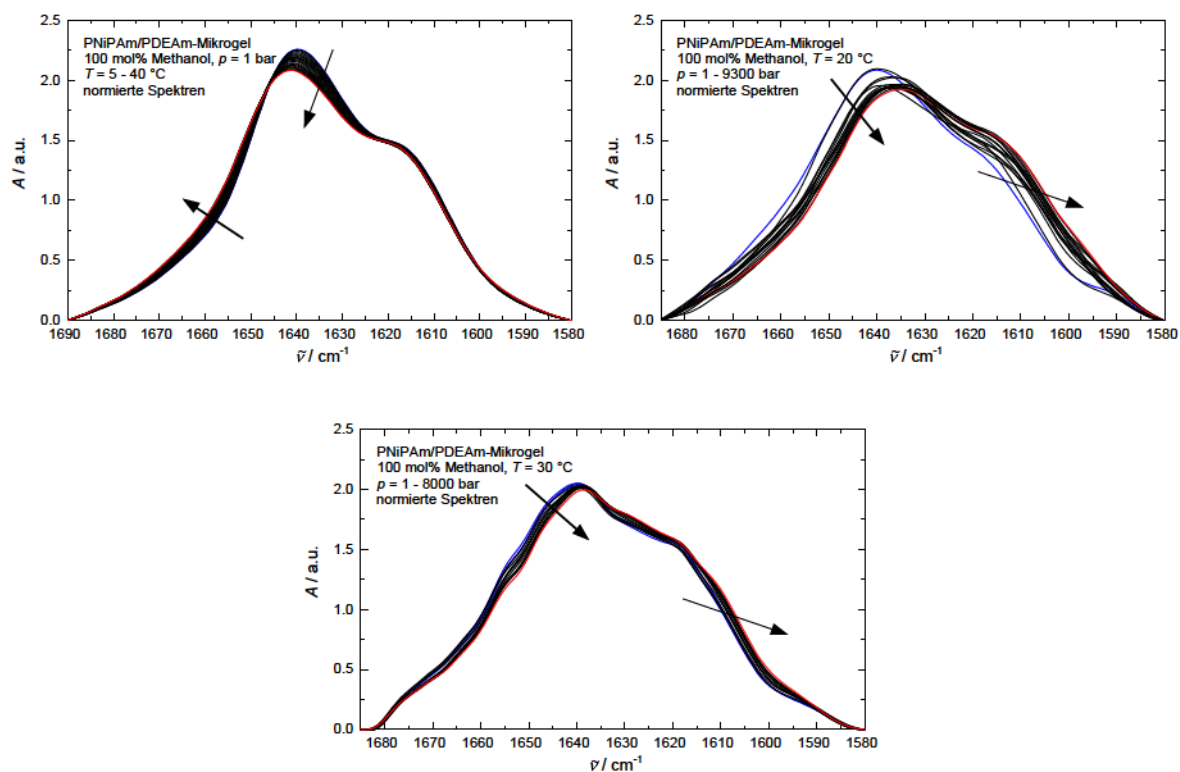


Abbildung 5.12: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des PNIPAm/PDEAm-Mikrogels in 100 mol% CD_3OD in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue und rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

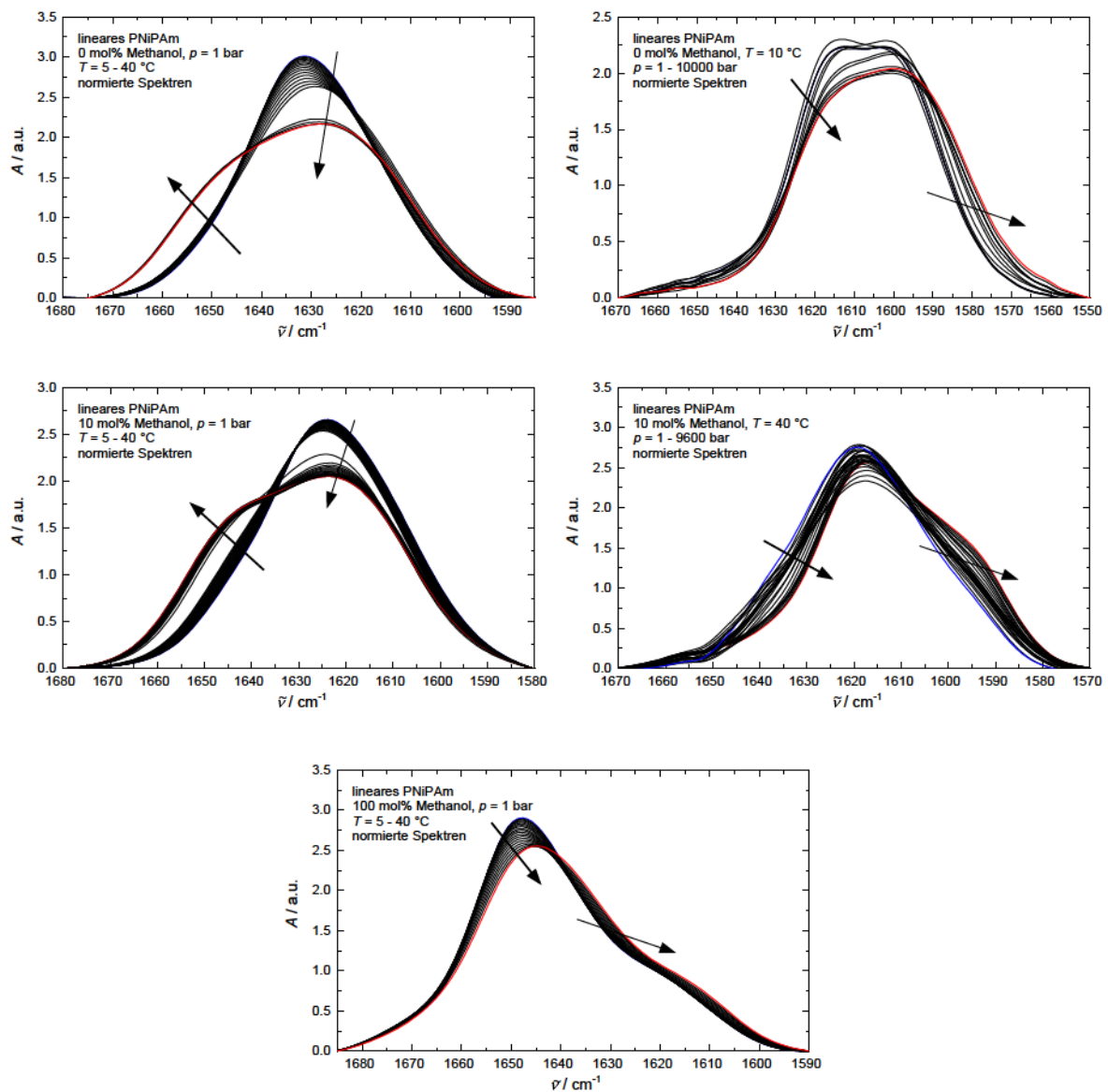


Abbildung 5.13: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande der linearen PNIPAm-Ketten bei verschiedenen Methanolkonzentrationen in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue bzw. rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

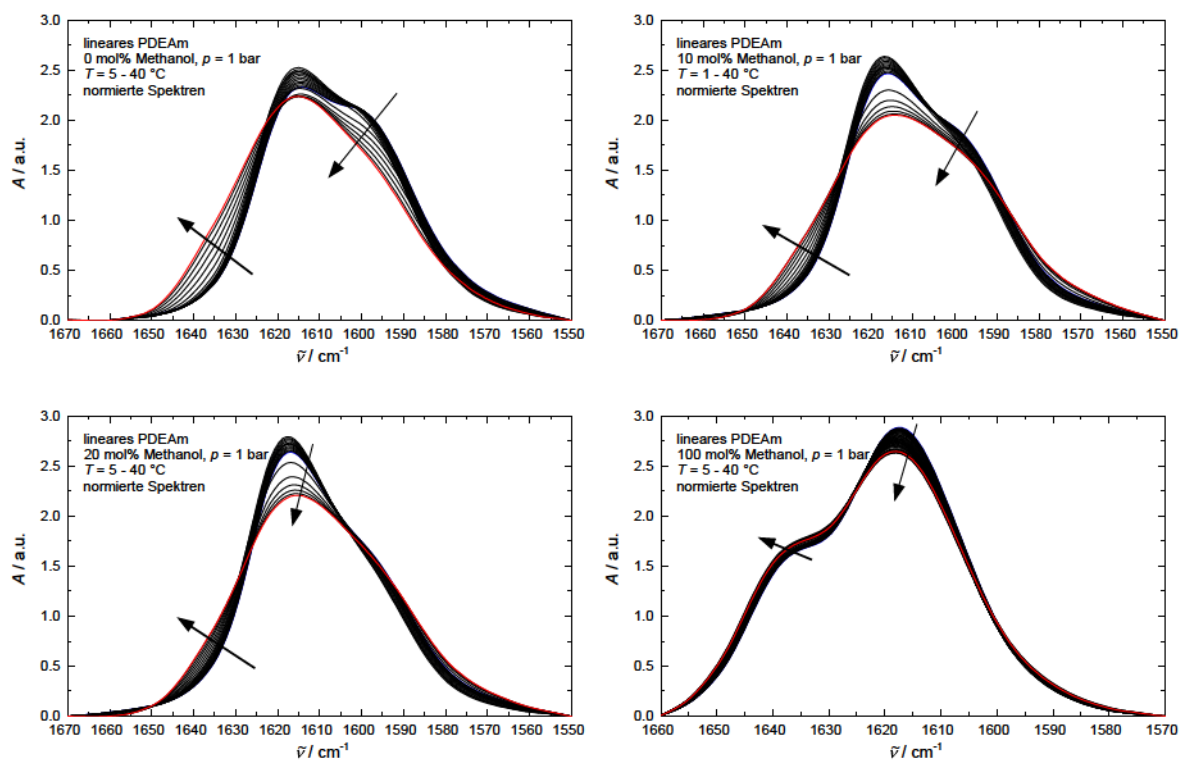


Abbildung 5.14: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande der linearen PDEAm-Ketten bei verschiedenen Methanolkonzentrationen in Abhängigkeit der Temperatur. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue bzw. rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur bzw. Endtemperatur.

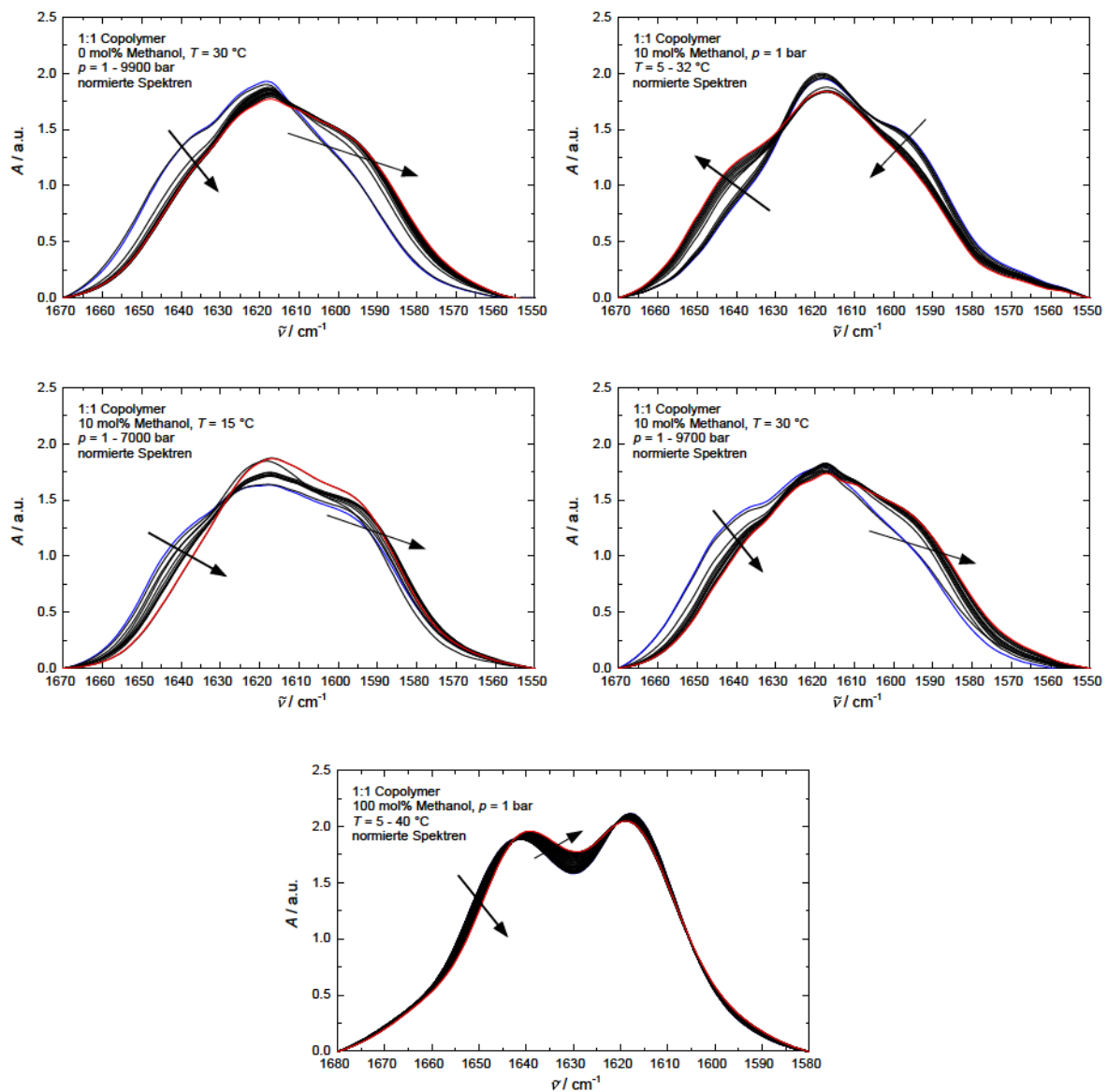


Abbildung 5.15: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des 1:1 Copolymers bei verschiedenen Methanolkonzentrationen in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue bzw. rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

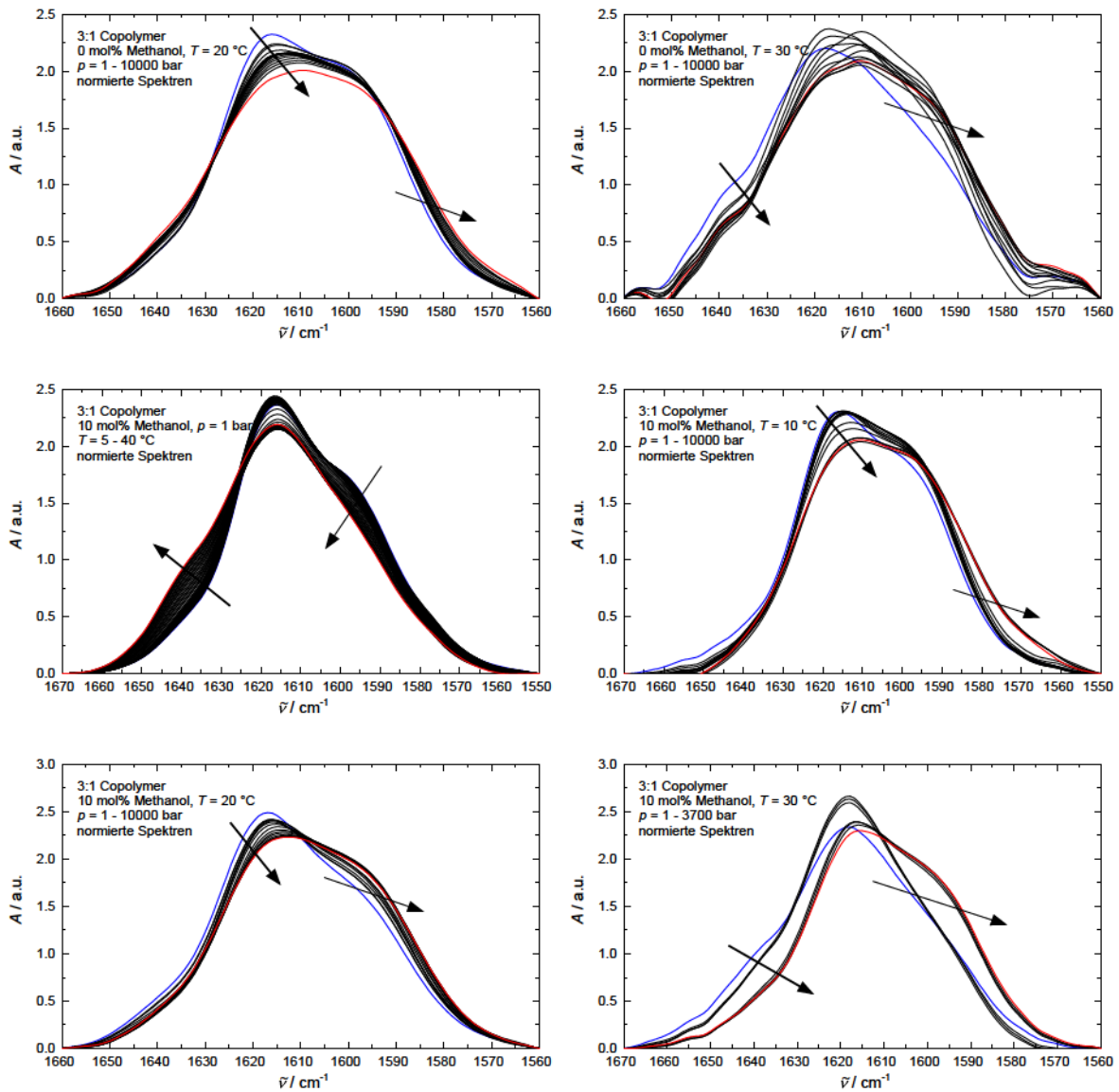


Abbildung 5.16: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymers bei verschiedenen Methanolkonzentrationen in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue bzw. rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

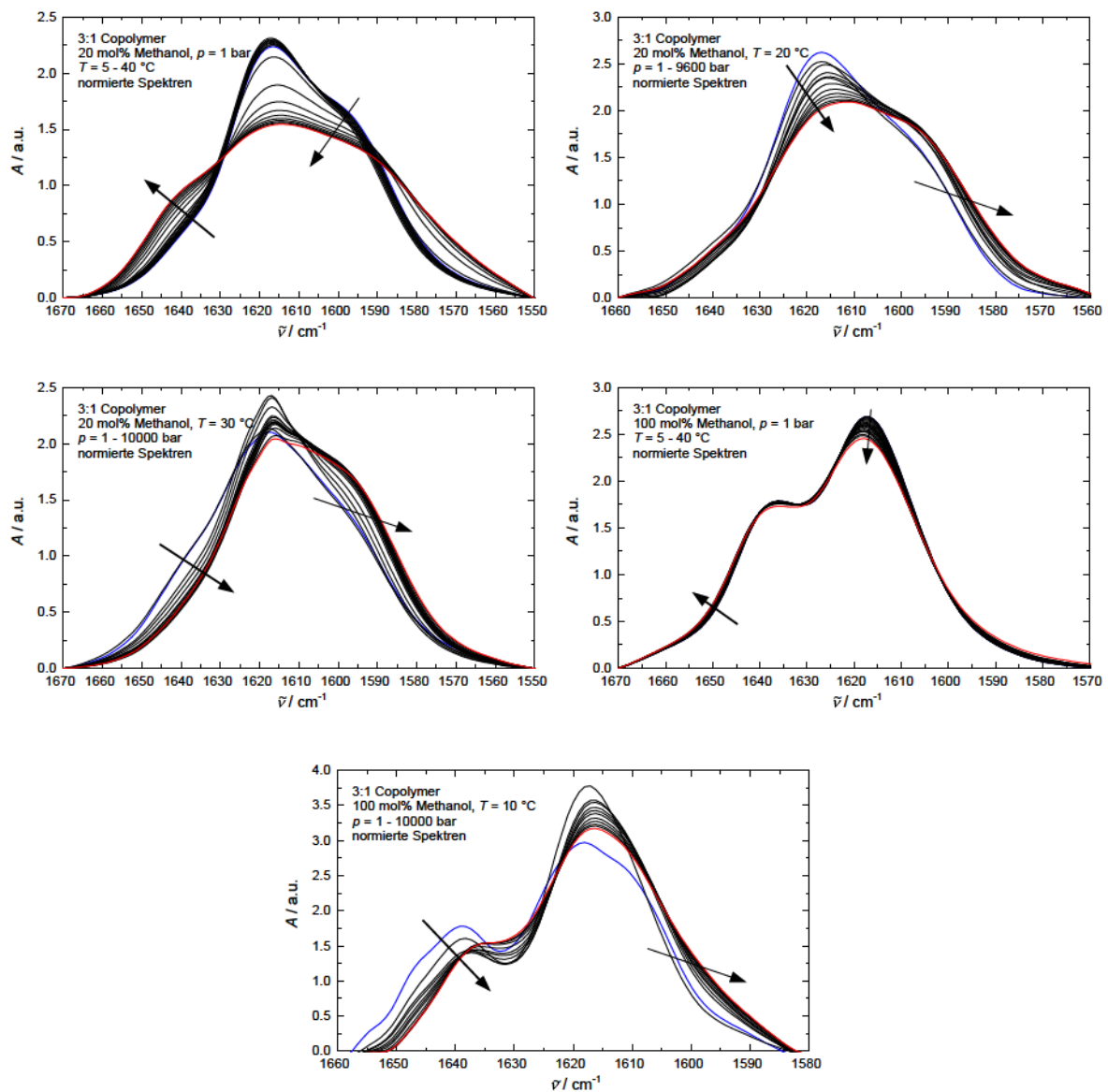


Abbildung 5.17: Normierte FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymers bei verschiedenen Methanolkonzentrationen in Abhängigkeit der Temperatur bzw. des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Der Verlauf der Spektren wird durch die Pfeile verdeutlicht. Die blaue bzw. rote Kurve kennzeichnen das Spektrum bei der Starttemperatur/-druck bzw. Endtemperatur/-druck.

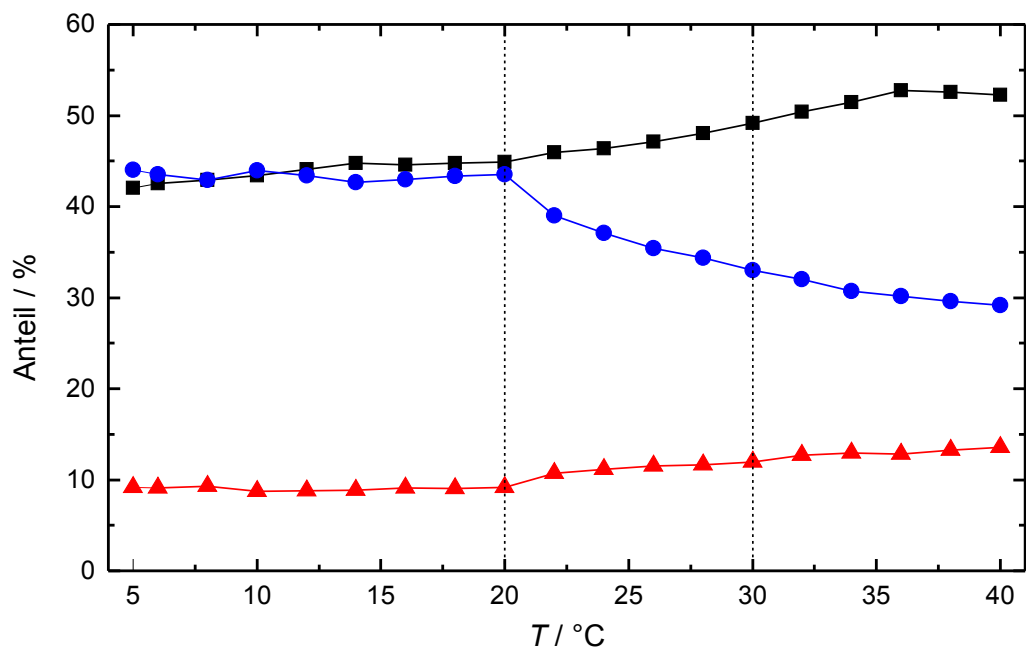


Abbildung 5.18: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymers in 20 mol% CD₃OD in einem Temperaturintervall zwischen 5 °C und 40 °C (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich). Die gestrichelten Linien zeigen die Temperaturen der korrespondierenden Druck-FTIR-Messungen an.

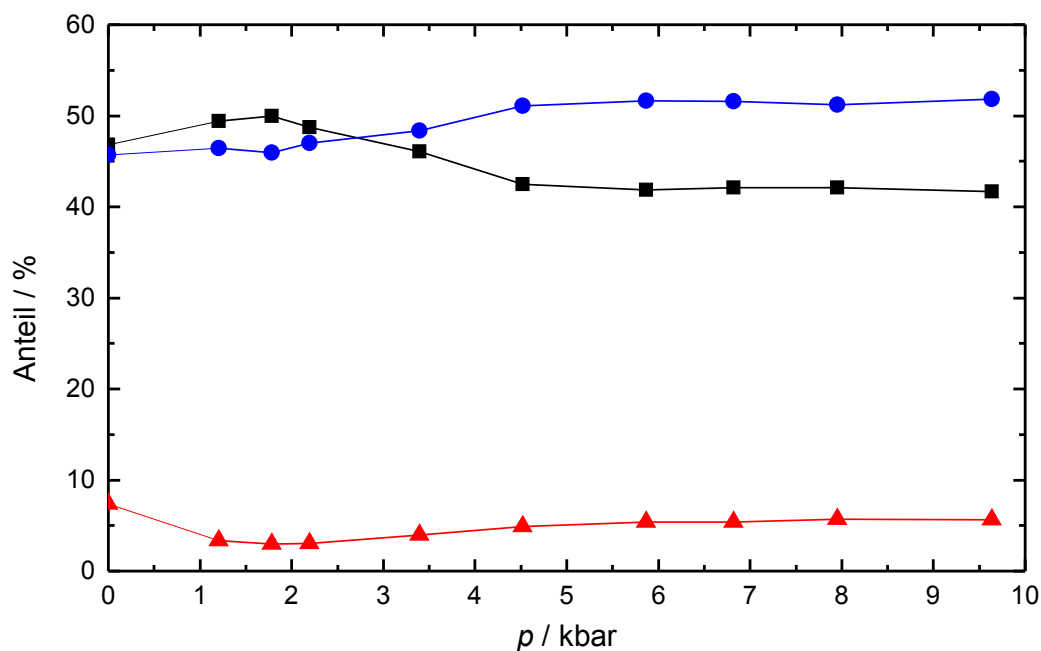


Abbildung 5.19: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymers in 20 mol% CD₃OD bei 20 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 9.6 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

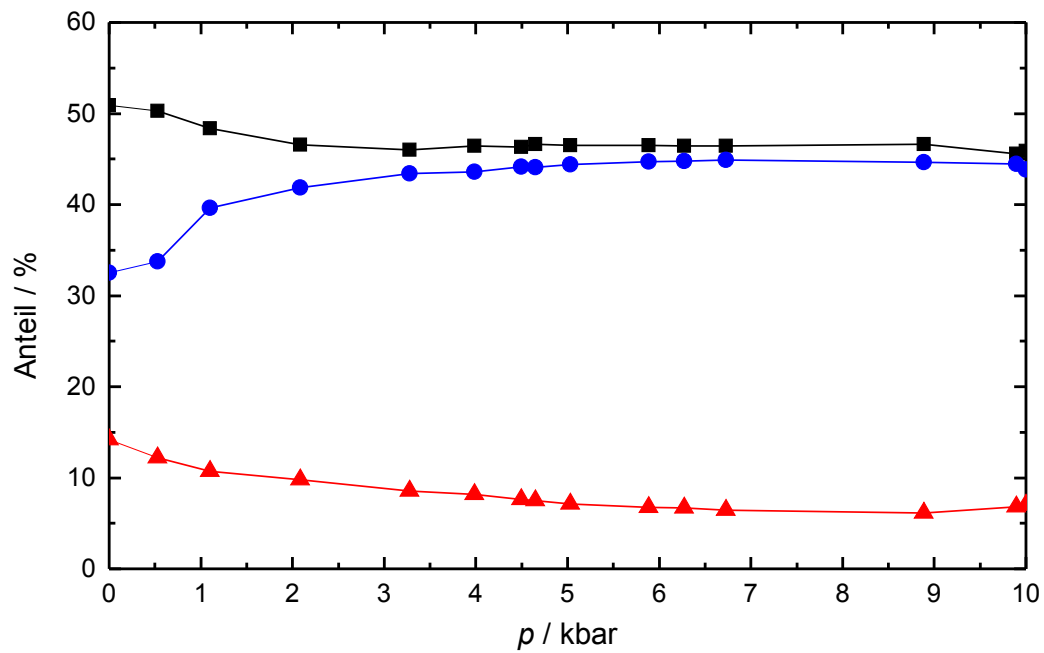


Abbildung 5.20: Subbandenanteile der Amid-I'-Bande des 3:1 Copolymers in 20 mol% CD₃OD bei 30 °C in einem Druckintervall zwischen 1 bar und 10 kbar (▲ hydrophober Bereich, ■ gemischt hydrophiler/hydrophober Bereich, ● hydrophiler Bereich).

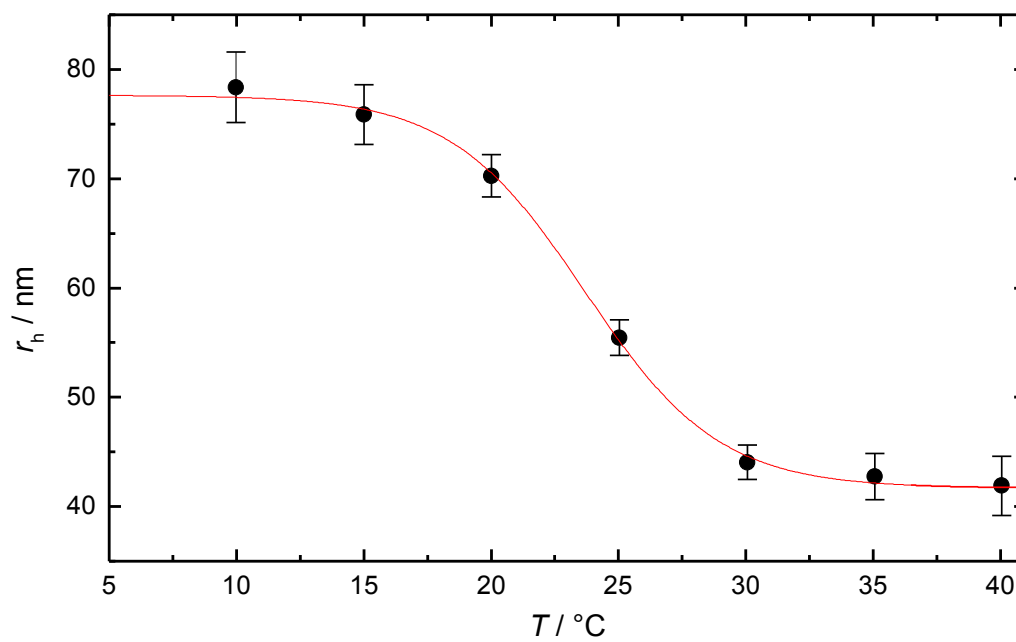


Abbildung 5.21: DLS-Messung des hydrodynamischen Radius r_h von PNiPAm in 10 mol% Methanol in Abhängigkeit der Temperatur.

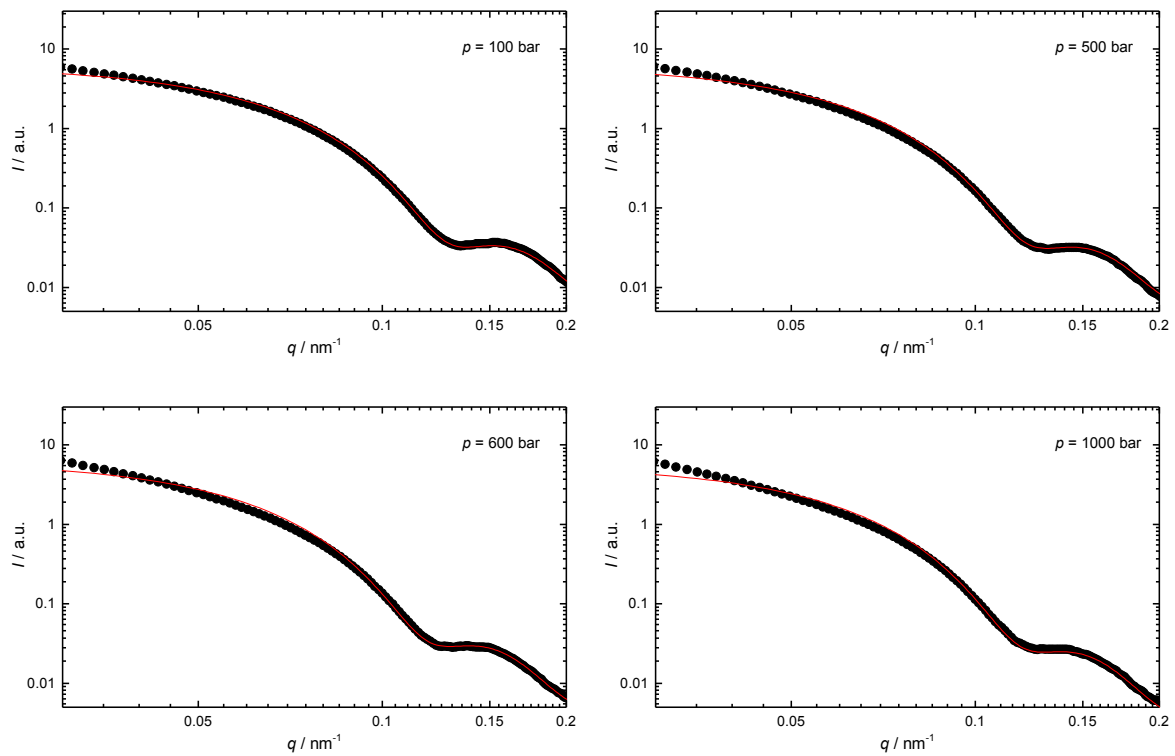


Abbildung 5.22: Röntgen-Kleinwinkelstreuukurven des PNIPAm-Mikrogels in 5 mol% Methanol bei 40 °C und unterschiedlichen Drücken. Die rote Kurve zeigt den Verlauf des Fits aus dem Modell von *Stieger*.^[126]

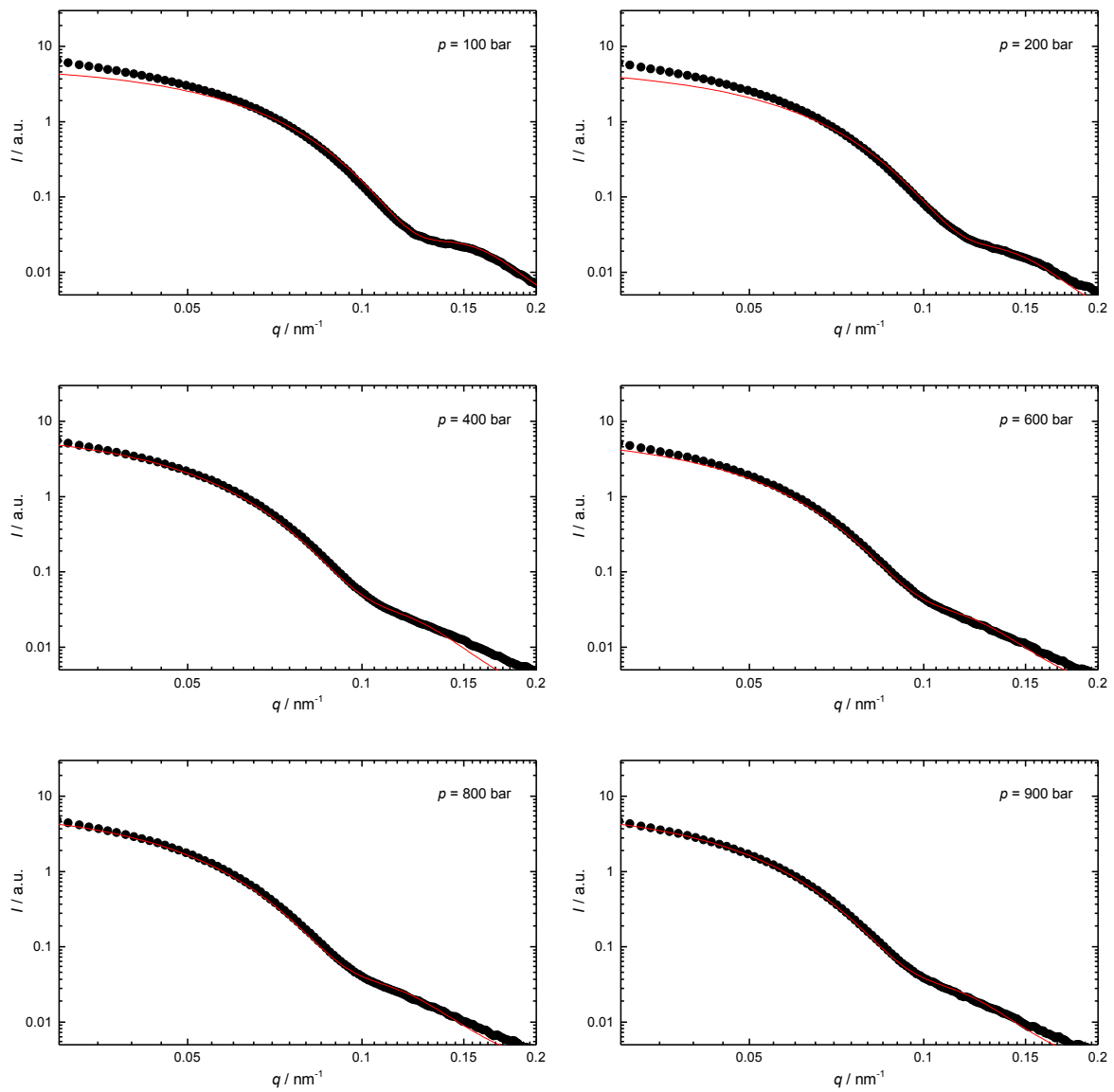


Abbildung 5.23: Röntgen-Kleinwinkelstreuungen des PNiPAm-Mikrogels in 10 mol% Methanol bei 30 °C und unterschiedlichen Drücken. Die rote Kurve zeigt den Verlauf des Fits aus dem Modell von *Stieger*.^[126]

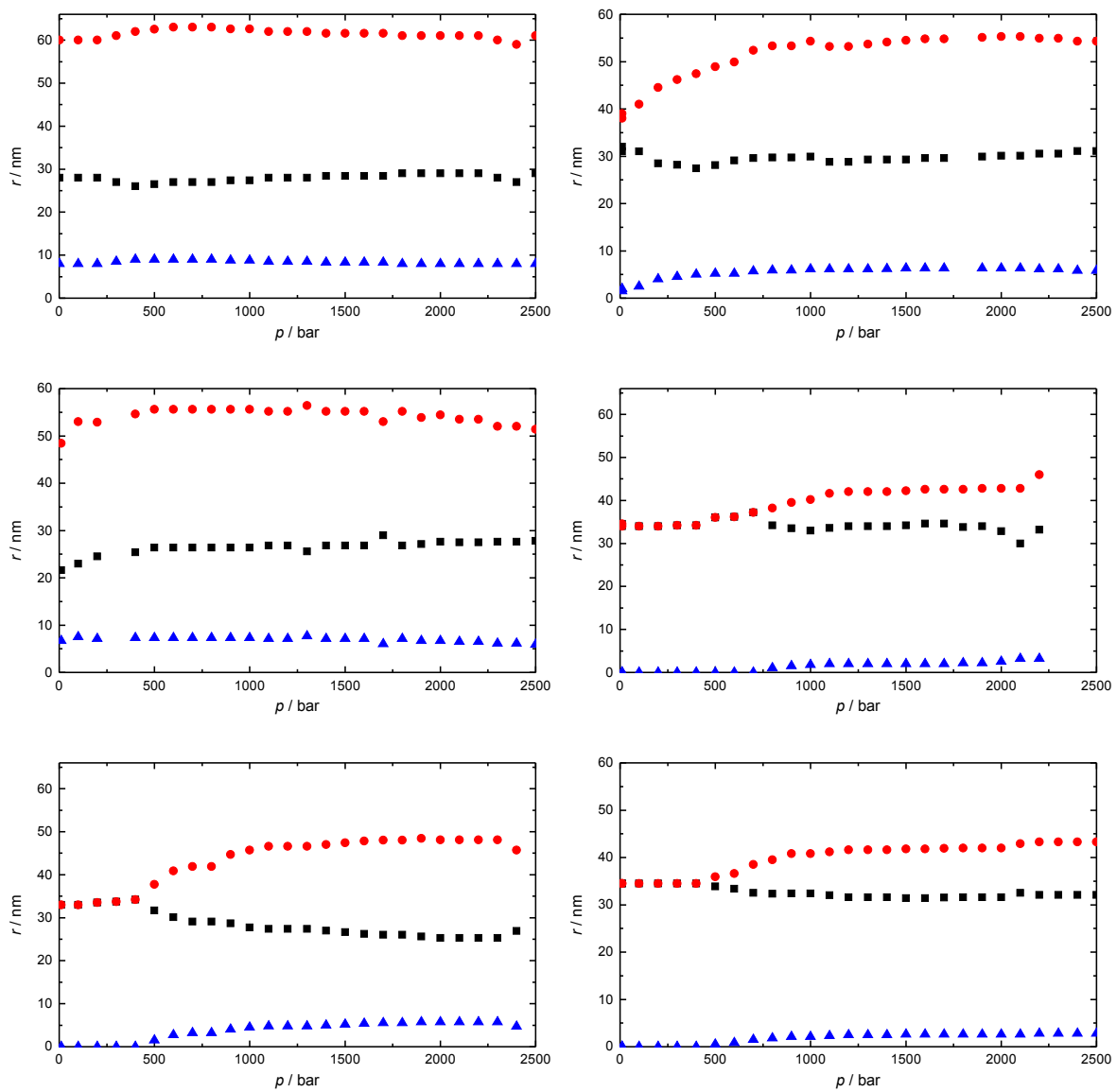


Abbildung 5.24: Ergebnisse der Funktionsanpassung aus dem Modell von *Stieger* für das PNIPAM-Mikrogel in 5 mol% Methanol (links) bei 20 °C (oben), 30 °C (mittig) sowie 40 °C (unten) und in 20 mol% Methanol (rechts) bei 10 °C (oben), 40 °C (mittig) sowie 50 °C (unten) in Abhängigkeit des Drucks (\bullet r_{tot} , \blacksquare r_{box} , \blacktriangle σ_{surf}).

Literaturverzeichnis

- [1] C. Czeslik, H. Seemann, R. Winter, *Basiswissen Physikalische Chemie*, Vieweg+Teubner-Verlag, Wiesbaden, **2010**.
- [2] R. Eggers, *Industrial High Pressure Applications*, Wiley-Verlag, Weinheim, **2012**.
- [3] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chemical Society Reviews* **2006**, 35(10), 858–875.
- [4] A. Yayanos, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, 83(24), 9542–9546.
- [5] F. M. Lauro, D. H. Bartlett, *Extremophiles* **2008**, 12, 15–25.
- [6] M. L. Sogin, H. G. Morrison, J. A. Huber, W. D. Mark, S. M. Huse, P. R. Neal, J. M. Arrieta, G. J. Herndl, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103(32), 12115–12120.
- [7] P. M. Oger, M. Jebbar, *Research in Microbiology* **2010**, 161(10), 799–809.
- [8] R. J. Menzies, R. Y. George, G. T. Rowe, *Abyssal Environment and Ecology of the World Oceans*, Wiley-Verlag, New York, **1973**.
- [9] R. Ellis, *Deep Atlantic: Life, Death, and Exploration in the Abyss*, Lyons Press, Guilford, **1998**.
- [10] O. V. Singh, *Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications*, Wiley-Verlag, New York, **2012**.
- [11] J. C. Cheftel, *Food Science and Technology International* **1995**, 1(2-3), 75–90.

- [12] A. M. Matser, B. Krebbers, R. W. van den Berg, P. V. Bartels, *Trends in Food Science & Technology* **2004**, *15*(2), 79–85.
- [13] V. Balasubramaniam, D. Farkas, *Food Science and Technology International* **2008**, *14*(5), 413–418.
- [14] A. Puig, P. Olmos, J. Quevedo, B. Guamis, S. Minguez, *Food Science and Technology International* **2008**, *14*(5), 5–11.
- [15] M. R. Adams, M. O. Moss, *Food Microbiology*, New Age International, New Dehli, **2009**.
- [16] F. J. Delgado, J. Delgado, J. González-Crespo, R. Cava, R. Ramírez, *Food Science and Technology International* **2013**, *19*(6), 493–501.
- [17] A. Brown, *Understanding Food: Principles and Preparation*, Cengage Learning, Andover, **2014**.
- [18] R. Jank, AiF 16007 N Funktionalisierung von Getreidemahlprodukten aus Weizen durch Anwendung von Hochdruck, *Techn. Ber.*, Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn, **2011**.
- [19] M. Südbeck, AiF 16263 N Hochdruckbehandlung mariniertes Geflügelfleischprodukte zur Verbesserung der Haltbarkeit sowie der Produkt- und Absatzsicherheit, *Techn. Ber.*, Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn, **2012**.
- [20] H. Günzler, H. M. Heise, *IR-Spektroskopie*, VCH-Verlag, Weinheim, **1996**.
- [21] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer-Verlag, Heidelberg, **1998**.
- [22] J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Wiley-Verlag, Chichester, **2001**.
- [23] H. P. Latscha, G. W. Linti, H. A. Klein, *Analytische Chemie*, Springer Verlag, Heidelberg, **2003**.

-
- [24] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme-Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [25] A. Barth, *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, 1767(9), 1073–1101.
- [26] P. R. Griffiths, J. A. De Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Wiley-Verlag, Chichester, **2007**.
- [27] A. L. Stancik, E. B. Brauns, *Vibrational Spectroscopy* **2008**, 47(1), 66–69.
- [28] E. Li-Chan, J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, *Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science*, Wiley-Verlag, Chichester, **2010**.
- [29] E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, *Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen*, Springer-Verlag, Heidelberg, **2010**.
- [30] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Vieweg+Teubner-Verlag, Wiesbaden, **2011**.
- [31] P. R. Griffiths, G. L. Pariente, *Trends in Analytical Chemistry* **1986**, 5(8), 209–215.
- [32] H. H. Mantsch, D. J. Moffatt, H. L. Casal, *Journal of Molecular Structure* **1988**, 173, 285–298.
- [33] P. B. Tooke, *Trends in Analytical Chemistry* **1988**, 7(4), 130–136.
- [34] A. Savitzky, M. J. E. Golay, *Analytical Chemistry* **1964**, 36(8), 1627–1639.
- [35] C. E. Weir, E. R. Lippincott, A. Van Valkenburg, E. N. Bunting, *Journal of Research of the National Bureau of Standards-A* **1959**, 63 A, 55–62.
- [36] A. Van Valkenburg, *Review of Scientific Instruments* **1962**, 33(12), 1462.
- [37] A. Jayaraman, *Reviews of Modern Physics* **1983**, 55(1), 65–108.
- [38] J. R. Ferraro, *Vibrational spectroscopy at high external pressures: The diamond anvil cell*, Academic Press, New York, **1984**.

- [39] D. J. Dunstan, I. L. Spain, *Journal of Physics E: Scientific Instruments* **1989**, 22, 913–923.
- [40] I. L. Spain, D. J. Dunstan, *Journal of Physics E: Scientific Instruments* **1989**, 22, 923–933.
- [41] C. Czeslik, R. Malessa, R. Winter, G. Rapp, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A* **1996**, 368, 847–851.
- [42] A. Katrusiak, *Journal of Applied Crystallography* **1999**, 32(5), 1021–1023.
- [43] C. M. Edwards, I. S. Butler, *Coordination Chemistry Reviews* **2000**, 199, 1–53.
- [44] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie der Elemente*, Wiley-Verlag, Weinheim, **1990**.
- [45] P. T. T. Wong, D. J. Moffat, *Applied Spectroscopy* **1989**, 43(7), 1279–1281.
- [46] D. J. Siminovitch, P. T. Wong, H. H. Mantsch, *Biochemistry* **1987**, 26(12), 3277–3287.
- [47] A. Guinier, G. Fournet, *Small-Angle Scattering of X-Rays*, John Wiley & Sons, New York, **1955**.
- [48] O. Glatter, O. Kratky, *Small Angle X-Ray Scattering*, Academic Press, London, **1982**.
- [49] L. Feigin, D. I. Svergun, *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*, Plenum Press, New York, **1987**.
- [50] T. Zemb, P. Lindner, *Neutron, X-rays and Light. Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*, North Holland-Verlag, Amsterdam, **2002**.
- [51] D. I. Svergun, M. H. Koch, *Reports on Progress in Physics* **2003**, 66, 1735–1782.
- [52] C. D. Putnam, M. Hammel, G. L. Hura, J. A. Tainer, *Quarterly Reviews of Biophysics* **2007**, 1–89.
- [53] N. Stribeck, *X-Ray Scattering of Soft Matter*, Springer-Verlag, Heidelberg, **2007**.

-
- [54] J. Daillant, A. Gibaud, *X-ray and Neutron Reflectivity*, Springer-Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [55] J. Als-Nielsen, D. McMorrow, *Elements of Modern X-ray Physics*, Wiley-Verlag, **2011**.
- [56] D. I. Svergun, M. H. J. Koch, P. A. Timmins, R. P. May, *Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules*, Oxford University Press, Oxford, **2013**.
- [57] O. Glatter, *Journal of Applied Crystallography* **1977**, *10*, 415–421.
- [58] M. Kotlarchyk, S. Chen, *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*(5), 2461–2469.
- [59] H. Brumberger, *Modern Aspects of Small-Angle Scattering*, Springer-Verlag, Heidelberg, **1995**.
- [60] R. Winter, *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, *1595*(1-2), 160–184.
- [61] J. Bolze, T. Fujisawa, T. Nagao, K. Norisada, H. Saito, A. Naito, *Chemical Physics Letters* **2000**, *329*, 215–220.
- [62] T. Narayanan, O. Diat, P. Bösecke, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **2001**, *467-468*, 1005–1009.
- [63] M. Sztucki, <http://www.sztucki.de/SAXSutilities/>, **2014**.
- [64] S. V. Roth, R. Döhrmann, M. Dommach, M. Kuhlmann, I. Kröger, R. Gehrke, H. Walter, C. Schroer, B. Lengeler, P. Müller-Buschbaum, *Review of Scientific Instruments* **2006**, *77*(8), 085106–1–085106–7.
- [65] A. P. Hammersley, S. O. Svensson, M. Hanfland, A. N. Fitch, D. Häusermann, *High Pressure Research* **1996**, *14*, 235–248.

- [66] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, N. Javid, R. Winter, A. Al-Sawalmih, S. Yi, D. Raabe, M. Tolan, *Journal of Synchrotron Radiation* **2007**, *14*(Pt 3), 244–251.
- [67] J. Woenckhaus, R. Köhling, R. Winter, P. Thiyagarajan, S. Finet, *Review of Scientific Instruments* **2000**, *71*(10), 3895–3899.
- [68] J. Kraineva, R. A. Narayanan, E. Kondrashkina, P. Thiyagarajan, R. Winter, *Langmuir* **2005**, *21*(8), 3559–3571.
- [69] T. C. Poulter, *Physical Review* **1932**, *40*, 860–875.
- [70] H. C. Alt, J. Kalus, *Review of Scientific Instruments* **1982**, *53*(8), 1235–1239.
- [71] D. P. Shelton, *Review of Scientific Instruments* **1992**, *63*(8), 3978–3982.
- [72] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, M. Tolan, C. Royer, R. Winter, *ChemPhysChem* **2008**, *9*(18), 2809–2815.
- [73] N. J. Brooks, B. L. L. E. Gauthe, N. J. Terrill, S. E. Rogers, R. H. Templer, O. Ces, J. M. Seddon, *Review of Scientific Instruments* **2010**, *81*(6), 064103–1–064103–10.
- [74] S. Grobelny, C. H. Hofmann, M. Erlkamp, F. A. Plamper, W. Richtering, R. Winter, *Soft Matter* **2013**, *9*(25), 5862–5866.
- [75] C. H. Hofmann, S. Grobelny, M. Erlkamp, R. Winter, W. Richtering, *Polymer* **2014**, *55*(8), 2000–2007.
- [76] M. Kano, E. Kokufuta, *Langmuir* **2009**, *25*(15), 8649–8655.
- [77] S. Ito, *Kobunshi Ronbunshu* **1989**, *46*, 437–443.
- [78] H. G. Schild, *Progress in Polymer Science* **1992**, *17*, 163–249.
- [79] Y. Ding, X. Ye, G. Zhang, *Macromolecules* **2005**, *38*, 904–908.
- [80] X. Pang, S. Cui, *Langmuir* **2013**, *29*(39), 12176–12182.
- [81] S. Fujishige, *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*(8), 3311–3313.

-
- [82] X. Wang, X. Qiu, C. Wu, *Macromolecules* **1998**, *31*(1), 2972–2976.
- [83] R. Pelton, *Advances in Colloid and Interface Science* **2000**, *85*(1), 1–33.
- [84] A. Pich, W. Richtering, *Advances in Polymer Science* **2010**, *234*, 1–37.
- [85] C. Wu, S. Zhou, *Macromolecules* **1997**, *30*, 574–576.
- [86] K. Kratz, T. Hellweg, W. Eimer, *Polymer* **2001**, *42*(15), 6631–6639.
- [87] W. Richtering, A. Pich, *Soft Matter* **2012**, *8*(45), 11423–11430.
- [88] S. Nayak, L. A. Lyon, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*(47), 7686–708.
- [89] N. Lu, K. Yang, J. Li, Y. Weng, B. Yuan, Y. Ma, *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117*(33), 9677–9682.
- [90] S. Wiese, A. C. Spiess, W. Richtering, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*(2), 576–579.
- [91] S. Sun, P. Wu, *Macromolecules* **2010**, *43*(22), 9501–9510.
- [92] N. Al-Manasir, K. Zhu, A.-L. Kjoniksen, K. D. Knudsen, G. Karlsson, B. Nyström, *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*(32), 11115–11123.
- [93] E. Kato, *The Journal of Chemical Physics* **1997**, *106*(9), 3792–3797.
- [94] S. Kunugi, K. Kameyama, T. Tada, N. Tanaka, M. Shibayama, M. Akashi, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2005**, *38*(8), 1233–1238.
- [95] M. Pühse, M. Keerl, C. Scherzinger, W. Richtering, R. Winter, *Polymer* **2010**, *51*(16), 3653–3659.
- [96] M. Keerl, V. Smirnovas, R. Winter, W. Richtering, *Macromolecules* **2008**, *41*(18), 6830–6836.
- [97] F. Meersman, J. Wang, Y. Wu, K. Heremans, *Macromolecules* **2005**, *38*, 8923–8928.

- [98] M. Reinhardt, J. Dzubiella, M. Trapp, P. Gutfreund, M. Kreuzer, A. H. Gröschel, A. H. E. Müller, M. Ballauff, R. Steitz, *Macromolecules* **2013**, 6541–6547.
- [99] H. G. Schild, M. Muthukumar, D. A. Tirrell, *Macromolecules* **1991**, 948–952.
- [100] F. M. Winnik, *Macromolecules* **1990**, *23*, 2415–2416.
- [101] S. Hirotsu, *The Journal of Chemical Physics* **1988**, *88*(1), 427–431.
- [102] T. Amiya, Y. Hirokawa, Y. Hirose, Y. Li, T. Tanaka, *The Journal of Chemical Physics* **1987**, *86*(4), 2375–2379.
- [103] H. M. Crowther, B. Vincent, *Colloid & Polymer Science* **1998**, *276*, 46–51.
- [104] K. Mukae, M. Sakurai, S. Sawamura, K. Makino, S. W. Kim, I. Ueda, K. Shirahama, *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 737–741.
- [105] K. Mukae, M. Sakurai, S. Sawamura, K. Makino, S. W. Kim, I. Ueda, K. Shirahama, *Colloid & Polymer Science* **1994**, *272*(6), 655–663.
- [106] S. Katayama, T. Tanaka, R. February, *Macromolecules* **1984**, *17*, 2641–2643.
- [107] K. Zhou, Y. Lu, J. Li, L. Shen, G. Zhang, Z. Xie, C. Wu, *Macromolecules* **2008**, *41*(22), 8927–8931.
- [108] M. Keerl, V. Smirnovas, R. Winter, W. Richtering, *Angewandte Chemie* **2008**, *120*(2), 344–347.
- [109] Y. Maeda, J. Sakamoto, S. Wang, Y. Mizuno, *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*(37), 12456–12461.
- [110] E. Tiktopulo, V. Uversky, V. Lushchik, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7519–7524.
- [111] S. Dixit, J. Crain, W. C. K. Poon, J. L. Finney, A. K. Soper, *Nature* **2002**, *416*(6883), 829–832.
- [112] G. Zhang, C. Wu, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1376–1380.
- [113] M. C. Arndt, G. Sadowski, *Macromolecules* **2012**, *45*(16), 6686–6696.

-
- [114] J. Walter, J. Sehart, J. Vrabec, H. Hasse, *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*(17), 5251–5259.
- [115] H. Kojima, F. Tanaka, *Soft Matter* **2012**, *8*(10), 3010–3020.
- [116] C. H. Hofmann, F. A. Plamper, C. Scherzinger, S. Hietala, *Macromolecules* **2013**, *46*, 523–532.
- [117] C. Scherzinger, P. Lindner, M. Keerl, W. Richtering, *Macromolecules* **2010**, *43*(16), 6829–6833.
- [118] Y. Maeda, T. Nakamura, I. Ikeda, *Macromolecules* **2002**, *35*, 10172–10177.
- [119] Y. Maeda, T. Higuchi, I. Ikeda, *Langmuir* **2000**, *16*, 7503–7509.
- [120] Y. Katsumoto, T. Tanaka, H. Sato, Y. Ozaki, *The Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106*, 3429–3435.
- [121] Y. Katsumoto, T. Tanaka, K. Ihara, M. Koyama, Y. Ozaki, *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*(44), 12730–12737.
- [122] Y. Maeda, T. Nakamura, I. Ikeda, *Macromolecules* **2001**, *34*, 1391–1399.
- [123] H. Kojima, F. Tanaka, C. Scherzinger, W. Richtering, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* **2013**, *51*(14), 1100–1111.
- [124] T. Eckert, W. Richtering, *The Journal of Chemical Physics* **2008**, *129*(12), 124902–1 – 124902–6.
- [125] J. J. Liétor-Santos, B. Sierra-Martín, U. Gasser, A. Fernández-Nieves, *Soft Matter* **2011**, *7*(14), 6370–6374.
- [126] M. Stieger, W. Richtering, J. S. Pedersen, P. Lindner, *The Journal of Chemical Physics* **2004**, *120*(13), 6197–6206.
- [127] M. Keerl, W. Richtering, *Colloid and Polymer Science* **2006**, *285*(4), 471–474.
- [128] X. Wu, R. H. Pelton, A. E. Hamielec, D. R. Woods, W. McPhee, *Colloid & Polymer Science* **1994**, *272*(4), 467–477.

- [129] K. Heremans, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **1982**, *11*, 1–21.
- [130] F. Sciortino, A. Geiger, H. E. Stanley, *Nature* **1991**, *354*, 218–221.
- [131] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* **2013**, *75*, 607–648.
- [132] F. Meersman, L. Smeller, K. Heremans, *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, *1764*(3), 346–354.
- [133] R. Winter, D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogtt, *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics* **2007**, *32*(1), 41–97.
- [134] R. Mishra, R. Winter, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*(35), 6518–6521.
- [135] S. Grobelny, M. Erlkamp, J. Möller, M. Tolan, R. Winter, *The Journal of Chemical Physics* **2014**.
- [136] L. Stagg, S.-Q. Zhang, M. S. Cheung, P. Wittung-Stafshede, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*(48), 18976–18981.
- [137] A. P. Minton, *Journal of Cell Science* **2006**, *119*(Pt 14), 2863–2869.
- [138] R. J. Ellis, *Current Opinion in Structural Biology* **2001**, *11*(1), 114–119.
- [139] R. J. Ellis, A. P. Minton, *Biological Chemistry* **2006**, *387*(5), 485–497.
- [140] R. J. Ellis, *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2007**, *594*, 1–13.
- [141] S. Zhao, H. Gies, R. Winter, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2007**, *221*(1), 139–154.
- [142] J. Koo, T. Gutberlet, C. Czeslik, *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*(20), 6292–6295.
- [143] M. Erlkamp, S. Grobelny, R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*, 5965–5976.

-
- [144] C. Haas, J. Drenth, *Journal of Crystal Growth* **1999**, *196*, 388–394.
- [145] N. Asherie, *Methods* **2004**, *34*(3), 266–272.
- [146] R. Ravindra, S. Zhao, H. Gies, R. Winter, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*(39), 12224–12225.
- [147] A. Stradner, H. Sedgwick, F. Cardinaux, W. C. K. Poon, S. U. Egelhaaf, P. Schurtenberger, *Nature* **2004**, *432*(7016), 492–495.
- [148] A. C. Dumetz, A. M. Chockla, E. W. Kaler, A. M. Lenhoff, *Biophysical Journal* **2008**, *94*(2), 570–583.
- [149] J. Seeliger, A. Werkmüller, R. Winter, *PLOS one* **2013**, *8*(7), e69652.
- [150] J. D. Gunton, A. Shiryayev, D. L. Pagan, *Protein Condensation*, Oxford University Press, Oxford, **2007**.
- [151] N. Javid, K. Vogtt, C. Krywka, M. Tolan, R. Winter, *ChemPhysChem : A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* **2007**, *8*(5), 679–689.
- [152] V. G. Taratuta, A. Holschbach, G. M. Thurston, D. Blankschtein, G. B. Benedek, *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 2140–2144.
- [153] M. Muschol, F. Rosenberger, *The Journal of Chemical Physics* **1997**, *107*(6), 1953–1962.
- [154] A. Ducruix, J. Guilloteau, M. Riès-Kautt, A. Tardieu, *Journal of Crystal Growth* **1996**, *168*(1-4), 28–39.
- [155] A. Tardieu, A. Le Verge, M. Malfois, F. Bonnete, S. Finet, M. Ries-Kautt, L. Belloni, *Journal of Crystal Growth* **1999**, *196*, 193–203.
- [156] J. Narayanan, X. Y. Liu, *Biophysical Journal* **2003**, *84*(1), 523–532.
- [157] G. Pellicane, D. Costa, C. Caccamo, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2003**, *15*, 375–384.

- [158] G. Pellicane, D. Costa, C. Caccamo, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2004**, *16*(42), S4923–S4936.
- [159] M. Niebuhr, M. H. J. Koch, *Biophysical Journal* **2005**, *89*(3), 1978–1983.
- [160] M. Schroer, J. Markgraf, D. Wieland, C. Sahle, J. Möller, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Physical Review Letters* **2011**, *106*(17), 178102–1–178102–4.
- [161] M. Schroer, Y. Zhai, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*(48), 11413–11416.
- [162] M. Schroer, M. Tolan, R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14*(26), 9486–9491.
- [163] J. Möller, M. Schroer, M. Erbkamp, S. Grobelny, M. Paulus, S. Tiemeyer, F. J. Wirkert, M. Tolan, R. Winter, *Biophysical journal* **2012**, *102*(11), 2641–2648.
- [164] A. J. Chinchalikar, V. K. Aswal, J. Kohlbrecher, A. G. Wagh, *Physical Review E* **2013**, *87*(6), 062708–1–062708–7.
- [165] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erbkamp, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Physical Review Letters* **2014**, *112*(2), 028101–1–028101–5.
- [166] M. Carpineti, R. Piazza, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*(7), 1506–1511.
- [167] D. C. Phillips, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1967**, *57*(3), 484–495.
- [168] P. Jolles, J. Jolles, *Molecular and Cellular Biochemistry* **1984**, *63*, 165–189.
- [169] C. M. Dobson, P. A. Evans, S. E. Radford, *Trends in Biochemical Sciences* **1994**, *19*(1), 31–37.
- [170] L. S. Ornstein, F. Zernike, *Proceedings of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences* **1914**, *17*, 793–806.

-
- [171] C. A. Croxton, *Introduction to Liquid State Physics*, Wiley-Verlag, London, **1975**.
- [172] J. Hansen, I. R. McDonald, *Theory of Simple Liquids*, Academic Press, London, **2006**.
- [173] M. J. Grimson, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* **1983**, 79(6), 817–832.
- [174] V. K. Kelkar, J. Narayanan, C. Manohar, *Langmuir* **1992**, (8), 2210–2214.
- [175] B. V. Derjaguin, L. V. Landau, *Acta Physicochimica USSR* **1941**, 14, 633–662.
- [176] E. J. W. Verwey, *The Journal of Chemical Physics* **1947**, 51(3), 631–636.
- [177] E. J. W. Verwey, J. T. G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, New York, **1948**.
- [178] J. J. Grigsby, H. W. Blanch, J. M. Prausnitz, *Biophysical Chemistry* **2001**, 91(3), 231–243.
- [179] Y. Liu, W.-R. Chen, S.-H. Chen, *The Journal of Chemical Physics* **2005**, 122(4), 44507–1–44507–13.
- [180] M. C. Abramo, C. Caccamo, D. Costa, G. Pellicane, R. Ruberto, U. Wanderlingh, *The Journal of Chemical Physics* **2012**, 136(3), 035103–1–035103–9.
- [181] R. C. Neumann, W. Kauzmann, A. Zipp, *Journal of Physical Chemistry* **1973**, 77(22), 2687–2691.
- [182] Y. Kitamura, T. Itoh, *Journal of Solution Chemistry* **1987**, 16(9), 715–725.
- [183] A. Bouchoux, P.-E. Cayemite, J. Jardin, G. Gésan-Guiziou, B. Cabane, *Biophysical Journal* **2009**, 96(2), 693–706.
- [184] R. F. Steiner, *Biochimica et Biophysica Acta* **1964**, 79, 51–63.
- [185] D. E. Kuehner, J. Engmann, F. Fergg, M. Wernick, H. W. Blanch, J. M. Prausnitz, *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103(8), 1368–1374.

- [186] W. B. Floriano, M. A. C. Nascimento, *Brazilian Journal of Physics* **2004**, *34*, 38–41.
- [187] F. Zhang, M. W. A. Skoda, R. M. J. Jacobs, R. A. Martin, C. M. Martin, F. Schreiber, *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*(1), 251–259.
- [188] D. I. Svergun, S. Richard, M. H. J. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin, G. Zaccai, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 2267–2272.
- [189] L. Smeller, F. Meersman, K. Heremans, *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, *1764*(3), 497–505.
- [190] A. Soper, M. Ricci, *Physical Review Letters* **2000**, *84*(13), 2881–2884.
- [191] A. Stradner, F. Cardinaux, P. Schurtenberger, *Physical Review Letters* **2006**, *96*(21), 219801.
- [192] A. Stradner, F. Cardinaux, S. U. Egelhaaf, P. Schurtenberger, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*(44), E75.
- [193] A. Shukla, E. Mylonas, E. Di Cola, S. Finet, P. Timmins, T. Narayanan, D. I. Svergun, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*(13), 5075–5080.
- [194] A. Shukla, E. Mylonas, E. Di Cola, S. Finet, P. Timmins, T. Narayanan, D. I. Svergun, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*(44), E76–E76.
- [195] L. Porcar, P. Falus, W.-R. Chen, A. Faraone, E. Fratini, K. Hong, P. Baglioni, Y. Liu, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2010**, *1*(1), 126–129.
- [196] F. Cardinaux, E. Zaccarelli, A. Stradner, S. Bucciarelli, B. Farago, S. U. Egelhaaf, F. Sciortino, P. Schurtenberger, *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*(22), 7227–7237.

-
- [197] Y. Liu, L. Porcar, J. Chen, W.-R. Chen, P. Falus, A. Faraone, E. Fratini, K. Hong, P. Baglioni, *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*(22), 7238–7247.
- [198] L. F. Filobelo, O. Galkin, P. G. Vekilov, *The Journal of Chemical Physics* **2005**, *123*(1), 014904–1–014904–7.
- [199] E. Cacioppo, M. L. Pusey, *Journal of Crystal Growth* **1991**, *114*(3), 286–292.
- [200] F. Rosenberger, S. Howard, J. Sowers, T. Nyce, *Journal of Crystal Growth* **1993**, *129*(1-2), 1–12.
- [201] W. C. K. Poon, S. U. Egelhaaf, P. A. Beales, A. Salonen, L. Sawyer, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2000**, *12*, L569–L574.
- [202] C. C. F. Blake, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **1967**, *167*, 365–377.
- [203] R. Fourme, R. Kahn, M. Mezouar, E. Girard, C. Hoerentrup, T. Prangé, I. Ascone, *Journal of Synchrotron Radiation* **2001**, *8*(5), 1149–1156.
- [204] C. Sauter, F. Otalora, J. Gavira, O. Vidal, R. Giege, J. Garcia-Ruiz, *Acta Crystallographica Section D* **2001**, 1119–1126.
- [205] Y. Cheng, R. F. Lobo, S. Sandler, A. M. Lenhoff, *Biotechnology and Bioengineering* **2006**, *94*(1), 177–188.
- [206] C. Kundrot, F. M. Richards, *Journal of Applied Crystallography* **1986**, *400*, 208–213.
- [207] B. van den Berg, R. Wain, C. M. Dobson, R. J. Ellis, *The EMBO Journal* **2000**, *19*(15), 3870–3875.
- [208] G. Rivas, F. Ferrone, J. Herzfeld, *EMBO reports* **2004**, *5*(1), 23–27.
- [209] J. Katsaras, T. A. Harroun, J. Pencer, M. Nieh, *Die Naturwissenschaften* **2005**, *92*(8), 355–366.

- [210] C. Jeworrek, S. Uelner, R. Winter, *Soft Matter* **2011**, 7(6), 2709–2719.
- [211] T. A. Harroun, M. Koslowsky, M. Nieh, C. de Lannoy, V. A. Raghunathan, J. Katsaras, *Langmuir* **2005**, 21(12), 5356–5361.
- [212] C. R. Sanders, J. P. Schwonek, *Biochemistry* **1992**, 31(37), 8898–8905.
- [213] R. R. Vold, R. S. Prosser, A. J. Deese, *Journal of Biomolecular NMR* **1997**, 9(3), 329–335.
- [214] C. R. Sanders, K. Oxenoid, *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, 1508(1-2), 129–145.
- [215] E. Brunner, M. R. Arnold, W. Kremer, H. R. Kalbitzer, *Journal of Biomolecular NMR* **2001**, 21(2), 173–176.
- [216] J. A. Whiles, R. Deems, R. R. Vold, E. A. Dennis, *Bioorganic Chemistry* **2002**, 30(6), 431–442.
- [217] C. R. Sanders, G. C. Landis, *Journal of American Chemical Society* **1994**, 116, 6470–6471.
- [218] S. Tan, H. T. Tan, M. C. M. Chung, *Proteomics* **2008**, 8(19), 3924–3932.
- [219] X. Chen, B. A. Hyatt, M. L. Mucenski, R. J. Mason, J. M. Shannon, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103(31), 11724–11729.
- [220] C. Dietrich, L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton, *Biophysical Journal* **2001**, 80(3), 1417–1428.
- [221] M. Edidin, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2003**, 32, 257–283.
- [222] K. Simons, W. L. C. Vaz, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2004**, 33, 269–295.
- [223] S. Thomas, A. Preda-Pais, S. Casares, T. D. Brumeanu, *Molecular Immunology* **2004**, 41(4), 399–409.

-
- [224] T. Baumgart, A. T. Hammond, P. Sengupta, S. T. Hess, D. A. Holowka, B. A. Baird, W. W. Webb, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*(9), 3165–3170.
- [225] S. L. Veatch, O. Soubias, S. L. Keller, K. Gawrisch, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*(45), 17650–17655.
- [226] F. Evers, C. Jeworrek, K. Weise, M. Tolan, R. Winter, *Soft Matter* **2012**, *8*(7), 2170–2175.
- [227] D. B. Ostrander, M. Zhang, E. Mileykovskaya, M. Rho, W. Dowhan, *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(27), 25262–25272.
- [228] D. B. Ostrander, G. C. Sparagna, A. A. Amoscato, J. B. McMillin, W. Dowhan, *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(41), 38061–38067.
- [229] S. J. Tucker, T. Baukrowitz, *The Journal of General Physiology* **2008**, *131*(5), 431–438.
- [230] J. Eisenblätter, R. Winter, *Biophysical Journal* **2006**, *90*(3), 956–966.
- [231] M. N. Triba, D. E. Warschawski, P. F. Devaux, *Biophysical Journal* **2005**, *88*(3), 1887–1901.
- [232] L. Barbosa-Barros, G. Rodriguez, M. Cocera, L. Rubio, C. Lopez-Iglesias, A. de la Maza, O. Lopez, *Pharmaceutics* **2011**, *3*(3), 636–664.
- [233] A. A. Elkordy, *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, InTech, Rijeka, **2013**.
- [234] L. van Dam, G. Karlsson, K. Edwards, *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, *1664*(2), 241–256.

Publikationsliste

Stand: 24. April 2014

- [1] **S. Grobelny**, M. Erlkamp, J. Möller and R. Winter, *Intermolecular interactions in highly concentrated protein solutions upon compression and the role of the solvent*, eingereicht
- [2] C. H. Hofmann, **S. Grobelny**, M. Erlkamp, R. Winter and W. Richtering, *Influence of High-Pressure on Cononsolvency of Poly(N-isopropylacrylamide) Nanogels in Water/Methanol Mixtures*, POLYMER, **2014**, 55, 2000-2007.
- [3] M. Erlkamp, **S. Grobelny**, A. Faraone, C. Czeslik and R. Winter, *Solvent Effects on the Dynamics of Amyloidogenic Insulin Revealed by Neutron Spin Echo Spectroscopy*, THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY PART B, **2014**, 118, 3310-3316.
- [4] J. Möller, **S. Grobelny**, J. Schulze, A. Steffen, S. Bieder, M. Paulus, M. Tolan and R. Winter, *Specific anion effects on the pressure dependence of the protein-protein interaction potential*, PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS, **2014**, 16, 7423-7429.
- [5] M. Erlkamp, **S. Grobelny** and R. Winter, *Crowding Effects on the Temperature and Pressure Dependent Structure, Stability and Folding Kinetics of Staphylococcal Nuclease*, PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS, **2014**, 16, 5965-5976.
- [6] J. Möller, **S. Grobelny**, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erlkamp, M. Paulus, M. Tolan and R. Winter, *Reentrant Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Solutions at Elevated Hydrostatic Pressures*, PHYSICAL REVIEW LETTERS, **2014**, 112, 028101-1-028101-5.

- [7] **S. Grobelny**, C. H. Hofmann, M. Erlkamp, F. A. Plamper, W. Richtering and R. Winter, *Conformational Changes Upon High Pressure Induced Hydration of poly(*N*-Isopropylacrylamide) Microgels*, *SOFT MATTER*, **2013**, 9, 5862-5866.
- [8] J. Koo, M. Erlkamp, **S. Grobelny**, R. Steitz and C. Czeslik, *Pressure-Induced Protein Adsorption at Aqueous-Solid Interfaces*, *LANGMUIR*, **2013**, 29, 8025-8030.
- [9] J. Möller, M. Schroer, M. Erlkamp, **S. Grobelny**, M. Paulus, S. Tiemeyer, F. Wirkert, M. Tolan and R. Winter, *The Effect of Ionic Strength, Temperature, and Pressure on the Interaction Potential of Dense Protein Solutions: From Nonlinear Pressure Response to Protein Crystallization*, *BIOPHYSICAL JOURNAL*, **2012**, 102, 2641-2648.
- [10] Y. Zhai, P. Chong, L. Taylor, M. Erlkamp, **S. Grobelny**, C. Czeslik, E. Watkins and R. Winter, *Physical Properties of Archaeal Tetraether Lipid Membranes as Revealed by Differential Scanning and Pressure Perturbation Calorimetry, Molecular Acoustics, and Neutron Reflectometry: Effects of Pressure and Cell Growth Temperature*, *LANGMUIR*, **2012**, 28, 5211-5217.
- [11] C. Jeworrek, F. Evers, M. Erlkamp, **S. Grobelny**, M. Tolan, P. Chong and R. Winter, *Structure and Phase Behavior of Archaeal Lipid Monolayers*, *LANGMUIR*, **2011**, 13113-13121.

Lebenslauf

Name:	Sebastian Grobelny
Geburtsdatum:	02. Februar 1985
Geburtsort:	Loslau
1991 – 1995	Grundschule Marienschule in Osnabrück
1995 – 1997	Orientierungsstufe Dom in Osnabrück
1997 – 2004	Gymnasium Carolinum in Osnabrück
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
2004 – 2005	Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund in Osnabrück
2005 – 2008	Studium der Chemie an der Technischen Universität Dortmund
	Abschluss: Bachelor of Science (B.Sc.)
	Thema: <i>Analyse der Wechselwirkung von Amyloid-Inhibitoren auf Modellbiomembranen</i>
2008 – 2010	Studium der Chemie an der Technischen Universität Dortmund
	Abschluss: Master of Science (M.Sc.)
	Thema: <i>Untersuchung des Einflusses von TMAO auf das Protein Lysozym mittels Röntgenkleinwinkelstreuung</i>
2010 – 2014	Promotion in Physikalischer Chemie am Lehrstuhl von Prof. Dr. R. Winter an der Technischen Universität Dortmund

Eidesstattliche Versicherung

Name: Sebastian Grobelny
Universität: Technische Universität Dortmund
Fakultät: Chemie und Chemische Biologie

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

Strukturuntersuchungen von Biomolekülen und stimuli-sensitiven Polymeren unter hohen hydrostatischen Drücken

selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Datum, Unterschrift