

Röntgenreflektometrie an der hydrophoben Festkörper-Flüssigkeits-Grenzfläche

Untersuchungen an organischen Lösungsmitteln und Proteinadsorbaten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät Physik der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Paul Salmen

im Februar 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Röntgenstrahlung	5
2.1.1	Die Streugeometrie	5
2.1.2	Röntgenreflektometrie	6
2.2	Die Struktur von Wasser	9
2.3	Grenzflächen	10
2.3.1	Festkörperoberflächen in Kontakt mit Flüssigkeiten	11
2.3.2	Hydrophobe Grenzflächen in Kontakt mit Wasser	13
2.4	Proteine	15
2.4.1	Proteine in Lösung	16
2.4.2	Proteinadsorbate an der fest-flüssig-Grenzfläche	18
3	Messapparaturen an Synchrotronstrahlungsquellen	21
3.1	Messzellen	21
3.2	Beamlines	23
4	Probenpräparation und -charakterisierung	25
4.1	Präparation der OTS-Proben	25
4.2	Charakterisierung der Schichten	26
4.3	Strahlenschäden am Probensystem	29
4.4	Die Struktur der Silizium-Siliziumdioxid-Grenzfläche	30
4.5	Bestimmung der Dichte wässriger Urea-Lösungen unter Druck	31
5	Lösungsmittel auf OTS	37
5.1	Charakterisierung der verwendeten Lösungsmittel	38
5.2	Ergebnisse für ungemischte Lösungsmittel	41
5.3	Ergebnisse für Lösungsmittelgemische	43
5.4	Untersuchung der Strahlenschäden	50
5.5	Analyse der Resultate und Diskussion	52
6	Proteine an Grenzflächen	57
6.1	Sojasauce und säurehydrolysierte Sojaproteine	61
6.1.1	Eigenschaften der Sojasauce und der säurehydrolysierten Proteine	62
6.1.2	Ergebnisse	63
6.1.3	Analyse der Resultate und Diskussion	70
6.2	Lysozymadsorbate an der fest-flüssig-Grenzfläche unter Druck	73

6.2.1	Lysozym und Lysozym-Urea-Mischungen auf OTS	74
6.2.2	Analyse der Resultate und Diskussion	80
7	Zusammenfassung und Ausblick	85
	Literaturverzeichnis	89
	Anhang A Zusätzliche Messwerte und Elektronendichteprofile	101
A.1	Ergebnisse der Dichtemessungen	101
A.2	Messungen zur Adsorption von Inhaltsstoffen der Sojasauce an OTS	103
A.3	Lysozym an Grenzflächen unter Druck	103
A.3.1	Lysozym auf Siliziumdioxid	103
A.3.2	Lysozym und Lysozym-Urea-Mischungen auf OTS	106
	Anhang B Technische Zeichnungen	111
	Abbildungsverzeichnis	118
	Tabellenverzeichnis	121
8	Danksagung	123

Kapitel 1

Einleitung

Nahezu überall in der Natur sind unterschiedliche Phasen (fest, flüssig, gasförmig) in Kontakt miteinander. An der zwischen ihnen gebildeten Grenzfläche können in den beiden Phasen strukturelle Veränderungen erzeugt werden. Beispielsweise unterscheiden sich die Eigenschaften einer Flüssigkeit in der Nähe einer festen Oberfläche von denen im Volumen. Die Moleküle der Flüssigkeit können über mehrere Lagen hinweg geordnet werden und sich somit in Schichten anordnen. Das kann zum Beispiel zur Änderung der Leitfähigkeit oder des Fließverhaltens der Flüssigkeit an der Grenzfläche führen.

Insbesondere die Grenzfläche zwischen wasserabweisenden, als hydrophob bezeichneten Oberflächen und Wasser hat in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit der Forschung auf sich gezogen. Hydrophobe Oberflächen sind unpolar und können nur über van-der-Waals-Kräfte mit der Flüssigkeit wechselwirken, dadurch ist die in der Flüssigkeit induzierte Ordnung geringer als an polaren oder geladenen Oberflächen. Die Flüssigkeitsphase ist dann nur in der ersten Molekülschicht stärker geordnet. Die untersuchten Oberflächen werden meistens durch Methylgruppen gebildet, diese und die Orientierung der Wassermoleküle erzeugen an den hydrophoben Oberflächen ein Dichtedefizit mit einer vertikalen Ausdehnung von wenigen Ångström (10^{-10}m).

Im Gegensatz zur hydrophoben Festkörper-Wasser-Grenzfläche ist die Grenzfläche zwischen hydrophoben Festkörpern und anderen Flüssigkeiten wie Lösungsmitteln bisher nur selten untersucht worden. Die wenigen bekannten Messungen zeigen sehr viel größere Dichtedefizite als in Wasser. Ein Teil der in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen beschäftigt sich mit der Bestimmung der Größe des Dichtedefizits an der Grenzfläche zwischen Lösungsmitteln und hydrophoben Oberflächen um so ein besseres Verständnis dieser Grenzflächen zu ermöglichen.

Hydrophobe Oberflächen haben auch auf im Wasser gelöste Stoffe großen Einfluss. Wenn die Stoffe sowohl polare als auch unpolare Bereiche haben, ist die Adsorption an der Grenzfläche oft energetisch günstig. Die polaren Bereiche des Moleküls sind dann zum Wasser orientiert und ermöglichen so den Wassermolekülen die Interaktion mit der Oberfläche.

Auch im Wasser gelöste komplexe Makromoleküle wie Proteine adsorbieren an Oberflächen. Hydrophobe Oberflächen führen dabei häufig zum Kollaps des Proteins, da die hydrophoben Bereiche eines Proteins im nativen Zustand innen liegen und im adsorbierten Zustand mit der Grenzfläche in Kontakt sind.

Proteinadsorption tritt an fast allen biologisch relevanten Grenzflächen abhängig von den Oberflächeneigenschaften auf. Ein Beispiel ist der Cholesterintransport im Körper. Apolipoprotein A-1 lagert sich hierzu an Membranen an und nimmt Cholesterin und Fettsäuren auf. Die Stoffe können dann zur Leber transportiert und abgebaut werden. Auch wenn Fremdkör-

per wie Implantate in einen Organismus eingebracht werden, adsorbieren an diesen Proteine. Abhängig von den adsorbierten Proteinen binden im nächsten Schritt unter anderem Blutplättchen an die Proteinschicht. Die um das Implantat gebildete Schicht kann so dick werden, dass sich Bakterien einnisten, es kommt zu einer Entzündung. Solche Entzündungen führen häufig zur Abstoßung des Implantates, daher soll die Bildung der Biofilme an Implantaten vermieden werden.

Die Adsorption von Proteinen an Implantaten kann aber auch positive Effekte haben. Wird ein Implantat im Knochen eingebracht, ist die Adsorption des Proteins Osteopontin erwünscht, da es zur Bildung von Knochenstrukturen führt und damit zum Beispiel Zahnimplantate mit dem Knochen verbindet.

Um eine Adsorbatschicht oder gelöste Proteine zu beeinflussen und so ihr Verhalten zu studieren, gibt es mehrere Möglichkeiten, zum Beispiel die Änderungen des pH-Werts, der Salzkonzentration in der Lösung, des hydrostatischen Drucks oder der Temperatur. Erhöht man die Temperatur über die Denaturierungstemperatur der Proteine werden sie entfaltet, dadurch kann ungehemmtes Schichtwachstum hervorgerufen werden.

Durch Variation des hydrostatischen Drucks ist es möglich, die Dichte des Systems bei konstanter Temperatur zu ändern und das System damit weniger zu stören als durch Temperaturänderung. Die Prozesse, die durch ändern des hydrostatischen Drucks in Proteinen hervorgerufen werden, sind daher bis zu einer gewissen Grenze reversibel. Die Änderung der Dichte des umgebenden Wasser ermöglicht es zudem, die Eigenschaften des Wassers in der Adsorbatschicht im Vergleich zum Volumenwasser zu untersuchen. Durch Änderungen an der Adsorbatschicht kann auch die druckinduzierte Denaturierung der Proteine studiert werden. Auch über die Zugabe von Kosolventien kann die Stabilität der Proteine beeinflusst werden. Diese Stoffe können durch Adsorption an der Grenzfläche oder an den bereits adsorbierten Proteinen die Adsorbatschicht verändern und die Adsorption der Proteine unterdrücken oder, bei destabilisierender Wirkung, verstärken.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei unterschiedliche Systeme mit aus Proteinen gebildeten Adsorbatschichten untersucht.

So wird die Adsorption säurehydrolysierter Proteine an der hydrophoben fest-flüssig-Grenzfläche studiert. In vorausgegangenen Experimenten wurde am Lehrstuhl für Verfahrenstechnische Transportprozesse der Ruhr-Universität Bochum festgestellt, dass Sojasauce die Dichtigkeit von Fettkapseln, die in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden sollen, erhöht. Zum weiteren Verständnis dieser Beobachtung wird in dieser Arbeit die konzentrationsabhängige Schichtbildung von Inhaltsstoffen der Sojasauce wie den säurehydrolysierten Sojaproteinen an der fest-flüssig- und flüssig-gas-Grenzfläche analysiert.

Zudem wird die Adsorption des Modellproteins Lysozym unter hydrostatischem Druck untersucht. Lysozym ist ein Protein, das schon häufig studiert worden ist. Aus diesen Untersuchungen ist bekannt, dass Lysozym bis 5000 bar druckstabil ist. Außerdem sind die Eigenschaften der bei Atmosphärendruck gebildeten Adsorbatschichten gut dokumentiert. Es eignet sich daher, um erste Untersuchungen an Adsorbatschichten unter Druck an der hydrophoben fest-flüssig-Grenzfläche durchzuführen.

Die beschriebenen Prozesse finden auf sehr kleinen Längenskalen statt und stellen hohe Anforderungen an die Messmethode. So muss zur Untersuchung der fest-flüssig-Grenzfläche die Volumenflüssigkeit oder der Festkörper an der Grenzfläche durchdrungen werden. Zudem muss der Beitrag der Grenzfläche zum Messsignal groß genug sein, um es vom Signal aus dem Festkörper und dem Volumenwasser unterscheiden zu können. Und nicht zuletzt muss die Auflösung hoch genug sein, um die Änderungen auf den kleinen Längenskalen an der Grenzfläche zu beobachten. Eine Methode, die allen drei Anforderungen genügt, ist die

Röntgenreflektometrie. Bei dieser Methode wird der Röntgenstrahl unter kleinen Einfallswinkeln an der Grenzfläche gebeugt. Aus der an der Grenzfläche reflektierten Röntgenstrahlung kann dann das vertikale Dichteprofil der Grenzfläche hergeleitet werden.

Die Gliederung der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden erläutert.

Am Anfang des **Kapitels 2** wird die Messmethode und die zur Auswertung verwendete Vorgehensweise erklärt. Anschließend wird die Struktur von flüssigem Wasser und der Grenzfläche zwischen Flüssigkeiten und Festkörpern beschrieben. Zuletzt wird dann der Aufbau von Proteinen in Lösung und im adsorbierten Zustand an der fest-flüssig-Grenzfläche erläutert. In **Kapitel 3** folgt die Beschreibung der verwendeten Beamlines und Messzellen. Dabei wird hauptsächlich auf die im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Probenzelle zur Vermessung der fest-flüssig-Grenzfläche eingegangen.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit den untersuchten Probensystemen. Zuerst wird die Präparation der hydrophoben Oberflächen und ihre Charakterisierung erläutert, anschließend die durch Strahlung an der Probe verursachten Schäden. Zur Beschreibung der Grenzfläche zwischen Silizium und Siliziumdioxid existieren mehrere Modelle, sie werden im nächsten Abschnitt beschrieben. Außerdem musste zur Auswertung der Röntgenreflektivitätsmessungen die Dichte der Urea-Lösungen unter Druck bestimmt werden, die hierzu genutzte Methode wird im Anschluss vorgestellt.

Die Messergebnisse zu hydrophoben Oberfläche in Kontakt mit unterschiedlichen Lösungsmitteln werden in **Kapitel 5** präsentiert und mit in der Literatur verfügbaren experimentellen Ergebnissen verglichen.

Die Messungen an Proteinadsorbatschichten werden in **Kapitel 6** dargestellt. Zuerst werden die zur Analyse der Adsorbatschichten verwendeten Parameter und ihre Berechnung erläutert. In **Kapitel 6.1** wird dann die Adsorption der säurehydrolysierten Sojaproteine an den verschiedenen Grenzflächen beschrieben. Das **Kapitel 6.2** befasst sich mit den Messungen an Lysozym unter Druck.

Im **Kapitel 7** werden die in der Arbeit erzielten Ergebnisse abschließend vorgestellt.

Kapitel 2

Grundlagen

Zur Untersuchung der Grenzflächen zwischen Festkörpern und Flüssigkeiten wird im Rahmen dieser Arbeit die Röntgenreflektometrie genutzt. Mit der Messmethode können Elektronendichteprofile von Grenzflächen mit einer Auflösung im Ångström-Bereich bestimmt werden. Die Messmethode und das zur Berechnung der Elektronendichteprofile verwendete Verfahren werden zu Beginn vorgestellt. Anschließend folgt die Beschreibung der Eigenschaften von flüssigem Wasser. Im nächsten Abschnitt wird die Wechselwirkung zwischen Festkörpern und Flüssigkeiten an der fest-flüssig-Grenzfläche erläutert. Hierbei wird anhand der aktuell verfügbaren Literatur hauptsächlich auf die Grenzfläche zwischen hydrophoben Oberflächen und Wasser eingegangen.

Zum Schluss wird der allgemeine Aufbau von Proteinen erläutert. Nach der Diskussion der Entfaltung von Proteinen werden die Eigenschaften von Proteinadsorbaten an der fest-flüssig-Grenzfläche beschrieben.

2.1 Röntgenstrahlung

Als Röntgenstrahlung bezeichnet man hochenergetische elektromagnetische Strahlung mit einer Photonenenergie E zwischen 1 keV und 500 keV. Somit liegt die Wellenlänge λ der Röntgenstrahlung im Bereich von $\approx 10^{-10} \text{ m} = 1 \text{ \AA}$. Diese sehr kleinen Wellenlänge ermöglicht es, Strukturen in der Größenordnung von Molekülen und Atomen zu untersuchen.

In folgenden Abschnitt wird die Röntgenreflektometrie erklärt und erläutert, wie aus den Messdaten Elektronendichteprofile berechnet werden. Alle Inhalte des Abschnitts orientieren sich an [Tol99] und [Als11].

2.1.1 Die Streugeometrie

Die bei einem Streuexperiment unter einem Winkel α_i auf die Oberfläche treffende Strahlung wird durch ihren Wellenvektor \vec{k}_i charakterisiert. Die Strahlung wird an der Oberfläche sowohl unter dem Winkel α_f mit dem Wellenvektor \vec{k}_f gestreut als auch mit dem Winkel α_t und dem Wellenvektor \vec{k}_t transmittiert. Die Streugeometrie mit den entsprechenden Vektoren ist in Abbildung 2.1 angegeben, in dieser liegt xz-Ebene parallel zum einfallenden Röntgenstrahl und senkrecht zur Porbenoberfläche. Zusätzlich kann die Strahlung auch in der Oberflächenebene unter dem Winkel φ gestreut werden. In Abbildung 2.1 entspricht dies der xy-Ebene. Die Streuintensität wird dann als Funktion des Wellenvektorübertrags $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_f$ gemessen.

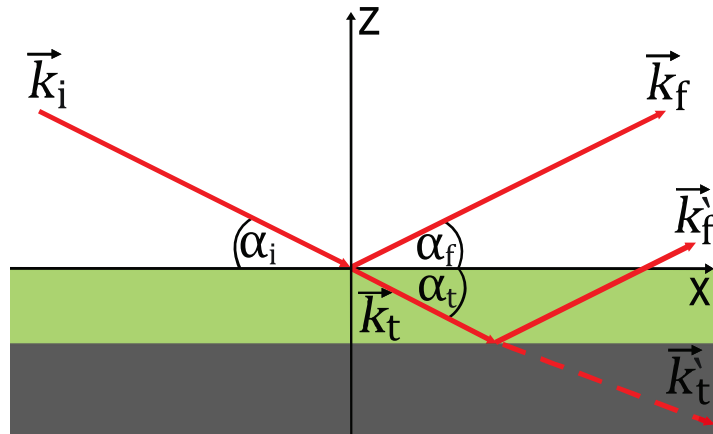


Abbildung 2.1: Die Streugeometrie an einer Grenzfläche in der xz-Ebene des Röntgenstrahls.

Aus der Streugeometrie in Abbildung 2.1 ergibt sich

$$\vec{q} = \begin{pmatrix} q_x \\ q_y \\ q_z \end{pmatrix} = |\vec{k}_i| \begin{pmatrix} \cos(\alpha_f) \cos(\varphi) - \cos(\alpha_i) \\ \cos(\alpha_f) \sin(\varphi) \\ \sin(\alpha_f) + \sin(\alpha_i) \end{pmatrix} \quad (2.1)$$

mit dem Betrag des Wellenvektors $|\vec{k}_i| = k = \frac{2\pi}{\lambda}$ und der Wellenlänge der einfallenden Strahlung λ .

Im Fall eines Röntgenreflektometrie-Experiments wird die reflektierte Intensität unter den Winkeln $\alpha_f = \alpha_i$ und $\varphi = 0$ gemessen. Aus Gleichung (2.1) folgt, dass keine Wellenvektorüberträge parallel zur Probenoberfläche vorhanden sind ($q_x = q_y = 0$) und, dass für den Wellenvektorübertrag senkrecht zur Probenoberfläche

$$q_z = 2k \sin(\alpha_i) = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\alpha_i) \quad (2.2)$$

gilt. Somit erhalten Reflektivitätsdaten nur Informationen über das lateral gemittelte Elektronendichteprofil einer Grenzfläche.

2.1.2 Röntgenreflektometrie

Beim Übergang zwischen zwei Medien unterschiedlicher Elektronendichte wird der Röntgenstrahl, wie auch sichtbares Licht, gebeugt. Beschreibt man die Atome im Festkörper als Oszillatoren mit einer Anregungsfrequenz ω_0 und geht dann von Strahlung mit der Frequenz $\omega \gg \omega_0$ aus, gilt für den Brechungsindex

$$n = 1 - \delta + i\beta = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi} r_0 \rho + i \frac{\lambda}{4\pi} \mu . \quad (2.3)$$

$\delta = \frac{\lambda^2}{2\pi} r_0 \rho$ wird hier als Dispersion und $\beta = \frac{\lambda}{4\pi} \mu$ als Absorption bezeichnet. Somit hängt der Brechungsindex neben dem konstanten Elektronenradius r_0 von der Wellenlänge λ , der Elektronendichte ρ sowie dem Absorptionskoeffizienten μ ab. Für die in dieser Arbeit verwendete Röntgenstrahlung liegt δ zwischen 10^{-5} und 10^{-8} . Aus der Tatsache, dass der Realteil des Brechungsindex kleiner 1 ist, folgt, dass für kleine Winkel unterhalb des sogenannten kritischen Winkels $\alpha_c \approx \sqrt{2\delta}$ externe Totalreflexion auftritt.

Die reflektierte Intensität für einen auf eine glatte Oberfläche treffenden Röntgenstrahl kann über die Fresnel'schen Formeln berechnet werden. Da der Brechungsindex nahe 1 ist, muss im Falle der Röntgenstrahlung nicht zwischen s- und p-polarisierter Strahlung unterschieden werden. Für die Intensität der reflektierten Strahlung R_F folgt dann unter Annahme einer glatten Grenzfläche die Fresnelreflektivität

$$R_F = \frac{(\alpha_i - p_+)^2 + p_-^2}{(\alpha_i + p_+)^2 + p_-^2} \quad (2.4)$$

$$\text{mit } p_{+/-}^2 = \frac{1}{2} \left(\sqrt{(\alpha_i^2 - \alpha_c^2)^2 + 4\beta^2} \pm (\alpha_i^2 - \alpha_c^2) \right) \quad (2.5)$$

Für große Winkel folgt R_F der Abhängigkeit $R_F \approx \left(\frac{\alpha_c}{2\alpha_i}\right)^4$, die reflektierte Intensität fällt bei größeren Winkeln also stark ab.

In Abbildung 2.2a) ist eine mit dem Programm LSFIT berechnete Fresnelreflektivität R_F der Silizium-Vakuum-Grenzfläche in Abhängigkeit des Wellenvektorübertrags q_z dargestellt (rote Kurve). In Abbildung 2.2b) ist das entsprechende, aus der Reflektivität berechnete Elektronendichteprofil gezeigt. Die Elektronendichte springt an der Grenzfläche ($z = 0$) von $0,71 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ (Silizium) direkt auf $0 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ (Vakuum).

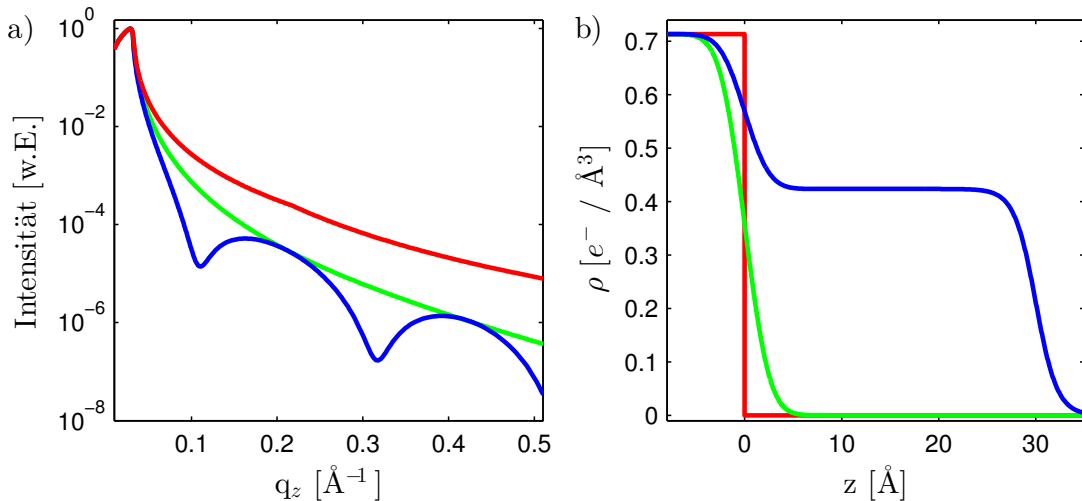


Abbildung 2.2: a) Beispiele des Intensitätsverlaufs verschiedener Reflektivitätsmessungen in logarithmischer Darstellung, die Intensitätsverläufe wurden aus den Elektronendichteprofilen (b)) berechnet. rot: Fresnelreflektivität der Silizium-Luft-Grenzfläche; grün: raue Silizium-Luft-Grenzfläche; blau: raue Silizium-Luft-Grenzfläche mit einer 30 \AA dicken Schicht oberhalb.

Der lateral gemittelte Übergang an der Grenzfläche ist bei einer realen Probe auf Grund der Rauigkeit der Oberflächen stetig. Bei der Berechnung der Elektronendichteprofile wird die Rauigkeit σ dadurch berücksichtigt, dass der unstetige Übergang mit einer Gaußschen Wahrscheinlichkeitsdichte $P(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{z^2}{2\sigma^2}\right)$ gefaltet wird. Erläuterungen hierzu finden sich in [Tol99].

Die grünen Kurven in Abbildung 2.2 zeigen den Intensitätsverlauf einer realen, rauhen Grenzfläche mit einer Rauigkeit $\sigma = 2 \text{ \AA}$ sowie das entsprechende Elektronendichteprofil. Die Intensität fällt, abhängig von q_z , stärker ab als die Fresnelreflektivität. Um auch bei größeren q_z ein Messsignal zu erhalten, sind deshalb für Reflektivitätsexperimente im Ängströmbereich glatte Probenoberflächen notwendig.

Reale Systeme bestehen zudem meistens aus mehr als nur einer Grenzfläche. Eine Weg zur Berechnung der Reflektivität solcher glatten Mehrschichtsysteme wurde erstmals von Parratt vorgestellt [Par54]. Bei diesem Algorithmus wird an jeder Grenzfläche rekursiv der transmittierte und der reflektierte Anteil der Strahlung berechnet wird. Der an der obersten Grenzfläche transmittierte Anteile mit dem Wellenvektor \vec{k}_t ist daher gleichzeitig der einfallende Strahl für die nächst tiefere Schicht (wie in Abbildung 2.1 angedeutet). Der an der untersten Grenzfläche transmittierte Anteil \vec{k}_t' (in Abbildung 2.1 rot gestrichelt) wird im Substrat, welches als unendlich dick angenommen wird, absorbiert und ist daher im Folgenden nicht relevant.

Zur Berechnung der Reflektivität werden die reflektierten Anteile (in Abbildung 2.1 mit den Wellenvektoren \vec{k}_f' und \vec{k}_f) vom Substrat aus rekursiv berechnet. Durch Interferenz zwischen den reflektierten Teilstrahlen entstehen charakteristische Oszillationen im Reflektivitätssignal, so genannte Kissingmuster.

Der Parratt Algorithmus mit modifizierten Fresnelkoeffizienten [Tol99] ermöglicht die Berechnung der Reflektivitäten von rauen Mehrschichtsystemen, wenn die Rauigkeit einer Schicht deutlich kleiner als deren Dicke ist. Ein Beispiel für eine 30 Å dicke Schicht auf einem Siliziumwafer in Luft ist in Abbildung 2.2 in blau angegeben.

Wenn hingegen Rauigkeit und Schichtdicke in der gleichen Größenordnung liegen, kann nicht mehr klar zwischen den verschiedenen Brechungsindizes einzelner Schichten unterschieden werden. Die durch den Parratt Algorithmus modulierte Elektronendichte ist dann am Übergang der Schichten unstetig. Um stetige Elektronendichteprofile zu erhalten, wird das Effektive Dichtemodell verwendet. Hierzu wird zuerst ein stetiger Verlauf des Elektronendichteprofiles erzeugt. Dieses Profil wird dann in dünne glatte Scheiben unterteilt. Hieraus kann der Intensitätsverlauf nach Parratt berechnet werden.

Mit der vorgestellten Methode können nun reale Systeme mit dünnen Schichten beschreiben werden.

Alternativ kann die reflektierte Intensität unter Einbeziehung der kinematische Näherung berechnet werden. Das führt zu

$$R(q_z) = R_F(q_z) \left| \frac{1}{\rho_\infty} \int \frac{d\rho(z)}{dz} \exp(i\rho_z z) dz \right|^2 . \quad (2.6)$$

Aus der Gleichung wird deutlich, dass $R(q_z)$ von der Fresnelreflektivität $R_F(q_z)$ sowie der Fouriertransformierten der Ableitung der Elektronendichte $\rho(z)$ senkrecht zur Oberfläche abhängt. Da die Fouriertransformation nur im, durch die Messung zugänglichen, begrenzten q_z -Bereich durchgeführt werden kann, ist das resultierende Elektronendichteprofil nicht eindeutig. Zudem ist die direkte Rücktransformation durch die Bildung des Betragsquadrats nicht möglich.

Mittels Röntgenreflektivitätsmessungen (im Folgenden XRR vom englischen X-ray reflectivity) ist es also möglich, lateral gemittelte Elektronendichteprofile von Grenzflächen mit einer Auflösung im Ångströmbereich zu bestimmen. Zur Berechnung der Elektronendichteprofile wird in dieser Arbeit das Programm LSFit genutzt, welches auf dem zuvor vorgestellten Parratt-Algorithmus und dem Effektiven Dichtemodell basiert.

2.2 Die Struktur von Wasser

In diesem Kapitel werden die Eigenschaften von Wasser im flüssigen Zustand beschrieben und der Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf die Wasserstruktur erläutert. Die folgende Beschreibung beruht hauptsächlich auf den Lehrbüchern [Mar07] und [Isr11].

Die speziellen Eigenschaften von Wasser sind für fast alle in dieser Arbeit untersuchten Systeme von entscheidender Bedeutung. Ein Wassermolekül besteht aus einem Sauerstoffatom (O) und zwei Wasserstoffatomen (H) und besitzt auf Grund einer ungleichen Elektronenverteilung starke Partialladungen (negativ geladener Sauerstoff gegenüber positiv geladenem Wasserstoff), sowie ein ausgeprägtes Dipolmoment. Dies führt dazu, dass zwischen zwei Wassermolekülen eine Wasserstoffbrückenbindung (im Folgenden H-Bindung) entstehen kann. Hierbei bindet ein zuvor nicht bindendes Elektronenpaar des Sauerstoffatoms an den Wasserstoff eines Nachbarmoleküls, eine schematische Darstellung mehrerer durch H-Bindungen verbundener Wassermoleküle ist Abbildung 2.3a) gezeigt.

Die H-Bindung ist eine gerichtete Bindung und kann nicht nur zwischen Wassermolekülen, sondern auch zwischen einem gebundenen Wasserstoffatom und anderen elektronegativen Atomen entstehen (zum Beispiel N, F oder C). Die Bindungsenergie liegt in der Größenordnung von 0,1 eV bis 0,7 eV und ist damit geringer als die von kovalenten Bindungen (einige eV). Gleichzeitig ist die Bindungsenergie größer als die Energie thermischer Fluktuationen ($k_B T = 0,026$ eV bei Raumtemperatur) und Van-der-Waals Wechselwirkungen ($\approx 0,01$ eV). Eine der Besonderheiten des Wassermoleküls ist, dass es bis zu vier H-Bindungen mit seinen nächsten Nachbarn eingehen kann (vgl. Abbildung 2.3a)). Dadurch bildet Wasser ein tetraedrisches Netzwerk mit großen Freiräumen aus. Der durchschnittliche Abstand der so durch H-Bindungen gebundenen Wassermoleküle beträgt $2,8 \text{ \AA}$. Die nächsten Nachbarmoleküle bilden die erste Koordinationsschale, die gegen äußere Einflüsse sehr stabil ist.

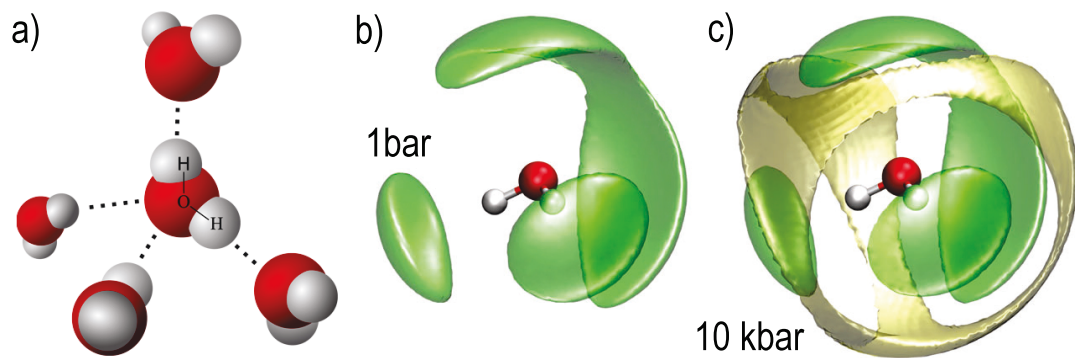


Abbildung 2.3: a) Darstellung des Wassermoleküls und der durch H-Bindungen gebundenen ersten Koordinationsschale. b) Räumliche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der ersten Koordinationsschale bei 1 bar und c) 10 kbar. Dunkelgrüne Bereiche kennzeichnen durch H-Bindungen gebundene Moleküle, hellgrüne nicht gebundene Moleküle. a) verändert aus [Wik16a]; b) und c) adaptiert aus Quelle [Imo15] mit Genehmigung der PCCP Eigentümergesellschaft.

So fanden Soper *et al.* [Sop00] mit Neutronendiffraktion für Drücke bis 4000 bar bei unterkühltem Wasser nahezu keine Veränderung der intermolekularen Abstände in der ersten Koordinationsschale. Die zweite Koordinationsschale hingegen kollabiert bei einem Druck von 2000 bar und wird in die erste Schale gedrückt. Der Kollaps wurde von Imoto *et al.* [Imo15] mit Simulationen untersucht. Sie konnten zeigen, dass sich bei 10 kbar und 300 K in der ersten Koordination zwei zusätzliche, nicht durch H-Bindungen gebundene Wassermoleküle befinden.

In Abbildung 2.3b) ist die räumlichen Verteilungsfunktionen der ersten Koordinationsschale eines Wassermoleküls bei 1 bar dargestellt. Sie zeigt neben den grünen Bereichen, in denen die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für weitere Wassermoleküle groß ist, Bereiche mit geringer Aufenthaltswahrscheinlichkeit von Wassermolekülen. Bei 10 kbar sind die Bereiche, wie in Abbildung 2.3c) zu sehen, mit im Mittel zwei Molekülen aufgefüllt. Die Moleküle besetzen dabei die freien Räume in der tetraedrischen Wasserstruktur, sind aber nicht direkt über H-Bindungen an das zentrale Molekül gebunden [Imo15].

Die Affinität der Wassermoleküle zueinander hat einen großen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen Wasser und Molekülen oder Oberflächen, die keine H-Bindungen eingehen können, dies wird unter dem Oberbegriff „hydrophober Effekt“ zusammengefasst. Im Gegensatz zu größeren Partikeln können kleine Moleküle in die Wasserstruktur eingebaut werden [Cha05]. Dadurch können die umgebenden Wassermoleküle weiterhin vier H-Bindungen eingehen und die kleinen, unpolaren Moleküle in Wasser gelöst werden. An Oberflächen oder großen Molekülen können Wassermoleküle nicht mehr vier H-Bindungen eingehen. Dadurch entsteht zwischen Oberflächen oder großen Molekülen bei geringen Abständen in Wasser eine anziehende Kraft, welche als hydrophobe Wechselwirkung bezeichnet wird [Mey06]. Die anziehende Kraft führt zum Kontakt der Grenzflächen und zur Aggregation der Moleküle. Dadurch wird die Anzahl der Wassermoleküle in Kontakt mit der Grenzfläche oder den Partikeln und damit die Anzahl der offenen H-Bindungen minimiert.

Viele Moleküle wie zum Beispiel Trimethylamin *N*-oxid (TMAO) sind amphiphil, haben also sowohl hydrophile als auch hydrophobe äußere Bereiche und reagieren somit sehr unterschiedlich auf Druck. Der hydrophile Bereich des TMAO-Moleküls besteht aus einem Sauerstoffatom und hat eine über Wasserstoffbrückenbindungen gebundene erste Koordinationsschale. Sie verhält sich unter Druck ähnlich wie die des reinen Wassers [Imo15].

Ganz anders beeinflusst Druck hingegen die erste Koordinationsschale des aus drei Methylgruppen bestehenden hydrophoben Teil des TMAO-Moleküls. Bei 1 bar ist das umgebende Wasser unstrukturiert. Da die 17 umgebenden Wassermoleküle keine Bindung mit den Methylgruppen eingehen, ist die erste Koordinationsschale in den räumlichen Verteilungsfunktionen nicht stark ausgeprägt. Wird der Druck auf 10 kbar erhöht, steigt die Anzahl der Wassermoleküle in der ersten Koordinationsschale auf 21. Daraus folgt eine höhere Ordnung, in den räumlichen Verteilungsfunktionen ist die erste Koordinationsschale zu erkennen [Imo15]. Die Ergebnisse lassen sich nicht verallgemeinern, zeigen aber, welchen großen Unterschied die Art der Wechselwirkung auf den Einfluss von Druck haben kann.

2.3 Grenzflächen

Grenzflächen bilden den Übergang zwischen Stoffen mit unter Umständen völlig anderen Eigenschaften bezüglich Struktur, Polarisierbarkeit oder Aggregatzustand. Eine solche Grenzfläche zwischen einer Kristallstruktur und Wasser ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt. Die geänderten physikalischen Eigenschaften haben an den verschiedenen Grenzflächen unterschiedlich starke Einflüsse. An der flüssig-gas-Grenzfläche (zum Beispiel Wasser-Luft) und der flüssig-flüssig-Grenzfläche (zum Beispiel Öl-Wasser) tritt nur eine geringe Strukturierung innerhalb der Medien auf, wie mit Simulationen gezeigt werden konnte [Bre08]. An der fest-flüssig Grenzfläche hingegen ist es möglich, dass sich in der flüssigen Phase nahe der Grenzfläche eine höhere Ordnung herausbildet, eine Übersicht bietet zum Beispiel [Kap06]. Im folgenden Kapitel werden die beschriebenen Phänomene erläutert. Hierbei wird anhand aktueller Literatur vor allem auf die in dieser Arbeit fast ausschließlich untersuchte hydro-

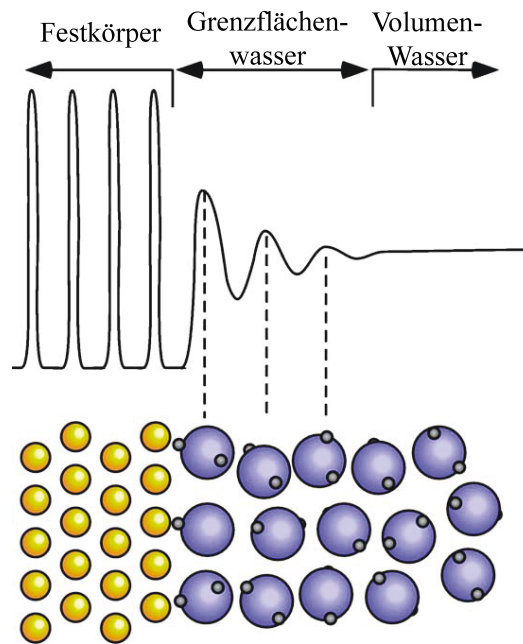


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung einer Festkörper-Wasser-Grenzfläche (unten) und das zugehörige Dichteprofil (oben), adaptiert mit Genehmigung aus [Fen04].

phobe Oberfläche eingegangen.

2.3.1 Festkörperoberflächen in Kontakt mit Flüssigkeiten

Wenn eine Flüssigkeit in Kontakt mit einer harten Wand ist, ordnen sich die Moleküle parallel zur Oberfläche in Schichten an. Diese Ordnung nimmt innerhalb weniger Moleküllagen ab und die Flüssigkeit wird zur Volumenflüssigkeit [Isr11], wie im unteren Teil der Abbildung 2.4 dargestellt. In Dichteprofilen der Flüssigkeit senkrecht zur Oberfläche führt dies zu einer gedämpften Oszillation, wie im oberen Bereich in Abbildung 2.4 gezeigt. Die höhere Ordnung an der Grenzfläche ändert die Eigenschaften der Flüssigkeit in der Nähe der Grenzfläche. So können sich zum Beispiel die Viskosität, die Polarität und der Brechungsindex an der Oberfläche von der Volumenflüssigkeit unterscheiden [Hen49; Kap06]. Daher wird bei Flüssigkeiten in direktem Kontakt mit der Grenzfläche von Grenzflächenflüssigkeiten und, im Fall von Wasser, von Grenzflächenwasser gesprochen.

Die Anordnung der Flüssigkeitsmoleküle an der Grenzfläche wurde experimentell zuerst nachgewiesen, indem eine wenige Nanometer dicke Wasserschicht zwischen zwei glatten Oberflächen platziert wurde. Die Kraft, die notwendig ist, um die Platten anzunähern, oszilliert in Abhängigkeit der Entfernung zwischen den Platten auf Grund der Anordnung der Moleküle. Die Oszillationsperiode entspricht dabei der Molekülgröße [Pas84]. Die Ordnung in der flüssigen Phase nahe der Grenzfläche konnte später auch mit XRR für verschiedene Systeme nachgewiesen werden. Hier wurden vor allem flüssige Metalle wie Gallium auf Diamant [Hui97] oder Aluminium auf Saphir [Oh05] untersucht und eine hohe Ordnung in den ersten Atomlagen der flüssigen Metalle gefunden.

An der Grenzfläche zwischen Siliziumdioxid und verschiedenen Flüssigkeiten konnte ebenfalls eine strukturierte Anordnung der Moleküle nachgewiesen werden, sowohl für kaum wechselwirkende, sphärische Moleküle wie Oktamethylcyclotetrasiloxan ($C_8H_{24}O_4Si_4$) [Yu01b], als auch für die unpolare Flüssigkeiten *n*-Hexan, *n*-Decan, Perfluorhexan und Cyclohexan

[Doe98; Doe00]. Die Anordnung in der Flüssigkeit führt auch zur Beobachtung einer Dichtedefizits zwischen Volumenflüssigkeit und Festkörperoberfläche. Dieses wird für die unpolaren Flüssigkeiten damit begründet, dass die Moleküle an der Oberfläche nicht dicht gepackt werden können [Doe00].

Komplizierter wird die Beschreibung der Strukturierung an einer Grenzfläche, wenn zwischen der Festkörperoberfläche und der Flüssigkeit Kräfte mit größerer Reichweite wirken. So können polare Moleküle wie Wasser an einer polaren Oberfläche orientiert werden. Dadurch wird Ordnung im oberflächennahen Wasser erzeugt. Die Ordnung konnte in Experimenten [Kag12] und in Simulationen [Jan07] nachgewiesen werden.

Die Stärke der Wechselwirkung zwischen Flüssigkeit und Oberfläche kann durch Untersuchung der Benetzung der Festkörperoberfläche mit einer Flüssigkeit bestimmt werden. Eine Charakterisierung der Benetzungseigenschaften ist anhand des makroskopisch beobachtbaren Kontaktwinkels θ möglich. Damit wird der Winkel zwischen einem Flüssigkeitstropfen und einer Oberfläche beschrieben. Der Kontaktwinkel wird von den Oberflächenenergien der festen Oberfläche, der Flüssigkeit und den Eigenschaften der Gasphase bestimmt. Ist der Kontaktwinkel der festen Oberfläche mit Wasser in Luft größer als 90° , wird sie als hydrophob bezeichnet. Ist θ kleiner als 90° , wird die Oberfläche hydrophil genannt. Als Beispiel sind in Abbildung 2.5 zwei Fotos für die in dieser Arbeit untersuchte hydrophobe Oktadecyltrichlorosilan (OTS) Oberfläche in Kontakt mit Wasser und (unpolarem) Diiodmethan dargestellt.

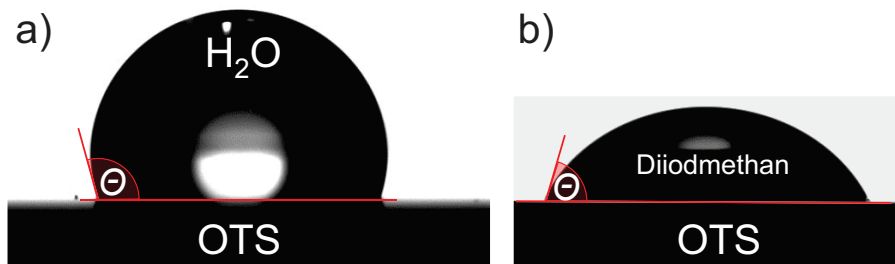


Abbildung 2.5: Fotos von Wasser (a) und Diiodmethan (b) auf OTS.

Der Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkel θ und den Oberflächenenergien γ wird mit der Young'schen Gleichung

$$\gamma_{OG} = \gamma_{OF} + \gamma_{FG} \cos \theta \quad (2.7)$$

beschrieben. Die Indizes stehen dabei für die beteiligten Komponenten (O für Oberfläche, F für Flüssigkeit, G für Gasphase). Bei Kontaktwinkelmessungen ist zu beachten, dass der gemessene Winkel einer Hysterese unterliegt. So ist der Kontaktwinkel zumeist größer, wenn die Oberfläche zuvor nicht benetzt war. Verringert man hingegen den benetzten Bereich, ist auch der gemessene Winkel kleiner. Da der Kontaktwinkel einer zuvor unbenetzten Oberfläche reproduzierbar messbar ist [Dav14], werden in dieser Arbeit nur solche Winkel angegeben. Geht man davon aus, dass der polare und der nicht polare Anteil unabhängig voneinander sind, folgt die Owens-, Wendt-, Rabel- und Kabel- (OWRK)-Gleichung [Owe69; Kae70]

$$\frac{(1 + \cos \theta) \gamma_F}{2 \sqrt{\gamma_F^n}} = \sqrt{\frac{\gamma_O^p \gamma_F^p}{\gamma_F^n}} + \sqrt{\gamma_O^n} \quad (2.8)$$

Die Größe γ_O^p bzw. γ_O^n beschreiben dann die polaren (Index p) bzw. nicht polaren (Index n) Anteile der Oberflächenenergie. Nach [Owe69; Kae70] zählen zu den polaren Anteilen die

Dipol-Dipol- und Debye-Wechselwirkungen sowie die H-Bindungen zwischen Flüssigkeit und Oberfläche. Die nicht polaren Anteile werden durch London'sche Kräfte erzeugt. Typische Werte für verschiedene Oberflächen sind in Tabelle 2.1 angegeben. Durch Bestimmung von γ_0^p und γ_0^n können die Eigenschaften einer Oberfläche und ihre Wechselwirkung mit Flüssigkeiten genauer beschrieben werden.

	θ [°]	γ [mN/m]	γ_0^n [mN/m]	γ_0^p [mN/m]
OTS	98,2 / 112 [Mez10]	$23,50 \pm 0,05$	$5,43 \pm 0,01$	$18,07 \pm 0,05$
SiO ₂	< 10	$77,36 \pm 0,02$	$68,13 \pm 0,01$	$9,23 \pm 0,02$

Tabelle 2.1: Werte für den Kontaktwinkel θ , die Oberflächenenergie γ und die polaren γ_0^p bzw. nicht polaren Anteile γ_0^n , wenn nicht anders angegeben entnommen aus [Jan06].

2.3.2 Hydrophobe Grenzflächen in Kontakt mit Wasser

Ein interessantes Problem stellt die Grenzfläche zwischen hydrophoben Medien und Wasser da [Cha05]. An einer hydrophoben Grenzfläche kann Wasser keine H-Bindungen mit der Grenzfläche ausbilden und ist somit nicht so stark orientiert wie an hydrophilen Oberflächen [Jan07; Kag12]. Aus diesem Grund wurde die Grenzfläche häufig untersucht, die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

Erste MD-Simulationen zu der Frage, wie Wasser sich an hydrophoben Oberflächen verhält, wurden in den 90er Jahren des 20sten Jahrhunderts durchgeführt [Gri96; Lum99; Mam04]. Die Studien führten zu Reflektivitätsmessungen mit Neutronen [Ste03] und Röntgenstrahlung [Jen03] an mit einer Monolage OTS beschichteten Siliziumwafern. Alle Experimente, wie auch die Simulationen, zeigten eine so genannte Verarmungsschicht an hydrophoben Oberflächen, konnten deren strukturellen Eigenschaften aber nur grob abschätzen.

Durch diese Studien sind mit OTS beschichtete Oberflächen das Standardsystem zur Untersuchung hydrophober Oberflächen. OTS Moleküle bestehen aus einer Kopfgruppe (SiCl₃) und einer Schwanzgruppe ((CH₂)₁₇CH₃) wie in Abbildung 2.6 dargestellt. Die OTS-Moleküle können über kovalente Bindungen der Kopf-Gruppe an die Siliziumdioxid-Oberfläche gebunden werden. Dabei gibt das OTS die Cl-Atome ab und bindet kovalent an die Oberfläche. Ein zuvor am Sauerstoff an der Oberfläche gebundenes H-Atom bildet mit dem Chlor HCl. Die Schwanzgruppen der OTS-Moleküle bilden so eine homogene, ungeladene Oberfläche. Eine genaue Beschreibung der Oberfläche folgt in Kapitel 4.1.

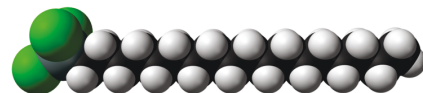


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines Oktadecyltrichlorosilan-(OTS)-Moleküls, die Atome sind farblich gekennzeichnet (grün: Cl, grau: Si, schwarz: C, weiß: H), aus [Wik16b] entnommen.

Nachfolgende Messungen mit höherer Auflösung konnten die Existenz der Verarmungsschicht an hydrophoben Oberflächen in Wasser bestätigen und ihre Dicke auf 1-6 Å eingrenzen [Mez06; Poy06; Mez10; Uys13]. Ein Elektronendichteprofil zwischen OTS und Wasser, das im Rahmen dieser Arbeit aus einer Messung berechnet wurde, ist in Abbildung 2.7a) dargestellt. Zwischen der Wasserphase und der OTS-Schwanzgruppe ist das Dichtedefizit gekennzeichnet, der Einschub zeigt die Messwerte und die aus dem Elektronendichteprofil berechnete Anpassung.

Die starke Variation der experimentell bestimmten Schichtdicke rührt daher, dass bei der Berechnung des Elektronendichteprofiles die Schichtdicke, die Rauigkeit und die Elektronen-

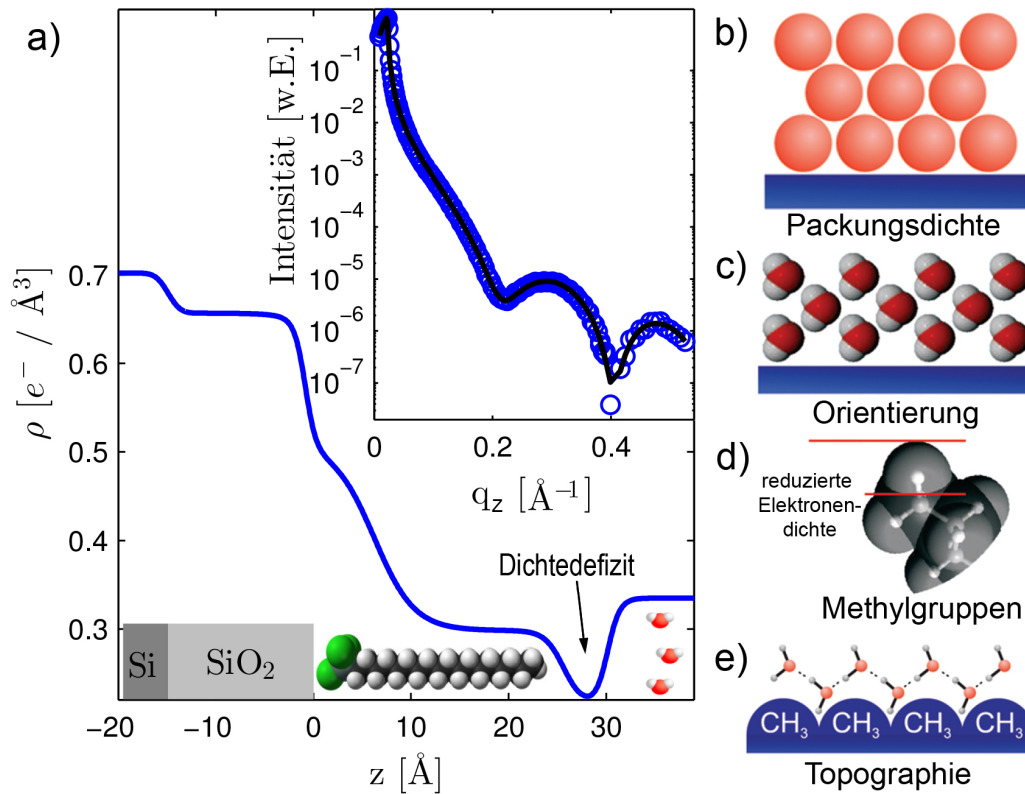


Abbildung 2.7: a) Elektronendichteprofil eines mit OTS beschichteten Silizium-Wafers. Der Einsatz zeigt die Messdaten und die aus dem Elektronendichteprofile berechnete Anpassung an die Daten. Die verschiedenen Bestandteile des Elektronendichteprofiles sind im unteren Bereich skizziert. b)-e) Verschiedene Möglichkeiten, die Verarmungsschicht auf hydrophoben OTS-Oberflächen zu erklären, weitere Erläuterungen im Text; b)-e) mit Modifikation nachgedruckt aus [Mez10], ©(2010), American Chemical Society.

dichte der Verarmungsschicht miteinander gekoppelt sind. So haben Mezger *et al.* beobachtet [Mez06], dass die Qualität des angepassten Intensitätsverlaufs gleich bleibt, wenn die Schichtdicke der Verarmungsschicht zwischen 1\AA und 6\AA zusammen mit der Elektronendichte variiert wird. Daher haben sie die Eigenschaften der Verarmungsschicht als Produkt aus Schichtdicke und Elektronendichtedifferenz zwischen dem Minimum der Verarmungsschicht und Wasser definiert. Mamatkulov *et al.* [Mam04] haben das Dichtedefizit aus ihren Simulationen über eine Integration der Elektronendichteprofile im Bereich der Verarmungsschicht bestimmt. Dabei konnten sie die in Simulationen einzeln zugänglichen Dichteprofile der Oberfläche und der Flüssigkeiten verwenden, was in experimentell ermittelten Elektronendichteprofilen nicht möglich ist. Eine allgemeine genutzte Definition zur Charakterisierung des Dichtedefizits existiert aber nicht, daher ist der Vergleich der verschiedenen Studien schwierig.

Der Ursprung der Verarmungsschicht wurde wegen der geringen Ausdehnung und der damit einhergehenden schweren Zuordnung kontrovers diskutiert. Die einzige Messmethode, die die nötige Auflösung zur Messung der Schicht besitzt, ist XRR. Mit XRR kann aber nur die Änderung der Elektronendichte bestimmt werden, eine Zuordnung des Defizits zur Oberfläche oder Flüssigkeit ist nur mit XRR daher nicht möglich.

In der Literatur werden verschiedene mögliche Gründe für die Verarmungsschicht diskutiert. Sie sind in Abbildung 2.7b)-e) zusammengefasst. So kann sowohl die Art und Weise, wie die Wassermoleküle an der Oberfläche gepackt werden (2.7 b)) als auch die Orientierung der Wassermoleküle (2.7 c)) eine Rolle spielen. Des Weiteren enden die meisten untersuchten hydrophoben Oberflächen mit einer Methylgruppe, die, im Gegensatz zum Rest der Schwanzgruppe, ein Wasserstoffatom anstatt eines Kohlenstoffatoms enthält (2.7 d)). Da Wasserstoff sieben Elektronen weniger als Kohlenstoff besitzt, wird die gemessenen mittleren Dichte am Ende der Schwanzgruppe herabgesenkt. Zusätzlich kann auch die Topographie der Oberfläche einen Einfluss auf die Anordnung der Wassermoleküle haben (2.7 e)).

Nach aktuellem Stand der Forschung führt eine Kombination aus mehreren Effekten zur Verarmungsschicht. So konnten Mezger *et al.* durch Kombination von XRR-Messungen und MD-Simulationen zeigen, dass die Wassermoleküle bevorzugt mit einem Wasserstoffatom zur Oberfläche orientiert sind und sich die Sauerstoffatome in der Mitte der ersten Wasserschicht befinden [Mez10]. Dadurch verschiebt sich der Schwerpunkt der Elektronen der ersten Wasserschicht von der Oberfläche zur Wasserphase. Das auch die Methylgruppe einen Beitrag zur verringerten Elektronendichte hat, wurde von Ocko *et al.* [Ock08] diskutiert. Nach Mezger *et al.* [Mez10] beträgt dieser 31 % einer Wassermonolage.

Des Weiteren konnten sowohl Mezger *et al.* [Mez10] als auch Uysal *et al.* [Uys13] zeigen, dass auf hydrophoben Monolagen aus Fluoralkylsilan-Molekülen unterschiedlicher Kettenlänge eine Verarmungsschicht existiert.

Eine solche Verarmungsschicht wurde mittels Neutronenreflektivitäts-Messungen zudem zwischen Materialien unterschiedlicher Polarität und Lösungsmitteln gemessen [Mac07; Gut11]. Die Verarmungsschicht ist allerdings selbst für die OTS-Wasser-Grenzfläche deutlich größer als in XRR-Experimenten. So haben Maccerini *et al.* eine Schichtdicke von $16 \pm 5 \text{ \AA}$ für die Verarmungsschichten zwischen hydrophob beschichteten Oberflächen und Flüssigkeiten wie teilweise deuteriertem Dodecanthiol oder Wasser gefunden [Mac07]. Da für die Experimente Moleküle mit einer Länge von 16 \AA bei einer Oberflächenrauigkeit von $14\text{--}16 \text{ \AA}$ genutzt wurden, und Neutronenreflektivitäts-Messungen gleichzeitig einen geringere Auflösung haben, sind die Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig.

Auch zwischen unpolarem Cyclohexan bzw. Oktan und einer hydrophoben Oberfläche konnte eine Verarmungsschicht nachgewiesen werden. Gutfreund *et al.* haben die Grenzfläche zwischen OTS und Cyclohexan mit einen deutlich größeren Messbereich untersucht und eine Verarmungsschicht mit einer Dicke von 14 \AA und einem Dichtedefizit von 30 % in der Flüssigkeitsphase bestimmt [Gut11]. Zwischen Siliziumdioxid und den gleichen Flüssigkeiten betrug die Dicke des Defizits ungefähr 30 \AA .

2.4 Proteine

Im folgenden Abschnitt wird die Struktur von Proteinen in Lösung und als Adsorbat an der fest-flüssig-Grenzfläche beschrieben. Die Proteinstruktur kann unter anderem durch die Zugabe von Kosolventien [Tim03], den Kontakt mit einer Grenzflächen [Roa05; Raf10] oder Änderung der thermodynamischen Umgebungsvariablen (p, T, \dots) [Her98; Gro94; Kie14b] geändert oder zerstört werden. Der Prozess wird als Entfaltung bezeichnet, die zu Grunde liegenden Mechanismen werden nachfolgend erläutert. Die Beschreibung der Proteine beruht auf den Quellen [Bra99] und [Les10].

2.4.1 Proteine in Lösung

Der hydrophobe Effekt ist entscheidend für die Struktur von biologischer Materie wie Lipidmembranen/-mizellen und Proteinen. Die dreidimensionale Struktur von Proteinen wird von ihrer Aminosäuresequenz bestimmt. Die Aminosäuren können auf verschiedene Arten wechselwirken, hierzu gehören ionische, hydrophobe und van-der-Waals Wechselwirkungen. Außerdem können sie Disulfid- und H-Bindungen eingehen. In Abbildung 2.8 sind die chemischen Strukturen der 20 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren dargestellt und anhand der Eigenschaften ihrer Seitenketten (unpolar,polar, basisch, sauer) sortiert.

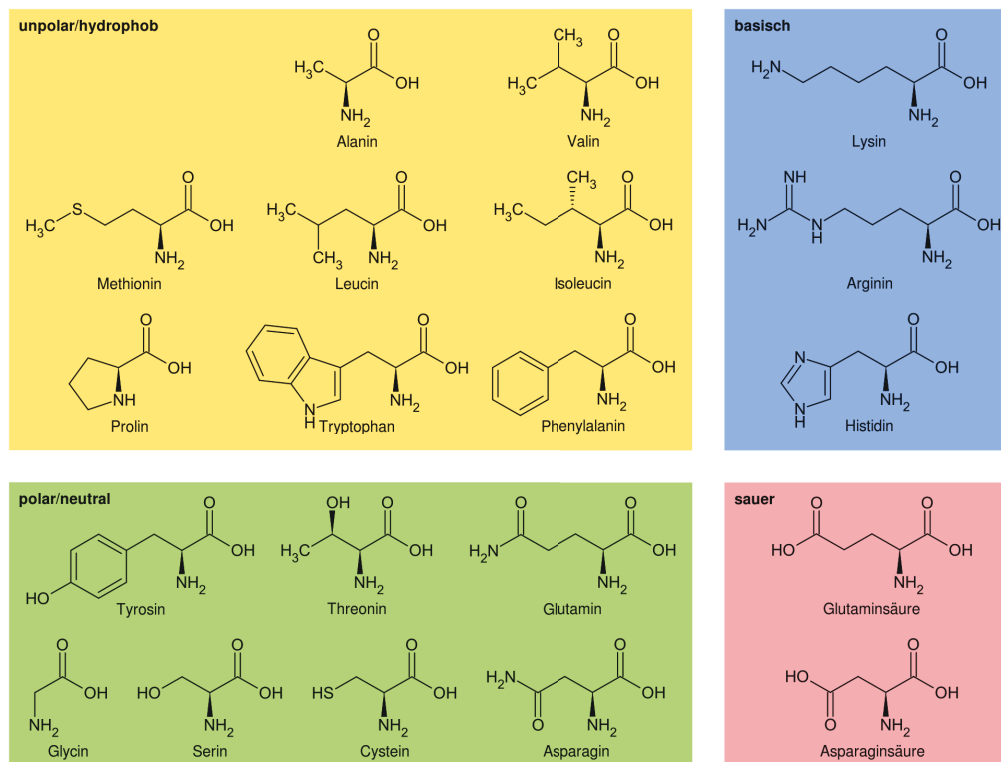


Abbildung 2.8: Chemische Strukturen der Aminosäuren eingeteilt nach den Eigenschaften ihrer Seitenketten, entnommen aus [Wik16c].

Aminosäuren sind in Proteinen in Ketten mit kurzen Seitenketten angeordnet. Die Kette wird als Primärstruktur bezeichnet und ist dadurch gekennzeichnet, dass jede Aminosäuren nur mit ihren direkten Nachbarn über Peptidbindungen verbunden ist. Durch die verschiedenen Wechselwirkungsarten der Aminosäuren bilden Proteine in wässrigen Lösungen dreidimensionale Strukturen aus, die sogenannte Tertiärstruktur des Proteins. Der Prozess der Strukturbildung wird als Faltung bezeichnet. Die hydrophoben Bereiche der Kette ordnen sich auf Grund des hydrophoben Effektes im Inneren des Proteins an. Gleichermäßen orientieren sich die meisten hydrophilen Bereich zum Wasser und bilden eine hydrophile Hülle, die mit dem Wasser interagiert. Außerdem können die Aminosäuren auch im Protein H-Bindungen sowohl mit Wasser als auch untereinander eingehen.

In dieser Arbeit wird das Protein Lysozym untersucht, dessen Form sich mit einer Ellipse mit zwei kurzen Achsen mit 30 Å Länge und einer langen Achse mit 45 Å Länge annähern lässt. In wässrigen Lösungen mit dem hier genutzten pH-Wert von 7,1 ist es positiv geladen. Der

isoelektrischen Punkt liegt bei 11. In Abbildung 2.9 ist die Struktur von gefaltetem Lysozym zu sehen. Innerhalb der Tertiärstruktur bilden die Aminosäuren eines Proteins weitere charakteristische Strukturen wie Helizes, Faltblätter oder Schleifen (Sekundärstruktur) aus. Sie werden durch die Wechselwirkung der Aminosäuren untereinander erzeugt und treten in den meisten Proteinen auf. Die Bereiche sind für Lysozym in Abbildung 2.9a) farblich gekennzeichnet. Abbildung 2.9b) zeigt die hydrophoben und hydrophilen Bereiche und die Hülle des Proteins als grauen Schatten.

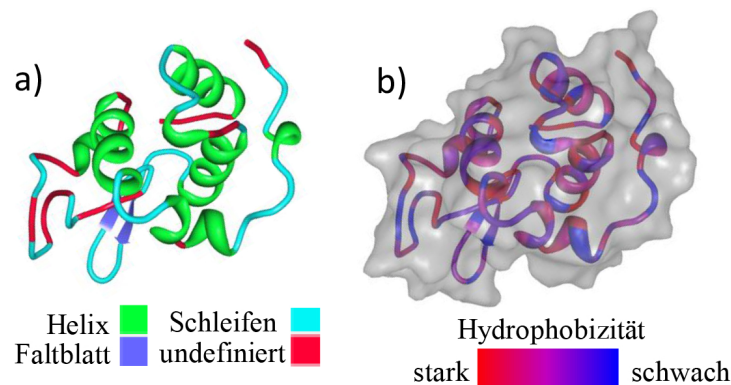


Abbildung 2.9: Darstellungen der gefalteten Aminosäurekette des Proteins Lysozym. Abbildung a) zeigt die unterschiedlichen Elemente der Sekundärstruktur, in Abbildung b) ist die Oberfläche des Proteins dargestellt, außerdem ist die Hydrophobizität der einzelnen Proteinbereiche zu erkennen. Die Abbildung wurde erstellt mit dem Proteindatabaseeintrag 2Lyz und dem Programm RCSP Protein Workshop auf Basis von [Mor05; Xu09].

Auf Grund der komplexen Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren, die die Struktur des Proteins bestimmen, reagieren Proteine auf Änderungen der Umgebungsvariablen (p, T, \dots) oder das Hinzufügen von Salzen oder Molekülen. Die native Form des Proteins kann dadurch kollabieren, der Prozess wird als Entfaltung bezeichnet. Für die Änderung der freien Gibbschen Energie eines Proteins vom gefalteten in den entfalteten Zustand gilt dann [Mee06]

$$\Delta G_{\text{entf}} = -\Delta SdT + \Delta Vdp \quad (2.9)$$

mit der Entropieänderung ΔS , der Temperatur T , der Volumenänderung ΔV und dem Druck p . Erhöht man somit den Druck bei konstanter Temperatur, verringert sich das Volumen des Proteins und es kann entfaltet werden. Der Einfluss von Druck auf die Proteinstruktur ist in [Gro94; Boo02; Roy02; Mee06] ausführlich beschrieben. Maßgeblich ist hierbei, dass durch die Änderung des Volumens Packungsdefekte im Protein reduziert werden können [Gek79] und zudem zuvor innen liegende Bereiche mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommen. Auch Änderungen der Ladungsverteilung und daraus folgende Umorientierung der Wassermoleküle können die Folge einer Druckerhöhung sein.

Die durch Druck hervorgerufenen Modifikationen sind in vielen Proteinen bis zum hier verwendeten Druck von 5000 bar zerstörungsfrei. So sind die Änderungen an der Struktur von Lysozym in Wasser bis 5000 bar vollständig reversibel [Her98] und die Sekundärstruktur bleibt erhalten [Sch11].

Die Entfaltung eines Proteins kann auch durch Zugabe verschiedener Stoffe erfolgen, sie werden als Chaotropen oder Denaturanten bezeichnet. Sie können in das Protein eindringen und dadurch die Bindungen im Protein beeinflussen, dabei wechselwirken sie sowohl mit den

Aminosäuren als auch mit dem Wasser innerhalb des Proteins. Chaotrope Stoffe werden zudem oft im Zusammenspiel mit Änderungen der Temperatur [Tim03] oder des Drucks genutzt [Sas99].

Ein häufig eingesetzter Chaotrop ist das auch in dieser Arbeit verwendete Urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$). Es kann sowohl hydrophob wechselwirken als auch H-Bindungen eingehen. In Abbildung 2.10 ist die chemische Struktur dargestellt. Ob Urea die Entfaltung indirekt (über eine Änderung der H-Bindungen im Wasser) oder direkt (über hydrophobe Wechselwirkung) beeinflusst, wurde in der Literatur kontrovers diskutiert [Ros08; Zho11]. Aktuelle Studien stützen die These der direkten Wechselwirkung [Hua08; Zan09; Can11; Son14]. So konnten Hua *et al.* [Hua08] zum Beispiel zeigen, dass Urea das Wasser aus dem Protein verdrängt und das Protein so entfaltet. Anschließend binden an die entfaltenen Seitenketten weitere Ureamoleküle. Die Simulationsergebnisse werden von experimentellen Resultaten unterstützt [Jha09; Son14].

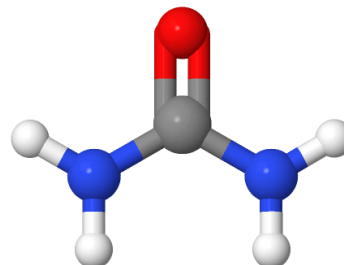


Abbildung 2.10: Darstellung des Denaturants Urea, die Atome sind farblich gekennzeichnet (weiß: H; rot: O; grau: C; blau: N), die Abbildung wurde mit Jmol (<http://www.jmol.org/>) erstellt.

2.4.2 Proteinadsorbate an der fest-flüssig-Grenzfläche

Grenzflächen ändern nicht nur die Struktur der Flüssigkeit, auch in ihr gelöste Moleküle werden von der Grenzfläche beeinflusst. Eine Vielzahl von Mechanismen können zur Adsorption von Molekülen wie zum Beispiel Proteinen an Oberflächen führen. Unterschiedliche Ladungen im Protein und an der Oberfläche tragen zur Bildung von Adsorbatschichten bei, an hydrophoben Oberflächen spielt der hydrophobe Effekt eine wichtige Rolle. So können amphiphile Moleküle durch die Bindung an eine hydrophobe Oberfläche den Kontakt ihrer hydrophoben Oberflächenanteile mit Wasser minimieren. Ein Beispiel ist die Adsorption von Urea an hydrophoben Oberflächen, welche sowohl in Simulationen [Zan09] als auch experimentell [Wir15] beobachtet wurde. Abhängig von der Art und Stärke der Wechselwirkung zwischen den Molekülen und der Oberfläche können die Moleküle wieder von der Oberfläche desorbieren, bis sich nach einiger Zeit an der Oberfläche ein Gleichgewicht einstellt. Der Bedeckungsgrad der Oberfläche mit den Molekülen ist somit auch ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung.

Proteine stellen einen Sonderfall bei der Betrachtung von Adsorptionsprozessen dar, da sie ihre Form ändern und dadurch auf verschiedenen Oberflächen auf unterschiedliche Arten adsorbieren können. Die Adsorption hängt daher stark von der Natur der Oberfläche und der des Proteins ab. Auf hydrophilen Oberflächen kann das Protein im nativen Zustand adsorbieren. Da die hydrophile Hülle des Proteins in Kontakt mit der hydrophilen Oberfläche ist, werden viele Proteine nicht entfaltet und erhalten ihre natürliche Form [Ric13; Kie14b; Göh15].

Auf hydrophoben Oberflächen hingegen entfalten Proteine meist. Der hydrophobe Effekt führt dazu, dass es für Proteine energetisch günstiger ist, ihre innen liegenden, hydrophoben Bereiche an die hydrophobe Oberfläche zu bringen [Cha04]. Die hydrophilen Bereiche des Proteins orientieren sich hierbei mehrheitlich zum Wasser hin und sorgen so dafür, dass die Eigenschaften der Oberfläche stark verändert werden und sie ihren hydrophoben Charakter verliert [Gol12]. Wegen der starken Wechselwirkung tritt Proteinadsorption auf nahezu allen hydrophoben Oberflächen, die in Kontakt mit Proteinlösungen sind, auf [Rab11] und ist

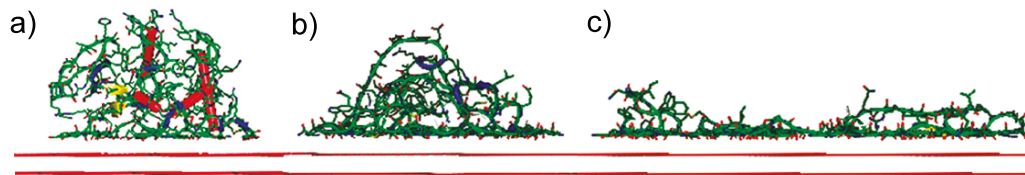


Abbildung 2.11: Verschiedene Zustände adsorbierten Lysozyms auf zwei Lagen Graphen (rote Linien). a) zeigt die günstigste Adsorptionsgeometrie am Anfang der Simulation, noch vorhandene Sekundärstrukturen sind rot (α -Helizes) bzw. gelb (β -Faltblätter) gekennzeichnet. In b) ist ein metastabiler finaler Zustand ohne Sekundärstruktur dargestellt, in c) der stabilsten beobachtete Endzustand. Abbildungen mit Modifikation nachgedruckt aus [Raf10], ©(2010), American Chemical Society.

meist irreversibel.

Beispiele für denaturierte adsorbierte Proteine auf einer hydrophoben Oberfläche sind in Abbildung 2.11 dargestellt. Die Abbildung zeigt verschiedene Stadien der Adsorption eines Lysozym-Moleküls auf Graphen und wurde aus Schnappschüssen während einer MD-Simulation erstellt [Raf10]. In Abbildungsteil 2.11a) ist die günstigste Geometrie zu Beginn des Adsorptionsprozesses zu sehen. Das Lysozymmolekül ist mit der langen Achse parallel zur Oberfläche adsorbiert und ein Teil der Sekundärstruktur bleibt erhalten. Der Zustand zerfällt innerhalb der Simulationszeit (200 ps) in verschiedene Endzustände. In 2.11b) ist das Protein in einem metastabilen Endzustand, in c) im stabilsten Endzustand. In beiden Zuständen ist keine Sekundärstruktur mehr vorhanden und Teile des Proteins sind in die Flüssigphase gerichtet.

Das Beispiel illustriert, wie stark der Einfluss der Oberfläche auf die Proteinstruktur ist. Da Simulationen an Proteinsystemen sehr komplex sind und langreichweitige Wechselwirkungen häufig vernachlässigt werden, sind die Erkenntnisse nur im Vergleich mit experimentellen Untersuchungen an Proteinadsorbaten nutzbar. Die *in situ*-Untersuchungen der Proteinschichten ist auf Grund der schlechten Zugänglichkeit der Grenzfläche nicht mit vielen Methoden möglich. Eine Zusammenfassung der Methoden findet sich zum Beispiel in [Zae12].

Auch mit XRR wurden Untersuchungen zur Struktur von Proteinadsorbatschichten an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen durchgeführt (unter anderem in [Lu98; Häh12; Ric13; Kie14b]). Sie ergeben detaillierte Elektronendichteprofile der Proteinadsorbatschichten in wässrigen Lösungen. Die für diese Arbeit relevanten Studien werden in Kapitel 6 diskutiert und mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen.

Der Einfluss von Druck auf Adsorbatschichten aus Proteinen und die Adsorption von Proteinen ist bisher sehr selten erforscht worden. Wie zuvor beschrieben, werden Proteine ab einem kritischen Druck denaturiert. Gleichzeitig kann Druck die Wechselwirkung zwischen der Oberfläche und dem Protein beeinflussen. Die Adsorption von Proteinen auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen unter Druck ist bisher nur in einer Studie analysiert worden [Koo13]. Es konnte ein leichtes Schichtwachstum mit steigendem Druck beobachtet werden, das mit einer Abschwächung der Entfaltungsenergie gemäß Gl. (2.9) auf Grund des Druckanstiegs assoziiert wurde. Die Studie zu der in dieser Arbeit genutzten Hochdruckzelle beinhaltet die Untersuchung der Denaturierung von Lysozym durch Druck unter Einfluss der Kosolvens Guanidiniumchlorid [Wir14]. Hier wurde bei erhöhter Temperatur von 40 °C ein Anstieg der Schichtdicke unter Druck festgestellt. Weitere Studien über den Einfluss von Druck auf die Struktur adsorbierter Proteine sind nicht bekannt, obwohl viele Studien zum Einfluss von Druck auf Proteine in Lösung durchgeführt wurden. Der Grund ist vermutlich der schwierige experimentelle Zugang zu Oberflächen in Flüssigkeiten unter Druck.

Kapitel 3

Messapparaturen an Synchrotronstrahlungsquellen

Im nachfolgenden Kapitel werden die zur Durchführung der Reflektivitätsmessungen genutzten Messzellen und Strahllinien (engl. Beamlines) an verschiedenen Synchrotronstrahlungsquellen vorgestellt.

3.1 Messzellen

Zur Durchführung der Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Zellen genutzt.

Die Hochdruckexperimente wurden mit der in Abbildung 3.1a) dargestellten Hochdruckzelle durchgeführt. Die Zelle wurde von F. Wirkert im Rahmen seiner Dissertation [Wir15] konstruiert und ist in dieser und in [Wir14] detailliert beschrieben. Sie besteht aus einem äußeren druckresistenten Zellkörper und einer Innenzelle mit separatem Volumen.

Die äußere Zelle wird an den Ein- bzw. Austrittsöffnungen mit zwei Diamantfenstern verschlossen. Sie sind für den Röntgenstrahl transparent und haben zugleich den Vorteil, dass sie dem Druckunterschied von mehreren 1000 bar standhalten können. Der Strahlengang durch die Diamanten ist in Abbildung 3.1b) zu sehen.

Der Druck wird über eine Handspindelpumpe erzeugt und an der Hochdruckzelle und der Pumpe gemessen. Die Innenzelle kann Siliziumwafer der Größe $7,6 \times 7,6 \text{ mm}^2$ aufnehmen und ist in Abbildung 3.1c) dargestellt. Durch die etwas kleineren Wafer im Vergleich zur Probenzellengröße ist sichergestellt, dass die Proben nicht verspannen. In dem Bereich, in dem der Röntgenstrahl auf die Probe treffen soll, wird die Innenzelle mit Kaptonfolie beklebt. Sie ist transparent für den Röntgenstrahl und chemisch inert. Da die Folie aber nicht flexibel ist und durch die Volumenänderung in der Innenzelle unter Druck reißen würde, wird die Innenzelle zusätzlich mit einer flexiblen Membran geschlossen. Wie in Abbildung 3.1c) zu sehen ist, hat die Schraube, die die Innenzelle verschließt, eine Bohrung. Sie wird mit der Membran beklebt und sorgt somit für den Druckausgleich zwischen den $400 \mu\text{l}$ Probenvolumen und dem Druck übertragenden Wasser aus der Pumpe.

Die meisten Experimente unter Normaldruck wurden mit der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Zelle durchgeführt. Die Zelle ist in Abbildung 3.2 dargestellt und bietet mehrere Vorteile gegenüber bereits vorhandenen Zellen zur Vermessung der fest-flüssig-Grenzfläche. So ist die Flüssigkeit leicht zugänglich und kann einfach getauscht oder verändert werden. Außerdem ist es mit der neuen Zelle wegen der hohen Dichtigkeit möglich, schnell verdamp-

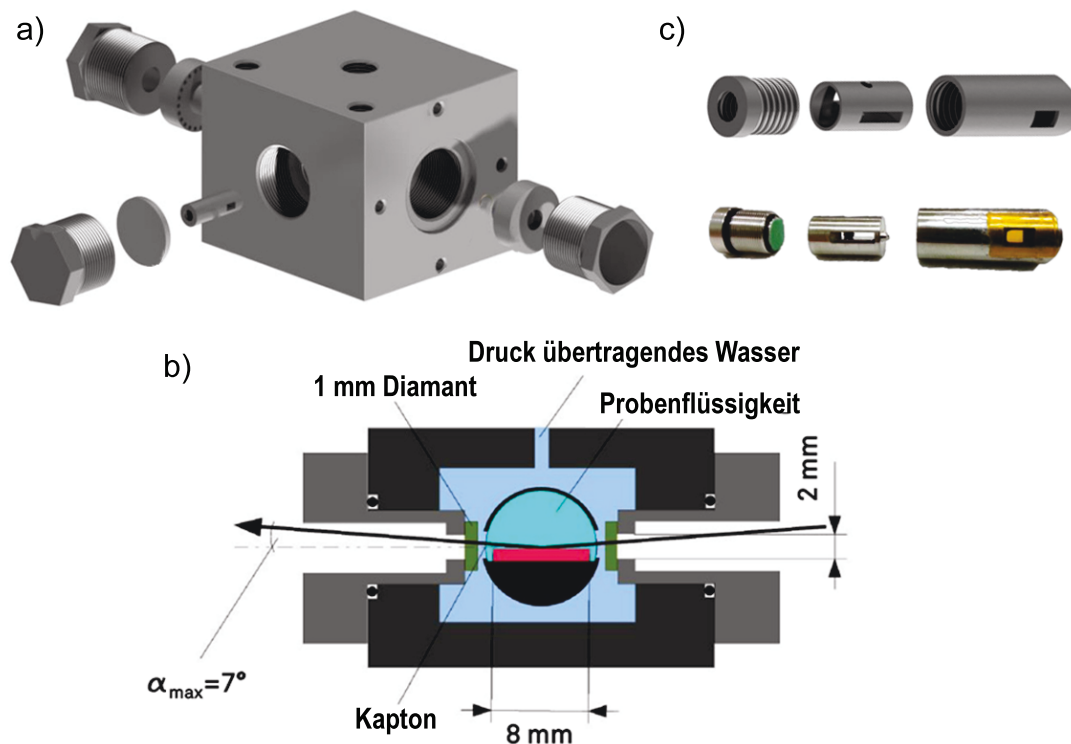


Abbildung 3.1: a) Konstruktionszeichnung und b) Skizze mit Strahlengang der XRR-Hochdruckzelle. c) Konstruktionszeichnung und Fotos der Innenzelle. Abbildungen entnommen aus [Wir14], Nachgedruckt mit Erlaubnis der International Union of Crystallography.

fende Stoffe wie Chloroform oder Ether und deren Gemische als Flüssigkeitsphase zu nutzen. Zudem kann die Temperatur der Probe schnell und kontrolliert geändert werden.

Die Zelle wurde in Zusammenarbeit mit dem Konstruktionsbüro der Fakultät Physik unter Leitung von Herrn Rudloff konstruiert. Ein Teil der Konstruktionszeichnungen ist in Abbildung 3.2a) dargestellt, das Design ist ähnlich der in [Kie14a] vorgestellten Zelle. Die vollständigen Konstruktionszeichnungen befinden sich im Anhang ab Seite 111.

Die Zelle besteht aus einem Zellkörper mit drei Öffnungen von jeweils $20 \times 20 \text{ mm}^2$. Sie werden mit zwei abnehmbaren Fenstern und einem Deckel verschlossen und mit O-Ringen ($27,5 \times 1,5 \text{ mm}^2$) abgedichtet. Die Fenster werden mit Kaptonfolie beklebt. Die Zelle ist so konstruiert, dass die Flüssigkeit in der Zelle nur mit dem Kapton und dem abdichtenden O-Ring in Kontakt ist, nicht aber mit dem Kleber. Somit können auch Flüssigkeiten untersucht werden, die den verwendeten Kleber lösen können.

Unterhalb des Zellkörpers wird ein Heizboden angebracht, über den die Zelle mit einem Flüssigkeitskreislauf gekühlt oder beheizt werden kann. Außerdem ist es möglich, einen Delrinboden zu befestigen, der die Zelle thermisch von der Befestigung an der Beamline entkoppelt. Der Siliziumwafer wird in einem Probenhalter befestigt, der Proben mit einer Fläche von $10 \times 18 \text{ mm}^2$ aufnehmen kann und durch die obere Öffnung des Zellkörpers getauscht wird. Im Boden des Zellkörpers befinden sich zwei Stifte, die den Probenhalter fixieren. Fotos der Zelle sowie aller Einzelteile sind in Abbildung 3.2b) zu sehen.

Die Zelle kann mit eingebautem Probenhalter ein Flüssigkeitsvolumen von maximal 10 ml aufnehmen. Bereits 4 ml Flüssigkeit reichen zur Durchführung einer Messung aus. Die Maße der Zelle wurden so gewählt, dass relativ große Siliziumwafer vermessen werden können, die

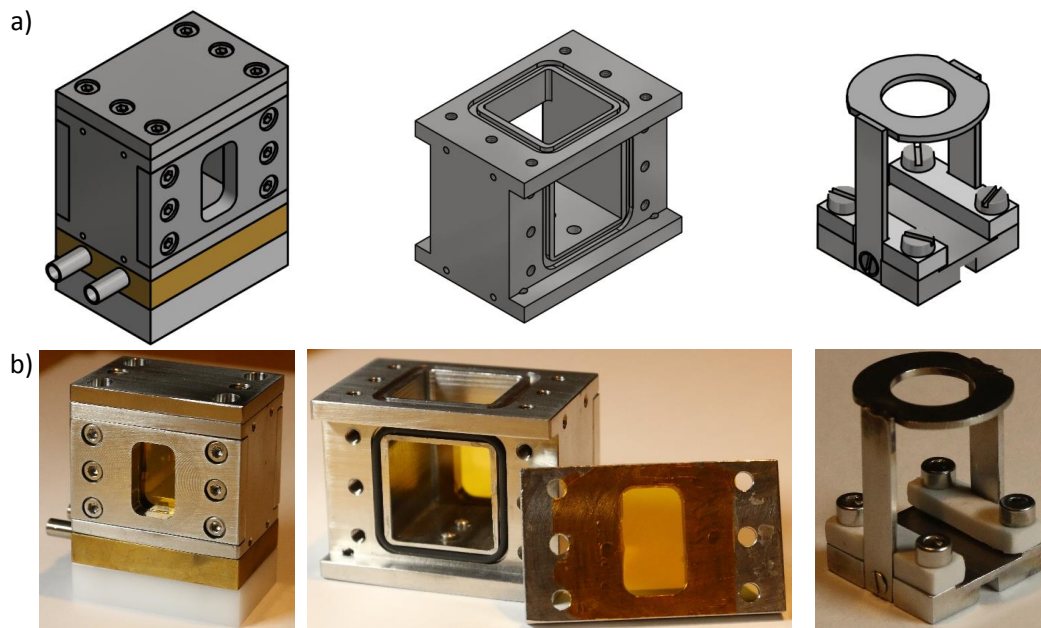


Abbildung 3.2: Konstruktionszeichnung (a)) und Fotos der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten XRR-Zelle (b)). Von links nach rechts: Die zusammengebaute Zelle; der innere Zellkörper; der Probenhalter für Siliziumwafer.

Transmission durch die Flüssigkeit aber gleichzeitig groß genug ist, um eine schnelle Messung zu ermöglichen.

3.2 Beamlines

Zur Durchführung der Experimente ist hochenergetische, intensive Röntgenstrahlung notwendig. Sie wird von Elektronenspeicherringen, sogenannten Synchrotronstrahlungsquellen, bereitgestellt. Die Strahlung an allen für diese Arbeit genutzten Messplätzen wird von einem „insertion device“ (ID) erzeugt, damit werden im Englischen Wiggler oder Undulatoren bezeichnet. Weitere Details hierzu und allgemein zu Synchrotronstrahlungsquellen finden sich zum Beispiel in [Als11] oder in [Wil96].

Zwischen dem insertion device und dem Messplatz wird der Strahl durch optische Elemente fokussiert und monochromatisiert. Durch Absorber ist es möglich die auf die Probe treffende Strahlung abzuschwächen und somit Strahlenschäden zu verhindern. Außerdem kann über Blendensysteme vor der Probe die Strahlgröße festgelegt werden, Blendensysteme hinter der Probe schirmen Streustrahlung ab.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente an verschiedenen europäischen Synchrotronstrahlungsquellen durchgeführt. Neben der Beamline 9 des DELTA in Dortmund ([Pau08; DEL16]) wurde an der I07 der Diamond Light Source in England ([Arn12; Dia16]) und an den ESRF Beamlines ID15A [Rei03b] und ID31 ([ESR16]) in Frankreich gemessen. Zu Beachten ist hierbei, dass die beiden ESRF-Beamlines nahezu identisch sind. Die ID15A wurde abgebaut und als ID31 an anderer Stelle neu errichtet. Abhängig vom Messplatz variiert die Photonenenergie und Flussdichte. Diese und weitere charakteristische Eigenschaften der jeweiligen Beamlines sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

In Abbildung 3.3 sind die beiden für diese Arbeit genutzten Zellen an der Beamline ID31

Beamline	BI9	I07	ID15A	ID31
Synchrotronstrahlungsquelle	DELTA	Diamond	ESRF	ESRF
genutzte Energie [keV]	27	30	70	70
Strahlgröße (v x h) [μm^2]	100/200 x 1000	100x300	4-6x25	4-6x40
Detektor	1D / 2D	2D	1D	2D
Photonen [s^{-1}]	7×10^8	10^{14} ^a	2×10^{10}	10^{12}
Messzeit [min]	45/30	20	35	5

Tabelle 3.1: Eigenschaften der verschiedenen Beamlines an europäischen Synchrotronstrahlungsquellen, als Messzeit ist die durchschnittliche Dauer einer kompletten Messung an der OTS-Wasser-Grenzfläche bei Atmosphärendruck angegeben. ^a bei einer Energie von 10 keV, bei der genutzten Energie von 30 keV ist der Fluss geringer

der ESRF gezeigt. Die meisten der vorgestellten Messungen wurden an dieser Beamline durchgeführt. Der Strahl tritt hier nach einem Blendensystem aus einer Kreisblende am Ende des Austrittsrohres aus, hierdurch soll Streustrahlung reduziert werden. Vor der Blende befindet sich eine Diode zur Messung der einfallenden Intensität. Sie kann zur Bestimmung der Strahlungsdosis genutzt werden. Nach der Probenzelle folgen zwei Blendensysteme, eine Diode und der Maxipix-Detektor.

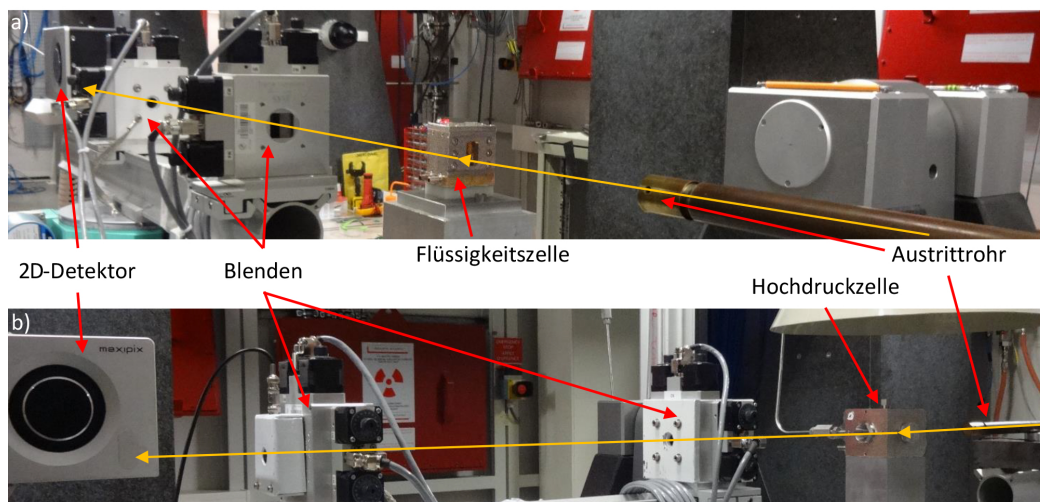


Abbildung 3.3: Die für diese Arbeit genutzten Zellen an der Beamline ID31 der ESRF mit Kennzeichnung der verschiedenen Elemente der Beamline. In a) ist die neu designte Zelle zu sehen, in Abbildungsteil b) die Hochdruckzelle.

Kapitel 4

Probenpräparation und -charakterisierung

Um XRR-Messungen an Oberflächen durchführen zu können, müssen sie, über den Bereich der Strahlgröße sehr glatt, flach und homogen sein. Um die Eigenschaften für die in dieser Arbeit fast ausschließlich genutzte Oktadecyltrichlorosilan (OTS)-Oberfläche gewährleisten zu können, muss nach der Herstellung eine ausführliche Charakterisierung erfolgen, welche in diesem Kapitel beschrieben wird. Zur Charakterisierung wurden die Proben mittels Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscope, AFM), XRR und Kontaktwinkelmessungen untersucht.

Zuvor wird beschrieben, wie die OTS-Monolagen an die Oberfläche des Siliziumwafers binden und die für diese Arbeit genutzte Präparationsmethode vorgestellt.

Die OTS-Proben sind im trockenen Zustand resistent gegen Strahlenschäden. Bei Messung in Flüssigkeiten erzeugt der Röntgenstrahl jedoch freie Radikale in der flüssigen Phase, die die Oberfläche angreifen. Die dadurch ausgelösten Prozesse werden im darauf folgenden Abschnitt beschrieben.

Des Weiteren ist zur Auswertung der Reflektivitätsmessungen die Kenntnis des Substrats und der Dichte der untersuchten Materialien notwendig. Alle vorgestellten Messungen wurden auf Siliziumwafern mit einer Siliziumdioxidschicht durchgeführt. Die Eigenschaften der dünnen Siliziumdioxidschicht sind nicht vollständig geklärt und werden in der Literatur diskutiert. Daher werden im anschließenden Abschnitt die verwendeten Modelle vorgestellt.

Die Dichte der verwendeten Flüssigkeiten kann bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck für alle verwendeten Materialien und Flüssigkeiten berechnet oder mittels eines Dichteschwingers gemessen werden. Die Druckabhängigkeit der Dichte der unter Hochdruck studierten Urea-Lösungen ist aber nicht bekannt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Absorptionsmessungen mit Röntgenstrahlung zur Bestimmung der Dichte durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen werden mit verfügbaren Literaturwerten für Wasser und Kontrollmessungen in kommerziellen Dichteschwängern bei niedrigen Drücken verglichen.

4.1 Präparation der OTS-Proben

Die Präparation der OTS-Schichten erfolgt mit einigen Modifizierungen nach der von Mezger *et al.* [Mez06] vorgestellten Methode. Ein Überblick über die verschiedenen Präparationsmethoden ist in [Onc05] zu finden.

Zu Beginn werden die bereits geschnittenen Siliziumwaferstücke nacheinander für 15 Mi-

nuten in Isopropanol (Sigma Aldrich¹), Aceton (Sigma Aldrich) und Chloroform (Sigma Aldrich) im Ultraschallbad gereinigt. Hierdurch sollen organische Verschmutzungen beseitigt werden. Durch die Reibung der Wafer aneinander werden zudem die Kanten geglättet, ansonsten kann es beim Einbau der Proben zu Problemen kommen. Anschließend werden die Wafer für 30 bis 45 Minuten in ein Bad aus Piranhalösung gegeben. Die Lösung besteht aus Wasserstoffperoxid (35 %, J. T. Baker) und Schwefelsäure (95 %, CHEMSOLUTE) und beseitigt ebenfalls organische Rückstände an den Oberflächen. Durch die Piranhalösung wird die Oberfläche angeätzt und es entstehen Silanolgruppen (Si-O-H). Um die Piranhalösung von der Oberfläche zu entfernen, werden die Wafer nacheinander in mindestens drei Wasserbäder gegeben. Hierbei muss die Probenoberfläche immer von einem Wasserfilm bedeckt sein, um die Silanolgruppen zu erhalten. Die so präparierten Wafer haben eine sehr hydrophile Oberfläche mit einem Kontaktwinkel $< 10^\circ$ und wurden für alle Messungen an Siliziumdioxidoberflächen genutzt. Bis zur Durchführung der Messung wurden die hydrophilen Wafer in MilliQ-Wasser (spezifischer Widerstand $> 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$) gelagert.

Zur weiteren Präparation werden die Wafer in einem Glasgefäß unter einem Argonstrom getrocknet. Es ist entscheidend, dass die Wafer nicht mit Sauerstoff in Kontakt kommen und die Silanolgruppen an der Oberfläche intakt bleiben [Wan03]. Nachdem die Wafer vollständig getrocknet sind, wird eine 1 mM OTS-Mischung aus einem Drittel Chloroform (wasserfrei, Sigma Aldrich) und zwei Drittel Hexan (wasserfrei, Sigma Aldrich) über die Wafer gegossen. Die Kopfgruppen der OTS-Moleküle (SiCl_3) können dann, solange kein Wasser vorhanden ist, nur Bindungen mit den Silanolgruppen der Oberfläche eingehen. Dabei bildet sich aus dem Wasserstoff der Silanolgruppe und einem Chloratom der Kopfgruppe Chlorwasserstoff (HCl) und das Siliziumatom bindet kovalent an die Oberfläche.

Bei einem zu hohen Wassergehalt in der Lösung bilden die OTS-Moleküle Aggregate [Wan03], welche, wenn sie in Kontakt mit der Oberfläche kommen, dort binden. Nach längerer Zeit kommt es zur Bildung mehrerer Schichten übereinander [Wan03]. Bei der hier verwendeten wasserfreien Präparationsmethode binden die Einzelmoleküle an die Oberfläche und es entsteht eine Monolage mit zur Flüssigkeit orientierten, nicht polaren Schwanzgruppen der OTS-Moleküle. Die auf diese Weise präparierten Monolagen haben eine hydrophobe und homogene Oberfläche (vgl. Abbildung 2.5 bzw. Tabelle 2.1).

Nachdem die Wafer mindestens 12 Stunden in der Flüssigkeit gelegen haben, werden sie entnommen und in ein Hexanbad gegeben. Um OTS-Rückstände aus verklumpten, aber nicht kovalent gebundenen OTS-Molekülen zu entfernen, werden die Wafer anschließend für 10 bis 30 Sekunden in Toluol (Sigma Aldrich) im Ultraschallbad gesäubert. Zuletzt werden die Wafer nochmal in Hexan- und Toluolbädern gereinigt. Größere Fehlstellen in den OTS-Schichten können bei der Reinigung sehr gut erkannt werden, da hier Flüssigkeitsreste auf der Probe verbleiben. Die Proben werden aussortiert. Die mit OTS beschichteten Proben sind sehr robust gegen äußere Beanspruchung und können bis zur Verwendung an Luft gelagert werden.

4.2 Charakterisierung der Schichten

Zur Charakterisierung der OTS-Proben wurde der Kontaktwinkel zu verschiedenen Flüssigkeiten bestimmt und eine Ausgleichsrechnung nach der OWRK-Methode [Owe69; Kae70] durchgeführt (siehe Gleichung 2.8 auf Seite 12). Hieraus ergibt sich die Oberflächenenergie

¹Alle von Sigma Aldrich bezogenen Stoffe stammen von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), im Folgenden nur Sigma Aldrich

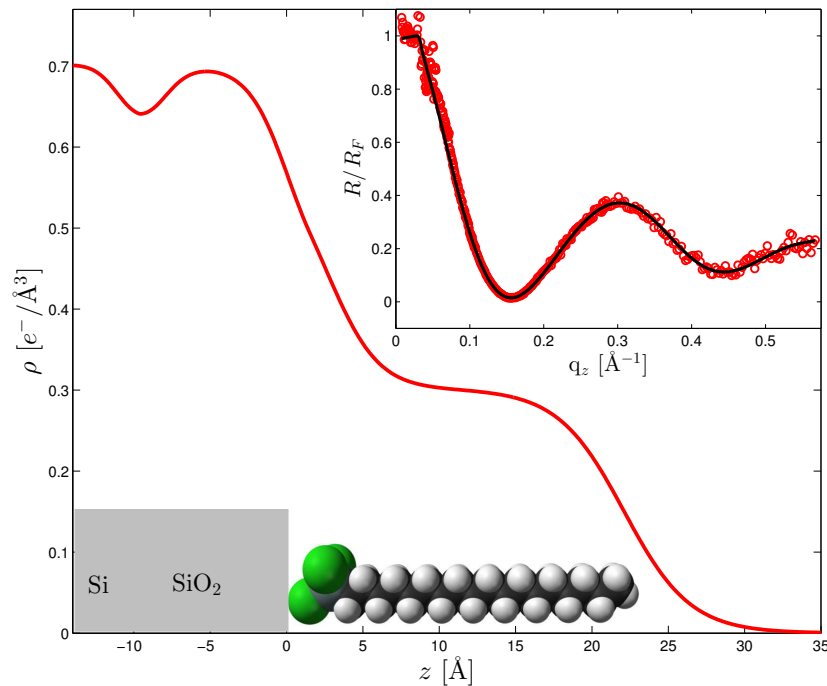


Abbildung 4.1: Elektronendichteprofil und XRR-Daten (im Einschub) eines mit OTS beschichteten Siliziumwafers in Luft. Die schwarze Linie zeigt den aus dem Elektronendichteprofil berechneten Intensitätsverlauf.

$\gamma_{\text{OTS}} = 23,94 \pm 0,87 \text{ mN/m}$ mit einem polaren Anteil von $\gamma_{\text{OTS}}^p = 0,07 \pm 0,04 \text{ mN/m}$ und einem nicht polaren Anteil von $\gamma_{\text{OTS}}^n = 23,86 \pm 0,87 \text{ mN/m}$. Die Ausgleichsgerade und die Messwerte sind in Abbildung 6.9 auf Seite 70 zusammen mit den Daten weiterer hydrophiler Proben dargestellt.

Im Vergleich mit den Literaturwerten ($\gamma = 23,5 \pm 0,05 \text{ mN/m}$; $\gamma_{\text{O}}^p = 5,43 \pm 0,01 \text{ mN/m}$; $\gamma_{\text{O}}^n = 18,07 \pm 0,05 \text{ mN/m}$ [Jan06]) zeigt sich, dass die OTS Proben die gleiche Oberflächenenergie haben, dabei aber deutlich unpolarer sind. Auch der Kontaktwinkel zu Wasser ($107,0 \pm 0,7^\circ$) ist größer als in der entsprechenden Quelle [Jan06] ($98,2^\circ$) angegeben. In der Literatur zu Röntgenreflektivitätsmessungen wird meistens nur der Kontaktwinkel zu Wasser angegeben, er bewegt sich zwischen 107° und 112° [Mez10; Häh12; Ric13]. Die für diese Arbeit verwendeten Proben sind somit vergleichbar mit in der XXR-Literatur verwendeten Proben. Dafür spricht auch der nicht vorhandene Anteil der polaren Oberflächenenergie.

Während eines Präparationvorganges können maximal 40 Wafer gleichzeitig beschichtet werden. Es hat sich gezeigt, dass zeitgleich präparierte Proben von gleicher Qualität sind, da sie von einem möglichen Fehler während der Präparation alle gleichermaßen betroffen sind. Daher wurde mindestens eine Probe jedes Präparationvorganges mittels XRR im D8-Labor-diffraktometer untersucht. Eine solche Messung inklusive Elektronendichteprofil ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Die OTS-Schwanzgruppe hat eine Länge von $18,67 \text{ \AA}$, ist also kürzer als die in der Literatur angegebenen $21,7 \text{ \AA}$. Die Rauigkeit beträgt $3,94 \text{ \AA}$, das sind $1,3 \text{ \AA}$ mehr als bei den Proben von Mezger *et al.* [Mez06; Ste14]. Die verringerte Länge kann durch nicht senkrecht aufgestellte Schwanzgruppen erzeugt werden, wohingegen die erhöhte Rauigkeit auf einige Fehlstellen und dadurch hervorgerufene Unordnung hinweist.

Solange nur wenige der Fehlstellen vorhanden sind, ist XRR darauf nicht sensitiv, da die Fehlstellen die mittlere Elektronendichte der Schwanzgruppe im Elektronendichteprofil nur

wenig absenken. Der Effekt ist bei einer geringen Anzahl der Fehlstellen nicht feststellbar, da das Messsignal immer gemittelt ist.

Daher wurden zur Untersuchung auf Fehlstellen zusätzlich zu den XRR-Messungen stichprobenartig AFM-Messungen an den Proben durchgeführt. Mittels AFM können Oberflächen mit einer Auflösung bis in den Nanometer-Bereich vermessen werden, näheres hierzu findet sich zum Beispiel in [Voi15].

Die Fläche, die ein OTS-Molekül im Film einnimmt, wird von Mezger *et al.* [Mez10] mit 23 \AA^2 angegeben, das entspricht einem Quadrat mit $4,8 \text{ \AA}$ Seitenlänge. Bei den hier gezeigten Proben mit einer Fläche von $1 \mu\text{m}^2$ beträgt der Abstand zwischen zwei Messpunkten 10 \AA , daher können einzelne, fehlende Moleküle nicht identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu sind aber schon Fehlstellen von der Größe mehrerer Moleküle im AFM-Signal sichtbar, somit kann die Probenqualität hinsichtlich der Fehlstellen mit den AFM-Messungen besser beurteilt werden als mit XRR.

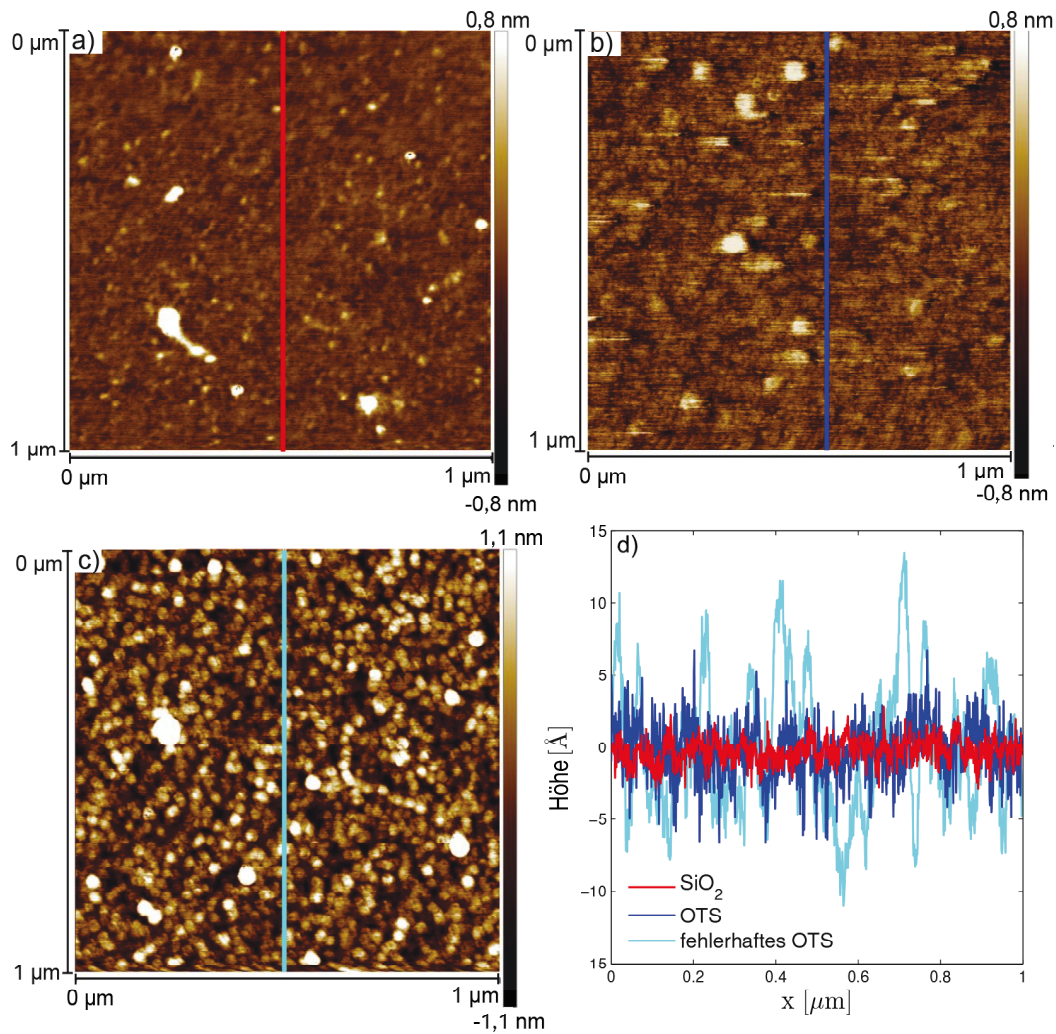


Abbildung 4.2: AFM-Bilder verschiedener Oberflächen, in Abbildung a) ist eine Siliziumdioxidoberfläche zu sehen, in b) eine glatte OTS-Oberfläche, in c) eine nicht geschlossene OTS-Oberfläche. In Abbildungsteil d) sind die Höhenprofile entlang der in a)-c) dargestellten Linien gezeigt.

In Abbildung 4.2a) ist eine AFM-Messung eines Siliziumdioxidwafers kurz nach dem Bad in

Piranha-Lösung gezeigt, ein Höhenprofil entlang der in der AFM-Aufnahme gezeigten roten Linie ist in Abbildung 4.2d) ebenfalls in rot zu sehen.

Die Oberfläche ist bis auf einige Fremdpartikel glatt. Die gemessene Höhe schwankt um $\pm 2 \text{ \AA}$. In Abbildung 4.2b) ist die Messung eines mit OTS beschichteten Wafers dargestellt, die Farbskala der Messung entspricht der in 4.2a). Die im Höhenprofil gemessenen Unterschiede betragen maximal $\pm 6 \text{ \AA}$, im Mittel ungefähr $\pm 3 \text{ \AA}$. Es wird deutlich, dass im OTS-Film einige kleine Löcher (schwarze Stellen) vorhanden sind. Außerdem sind auf dem Film weiße Punkte zu erkennen, die vermutlich zusätzlich adsorbierten OTS-Moleküle oder andere Verunreinigungen aus den genutzten Lösungsmitteln entsprechen. Der Vergleich mit in der Literatur [Wan03] verfügbaren AFM-Messungen zeigt eine leicht höhere Rauigkeit, allerdings ist die Auflösung der dort gezeigten Aufnahmen nicht so hoch wie bei der Aufnahme in Abbildung 4.2b). Die wichtigste Erkenntnis der AFM-Messungen ist, dass die Oberfläche kaum Fehlstellen aufweist.

Auf die in Abbildung 4.2c) gezeigte Messung trifft das nicht zu. Obwohl die Farbskala einen größeren Bereich abdeckt, wird deutlich, dass die OTS-Oberfläche inhomogen ist. Auch das Linienprofil in 4.2d) zeigt deutlich die Höhenunterschiede. Der maximale Höhenunterschied beträgt 23 \AA und entspricht ungefähr der Länge eines OTS-Moleküls.

Die inhomogene Oberflächenstruktur trat bei allen Proben auf, die zusammen mit der in Abbildung 4.2c) gezeigten präpariert wurden. Der Fehler in der Präparation, der zu den inhomogenen Schichten geführt hat, ist nicht bekannt. Keine der Proben wurden für eine Messung verwendet.

4.3 Strahlenschäden am Probensystem

Ein wichtiger Punkt bei Untersuchungen mit Röntgenstrahlung ist die mögliche Zerstörung der Probe durch die intensive Strahlung.

Nach [Far87] erzeugt Röntgenstrahlung in Wasser verschiedenste Reaktionsprodukte. Entweder wird das Wassermolekül angeregt und zerfällt anschließend in H^+ und OH^- bzw. H_2 und O oder es gibt ein Elektron ab. Das verbleibende, positiv geladene Wassermolekül kann mit einem weiteren Wassermolekül zu OH und H_3O^+ reagieren. Vor allem das freigesetzte Elektron, zum Beispiel ein 500 eV Auger-Elektron, beeinflusst die Wassermoleküle in seiner Umgebung. So kann es ungefähr 20 weitere Wassermoleküle [Tim04] in einem Radius von 100 \AA ionisieren. Die Ionisierungsrate unterscheidet sich nicht stark von der in anderen Stoffen wie zum Beispiel Diamant [Tim04]. Wegen der geringeren Dichte des Wassers und der daraus resultierenden größeren freien Weglänge des Elektrons, verteilen sich die entstehenden Radikale aber in einem größeren Umkreis [Tim04]. Die Strahlenschäden entstehen sehr lokal in dem Bereich, in dem die Röntgenstrahlung mit dem Wasser wechselwirkt. Bei Reflektivitätsmessungen ist das auf Grund der kleinen Winkel immer in der Nähe der Oberfläche. Die freien Radikale diffundieren zur Oberfläche und schädigen dort die oberste Schicht an der Grenzfläche. In dieser Arbeit betrifft dieser Effekt entweder die OTS-Moleküle oder die Adsorbatschicht aus Proteinen.

Strahlenschäden an der OTS-Wasser-Grenzfläche wurde von M. Mezger detailliert untersucht [Mez06; Mez08b; Mez08a]. Hier konnte gezeigt werden, dass die Strahlenschäden nur sehr lokal im Bereich der Strahlenbreite auftreten [Mez08b]. Außerdem wurde festgestellt, dass bei Messungen an OTS in Luft oder in verschiedenen Gasatmosphären kaum Strahlenschäden auftreten. Proben in Wasser hingegen wurden schon nach 50 s im vollen Röntgenstrahl so stark beschädigt, dass das Messergebnis beeinflusst wurde [Mez08b]. Das

zeigt eindeutig, dass die Strahlenschäden mit der Flüssigphase zusammenhängen. Ab einer gewissen Defektdichte erhöht sich die Rauigkeit der Oberfläche signifikant und verändert das Messsignal. Die Länge der Schwanzgruppen wird im Folgenden reduziert, was zu einer Verschiebung der Minima in der Reflektivitätsmessung führt. Nach 1000 s ändert sich das Messsignal nicht mehr und es verbleibt eine sehr raue SiO_2 -Schicht mit OTS-Resten auf der Oberfläche.

Bei XRR-Messungen treten Strahlenschäden zumeist bei größeren Eintrittswinkeln bzw. q_z -Werten auf. Da die reflektierte Intensität stark abfällt, muss dort eine stärkere einfallende Intensität gewählt werden und die Wahrscheinlichkeit für Strahlenschäden nimmt zu.

4.4 Die Struktur der Silizium-Siliziumdioxid-Grenzfläche

Die genaue Kenntnis des Substrates ist zur Auswertung der Messungen unerlässlich. Die bisherige Beschreibung des Substrates bezieht sich auf die an die Oberfläche gebundenen OTS-Moleküle. Um die Elektronendichteprofile der Proben bestimmen zu können, muss aber auch die Struktur des Siliziumfestkörpers und seiner Oberfläche bekannt sein. Durch den Kontakt mit Luft bildet sich auf Silizium eine Siliziumdioxidschicht. Sie wird, wie zuvor beschrieben, genutzt, um die OTS-Moleküle an die Oberfläche zu binden. Die genaue Struktur des Übergangs vom Siliziumfestkörper zur Oxidschicht ist bisher nicht vollständig geklärt und wird in der Literatur diskutiert.

Die Siliziumdioxidschicht der Proben, die in XRR-Messungen üblicherweise verwendet werden, ist amorph und hat eine geringere Elektronendichte als der Siliziumfestkörper. Die geringere Elektronendichte wird auch in Reflektivitätsmessungen beobachtet, wenn die Dicke der Siliziumdioxidschicht künstlich erhöht wird [Häh12; Uys13]. Für native Schichten bis $\approx 15 \text{ \AA}$ Dicke wird häufig das von Tidswell *et al.* [Tid90] entwickelte Modell genutzt. Es nimmt eine Schicht mit einer homogenen Elektronendichte von $0,66 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ an. Mit den nach diesem Modell bestimmten Elektronendichteprofilen und den daraus berechneten Intensitätsverläufen können Messungen in einem kleinen q_z -Bereich gut reproduziert werden.

Auf Grund der hohen Intensitäten moderner Synchrotronstrahlungsquellen kann mittlerweile ein deutlich größerer q_z -Bereich vermessen werden, weswegen die Messungen nicht mit dem von Tidswell *et al.* entwickelten Modell angepasst werden können. Das Problem wurde von Steinrück *et al.* [Ste14] dadurch gelöst, dass zwischen Silizium und Siliziumdioxid eine dünne Schicht verringerter Elektronendichte eingefügt wird. Diese Schicht wird damit begründet, dass die unterschiedlichen Einheitszellengrößen und damit die Bindungen der beiden Schichten nicht zueinander passen. Hierdurch fehlt in der Siliziumdioxid-Einheitszelle an der Grenzfläche zum Silizium ein Sauerstoffatom und dessen freie Bindungen werden wasserstoffpassiviert. Somit ergibt sich, dass nach [Ste14] pro $5,43 \times 5,43 \text{ \AA}^2$ großer Einheitszelle sechs bis acht Elektronen fehlen.

Ein Vergleich der beiden Modelle ist in Abbildung 4.3 dargestellt. An die im Einschub gezeigte Messung wurde zuerst ein Elektronendichteprofil nach dem Modell von Steinrück angepasst (rote Linien). Die Lücke zwischen Silizium und Siliziumdioxid entspricht hier ungefähr 5,2 Elektronen pro Einheitszelle und ist somit im Einklang mit dem Modell von Steinrück [Ste14]. Zum Vergleich wurde das Modell von Tidswell ebenfalls in einem Elektronendichteprofil verwendet (grüne Linien) und an die Messdaten bis $q_z = 0,4 \text{ \AA}^{-1}$ (angedeutet durch die grüne gestrichelte Linie) angepasst. Die Messwerte können bis $q_z = 0,4 \text{ \AA}^{-1}$ sehr gut reproduziert werden. Oberhalb des Wertes entspricht die angepasste Kurve jedoch nicht mehr den Messwerten. Werden alle Messwerte bei der Anpassung berücksichtigt, ist es durch starke

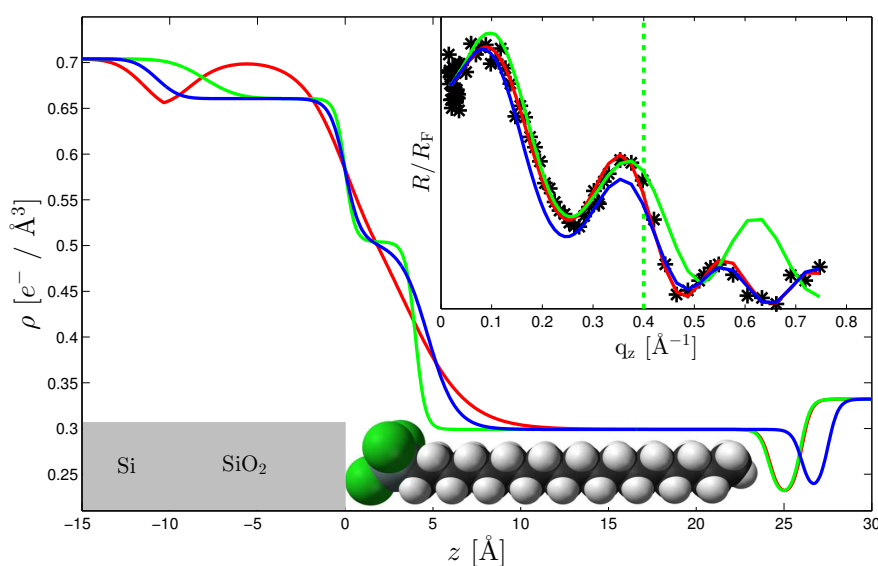


Abbildung 4.3: Verschiedene Elektronendichteprofile zu einer Messung eines OTS-Wafers in Wasser an der Beamline ID31, ESRF. Die aus den Profilen berechneten Intensitätsverläufe sind zusammen mit den Messdaten im Einschub dargestellt. Die rote Kurve wurde mit dem Modell nach Steinrück *et al.* [Ste14] erstellt, für die blaue und grüne Kurve wurde das Modell nach Tidswell *et al.* [Tid90] verwendet.

Variation der Parameter möglich, die Messwerte zu reproduzieren (blaue Kurve). Die Übereinstimmung ist trotzdem schlechter als die nach dem Modell von Steinrück. Außerdem ist die Grenzfläche zwischen Siliziumdioxid und OTS bei den Elektronendichteprofilen nach Tidswell unphysikalisch glatt.

Da das Modell nach Steinrück mehr Freiheitsgrade beim Anpassen des Elektronendichteprofiles bietet, ist eine eindeutige Bestimmung der Substratstruktur bei Messung mit kleinem q_z -Bereich nicht immer möglich. Daher wird bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit einem kleinem q_z -Bereich das Modell nach Tidswell verwendet. Bei größerem q_z -Bereich hingegen wird das Modell nach Steinrück verwendet, da nur so eine Anpassung an die Messwerte möglich ist.

4.5 Bestimmung der Dichte wässriger Urea-Lösungen unter Druck

Zur Berechnung der Elektronendichteprofile wird die Elektronendichte der Probenflüssigkeit ρ_{Fl} als Referenz benötigt. Sie kann aus der Dichte ρ_{D} der Flüssigkeiten berechnet werden. Diese Werte sind bei Atmosphärendruck und verschiedenen Temperaturen bekannt. Die Dichten wässriger Urea-Lösungen unter Druck sind dagegen nicht verfügbar und müssen zur Auswertung der XRR-Messungen ermittelt werden. Kommerziell verfügbare Messgeräte wie das als Referenz genutzte Anton Paar 4200M erreichen nur Drücke bis 500 bar. Um im gesamten Druckbereich bis 5000 bar die Dichte der wässrigen Urea-Lösungen zu bestimmen, wurde die druckabhängige Absorption von Röntgenstrahlung gemessen. Anschließend kann die relative Dichteänderung der Lösungen bestimmt werden. Das hierzu verwendete Verfahren wird im Folgenden vorgestellt.

Die Wechselwirkung mit Materie führt zur Absorption der Röntgenstrahlung. So gilt bei

einfallender Intensität I_0 mit einer Probendicke d für die Intensität des Röntgenstrahls hinter der Probe

$$I_1(d,p,E) = I_0 e^{-\mu(p,E)d} \quad (4.1)$$

mit dem Absorptionskoeffizienten $\mu(p,E) = \frac{\rho_D(p)N_A\sigma_a(E)}{M}$. Hierbei ist $\sigma_a(E)$ der energieabhängige Absorptionsquerschnitt, N_A die Avogadrozahl, $\rho_D(p)$ die druckabhängige Dichte und M die molare Masse des Mediums im Röntgenstrahl. Somit ergibt sich die Dichte eines Mediums zu

$$\rho_D(p) = \ln\left(\frac{I_0}{I_1(p)}\right) \frac{M}{dN_A\sigma_a(E)} \quad (4.2)$$

ρ_D kann also, bis auf einen konstanten Faktor, über $\ln\left(\frac{I_0}{I_1}\right)$ aus der Intensität vor und hinter der Probe bestimmt werden.

Die Absorptionsspektren wurden im Energiebereich von 16,86 keV bis 16,91 keV an der Beamlinie 8 am Speicherring DELTA [Lüt09] aufgenommen. Die Intensitäten I_0 und I_1 wurden mit 15 cm langen Ionisationskammern gemessen. Die Kammer vor der Probe wurde mit N_2 gespült, die Kammer hinter der Probe mit Xe befüllt. Für die Messungen wurde die in Kapitel 3.1 vorgestellte Hochdruckzelle genutzt, die Innenzellen wurden ohne den Probenhalter für Siliziumwafer verwendet. Das Probenvolumen betrug somit 0,75 ml. Durch das Design der Zelle beträgt der Abstand zwischen der Innenzelle und den Diamantfenstern ungefähr 0,1 mm pro Seite. In diesem Bereich befindet sich während der Experimente Wasser aus dem Druckkreislauf. Da das Wasser stärker komprimiert wird als die Urea-Lösungen, ist Adsorption mit einem systematischen Fehler behaftet. Die Probe hat im Strahlengang eine Länge von 10 mm und dominiert das Messsignal, daher ist der Fehler klein. Für die Rechnung wird der Unterschied der Absorptionskoeffizienten vernachlässigt ($\mu(p) \approx \mu_{H_2O}$) und für die Gesamtprobendicke 10,2 mm angenommen.

In Abbildung 4.4a) ist der Logarithmus des Koeffizienten aus einfallender und gemessener Intensität $\left(\ln\left(\frac{I_0}{I_1}\right)\right)$ abhängig von der Photonenenergie E dargestellt. Der Druck wurde von 50 bar (magenta) bis 5000 bar (cyan) in 250 bar Schritten erhöht. Um Luft im Probensystem zu komprimieren, wurde als Startwert 50 bar gewählt. In den Adsorptionsspektren sind durch die Diamantfenster erzeugte Streureflexe zu erkennen [Kry08]. Sie variieren abhängig vom Druck und verringern die hinter der Probe gemessene Intensität I_1 wie in Abbildung 4.4a) unterhalb von 16,87 keV zu sehen. Um die mittlere Absorption zu bestimmen, wurde an den linearen Bereich der Spektren zwischen 16,872 keV bis 16,910 keV eine Gerade angepasst (in Abbildung 4.4a) schwarz gestrichelt) und so die Position $I_{MW}(p)$ der Gerade auf der y-Achse bestimmt. $I_{MW}(p)$ ist proportional zur Dichteänderung der Flüssigkeiten und zeigt eine deutliche Druckabhängigkeit, die in Abbildung 4.4b) für Wasser (schwarz) sowie wässrige Lösungen mit 1 M (blau), 4 M (grün) und 8 M (rot) Urea dargestellt ist. Unterschiedliche Symbole gleicher Farbe kennzeichnen voneinander unabhängige Proben.

Die Absolutwerte für $I_{MW}(p)$ sind nicht von der Dichte der Lösung abhängig. So absorbiert zum Beispiel eine der 4 M Urea-Lösungen weniger stark als alle anderen untersuchten Proben. Ein möglicher Grund ist, dass die Maße des Röntgenstrahls mit $1,3 \times 0,6 \text{ mm}^2$ (Breite \times Höhe) bei einem Fensterdurchmesser von 1,8 mm zu groß gewählt wurde. Dadurch können Schwankungen der Strahlage während des Neubefüllens des Speicherrings das Messergebnis beeinflussen.

Diese Unsicherheit und die nicht bekannten Größen in Gleichung (4.2) führen dazu, dass mit der vorgestellten Methode nur die druckabhängige relative Änderung der Dichte gemessen

4.5. Bestimmung der Dichte wässriger Urea-Lösungen unter Druck

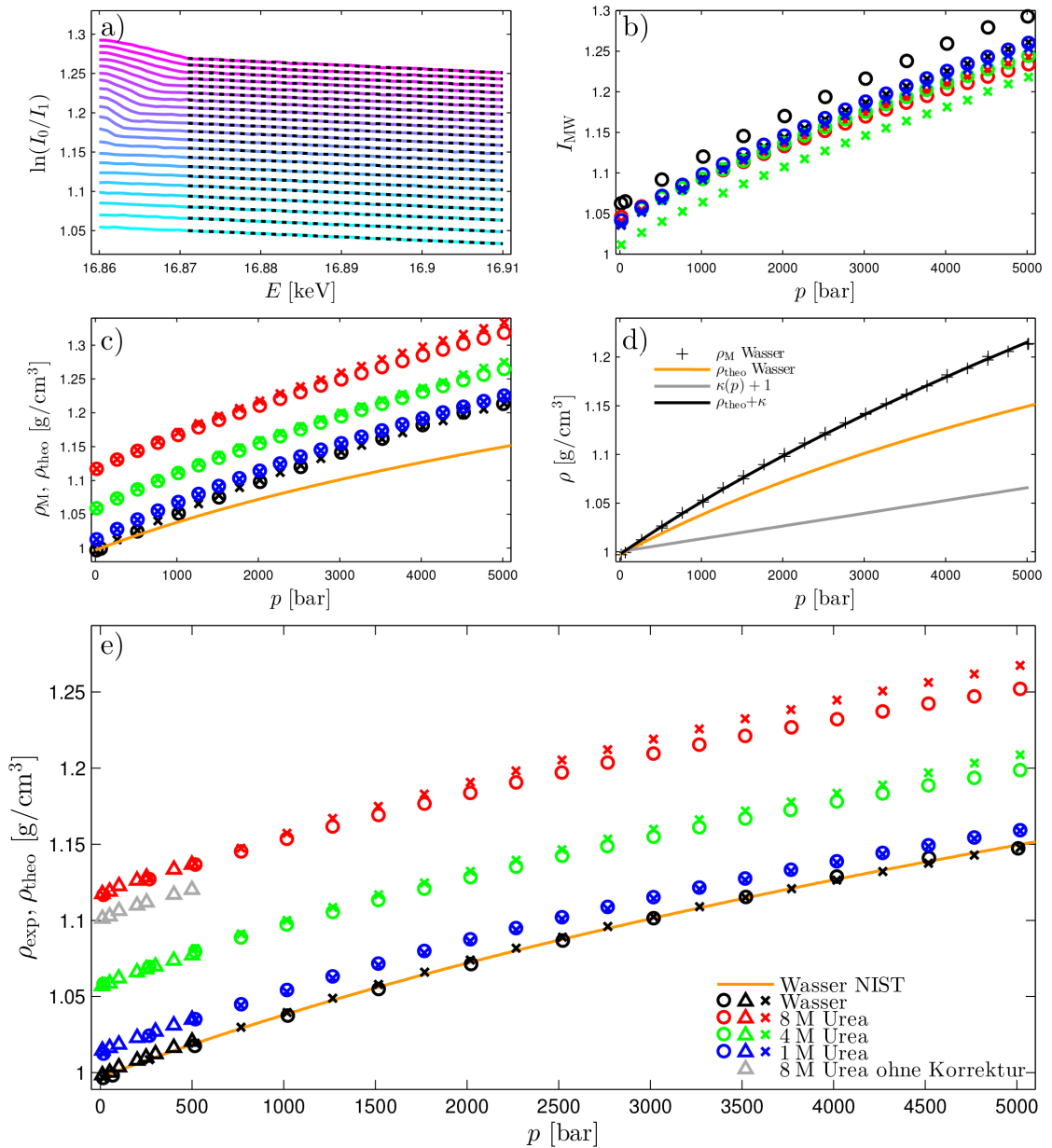


Abbildung 4.4: a) Absorptionsmessungen in 250 bar Schritten von 50 bar (magenta) bis 5000 bar (cyan). b) Änderung der Absorption $I_{MW}(p)$ abhängig vom Druck. Verschiedene Symbole gleicher Farbe entsprechen verschiedenen Messserien unterschiedlicher Urea-Konzentrationen (schwarz: Wasser; blau: 1 M Urea; grün: 4 M Urea; rot: 8 M Urea). c) I_M normiert auf die bei Atmosphärendruck gemessene Dichten im Vergleich mit der Theoriekurve (orange). d) Verlauf der gemessenen ρ_M und der theoretischen Dichte ρ_{theo} von Wasser sowie die an die Differenz angepasste Gerade $\kappa(p)$. e) Mittels Röntgenabsorption gemessene Dichten $\rho_{exp}(p)$ im Vergleich mit Messwerten eines Dichteschwingers (Dreiecke). Da die Wassermessungen zur Berechnung des Korrekturfaktors genutzt wurde, entsprechen die Werte der Theoriemessung.

werden kann. Daher wird als Referenz die Dichte ρ_{ATM} der Lösungen bei Atmosphärendruck bestimmt.

Mit dem Abstand entlang der y -Achse $I_{\text{MW}}(p) \propto \ln\left(\frac{I_0}{I_1}\right)$ folgt aus Gleichung (4.2)

$$\rho_{\text{M}}(p) = \frac{I_{\text{MW}}(p)}{I_{\text{MW}}(50)} \rho_{\text{ATM}} , \quad (4.3)$$

da alle anderen Faktoren konstant sind. Für die Bestimmung der Dichte wird der Dichteschwinger Anton Paar DSA5000M des Lehrstuhls Physikalische Chemie II verwendet.

Die so bestimmten Dichte $\rho_{\text{M}}(p)$ sind für alle Lösungen in Abbildung 4.4c) dargestellt. Wie zu erkennen ist, unterscheidet sich die errechnete Dichte $\rho_{\text{M}}(p)$ für Wasser (schwarze Symbole) von der aus Quelle [NIS16] entnommenen Dichte $\rho_{\text{theo}}(p)$ (orangene Linie). Die Abweichung zwischen $\rho_{\text{theo}}(p)$ und $\rho_{\text{M}}(p)$ wird durch die Ausdehnung der äußeren Probenzelle unter Druck erzeugt. In den Bereich zwischen der Innenzelle und den Diamantfenstern dringt Wasser aus dem Druckkreislauf ein. Hierdurch steigt die Wassermenge im Röntgenstrahl und die Absorption nimmt zu.

Folglich gilt für die zusätzliche druckabhängige Absorption nach Gleichung (4.1)

$$I_1 = I_0 e^{-(\mu(p)d + \mu_{\text{H}_2\text{O}}(p)d_2(p))} , \quad (4.4)$$

hierbei wird mit $\mu_{\text{H}_2\text{O}}(p)$ der Absorptionskoeffizient von Wasser bezeichnet und mit $d_2(p)$ die zusätzliche Dicke der Wasserschicht zwischen Innenzelle und Diamanten. Somit ergibt sich

$$\ln\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \mu(p)d + \mu_{\text{H}_2\text{O}}(p)d_2(p) \quad (4.5)$$

und mit dem Abstand entlang der y -Achse $I_{\text{MW}}(p) \propto \ln\left(\frac{I_0}{I_1}\right)$ und der Normierung auf 50 bar gilt

$$\frac{I_{\text{MW}}(p)}{I_{\text{MW}}(50)} = \frac{\mu(p)d + \mu_{\text{H}_2\text{O}}(p)d_2(p)}{\mu(50)d + \mu_{\text{H}_2\text{O}}(50)d_2(50)} . \quad (4.6)$$

Mit $d_2(50) = 0$ folgt dann

$$\frac{I_{\text{MW}}(p)}{I_{\text{MW}}(50)} = \frac{\mu(p)}{\mu(50)} + \frac{\mu_{\text{H}_2\text{O}}(p)d_2(p)}{\mu(50)d} \quad (4.7)$$

und unter der Annahme, dass außer der Dichte alle Beiträge zum Absorptionskoeffizienten konstant sind, ist

$$\frac{I_{\text{MW}}(p)}{I_{\text{MW}}(50)} = \frac{\rho_{\text{D}}(p)}{\rho_{\text{D}}(50)} + \frac{\rho_{\text{D,H}_2\text{O}}(p)d_2(p)}{\rho_{\text{D}}(50)d} = \frac{\rho_{\text{D}}(p)}{\rho_{\text{D}}(50)} + \frac{\kappa(p)}{\rho_{\text{D}}(50)} \quad (4.8)$$

mit dem durch die Ausdehnung der Zelle erzeugten Korrekturterm

$$\kappa(p) = \rho_{\text{D,H}_2\text{O}}(p) \frac{d_2(p)}{d} . \quad (4.9)$$

Die gemessene Dichte ρ_{M} aller Urea-Lösungen weicht somit um $\kappa(p)$ von der tatsächlichen Dichte $\rho_{\text{D}}(p) = \rho_{\text{exp}}(p)$ ab. Nach Gleichung (4.3) und Gleichung (4.8) und mit $\rho(50) = \rho_{\text{ATM}}$ kann sie über

$$\rho_{\text{exp}}(p) = \rho_{\text{M}}(p) - \kappa(p) \quad (4.10)$$

berechnet werden.

Der Korrekturterm $\kappa(p)$ ist bei den hier vorgestellten Experimenten linear im Druck und kann an $\rho_M - \rho_{\text{theo}}$ mit einer Geraden der Form $\kappa(p) = mp + b$ angepasst werden. In Abbildung 4.4d) ist die Gerade $\kappa(p) + 1$ als graue Linie dargestellt, ebenso wie ρ_{theo} (orange) und ρ_M (schwarze Kreuze). Die Summe aus $\kappa(p)$ und ρ_{theo} (schwarze Linie) stimmt mit der gemessenen Dichte überein.

Da der y -Achsenabschnitt der Gerade $b = 2,74 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ beträgt und damit vernachlässigt werden kann, folgt mit der Steigung der Geraden von $m = 0,0131 \text{ g/cm}^3/\text{kbar}$ und aus Gleichung (4.9) dann

$$d_2(p) = m \frac{dp}{\rho_{D,H_2O}(p)} . \quad (4.11)$$

Die Änderung der Dicke ist nicht linear und beträgt insgesamt $d_2(5000) = 5,8 \text{ mm}$. Die mittlere Ausdehnung ist somit $\bar{d}_2 = 0,116 \text{ mm/kbar}$.

Die Zunahme des Abstandes zwischen Innenzelle und Diamanten ist durch die Konstruktion der Zelle bedingt. So werden an der Zelle Diamantfenster des Poultertyps verwendet [Kry08]. Die Fenster dichten bis 40 kbar dadurch ab, dass sie bei Erhöhung des Drucks in den Stahl gepresst werden. Die beobachtete Zunahme der Wassermenge im Strahlengang könnte, zumindest teilweise, hierdurch verursacht werden. Des Weiteren sind die Schrauben zur Befestigung der Fenster aus weicherem Stahl als der Rest der Zelle und werden stärker komprimiert. Im Vergleich zur Gesamtzellenlänge in Strahlrichtung von 98 mm beträgt die Längenänderung 0,15 %/kbar. Aus der Ausdehnung kann der Kompressionsmodul K berechnet werden. Auf die Gesamtlänge und die mittlere Ausdehnung \bar{d}_2 bezogen ergibt sich der mittlere Kompressionsmodul $K_{\text{Zelle}} = 8,4 \cdot 10^{10} \text{ Pa}$. Dieser Wert ist größer als der eines weichen Metalls wie Kupfer ($K_{\text{Kupfer}} = 1,3 \cdot 10^{10} \text{ Pa}$ [Stö07]), aber kleiner als der von Stahl ($K_{\text{Stahl}} = 16,5 \cdot 10^{10} \text{ Pa}$ [Vit03]). Die Ausdehnung der Zelle unter Druck ist also im Rahmen der für das Material und die genutzten Poulterfenster erwarteten Größenordnung.

In Abbildung 4.4e) sind die nach Gleichung (4.10) bestimmten Dichten für Wasser, 1 M Urea, 4 M Urea und 8 M Urea in Wasser bis 5000 bar gezeigt. Die verschiedenen Symbole entsprechen jeweils unabhängigen Messreihen und weichen bei höheren Konzentrationen und Drücken voneinander ab. Die Werte für Wasser wurden zur Berechnung des Korrekturfaktors $\kappa(p)$ genutzt und entsprechen daher der Theorie.

Der Unterschied der gemessenen Dichten identischer Lösungen nimmt mit steigendem Druck zu. Das liegt daran, dass alle Messungen einer Ureakonzentration auf den gleichen Referenzwert ρ_{ATM} bei 50 bar normiert sind und Abweichungen erst bei höheren Drücken auftreten können. Die Normierung hat außerdem zur Folge, dass Fehler bei der Präparation der Proben nicht festgestellt werden können. Eine zu geringe Ureakonzentration in der Probe oder eine undichte Probenzelle können mit der vorgestellten Methode bei niedrigen Drücken nicht erkannt werden. Da eindringendes Wasser die Dichte der Probe herabsenkt, wurden für die Auswertung die Messwerte der dichteren Probe verwendet.

Am Lehrstuhl für Thermodynamik der Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen wurden Vergleichsmessungen mit einem Dichteschwinger (AntonPaar 4200M) durchgeführt. Der Dichteschwinger kann die Dichte von Flüssigkeiten bis 500 bar bestimmen. Die Ergebnisse der Messungen sind als Dreiecke in Abbildung 4.4e) dargestellt und entsprechen den Ergebnissen der Röntgenabsorptionmessungen. Einzig die Werte der 8 M Urea-Mischung (graue Dreiecke) liegen um $0,016 \text{ g/cm}^3$ niedriger. Aus den Mischungsanteile von Urea und Wasser in der Lösung kann, da zuvor das Volumen der Lösungen bestimmt wurde, ebenfalls die Dichte bei Atmosphärendruck bestimmt werden. Sie entspricht dem Wert, der mit dem zur

Normierung der Absorptionsspektren genutzten Dichteschwingers ermittelt wurde. Somit muss in der Messung des druckabhängigen Dichteschwingers ein Messfehler vorliegen. Re-skaliert auf die gemessene Dichte der 8 M Mischung (rote Dreiecke) entsprechen die Werte dem Verlauf der Absorptionsmessungen.

Eine Erhöhung der Anzahl der Messungen würde die Unsicherheiten bei hohen Drücken verringern, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Die gemessenen Dichten sind im Anhang auf Seite 101 angegeben, die Dichten weiterer Ureakonzentrationen wurden aus den gemessenen Dichten extrapoliert.

Kapitel 5

Lösungsmittel auf OTS

Die Grenzfläche zwischen Flüssigkeiten und Oberflächen ist seit langer Zeit ein Gegenstand der Forschung [Hen49; Yu01a; Fen04; Kap06; Kap13]. Dabei wurde auch der ordnende Einfluss der festen Oberfläche auf die Flüssigphase untersucht.

An kristallinen Oberflächen kann die Flüssigkeit an der Grenzfläche sowohl senkrecht als auch parallel zur Oberfläche geordnet werden.¹ Auch an amorphen, hydrophilen Siliziumdioxid-Oberflächen tritt Ordnung in der Flüssigkeit senkrecht zur Oberfläche auf. So konnten mit XRR Packungseffekte in 80 Å dünnen Schichten unpolarer Flüssigkeiten wie *n*-Hexan an der Siliziumdioxid-Oberfläche nachgewiesen werden [Doe98; Doe00]. Die Dicke der Schicht verringerter Elektronendichte senkrecht zur Oberfläche betrug dabei für *n*-Hexan etwa 25 Å. Durch Simulationen [Jan07] und AFM-Messungen [Kag12] gelang es, auch in Wasser an der Siliziumdioxid-Oberfläche Ordnung über einige Moleküllagen zu beobachten.

Bei Oberflächen, die nur über van-der-Waals-Kräfte wechselwirken können, ist die in der Flüssigkeit induzierte Ordnung geringer [Jan07; Kag12]. Mit Neutronenreflektivitätsmessungen wurden Defizite zwischen solchen Oberflächen und verschiedenen Flüssigkeiten wie deuteriertem Hexadekan, Oktan oder Dodecanthiol gefunden. Für Dichtedefizite wurde dabei eine vertikale Ausdehnung von 15 Å bis 23 Å gemessen [Mac07; Gut11].

Für Wasser wird an solchen Oberflächen ein Dichtedefizit beobachtet, das zum Teil durch eine Verschiebung des Schwerpunkts der Elektronen der Wassermoleküle in der ersten Wasserlage erzeugt wird (vgl. Kapitel 2.3.2 oder [Mez06; Mez10]). Die am häufigsten studierte Oberfläche dieser Art sind mit einer Monolage OTS beschichtete Siliziumwafer. Die Oberfläche wird aus den Methylgruppen am Ende der OTS-Schwanzgruppen gebildet. Im Vergleich zum Rest der Schwanzgruppe haben die Methylgruppen eine niedrigere Elektronendichte und senken die Elektronendichte an der Grenzfläche dadurch herab [Ock08]. Dieser Beitrag wird von Mezger *et al.* [Mez10] mit 31% einer Wassermonolage angegeben.

Um den Einfluss der Methylgruppe auf die Messung einzugrenzen, kann die Elektronendichte der Methylgruppe abgeschätzt werden. Ausgehend von einer Fläche von 23 Å² pro OTS-Molekül auf der Oberfläche [Mez10] und einer Länge von 1,5 Å [Mez06] der Methylgruppe liegt die mittlere Elektronendichte bei $\rho_{\text{Methyl}} = 0,26 \pm 0,3 \text{ e}^-/\text{Å}^3$. Zur Abschätzung des Fehlers von $\pm 0,3 \text{ e}^-/\text{Å}^3$ wurde die Länge der Schwanzgruppe um $\pm 0,2 \text{ Å}$ variiert.

Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente ist es, dass Defizit an der OTS-Lösungsmittel-Grenzfläche mit hoher Genauigkeit zu untersuchen. Bisherige XRR-Messungen beschäftigen sich hauptsächlich mit der OTS-Wasser-Grenzfläche und variieren die Flüssig-

¹Mehrere Beispiele für Simulationen und experimentelle Ergebnisse für flüssige Metalle im Kontakt mit Kristallen sind in [Kap06] zu finden.

keitseigenschaften nicht. Wasser hat dabei zwei besondere Eigenschaften, die die Größe des (gemessenen) Defizits beeinflussen. So ist die Elektronendichte von Volumenwasser nur $\approx 0,03 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ größer als die der Schwanzgruppe des OTS ($0,31 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ [Ste15]). XRR ist auf den Elektronendichtekontrast der Grenzfläche sensitiv. Wegen der ähnlichen Elektronendichte des Wassers und der Schwanzgruppe ist der Elektronendichtekontrast an der Grenzfläche ohne Dichtedefizit gering. Durch das Dichtedefizit steigt der Elektronendichtekontrast an und ändert das Messsignal deutlich. Zudem ist Wasser die polarste aller Flüssigkeiten [Rei03a]. Durch die Variation der Elektronendichte und der Polarität der Flüssigkeit wird der Einfluss der beiden Eigenschaften des Wassers auf das Defizit untersucht. Für ersteres werden Mischungen unpolarer Lösungsmittel unterschiedlicher Dichte (*tert* butyl methyl ether (TBME)/Chloroform und *p*-Xylol/Trichlorobenzol) genutzt. Durch die Verwendung unpolarer Lösungsmittel für die Mischungen wird verhindert, dass die Polarität der Mischung abhängig vom Anteil der Lösungsmittel ist.

Um den Einfluss der Polarität und anderer Eigenschaften der Flüssigkeit zu bestimmen, wurden zusätzliche Messungen an unterschiedlich polaren, ungemischten Lösungsmitteln durchgeführt.

Zu Beginn des Kapitels werden die verwendeten Lösungsmittel vorgestellt und anschließend die Ergebnisse diskutiert. Der Einfluss der durch Röntgenstrahlung verursachten Schäden an der Probenoberfläche wird an verschiedenen Flüssigkeiten untersucht. Zum Schluss wird aus den Elektronendichteprofilen ein Maß zum Vergleich des Dichtedefizits an den verschiedenen Grenzflächen berechnet und mit den Eigenschaften der Lösungsmittel in Beziehung gesetzt.

5.1 Charakterisierung der verwendeten Lösungsmittel

Die Fähigkeit eines Lösungsmittels, polare oder unpolare Stoffe zu lösen, wird über die Polarität definiert [Rei03a]. Auch die Wechselwirkung zwischen unterschiedlich polaren Oberflächen und Lösungsmitteln hängt von der Polarität ab. Dies zeigt sich zum Beispiel in der Abhängigkeit des Kontaktwinkels von den polaren und nicht polaren Anteilen der Oberflächenenergie des Lösungsmittels und der Oberfläche. Die Bestimmung der Polarität ist auf Grund der vielen möglichen Wechselwirkungen komplex. So hängt sie von vielen Faktoren wie der Polarisierbarkeit, dem Dipolmoment des Einzelmoleküls, den induzierten Dipolmomenten oder den Coulomb-Wechselwirkungen ab. Auch die Möglichkeit H-Bindungen einzugehen, ändert die Polarität eines Lösungsmittels. Alle diese Wechselwirkungen können nicht von einer einzigen physikalischen Größe beschrieben werden. Die häufig als Maß genutzte relative Permittivität ϵ_r ist, wenn alle Wechselwirkungen berücksichtigt werden, stark frequenzabhängig und nicht zur allgemeinen Definition geeignet. Daher wird in dieser Arbeit ein bekanntes empirisches Maß für die Polarität eines Lösungsmittels, der E_T^N -Index, genutzt. Die folgende Beschreibung beruht auf dem Lehrbuch [Rei03a] und dem aktuellen Übersichtsartikel [Mac14].

Zur Bestimmung des E_T^N -Wertes wird das Absorptionsspektrum für ein Gemisch aus einem Lösungsmittel mit dem negativ solvatochromischen Farbstoff (Betain 30) gemessen, dieser ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

Abhängig von der Polarität des Lösungsmittels verschiebt sich die Elektronenverteilung im

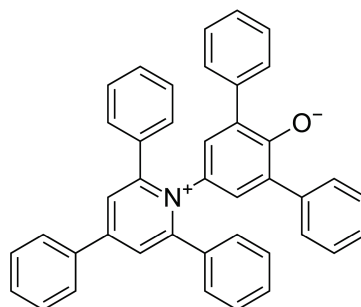


Abbildung 5.1: Struktur des Farbstoffs Betain 30 [Wik16d].

Farbmolekül. In polaren Lösungsmitteln verlagern sich die Elektronen vom Sauerstoff zum Stickstoff in der Mitte des Moleküls. Dadurch ändert sich Übergangsenergie zwischen dem Grundzustand und dem ersten angeregten Zustand des Moleküls. Da sie bei Betain 30 ungefähr im Bereich sichtbaren Lichts liegt, ändert sich die Farbe des Lösungsmittels abhängig von der Polarität und kann über Absorptionsmessungen bestimmt werden [Rei03a; Mac14]. Aus der Wellenlänge λ_{Max} , bei der die maximale Absorption auftritt, wird der E_T^N -Index bestimmt. Per Definition gilt $E_T^N = 1$ für die kleinste gemessene Wellenlänge (Wasser, $\lambda_{\text{H}_2\text{O}} = 454 \text{ nm}$) und $E_T^N = 0$ für die größte Wellenlänge (Tetramethylsilan, $\lambda_{\text{TMS}} = 931 \text{ nm}$). In Tabelle 5.1 sind die physikalischen Eigenschaften der in diesem Kapitel studierten Lösungsmittel angegeben, die Strukturen sind in Abbildung 5.2 dargestellt.

Lösungsmittel	Formel	ρ_D [g/cm ³]	ρ [e/Å ³]	r_{Gy} [Å]	γ [mN/m]	ϵ_r	E_T^N
Wasser	H ₂ O	1,00	0,332	0,62 ^c	72,0 ^b	78,4 ^b	1,00 ^b
Ethylenglycol	C ₂ H ₆ O ₂	1,11	0,366	2,56 ^c	48,0 ^b	37,7 ^b	0,79 ^b
Methanol	CH ₄ O	0,74	0,250	1,55 ^c	22,1 ^b	32,7 ^b	0,76 ^b
Aceton	C ₃ H ₆ O	0,79	0,262	2,75 ^c	23,5 ^b	20,6 ^b	0,36 ^b
Chloroform	CHCl ₃	1,50	0,433	3,29 ^c	37,6 ^c	4,9 ^b	0,26 ^b
Trichlorobenzol	C ₆ H ₃ Cl ₃	1,45	0,436	4,83 ^c	19,5 ^c	-	0,17 ^b
TBME	C ₅ H ₁₂ O	0,75	0,252	3,18 ^c	17,7 ^d	4,5 ^b	0,12 ^b
<i>p</i> -Xylol	C ₈ H ₁₀	0,86	0,283	3,83 ^c	28,0 ^b	2,3 ^a	0,07 ^b
<i>n</i> -Hexan	C ₆ H ₁₄	0,66	0,231	3,77 ^c	17,9 ^b	1,9 ^b	0,01 ^b

Tabelle 5.1: Eigenschaften einiger Lösungsmittel. Für das Feld mit '-' konnte keine zitierfähige Quelle gefunden werden. ^a [Rei03a] ^b [Lid03] ^c [Yaw08] ^d [Wan06]

Wie anhand der Tabelle 5.1 ersichtlich, bedeuten größere E_T^N -Werte auch eine größere relative Permittivität ϵ_r , das Verhältnis der beiden Parameter zueinander unterscheidet sich aber deutlich.

Die Lösungsmittel wurden so gewählt, dass verschiedene Lösungsmittleigenschaften wie Polaritäten, Oberflächenenergien, Molekülgrößen und Dichten abgedeckt werden. So wurden unpolare (*n*-Hexan) und polare (Ethylenglycol, Methanol, Wasser) Lösungsmittel verwendet, zudem mit Aceton ein Lösungsmittel mittlerer Polarität. *p*-Xylol, TBME, Trichlorobenzol und Chloroform sind ebenfalls unpolar.

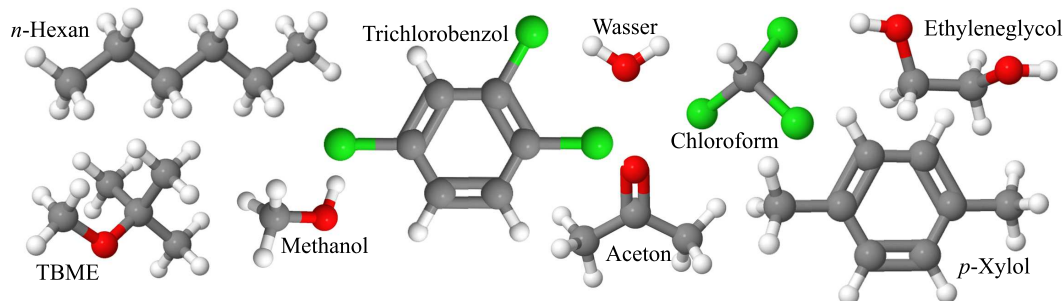


Abbildung 5.2: Strukturen der verwendeten Lösungsmittel, die Atomsorten sind farblich gekennzeichnet: weiß: H (1e⁻); grau: C (6e⁻); rot: O (8e⁻); grün: Cl (17e⁻). Die Größe der abgebildeten Moleküle entspricht den tatsächlichen Verhältnissen. Die Abbildung wurde mit Jmol (<http://www.jmol.org/>) erstellt.

In Tabelle 5.1 ist der Gyrationradius r_{Gy} angegeben, dieser ist ein Maß für die Ausdehnung der Masse um den Schwerpunkt des Moleküls. Er wird hier verwendet, um die Größe des durch die Molekülbewegung eingenommenen Volumens abzuschätzen. Die exakten Packungseffekte können damit aber nicht beschrieben werden, hierzu sind Simulationen notwendig, die die genauen Molekülradien und weitere Eigenschaften der Moleküle wie Asymmetrien berücksichtigen und im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

Um den Einfluss des Kontrastes zwischen Substrat und Flüssigkeit zu studieren, wurden außerdem Mischungen aus unpolaren, verschieden dichten Lösungsmitteln verwendet. Hierzu wurden Chloroform und TBME sowie Trichlorobenzol und *p*-Xylol genutzt. Die Strukturen der beiden letztgenannten Lösungsmittel bestehen aus einem Benzol-Ring mit zwei Methylgruppen bzw. drei Chlor-Atomen. Die Moleküle benötigen somit in der Volumenflüssigkeit einen ähnlichen Raum pro Molekül. Daher sind auch die molaren Volumina $V_{p\text{-Xylol}} = 0,1231/\text{mol}$ und $V_{\text{Trichlorobenzol}} = 0,1241/\text{mol}$ fast identisch. Wegen der Chlor-Atome ist der Gyrationradius des Trichlorobenzol um 1 \AA größer als der des *p*-Xylol. Im Gegensatz dazu haben die Lösungsmittel des anderen Gemisches aus Chloroform und TBME verschiedene Strukturen und somit unterschiedliche molare Volumina ($V_{\text{TBME}} = 0,1201/\text{mol}$ und $V_{\text{Chloroform}} = 0,0811/\text{mol}$). Der äußere Bereich des TBME-Moleküls wird dabei von leichten Wasserstoffatomen eingenommen und die Gyrationradien unterscheiden sich daher nur um $0,11 \text{ \AA}$.

Die beiden dichtesten untersuchten Lösungsmittel (Chloroform und Trichlorobenzol) unterscheiden sich in beiden Größen. Sowohl der Gyrationradius als auch das molare Volumen des Chloroform sind kleiner als die des Trichlorobenzol. Es ist also durch Verwendung der beiden Lösungsmittel möglich, den Einfluss der Molekülgröße an der Grenzfläche für Stoffe mit hoher Elektronendichte abzuschätzen. Die Dichten der Mischungen wurden mit dem Dichteschwinger Anton Paar DSA5000M des Lehrstuhls Physikalische Chemie II bestimmt und sind in Tabelle A.2 im Anhang angegeben.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Daten wurden, bis auf die gekennzeichnete Ausnahme, an der Beamline ID31 der ESRF gemessen. Auf Grund des großen q_z -Bereiches wird für die Silizium-Siliziumdioxid-Grenzfläche das Modell nach Steinrück *et al.* genutzt. Die an der Diamond Light Source durchgeführten Messungen haben einen kleineren q_z -Bereich. Das Modell nach Steinrück *et al.* bot dabei so viele Freiheitsgrade, dass eine eindeutige Charakterisierung des Substrates nicht möglich war. Daher wird für die Elektronendichteprofile das Modell nach Tidswell *et al.* verwendet.

Die OTS-Proben, die an der ESRF genutzt wurden, sind zusammen mit den in Kapitel 4.2 vorgestellten Proben präpariert worden. Auch eine der Proben, die an der Diamond Light Source vermessen wurden, ist zuvor am Labordiffraktometer D8 des Lehrstuhls Experimentelle Physik 1a untersucht worden. Die so bestimmten Eigenschaften der trockenen OTS-Schicht werden in diesem Kapitel als Referenz genutzt. In allen Elektronendichteprofilen wird die Skizze eines OTS-Moleküls als Referenz angegeben. Die Skizze entspricht entlang der z -Achse der Länge der aus der Referenzmessung bekannten OTS-Schicht.

Die Schichtdicke und die Rauigkeit der Kopfgruppe unterscheiden sich auf der gleichen Probe leicht und wurden bei der Anpassung der Intensitätsverläufe in einer Größenordnung unterhalb von 1 \AA variiert. Die Parameter der Silizium- und der Siliziumdioxidschicht wurden, wenn möglich, für eine Probe konstant gehalten. Alle Messungen wurden auf einer neuen Position auf der Probe durchgeführt. Die Temperatur der Probenzelle betrug 25°C .

5.2 Ergebnisse für ungemischte Lösungsmittel

Die Elektronendichteprofile an der Grenzfläche zwischen OTS und ungemischten Flüssigkeiten sind in Abbildung 5.3 dargestellt. Im Einschub sind die Messdaten und die errechneten Anpassungen gezeigt. Es werden die Ergebnisse von Messungen an Wasser, Methanol, Aceton, *n*-Hexan und Ethylenglycol in Kontakt mit OTS vorgestellt. Bei der Bestimmung des Elektronendichteprofiles für die Messung „Wasser P2“ wurden die Messwerte mit $q_z > 0,55 \text{ \AA}^{-1}$ wegen einer zu hohen Strahlungsdosis während der Messung nicht berücksichtigt. Diese Problematik wird in Abschnitt 5.4 erläutert.

Abhängig von der Polarität und der Elektronendichte der Lösungsmittel ist oberhalb der OTS-Schwanzgruppe ein Dichtedefizit zu sehen. Die Länge des OTS-Moleküls der Referenzmessung ist zusätzlich durch die graue Linie gekennzeichnet.

Für die beiden Messungen in Wasser beträgt der Abstand zwischen den Wendepunkten des Defizits und damit die Schichtdicke $d = 3 \text{ \AA}$. Das Minimum der Elektronendichte des Defizits liegt bei $\rho_{\text{Min}} = 0,265 e^-/\text{\AA}^3$ und der Unterschied zur Elektronendichte des Wassers ist damit $\Delta\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 0,065 e^-/\text{\AA}^3$. Die aus dem Elektronendichteprofil von Mezger *et al.* [Mez06] entnommenen Werte sind $d = 3,8 \text{ \AA}$ und $\rho_{\text{Min}} = 0,27 e^-/\text{\AA}^3$, somit folgt für den Elektronendichteunterschied $\Delta\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 0,06 e^-/\text{\AA}^3$. Das Dichtedefizit ist in der Studie von Mezger *et al.* über das Produkt $\delta D = \Delta\rho d$ definiert und beträgt $\delta D = 0,23 e^-/\text{\AA}^2$. Für die Wasserproben in Abbildung 5.3 ergibt es sich zu $\delta D = 0,20 e^-/\text{\AA}^2$, es ist also in der gleichen Größenordnung wie das aus der Literatur bekannte Defizit.

In den Elektronendichteprofilen an der Grenzfläche zwischen OTS und dem ebenfalls polaren Methanol ist ein ausgeprägtes Minimum zu sehen. Der Abstand zwischen den Wendepunkten beträgt $d \approx 8,2 \text{ \AA}$. Das Minimum liegt oberhalb der OTS-Schicht und ist hauptsächlich der Flüssigkeitsphase zuzuordnen. Die Elektronendichte liegt mit $\rho = 0,231 e^-/\text{\AA}^3$ am unteren Ende möglichen Elektronendichte der Methylgruppen $\rho_{\text{Methyl}} = 0,26 \pm 0,3 e^-/\text{\AA}^3$.

Im Gegensatz zu den Messungen an Wasser (Rauigkeit $\sigma = 1 \text{ \AA}$) ist der Übergang zwischen der OTS-Schwanzgruppe und dem Dichtedefizit rauer ($\sigma = 4,1 \text{ \AA}$). Die Rauigkeit entspricht der Referenzmessung am trockenen OTS ($\sigma = 3,9 \text{ \AA}$). Der Grund für die geringere Rauigkeit der Wassermessung ist unklar.

Zwischen OTS und Aceton ist im Vergleich zum Methanol ein weniger ausgeprägtes Minimum vorhanden. Der Wendepunkteabstand ist mit $d \approx 6,7 \text{ \AA}$ etwas geringer, das Minimum liegt ebenfalls oberhalb der OTS-Schicht. Eine mögliche Ursache für das weniger ausgeprägte Minimum ist die geringere Polarität des Acetons im Vergleich zu Methanol und Wasser.

n-Hexan hat die geringste Elektronendichte ($\rho_{n\text{-Hexan}} = 0,231 e^-/\text{\AA}^3$) der verwendeten Lösungsmittel und zeigt kein Minimum an der Oberfläche. $\rho_{n\text{-Hexan}}$ entspricht dem abgeschätzten Minimalwert der Elektronendichte der Methylgruppe. Dadurch ändern die Methylgruppen den Verlauf der Elektronendichte an der Oberfläche, können aber kein Minimum mehr erzeugen. Die Elektronendichte fällt an der Grenzfläche daher monoton vom Wert der Schwanzgruppe auf den Wert des flüssigen *n*-Hexans ab, ähnlich wie in der Messung der trockenen Referenzprobe (Abbildung 4.1, Seite 27) auf die Elektronendichte der Luft ($\rho \approx 0 e^-/\text{\AA}^3$). Dass sich auch in der flüssigen Phase an der Grenzfläche kein Minimum und damit kein Dichtedefizit ausbildet, liegt vermutlich daran, dass *n*-Hexan das unpolarste untersuchte Lösungsmittel ist und die induzierte Ordnung daher geringer ist.

Ethylenglycol hat unter den in diesem Abschnitt vorgestellten Lösungsmitteln eine Sonderrolle, da es mit einer Elektronendichte von $\rho_{\text{Et}} = 0,366 e^-/\text{\AA}^3$ deutlich dichter ist. An die in Abbildung 5.3 gezeigte Messung konnten zwei verschiedene Elektronendichteprofile angepasst werden. Sie unterscheiden sich im Bereich der Grenzfläche zwischen OTS-Schwanzgruppe

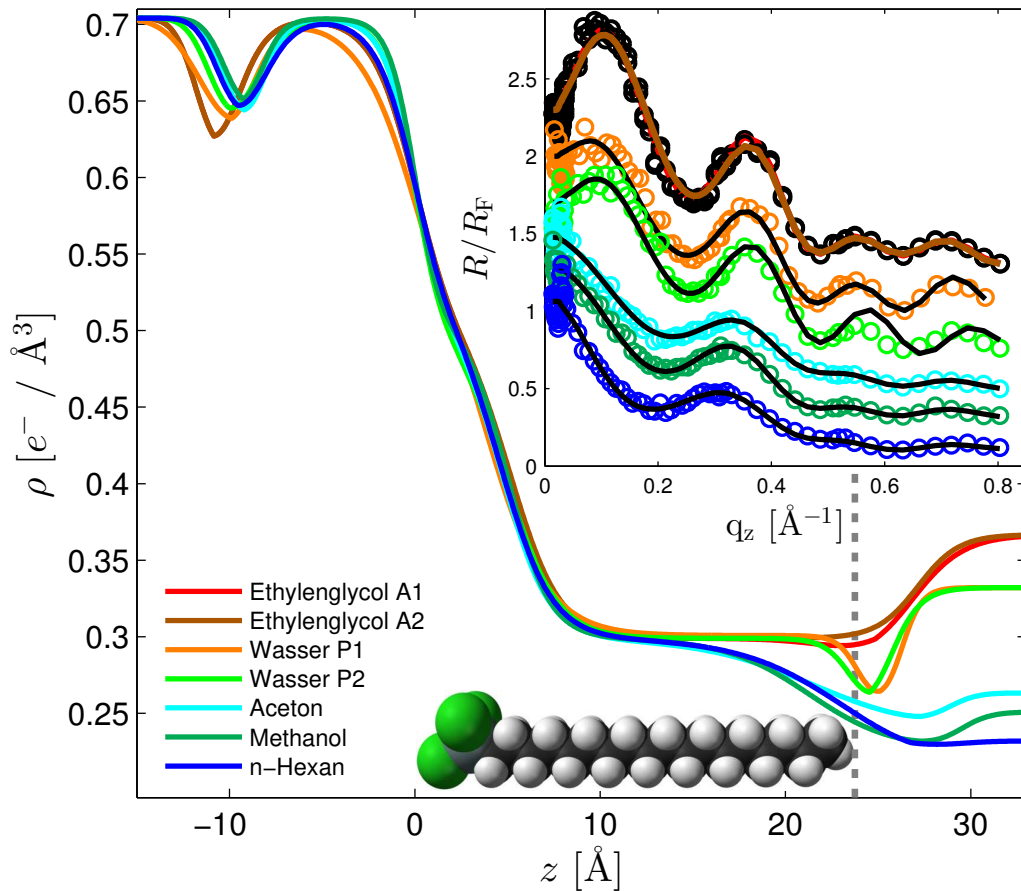


Abbildung 5.3: Elektronendichteprofile für Messungen an Wasser, *n*-Hexan, Aceton und Methanol in Kontakt mit OTS, im Einschub sind die Messwerte und die errechneten Intensitätsverläufe gezeigt. Für die Anpassung der Probe Wasser P2 wurden die Messwerte ab $q_z > 0,55 \text{ \AA}^{-1}$ nicht berücksichtigt. Für Ethylenglycol wurden zwei angepasste Intensitätsverläufe berechnet, die entsprechenden Elektronendichteprofile sind ebenfalls angegeben.

und Ethylenglycol. Das eine Elektronendichteprofil hat hier eine Elektronendichte, die niedriger ist als die der OTS-Schwanzgruppe (A1, rot). Im anderen Elektronendichteprofil steigt die Elektronendichte monoton auf den Wert des Ethylenglycols an, es ist kein Minimum im Bereich der Grenzfläche erkennbar (A2, braun). Die errechneten Intensitätsverläufe sind nahezu identisch. Wegen der hohen Rauigkeit der Probe und des großen Elektronendichteunterschiedes zwischen OTS-Schwanzgruppe und Ethylenglycol kann die Region nicht mehr aufgelöst werden.

Die senkrechte, grau gestrichelte Linie gibt den Wendepunkt der trocken gemessenen Referenzprobe an. Die Wendepunkte an der Ethylenglycol-OTS-Grenzfläche sind in beiden Elektronendichteprofilen bei $27,2 \text{ \AA}$ und damit um $3,4 \text{ \AA}$ weiter von Siliziumdioxid-Oberfläche entfernt als bei der Referenzprobe. Dies entspricht der Schichtdicke des Defizits in den Messungen an Wasser. Das Dichtedefizit ist also in beiden Elektronendichteprofilen der OTS-Ethylenglycol-Grenzfläche vorhanden, auf Grund des größeren Elektronendichtekontrastes ist das Minimum im Verlauf der Elektronendichte aber nicht mehr eindeutig.

Die weitere Diskussion des Dichtedefizites erfolgt im Abschnitt 5.5, zuerst werden die Ergebnisse für die Lösungsmittelgemische beschrieben.

5.3 Ergebnisse für Lösungsmittelgemische

Bereits die Messung an Ethylenglycol zeigt, dass das mit XRR bestimmte Defizit von der Elektronendichte der Flüssigkeit ρ_{Fl} abhängt. So ist das Defizit bei steigender Elektronendichte der Volumenflüssigkeit nicht mehr in Form eines Minimums in der Elektronendichte sichtbar. Durch Variation der Flüssigkeitsdichte soll dieser Effekt weiter untersucht werden. Für die Mischungen wurden Flüssigkeiten geringer Polarität gewählt. Die Änderung der Polarität der Mischungen ist also gering und wird im Folgenden vernachlässigt.

Um einen möglichst großen Bereich der Flüssigkeitselektronendichte untersuchen zu können, wurde jeweils ein sehr dichtes Lösungsmittel (Trichlorobenzol/Chloroform) mit einem Lösungsmittel mit geringer Elektronendichte (*p*-Xylol/TBME) gemischt. Für die Messungen wurde die Probenzelle zuerst mit 4 ml reinen Lösungsmittels befüllt und die Grenzfläche vermessen. Anschließend wurde sukzessive 1 ml des zweiten Lösungsmittels hinzugefügt, bis ein Mischungsverhältnis von 4:5 erreicht war. Am Beispiel der TBME-Chloroform Gemisches bedeutet dies, dass zuerst mit reinem TBME begonnen wird und dann bis zum Mischungsverhältnis von 4:5 Chloroform hinzugefügt wird. In umgekehrter Reihenfolge wird für die Messung mit Chloroform verfahren. Alle Mischungen konnten zwei Mal vermessen werden. Die Elektronendichteprofile der Mischungen aus Chloroform und TBME in Kontakt mit OTS sind in den Abbildungen 5.4 und 5.5 gezeigt. Um die Entwicklung des Übergangs zwischen OTS-Schwanzgruppe und Flüssigkeit über den gesamten Bereich der Flüssigkeitselektronendichte darzustellen, sind jeweils die Ergebnisse einer Probe bei der mit Chloroform und einer bei der mit TBME gestartet wurde, in einer Abbildung angegeben. Die gestrichelte Linien zeigen die Proben, bei denen zuerst Chloroform eingefüllt wurde, die durchgezogenen Linien die Messungen, die mit reinem TBME begonnen wurden.

Nach demselben Schema sind Messungen an Mischungen aus Trichlorobenzol und *p*-Xylol durchgeführt worden. In Abbildung 5.6 und 5.7 sind die Elektronendichteprofile sowie, im Einschub, die Messdaten dargestellt.

Trichlorobenzol und *p*-Xylol wurde zudem an der I07 der Diamond Light Source mit einer Photonenenergie von 30 keV untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.8 gezeigt und stammen alle von der gleichen Probe. Auf Grund der Photonenenergie und der damit einhergehenden höheren Absorption ist nur ein kleinerer q_z -Bereich zugänglich. Die große Absorption führte außerdem dazu, dass am reinen Trichlorobenzol keine Messung durchgeführt werden konnte.

Zwischen den Messungen an Chloroform/TBME und Trichlorobenzol/*p*-Xylol ist in den Elektronendichteprofilen kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die Rauigkeit der OTS-Schwanzgruppen entspricht, wie bei den zuvor gezeigten reinen Lösungsmitteln, der Rauigkeit der Referenzmessung ($\sigma = 3,9 \text{ \AA}$). In allen Elektronendichteprofilen mit einer Flüssigkeitselektronendichte $\rho_{\text{Fl}} < 0,33 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ ist ein Minimum in der Elektronendichte an der Grenzfläche vorhanden. Für $\rho_{\text{Fl}} > 0,33 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ ist nicht mehr eindeutig, ob ein Minimum vorhanden ist.²

Wie für die OTS-Ethylenglycol-Grenzfläche diskutiert, ist der Bereich der OTS-Schwanzgruppe auch in den Elektronendichteprofilen mit $\rho_{\text{Fl}} > 0,33 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ ungefähr 3 \AA länger als aus der trockenen Referenzmessung bekannt. Das ist auch für die Proben zu beobachten, bei denen mit den weniger Dichte Lösungsmitteln *p*-Xylol und TBME begonnen wurde. Unterhalb von $\rho_{\text{Fl}} = 0,33 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ entspricht die durch den Wendepunkt am Übergang zur Grenzfläche definierte Schichtdicke der aus der Referenzmessung bekannten Schichtdicke. Steigt die

²Die einzige Ausnahme stellt das Elektronendichteprofil der Messung an 5 ml Chloroform und 4 ml TBME in Abbildung 5.5 dar.

Elektronendichte in diesen Mischungen über $\rho_{\text{Fl}} = 0,33 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$, ist das Minimum nicht mehr vorhanden und der Bereich mit der Elektronendichte der Schwanzgruppe ist länger als in der Referenzmessung. Dieser Unterschied entspricht, wie auch bei den Elektronendichteprofilen des Ethylenglycol, dem Dichtedefizit.

Der kontinuierliche Übergang von Elektronendichteprofilen mit Minimum zu solchen ohne mit steigender Elektronendichte zeigt, dass die Flüssigkeiten an der Grenzfläche nicht entmischen.

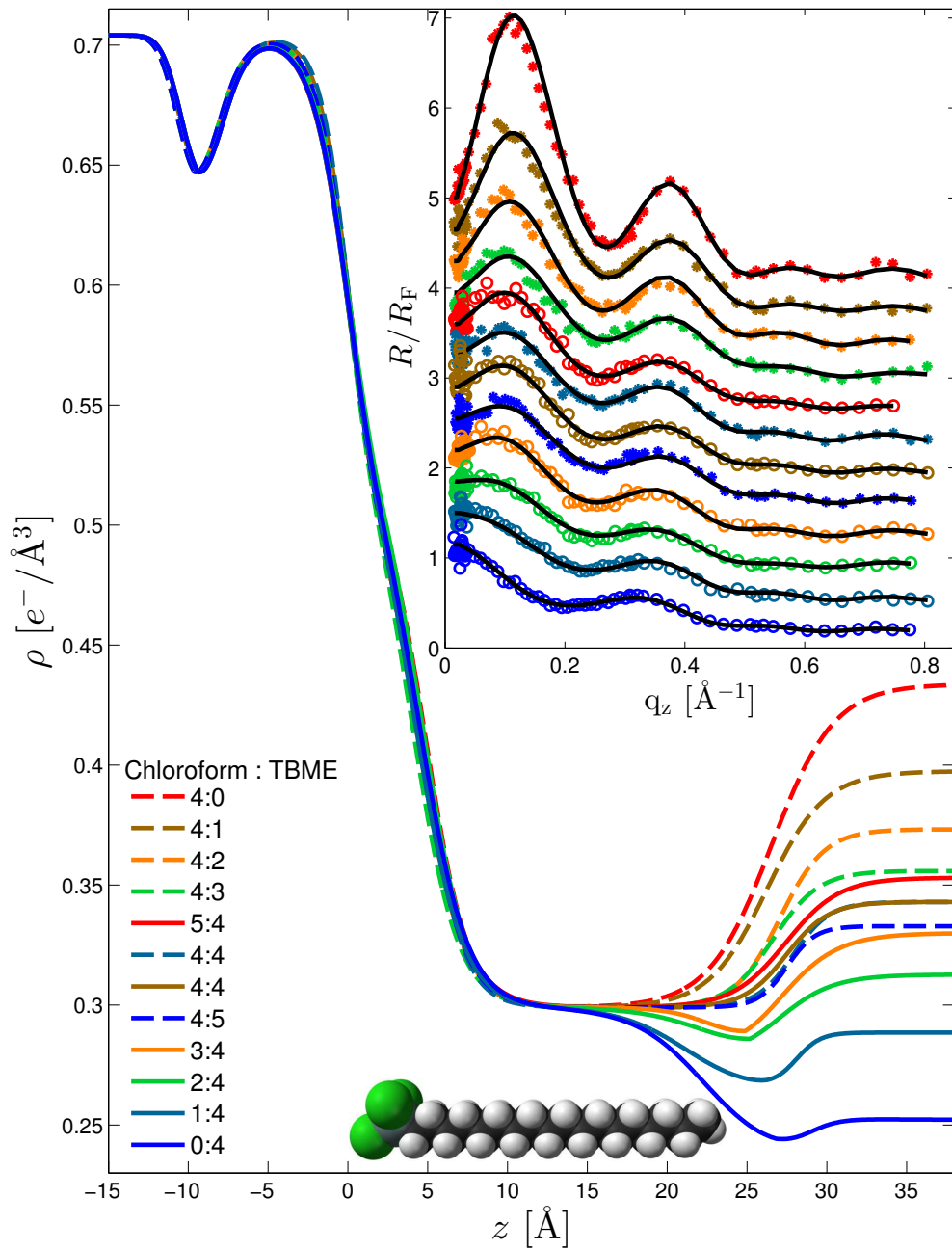


Abbildung 5.4: Elektronendichteprofile der ersten Messreihen an Chloroform und TBME sowie Mischungen der beiden Lösungsmittel in Kontakt mit OTS. Der Einschub zeigt die Messwerte und die aus den Elektronendichteprofilen berechneten Reflektivitätskurven (schwarze Linien). Die Messwerte und die Reflektivitätskurven wurden auf der y-Achse verschoben. Die gestrichelten und durchgezogenen Linien wurden auf zwei voneinander unabhängigen Proben gemessen. Die Messwerte der verschiedenen Proben sind im Einschub durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet.

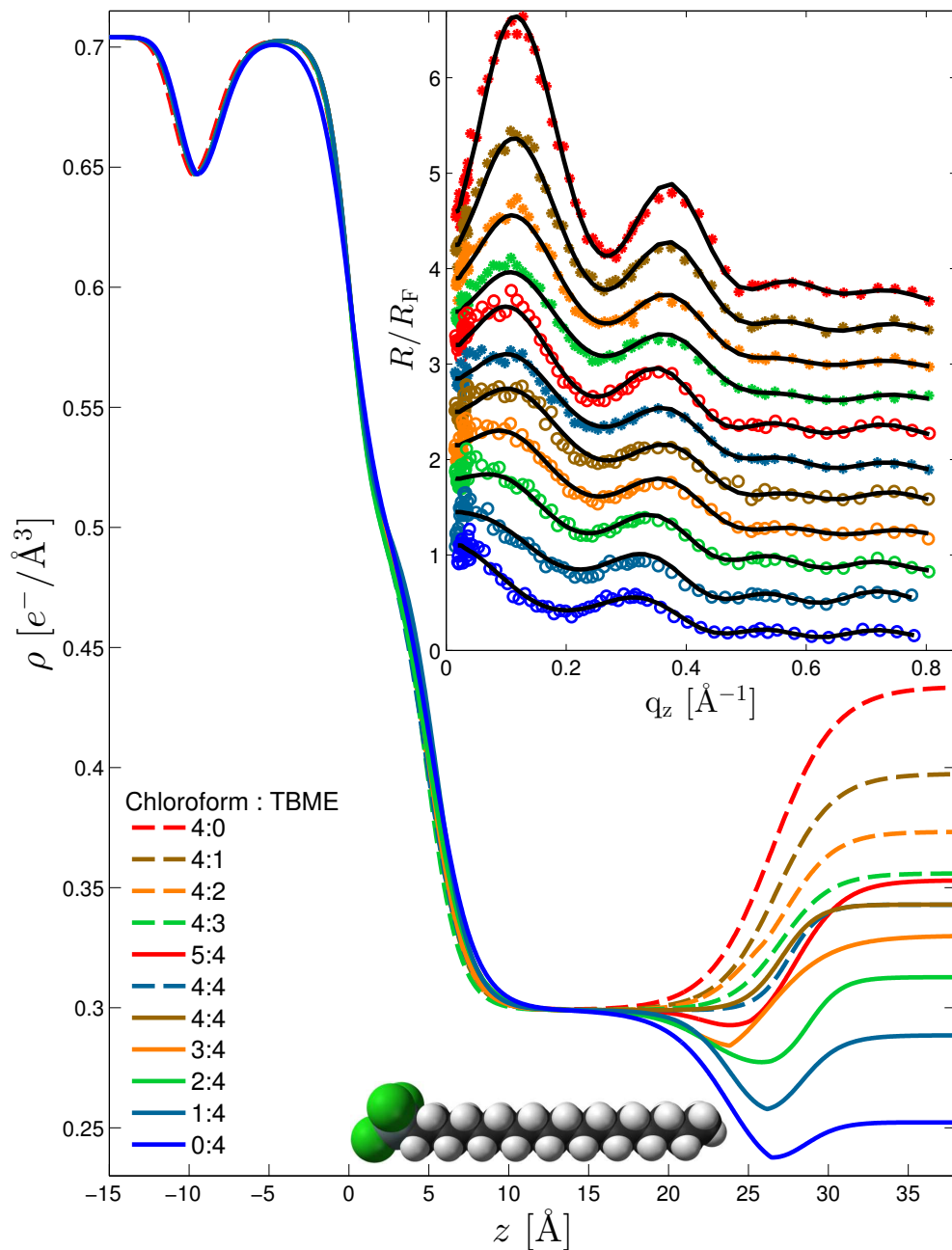


Abbildung 5.5: Elektronendichteprofile zu der zweiten Messreihe an Chloroform und TBME sowie Mischungen der beiden Lösungsmittel in Kontakt mit OTS. Der Einschub zeigt die Messwerte und die aus den Elektronendichteprofilen berechneten Reflektivitätskurven (schwarze Linien). Die Messwerte und die Reflektivitätskurven wurden auf der y-Achse verschoben. Die gestrichelten und durchgezogenen Linien wurden auf zwei voneinander unabhängigen Proben gemessen. Die Messwerte der verschiedenen Proben sind im Einschub durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet.

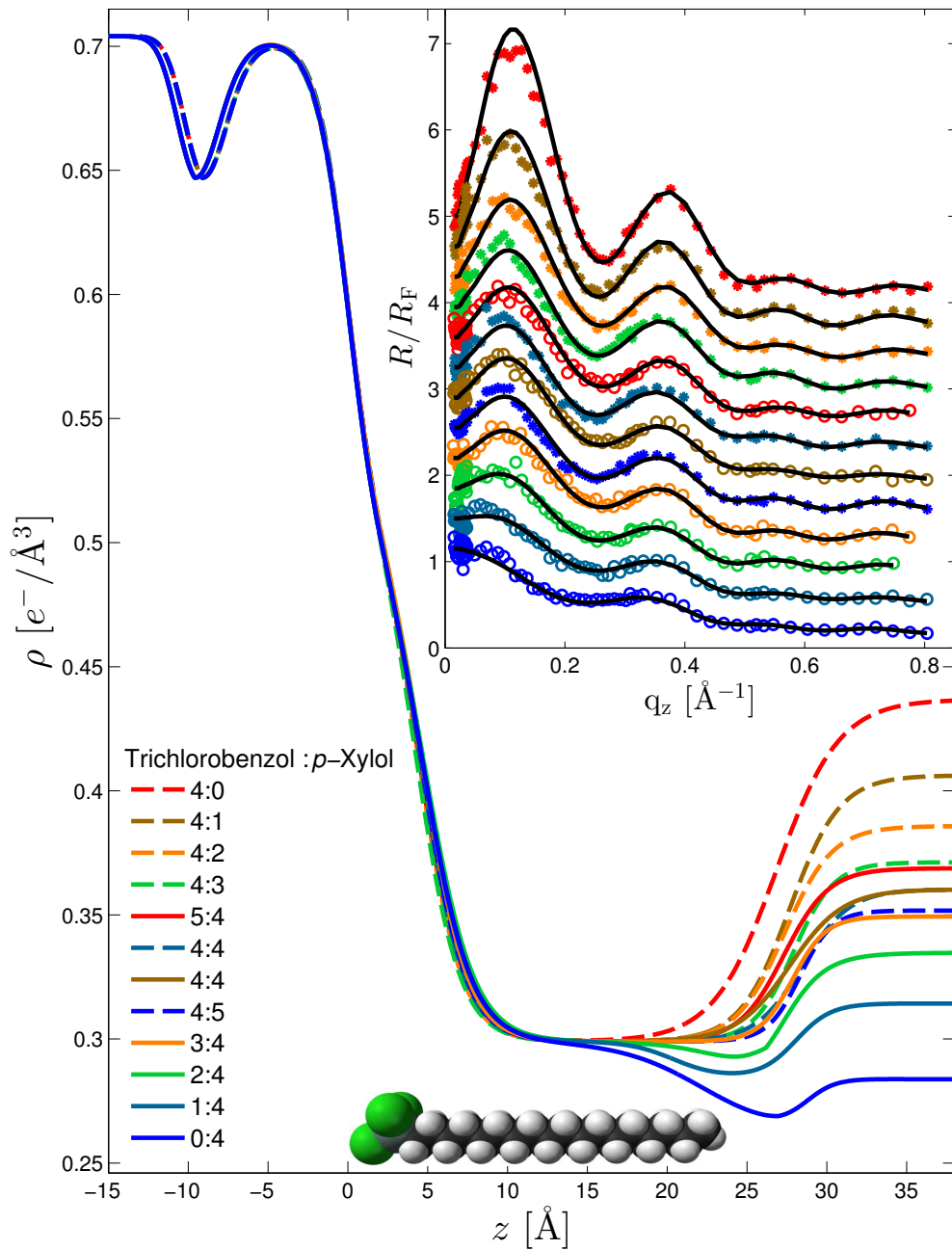


Abbildung 5.6: Elektronendichteprofile der ersten Messreihen an Trichlorobenzol und *p*-Xylol sowie Mischungen der beiden Lösungsmittel in Kontakt mit OTS. Der Einschub zeigt die Messwerte und die aus den Elektronendichteprofilen berechneten Reflektivitätskurven (schwarze Linien). Die Messwerte und die Reflektivitätskurven wurden auf der y-Achse verschoben. Die gestrichelten und durchgezogenen Linien wurden auf zwei voneinander unabhängigen Proben gemessen. Die Messwerte der verschiedenen Proben sind im Einschub durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet.

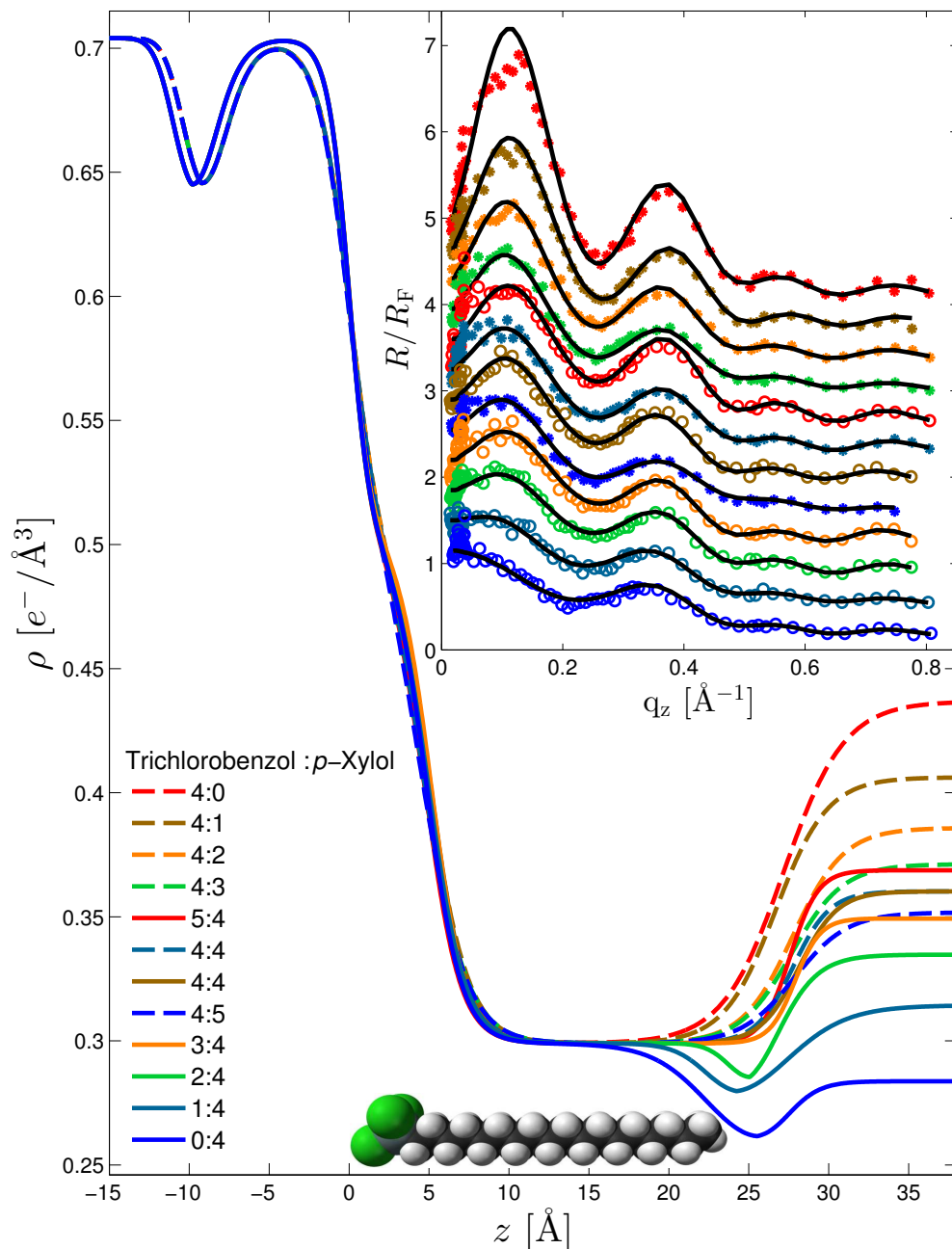


Abbildung 5.7: Elektronendichteprofile der zweiten Messreihe an Trichlorobenzol und *p*-Xylol sowie Mischungen der beiden Lösungsmittel in Kontakt mit OTS. Der Einschub zeigt die Messwerte und die aus den Elektronendichteprofilen berechneten Reflektivitätskurven (schwarze Linien). Die Messwerte und die Reflektivitätskurven wurden auf der *y*-Achse verschoben. Die gestrichelten und durchgezogenen Linien wurden auf zwei voneinander unabhängigen Proben gemessen. Die Messwerte der verschiedenen Proben sind im Einschub durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet.

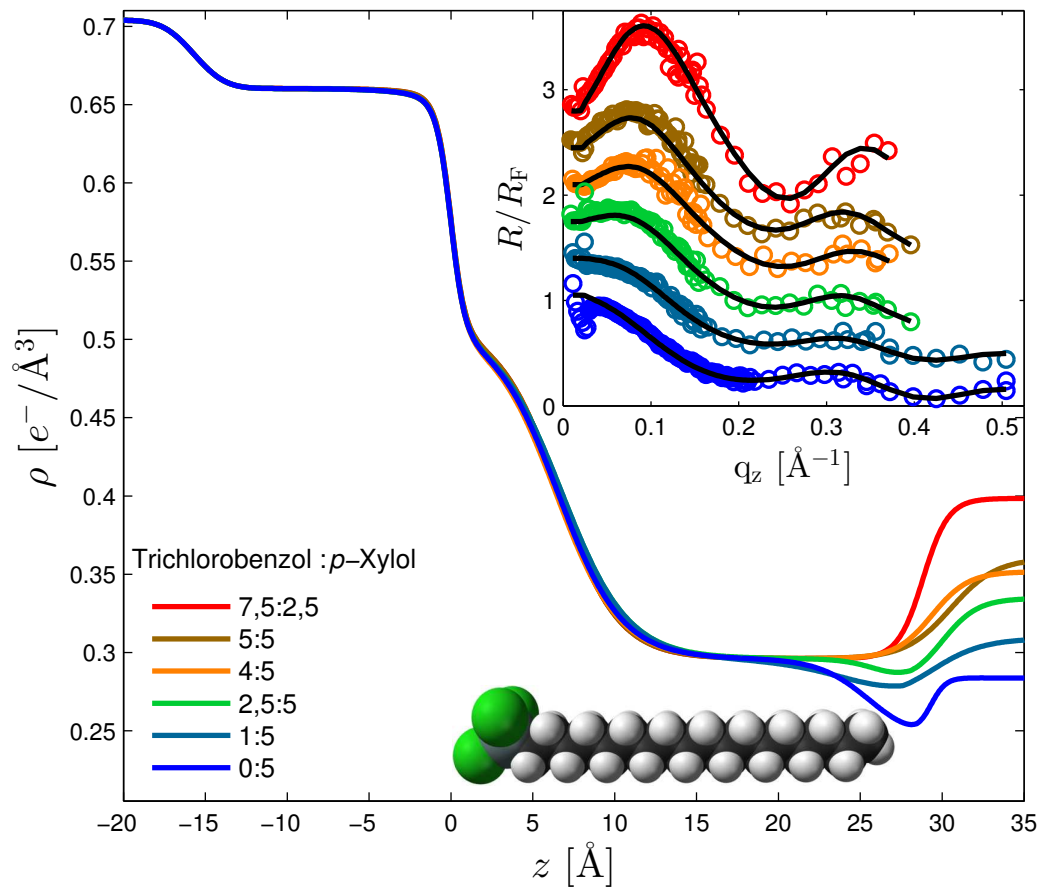


Abbildung 5.8: Elektronendichteprofile für Messungen an *p*-Xylol und Mischungen mit Trichlorobenzol in Kontakt mit OTS. Die Messungen wurden an der Beamline I07 der Diamond Light Source durchgeführt. Der Einschub zeigt die auf der y -Achse verschobenen Messwerte.

5.4 Untersuchung der Strahlenschäden

Bei den Messungen an Lösungsmitteln und Wasser in Kontakt mit OTS ist der schädigende Einfluss der Röntgenstrahlung von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden an mehreren Proben Messungen zur Änderung der Oberflächeneigenschaften durch die Röntgenstrahlung an der Beamline ID31 durchgeführt. Elektronendichtepprofile der Grenzflächen zwischen Wasser, *n*-Hexan und Chloroform in Kontakt mit OTS sind in Abbildung 5.9a) und b) dargestellt.

Zur Bestimmung des Einflusses der Röntgenstrahlung wird die Strahlendosis am Ort der Probe benötigt. Sie kann aus dem Messdaten einer Silizium-Diode direkt vor der Probenzelle bestimmt werden. Die Diode misst während der Datenaufnahme die Eingangsintensität. Aus diesen Werten kann die Anzahl der einfallenden Photonen pro Sekunde und, bei bekannter Photonenenergie von 70 keV, die einfallende Energie in mJ berechnet werden. Drei Beispiele für die Energie, die im Verlauf einer Messung auf die Probe einfällt, sind in Abbildung 5.9c) gegen q_z aufgetragen. Die Daten wurden während der in Abbildung 5.9a) bzw. b) in gleicher Farbe dargestellten Messungen aufgezeichnet. Da die Diode nicht genau kalibriert ist, können die so erhaltenen Werte Fehler von bis zu 20 % beinhalten.

Die einfallende Energie der Probe mit der geringsten genutzten Dosis (H₂O P1, rot) beträgt insgesamt 5,3 mJ. Wie im Elektronendichteprofil in Abbildung 5.9a) zu sehen, ist an der Grenzfläche das bereits diskutierte Dichtedefizit vorhanden. Für Messungen in Wasser ist die Strahlendosis, ab der die Schädigung des OTS an der Oberflächen durch im Wasser gebildete, freie Radikale beginnt, bekannt (vgl. Kapitel 4.3). Aus den Angaben in den Quellen [Mez06; Mez08b] wurde so als Schwellwert für einsetzende Schädigung die aufsummierte Photonenenergie von 2,7 mJ berechnet. Dieser Wert ist in Abbildung 5.9c) als schwarze Linie eingezeichnet. Die aufsummierte Energie der Probe H₂O P1 überschreitet den Schwellwert bei $q_z = 0,6 \text{ \AA}^{-1}$. Da ein ausgeprägtes, mit der Literatur vergleichbares Defizit vorhanden ist, sind die durch die Strahlung verursachten Schäden bei dieser Probe vernachlässigbar.

Die Probe H₂O P1 war die erste Probe, die während der Messzeit vermessen wurde. Die Strahlendosis aller anderen Proben ist höher, da die Messzeit erhöht und zudem im letzten Messbereich der Absorber herabgesetzt wurde. Die einfallende Intensität in diesem Bereich ist dadurch um einen Faktor 10 größer.

Für eine Wasserprobe mit höherer aufsummierter Energie (46,0 mJ, H₂O P2 #1) ist das Minimum weniger ausgeprägt (grüne Kurve H₂O P2 #1-1 in Abbildung 5.9a)). Für diese Messung ist es nicht möglich, die Messdaten mit dem aus dem Elektronendichteprofil berechneten angepassten Intensitätsverlauf nachzuvollziehen. Das erste Minimum, welches auf Grund der geringeren Strahlendosis das aussagekräftigste ist, wird von der Anpassung nicht reproduziert. Wenn hingegen die Messwerte oberhalb des Schwellwertes von 2,7 mJ (ab $q_z > 0,55 \text{ \AA}^{-1}$) bei der Berechnung nicht beachtet werden, entspricht das Elektronendichteprofil H₂O P2 #1-2 (braun) dem Verlauf der weniger belasteten Probe. Auch das erste Minimum wird jetzt vom angepassten Intensitätsverlauf nachvollzogen.

Um zu überprüfen, ob eine Schädigung der Probe schon am Beginn der Messung oder bei der Justierung auftritt, wurden Messungen des Minimums an zuvor unbestrahlten Probenpositionen durchgeführt, diese sind im Einschub ii) in Abbildung 5.9a) in türkis und schwarz zu sehen. Sie zeigen, dass die Form des Minimums dem der Messung H₂O P2-#1 entspricht und somit an dieser Position noch keine Schädigung der Probenoberfläche aufgetreten ist. Zum Vergleich wurde an der geschädigten Probenposition eine zweite Messung durchgeführt. Das Messsignal (orangene Kurve in 5.9a), Einschub i)) zeigt eine Abnahme der Oszillationsamplitude im ganzen Messbereich. Das entsprechende Elektronendichteprofil H₂O P2#2

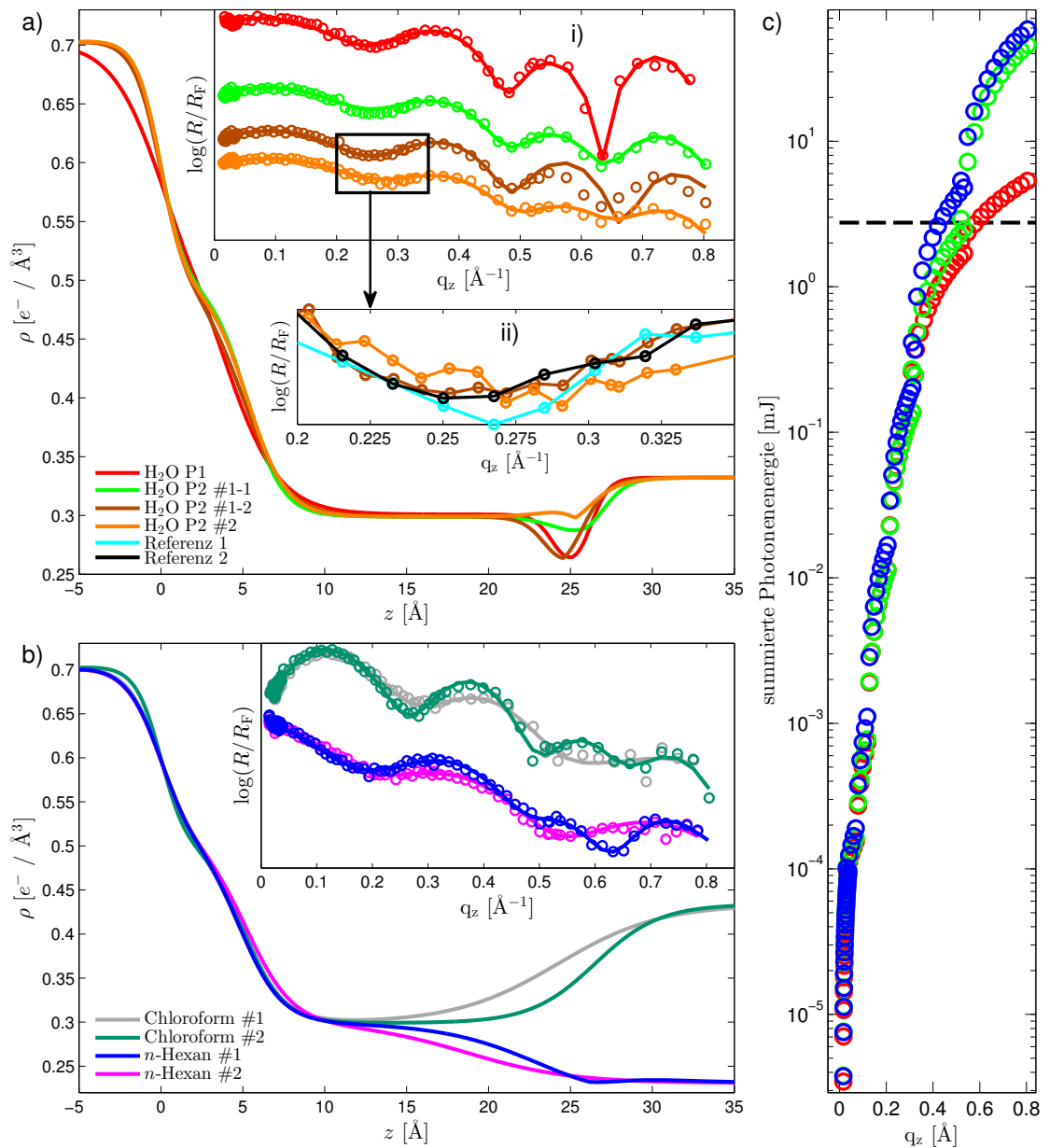


Abbildung 5.9: a) Elektronendichteprofile zweier Proben (P1, P2) mit OTS in Kontakt mit Wasser, die Profile H₂O P2#1-1 und H₂O P2#1-2 wurden zum gleichen Intensitätsverlauf angepasst. Für H₂O P2#1-2 wurden die Werte oberhalb $q_z = 0,55 \text{\AA}^{-1}$ nicht berücksichtigt. Das Elektronendichteprofil H₂O P2 #2 wurde an eine danach auf der gleichen Probenposition durchgeführte Messung angepasst. Einschub i) zeigt die Messwerte und die aus den Elektronendichteprofilen berechneten Intensitätsverläufe. In Einschub ii) ist das mehrfach vermessene erste Minimum gezeigt, Referenz 1 und 2 wurden auf zuvor unbestrahlten Probenpositionen gemessen. Die Linien dienen hier nur als Hilfslinien um den Kurvenverlauf nachvollziehen zu können. b) Elektronendichteprofile mit *n*-Hexan und Chloroform als flüssige Phase, die Proben wurden zuvor mit unterschiedlich vielen Photonen bestrahlt. c) Strahlendosen zu den in a) und b) dargestellten Messungen gleicher Farbe. Die schwarze gestrichelte Linie entspricht der von Mezger *et al.* [Mez06; Mez08b] beobachteten summierte Energie, ab der Schädigung am OTS auftritt.

zeigt ein weniger ausgeprägtes Minimum und einen (unphysikalisch) spitzen Verlauf an der Grenzfläche zwischen Schwanzgruppe und Wasser.

Für Messungen in anderen Flüssigkeiten existieren keine Beispiele für durch Strahlung verursachte Schäden an Grenzflächen. Um den Einfluss der Strahlung zu untersuchen, wurden Messungen an Chloroform, einem der dichtesten verwendeten Lösungsmittel, und *n*-Hexan, dem Lösungsmittel mit der geringsten Dichte, durchgeführt. Die Absorption der Strahlung ist nach Gleichung (4.1) (Seite 32) über den Absorptionskoeffizienten μ von der Dichte der Flüssigkeit abhängig.

Die in grau gezeigte Messung an der OTS-Chloroform-Grenzfläche wurde an einer belasteten Probenposition durchgeführt. Das Elektronendichteprofil (grau) zeigt eine sehr raue Probenoberfläche mit verkürztem OTS-Schwanz. Im Gegensatz dazu entspricht die Messung an einer unbelasteten Position (dunkel-grün) dem erwarteten Verlauf für eine OTS-Oberfläche in Kontakt mit unpolaren Lösungsmitteln, da die Rauigkeit nicht größer ist als bei der trockenen Probe.

Die Messung an *n*-Hexan zeigt hingegen, dass OTS in weniger dichten Lösungsmitteln auch weniger anfällig für Strahlenschäden ist. Die in blau dargestellte Messung wurde mit der höchsten einfallenden Intensität aller Proben gemessen und zeigt trotzdem keinen erkennbaren Strahlenschaden, da alle Minima vom angepassten Intensitätsverlauf reproduziert werden können. Die zusätzliche Bestrahlung der Probe für 15 Sekunden durch den um einen Faktor 100 abgeschwächten Röntgenstrahl³ und erneutes Messen ändern den Intensitätsverlauf der Messung nicht (nicht gezeigt). Erst durch 60 Sekunden Bestrahlung mit der vollen Intensität des Röntgenstrahls konnte die Probe geschädigt werden (magenta). Wie bei der an der OTS-Chloroform-Grenzfläche beobachteten Schädigung wird die OTS-Schwanzgruppe kürzer und rauer.

Die vorgestellten Beispiele zeigen, dass die Dichte und Struktur der verwendeten Flüssigkeit einen großen Einfluss auf die durch Strahlung verursachten Schäden an der Oberfläche hat. Die dichten Lösungsmittel sind anfälliger für Strahlenschäden als die weniger dichten Lösungsmittel, da sie mehr Energie aus der Röntgenstrahlung aufnehmen und stärker geschädigt werden.

5.5 Analyse der Resultate und Diskussion

Zur Charakterisierung des Dichtedefizits zwischen einer hydrophoben Oberfläche und Wasser sind in der Literatur verschiedene Parameter vorgeschlagen worden [Mam04; Mez06]. Die beiden am häufigsten genutzten Methoden sind bei den zuvor gezeigten Ergebnissen nicht verwendbar. So nutzen Mezger *et al.* das Produkt aus der Schichtdicke der Verarmungsschicht und die Elektronendichtedifferenz zwischen Wasser und dem Minimum des Dichtedefizits [Mez06]. Ein solches Minimum ist in den Elektronendichteprofilen an Proben mit einer Flüssigkeitselektronendichte $\rho_{F1} > 0,33e^-/\text{\AA}^3$ nicht sicher bestimmbar und für größere ρ_{F1} nicht mehr vorhanden. Daher kann keine Schichtdicke mehr bestimmt werden. Mamatkulov *et al.* beschreiben die Dichtedifferenz, indem sie über normierte Integrale unabhängig die Beiträge der festen und der flüssigen Phase berechnen. Diese sind nur in Simulationen zugänglich.

Um das Dichtedefizit an den verschiedenen OTS-flüssig-Grenzflächen zu bestimmen, wird stattdessen das Elektronendichteprofil der idealen Grenzfläche ohne Dichtedefizit $\rho_t(z)$ berechnet. Hierzu werden die aus der Messung des trockenen OTS-Wafers bekannten Parame-

³Das entspricht der einfallenden Intensität bei großen q_z in Abbildung 5.9c)

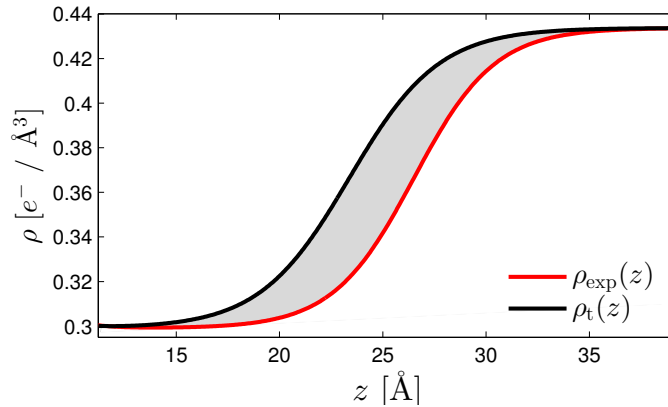


Abbildung 5.10: Experimentell ermitteltes Elektronendichteprofil der OTS-Chloroform-Grenzfläche ρ_{exp} (rot) und das ideale Elektronendichteprofil der gleichen Grenzfläche ρ_t (schwarz), erstellt aus den Parametern der Referenzmessung.

ter für die Schichtdicke und die Rauigkeit der OTS-Schwanzgruppen verwendet. Aus diesem und dem experimentellen Elektronendichteprofil $\rho_{\text{exp}}(z)$ wird die Summe der Abstandsquadrate nach

$$\chi^2 = \sum_z (\rho_t(z) - \rho_{\text{exp}}(z))^2 \quad (5.1)$$

berechnet. Das entspricht dem grauen Bereich in Abbildung 5.10 zwischen $\rho_t(z)$ (schwarz) und $\rho_{\text{exp}}(z)$ (rot). Bei dieser Methode wird die Abweichung vom idealen Verlauf berechnet, ohne das Vermutungen darüber gemacht werden müssen, welchem Bereich der Grenzfläche das Defizit zuzurechnen ist. Da nur an einer Probe die Eigenschaften der trockenen OTS-Monolage bestimmt wurden, ist die Methode mit einem systematischen Fehler behaftet. Es hat sich aber herausgestellt, dass der Unterschied zwischen gleichzeitig präparierten Proben sehr gering ist. So stimmt auch die Dicke der OTS-Schicht in den Elektronendichteprofilen mit $\rho_{\text{Fl}} < 0,33 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ mit der Referenzprobe überein und zeigt, dass alle Proben die gleichen Eigenschaften haben (vgl. Abbildung 5.3).

In Abbildung 5.11 sind die so bestimmten χ^2 -Werte gegen die Elektronendichte der Flüssigkeit ρ_{Fl} aufgetragen. Die Messwerte sind ohne Fehlerbalken angegeben, da maximal zwei unabhängige Messungen an der gleichen Grenzfläche durchgeführt wurden und daher kein Fehler ermittelt werden kann. Als Anhaltspunkt für die Größe des Fehlers kann die Streuung der χ^2 -Werte an der gleichen Grenzfläche genutzt werden, zum Beispiel die Proben mit reinem p-Xylol oder Chloroform. Die χ^2 -Werte für die Gemische der Lösungsmittel streuen bis zur Elektronendichte von $\rho_G \approx 0,345 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ um einen konstanten Wert. ρ_G ist fast gleich zu dem Wert, ab dem in den Elektronendichteprofilen auf Grund des größeren Elektronendichtekontrastes nicht mehr unterschieden werden konnte, ob ein Minimum vorliegt ($\rho_{\text{Fl}} \approx 0,33 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$). Oberhalb von ρ_G steigt χ^2 an. Die wachsende Differenz zwischen der Elektronendichte der OTS-Schwanzgruppe und der Flüssigphase erhöht bei einer konstanten Abweichung von $\rho_{\text{exp}}(z)$ entlang z den χ^2 -Wert. Es sollten daher im Bereich $\rho_{\text{Fl}} > 0,345 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ nur Flüssigkeiten mit gleicher Elektronendichte miteinander verglichen werden, um Effekte der Lösungsmiteleigenschaften wie Polarität oder Molekülgröße zu diskutieren. Dies trifft unter den hier verwendeten Lösungsmitteln auf Chloroform und Trichlorobenzol zu. Die χ^2 -Werte steigen für Mischungen mit Trichlorobenzol ($r_{\text{Gy}} = 4,83 \text{ \AA}$) stärker als bei Chloroform ($r_{\text{Gy}} = 3,23 \text{ \AA}$), da die Packungsdichte der größeren Trichlorobenzol-

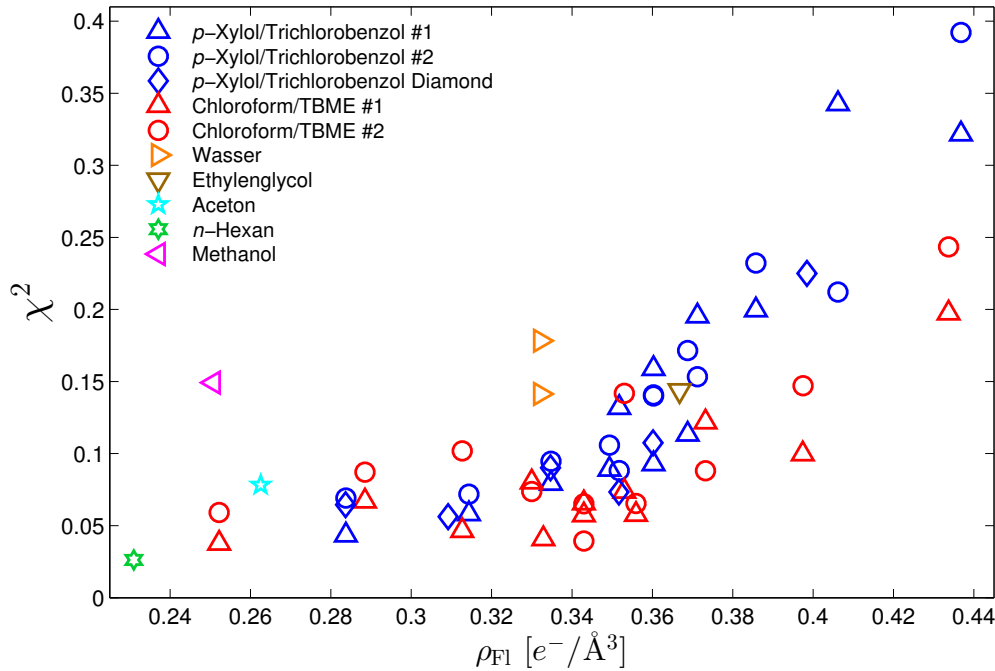


Abbildung 5.11: Verlauf der χ^2 -Werte in Abhängigkeit der Elektronendichte der Lösungsmittel ρ_{Fl} und deren Mischungen.

Moleküle an der rauen Oberfläche geringer ist als die der kleineren Chloroform-Moleküle. Möglich ist auch ein Einfluss der unterschiedlichen Symmetrie der Moleküle (vgl. Abbildung 5.2, Seite 39), dieser kann ohne zusätzliche Simulationen aber nicht bestimmt werden.

Um einen Überblick über mögliche Ursachen für das Dichtedefizit zu erhalten, sind in Abbildung 5.12 die χ^2 -Werte gegen verschiedene Eigenschaften der reinen Lösungsmittel aufgetragen. Es werden nur die Lösungsmittel diskutiert, bei denen ein Minimum in den Elektronendichteprofilen an der Grenzfläche festgestellt werden konnte oder die Elektronendichte der Flüssigkeit ρ_{Fl} unterhalb von ρ_{G} liegt. Die χ^2 -Werte für Chloroform und Trichlorobenzol werden daher in der Diskussion nicht berücksichtigt. Der große Elektronendichteunterschied an der Grenzfläche erhöht den χ^2 -Wert und macht sie dadurch nicht mehr mit den Werten der anderen Lösungsmitteln vergleichbar. Da für Ethylenglycol auch ein Elektronendichteprofil mit Minimum angepasst werden konnte, wird dieses bei der folgenden Betrachtung mit einbezogen, obwohl die Elektronendichte des Ethylenglycol ($\rho = 0,366 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$) etwas größer ist als $\rho_{\text{G}} = 0,345 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$.

In Abbildung 5.12a) sind die χ^2 -Werte anhand der Polarität der Flüssigkeiten, bestimmt durch die E_{T}^{N} -Werte, aufgetragen (vgl. Tabelle 5.1). Die Werte für χ^2 folgen einem linearen Verlauf in Abhängigkeit der Polarität der Lösungsmittel E_{T}^{N} , wie durch die angepasste Gerade angedeutet.

In Abbildung 5.12b) sind die χ^2 -Werte gegen die Oberflächenenergie γ dargestellt. Ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Größen ist für fast alle Messwerte gegeben, einzig Methanol liegt außerhalb dieses Verlaufs. Der Grund dafür ist unbekannt. Zur Visualisierung des linearen Verlaufs wurde auch hier eine Gerade angepasst.

In Abbildungsteil 5.12c) ist die Abhängigkeit der χ^2 -Werte vom Gyrationradius r_{Gy} angegeben. Auch hier ist ein linearer Zusammenhang vorhanden und durch eine angepasste Gerade angedeutet, nur der χ^2 -Wert für Ethylenglycol weicht etwas ab. Bemerkenswert ist,

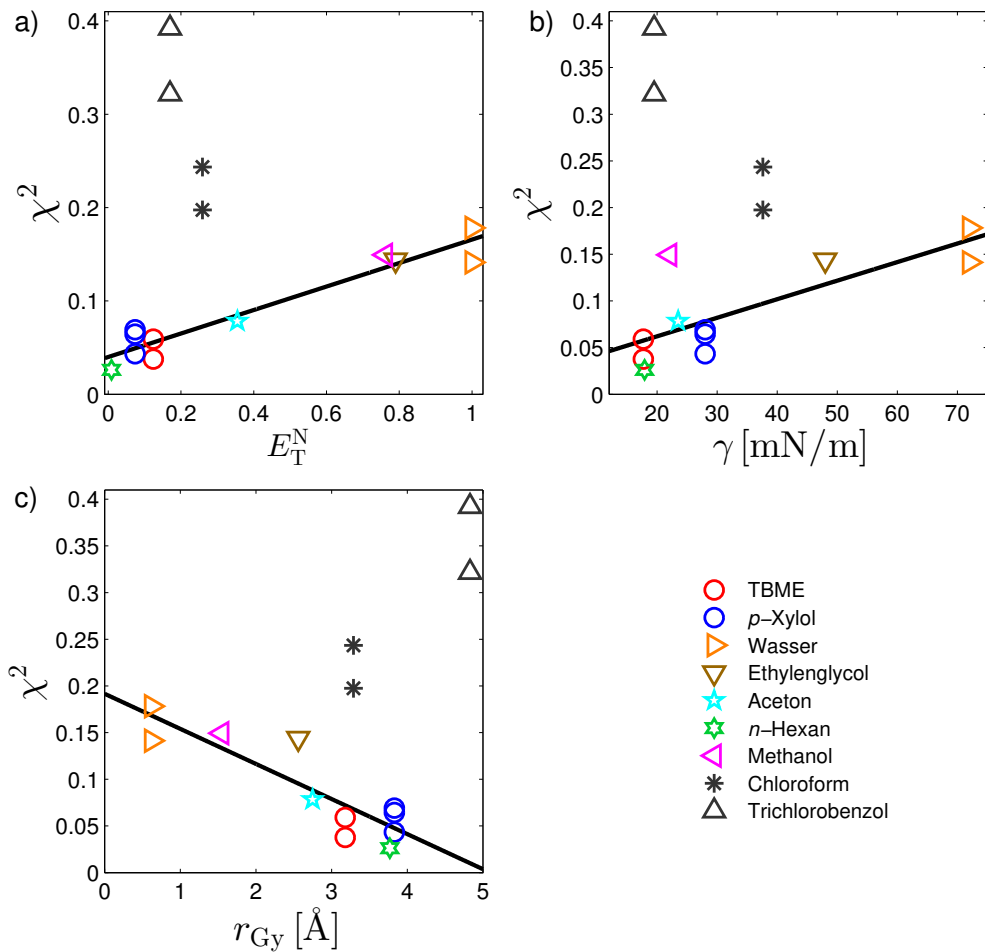


Abbildung 5.12: Abweichung von der idealen Oberfläche χ^2 gegen a) E_T^N , b) γ und c) r_{Gy} . Alle Parameter zeigen eine lineare Abhängigkeit zwischen den Eigenschaften und der Abweichung χ^2 , dies ist jeweils durch eine angepasste Gerade angedeutet.

dass die kleineren Moleküle größere χ^2 -Werte haben. Das kann damit zusammenhängen, dass die kleine Moleküle gleichzeitig die drei polarsten Moleküle sind. Dies widerspricht der Beobachtung bei den dichten Lösungsmitteln Chloroform und Trichlorobenzol. Hier ist der Effekt umgekehrt, dass größere Trichlorobenzol hat auch ein größeres Defizit. Diese Beobachtung kann auch durch unterschiedliche Orientierungen an der Oberfläche erzeugt werden, da Trichlorobenzol eine komplexere Struktur als das eher kugelförmige Chloroform hat.

Die geringste Abweichung vom linearen Verlauf besteht zwischen χ^2 und dem Polaritätsindex E_T^N , aber auch die anderen Größen folgen, bis auf jeweils eine Ausnahme, einem linearen Verlauf. Gerade für den Gyrationradius hängt dies möglicherweise damit zusammen, dass der Gyrationradius r_{Gy} der verwendeten Lösungsmittel umgekehrt proportional zur Polarität E_T^N ist.

Im Vergleich mit in der Literatur verfügbaren Messungen an der fest-flüssig-Grenzfläche ist die Reichweite der Ordnung in der Flüssigkeit geringer. Das beobachtete Defizit ist kleiner als das zuvor an der gleichen [Gut11] und ähnlichen [Mac07] Festkörper-Lösungsmittel-Grenzfläche mit Neutronenreflektivitäten bestimmte Defizit. Die Länge der in beiden Studien gemessenen Defizite betrug zwischen 15 \AA und 23 \AA und ist damit mehr als doppelt so groß

wie das größte hier gemessene Defizit (Methanol, $d = 8 \text{ \AA}$). Der Unterschied kann nicht erklärt werden, Dichtedefizite dieser Größenordnung ergeben stark geänderte Reflektivitätsmessungen und können bei den hier gezeigten Messungen ausgeschlossen werden. In beiden Studien werden Neutronenreflektivitäts-Messungen zur Bestimmung des Defizits genutzt, dies scheint das Messergebnis zu beeinflussen. Zumindest in der Studie von [Mac07] kann auch die erhöhte Rauigkeit (15 \AA) das gemessene Defizit beeinflussen.

Die beobachteten Dichtedefizite sind auch kleiner als die zuvor an Siliziumdioxid beobachteten Defizite der unpolaren Flüssigkeiten *n*-Hexan, *n*-Decan, Perfluorhexan und Cyclohexan [Doe98; Doe00]. Die Schichtdicke des Defizits an der *n*-Hexan-Siliziumdioxid-Grenzfläche beträgt in den Studien ungefähr 25 \AA und ist damit um 17 \AA dicker als das größte in dieser Arbeit für Methanol im Kontakt mit OTS gemessene Defizit (8 \AA). Auch der Unterschied in der Elektronendichte ist größer. Möglicherweise beeinflusst die geringe Dicke des Flüssigkeitsfilms von 80 \AA in den Studien von Doerr *et al.* die Größe des Dichtedefizits.

Dass bei den hier vorgestellten Messungen keine Ordnung innerhalb der Flüssigkeiten nachgewiesen werden konnte, hängt mit mehreren Faktoren zusammen. Da die Oberfläche nur über Van-der-Waals Kräfte wechselwirkt, ist der Einfluss auf die Flüssigkeitsphase geringer als an anderen Oberflächen. Auch die etwas erhöhte Rauigkeit gegenüber den aus der Literatur bekannten OTS-Oberflächen beeinflusst das Messergebnis [Mez06; Mez08b]. Die Proben sind zudem rauer als die häufig untersuchten Siliziumdioxid-Oberflächen. Eine erhöhte Rauigkeit kann die Ordnung an einer Grenzfläche stören [Isr11] und das Dichtedefizit so herabsenken [Yu01b]. Durch erhöhte Ordnung hervorgerufene und in der Literatur beobachtete Dichtedefizite mit Schichtdicken von 15 \AA und mehr wären in den vorgestellten Ergebnissen aber sichtbar und können für die Proben ausgeschlossen werden.

Kapitel 6

Proteine an Grenzflächen

Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente beschäftigen sich mit Proteinadsorbaten an der hydrophoben OTS-Wasser-Grenzfläche.

Die Proteinadsorption auf Oberflächen betrifft viele verschiedene Bereiche, zum Beispiel die Biologie, die industrielle Nahrungsmittelerzeugung oder die Medizin [Nak01; Hor03; Wei14]. So ist für die Akzeptanz von Implantaten im menschlichen Körper die Proteinadsorption von großer Bedeutung, da diese die Grundlage für die Bildung Infektionen am Implantat sein kann [Kas02]. Die Anlagerung der im Blut enthaltenen Proteine an solchen Oberflächen erfolgt abhängig von der Größe der Proteine. Schon in einer der ersten Studien hierzu nutzte Vroman verschiedenen hydrophobe Oberflächen und bestimmte die Adsorption der Proteine durch die geänderte Benetzung mit Wasser [Vro62]. Später konnte gezeigt werden, dass die Adsorption von biologischen Filmen auf Implantaten von den Oberflächeneigenschaften und dem Denaturierungsgrad der Proteine abhängt. Beispielsweise adsorbiert das Protein Fibronectin stärker auf hydrophobem Polystyrol und führt so zu vermehrter Zelladsorption. Auf hydrophilisiertem Polystyrol hingegen adsorbieren weniger Proteine, dadurch sinkt auch die Zelladsorption [Hor94; Hor03]. Die Bildung der Filme auf Implantaten hängt zudem von der Zusammensetzung des Serums am Implantat ab. Wenn zum Beispiel das Protein Fibrinogen aus dem Blutplasma entfernt wird, sinkt die Adsorption der Blutplättchen und die Filmbildung wird reduziert [Tsa02].

Des Weiteren hat die Proteinadsorption großen Einfluss in vielen technischen Bereichen. Viele Filtermembranen bestehen aus Kunststoffen wie Polypropylen und haben eine hydrophobe Oberfläche. An den Oberflächen adsorbieren Proteine und initiieren damit wie an Implantaten das Wachstum biologischer Schichten (engl. Biofouling). Letztendlich führt dies zum Verstopfen der Filter. Werden stattdessen modifizierte Kunststoffe mit einer hydrophilen Oberfläche genutzt, reduziert sich die Adsorption stark [Chu97]. Ähnliches wurde auch für Fleece-Fasern festgestellt, hier konnten sowohl Bakterien- als auch Proteinadsorption durch Hydrophilisierung stark reduziert werden [Wan11].

Das Adsorptionsverhalten von Proteinen hängt neben den Eigenschaften der Oberfläche auch von den Umgebungsvariablen wie der Temperatur [Jac02; Kie14b] oder dem pH-Wert [Hö98; Göh15] ab. Hierbei ist auch die Änderung des Zustandes der Proteine in der Lösung von Bedeutung, da sie als Reservoir für weitere Adsorption dienen. So konnten Kiesel *et al.* zeigen, dass die Schichtdicke stark zunimmt, wenn die Temperatur über die Denaturierungstemperatur der Proteine erhöht wird und sich die Probe in wässriger Proteinlösung befindet [Kie14b]. Wird statt der Proteinlösung reines Wasser ohne gelöste Proteine an einer Probe mit Proteinschicht genutzt, sinkt die Schichtdicke bei steigender Temperatur leicht. Die Stabilität der Proteine kann auch durch Änderung des hydrostatischen Druck unter-

sucht werden. Gegenüber der Variation der Temperatur hat die Änderung des Drucks den Vorteil, dass sich bei konstanter Temperatur nur die Dichte des Systems ändert. In Proteinen werden durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks hauptsächlich Packungsdefekte reduziert [Gek79], während die Sekundärstruktur erhalten bleibt [Sch11]. Erst oberhalb eines proteinabhängigen Grenzdrucks werden die Proteine entfaltet. Auf Grund der komplexen experimentellen Implementation gibt es bisher kaum Daten zum Einfluss von Druck auf an Oberflächen adsorbierte Proteinschichten. Die einzige bekannte Studie zeigt die Zunahme der Dicke einer Lysozymschicht um ungefähr 7 Å auf hydrophobem Polystyrol und 10 Å auf Siliziumdioxid [Koo13].

Das folgende Kapitel befasst sich mit den Eigenschaften solcher durch Proteine gebildeten Adsorbatschichten. So wurde das Verhalten von durch Säurehydrolyse zerstörten Proteinen an der fest-flüssig-Grenzfläche untersucht. Durch die Säurehydrolyse sind die Proteine denaturiert und teilweise in ihre einzelnen Aminosäurenbestandteile zerlegt [Fou98]. Sie adsorbieren in dünnen Schichten auf hydrophoben Oberflächen und ändern die Eigenschaften der Oberfläche erheblich. Die Schichten wurden sowohl *in situ* als auch *ex situ* charakterisiert. Die Beschreibung der Analyse befindet sich im ersten Teil des Kapitels.

Im zweiten Abschnitt des Kapitels wird der Einfluss von hohen hydrostatischen Drücken auf adsorbierte Schichten des Modellproteins Lysozym an der hydrophoben fest-flüssig-Grenzfläche diskutiert. Die in der Literatur beschriebene druckinduzierte Adsorption konnte an der OTS-Wasser-Grenzfläche nicht bestätigt werden. Des Weiteren wird durch das Hinzufügen von Urea die Adsorption an der Grenzfläche erheblich reduziert. Durch die Erhöhung des hydrostatischen Drucks ist es möglich, dies mit der Anlagerung von Urea in der Schicht in Verbindung zu setzen.

Eine häufig genutzte Größe zur Beschreibung der Eigenschaften einer Proteinschicht ist die adsorbierte Menge eines Proteins Γ [Häh12; Kie14b]. Hierzu wird aus dem Elektronendichteprofil $\rho_{\text{Protein}}(z)$ das Volumenbruchprofil

$$\Theta_{\text{Lit}}(z) = \frac{\rho_{\text{Protein}}(z) - \rho_{\text{Substrat}}(z)}{\rho_{\text{Protein}}^0 - \rho_{\text{H}_2\text{O}}^0} \quad (6.1)$$

berechnet. $\rho_{\text{Substrat}}(z)$ bezeichnet das Elektronendichteprofil des sauberen Substrats in Wasser, und ρ_{Protein}^0 bzw. $\rho_{\text{H}_2\text{O}}^0$ den theoretischen Wert der Elektronendichte des Proteins bzw. der wässrigen Lösung.

Die Berechnung nach dieser Methode ist für die in dieser Arbeit genutzten hydrophoben OTS-Oberflächen auf Grund von Änderungen im Bereich der Verarmungsschicht nicht geeignet. In Abbildung 6.1 ist diese Region oberhalb der OTS-Schwanzgruppe mit einer Adsorbatschicht aus Lysozym dargestellt. Wie zu sehen ist, existiert auch zwischen OTS und Adsorbatschicht eine Verarmungsschicht. Ist eine OTS-Probe nur in Kontakt mit Wasser, wird ein Teil der Verarmungsschicht, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, durch eine Orientierung der Wassermoleküle erzeugt. Das auf diese Weise erzeugte Defizit ist im Elektronendichteprofil $\rho_{\text{Substrat}}(z)$ enthalten. Da die Proteine auf hydrophoben Oberflächen stark denaturiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass um das Protein keine intakte Hydratationsschale mehr existiert und die hydrophoben Bereiche in direktem Kontakt mit der Oberfläche sind. Wenn die Elektronendichte dieser hydrophoben Bereiche kleiner ist als die des Wassers, wird das beobachtete Defizit sogar vergrößert und ist anderen Ursprungs als an der OTS-Wasser-Grenzfläche. Daher verändert sich auch das Elektronendichteprofil des Substrates $\rho_{\text{Substrat}}(z)$ in wässriger Proteinlösung gegenüber dem in Wasser und ist nicht mehr bekannt. Eine Berechnung nach Gleichung (6.1) ist damit nicht möglich.

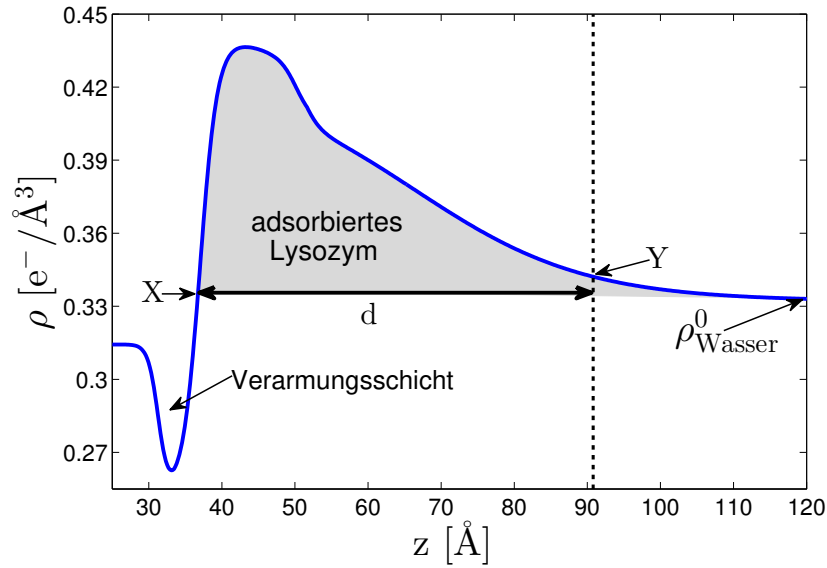


Abbildung 6.1: Beispiel zur Analyse einer auf OTS adsorbierten Schicht aus Lysozym, weitere Informationen zu den angegebenen Parametern im Text.

Stattdessen kann nach Definition eines Punktes X, ab dem die Elektronendichte der Proteinschicht größer als die des Wassers $\rho_{\text{H}_2\text{O}}^0$ ist, das Volumenbruchprofil mit

$$\Theta(z) = \frac{\rho_{X-\infty}(z) - \rho_{\text{H}_2\text{O}}^0}{\rho_{\text{Protein}}^0 - \rho_{\text{H}_2\text{O}}^0} \quad (6.2)$$

berechnet werden. $\rho_{X-\infty}(z)$ bezeichnet dann den Bereich des Elektronendichteprofiles zwischen dem Punkt X und dem Volumenwasser. Der Term $\rho_{X-\infty}(z) - \rho_{\text{H}_2\text{O}}^0$ entspricht dann dem grau eingefärbten Bereich in Abbildung 6.1. Aus den Volumenbruchprofilen kann dann über

$$\Gamma = \frac{m}{V} \int \Theta(z) dz \quad (6.3)$$

die adsorbierte Menge in mg/m^2 bestimmt werden, mit der molaren Masse m und dem molaren Volumen V des Proteins.

Analog zur Berechnung der adsorbierten Menge kann die maximale Belegung

$$\Gamma_{\text{Max}} = \frac{\rho_{\text{Max}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}}^0}{\rho_{\text{Protein}}^0 - \rho_{\text{H}_2\text{O}}^0} \quad (6.4)$$

berechnet werden. Hierbei ist ρ_{Max} die maximale Elektronendichte der Proteinschicht. Γ_{Max} ist somit ein Maß für die Belegung am dichtesten Punkt der Proteinschicht.

Bei der Berechnung der Elektronendichte wird für die einzelnen Schichten eine Dicke und eine Rauigkeit angenommen, die Schichtdicke entspricht dann dem Wendepunkt im Elektronendichteprofil. Auf Grund der komplexen Substruktur der Proteinschichten muss die Adsorbatschicht bei der Berechnung der Elektronendichteprofilen häufig durch mehrere dünne Schichten großer Rauigkeit modelliert. Diese überlagern sich bei der Berechnung nach dem Effektiven Dichtemodell und die Unterscheidung zwischen den einzelnen Schichtdicken und Rauigkeiten ist nicht mehr möglich. Für die Proteinschichten wird aber ein einheitliches Maß zur Bestimmung der Schichtdicke benötigt, welches nicht von der Substruktur bei

der Berechnung des Elektronendichteprofiles abhängt und auch die zum Wasser orientierten Seitenketten berücksichtigt.

In dieser Arbeit wird dazu die Entfernung zwischen dem Punkt X und dem Wert, bei dem die Elektronendichte auf $1,03 \cdot \rho_{\text{Fl}} \approx 0,34 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ abfällt (Punkt Y in Abbildung 6.1) verwendet. Nach Gleichung (6.4) entspricht das ungefähr einer Lysozymbelegung von 5%. Die Berechnungsmethode wurde von Richter *et al.* vorgeschlagen [Ric13].

Die Eigenschaften von Proteinadsorbaten wurden zuvor von vielen Gruppen mittels XRR und Neutronenreflektivitäten untersucht. Die Ergebnisse an der hydrophoben OTS-Wasser-Grenzfläche werden im folgenden Abschnitt vorgestellt. In Tabelle 6.1 sind aus der Literatur bekannte Werte für die Schichtdicke d und adsorbierte Menge Γ für verschiedene Proteine auf OTS angegeben.

Allgemein zeigt sich, dass die Schichtdicke der Proteinadsorbate auf OTS kleiner ist als die Dimensionen der nativen Proteine.¹ So haben Hähl *et al.* die Adsorption unterschiedlicher Proteine (Lysozym, Rinderalbumin (bovine serum albumin, BSA), α -Amylase) auf OTS studiert [Häh12]. Die Schichtdicke aller in der Studie untersuchten Proteine auf OTS betrug $\approx 20 \text{ \AA}$. Die gleichen Schichtdicken wurden von Richter *et al.* für Lysozym und BSA gemessen [Ric13]. Die Schichten sind außerdem dichter als Adsorbate aus nativen Proteinen, welche in den gleichen Studien auf Siliziumdioxid beobachtet werden. Wegen dieser dünnen und dichten Schichten kann davon ausgegangen werden, dass die an den hydrophoben Oberflächen adsorbierten Proteine denaturiert sind.

Lu *et al.* [Lu98] haben Lysozymadsorbate auf OTS mit Neutronenreflektivitäten untersucht. Sie konnten oberhalb der zuvor beschriebenen dichten und denaturierten Schicht ($d = 10 \pm 2 \text{ \AA}$) mittels Kontraständerung eine zweite Lysozymschicht ($40 \pm 20 \text{ \AA}$) geringerer Dichte nachweisen. Diese zweite Schicht kann entweder aus Seitenketten der denaturierten ersten Schicht bestehen oder, da die Schichtdicke ungefähr den Ausmaßen nativen Lysozyms entspricht, als Adsorption intakter Proteine an der denaturierten Schicht interpretiert werden. Ebenfalls mit Neutronenreflektivitäten wurde von Koo *et al.* [Koo13] eine ähnliche Gesamtschichtdicke ($d = 56,3 \text{ \AA}$) für die Adsorption von Lysozym auf hydrophobem Polystyrol bestimmt. In der Studie wird nicht von zwei getrennten Lysozymschichten berichtet. Die an der hydrophoben fest-flüssig-Grenzfläche adsorbierten Schichten werden in allen Studien als statisch beschrieben. Die Adsorption der Proteine ist nach wenigen Minuten im Gleichgewicht und ändert sich im Zeitraum der Messung nicht mehr. Einzig Richter *et al.* haben an einer Probe die zeitliche bedingte Zunahme der Schichtdicke um 7 \AA innerhalb von 258 Minuten [Ric13].

Quelle	System	d [Å]	Γ [mg/m ²]
Lu <i>et al.</i> [Lu98]	Lysozym; PP	$(10 \pm 2) + (40 \pm 20)$	$1,65 \pm 0,2$
Häh1 <i>et al.</i> [Häh12]	Lysozym; PP	≈ 18	$\approx 1,25$
Häh1 <i>et al.</i> [Häh12]	α -Amylase; PP	≈ 20	$\approx 0,9$
Häh1 <i>et al.</i> [Häh12]	BSA; PP	≈ 20	$\approx 1,1$
Richter <i>et al.</i> [Ric13]	Lysozym; PBS; nach 5 min	$20 \pm 0,4$	-
Richter <i>et al.</i> [Ric13]	Lysozym; PBS; nach 258 min	$27,4 \pm 0,4$	1,36
Richter <i>et al.</i> [Ric13]	BSA PBS;	$21,3 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,05$

Tabelle 6.1: Werte für Schichtdicke und adsorbierte Menge verschiedener Proteine auf OTS. Die Werte von Lu *et al.* wurden mit Neutronenreflektivitätsmessungen bestimmt, alle anderen Werte mit XRR. Werte mit \approx wurden aus Abbildungen abgelesen. PP=Phosphatpuffer; PBS=phosphatgepufferte Salzlösung.

¹Für Lysozym zum Beispiel $45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$.

6.1 Sojasauce und säurehydrolysierte Sojaproteine

Kleine, mit Flüssigkeit gefüllte Fettkapseln sind ein System mit großem Potential in der Lebensmittelindustrie. Eine Mikroskopieaufnahme einer solchen Kapsel ist in Abbildung 6.2 zu sehen. Diese Kapseln sollen in Zukunft dafür genutzt werden, Aromastoffe oder Gewürze zu verkapseln und so über einen langen Zeitraum zu konservieren. Sie können dann zum Beispiel in Mikrowellengerichten eingesetzt werden und zum Zeitpunkt des Erhitzens den Inhaltsstoff freigeben, ohne dass er Alterungs- oder Oxidationseffekte zeigt. Um die Kapseln wie gewollt einsetzen zu können, ist es essentiell, dass der verkapselte Stoff für lange Zeit luftdicht umschlossen wird.

Dies konnte für wassergefüllte Kapseln bisher nicht erreicht werden. Das verkapselte Wasser verflüchtigt sich innerhalb mehrerer

Stunden. Hierfür kann es mehrere Ursachen geben. Im Fall vollständig geschlossener Kapseln kann der Flüssigkeitsverlust mit der Diffusion des Wassers durch das Fett begründet werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Wände der Kapseln nicht vollständig intakt sind und Wasser durch Kanäle im Fett verdunstet. Bei Versuchen am Lehrstuhl für Verfahrenstechnische Transportprozesse der Ruhr Universität Bochum wurde festgestellt, dass die Kapseln dann über einen Zeitraum von Wochen stabil sind, wenn sich Sojasauce in der Lösung befindet.

Eine mögliche Ursache für die höhere Stabilität ist die Adsorption von in Sojasauce enthaltenen Stoffen an der Fett-Wasser- oder Wasser-Luft-Grenzfläche. In Sojasauce sind unter anderem viele Fragmente von Pflanzenproteinen enthalten, welche die Eigenschaften fester Oberflächen stark verändern können [Gol12]. Goli *et al.* konnten zeigen, dass die Adsorption von denaturierten Proteinen auf OTS den Kontaktwinkel zu Wasser deutlich senkt. Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Proteine wie Lysozym oder Soja-Globulinproteine thermisch denaturiert und die hydrophoben Proben in die erhitzte Proteinlösung gegeben [Gol12].

Weitere Untersuchungen an den Sojaproteinen 7S und 11S beschäftigen sich vor allem mit dem Einfluss verschiedener Hydrolysegrade auf die rheologischen Eigenschaften an der Wasser-Luft-Grenzfläche [Nir94; Con05a; Mar09]. Hierbei wurde beobachtet, dass die Oberflächenaktivität der Proteine durch Hydrolyse erhöht und durch höhere Hydrolysegrade wieder verringert wird [Mar09]. Bisher sind keine Informationen über Schichtdicken oder adsorbierte Mengen an der Wasser-Luft-Grenzfläche verfügbar.

Ziel der hier vorgestellten Studie ist ein besseres Verständnis der höheren Stabilität der mit Sojasauce gefüllten Kapseln. Hierzu wurden mit einem Spin Coater Schichten aus Fetten und Wachsen, die zur Kapselherstellung verwendet werden, präpariert. Die Oberflächen wurden mit dem AFM und XRR-Messungen untersucht, sind allerdings zu inhomogen für Reflektivitätsmessungen zur Proteinadsorption. Alle Oberflächen zeigten Risse und Inselbildung der Fette. Einzig aus Bienenwachs konnten Schichten präpariert werden, die den Anforderungen

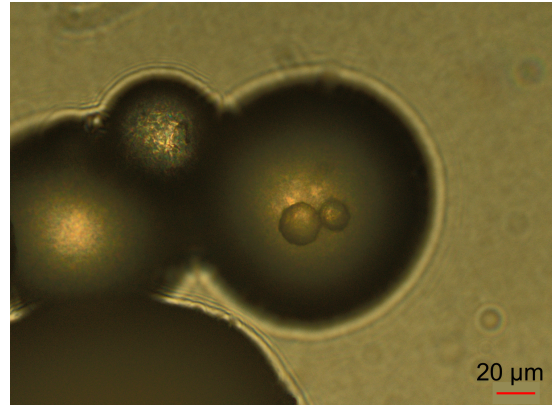


Abbildung 6.2: Mikroskopieaufnahme einer Fettkapsel, weitere Details im Text. Das Bild wurde zur Verfügung gestellt von Rebecca Scholz, Lehrstuhl für Verfahrenstechnische Transportprozesse, Ruhr Universität Bochum [Sch17].

genügen. Der Kontaktwinkel zu Wasser betrug 104° . Das Bienenwachs löst sich während der XRR-Messung in Wasser vom Siliziumwafer und ist schon über den Zeitraum zweier aufeinander folgender Messungen nicht stabil. Daher können die Fette und Wachse nicht als Probenoberfläche verwendet werden. Als Substrat wurde stattdessen die ähnlich hydrophobe OTS-Oberfläche als zeitlich stabile Modelloberfläche genutzt (Kontaktwinkel 107°).

Im Folgenden werden die Eigenschaften der Sojasauce und der säurehydrolysierten Proteine diskutiert und anschließend die Resultate an der fest-flüssig-Grenzfläche präsentiert. Zudem werden die an der Wasser-Luft-Grenzfläche erzielten Ergebnisse vorgestellt. Zum Abschluss werden die *ex situ* Eigenschaften der Schichten durch AFM-, XRR- und Kontaktwinkelmessungen untersucht und alle Resultate im Bezug zur Anfangs beschriebenen Fragestellung analysiert.

Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Victoria Jakobi aus der Gruppe Biointerfaces vom Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr Universität Bochum durchgeführt.² Ein Teil der *ex situ* Resultate ist bereits in Quelle [Jak17] veröffentlicht. Die Messungen an der Wasser-Luft-Grenzfläche wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von L. Heuchel [Heu15] durchgeführt.

6.1.1 Eigenschaften der Sojasauce und der säurehydrolysierten Proteine

Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurde „natürlich gebraute Sojasauce“ von Kikkoman genutzt. Laut Hersteller [Kik16a] wird die Sauce nach traditionellen Verfahren aus Wasser, Soja, Weizen und Speisesalz gebraut. Zur Produktion werden Sojabohnen eingeweicht und dann geröstet, der Weizen wird ebenfalls geröstet und gemahlen. Anschließend werden beide Produkte mit Hilfe eines Pilzes fermentiert, mit Salzwasser gemischt und weiter durch verschiedene Prozesse fermentiert [Kik16b]. Zum Schluss wird die Flüssigkeit gefiltert, um die Sojasauce zu erhalten. Durch das Rösten und die verschiedenen Fermentationsschritte sind die in Soja und Weizen enthaltenen Proteine in der Sojasauce nur noch in denaturierter Form enthalten. Nach Herstellerangabe sind in 100 ml Sojasauce 16,9 g Salz, 10 g Eiweiß (Proteine) und 3,2 g Kohlenhydrate.

Aminosäure	total [mg/g]	frei [mg/g]	Aminosäure	total [mg/g]	frei [mg/g]
Alanin(h)	61	47	Leucin(h)	65	36
Arginin	61	64	Lysin	48	36
Asparaginsäure	-	68	Methionin(h)	11	-
Asparagin*	82	-	Phenylalanin(h)	41	22
Cystein	4	-	Prolin(h)	53	41
Glutaminsäure	-	90	Serin	14	7
Glutamin*	151	-	Threonin	17	10
Glycin	34	26	Tyrosin	27	5
Histidin	16	5	Valin(h)	38	18
Isoleucin(h)	37	15			

Tabelle 6.2: Aminosäuren in säurehydrolysiertem Sojaprotein, nach Herstellerangaben. * oder entsprechende -säure; (h) hydrophobe Aminosäuren (vgl. Abbildug 2.8).

Eine alternative Methode, um Proteine auf ähnliche Art zu denaturieren und in ihre einzelnen Bestandteile zu zerlegen, ist die Säurehydrolyse [Fou98]. Sie wird auch bei der Produktion vieler Sojasaucen verwendet, da hierdurch der zeitliche Aufwand zur Herstellung

²Die Kooperation fand im Rahmen des Exzellenzclusters RESOLV (Ruhr Explores SOLVvation) statt.

reduziert werden kann. Bei der Säurehydrolyse werden durch Zugabe von Säuren die Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren aufgebrochen und das Protein dadurch zerstört. Solche säurehydrolysierten Sojaproteine sind in reiner Form erhältlich. Sie bestehen nur aus Proteinfragmenten sowie den einzelnen Aminosäuren, nicht aber aus zusätzlichen Stoffen wie Salzen.

Die säurehydrolysierten Sojaproteine wurden von Sigma Aldrich bezogen, in Tabelle 6.2 ist die vom Hersteller angegebene Aminosäurezusammensetzung gezeigt. Nahezu alle Aminosäuren kommen in freier und gebundener Form vor. Die Zahl an freien Aminosäuren (64,5%) deutet auf einen im Vergleich zur zuvor beschriebenen Literatur (2% bis 46,3% [Con05a; Mar09]) hohen Hydrolysegrad hin.

6.1.2 Ergebnisse

Die in diesem Kapitel vorgestellten Messungen wurden an der Beamline BL9 am Speicherring DELTA durchgeführt. Da an dieser Beamline nur Messungen bis zu $q_z = 0,5 \text{ \AA}^{-1}$ möglich waren, wird für alle Elektronendichteprofile für den Übergang zwischen Silizium und Siliziumdioxid das Modell nach Tidswell [Tid90] genutzt (weitere Erläuterungen in Kapitel 4.4).

Die Messungen wurden vor Fertigstellung der in Kapitel 3.1 beschriebenen Probenzelle durchgeführt, es wurde die in [Kie14a] beschriebene Zelle ähnlicher Bauart genutzt. Alle Messungen wurden mit einem 0,01 M Phosphatpuffer durchgeführt. Die Temperatur der Probenzelle betrug 25°C . Für jede Messung wurde ein neuer, mit OTS beschichteter Siliziumwafer verwendet.

Die Grenzfläche zwischen wässrigen Lösungen mit Sojasauce und hydrophoben Oberflächen wurde mit der in Abbildung 6.3 gezeigten Messreihe untersucht. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen Sojasauce in Puffer gegeben. Weitere Elektronendichteprofile sind im Anhang in Abbildung A.1 dargestellt. Aus den Herstellerangaben (10 g Eiweiß/100 ml) kann die Sojasaucenkonzentration in die Proteinkonzentration in der Lösung umgerechnet werden (9% = 9 mg/ml; 20% = 20 mg/ml; 33% = 33 mg/ml).

Oberhalb des mit OTS beschichteten Substrates sind adsorbierte Schichten aus den Inhaltsstoffen der Sojasauce zu erkennen. Das Dichtedefizit am Ende der OTS-Schwanzgruppe bleibt erhalten. Die Dicke der Schichten liegt zwischen 16 \AA und 25 \AA und ist nicht von der in Prozent angegebenen Konzentration der Sojasauce im Puffer abhängig. Die maximale Elektronendichte ist bei allen Konzentrationen ähnlich und beträgt zwischen $0,377 e^-/\text{\AA}^3$ und $0,393 e^-/\text{\AA}^3$.

Da die Sojasauce aus Proteinfragmenten, Salzen und eventuellen Verunreinigungen besteht, unterliegen die Adsorbatschichten komplexen Wechselwirkungen und es sind keine systematischen Zusammenhänge zwischen der Konzentration und den Adsorbatschichten zu erkennen. Um das System zu vereinfachen, werden im folgenden Untersuchungen an den in der Sauce enthaltenen Proteinfragmenten durchgeführt.

In Abbildung 6.4 sind die Elektronendichteprofile von wässriger Lösung mit säurehydrolysiertem Sojaprotein in Kontakt mit OTS dargestellt.

Die adsorbierten Schichten aus säurehydrolysiertem Sojaprotein sind abhängig von der Proteinkonzentration in der Lösung. Bei der geringsten Konzentration (0,1 mg/ml, rot) bildet sich ein Doppelschichtsystem aus. Es besteht aus einer 5 \AA dicken Schicht an der OTS-Schwanzgruppe mit einer Elektronendichte von $\rho = 0,394 e^-/\text{\AA}^3$ und einer 12 \AA dicken Schicht mit $\rho = 0,363 e^-/\text{\AA}^3$ am Übergang zum Wasser. Wird die Konzentration auf 1 mg/ml erhöht (orange), ist kein Doppelschichtsystem mehr vorhanden. Die Schichtdicke

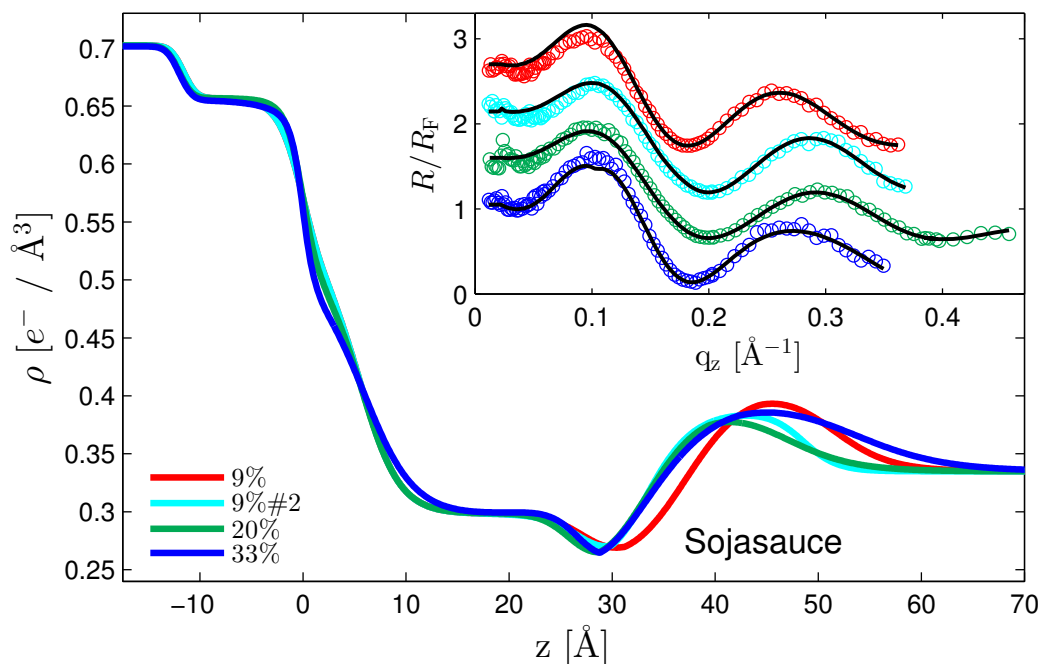


Abbildung 6.3: Elektronendichteprofile für verschiedenen Sojasaucenkonzentrationen in Phosphatpuffer. Der Einschub zeigt die Messungen und die aus den Elektronendichteprofilen berechneten Anpassungen. Sie wurden entlang der y -Achse verschoben.

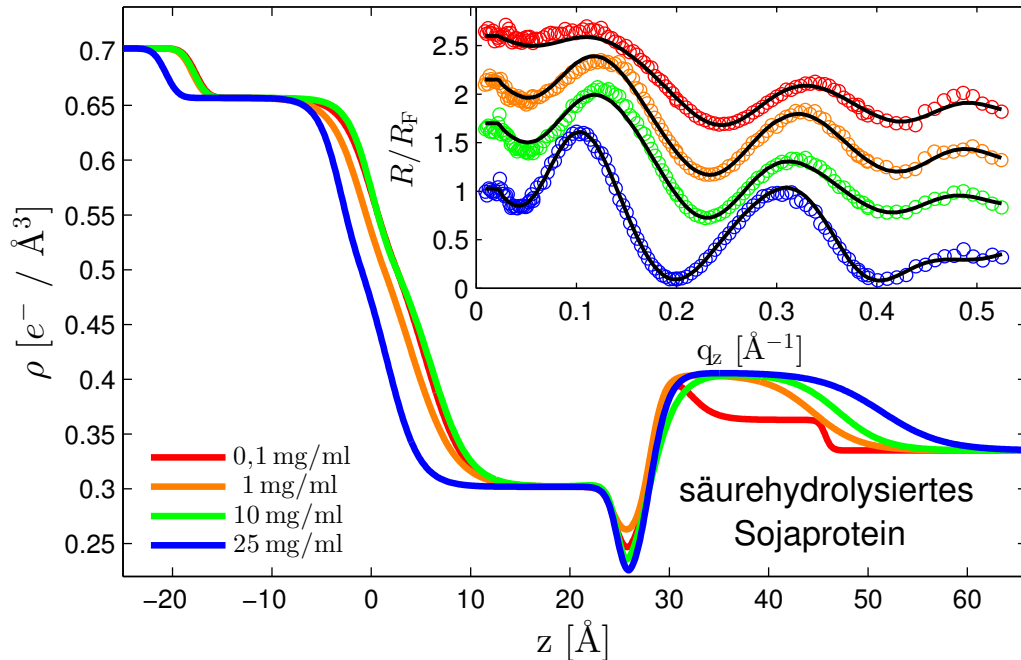


Abbildung 6.4: Elektronendichteprofile für verschiedenen Konzentrationen säurehydrolysierten Sojaproteins in Puffer. Der Einschub zeigt die Messungen und die angepassten Intensitätsverläufe. Sie wurden entlang der y -Achse verschoben.

der gesamten Schicht bleibt mit 20 \AA fast konstant, während die Elektronendichte über den ganzen Bereich auf $\rho = 0,405 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ ansteigt. Die weiteren Erhöhungen der Konzentration auf 10 mg/ml und 25 mg/ml führen zu einer Erhöhung der Schichtdicke auf 22 \AA und 28 \AA bei konstanter Elektronendichte. Die Schwanzgruppe im Elektronendichteprofil der Probe mit der höchsten Konzentration ist länger als bei den anderen Proben, der Grund ist unbekannt. Alle Schichten aus säurehydrolysiertem Protein sind dicker und dichter als die Schichten aus den Inhaltsstoffen der Sojasaucen in Abbildung 6.3. Im Bereich des Dichtedefizits sind die Rauigkeiten geringer und die Elektronendichte ist niedriger als in den Messungen mit Sojasaucen in der Lösung.

Da die säurehydrolysierten Proteine an der hydrophoben OTS-Oberfläche ausgeprägte und homogene Schichten bilden, wurde für die weiteren Untersuchungen die Wasser-Luft-Grenzfläche gewählt. Diese Grenzfläche ist sehr hydrophob, da die Luft an der Grenzfläche vollständig unpolar ist. Weitere Informationen zu Messungen an der Wasser-Luft-Grenzfläche finden sich zum Beispiel in [Mur15]. Die Messungen wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von L. Heuchel [Heu15] am Röntgendiffraktometer D8 des Lehrstuhls Experimentelle Physik 1a durchgeführt und im Rahmen dieser Arbeit betreut. In Abbildung 6.5 sind die Messdaten und die Elektronendichteprofile dargestellt.

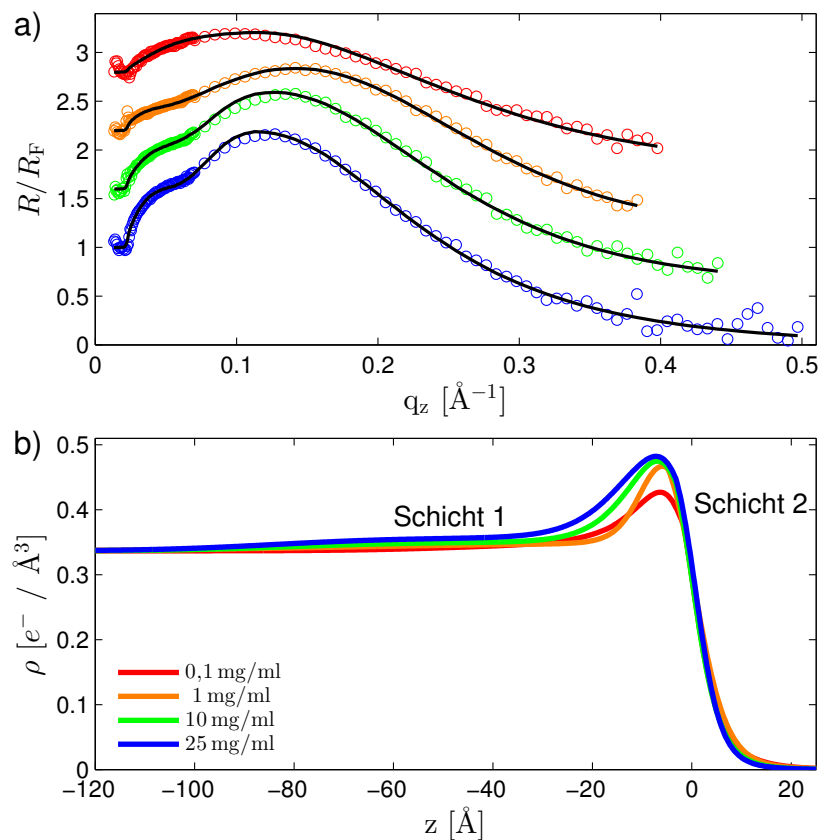


Abbildung 6.5: a) zeigt die Messung zur Adsorption säurehydrolysierten Sojaproteins an der Wasser-Luft-Grenzfläche und die aus den in b) dargestellten Elektronendichteprofilen berechneten angepassten Intensitätsverläufe. Die die in a) angegebenen Kurven wurden auf der y-Achse verschoben. Die Messungen wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von L. Heuchel an der Flüssigkeits-Gas-Grenzfläche durchgeführt [Heu15].

Die Adsorbate unterscheiden sich deutlich von den Schichten an der OTS-Wasser-Grenzfläche.

Sie bestehen aus zwei Bereichen, einer sehr dicken, rauhen Schicht im Wasser (Schicht 1 in Abbildung 6.5b)) und einer dünnen Schicht an der Wasseroberfläche (Schicht 2). Die Elektronendichte der zweiten Schicht nimmt mit steigender Konzentration des säurehydrolysierten Proteins im Wasser von $0,427e^-/\text{\AA}^3$ (0,1 mg/ml) auf $0,482e^-/\text{\AA}^3$ (25 mg/ml) zu, während sich die Schichtdicke von $16,7\text{\AA}$ (0,1 mg/ml) auf 27\AA (25 mg/ml) erhöht. Die erste Schicht ist bei der niedrigsten Konzentration (0,1 mg/ml) kaum vorhanden, bei steigender Konzentration erhöht sich aber sowohl die Elektronendichte als auch die Schichtdicke. Die Dicke der Gesamtschicht ist größer (bis zu 100\AA) als die Adsorbatschichten der säurehydrolysierten Proteine an der fest-flüssig-Grenzfläche. Ebenso ist die Elektronendichte der zweiten Schicht größer als die an der fest-flüssig-Grenzfläche. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Stärke der Absorption mit der Hydrophobizität der Grenzfläche zusammenhängt.

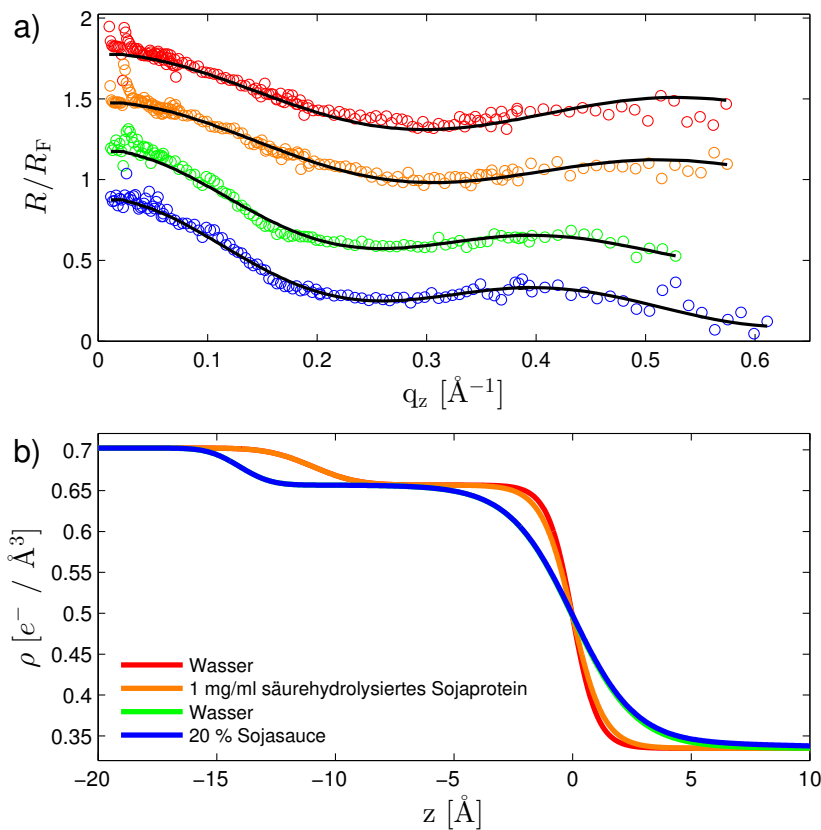


Abbildung 6.6: a) Messungen an der Siliziumdioxid-Wasser-Grenzfläche und angepasste Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y -Achse verschoben. b) Elektronendichteprofile der Siliziumdioxid-Wasser-Grenzfläche. Jede Oberfläche wurde jeweils mit und ohne Sojasauce/säurehydrolysiertem Sojaprotein in der Lösung untersucht.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden ergänzende Messungen an der hydrophilen Siliziumdioxid-Wasser-Grenzfläche durchgeführt. In Abbildung 6.6 sind die Elektronendichteprofile wässriger Lösungen in Kontakt mit Siliziumdioxid gezeigt, jeweils mit und ohne Sojasauce/säurehydrolysiertem Sojaprotein. In beiden Fällen ist keine Adsorption an der Grenzfläche zu erkennen. Die Siliziumwafer sind nicht gleichzeitig präpariert worden, damit kann der Unterschied in der Rauigkeit der Siliziumdioxidschicht erklärt werden.

Bei der Untersuchung der Adsorbatschichten wurde festgestellt, dass die dünnen Schichten die Oberflächeneigenschaften der mit OTS beschichteten Siliziumwafer stark verändern, dies

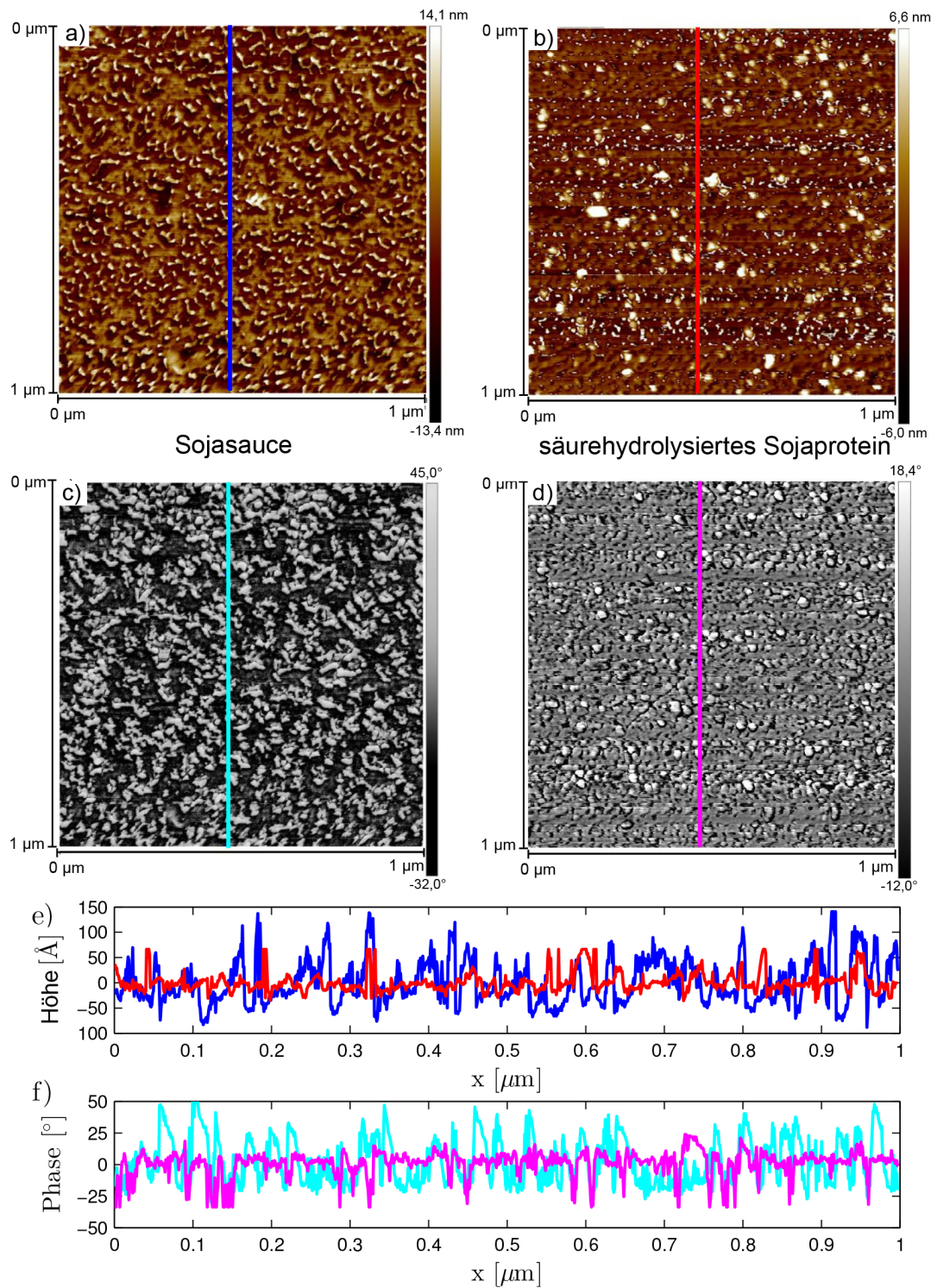


Abbildung 6.7: In Abbildungsteil a) und b) sind Höhenmessungen zu sehen, in c) und d) Messungen der Tapping-Phase. Die linken Abbildungen zeigen OTS-Wafer nach einem Bad in Sojasauce, die rechten nach einem Bad aus 10 mg/ml säurehydrolysiertem Sojaprotein in Puffer. In Abbildung e) und f) sind die Linienprofile zu sehen, sie entsprechen jeweils den Linien in den AFM-Messungen.

wurde auch in der Studie von Jakobi *et al.* für diese und die ebenfalls hydrophobe mit 1-Dodecanthiol beschichtete Gold-Oberfläche gezeigt [Jak17]. Zur *ex situ* Untersuchung der Oberflächeneigenschaften wurden die OTS-Wafer nach der in [Jak17] beschriebenen Methode präpariert. Dazu wurden sie in ein Bad aus Sojasauce (entspricht 100 mg/ml hydrolysiertes Proteine) oder einer Lösung aus 10 mg/ml säurehydrolysiertem Sojaprotein in Puffer gegeben. Nach 20 Minuten wurden die Lösung über den Proben durch Spülen mit milliQ-Wasser ersetzt. Anschließend wurden die Proben aus dem Wasser entnommen. Das Ersetzen der Lösung ist notwendig, damit sich auf den Oberflächen der Proben beim Durchtritt durch die Wasseroberfläche keine Schichten aus an der Wasser-Luft-Grenzfläche adsorbierten Proteinen ausbilden.

In Abbildung 6.7a) und 6.7b) sind AFM-Höhenmessungen der beiden so präparierten Oberflächen gezeigt. Anhand dieser und den in Abbildung 6.7e) angegebenen Höhenprofilen ist ersichtlich, dass die Schicht aus Inhaltsstoffen der Sojasauce im trockenen Zustand sehr inhomogen sind. Die AFM-Messungen wurden im Tappingmodus durchgeführt, hier wurde auch die Oberflächeneigenschaften-spezifische Tapping Phase aufgezeichnet. Dieses Messsignal ist sensitiv auf die chemischen Eigenschaften der Oberfläche [Voi15] und ermöglicht es, verschiedene Elemente an der Grenzfläche zu unterscheiden [Mag97; Voi10].

Die in 6.7c) dargestellte AFM-Messung der Tapping Phase zeigt, dass die Oberfläche der Probe mit Sojasauce aus zwei verschiedenen Materialien besteht, OTS und Ablagerungen der Sojasauce. Im Gegensatz dazu sind in den Messungen des Höhsignales (Abbildung 6.7b)) und der Tapping Phase (Abbildung 6.7d)) für säurehydrolysiertes Sojaprotein homogenere Schichten mit wenigen Rissen zu sehen.

In Abbildung 6.7e) und 6.7f) sind Linienprofile der Höhenmessungen und der Messung der Tapping Phase dargestellt. Der Vergleich der Linienprofile zeigt ebenfalls, dass die Oberfläche nach dem Bad in säurehydrolysiertem Sojaprotein homogener ist als nach dem Bad in Sojasauce.

Die getrockneten Schichten wurden auch mittels XRR untersucht, die Elektronendichteprofile sind in Abbildung 6.8 zu sehen. Angegeben ist das Elektronendichteprofil der sauberen OTS-Probe (rot). Die auf diese Probe aufgebrachte Schicht aus Inhaltsstoffen der Sojasauce ist, wie in der AFM-Messungen, inhomogen und weist keine konstante Elektronendichte auf. Die Schichtdicke beträgt vom Minimum bis zum Wendepunkt $d \approx 25 \text{ \AA}$. Die Messung an säurehydrolysiertem Sojaprotein (blau) zeigt eine dickere Schicht homogener Elektronendichte. Die Schicht ist mit $d \approx 35 \text{ \AA}$ vom Minimum bis zum Wendepunkt dicker als die *in situ* gemessenen Schichten. Das Minimum in der Elektronendichte zwischen OTS und Proteinschicht bleibt auch hier bestehen. Es wird durch die Methylgruppen und weniger dichte hydrophobe Proteinbereiche verursacht.

Das Ergebnis der AFM- und XRR-Messungen spiegelt sich im Kontaktwinkel der Proben zu Wasser wieder. So sinkt der Kontaktwinkel der Schichten aus Inhaltsstoffen der Sojasauce zu Wasser von $107 \pm 0,7^\circ$ auf $86,9 \pm 3,3^\circ$, der Kontaktwinkel zwischen den Schichten aus säurehydrolysiertem Sojaprotein und Wasser verringert sich auf $54,6 \pm 10,8^\circ$. Der große Fehler des Kontaktwinkels zwischen Wasser und säurehydrolysiertem Sojaprotein entsteht dadurch, dass die Oberfläche sehr stark benetzt wird und sich kein homogener, runder Tropfen mehr ausbildet. Die Tropfengröße und der Kontaktwinkel hängen hierdurch sehr viel stärker von der Wassermenge ab als bei den größeren Kontaktwinkeln. Es war nicht möglich, den Fehler durch wiederholte Messungen zu verringern. Aus der Literatur bekannte Messungen zu denaturierten Proteinen ergeben ähnliche Kontaktwinkel von ungefähr 60° [Gol12].

Durch weitere Messungen mit Diiodmethan und Bromonaphthalene können aus den Kontaktwinkeln die polaren $\gamma_{\text{O}}^{\text{p}}$ und nicht polaren $\gamma_{\text{O}}^{\text{n}}$ Anteile nach der OWRK-Methode bestimmt

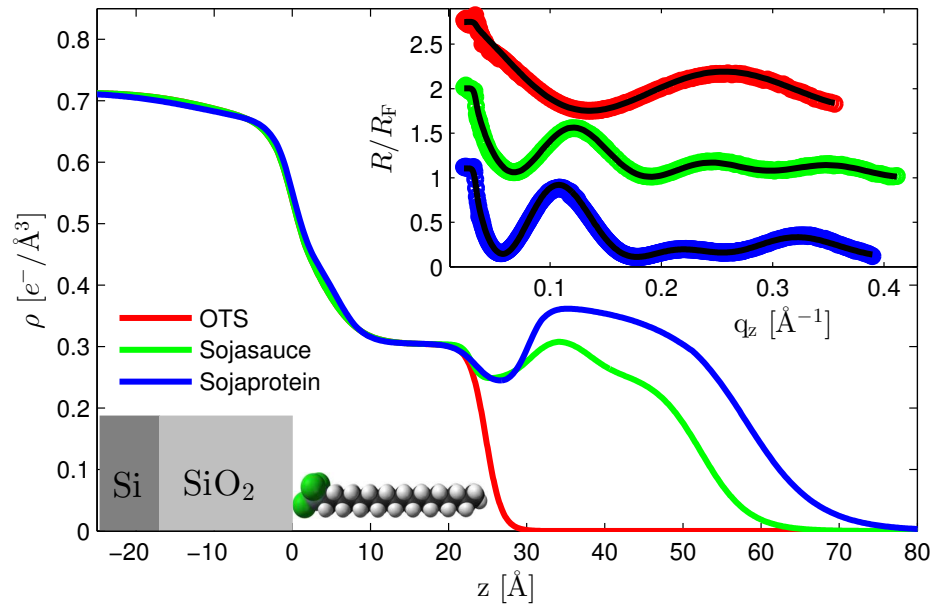


Abbildung 6.8: Elektronendichteprofile verschiedener OTS-Proben. Der Einschub zeigt die Messdaten und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y -Achse verschoben. Die Ergebnisse für die saubere OTS-Oberfläche und die Adsorbatschicht aus Inhaltsstoffen der Sojasauce wurden bereits in [Jak17] gezeigt und werden mit Genehmigung des Elsevier Verlags nachgedruckt.

	θ zu Wasser [°]	γ [mN/m]	γ_0^p [mN/m]	γ_0^n [mN/m]
OTS	$107,0 \pm 0,7$	$23,94 \pm 0,87$	$0,07 \pm 0,04$	$23,86 \pm 0,87$
Sojasauce	$86,9 \pm 3,3$	$35,64 \pm 4,32$	$0,98 \pm 0,61$	$34,66 \pm 4,27$
säurehydrolysiertes Sojaprotein	$54,6 \pm 10,8$	$41,91 \pm 6,71$	$7,39 \pm 1,72$	$34,53 \pm 5,93$

Tabelle 6.3: Werte für den Kontaktwinkel θ , die Oberflächenenergie γ und die polare γ_0^p und γ_0^n nicht polaren Anteile, die Messwerte und die Ausgleichsgerade sind in Abbildung 6.9 angegeben.

werden [Owe69; Kae70], diese sind für alle drei Oberflächen in Tabelle 6.3 angegeben, in Abbildung 6.9 sind die entsprechenden Ausgleichsgeraden und die Messwerte angegeben. Die für OTS gezeigten Messwerte wurden zudem für die Charakterisierung des OTS in Kapitel 4.2 genutzt.

Das Quadrat der Steigung der in der Abbildung 6.9 angegebenen Geraden entspricht dem polaren Anteil γ_0^p der Oberflächenenergie, das Quadrat des y -Achsenabschnitts dem nicht polaren Anteil γ_0^n der Oberflächenenergie. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Oberflächen sind deutlich und zeigen, wie stark das säurehydrolysierte Sojaprotein die Oberflächeneigenschaften ändert. Der größere Kontaktwinkel und geringere polare Anteil γ_0^p der Schichten aus Inhaltsstoffen der Sojasauce kann mit der in den AFM-Messungen zu sehenden Inselbildung begründet werden. Dadurch ist das Wasser auch mit dem OTS in Kontakt. Der Kontaktwinkel zu Wasser ist daher größer während der polare Anteil der Oberflächenenergie γ_0^p kleiner wird.

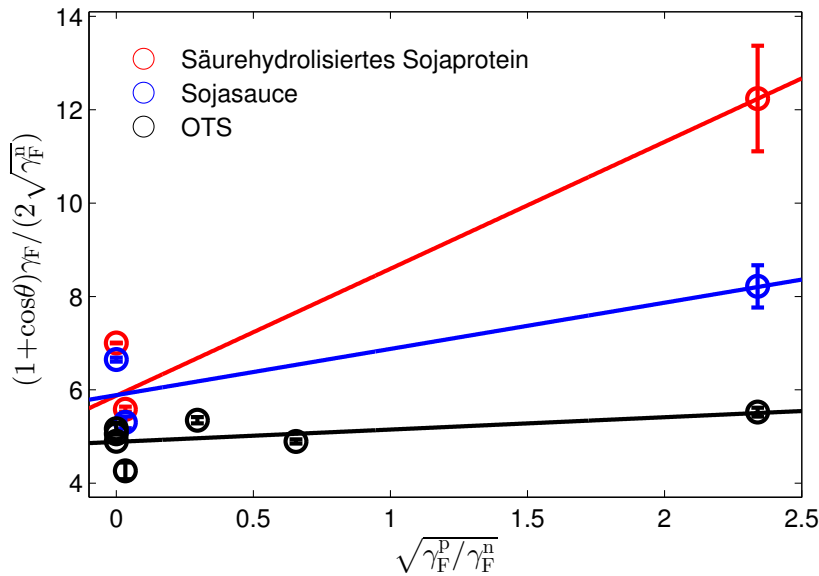


Abbildung 6.9: Messwerte und Ausgleichsgerade zur Bestimmung der Oberflächenenergie $\gamma = \gamma_0^n + \gamma_0^p$.

6.1.3 Analyse der Resultate und Diskussion

Zur genaueren Analyse der Abhängigkeit der Adsorbatschichten von den Eigenschaften der Grenzfläche wurde die integrierte Elektronendichte

$$\Gamma_{\text{int}} = \int \rho_{X-\infty}(z) - \rho_{\text{H}_2\text{O}}^0 dz \quad (6.5)$$

berechnet. Die adsorbierte Menge Γ kann nicht ermittelt werden, da einige Parameter ($\rho_{\text{Protein}}^0, m, V$) der Proteine bzw. Sojasauce nicht bekannt sind. Die integrierte Elektronendichte Γ_{int} ist aber proportional zu Γ . In Abbildung 6.10 sind Γ_{int} und die Schichtdicke d in Abhängigkeit der Konzentrationen von Sojasauce und säurehydrolysiertem Sojaprotein in der Lösung aufgetragen. Aus der Sojasaucenkonzentration wurde zum Vergleich der Ergebnisse der Proteingehalt in der Lösung ermittelt.

Für Sojasauce in der Lösung variieren die beiden Größen unabhängig von der Sojasaucenmenge. d und Γ_{int} sind bei allen Konzentrationen niedriger als für die reinen säurehydrolysierten Sojaproteine an der OTS-Wasser-Grenzflächen. Das kann daran liegen, dass in der Lösung weitere Inhaltsstoffe der Sojasauce vorhanden sind. Beispielsweise kann die große Menge Salz in der Sojasauce (169 mg/ml) die elektrostatische Wechselwirkung an der Grenzfläche abschwächen und dadurch die Proteinabsorption reduzieren [Göh15].

Dagegen steigen sowohl d als auch Γ_{int} bei höherer Konzentration der reinen säurehydrolysierten Sojaproteins an. Die integrierte Elektronendichte an der Wasser-Luft-Grenzfläche ist allerdings ungefähr drei Mal so groß wie an der OTS-Wasser-Grenzfläche, auch die Schichtdicke ist deutlich größer. Der Grund hierfür liegt in der stärkeren hydrophoben Wechselwirkung an der Wasser-Luft-Grenzfläche. Zwischen der Konzentration säurehydrolysierten Sojaproteins (1 mg/ml, 10 mg/ml und 25 mg/ml) und den Größen Γ_{int} und d besteht ein linearer Zusammenhang. Dieser ist in Abbildung 6.10 durch die angepassten Geraden angedeutet. Bei 0,1 mg/ml bildet sich, wie in den Elektronendichteprofilen zu erkennen, an den Grenzflächen noch keine homogene und dichte Schicht. Γ_{int} und d entsprechen bei daher für

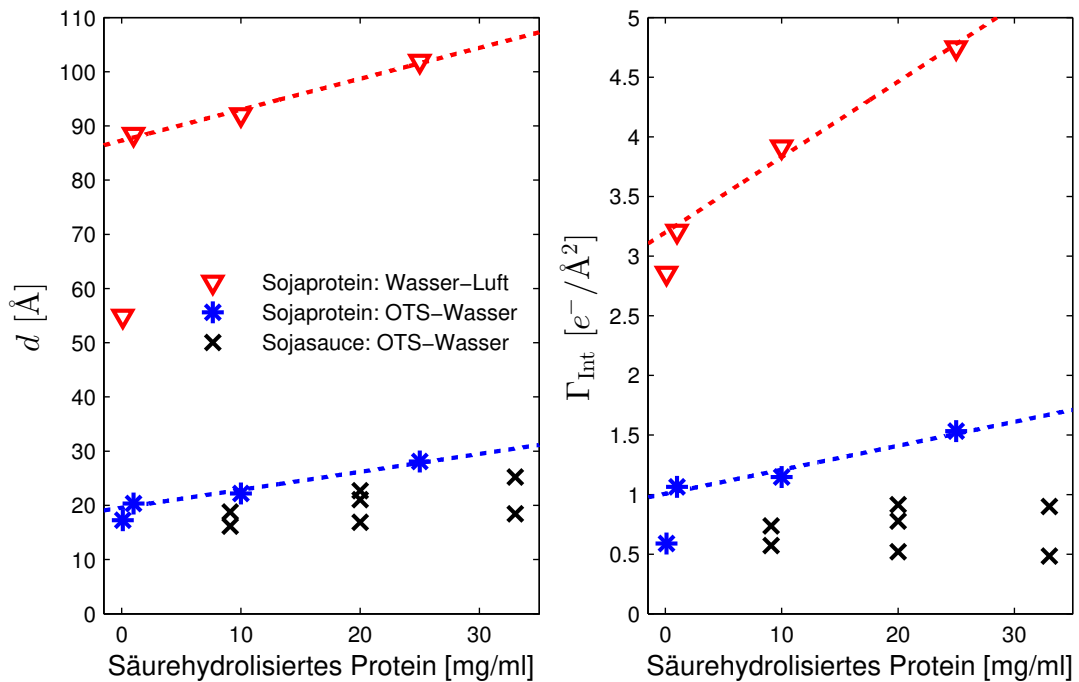


Abbildung 6.10: Vergleich der adsorbierten Menge Γ_{Int} und der Schichtdicke d für Sojasauce und säurehydrolysiertes Protein an verschiedenen Grenzflächen. Die Proteinkonzentration in der Sojasauce wurde aus den Herstellerangaben berechnet [Kik16a].

0,1 mg/ml nicht dem linearen Verlauf. Eine ebenfalls lineare Abhängigkeit der Schichtdicke von der Konzentration wurde *ex-situ* für thermisch denaturierte Sojaproteine mittels Ellipsometrie festgestellt [Gol12]. Die Schichtdicken auf OTS steigen dabei von $d \approx 14 \text{ \AA}$ bei 0,01 mg/ml auf $d \approx 35 \text{ \AA}$ bei 1 mg/ml.³ Die Schichtdicke bei 1 mg/ml entspricht damit der in dieser Arbeit *ex situ* gemessenen Schichtdicke von $d \approx 35 \text{ \AA}$ bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml (vgl. Abbildung 6.8).

Im Gegensatz zur Literatur [Con05b; Mar09] konnte auch bei einem hohen Hydrolysegrad eine hohe Oberflächenaktivität und Schichtdicke an der Wasser-Luft-Grenzfläche gemessen werden. Die beobachteten Schichten sind dicker als die Schichten nativer Proteine wie RNase an derselben Grenzfläche [Hüs10]. In einer Studie zur Adsorption von Lysozym an der Wasser-Luft-Grenzfläche wurden Schichten ähnlicher Dicke und Form beobachtet. Sie wurden mit Mehrfachschichten aus denaturierten Lysozymmolekülen assoziiert [Yan09].

Auf Grund der Resultate zur Adsorption der Proteine sind unterschiedliche Hypothesen zur Erklärung der höheren Dichtigkeit der Fettkapseln mit Sojasauce. Dabei muss beachtet werden, dass die genauen Eigenschaften der Kapselwände unbekannt sind. Wenn die Kapselwände Risse aufweisen, können die adsorbierten Proteinfragmente Risse in den Kapselwänden auffüllen und dadurch die Kapsel abdichten. Solche Risse wurden bei Messungen an dünnen Schichten der zur Kapselherstellung verwendeten Fette und Wachse mit dem AFM beobachtet. Risse, die größer als ein paar Nanometer sind, können von den Proteinfragmenten nicht mehr geschlossen werden, da die Fragmente hierfür zu klein sind. Bei größeren Rissen im Fett könnte die Adsorption an der Wasser-Luft-Grenzfläche die Verdunstung des Wassers durch die dichten und dicken Proteinschichten verringern.

³Die Schichtdicke wurden aus den in [Gol12] angegebenen Werten für die „fractional coverage“ berechnet.

Sind die Wände der Kapseln hingegen intakt, kann der Flüssigkeitsverlust nur durch Diffusion entstehen. Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass die Proteine die Oberfläche hydrophilisieren. Solche hydrophilen Oberflächen interagieren stärker mit der Wasserphase und erhöhen die Ordnung im grenzflächennahen Wasser (vgl. Kapitel 2.3.1). Die erste Wasserschicht ist an solchen Grenzflächen weniger mobil, dadurch wird die Diffusion durch das Fett verringert.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen somit, dass die in der Sauce enthaltenen Proteinfragmente die Dichtigkeit der Kapseln erhöhen, da diese *in situ* bei allen Konzentrationen Schichten an den hydrophoben Oberflächen bilden. Der zu Grunde liegende Prozess kann mit den vorgestellten Untersuchungen aber nicht bestimmt werden.

6.2 Lysozymadsorbate an der fest-flüssig-Grenzfläche unter Druck

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zum Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf die Adsorbatschichten aus Lysozym an der fest-flüssig-Grenzfläche vorgestellt.

Das Verhalten von Proteinen unter hohen hydrostatischen Drücken in Lösung ist ein aktuelles Forschungsgebiet. Solche Untersuchungen ermöglichen es zum Beispiel, das Phasenverhalten von dichten Proteinlösungen zu verstehen [Möl14]. Aus den Studien sind viele Eigenschaften des auch in dieser Arbeit verwendeten Lysozyms in Lösung bis zum Druck von 5000 bar bekannt. So bleibt die Sekundärstruktur bestehen [Sch11] und die Änderungen an der Proteinstruktur sind vollständig reversibel [Her98]. Durch die Volumenreduzierung werden bis 5000 bar hauptsächlich Packungsdefekte in der Proteinstruktur reduziert (vgl. Kapitel 2.4). Wie in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben, wurden Adsorbatschichten aus Lysozym an der OTS-Wasser-Grenzfläche bisher häufig bei Atmosphärendruck studiert. Der Einfluss hydrostatischen Drucks auf Adsorbatschichten aus Proteinen wurde in zwei Studien beschrieben. Koo *et al.* haben Lysozym bis 2000 bar auf Siliziumdioxid und Polystyrol analysiert [Koo13]. Die Dicke der Lysozymschicht nahm auf Siliziumdioxid von 40,1 Å bei 1 bar auf 51,2 Å bei 2000 bar zu, auf hydrophobem Polystyrol konnte ein Anstieg der Schichtdicke von 56,3 Å auf 63,7 Å festgestellt werden. Das Schichtwachstum wurde mit einer weiteren Denaturierung der Moleküle auf Grund der Änderungen der Gibbschen Energie (Gleichung (2.9), Seite 17) begründet. In der Studie, in der die auch in dieser Arbeit genutzte Hochdruckzelle vorgestellt wurde, wird der Einfluss des Denaturants Guanidiniumchlorid untersucht und eine druckinduzierte Änderung der adsorbierten Schicht gemessen [Wir14]. Durch Guanidiniumchlorid wurde die adsorbierte Menge schon bei 1 bar im Vergleich zur Literatur reduziert. Hohe hydrostatische Drücke sind zudem biologisch relevant. So beträgt der Druck am tiefsten Punkt des Meeres über 1000 bar. Tiefseefische, die in Umgebungen mit hohen hydrostatischen Drücken leben, zeigen erhöhte Konzentrationen von TMAO und Urea [Lin94; Yan05]. TMAO stabilisiert die Wasserstruktur und erhöht damit die Proteinstabilität. Urea hingegen wirkt denaturierend. Um die Proteine, zusätzlich zur in der Literatur beschriebenen denaturierenden Wirkung des hydrostatischen Drucks [Koo13], weiter zu destabilisieren, ist Urea als Kosolvent ausgewählt worden. Bisher sind keine Studien zum Einfluss von Urea auf Proteinadsorbatschichten an der fest-flüssig-Grenzfläche bekannt. An der Wasser-Luft-Grenzfläche wurde eine Reduktion der Adsorption nativer Proteine durch steigende Urea-Konzentrationen gemessen [Hüs10].

Im Folgenden werden zuerst die Adsorbatschichten an der Grenzfläche zwischen OTS und Lösungen mit Lysozym und Lysozym/Urea beschrieben. Daran schließt die Untersuchung möglicher Strahlenschäden an den Beamlines der ESRF an. Zum Abschluss werden aus den Elektronendichteprofilen die Schichtdicke d , die maximale Belegung Γ_{Max} und die adsorbierte Menge Γ berechnet und mit der Literatur verglichen. Anhand dieser Größen ist die Analyse der druckabhängigen Veränderung der Adsorbatschichten möglich.

Ein Teil der Datenaufnahme für die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse erfolgte im Rahmen der Dissertation von F. Wirkert [Wir15]. Die resultierenden Elektronendichteprofile sind gekennzeichnet.

Alle in diesem Kapitel vorgestellten Messungen wurden unter Verwendung von 20 mM BisTris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,1 und mit einer Proben temperatur von $T = 25^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 0,1 mg/ml. Der BisTris-Puffer und das Lysozym aus Hühnereiweiß (Nr: 10837059001 Roche) wurden von Sigma Aldrich bezogen, das Urea stammt von VWR (Langenfeld, Deutschland).

Um die Luftblasen in der Probenzelle zu komprimieren, wurden alle Messreihen bei einem Anfangsdruck von 50 bar begonnen. Der Wert ist nah am Atmosphärendruck von 1 bar und verändert die Adsorbatschichten und die Proteine im Wasser nicht. Die Werte der einzelnen Messreihen bei 50 bar werden im Folgenden daher mit den Literaturwerten bei 1 bar verglichen.

6.2.1 Lysozym und Lysozym-Urea-Mischungen auf OTS

Adsorbatschichten aus Lysozym auf OTS wurden an drei verschiedenen Beamlines untersucht, den beiden ESRF Beamlines ID15A und ID31 mit einer Photonenenergie von 70 keV und der Beamline BI9 am Speicherring DELTA mit einer Photonenenergie von 27 keV. Die Ergebnisse unterscheiden sich abhängig von der verwendeten Photonenenergie und werden daher separat diskutiert. Eine Analyse anhand der aus den Elektronendichteprofilen berechneten Parameter wie der absorbierten Menge Γ erfolgt in Kapitel 6.2.2 für alle Lysozymproben an der OTS-Wasser-Grenzfläche.

Messungen an reinen Lysozym-Lösungen in Kontakt mit OTS bei einer Photonenenergie von 27 keV

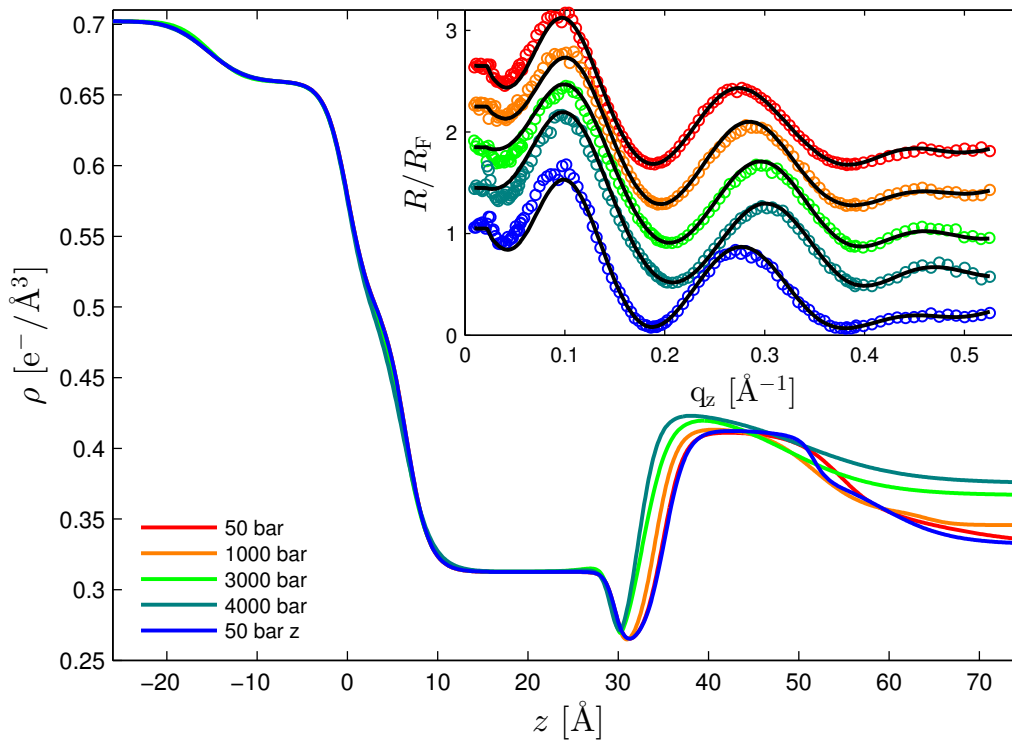


Abbildung 6.11: Elektronendichteprofile einer Lysozym-Lösung in Kontakt mit OTS, der Einschub zeigt die Messdaten und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y-Achse verschoben. Die bei der Absenkung des Drucks gemessenen Werte sind durch „z“ in der Legende gekennzeichnet. Die Messungen wurden an der Beamline BI9 des Speicherrings DELTA durchgeführt.

In Abbildung 6.11 sind die Ergebnisse der Messungen an der Beamline BI9 des Speicherrings DELTA dargestellt. Die auf dem OTS adsorbierte Lysozymschicht bei 50 bar (rot) besitzt eine

Schichtdicke von $d = 25,9 \text{ \AA}$. Dies ist 6 \AA dicker als aus der Literatur bekannt (siehe Tabelle 6.1, Seite 60). Die Belegung und die Form entsprechen den beschriebenen Schichten aus Untersuchungen mit XRR [Häh12; Ric13]. Die Messungen von Hähl *et al.* wurden ebenfalls an der Beamline B19 des Speicherrings DELTA durchgeführt, die Messungen von Richter *et al.* bei Photonenenergien von $22,8 \text{ keV}$ und 24 keV .

Wie auch bei den Messungen an Adsorbatschichten aus säurehydrolysiertem Sojaprotein bleibt das Dichtedefizit zwischen OTS-Schwanzgruppe und Adsorbatschicht erhalten. Durch die Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf bis zu 5000 bar verringert sich die Größe des Dichtedefizits. Die Dicke der Proteinschicht ändert sich unter Druck dagegen nicht. Die Elektronendichte der Schicht steigt an. Die anschließende Messung mit wieder abgesenktem Druck (blau) entspricht der ersten Messung bei 50 bar . Die Form und die Dicke der Proteinschicht variieren mit steigendem Druck kaum, beides wäre aber zu erwarten, wenn zusätzliche Proteine adsorbieren. Die Zunahme der Elektronendichte der Adsorbatschicht wird somit durch den Anstieg der Dichte des in der Proteinschicht enthaltenen Wassers verursacht. Die weitere Diskussion der Druckabhängigkeit der Adsorbatschichten erfolgt am Ende dieses Kapitels.

In der Literatur wurde für eine Erhöhung des Drucks von 1 bar auf 2000 bar ein Anstieg der Dicke der Proteinschicht auf hydrophobem Polystyrol um $7,4 \text{ \AA}$ beschrieben [Koo13]. Im Rahmen dieser Arbeit sind ähnliche Effekte auf OTS bis 5000 bar nicht beobachtet worden. Die Änderung der Gibbschen Energie nach Gleichung (2.9) ist für die auf OTS adsorbierten Proteine also zu gering und die Proteine werden nicht weiter entfaltet.

Messungen an reinen Lysozym-Lösungen in Kontakt mit OTS bei einer Photonenenergie von 70 keV

Ein Beispiel für eine Druckserie, die mit einer Photonenenergie von 70 keV an der Beamline ID15A an der ESRF aufgenommen wurde, ist in Abbildung 6.12 gezeigt. Elektronendichteprofile und Messungen zweier weiterer Proben sind im Anhang in den Abbildungen A.4 und A.5 ab Seite 106 dargestellt.

Die in den Elektronendichteprofilen in Abbildung 6.12 gezeigte Proteinschicht ist bei 50 bar (rot) 44 \AA dick, das sind $18,1 \text{ \AA}$ mehr als die an Beamline B19 gemessene Schichtdicke. Das Dichtedefizit zwischen OTS und Adsorbatschicht ist ausgeprägter als bei den an Beamline B19 erzielten Ergebnissen. Auch die Form der Proteinschicht unterscheidet sich, da die Lysozymschicht aus zwei unterschiedlichen Bereichen besteht. So ist oberhalb des dichten Bereiches ($d = 13 \text{ \AA}$) eine zweite Schicht geringerer Dichte vorhanden, sie ist ungefähr 31 \AA dick. Die gleichen Schichten wurden von Lu *et al.* mit Neutronenreflektivitäten und unterschiedlichen Deuterierungsgraden der Probenflüssigkeit auf OTS beschrieben [Lu98]. Die Dichte der Schichten nimmt bei Erhöhung des Drucks zu. Bei 3000 bar (hellgrün) steigt sie stärker an als zuvor von 50 bar auf 1000 bar , bleibt bei der weiteren Erhöhung des Drucks auf 5000 bar (orange) konstant. Der Bereich des Dichtedefizits an der Grenzfläche zwischen OTS und Lysozymschicht wird mit steigendem Druck kleiner, zusätzlich nimmt auch die Rauigkeit an der Grenzfläche ab. Bei der Reduzierung des Druckes sind die Elektronendichteprofile nahezu identisch zu den Messungen bei Erhöhung des Drucks. Die Schicht der 50 bar Messung (blau) ist durch geringe Mengen zusätzlich adsorbierter Proteine 8 \AA dicker.

Messungen an wässrigen Lösungen mit Lysozym und Urea in Kontakt mit OTS

Der Einfluss des Denaturants Urea auf die Proteinschichten wurde ebenfalls an der Beamline ID31 und zusätzlich an der Beamline MS04 der Swiss Light Source studiert. Messreihen mit

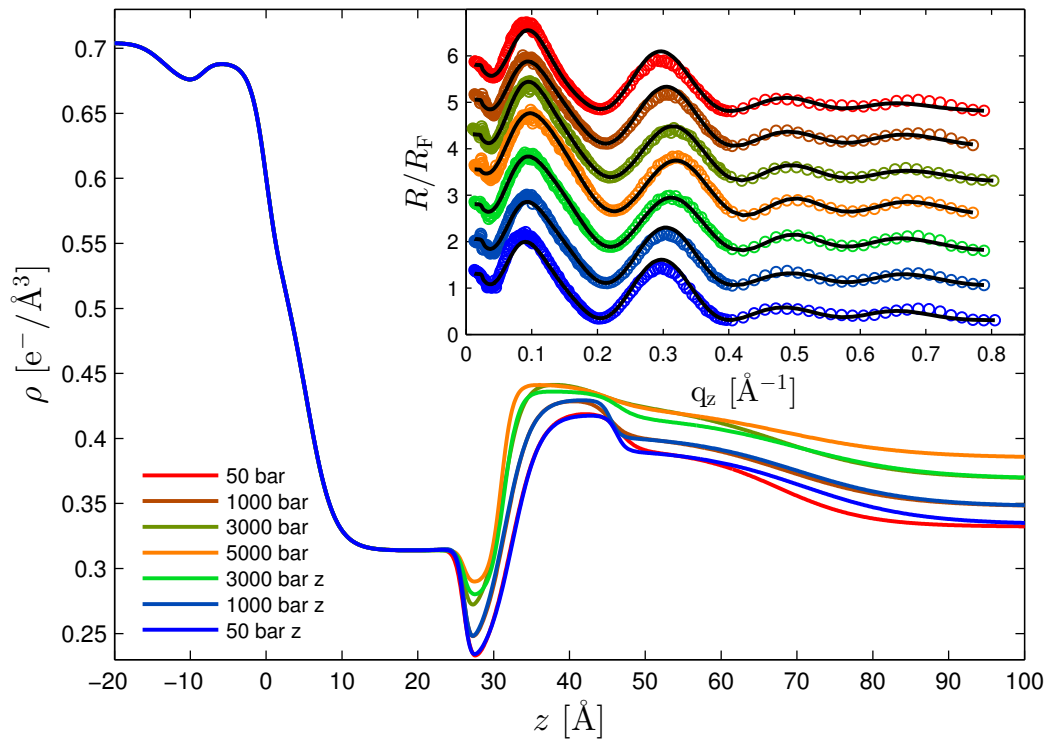


Abbildung 6.12: Elektronendichteprofile einer Lysozym-Lösung in Kontakt mit OTS, der Einschub zeigt die Messdaten und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y -Achse verschoben. Die bei der Absenkung des Drucks gemessenen Werte sind durch „z“ in der Legende gekennzeichnet. Die Messungen wurden an der Beamline ID15A an der ESRF durchgeführt.

1 M Urea sind in Abbildung 6.13 und im Anhang in Abbildung A.6 (Seite 108) dargestellt. Zudem wurde eine Probe mit 5 M Urea untersucht, die Ergebnisse sind in Abbildung A.7 auf Seite 109 gezeigt.

Die druckabhängige Anlagerung von Urea auf OTS wurde in [Wir15] studiert. Es konnte gezeigt werden, dass Urea ungefähr 12 \AA dicke Schichten an der OTS-Wasser-Grenzfläche ausbildet. Diese Schichten haben eine konstante Elektronendichte. Wird der Druck erhöht, steigt die Elektronendichte der Schicht gleichmäßig an. Die Schichten sind dicker ($d \approx 11 \text{ \AA}$) als für Monolagen aus einem kleinen Molekül wie Urea ($r = 2,33 \text{ \AA}$ [Aut08]) erwartet und etwa doppelt so dick wie an hydrophoben Graphen-Oberflächen in 8 M Urea Lösungen in Molekulardynamik-Simulationen beobachtet [Zan09].

Ebenso wie die in Abbildung 6.13 dargestellten Elektronendichteprofil zeigen alle Messungen mit Urea und Lysozym Adsorbatschichten mit einer Dicke von ungefähr 20 \AA . Die Schichten sind also deutlich dünner als die ebenfalls an der Beamline ID31 bestimmten Schichten aus reinem Lysozym ($d \approx 44 \text{ \AA}$). Die Schichtdicke der Adsorbate mit Urea und Lysozym in der Lösung entspricht damit den aus der Literatur mit XRR bestimmten Werten für reines Lysozym auf OTS. Die Erhöhung des Drucks führt zu einer schwachen Zunahme der Elektronendichte, während die Schichtdicke etwas abnimmt. Diese Abnahme kann durch den Verlust des Elektronendichtekontrastes mit steigendem Druck hervorgerufen werden. Nimmt die Elektronendichte des Wassers stärker zu als die der Proteinschicht, ist die Unterscheidung zwischen den weniger dichten Bereichen der Proteinschicht und dem Wasser an der Protein-Wasser-Grenzfläche nicht mehr möglich.

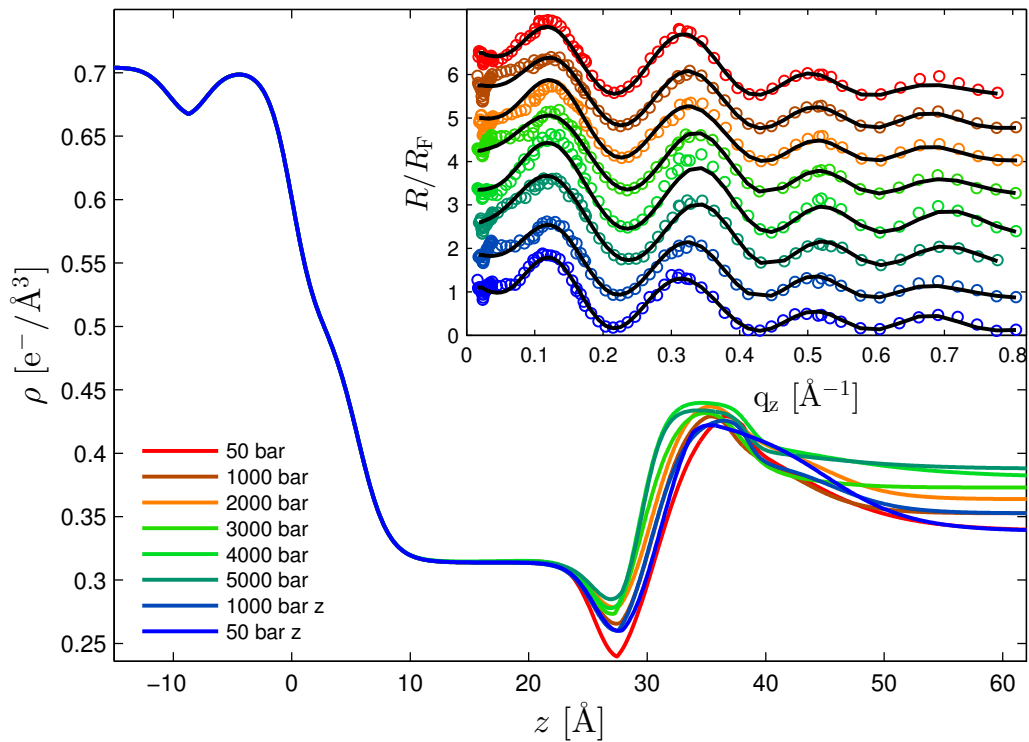


Abbildung 6.13: Elektronendichteprofile einer Lösung mit Lysozym und 1 M Urea in Kontakt mit OTS, der Einschub zeigt die Messdaten und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y-Achse verschoben. Die bei der Absenkung des Drucks gemessenen Werte sind durch „z“ in der Legende gekennzeichnet. Die Messungen wurden an der Beamline ID31 der ESRF durchgeführt.

Die Form der Adsorbatschicht im Elektronendichteprofil bleibt nach dem Absenken des Drucks auf 1000 bar (hellblau in Abbildung 6.13) erhalten. Wird der Druck weiter auf 50 bar verringert (blau), nimmt die Elektronendichte der Schicht im Bereich der Protein-Wasser-Grenzfläche deutlich zu während die Schichtdicke konstant bleibt. Beim Absenken des Druckes kommt es also zur Adsorption von Lysozym oder Urea.

Untersuchungen zum schädigenden Einfluss der Röntgenstrahlung bei einer Photonenenergie von 70 keV

Da durch Röntgenstrahlung verursachten Schäden die Adsorption der Proteine beeinflussen können, wurden verschiedene Messungen hierzu durchgeführt. Das ist insbesondere deshalb notwendig, weil die mit einer Photonenenergie von 70 keV durchgeführten Messungen sich von den Messungen mit einer Photonenenergie von 27 keV und der XRR-Literatur unterscheiden.

Um den schädigenden Einfluss der Strahlung zu untersuchen, wurden mehrfach hintereinander bei 50 bar Messungen auf der gleichen Probenstelle durchgeführt. Die aufgenommenen Intensitätsverläufe sind in Abbildung 6.14 dargestellt. Die Messwerte der drei aufeinander folgenden Messungen sind im Rahmen der Messgenauigkeit identisch und können mit der angepasste Intensität (schwarze Linie) reproduziert werden. Eine Zunahme der Dicke der Lysozymschicht durch die wiederholte Bestrahlung kann für diese Messreihe ausgeschlossen werden.

Das Resultat unterscheidet sich von den Untersuchungen des schädigenden Einflusses der

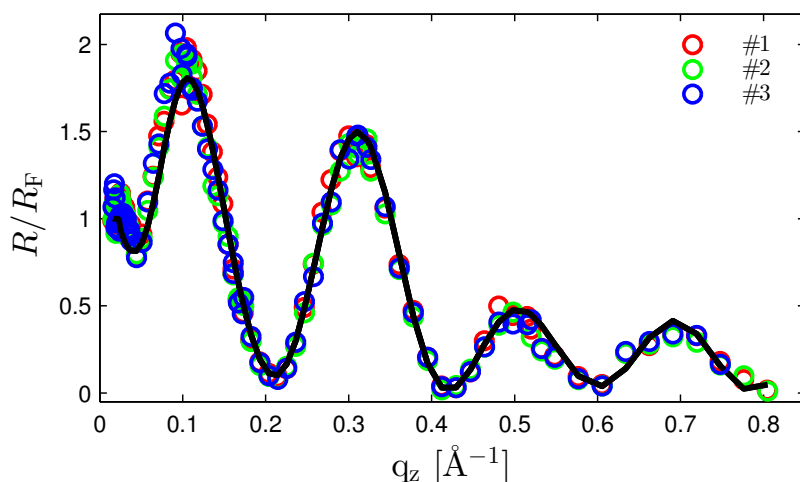


Abbildung 6.14: Drei nacheinander auf einer Probenposition durchgeführte Messungen bei 50 bar. Der angepasste Intensitätsverlauf (schwarze Linie) reproduziert alle drei Messungen.

Röntgenstrahlung an OTS in Kontakt mit Wasser (vgl. Kapitel 5.4). Die Erhöhung der Strahlintensität führte ohne Proteinschicht zu Veränderungen in der gemessenen Intensität. Möglicherweise wurden die Proteine in der Lösung oder an der Oberfläche schon am Anfang der Messungen so stark geschädigt, dass im Vergleich zur Literatur zusätzliche Proteine adsorbieren. Die so entstandene Schicht ist nicht mehr sensitiv auf weitere durch die Strahlung verursachte Schäden.

Die Intensität der Strahlung an der Beamline ID15A kann nicht mit der an der Beamline ID31 verglichen werden⁴, da eine andere Diode zur Bestimmung der einfallenden Intensität verwendet wurde (vgl. Kapitel 5.4). Die Spezifikationen der Diode sind nicht genau bekannt, daher kann die Photonenzahl nicht berechnet werden. Jedoch ist es möglich, die Strahlungsintensität unterschiedlicher Messreihen an einer Beamline durch den Vergleich der Messdaten der Diode zu bestimmen.

In Abbildung 6.15 sind Messungen an Lysozym-Lösung in Kontakt mit OTS gezeigt. Die Daten wurden mit einer im Vergleich zu den in Abbildung 6.12 dargestellten Messungen 50 % höheren Strahlungsintensität aufgenommen. Die Adsorbatschicht hat zu Beginn der Messreihe bei 50 bar (rot) die gleiche Form wie in dem zuvor in Abbildung 6.12 gezeigten Elektronendichteprofil. Erst mit steigendem Druck unterscheiden sich die Elektronendichteprofile der beiden Messreihen. So steigt Dicke der zweiten Lysozymschicht in Abbildung 6.15 von 3000 bar (orange) auf 5000 bar (grün) um 10 \AA und auch die Elektronendichte nimmt zu. Beim Absenken des Drucks erhöht sich die Dichte der Proteinschicht am Wasser weiter. Das kann nur durch die Adsorption weiterer Proteine erklärt werden. Die Menge der adsorbierten Proteine steigt mit jeder Messung, dies erfolgt gleichmäßig auf der ganzen Probe. Es ist also nicht möglich, durch den Wechsel der Probenposition eine von der Strahlung unbeeinflusste Proteinschicht zu untersuchen. Die Schädigung, die zur Adsorption führt, muss also an den Molekülen in der Lösung auftreten. Der Mechanismus ist somit ein anderer als der an OTS in Kontakt mit reinem Wasser beobachtete (vgl. Kapitel 5.4 oder [Mez06; Mez08b]). Auch

⁴Im Allgemeinen ist die Intensität an der Beamline ID31 um den Faktor 100 höher als an der Beamline ID15A. Da der Röntgenstrahl an der Beamline ID31 in allen Messungen abgeschwächt wurde und die Zeit der Bestrahlung an der Beamline ID15A länger war, kann die Strahlintensität nicht pauschal abgeschätzt werden.

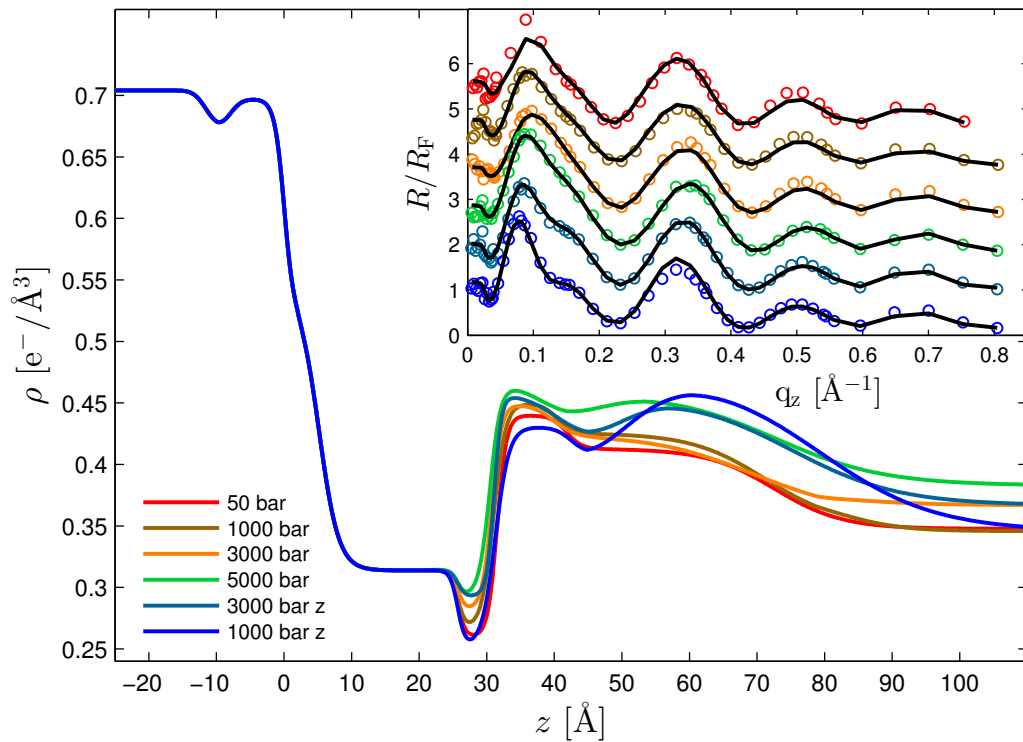


Abbildung 6.15: Elektronendichteprofile von Lysozym auf OTS, der Einschub zeigt die Messdaten und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y -Achse verschoben. Die bei der Absenkung des Drucks gemessenen Werte sind durch „z“ in der Legende gekennzeichnet. Diese Datenaufnahme wurde an der Beamline ID15A im Rahmen der Dissertation von F. Wirkert [Wir15] durchgeführt. Die einfallende Intensität war um einen 50 % höher als bei den in Abbildung 6.12 gezeigten Messungen.

die Interpretation der Ergebnisse ist bei diesem System und der hohen Photonenenergie von 70 keV weniger eindeutig, da es keine von der Strahlung unbeeinflussten Probenpositionen gibt.

In den zuvor in Abbildung 6.12 gezeigten Elektronendichteprofilen ist kein solches Schichtwachstum zu erkennen. Die druckabhängige Veränderung ist auch für höhere Photonenenergien gleich der an Beamline B19 beobachteten. Die wahrscheinlichste Ursache für die dickeren Schichten ist, dass die Röntgenstrahlung mit höherer Flussdichte und einer Photonenenergie von 70 keV das System destabilisiert und zur Adsorption weiterer Proteine führt. Die Schädigung an den Proteinen muss sehr schnell geschehen, da es nicht möglich war, an den ESRF Beamlines dünne Schichten zu vermessen. So lange die Strahlungsintensität niedrig gehalten wird, sind die so entstandenen Schichten gegen weitere strahlungsinduzierte Schäden resistent. Das ähnliche Schichten auch mit Neutronenreflektivitäten beobachtet wurden [Lu98], macht deutlich, dass es auch andere Ursachen als Strahlenschäden geben kann. Die durch Urea hervorgerufenen Änderungen zeigen außerdem, dass die Adsorbate trotz vermutlich strahlungsinduzierter Adsorption weiterer Proteine auf Änderungen am System sensitiv sind. Durch den Vergleich der Messreihe an Lysozym und 1 M Urea bei einer Photonenenergie von 25 keV (Abbildung A.6, Seite 108 im Anhang) mit der Messreihe bei einer Photonenenergie von 70 keV (Abbildung 6.13) wird deutlich, dass die Ergebnisse mit Urea in der Lösung nicht von der Strahlung beeinflusst werden, da das Urea die weitere Adsorption des Lysozym unterdrückt.

Da die Untersuchungen bei einer Photonenenergie von 70 keV reproduzierbare Schichten mit gleicher druckabhängigkeit wie die Messungen mit einer Photonenenergie von 27 keV ergeben, werden sie in die folgende Diskussion mit einbezogen.

6.2.2 Analyse der Resultate und Diskussion

Zum Vergleich der Adsorbatschichten können aus den Elektronendichteprofilen die Schichtdicke d , die maximale Belegung Γ_{Max} und die adsorbierte Menge Γ berechnet werden. Hierfür wird die Elektronendichte des Lysozym ρ_{Protein}^0 , das molare Volumen V und die molare Masse m benötigt. Für ρ_{Protein}^0 und V sind in der Literatur zwei verschiedene Angaben verfügbar. Kiesel *et al.* [Kie14b] geben $\rho_{\text{Protein,Kiesel}}^0 = 0,49 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ und $V_{\text{Kiesel}} = 9348 \text{ cm}^3/\text{mol}$ an während Evers *et al.* [Eve08] $\rho_{\text{Protein,Evers}}^0 = 0,455 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ und $V_{\text{Evers}} = 10057 \text{ cm}^3/\text{mol}$ nutzen. Zur Berechnung werden zwei nahezu identische Proteindatenbankeinträge genutzt, daher ist es nicht möglich, einen der beiden Werte auszuschließen. Im Folgenden wird mit den Mittelwerten $\rho_{\text{Protein}}^0 = 0,4725 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ und $V = 9703 \text{ cm}^3/\text{mol}$ gerechnet. Die molare Masse beträgt $m = 14300 \text{ g/mol}$.

Für Lösungen, die Urea enthalten, können Γ_{Max} und Γ nur abgeschätzt werden. Die genaue Zusammensetzung der Schicht aus Lysozym und Urea ist nicht bekannt, daher kann die Elektronendichte ρ_{Schicht}^0 nicht bestimmt werden. Als Näherung wird somit auch für Lösungen mit Urea $\rho_{\text{Protein}}^0 = 0,4725 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ genutzt.

Die Werte für d , Γ_{Max} und Γ sind für alle Adsorbatschichten in Abbildung 6.16 angegeben. Sie werden anhand der Messplätze unterschieden. Schwarze Symbole kennzeichnen die Messungen an reinem Lysozym an den Beamlines mit einer Photonenenergie von 70 keV, rote Symbole die Messungen an Urea und Lysozym und blaue Kreise die Resultate, die bei einer Photonenenergie von 27 keV ermittelt wurden.

Für jedes System wurde eine Gerade der Form $f(x) = ax + b$ angepasst, alle Parameter sind in Tabelle 6.4 angegeben. Die Fehler der Anpassung an den Hochenergiebeamlines (ID15A und ID31) sind in Abbildung 6.16 als gestrichelte Linien gezeigt. Für die Gerade, die an die Werte der Beamline BI9 angepasst wurde, kann kein Fehler angegeben werden, da nur eine Messreihe existiert.

Die Resultate der Lysozym-Urea-Mischungen sind für die beiden studierten Konzentrationen sehr ähnlich. Die Werte der höheren Konzentration (5M Urea) sind für Γ_{Max} und Γ etwas größer, der druckabhängige Verlauf entspricht aber den Ergebnissen der Proben mit 1 M Urea. Daher kann über alle Proben durch Anpassung einer Gerade gemittelt werden. Die Steigung der Geraden spiegelt dann die Druckabhängigkeit aller Urea-Konzentrationen wieder, der y -Achsenabschnitt kann nicht interpretiert werden.

Parameter	Lysozym (27 keV)	Lysozym (70 keV)	Lysozym & Urea
a_d [$\text{\AA}/\text{kbar}$]	-0,3	$-0,9 \pm 0,7$	$-1,7 \pm 0,6$
b_d [\AA]	24,5	$46,3 \pm 2,3$	$22,3 \pm 1,7$
$a_{\Gamma_{\text{Max}}}$ [%/kbar]	-0,2	$0,4 \pm 1,5$	$2,0 \pm 1,1$
$b_{\Gamma_{\text{Max}}}$ [%]	50,1	$72,0 \pm 4,8$	$69,6 \pm 3,2$
a_{Γ} [$\text{mg}/\text{m}^2/\text{kbar}$]	0,0	$0,1 \pm 0,1$	$-0,1 \pm 0,04$
b_{Γ} [mg/m^2]	1,3	$2,7 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$

Tabelle 6.4: Anpassungsparameter der in Abbildung 6.16 abgebildeten Geraden der Form $f(x) = ax + b$.

Die aus den Anpassungen berechneten y -Abschnitte für reines Lysozym entsprechen den

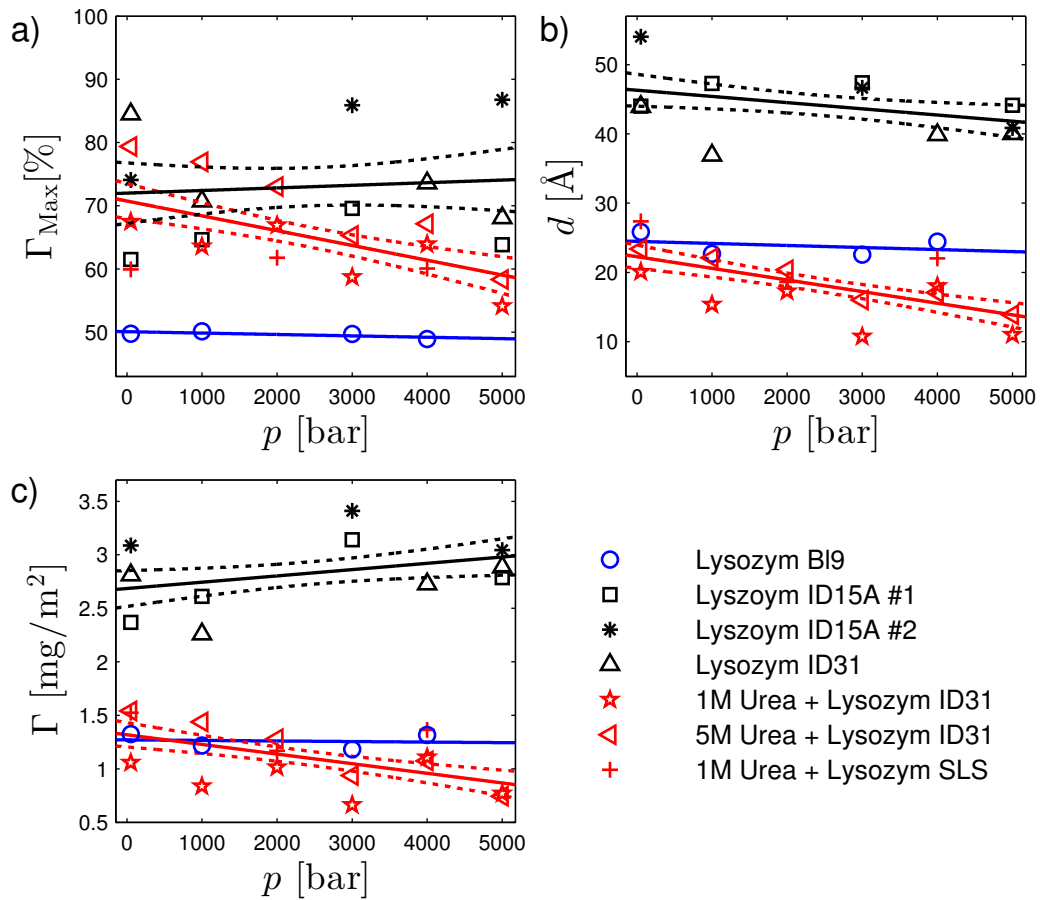


Abbildung 6.16: Vergleich der Proben mit Protein an der OTS-Wasser-Grenzfläche. a) zeigt die maximale Belegungsichte Γ_{Max} , b) die Dicke d der adsorbierten Schicht und c) die adsorbierte Menge Γ . Die Geraden wurden an die Messwerte angepasst.

Werten bei Atmosphärendruck und ermöglichen den Vergleich der Mittelwerte der unterschiedlichen Systeme mit der Literatur, wie zuvor die aus den Messungen bei 50 bar ermittelten Parameter der einzelnen Messreihen. Aus der Literatur sind keine Messungen zu Lysozym-Urea-Gemischen an der fest-flüssig-Grenzfläche bekannt. Im Folgenden werden zuerst Γ und d mit der Literatur verglichen, anschließend erfolgt die Analyse der Druckabhängigkeit und die Diskussion der durch Urea verursachten Änderungen im System.

Die Adsorbatschichten aus reinem Lysozym auf OTS entsprechen für die Resultate der Beamlinie BI9 den in der Literatur beschriebenen Schichten. Die Schichtdicke von $d = 24,5 \text{ \AA}$ ist $4,5 \text{ \AA}$ größer als die in der Literatur durchschnittlich beschriebenen $18 - 22 \text{ \AA}$ [Häh12; Ric13]. Die Schichtdicke ist deutlich geringer als die Ausdehnung nativen Lysozyms ($45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$). Die adsorbierte Menge beträgt $\Gamma = 1,3 \text{ mg/m}^2$ und entspricht den Literaturwerten. Die höhere Schichtdicke kann durch den in Hochdruckmessungen notwendigen BisTris-Puffer verursacht werden. Die zitierten Studien haben entweder Phosphatpuffer [Häh12; Lu98] oder phosphatgepufferte Salzlösung [Ric13] verwendet. Da die Wahl des Puffers die Adsorption von Proteinen variieren kann, wurde für Germanium-Wasser-Grenzfläche und verschiedene Proteine bereits untersucht [Wei09].

Die Schichtdicke der an den Beamlines ID15A und ID31 untersuchten Lysozymadsorbate beträgt $d = 46,3 \pm 2,3 \text{ \AA}$, die adsorbierte Menge $\Gamma = 2,7 \text{ mg/mm}^2$. Beide Werte sind

damit etwa doppelt so groß wie die in der Literatur mittels XRR bestimmten Werte. Mit Neutronenreflektivitäten wurde durch Kontraständerung ein sehr ähnliches System aus zwei Schichten mit jeweils $10 \pm 2 \text{ \AA}$ und $40 \pm 20 \text{ \AA}$ dicken Schichten gefunden [Lu98]. Die von Lu *et al.* bestimmte adsorbierte Menge ist mit $\Gamma = 1,65 \pm 0,2 \text{ mg/m}^2$ geringer [Lu98]. Obwohl die Schichtdicke der langen Achse nativer Lysozymmoleküle entspricht, muss auf Grund der inhomogenen Dichteverteilung der Schichten und der stark denaturierenden Wirkung der hydrophoben Oberfläche davon ausgegangen werden, dass die adsorbierten Proteine denaturiert sind.

Die adsorbierte Menge Γ und die Schichtdicke d der Messungen an wässrigen Lösungen mit Urea und Lysozym in Kontakt mit OTS sind bei 50 bar (rote Symbole in Abbildung 6.16) vergleichbar mit den Werten der Probe mit reiner Lysozym-Lösung, die bei einer Photonenenergie von 27 keV bestimmt wurden (blaue Kreise). Die maximalen Belegungen Γ_{Max} hingegen sind zwischen 10 % und 29 % höher. Das ist ein Indiz dafür, dass Urea in die Lysozymschicht eindringt und die (Elektronen-)Dichte erhöht. Die zusätzliche Adsorption weiterer Lysozymmoleküle kann ausgeschlossen werden. Wie in den Messungen zum Strahlungsinduzierten Schichtwachstum (Abbildung 6.15) zu erkennen ist, steigen dadurch auch die adsorbierte Menge Γ und die Schichtdicke.

Bei der Analyse des Druckverhaltens der Adsorbatschichten muss beachtet werden, dass d , Γ und Γ_{Max} von der steigenden Dichte des Wassers abhängen. So ändert sich der Kontrast im System und damit der Anteil der Proteinbereiche, die noch von der Wasserphase unterschieden werden können. Dadurch kann die gemessene Schichtdicke variieren.⁵ Auch bei der Berechnung von Γ und Γ_{Max} fließt die Elektronendichte der Wasserphase ein (vgl. die Gleichungen (6.3) und (6.4) auf Seite 59). Steigt die Elektronendichte der Wasserphase stärker als die der Schicht, sinken d , Γ und Γ_{Max} . Fallende Werte mit steigendem Druck sind somit nicht gleichbedeutend mit Desorption von der Oberfläche.

Wie aus den in Tabelle 6.4 angegebenen Steigungen und aus Abbildung 6.16 hervorgeht, sind Γ_{Max} und Γ für die reinen Lysozymproben im Rahmen des Fehlers mit steigendem Druck konstant. Die Dichte der Schicht ändert sich somit wie die Dichte des Volumenwassers. Das bedeutet entweder, dass die Dichte des in der Schicht enthaltenen Wassers etwas stärker zu nimmt als die des Volumenwassers, oder dass mit steigendem Druck zusätzliche Proteine in die Schicht eindringen. Zwischen diesem Effekt kann in den Elektronendichteprofilen nicht unterschieden werden. Auf Grund der Reversibilität und der Unterschiede zum durch Strahlenschäden verursachten Schichtwachstum (vgl. Abbildung 6.15) kann aber davon ausgegangen werden, dass es nicht zur Adsorption weiterer Lysozymmoleküle kommt. Die Dicke der Lysozymschichten sinkt mit steigendem Druck im Rahmen des Fehlers leicht.

Um die druckabhängige Veränderung des in der Adsorbatschicht enthaltenen Wassers zu bestimmen, können Schichten aus nativen Proteinen an der Siliziumdioxid-Wasser-Grenzfläche untersucht werden. Erste Messungen konnten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden. Die Resultate werden im Anhang in Kapitel A.3.1 diskutiert.

Die von Koo *et al.* [Koo13] auf Polystyrol bis 2000 bar gemessene druckinduzierte Erhöhung der Schichtdicke um $7,4 \text{ \AA}$ und der adsorbierten Menge um $0,6 \text{ mg/m}^2$ kann für OTS und Lysozym nicht bestätigt werden.

Mit Urea in der Lösung sinken d , Γ_{Max} und Γ mit steigendem Druck. Das unterschiedliche Verhalten der beiden Lösungen mit und ohne Urea kann mit der Verdrängung von Wasser durch Urea in der Proteinschicht begründet werden. Dadurch wird die Adsorbatschicht dichter gepackt und bei steigendem Druck dringt weniger Wasser in die Schicht ein. Die

⁵Die Schichtdicke d der Proteinschichten wird am Übergang zur Flüssigkeit bis zu einer Elektronendichte von $1,03 \cdot \rho_{\text{FI}}$ gemessen (vgl. Seite 60).

Elektronendichte und damit die maximale Belegung der Schicht nimmt weniger stark zu. Für diese Hypothese finden sich Belege in der Literatur. So wurde die Bindung von Urea an Lysozym auch in Molekulardynamik-Simulationen untersucht [Hua08]. Dabei wurde die Entfaltung einer mutierten Lysozymart in 8 M Urea Lösung studiert. Das mutierte Lysozym wurde gewählt, da natives Lysozym in Lösung selbst bei der höchstmöglichen Urea-Konzentration von 9,3 M nicht entfaltet [Tim03; Son14]. Die von Hua *et al.* beobachtete Entfaltung findet in zwei Schritten statt [Hua08]. Zuerst bindet Urea an die hydrophoben Bereiche im Protein. Das Protein wird entfaltet und Urea kann an die zuvor unzugänglichen Bereiche und Seitenketten binden.

Auch experimentell wurde beobachtet, dass Urea während der Entfaltung Wasser in den Proteinen verdrängt [Son14]. Als Beispiel für ein Protein, das in Urea-Lösung im nativen Zustand erhalten bleibt, wurde Lysozym von Son *et al.* [Son14] ebenfalls untersucht.

Die vorgestellten Beispiele zeigen, dass Lysozym in Lösung nicht von Urea entfaltet wird und die Urea-Moleküle nicht in das Protein eindringen. Erst durch die Adsorption auf dem OTS und die damit einhergehende Entfaltung kann Urea, auch in niedrigen Konzentrationen, an die Proteine binden und Wasser aus der Schicht verdrängen. Da Urea mit einem Radius von 2,33 Å [Aut08] im Vergleich zur Schichtdicke klein ist, äußert sich die Adsorption nicht in einer Zunahme der Schichtdicke.

Dass die Zugabe von Urea zur Reduktion der Adsorption von Proteinen führen kann, wurde bereits an der Wasser-Luft-Grenzfläche festgestellt. So sinkt die adsorbierte Menge des Proteins Ribonuclease A durch Zugabe von Urea [Hüs10]. An der fest-flüssig-Grenzfläche sind keine Untersuchungen bekannt.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Resultate zeigen, dass an hydrophoben Grenzflächen adsorbiertes Lysozym durch die Erhöhung des hydrostatischen Drucks nicht destabilisiert wird. Der Unterschied der Ergebnisse von den Beamlines ID31 und ID15A zu den Studien von Hähl *et al.* [Häh12] und Richter *et al.* [Ric13] sowie den an der Beamline BI9 ermittelten Resultate ist eindeutig. Vermutlich führt die höhere Photonenenergie zu den dickeren und dichteren Adsorbatschichten. Durch die Zugabe von Urea kann die zusätzliche Adsorption unterdrückt werden. Durch die Nutzung des hydrostatischen Drucks konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Urea das Wasser aus der Adsorbatschicht verdrängt.

Kapitel 7

Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grenzflächen zwischen einem hydrophoben Substrat und verschiedenen Flüssigkeiten untersucht. Die hydrophoben Oberflächeneigenschaften wurden durch Beschichtung von Siliziumwafern mit Oktadecyltrichlorosilan (OTS) erzeugt. Zwischen dieser Oberfläche und Wasser existiert eine Verarmungsschicht, die hauptsächlich durch die Methylgruppen des OTS an der Oberfläche und die Ausrichtung der Moleküle der ersten Wasserschicht erzeugt wird. Da bisher vor allem wässrige Lösungen als flüssige Phase an solchen Oberflächen untersucht wurden, stellt sich die Frage, in wie weit die Polarität und andere Eigenschaften der Flüssigkeitsphase die Bildung der Verarmungsschicht beeinflussen.

Der erste Abschnitt der vorgestellten Untersuchungen beschäftigt sich daher mit der Grenzfläche zwischen der OTS-Oberfläche und Lösungsmitteln. Bisherige Studien an der Grenzfläche zwischen hydrophoben Oberflächen und Lösungsmitteln konnten die vertikale Ausdehnung der Verarmungsschicht mittels Neutronenreflektometrie auf 15 Å bis 23 Å eingrenzen [Mac07; Gut11]. Die geringe Auflösung von Neutronenreflektivitätsexperimenten sowie der Vergleich mit den Ergebnissen für Wasser [Mez06; Mez10] zeigt, dass diese Werte nur eine obere Abschätzung darstellen.

Als Maß für Größe des Dichtedefizits zwischen der hydrophoben Oberfläche und den Flüssigkeiten wurde in dieser Arbeit die quadratische Abweichung χ^2 zwischen den experimentellen Elektronendichteprofilen und dem aus den Parametern einer trockenen Probe bestimmten Elektronendichteprofil der Grenzfläche ermittelt. Das Dichtedefizit an der OTS-Wasser-Grenzfläche, welches zum Vergleich mit der Literatur auch nach der Methode von Mezger *et al.* [Mez06] berechnet wurde, entspricht für die verwendeten Proben dem von Mezger *et al.* ermittelten.

Die vertikale Ausdehnung des Dichtedefizits zwischen hydrophoben Oberflächen und unterschiedliche Lösungsmitteln (*n*-Hexan, *p*-Xylol, *tert* butyl methyl ether (TBME), Trichlorobenzol, Aceton, Ethylenglycol, Methanol, Wasser) konnte in dieser Arbeit eingegrenzt werden. So beträgt die vertikale Ausdehnung für das größte beobachtete Dichtedefizit (Methanol) 8 Å während zwischen *n*-Hexan und OTS kein Dichtedefizit festgestellt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass die über χ^2 bestimmte Größe des Defizits mit den Moleküleigenschaften der Lösungsmittel korreliert ist. Polare Lösungsmittel wie Methanol haben ein größeres Dichtedefizit an der Oberfläche als unpolare wie *p*-Xylol oder *n*-Hexan. Dieser Zusammenhang ist für die hier untersuchten Lösungsmittel linear.

Außerdem konnte durch Mischung der unterschiedlich dichten und unpolaren Lösungsmittel TBME und Chloroform sowie *p*-Xylol und Trichlorobenzol der Einfluss des Elektronendichtekontrastes zwischen der OTS-Schwanzgruppe und der Flüssigkeit bestimmt werden. Un-

terhalb einer kritischen Dichte $\rho_G \approx 0,345 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ ist das Defizit von den Eigenschaften der Lösungsmittel abhängig und es bildet sich ein Minimum im Elektronendichteprofil aus. Für Flüssigkeitselektronendichten oberhalb von ρ_G ist kein Minimum an der Grenzfläche vorhanden, es tritt ein monotoner Übergang auf, der jedoch im Vergleich zu Referenzmessung in seiner Länge verschoben ist. Aus diesem Resultat folgt, dass oberhalb der Flüssigkeitselektronendichte ρ_G das über χ^2 bestimmte Dichtedefizit durch den Elektronendichtekontrast bestimmt wird. Ein Vergleich ist somit nur für Flüssigkeiten ähnlicher Dichte möglich. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Lösungsmitteln trifft dies auf Chloroform und Trichlorobenzol zu. Es zeigt sich, dass Chloroform auf Grund seiner geringeren Größe und anderen Form gegenüber Trichlorobenzol ein kleineres Dichtedefizit hat.

Zur weiteren Untersuchung der beobachteten Zusammenhänge sind mehrere Vorgehensweisen möglich. Aus Molekulardynamik-Simulationen können die Zusammenhänge auf molekularer Ebene analysiert werden. Hierdurch können auch Eigenschaften der Lösungsmittel wie die Symmetrie der Moleküle oder die Topographie der Oberfläche berücksichtigt werden. Auch durch Messungen an weiteren Lösungsmitteln ist es möglich, die Abhängigkeit des Defizits von den Lösungsmittelleigenschaften zu bestimmen. Hier sind insbesondere kleine, unpolare Lösungsmittel wie zum Beispiel Kohlenstoffdisulfid (CS_2 , $r_{\text{Gy}} = 1,56 \text{ \AA}$, $E_{\text{T}}^{\text{N}} = 0,065$) oder große, polare Lösungsmittel wie Triethylenglycol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$, $r_{\text{Gy}} = 4,71 \text{ \AA}$, $E_{\text{T}}^{\text{N}} = 0,682$) interessant. Ebenso sind Messungen an anderen Oberflächen wie Siliziumdioxid möglich, um den Einfluss der Oberflächenpolarität zu studieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden an zwei unterschiedlichen Systemen Adsorbatschichten aus Proteinen studiert. Eines dieser Systeme wurde durch den Einfluss von Proteinen auf die Dichtigkeit von Fettkapseln motiviert. Die Dichtigkeit solcher mit Wasser gefüllter Fettkapseln, die in Zukunft in der Nahrungsmittelindustrie genutzt werden sollen, erhöht sich, wenn sich Sojasauce im Wasser befindet. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen an wässrigen Lösungen mit Sojasauce und an in der Sauce enthaltenen säurehydrolysierten Proteinen durchgeführt.

Aus den Inhaltsstoffen der Sojasauce werden an der Grenzfläche zwischen Lösungen mit Sojasauce und OTS Adsorbatschichten mit einer Dicke von $d \approx 20 \text{ \AA}$ gebildet. Durch die Verwendung säurehydrolysierten Sojaproteine konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinfragmente in der Sauce für die Bildung der Schichten verantwortlich sind. Die säurehydrolysierten Sojaproteine bilden an der OTS-Wasser- und der Wasser-Luft-Grenzfläche Schichten, deren Dicke mit der Konzentration steigt. Die Schichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche sind dicker ($d_{\text{Max}} \approx 100 \text{ \AA}$) und dichter ($\rho_{\text{Max}} = 0,482 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$) als an der OTS-Wasser-Grenzfläche ($d_{\text{Max}} = 28 \text{ \AA}$, $\rho_{\text{Max}} = 0,405 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$). An der Siliziumdioxid-Wasser-Grenzfläche ist keine Adsorption sichtbar. Die Schichtdicke und die integrierte Elektronendichte der Schichten aus säurehydrolysierten Proteinen steigen also mit der Hydrophobizität der Grenzfläche und sind, für hydrophobe Grenzflächen, zudem Konzentrationsabhängig.

Die Schichten wurden auch im getrockneten Zustand mit XRR, Rasterkraftmikroskopie und Kontaktwinkelmessungen untersucht. Ähnlich wie aus der Literatur bekannt [Gol12], zeigt sich, dass die denaturierten Proteine die Oberflächeneigenschaften des Substrates ändern und der polare Anteil der Oberflächenenergie durch die Proteinschicht steigt. Die Schichten aus säurehydrolysierten Proteinen sind dabei geschlossener und polarer als die aus den Inhaltsstoffen der Sojasauce gebildeten Schichten.

Aus diesen Resultaten folgt, dass die beobachtete Steigerung der Dichtigkeit der Fettkapseln durch die nur 20 \AA bis 100 \AA dicken Proteinschichten hervorgerufen werden muss. Mögliche Prozesse sind die Adsorption der Proteinfragmente in Rissen der Fettschicht, eine deutlich geringere Verdampfung des Wassers durch die Schichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche

oder die Immobilisierung der Wassermoleküle an der hydrophilen Grenzfläche.

Neben diesen Experimenten wurden auch die aus Lysozym gebildeten Schichten auf OTS unter hohen hydrostatischen Drücken untersucht. Das Verhalten von Proteinen in Lösung unter Druck ist ein viel studiertes Forschungsgebiet, über die Druckabhängigkeit von Proteinadsorbatschichten ist dagegen noch nicht viel bekannt. Dabei bietet Druck die Möglichkeit, das System zu beeinflussen ohne gleichzeitig die Temperatur und die Dichte zu variieren und das System so nur gering zu stören. Dadurch können zum Beispiel die Eigenschaften des in der Schicht enthaltenen Wassers studiert werden.

Für die Untersuchungen an Lysozymadsorbatschichten wurden verschiedene Photonenenergien eingesetzt. Die aus den Messungen mit einer Photonenenergie von 27 keV an der Beamlinie BI9 am Elektronenspeicherring DELTA ermittelten Elektronendichteprofile zeigen bei 50 bar Adsorbatschichten mit den gleichen Eigenschaften ($d = 24,5 \text{ \AA}$, $\Gamma = 1,3 \text{ mg/m}^2$ nach Tabelle 6.4) wie die vergleichbare Literatur bei Atmosphärendruck [Häh12; Ric13]. An den Beamlines ID15A und ID31 der ESRF wurden bei einer Photonenenergie von 70 keV und höherer Flusssdichte dickere Adsorbatschichten aus Lysozym gemessen ($d = 46,3 \text{ \AA}$, $\Gamma = 2,7 \text{ mg/m}^2$). Der Unterschied wird wahrscheinlich bereits zu Beginn der Experimente durch die strahlungsinduzierte Denaturierung der Proteine verursacht. Die so entstandenen Schichten sind gegen weitere Strahlenschäden resistent und haben reproduzierbare Eigenschaften. Die durch die Erhöhung des hydrostatischen Drucks hervorgerufenen Effekte sind für beide Photonenenergien gleich und führt nicht zur Ad- oder Desorption von Proteinen. Das in der Literatur von Koo *et al.* beschriebene Schichtwachstum wird nicht beobachtet [Koo13]. Eine mögliche Ursache ist, dass in dieser Arbeit OTS als Substrat genutzt wird statt wie von Koo *et al.* Polystyrol und die adsorbierten Proteine dadurch in einem anderen Zustand sind.

Durch die Hinzugabe unterschiedlicher Mengen Urea konnte die Dicke der Schicht auf $d \approx 22 \text{ \AA}$ reduziert werden. Die Schichten an der Grenzfläche zwischen OTS und Lösungen mit Urea und Lysozym reagieren auf die Erhöhung des hydrostatischen Drucks anders als die Schichten aus reinem Lysozym. So sind die Schichtdicke d , die adsorbierte Menge Γ und die maximale Belegung Γ_{max} für Schichten aus reinem Lysozym unter steigendem Druck konstant während sie mit Urea in der Lösung verringert werden. Urea verdrängt das Wasser in der Schicht, dadurch nimmt die Dichte der Schicht, im Vergleich zum Volumenwasser, bei steigendem Druck weniger stark zu. Die Bindung von Urea an entfaltete Proteine wurde in der Literatur für Proteine in Lösung bereits beschrieben [Hua08; Son14], nicht aber an Grenzflächen. An der Wasser-Luft-Grenzfläche wurde die Reduktion der Adsorption von RNase durch Urea festgestellt, aber mit einem anderen Mechanismus in Verbindung gebracht [Hüs10]. Die bisher noch nicht beobachtete Verringerung der Dicke der Adsorbatschicht an der fest-flüssig-Grenzfläche kann über die Verwendung hoher hydrostatischer Drücke eindeutig mit der Anlagerung von Urea in der Schicht in Verbindung gebracht werden.

Um das Druckverhalten der Proteine weiter zu untersuchen, sind Simulationen oder weitere Messungen an Adsorbatschichten aus nativen Proteinen notwendig. Aus diesen Untersuchungen kann die druckabhängige Änderung des Wassers in der Proteinschicht bestimmt werden. Erste Messungen dazu konnten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden. Sie zeigen eine Umorientierung der Proteine. Die Ergebnisse werden im Anhang in Kapitel A.3.1 diskutiert. Um die Druckabhängigkeit des in der Schicht enthaltenen Wassers zu bestimmen, müssen Messungen an Adsorbatschichten in wässriger Lösung ohne Proteine durchgeführt werden. Dadurch wird die Belegung konstant gehalten [Kie14b] und die Änderung des in der Schicht enthaltenen Wassers kann auch bei Umorientierung der Moleküle bestimmt werden.

Literaturverzeichnis

- [Als11] J. Als-Nielsen und D. McMorrow. *Elements of Modern X-ray Physics - Second Edition*. Wiley, 2011.
- [Arn12] T. Arnold, C. Nicklin, J. Rawle, J. Sutter, T. Bates, B. Nutter, G. McIntyre und M. Burt. "Implementation of a beam deflection system for studies of liquid interfaces on beamline I07 at Diamond". In: *Journal of Synchrotron Radiation* **19** (2012), 408–416. DOI: 10.1107/S0909049512009272.
- [Aut08] M. Auton, D. W. Bolen und J. Rösigen. "Structural thermodynamics of protein preferential solvation: Osmolyte solvation of proteins, aminoacids, and peptides". In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **73** (4) (2008), 802–813. DOI: 10.1002/prot.22103.
- [Boo02] B. B. Boonyaratanakornkit, C. B. Park und D. S. Clark. "Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins". In: *Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology* **1595** (2002), 235–249. DOI: 10.1016/S0167-4838(01)00347-8.
- [Bra99] C. Branden und J. Tooze, Hrsg. *Introduction to Protein Structure: Second Edition*. Garland Publishing, 1999.
- [Bre08] F. Bresme, E. Chacón, P. Tarazona und K. Tay. "Intrinsic Structure of Hydrophobic Surfaces: The Oil-Water Interface". In: *Physical Review Letters* **101** (2008), 056102. DOI: 10.1103/PhysRevLett.101.056102.
- [Can11] D. R. Canchi und A. E. García. "Backbone and Side-Chain Contributions in Protein Denaturation by Urea". In: *Biophysical Journal* **100** (2011), 1526–1533. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.01.028.
- [Cha04] S. D. Chakarova und A. E. Carlsson. "Model study of protein unfolding by interfaces". In: *Physical Review E* **69** (2004), 021907. DOI: 10.1103/PhysRevE.69.021907.
- [Cha05] D. Chandler. "Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly". In: *Nature* **437** (2005), 640–647. DOI: 10.1038/nature04162.
- [Chu97] T. C. Chung und S. H. Lee. "New hydrophilic polypropylene membranes; fabrication and evaluation". In: *Journal of Applied Polymer Science* **64** (3) (1997), 567–575. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4628(19970418)64:3<567::AID-APP13>3.0.CO;2-V.
- [Con05a] J. M. Conde und J. M. Rodríguez Patino. "Rheological Properties of Hydrolysates of Proteins from Extracted Sunflower Flour Adsorbed at the Air?Water Interface". In: *Industrial and Engineering Chemistry Research* **44** (2005), 7761–7769. DOI: 10.1021/ie0506163.

- [Con05b] J. M. Conde, J. M. Rodríguez Patino und J. M. Trillo. "Structural Characteristics of Hydrolysates of Proteins from Extracted Sunflower Flour at the Air-Water Interface". In: *Biomacromolecules* **6** (2005), 3137–3145. DOI: 10.1021/bm050469s.
- [Dav14] R. David und A. W. Neumann. "Contact Angle Patterns on Low-Energy Surfaces". In: *Advances in Colloid and Interface Science* **206** (2014), 46–56. DOI: 10.1016/j.cis.2013.03.005.
- [DEL16] DELTA. *Beamline 9*. Okt. 2016. URL: http://www.delta.tu-dortmund.de/cms/de/Forschung/Strahllinien/Beamline_9/.
- [Dia16] Diamond. *Beamline I07*. Okt. 2016. URL: <http://www.diamond.ac.uk/Beamlines/Surfaces-and-Interfaces/I07.html>.
- [Doe00] A. K. Doerr, M. Tolan, J.-P. Schlomka und W. Press. "Evidence for density anomalies of liquids at the solid/liquid interface". In: *Europhysics Letters* **52** (2000), 330–336. DOI: 10.1209/epl/i2000-00443-7.
- [Doe98] A. K. Doerr, M. Tolan, T. Seydel und W. Press. "The interface structure of thin liquid hexane films". In: *Physica B: Condensed Matter* **248** (1998), 263–268. DOI: 10.1016/S0921-4526(98)00245-2.
- [ESR16] ESRF. *Beamline ID31*. Okt. 2016. URL: www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/StructMaterials/ID31.
- [Eve08] F. Evers, K. Shokuie, M. Paulus, C. Sternemann, C. Czeslik und M. Tolan. "Exploring the Interfacial Structure of Protein Adsorbates and the Kinetics of Protein Adsorption: An In Situ High-Energy X-ray Reflectivity Study". In: *Langmuir* **24** (18) (2008), 10216–10221. DOI: 10.1021/1a801642s.
- [Far87] Farhataziz und Rodgers. *Radiation Chemistry*. VCH, 1987.
- [Fen04] P. Fenter und N. C. Sturchio. "Mineral-water interfacial structures revealed by synchrotron X-ray scattering". In: *Progress in Surface Science* **77** (2004), 171–258. DOI: 10.1016/j.progsurf.2004.12.001.
- [Fou98] M. Fountoulakis und H.-W. Lahm. "Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins". In: *Journal of Chromatography A* **826** (1998), 109–134. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00721-3.
- [Gek79] K. Gekko und H. Noguchi. "Compressibility of Globular Proteins in Water at 25 C". In: *Journal of Physical Chemistry* **83** (21) (1979), 2706–2714. DOI: 10.1021/j100484a006.
- [Göh15] H. Göhring, M. Paulus, P. Salmen, F. J. Wirkert, T. Kruse, P. Degen, S. Stuhr, H. Rehage und M. Tolan. "Salt induced reduction of lysozyme adsorption at charged interfaces". In: *Journal of Physics: Condensed Matter* **27** (23) (2015), 235103. DOI: 10.1088/0953-8984/27/23/235103.
- [Gol12] K. K. Goli, O. J. Rojas, A. E. Özçam und J. Genzer. "Generation of Functional Coatings on Hydrophobic Surfaces through Deposition of Denatured Proteins Followed by Grafting from Polymerization". In: *Biomacromolecules* **13** (5) (2012), 1371–1382. DOI: 10.1021/bm300075u.
- [Gri96] J. R. Grigera, S. G. Kalko und J. Fischbarg. "Wall-Water Interface. A Molecular Dynamics Study". In: *Langmuir* **12** (1) (1996), 154–158. DOI: 10.1021/1a9408681.

- [Gro94] M. Gross und R. Jaenicke. "The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes". In: *European Journal of Biochemistry* **221** (1994), 617–630. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18774.x.
- [Gut11] P. Gutfreund, M. Wolff, M. Maccarini, S. Gerth, J. F. Ankner, J. Browning, C. E. Halbert, H. Wacklin und H. Zabel. "Depletion at solid/liquid interfaces: Flowing hexadecane on functionalized surfaces". In: *Journal of Chemical Physics* **134** (2011), 64711. DOI: 10.1063/1.3549895.
- [Häh12] H. Hähl, F. Evers, S. Grandthyll, M. Paulus, C. Sternemann, P. Loskill, M. Lessel, A. K. Hüsecken, T. Brenner, M. Tolan und K. Jacobs. "Subsurface Influence on the Structure of Protein Adsorbates as Revealed by in Situ X-ray Reflectivity". In: *Langmuir* **28** (20) (2012), 7747–7756. DOI: 10.1021/1a300850g.
- [Hen49] J. C. Henniker. "The Depth of the Surface Zone of a Liquid". In: *Reviews of Modern Physics* **21** (1949), 322–341. DOI: 10.1103/RevModPhys.21.322.
- [Her98] K. Heremans und L. Smeller. "Protein structure and dynamics at high pressure". In: *Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology* **1386** (1998), 353–370. DOI: 10.1016/S0167-4838(98)00102-2.
- [Heu15] L. Heuchel. "Adsorption von säurehydrolysierten Sojaproteinen an der Wasser-Luft-Grenzfläche". Bachelorarbeit. 2015.
- [Höö98] F. Höök, M. Rodahl, B. Kasemo und P. Brzezinski. "Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: Effect of pH, ionic strength, and ligand binding". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** (21) (1998), 12271–12276. DOI: 10.1073/pnas.95.21.12271.
- [Hor03] T. A. Horbett. *Biopolymers at Interfaces: Biological Activity of Adsorbed Proteins (Kapitel 15)*. Hrsg. von M. Malmsten. 2. Aufl. Bd. 110. Surfactant Science Series. Marcel Dekker, 2003, S. 393–413.
- [Hor94] T. A. Horbett. "The role of adsorbed proteins in animal cell adhesion". In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (1994), 225–240. DOI: 10.1016/0927-7765(94)80037-5.
- [Hua08] L. Hua, R. Zhou, D. Thirumalai und B. J. Berne. "Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (44) (2008), 16928–16933. DOI: 10.1073/pnas.0808427105.
- [Hui97] W. J. Huisman, J. F. Peters, M. J. Zwanenburg, S. A. de Vries, T. E. Derry, D. Abernathy und J. F. van der Veen. "Layering of a liquid metal in contact with a hard wall". In: *Nature* **390** (1997), 379–381. DOI: 10.1038/37069.
- [Hüs10] A. K. Hüsecken, F. Evers, C. Czeslik und M. Tolan. "Effect of Urea and Glycerol on the Adsorption of Ribonuclease A at the Air-Water Interface". In: *Langmuir* **26** (16) (2010), 13429–13435. DOI: 10.1021/1a102222z.
- [Imo15] S. Imoto, H. Forbert und D. Marx. "Water structure and solvation of osmolytes at high hydrostatic pressure: pure water and TMAO solutions at 10 kbar versus 1 bar". In: *Physical Chemistry Chemical Physics* **17** (2015), 24224–24237. DOI: 10.1039/c5cp03069b.

- [Isr11] J. N. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*. 3. Aufl. Academic Press, 2011.
- [Jac02] G. Jackler, R. Steitz und C. Czeslik. "Effect of Temperature on the Adsorption of Lysozyme at the Silica/Water Interface Studied by Optical and Neutron Reflectometry". In: *Langmuir* **18** (17) (2002), 6565–6570. DOI: 10.1021/1a025605i.
- [Jak17] V. Jakobi, P. Salmen, M. Paulus, M. Tolan und A. Rosenhahn. "Compositional fingerprint of soy sauces via hydrophobic surface interaction". In: *Food Chemistry* **218** (2017), 256–260. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.045.
- [Jan06] D. Janssen, R. De Palma, S. Verlaak, P. Heremans und W. Dehaen. "Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide". In: *Thin Solid Films* **515** (4) (2006), 1433–1438. DOI: 10.1016/j.tsf.2006.04.006.
- [Jan07] J. Janecek und R. R. Netz. "Interfacial Water at Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces: Depletion versus Adsorption". In: *Langmuir* **23** (16) (2007), 8417–8429. DOI: 10.1021/1a700561q.
- [Jen03] T. R. Jensen, M. Ø. Jensen, N. Reitzel, K. Balashev, G. H. Peters, K. Kjaer und T. Bjørnholm. "Water in Contact with Extended Hydrophobic Surfaces: Direct Evidence of Weak Dewetting". In: *Physical Review Letters* **90** (2003), 086101. DOI: 10.1103/PhysRevLett.90.086101.
- [Jha09] S. K. Jha und J. B. Udgaonkar. "Direct evidence for a dry molten globule intermediate during unfolding of a small protein". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (30) (2009), 12289–12294. DOI: 10.1073/pnas.0905744106.
- [Kae70] D. H. Kaelble. "Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids". In: *Journal of Adhesion* **2** (1970), 66–81. DOI: 10.1080/0021846708544582.
- [Kag12] G. B. Kaggwa, P. C. Nalam, J. I. Kilpatrick, N. D. Spencer und S. P. Jarvis. "Impact of Hydrophilic/Hydrophobic Surface Chemistry on Hydration Forces in the Absence of Confinement". In: *Langmuir* **28** (16) (2012), 6589–6594. DOI: 10.1021/1a300155c.
- [Kap06] W. D. Kaplan und Y. Kauffmann. "Structural Order in Liquids Induced by Interfaces with Crystals". In: *Annual Review of Materials Research* **36** (2006), 1–48. DOI: 10.1146/annurev.matsci.36.020105.104035.
- [Kap13] W. D. Kaplan, D. Chatain, P. Wynblatt und W. Craig Charter. "A review of wetting versus adsorption, complexions and related phenomena: *the rosetta stone of wetting*". In: *Journals of Materials Science* **48** (2013), 5681–5717. DOI: 10.1007/s10853-013-7462-y.
- [Kas02] B. Kasemo. "Biological surface science". In: *Surface Science* **500** (2002), 656–677. DOI: 10.1016/S0039-6028(01)01809-X.
- [Kie14a] I. Kiesel. "In situ Untersuchung von Proteinen an Grenzflächen mit oberflächensensitiven Röntgenstreuungsmethoden". Dissertation. TU Dortmund, 2014. DOI: 10.17877/DE290R-11750.

- [Kie14b] I. Kiesel, M. Paulus, J. Nase, S. Tiemeyer, C. Sternemann, K. Rüster, F. J. Wirkert, K. Mende, T. Büning und M. Tolan. "Temperature-Driven Adsorption and Desorption of Proteins at Solid-Liquid Interfaces". In: *Langmuir* **30** (8) (2014), 2077–2083. DOI: 10.1021/la404884a.
- [Kik16a] Kikkoman. Nov. 2016. URL: <http://www.kikkoman.de/verbraucher/produkte/natuerlich-gebraute-sojasauce/#0>.
- [Kik16b] Kikkoman. Nov. 2016. URL: <http://www.kikkoman.de/verbraucher/kikkoman-qualitaet/brauprozess/>.
- [Koo13] J. Koo, M. ErIkamp, S. Grobelny, R. Steitz und C. Czeslik. "Pressure-Induced Protein Adsorption at Aqueous-Solid Interfaces". In: *Langmuir* **29** (25) (2013), 8025–8030. DOI: 10.1021/la401296f.
- [Kry08] C. Krywka. "Ein Aufbau für Röntgenkleinwinkelstreuung an Protein-Lösungen an der Synchrotronstrahlungsquelle DELTA". Dissertation. TU Dortmund, 2008. DOI: 10.17877/DE290R-871.
- [Les10] A. M. Lesk. *INTRODUCTION TO PROTEIN SCIENCE: Architecture, Function and Genomics*. Oxford, 2010.
- [Lid03] D. R. Lide, Hrsg. *HANDBOOK of CHEMISTRY and PHYSICS*. 84. Aufl. CRC Press, 2003.
- [Lin94] T.-Y. Lin und S. N. Timasheff. "Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein". In: *Biochemistry* **33** (42) (1994), 12695–12701. DOI: 10.1021/bi00208a021.
- [Lu98] J. R. Lu, T. J. Su, P. N. Thirtle, R. K. Thomas, A. R. Rennie und R. Cubitt. "The Denaturation of Lysozyme Layers Adsorbed at the Hydrophobic Solid/Liquid Surface Studied by Neutron Reflection". In: *Journal of Colloid and Interface Science* **206** (1998), 212–223. DOI: 10.1006/jcis.1998.5680.
- [Lum99] K. Lum, D. Chandler und J. D. Weeks. "Hydrophobicity at Small and Large Length Scales". In: *Journal of Physical Chemistry B* **103** (22) (1999), 4570–4577. DOI: 10.1021/jp984327m.
- [Lüt09] D. Lützekirchen-Hecht, R. Wagner, U. Haake, A. Watenphul und R. Frahm. "The materials science X-ray beamline BL8 at the DELTA storage ring". In: *Journal of Synchrotron Radiation* **16** (2009), 264–272. DOI: 10.1107/S0909049509000508.
- [Mac07] M. Maccarini, R. Steitz, M. Himmelhaus, J. Fick, S. Tatur, M. Wolff, M. Grunze, J. Janecek und R. R. Netz. "Density Depletion at Solid-Liquid Interfaces: a Neutron Reflectivity Study". In: *Langmuir* **23** (2) (2007), 598–608. DOI: 10.1021/la061943y.
- [Mac14] V. G. Machado, R. I. Stock und C. Reichardt. "Pyridinium N-Phenolate Betaine Dyes". In: *Chemical Reviews* **114** (20) (2014), 10429–10475. DOI: 10.1021/cr5001157.
- [Mag97] S. N. Magonov, V. Elings und M.-H. Whangbo. "Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy". In: *Surface Science* **375** (1997), L385–L391. DOI: 10.1016/S0039-6028(96)01591-9.

- [Mam04] S. I. Mamatkulov, P. K. Khabibullaev und R. R. Netz. "Water at Hydrophobic Substrates: Curvature, Pressure and Temperature Effects". In: *Langmuir* **20** (11) (2004), 4756–4763. DOI: 10.1021/1a036036x.
- [Mar07] Y. Maréchal. *The Hydrogen Bond and the Water Molecule*. Elsevier, 2007.
- [Mar09] K. D. Martínez, C. C. Sanchez, J. M. R. Patino und A. M. Pilosof. "Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates". In: *Food Hydrocolloids* **23** (2009), 2149–2157. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2009.03.015.
- [Mee06] F. Meersman, C. M. Dobson und K. Heremans. "Protein unfolding, amyloid fibril formation and configurational energy landscapes under high pressure conditions". In: *Chemical Society Reviews* **35** (2006), 908–917. DOI: 10.1039/b517761h.
- [Mey06] E. E. Meyer, K. J. Rosenberg und J. Israelachvili. "Recent progress in understanding hydrophobic interactions". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** (43) (2006), 15739–15746. DOI: 10.1073/pnas.0606422103.
- [Mez06] M. Mezger, H. Reichert, S. Schröder, J. Okasinski, H. Schröder, H. Dosch, D. Palms, J. Ralston und V. Honkimäki. "High resolution *in situ* x-ray study of the hydrophobic gap at the water-octadecyl-trichlorosilane interface". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** (49) (2006), 18401–18404. DOI: 10.1073/pnas.0608827103.
- [Mez08a] M. Mezger. "X-ray Studies of the Density Depletion at Hydrophobic Water-Solid Interfaces". Dissertation. Max-Planck-Institut für Metallforschung, 2008. DOI: 10.18419/opus-6665.
- [Mez08b] M. Mezger, S. Schöder, H. Reichert, H. Schröder, J. Okasinski, V. Honkimäki, J. Ralston, J. Bilgram, R. Roth und H. Dosch. "Water and ice in contact with octadecyl-trichlorosilane functionalized surfaces: A high resolution x-ray reflectivity study". In: *Journal of Chemical Physics* **128** (24) (2008), 244705. DOI: 10.1063/1.2931574.
- [Mez10] M. Mezger, F. Sedlmeier, D. Horinek, H. Reichert, D. Pontoni und H. Dosch. "On the Origin of the Hydrophobic Water Gap: An X-ray Reflectivity and MD Simulation Study". In: *Journal of the American Chemical Society* **132** (19) (2010), 6735–6741. DOI: 10.1021/ja910624j.
- [Möl14] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erkkamp, M. Paulus, M. Tolan und R. Winter. "Reentrant Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Solutions at Elevated Hydrostatic Pressures". In: *Physical Review Letters* **112** (2014), 028101. DOI: 10.1103/PhysRevLett.112.028101.
- [Mor05] J. L. Moreland, A. Gramada, O. V. Buzko, Q. Zhang und P. E. Bourne. "The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications". In: *BMC Bioinformatics* **6** (2005), 21. DOI: 10.1186/1471-2105-6-21.
- [Mur15] B. Murphy und O. H. Seeck, Hrsg. *X-ray Diffraction: Modern Experimental Techniques*. Pan Stanford Publishing Pte Ltd., 2015.
- [Nak01] K. Nakanishi, T. Sakiyama und K. Imamura. "On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon". In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91** (3) (2001), 233–244. DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80127-4.

- [Nir94] I. Nir, Y. Feldman, A. Aserin und N. Garti. "Surface Properties and Emulsification Behavior of Denatured Soy Proteins". In: *Journal of Food Science* **59** (3) (1994), 606–610. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1994.tb05573.x.
- [NIS16] NIST. *Datenbank*. Dez. 2016. URL: <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid>.
- [Ock08] B. M. Ocko, A. Dhinojwala und J. Daillant. "Comment on „How Water Meets a Hydrophobic Surface“". In: *Physical Review Letters* **101** (2008), 036901. DOI: 10.1103/PhysRevLett.101.036901.
- [Oh05] S. Oh, Y. Kauffmann, C. Scheu, W. Kaplan und M. Rühle. "Ordered Liquid Aluminium at the Interface with Sapphire". In: *Science* **310** (2005), 661–663. DOI: 10.1126/science.1118611.
- [Onc05] S. Onclin, B. J. Ravoo und D. N. Reinhoudt. "Engineering Silicon Oxide Surface Using Self-Assembled Monolayers". In: *Angewandte Chemie, International Edition* **44** (39) (2005), 6282–6304. DOI: 10.1002/anie.200500633.
- [Owe69] D. K. Owens und R. C. Wendt. "Estimation of the surface free energy of polymers". In: *Journal of Applied Polymer Science* **13** (8) (1969), 1741–1747. DOI: 10.1002/app.1969.070130815.
- [Par54] L. G. Parratt. "Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays". In: *Physical Review* **95** (2) (1954), 359–369. DOI: 10.1103/PhysRev.95.359.
- [Pas84] R. M. Pashley und J. N. Israelachvili. "Molecular layering of water in thin films between mica surfaces and its relation to hydration forces". In: *Journal of Colloid and Interface Science* **101** (2) (1984), 511–523. DOI: 10.1016/0021-9797(84)90063-8.
- [Pau08] M. Paulus, D. Lietz, C. Sternemann, K. Shokuie, F. Evers, M. Tolan, C. Czeslik und R. Winter. "An access to buried interfaces: the X-ray reflectivity set-up of BI9 at Delta". In: *Journal of Synchrotron Radiation* **15** (2008), 600–605. DOI: 10.1107/S0909049508026745.
- [Poy06] A. Poynor, L. Hong, I. K. Robinson, S. Granick, Z. Zhang und P. A. Fenter. "How Water Meets a Hydrophobic Surface". In: *Physical Review Letters* **97** (2006), 266101. DOI: 10.1103/PhysRevLett.97.266101.
- [Rab11] M. Rabe, D. Verdes und S. Seeger. "Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces". In: *Advances in Colloid and Interface Science* **162** (1-2) (2011), 87–106. DOI: 10.1016/j.cis.2010.12.007.
- [Raf10] G. Raffaini und F. Ganazzoli. "Protein Adsorption on a Hydrophobic Surface: A Molecular Dynamics Study of Lysozyme on Graphite". In: *Langmuir* **26** (8) (2010), 5679–5689. DOI: 10.1021/1a903769c.
- [Rei03a] C. Reichardt. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. 3. Aufl. WILEY-VCH, 2003.
- [Rei03b] H. Reichert, V. Honkimäki, A. Snigirev, S. Engemann und H. Dosch. "A new X-ray transmission-reflection scheme for the study of deeply buried interfaces using high-energy microbeams". In: *Physica B: Condensed Matter* **336** (2003), 46–55. DOI: 10.1016/S0921-4526(03)00268-0.

- [Ric13] A. G. Richter und I. Kuzmenko. "Using in Situ X-ray Reflectivity to Study Protein Adsorption on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: Benefits and Limitations". In: *Langmuir* **29** (17) (2013), 5167–5180. DOI: 10.1021/la3049532.
- [Roa05] P. Roach, D. Farrar und C. C. Perry. "Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes". In: *Journal of the American Chemical Society* **127** (22) (2005), 8168–8173. DOI: 10.1021/ja042898o.
- [Ros08] P. J. Rossky. "Protein denaturation by urea: Slash and bond". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (44) (2008), 16825–16826. DOI: 10.1073/pnas.0809224105.
- [Roy02] C. A. Royer. "Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding". In: *Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology* **1595** (1-2) (2002), 201–209. DOI: 10.1016/S0167-4838(01)00344-2.
- [Sas99] K. Sasahara, M. Sakurai und K. Nitta. "The Volume and Compressibility Changes of Lysozyme Associated with Guanidinium Chloride and Pressure-assisted Unfolding". In: *Journal of Molecular Biology* **291** (3) (1999), 693–701. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2982.
- [Sch11] M. A. Schroer, J. Markgraf, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Möller, M. Paulus, M. Tolan und R. Winter. "Nonlinear Pressure Dependence of the Interaction Potential of Dense Protein Solutions". In: *Physical Review Letters* **106** (2011), 178102. DOI: 10.1103/PhysRevLett.106.178102.
- [Sch17] R. Scholz. "Diffusivity of water encapsulated in fat particles through structured 3-d surfaces solid fat/liquid water". Dissertation in Vorbereitung. 2017.
- [Son14] I. Son, Y. L. Shek, A. Tikhomirova, E. H. Baltasar und T. V. Chalikian. "Interactions of Urea with Native and Unfolded Proteins: A Volumetric Study". In: *Journal of Physical Chemistry B* **118** (47) (2014), 13554–13563. DOI: 10.1021/jp509356k.
- [Sop00] A. K. Soper und M. A. Ricci. "Structure of High-Density and Low-Density Water". In: *Physical Review Letters* **84** (2000), 2881–2884. DOI: 10.1103/PhysRevLett.84.2881.
- [Ste03] R. Steitz, T. Gutberlet, T. Hauss, B. Klösgen, R. Krastev, S. Schemmel, A. C. Simonsen und G. H. Findenegg. "Nanobubbles and Their Precursor Layer at the Interface of Water Against a Hydrophobic Substrate". In: *Langmuir* **19** (6) (2003), 2409–2418. DOI: 10.1021/la026731p.
- [Ste14] H.-G. Steinrück, A. Schiener, T. Schindler, J. Will, A. Magerl, O. Konovalov, G. L. Destri, O. H. Seek, M. Mezger, J. Haddad, M. Deutsch, A. Checco und B. M. Ocko. "Nanoscale Structure of Si/SiO₂/Organics Interfaces". In: *ACS Nano* **8** (12) (2014), 12676–12681. DOI: 10.1021/nn5056223.
- [Ste15] H. G. Steinrück, J. Will, A. Magerl und B. M. Ocko. "Structure of n-Alkyltrichlorosilane Monolayers on Si(100)/SiO₂". In: *Langmuir* **31** (43) (2015), 11774–11780. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b03091.
- [Stö07] H. Stöcker, Hrsg. *Taschenbuch der Physik*. Verlag Harri Deutsch, 2007.

- [Tid90] I. Tidswell, B. M. Ocko, P. Pershan, S. R. Wassermann, G. M. Whitesides und J. D. Axe. "X-ray specular reflection studies of silicon coated by organic monolayers (alkylsiloxanes)". In: *Physical Review B* **41** (2) (1990), 1111–1128. DOI: 10.1103/PhysRevB.41.1111.
- [Tim03] S. N. Timasheff und G. Xie. "Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation". In: *Biophysical Chemistry* **105** (2-3) (2003), 421–448. DOI: 10.1016/S0301-4622(03)00106-6.
- [Tim04] N. Timneanu, C. Caleman, J. Hajdu und D. van der Spoel. "Auger electron cascades in water and ice". In: *Chemical Physics* **299** (2004), 277–283. DOI: 10.1016/j.chemphys.2003.10.011.
- [Tol99] M. Tolan. *X-Ray Scattering from Soft-Matter Thin Films*. Materials Science and Basic Research 148. Springer Tracts in Modern Physics, 1999. DOI: 10.1007/BFb0112834.
- [Tsa02] W.-B. Tsai, J. M. Grunkemeier, C. D. McFarland und T. A. Horbett. "Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin or von Willebrand's factor". In: *Journal of Biomedical Materials Research* **60** (3) (2002), 348–359. DOI: 10.1002/jbm.10048.
- [Uys13] A. Uysal, M. Chu, B. Stripe, A. Timalina, S. Chattopadhyay, C. Schlepütz, T. J. Marks und P. Dutta. "What x rays can tell us about the interfacial profile of water near hydrophobic surfaces". In: *Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics* **88** (2013), 035431. DOI: 10.1103/PhysRevB.88.035431.
- [Vit03] L. Vitos, P. A. Korzhavyi und B. Johansson. "Stainless steel optimization from quantum mechanical calculations". In: *Nature Materials* **2** (2003), 25–28. DOI: 10.1038/nmat790.
- [Voi10] K. Voitchovsky, J. J. Kuna, S. A. Contera, E. Tosatti und F. Stellacci. "Direct Mapping of the solid-liquid adhesion energy with subnanometre resolution". In: *nature nanotechnology* **5** (2010), 401–405. DOI: 10.1038/NNANO.2010.67.
- [Voi15] B. Voigländer. *Scanning Probe Microscopy - Atom Force Microscopy and Scanning Tunneling Microscopy*. Springer, 2015. DOI: 10.1007/978-3-662-45240-0.
- [Vro62] L. Vroman. "Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids". In: *Nature* **196** (1962), 467–477. DOI: 10.1038/196476a0.
- [Wan03] Y. Wang und M. Lieberman. "Growth of Ultrasooth Octadecyltrichlorosilane Self-Assembled Monolayers on SiO₂". In: *Langmuir* **19** (4) (2003), 1159–1167. DOI: 10.1021/1a020697x.
- [Wan06] X. Wang, J. Pan, J. Wu und Z. Liu. "Surface Tension of Dimethoxymethane and Methyl *tert*-Butyl Ether". In: *Journal of Chemical and Engineering Data* **51** (4) (2006), 1394–1397. DOI: 10.1021/je060097q.
- [Wan11] C. Wang, R. Feng und F. Yang. "Enhancing the hydrophilic and antifouling properties of polypropylene nonwoven fabric membranes by the grafting of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) via the ATRP method". In: *Journal of Colloid and Interface Science* **357** (2) (2011), 273–279. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.01.094.

- [Wei09] T. Wei, S. Kaewtathip und K. Shing. "Buffer Effect on Protein Adsorption at Liquid/Solid Interface". In: *Journal of Physical Chemistry C* **113** (6) (2009), 2053–2062. DOI: 10.1021/jp806586n.
- [Wei14] Q. Wei, T. Becherer, S. Angioletti-Uberti, J. Dzubiella, C. Wischke, A. T. Neffe, A. Lendlein, M. Ballauff und R. Haag. "Wechselwirkungen von Proteinen mit Polymerbeschichtungen und Biomaterialien". In: *Angewandte Chemie* **126** (31) (2014), 8138–1869. DOI: 10.1002/ange.201400546.
- [Wik16a] Wikipedia. Dez. 2016. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:3D_model_hydrogen_bonds_in_water.svg.
- [Wik16b] Wikipedia. Dez. 2016. URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Octadecyltrichlorosilane-3D-sf.png>.
- [Wik16c] Wikipedia. Dez. 2016. URL: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Overview_proteinogenic_amino_acids-DE.svg&oldid=76418276.
- [Wik16d] Wikipedia. Dez. 2016. URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Reichardt-Farbstoff#/media/File:Reichardt%E2%80%99s_dye_200.svg.
- [Wil96] Wille, K. *Physik der Teilchenbeschleuniger und Synchrotronstrahlungsquellen*. Teubner, 1996.
- [Wir14] F. J. Wirkert, M. Paulus, J. Nase, J. Möller, S. Kujawski, C. Sternemann und M. Tolan. "X-ray reflectivity measurements of liquid/solid interfaces under high hydrostatic pressure conditions". In: *Journal of Synchrotron Radiation* **21** (2014), 76–81. DOI: 10.1107/S1600577513021516.
- [Wir15] F. J. Wirkert. "Die hydrophobe fest-flüssig-Grenzfläche unter hohem hydrostatischen Druck". Dissertation. TU Dortmund, 2015. DOI: 10.17877/DE290R-16354.
- [Xu09] D. Xu und Y. Zhang. "Generating Triangulated Macromolecular Surfaces by Euclidean Distance Transform". In: *PLoS one* **4** (12) (2009), e8140. DOI: 10.1371/journal.pone.0008140.
- [Yan05] P. H. Yancey. "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses". In: *Journal of Experimental Biology* **208** (2005), 2819–2830. DOI: 10.1242/jeb.01730.
- [Yan09] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki und H. Yamada. "Driving Force Behind Adsorption-Induced Protein Unfolding: A Time-Resolved X-ray Reflectivity Study on Lysozyme Adsorbed at an Air/Water Interface". In: *Langmuir* **25** (1) (2009), 32–35. DOI: 10.1021/la803235x.
- [Yaw08] C. L. Yaws, Hrsg. *Thermophysical properties of chemicals and hydrocarbons*. Bd. 2. William Andrew Publishing, 2008.
- [Yu01a] C.-J. Yu, G. Evmenenko, A. Richter, A. Datta, J. Kmetko und P. Dutta. "Order in molecular liquids near solid liquid interaces". In: *Applied Surface Science* **182** (3-4) (2001), 231–235. DOI: 10.1016/S0169-4332(01)00410-X.
- [Yu01b] C.-J. Yu, A. G. Richter, J. Kmetko, S. W. Dugan, A. Datta und P. Dutta. "Structure of interfacial liquids: X-ray scattering studies". In: *Physical Review E* **63** (2001), 021205. DOI: 10.1103/PhysRevE.63.021205.

- [Zae12] F. Zaera. "Probing Liquid/Solid Interfaces at the Molecular Level". In: *Chemical Reviews* **112** (5) (2012), 2920–2986. DOI: 10.1021/cr2002068.
- [Zan09] R. Zangi, T. Zhou und B. J. Berne. "Urea's Action on Hydrophobic Interaction". In: *Journal of the American Chemical Society* **131** (4) (2009), 1535–1541. DOI: 10.1021/ja807887g.
- [Zho11] R. Zhou, J. Li, L. Hua, Z. Yang und B. J. Berne. "Comment on „Urea-Mediated Protein Denaturation: A Consensus View"". In: *Journal of Physical Chemistry B* **115** (5) (2011), 1323–1326. DOI: 10.1021/jp105160a.

Anhang A

Zusätzliche Messwerte und Elektronendichteprofile

A.1 Ergebnisse der Dichtemessungen

p [bar]	1 Mol	1 Mol	4 Mol	4 Mol	8 Mol	8 Mol
50	1,012	1,012	1,058	1,058	1,117	1,117
250	1,024	1,024	1,070	1,071	1,127	1,127
500	1,035	1,035	1,080	1,082	1,137	1,138
750	1,045	1,044	1,089	1,091	1,145	1,147
1000	1,054	1,053	1,097	1,100	1,154	1,157
1250	1,063	1,062	1,106	1,109	1,162	1,167
1500	1,072	1,071	1,113	1,117	1,169	1,175
1750	1,080	1,079	1,121	1,125	1,177	1,183
2000	1,088	1,086	1,128	1,132	1,184	1,191
2250	1,095	1,094	1,135	1,140	1,191	1,198
2500	1,102	1,101	1,142	1,146	1,197	1,205
2750	1,109	1,108	1,149	1,154	1,204	1,212
3000	1,115	1,114	1,155	1,160	1,210	1,219
3250	1,122	1,121	1,161	1,166	1,215	1,226
3500	1,128	1,127	1,167	1,172	1,221	1,232
3750	1,133	1,132	1,173	1,178	1,227	1,238
4000	1,139	1,138	1,178	1,184	1,232	1,245
4250	1,144	1,144	1,183	1,189	1,237	1,251
4500	1,149	1,149	1,256	1,197	1,242	1,256
4750	1,155	1,154	1,262	1,203	1,247	1,262
5000	1,159	1,159	1,268	1,209	1,252	1,268

Tabelle A.1: Gemessene Dichten für wässrige Lösungen mit Urea, die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die verwendete Ureakonzentration. Für die Auswertung wurden jeweils die Werte mit der höheren Dichte bei 5000 bar genutzt.

Chloroform	TBME	Anteil Chloroform	ρ_D [g/cm ³]	ρ [e ⁻ /Å ³]
4	0	1,00	1,50	0,433
4	1	0,80	1,35	0,397
4	2	0,67	1,25	0,373
4	3	0,57	1,17	0,355
5	4	0,56	1,16	0,352
4	4	0,50	1,12	0,342
4	5	0,44	1,08	0,332
3	4	0,43	1,07	0,329
2	4	0,33	1,00	0,312
1	4	0,20	0,90	0,288
0	4	0,00	0,75	0,252
Trichlorobenzol	<i>p</i> -Xylol	Anteil Trichlorobenzol	ρ_D [g/cm ³]	ρ [e ⁻ /Å ³]
4	0	1,00	1,45	0,436
4	1	0,80	1,34	0,406
4	2	0,67	1,26	0,385
4	3	0,57	1,20	0,371
5	4	0,56	1,19	0,368
4	4	0,50	1,16	0,360
4	5	0,44	1,13	0,351
3	4	0,43	1,12	0,349
2	4	0,33	1,06	0,334
1	4	0,20	0,98	0,314
0	4	0,00	0,86	0,283

Tabelle A.2: Dichte ρ_D und Elektronendichte ρ der verwendeten Lösungsmittelgemische. Die Dichte der Gemische wurde mit dem Dichteschwinger der Physikalischen Chemie II bestimmt. Der Zusammenhang zwischen Mischungsverhältnis und Dichte ist hier linear. Daher wurde zur Fehlerminimierung die gemessenen Dichte durch eine Gerade $f(x) = mx + b$ angepasst, die Werte sind hier angegeben.

A.2 Messungen zur Adsorption von Inhaltsstoffen der Sojasauce an OTS

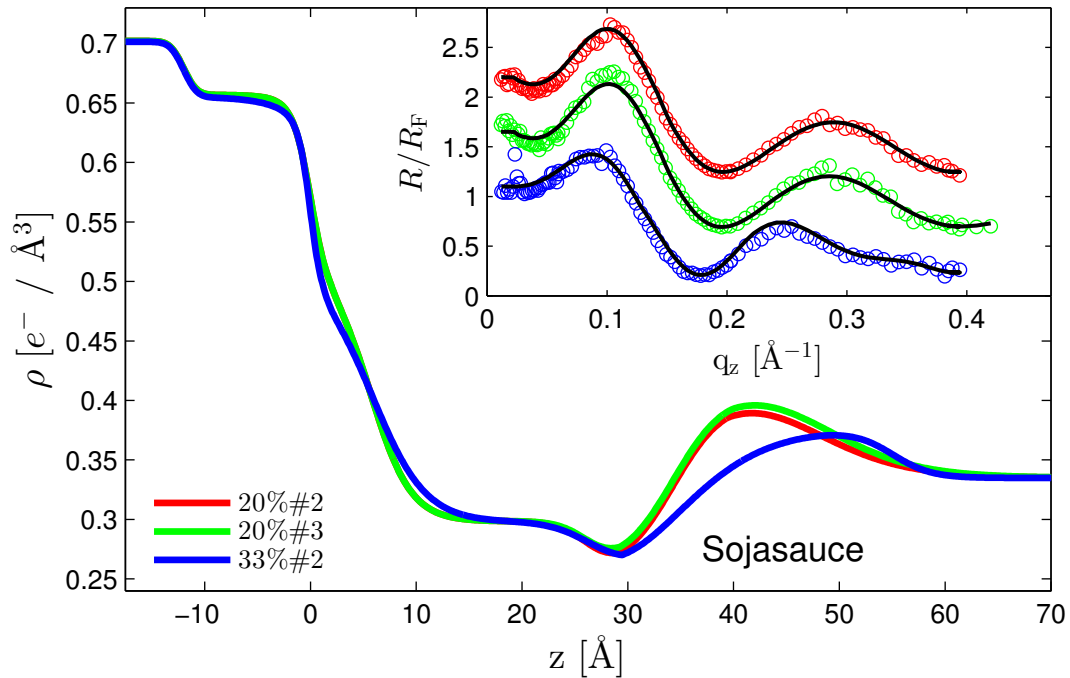


Abbildung A.1: Elektronendichteprofile für weitere Messungen an wässrigen Lösungen mit Sojasauce in Phosphatpuffer. Der Einschub zeigt die Messungen und die aus den Elektronendichteprofilen berechneten Anpassungen. Sie wurden entlang der y -Achse verschoben.

A.3 Lysozym an Grenzflächen unter Druck

A.3.1 Lysozym auf Siliziumdioxid

Um die Druckabhängigkeit des in den Lysozimschichten enthaltenen Wassers zu untersuchen, können Messungen an nativem Lysozym auf Siliziumdioxid durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste Untersuchungen hierzu durchgeführt werden, die Elektronendichteprofile sind in Abbildung A.2 und A.3 dargestellt.

Da bei den Messungen keine Referenz an der Siliziumdioxid-Wasser-Grenzfläche ohne Protein in Lösung gemessen wurde, ist die genaue Struktur des Substrates unbekannt und muss aus den Messungen mit Lysozimschicht bestimmt werden. Die Anzahl der fehlenden Elektronen pro Silizium-Einheitszelle liegt mit 4,7 in der gleichen Größenordnung wie die der anderen in dieser Arbeit untersuchten Proben.

Die Messung bei 50 bar (rot) in Abbildung A.2 zeigt eine etwa 30 Å dicke Schicht aus Lysozym auf der Oberfläche. Diese Schichtdicke entspricht ungefähr den Ausmaßen nativen Lysozyms. Zwischen den Proteinen und der Siliziumdioxidoberfläche befindet sich, wegen der elliptischen Form der nativen Proteine, Wasser. In den Elektronendichteprofilen entsteht dadurch ein Bereich niedriger Elektronendichte welcher zeigt, dass die Proteine ihre native Form erhalten. Auf Grund dieses Minimums wird die Schichtdicke des Proteins bei diesem System nicht vom Substrat bis $1,03 \cdot \rho_{\text{Flüssigkeit}} \approx 0,34 \text{ e}^-/\text{Å}^3$ gemessen, sondern vom Minimum aus.

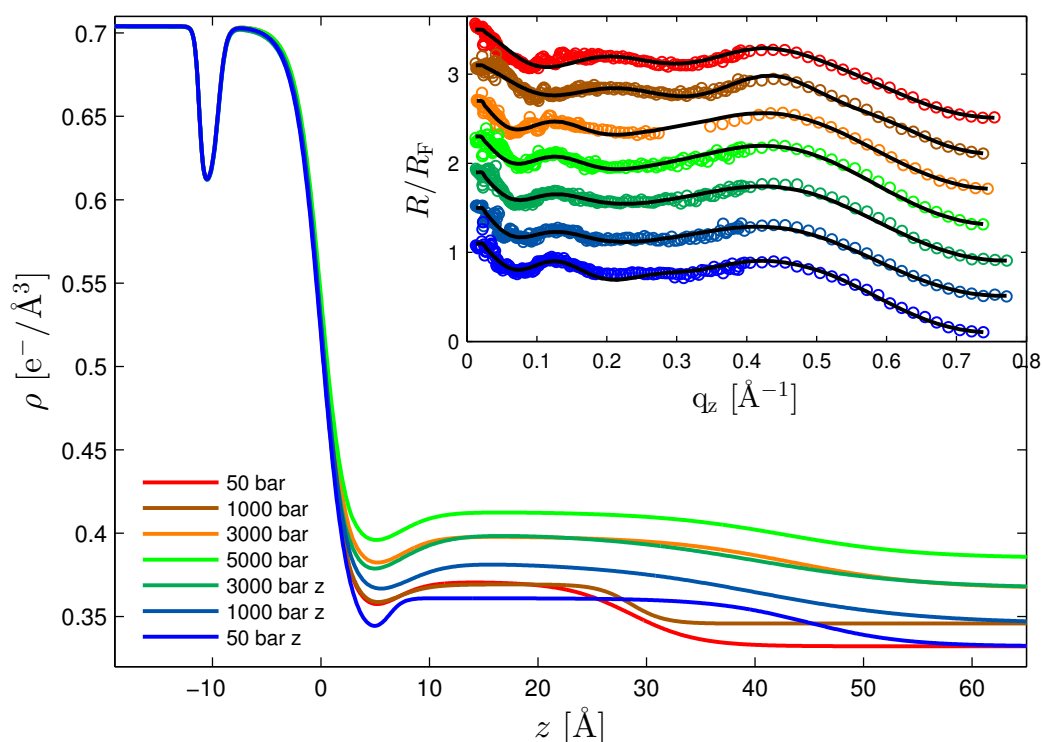


Abbildung A.2: Elektronendichteprofile von Lysozym auf Siliziumdioxid, der Einschub zeigt die Messwerte und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y -Achse verschoben. Die bei der Absenkung des Drucks gemessenen Werte sind durch „z“ in der Legende gekennzeichnet. Die Messungen wurden an der Beamline ID15A durchgeführt.

Die Messung bei 1000 bar (braun, Abbildung A.2) zeigt die gleiche Schichtdicke und Elektronendichte. Die Rauigkeit an der Grenzfläche zwischen Wasser und Protein nimmt ab. Steigt der Druck auf 3000 bar (orange), ändert sich die Form der Lysozymschicht. Die Schichtdicke wächst um 20 \AA und auch die Rauigkeit der Schicht zum Substrat und zum Wasser steigt. Diese Form bleibt bei der Erhöhung des Drucks auf 5000 bar (hellgrün) und auch beim Absenken des Drucks erhalten.

Die Änderung der Schichtdicke um 20 \AA entspricht einer Umorientierung der adsorbierten Lysozym-Moleküle. Natives Lysozym hat, bei Annahme einer elliptischen Form, zwei kurze Achsen von 30 \AA und eine lange Achse von 45 \AA . Eine solche Umorientierung auf Grund der Änderung der Umgebungsvariablen wurde in der Literatur beispielsweise für die Änderung des pH-Werts beschrieben [Göh15]. Mit der Umorientierung geht auch eine Änderung der Belegung der Oberfläche einher, daher kann aus den vorliegenden Messungen nicht die Druckabhängigkeit des in der Schicht enthaltenen Wassers bestimmt werden. Um andere Effekte wie Strahlenschäden ausschließen zu können, sind aber weitere Messungen bei geringeren Photonenenergien und Flussdichten notwendig, diese konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

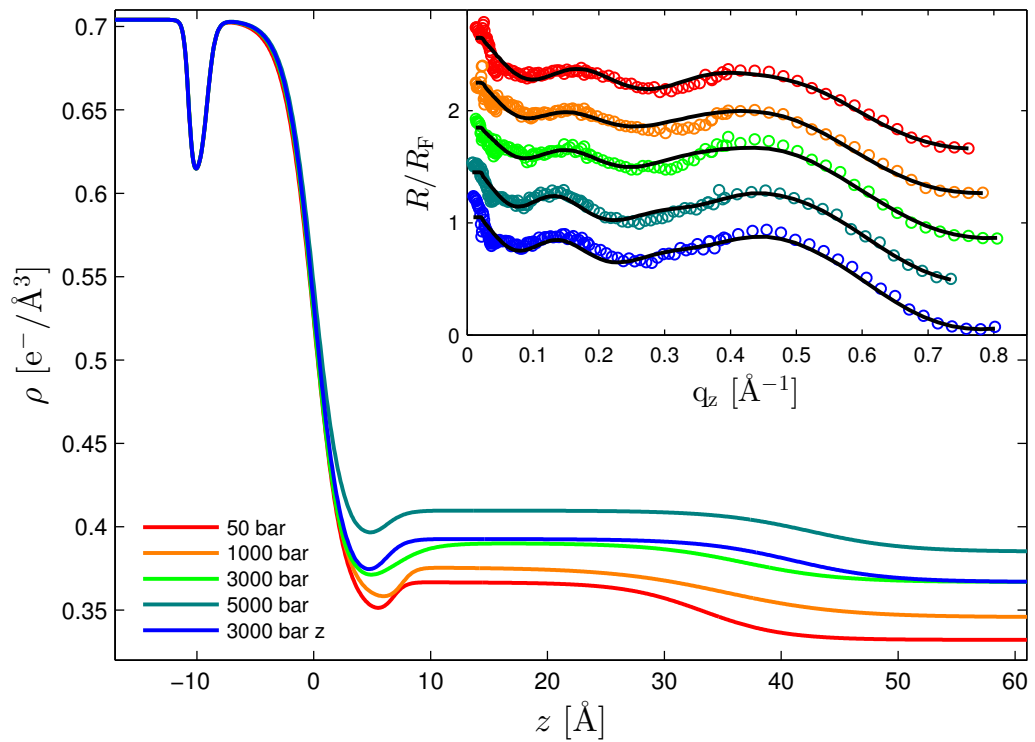


Abbildung A.3: Elektronendichteprofile von Lysozym auf Siliziumdioxid, der Einschub zeigt die Messwerte und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y -Achse verschoben. Die bei der Absenkung des Drucks gemessenen Werte sind durch „z“ in der Legende gekennzeichnet. Die Messungen wurden an der Beamline ID15A durchgeführt.

A.3.2 Lysozym und Lysozym-Urea-Mischungen auf OTS

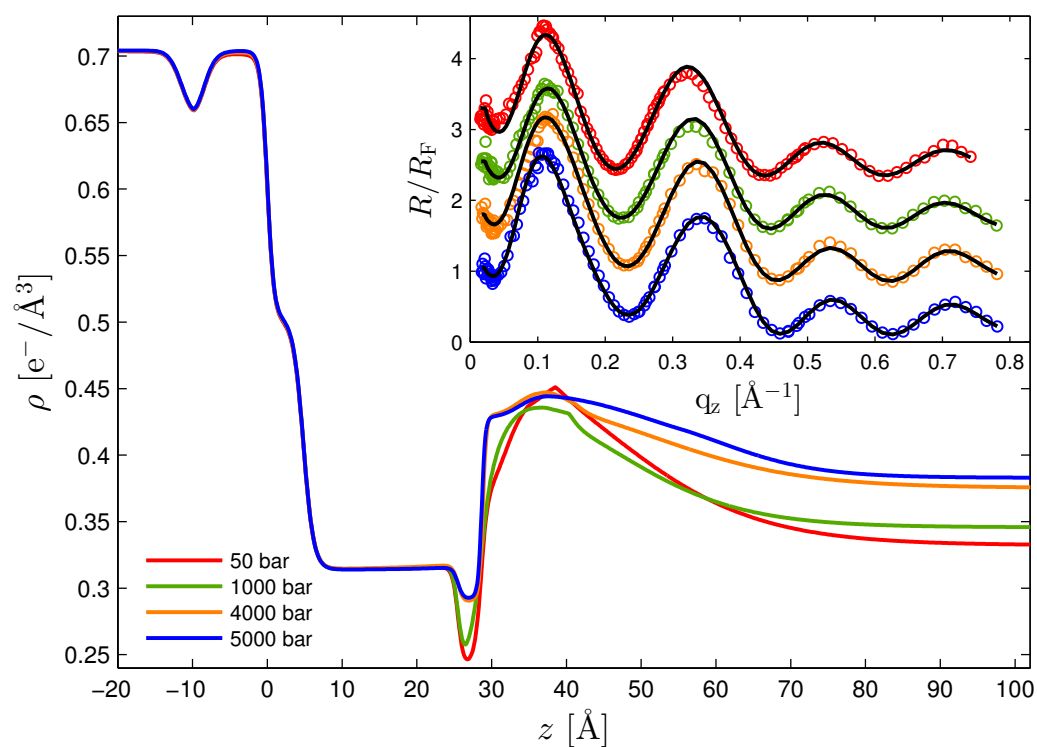


Abbildung A.4: Elektronendichteprofile einer Lysozym-Lösung in Kontakt mit OTS, der Einschub zeigt die Messwerte und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y -Achse verschoben. Die bei der Absenkung des Drucks gemessenen Werte sind durch „z“ in der Legende gekennzeichnet. Die Messung wurde an der Beamline ID31 durchgeführt.

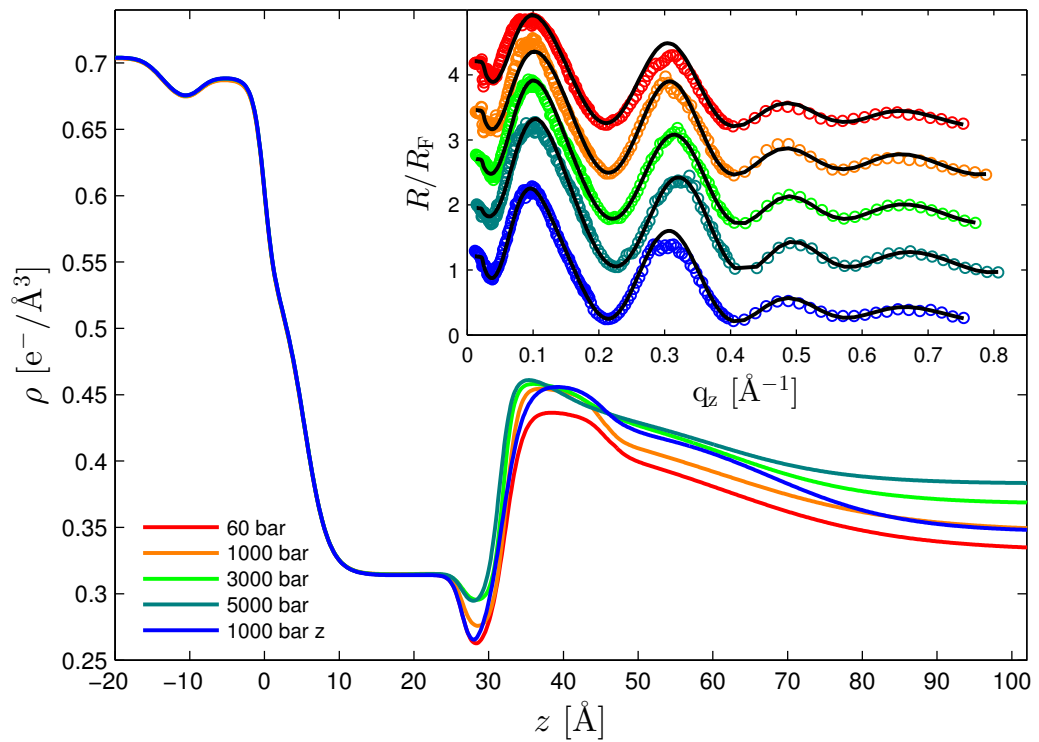


Abbildung A.5: Elektronendichteprofile einer Lysozym-Lösung in Kontakt mit OTS, der Einschub zeigt die Messwerte und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y-Achse verschoben. Die bei der Absenkung des Drucks gemessenen Werte sind durch „z“ in der Legende gekennzeichnet. Die Messung wurde an der Beamline ID15A durchgeführt.

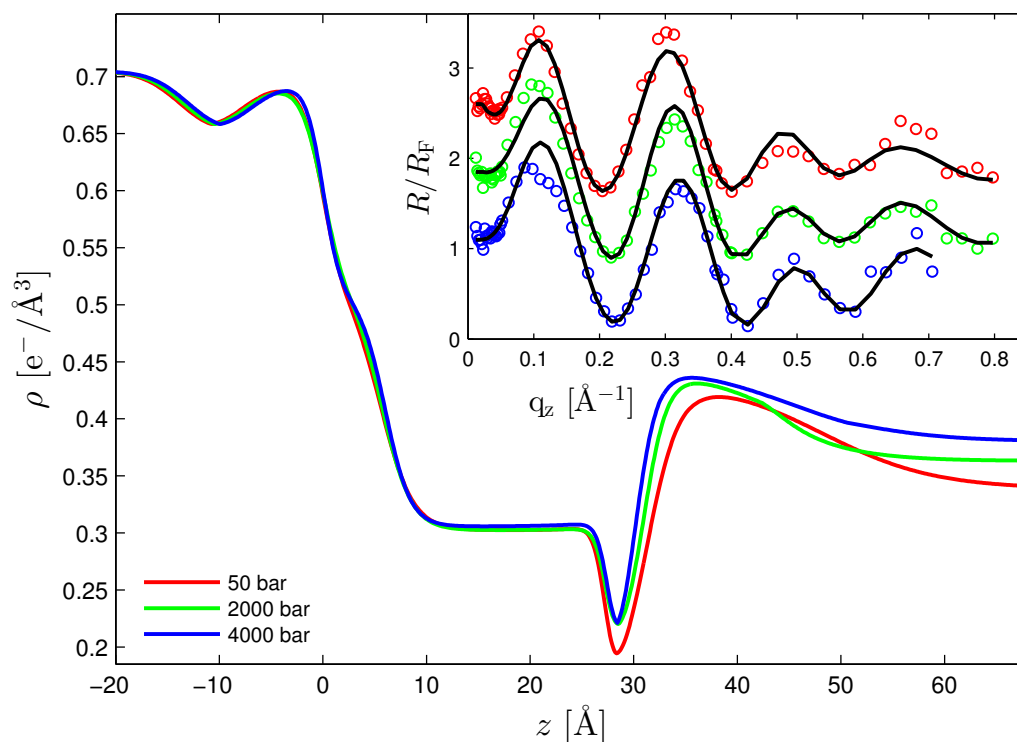


Abbildung A.6: Elektronendichteprofile einer Lösung mit Lysozym und 1 M Urea in Kontakt mit OTS, der Einschub zeigt die Messwerte und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y -Achse verschoben. Die Datenaufnahme erfolgte an der Beamline MS04 der Swiss Light Source mit einer Photonenenergie von 25 keV im Rahmen der Dissertation von F. Wirkert [Wir15].

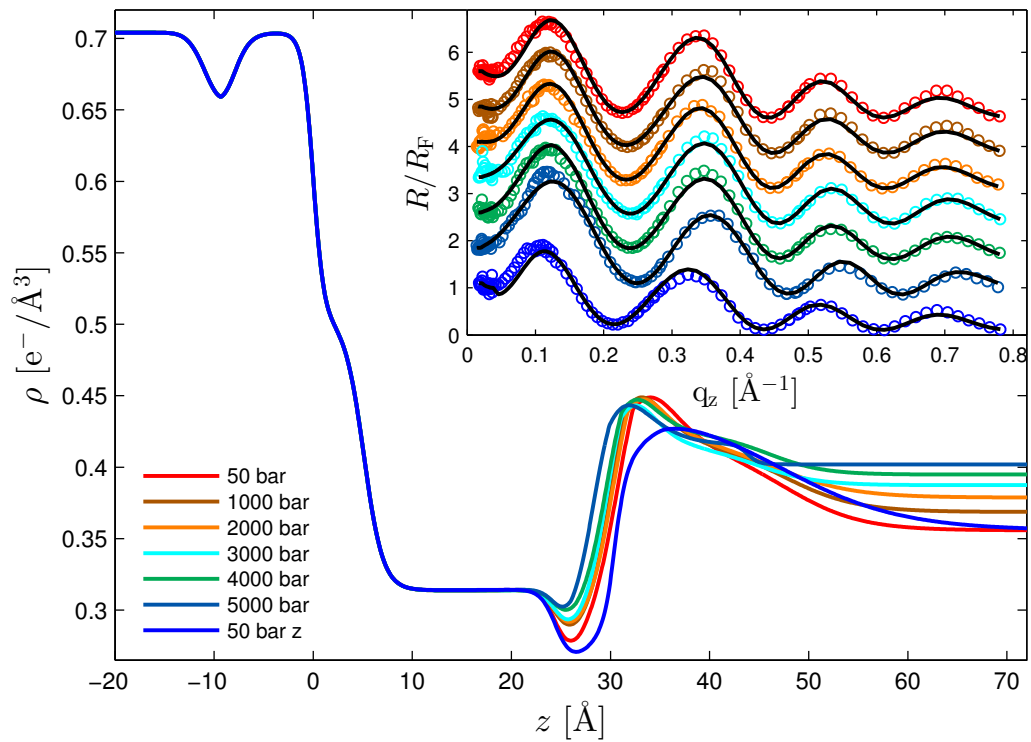
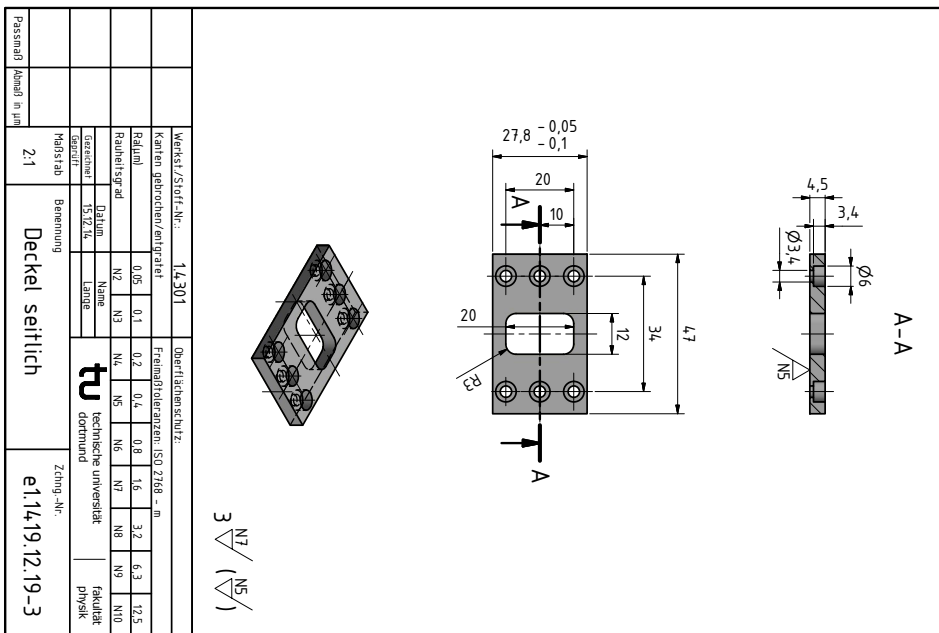
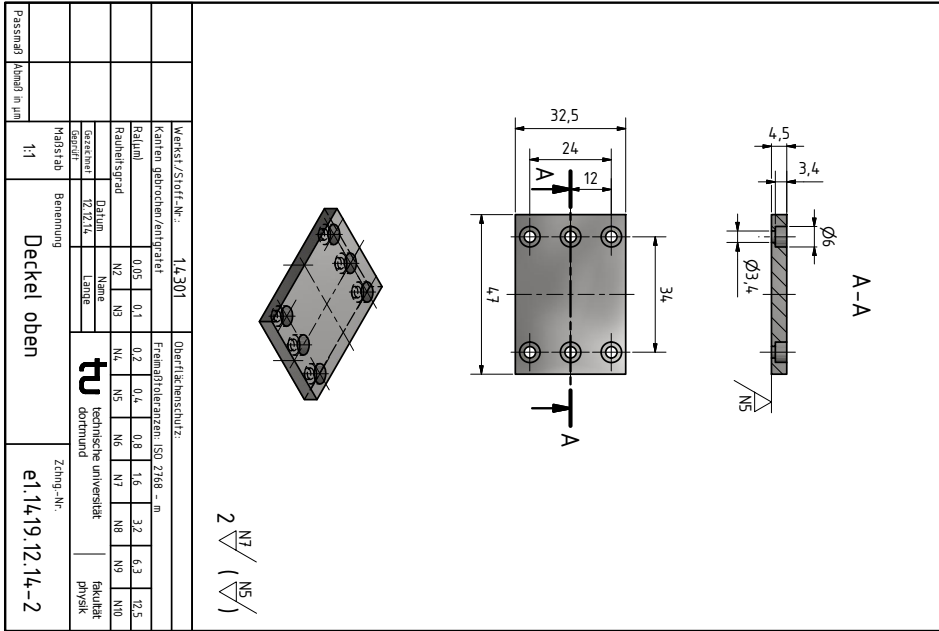
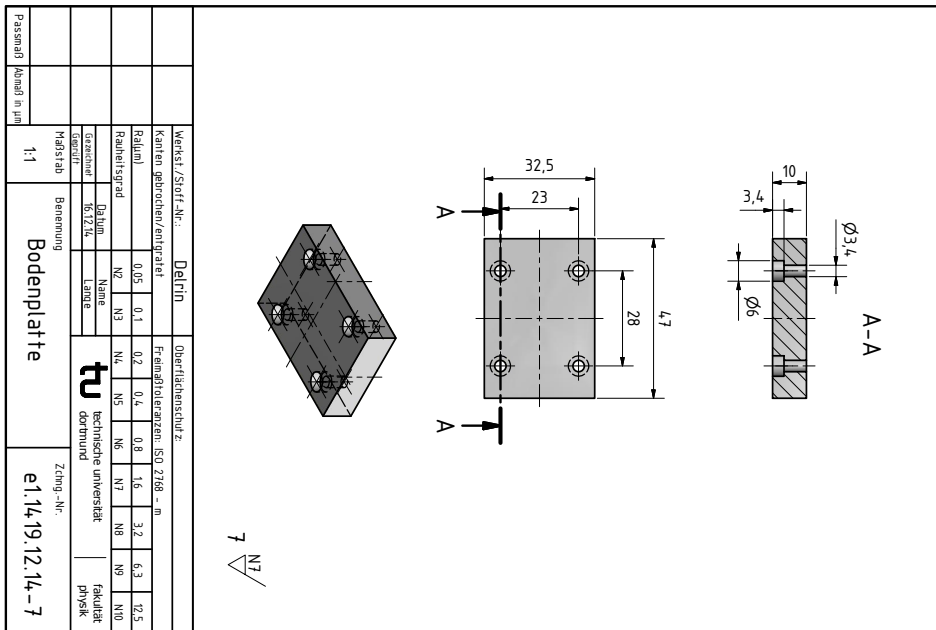
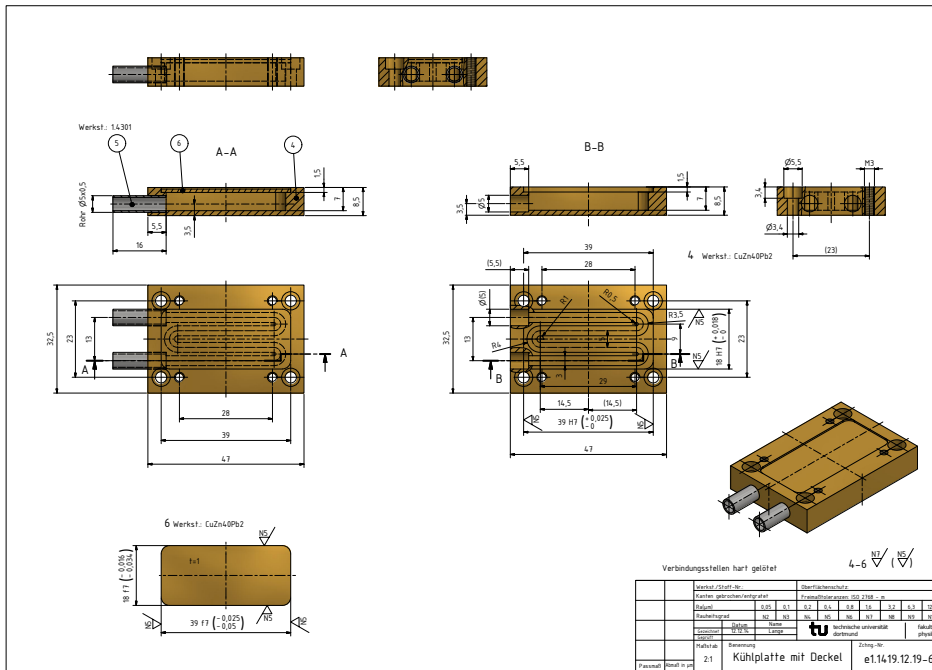


Abbildung A.7: Elektronendichteprofile einer Lösung mit Lysozym und 5 M Urea in Kontakt mit OTS, der Einschub zeigt die Messwerte und die angepassten Intensitätsverläufe, sie wurden entlang der y-Achse verschoben. Die bei der Absenkung des Drucks gemessenen Werte sind durch „z“ in der Legende gekennzeichnet. Die Messungen wurden an der Beamline ID31 durchgeführt.





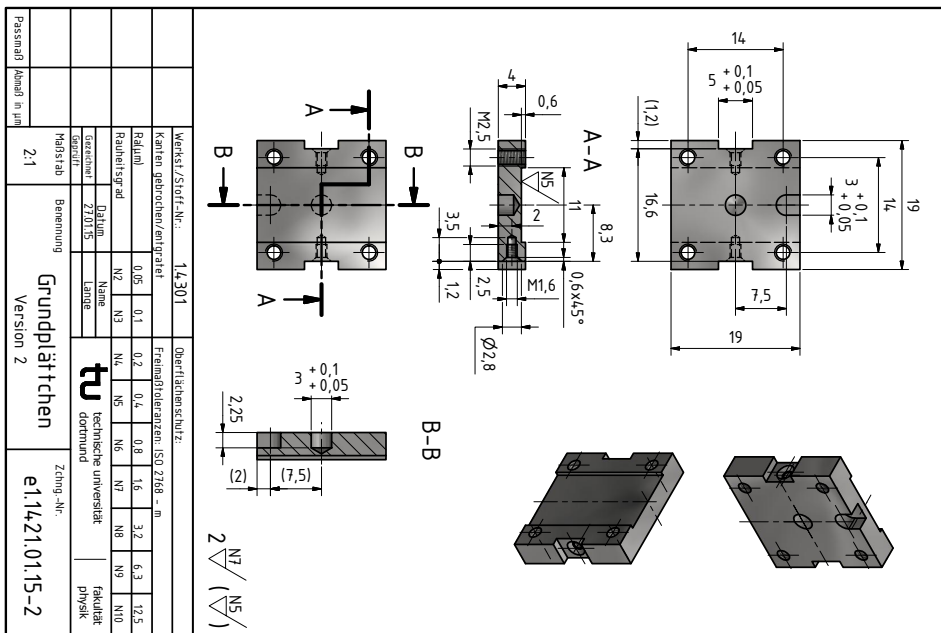
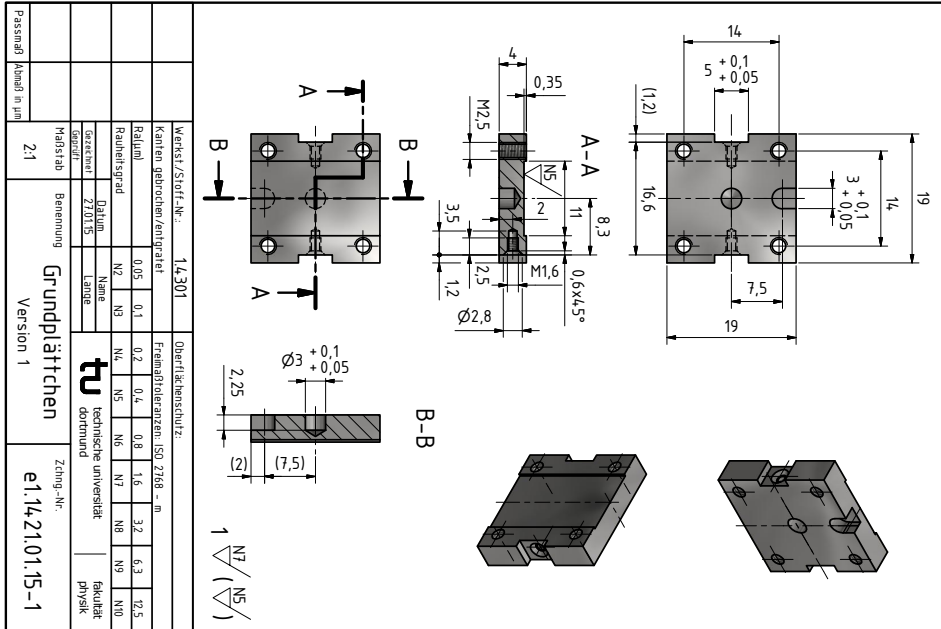
8 $\sqrt{R7}$

Passmaß	Maßstab	Benennung	Zehng.-Nr.
h6/n9	2:1	Probenhalter	e1.14.19.12.14-8
Werkst./Stoff-Nr.: Kanten geraden/entgratet Rauheit Rauheitsgrad Datum Name Lage		Oberflächenschutz: Fremdstoffeigenschaften ISO 2768 - m N2 0.1 N3 0.2 N4 0.4 N5 0.8 N6 1.6 N7 3.2 N8 6.3 N9 12.5 N10	
Gezeichnet 08.12.14		tu technische universität dortmund Fakultät physik	

Version 1

Version 2

Werkst./Stoff-Nr.	Oberflächenschutz:		
Kanten geraden/entgratet	Fremdstoffeigenschaften ISO 2768 - m		
Rauheit	0.05 0.1 0.2 0.4 0.8 1.6 3.2 6.3 12.5		
Rauheitsgrad	N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9 N10		
Gezeichnet	Datum Name		
08.12.14	08.12.14		
tu technische universität dortmund Fakultät physik			
Passmaß	Maßstab	Benennung	Zehng.-Nr.
h6/n9	2:1	Innenzelle Waverhalter	e1.14.21.01.15



Abbildungsverzeichnis

2.1	Streugeometrie bei XRR-Experimenten	6
2.2	Beispiele für Reflektivitätsmessung und daraus berechnete Elektronendichteprofile	7
2.3	Durch H-Bindungen gebundene Wassermoleküle und Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Wassermoleküle unter Druck	9
2.4	Ordnung einer Flüssigkeit an der Grenzfläche	11
2.5	Fotos von Wasser und Diiodmethan auf OTS zur Bestimmung des Kontaktwinkels	12
2.6	Schematische Darstellung eines OTS-Moleküls	13
2.7	Elektronendichteprofil einer OTS-Probe in Wasser und verschiedene Möglichkeiten, die Verarmungsschicht auf OTS-Oberflächen zu erklären	14
2.8	Chemische Struktur der Aminosäuren	16
2.9	Darstellungen der gefalteten Aminosäurekette des Proteins Lysozym	17
2.10	Chemische Struktur von Urea	18
2.11	Adsorbiertes Lysozym auf Graphen	19
3.1	Verschiedene Darstellungen der Hochdruckzelle	22
3.2	Konstruktionszeichnung und Fotos der XRR-Zelle	23
3.3	Die für die Arbeit verwendeten Messzellen, aufgebaut an der Beamline ID31 der ESRF	24
4.1	XRR-Messung einer OTS-Probe in Luft	27
4.2	AFM-Aufnahmen von Siliziumdioxid sowie einer homogenen und einer inhomogenen OTS-Oberfläche	28
4.3	Vergleich der Modelle für die Silizium-Siliziumdioxid-Grenzfläche nach Tidesswell und Steinrück	31
4.4	Bestimmung der Dichte wässriger Urea-Lösungen unter Druck	33
5.1	Struktur des Farbstoffs Betain 30	38
5.2	Schematische Darstellung der genutzten Lösungsmittel	39
5.3	Elektronendichteprofile verschiedener Lösungsmittel und Wasser auf OTS	42
5.4	Chloroform und TBME in Kontakt mit OTS #1	45
5.5	Chloroform und TBME in Kontakt mit OTS #2	46
5.6	Trichlorobenzol und <i>p</i> -Xylol in Kontakt mit OTS #1	47
5.7	Trichlorobenzol und <i>p</i> -Xylol in Kontakt mit OTS #2	48
5.8	<i>p</i> -Xylol gemischt mit unterschiedlichen Mengen Trichlorobenzol in Kontakt mit OTS an der Diamond Light Source	49

5.9	Analyse der durch Röntgenstrahlung verursachten Schäden an der OTS-Lösungsmittel-Grenzfläche	51
5.10	Unterschied zwischen idealem und experimentellem Elektronendichteprofile der OTS-Chloroform-Grenzfläche	53
5.11	χ^2 in Abhängigkeit der Elektronendichte der Lösungsmittel	54
5.12	Vergleich χ^2 gegen E_T^N , γ und r_{Gy}	55
6.1	Beispiel zur Analyse einer Proteinschicht auf OTS	59
6.2	Mirkoskopieaufnahme einer Fettkapsel	61
6.3	Wässrigen Lösungen mit Sojasauce in Kontakt mit OTS	64
6.4	Säurehydrolysiertes Sojaprotein an der OTS-Wasser-Grenzfläche	64
6.5	Säurehydrolysiertes Sojaprotein an der Wasser-Luft-Grenzfläche	65
6.6	Wässrige Lösungen mit Sojasauce und säurehydrolysiertem Sojaprotein an der Siliziumdioxid-Wasser-Grenzfläche	66
6.7	AFM-Messungen an OTS mit Schichten aus Inhaltsstoffen der Sojasauce und säurehydrolysiertem Sojaprotein	67
6.8	Vergleich zwischen <i>ex situ</i> XRR-Messungen an Schichten aus Inhaltsstoffen der Sojasauce und säurehydrolysiertem Sojaprotein auf OTS	69
6.9	Zur Berechnung der Oberflächenenergien der Proben genutzte Werte	70
6.10	Vergleich von Γ_{int} und d für Schichten aus Inhaltsstoffen der Sojasauce und säurehydrolysiertem Sojaprotein an verschiedenen Grenzflächen	71
6.11	Lysozym auf OTS unter Druck an der Beamline BI9	74
6.12	Lysozym auf OTS unter Druck an der Beamline ID15A	76
6.13	Lysozym-Lösung mit 1 M Urea in Kontakt mit OTS unter Druck an der Beamline ID31	77
6.14	Wiederholte Messungen an Lysozymadsorbaten auf OTS bei 50 bar	78
6.15	Lysozym auf OTS unter Druck mit erhöhter Strahlenbelastung an der Beamline ID15A	79
6.16	Vergleich von Γ_{Max} , d und Γ für Lysozym und Lysozym-Urea-Mischungen auf OTS	81
A.1	Zusätzliche Messungen an wässrigen Lösungen mit Sojasauce in Kontakt mit OTS	103
A.2	Lysozym auf SiO_2 unter Druck #1	104
A.3	Lysozym auf SiO_2 unter Druck #2	105
A.4	Lysozym auf OTS unter Druck an der Beamline ID31	106
A.5	Lysozym auf OTS unter Druck an der Beamline ID15A #2	107
A.6	Lysozymlösung mit 1 M Urea in Kontakt mit OTS unter Druck an der Beamline MS04	108
A.7	Lysozymlösung mit 5 M Urea in Kontakt mit OTS unter Druck an der Beamline ID31	109
8.1	Eine Schicht aus Bienenwachs auf Siliziumdioxid	124

Tabellenverzeichnis

2.1	Kontaktwinkel und Oberflächenenergie γ für OTS und Siliziumdioxid	13
3.1	Eigenschaften der genutzten Beamlines	24
5.1	Eigenschaften der Lösungsmittel	39
6.1	Aus der Literatur bekannte Werte für Proteinadsorbate auf OTS	60
6.2	Zusammensetzung des säurehydrolysierten Sojaproteins	62
6.3	Kontaktwinkel θ und Oberflächenenergie γ der Proben mit Schichten aus Inhaltsstoffen der Sojasauce und säurehydrolysiertem Sojaprotein	69
6.4	Anpassungsparameter zur Untersuchung der Druckabhängigkeit der Adsor- batschichten aus Lysozym und Urea	80
A.1	Aus Röntgenadsorptionsmessungen bestimmte Dichten wässriger Urealösungen	101
A.2	Gemessene Dichte der Lösungsmittelgemische	102

Kapitel 8

Danksagung

Eine Dissertation entsteht vermutlich nie ohne Hilfe und Unterstützung. Bei allen, die einen Anteil am Gelingen der Arbeit hatten, möchte ich mich bedanken.

Der erste Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Metin Tolan für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl E1a anfertigen zu können. Herrn Prof. Dr. Matthias Schneider danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Bei Frau Dr. Julia Nase und Herrn Dr. Michael Paulus möchte ich mich herzlichst für die Diskussionen mit hilfreichen Ideen und Ratschlägen, die vielen ermunternden Worte im Verlauf der Promotionszeit und die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Messzeiten bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Patrick Degen, der stets ein offenes Ohr für die Fragen eines unwissenden Physikers hatte und mir bei der Auswahl und Einschätzung diverser Lösungsmittel geholfen hat. Auch die Diskussionen über Sojasauce und deren Inhaltsstoffe waren sehr hilfreich. Bei Prof. Dr. Heinz Hövel bedanke ich mich für Hilfestellungen bei den AFM-Messungen. Bei Elena Zwar bedanke ich mich für die Diskussionen während der ESRF-Messzeit, die zur Auswahl einiger zusätzlicher Lösungsmittel führten. Bei diverser Kontaktwinkel- und Dichtemessungen haben mir Simon Egger, Dr. Patrick Degen und Elena Zwar vom Lehrstuhl Physikalische Chemie II geholfen. Für die Hilfe bei den druckabhängigen Dichtemessungen bedanke ich mich bei Susanne Richter.

Dann will ich mich bei Samuel dafür bedanken, dass er (fast) klaglos einen Teil seiner Bienenwachskerze zur Herstellung dünner Schichten geopfert hat. Das Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit leider nicht berücksichtigt werden und ist daher zur Entschädigung in Abbildung 8.1 dargestellt.

Bei der Mechanischen Werkstatt und dem Konstruktionsbüro der Fakultät bedanke ich mich für die schnelle Umsetzung der Idee zum Bau der neuen Flüssigkeitszelle. Den Mitarbeitern der Mechanischen Werkstatt gilt noch ein besonderer Dank für den Bau der zweiten Hochdruckzelle, der sie bei weitem mehr Nerven gekostet hat als mich. Herr Schemionek und Frau Pike aus dem Präparationslabor der Fakultät Physik haben die Siliziumwafer passend gesägt und konnten außerdem bei Chemikalienengpässen aushelfen.

Bei meinen Büronachbarn, Julian Schulze, Dominik Wolter und Dr. Christoph Schröder¹ bedanke ich mich für die hervorragende Atmosphäre und auch dafür, dass diverse Flüche während der Nutzung von LSfit (meistens) klaglos ertragen haben.

Messzeiten kann man nie alleine erledigen, daher muss ich mich besonders bei den vielen Helfern bedanken: Dr. Steffen Bieder, Dr. Patrick Degen, Susanne Dogan, Simon Egger, Mirko Elbers, Yury Forov, Holger Göhring, Dr. Julia Nase, Benedikt Nowak, Dr. Michael

¹nicht offiziell, aber auch dazuzuzählen: Steffi Roese

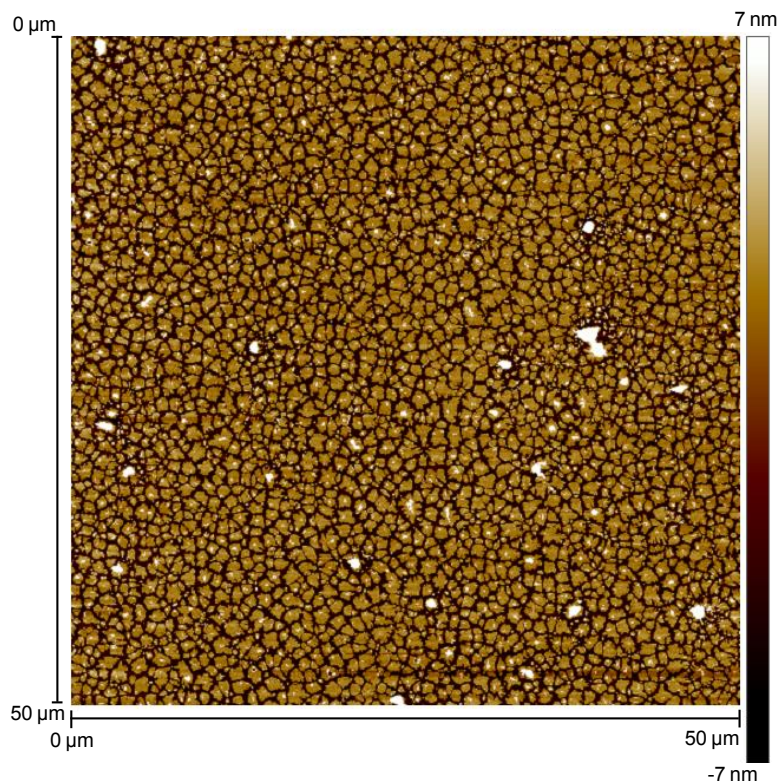


Abbildung 8.1: Eine durch Spin Coating erzeugte Schicht aus Bienenwachs auf Siliziumdioxid, die Schichtdicke beträgt ungefähr 7,5 nm. Das Bienenwachs wurde zuvor in Chloroform gelöst.

Paulus, Steffi Roese, Göran Surmeier, Dr. Florian Wieland, Dr. Florian Wirkert, Dr. Thomas Zander und Elena Zwar.

Dann möchte ich mich beim ganzen Lehrstuhl E1a für die hervorragende Arbeitsatmosphäre bedanken, insbesondere bei Julian Schulze, Steffi Roese, Dominik Wolter, Dr. Christoph Schröder, Holger Göhring, Dr. Thomas Büning, Susanne Dogan, Dr. Steffen Bieder, Göran Surmeier, Dr. Julia Nase, Dr. Michael Paulus, Dr. Christian Sternemann und bei allen anderen natürlich auch.

Für die Korrekturen an der vorliegen Arbeit bedanke ich mich bei Steffi Bank, Dr. Julia Nase, Dr. Michael Paulus und Steffi Roese.

Bei meinen Eltern und Schwiegereltern möchte ich mich für die Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus bedanken, auch für das regelmäßige Kindersitten während des Studiums und der Messzeiten.

Zu guter Letzt Danke ich Steffi, Samuel und Jakob die mich zu Hause und in diversen Urlauben auf andere Gedanken gebracht haben und mich immer Unterstützt haben, auch wenn „Papa mal wieder nicht da ist“.