

# Das Phasenverhalten kolloidaler Systeme unter Druck

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Julian Schulze**

im Juni 2017



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Röntgenkleinwinkelstreuung</b>	<b>5</b>
2.1	Grundlegende Streugeometrie . . . . .	6
2.2	Streuung an einem Elektron . . . . .	6
2.3	Streuung an einem Objekt . . . . .	8
2.4	Streuung an vielen Objekten . . . . .	9
2.5	Kontrast und Transmission . . . . .	13
2.6	Der Formfaktor . . . . .	14
2.7	Asymptotisches Verhalten . . . . .	16
2.8	Der Strukturfaktor . . . . .	17
2.8.1	Ornstein-Zernike-Gleichung . . . . .	17
2.8.2	Kolloidale Interaktionspotenziale . . . . .	19
2.8.3	Entwicklung des Strukturfaktors in der Nähe von Phasengrenzen . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Probensysteme und deren Phasenverhalten</b>	<b>23</b>
3.1	Aufbau von Proteinen . . . . .	25
3.2	Auswirkung von hydrostatischen Drücken auf Proteine . . . . .	26
3.3	Phasenentmischung in Kolloidlösungen . . . . .	29
3.4	Wechselwirkung von Kolloiden in Lösung . . . . .	30
3.5	Beschreibung von Kolloiden als reale Gase . . . . .	32
3.6	Siliziumdioxid-Nanopartikel . . . . .	34
3.7	Polymerlösungen . . . . .	35
3.8	Das Phasenverhalten von Kolloid-Polymer-Lösungen . . . . .	38
3.9	Die Struktur der Nanopartikel in der hochkonzentrierten Phase . . . . .	41
<b>4</b>	<b>Aufbau und Durchführung</b>	<b>47</b>
4.1	Messplätze . . . . .	47

4.1.1	Strahllinie ID02 an der ESRF . . . . .	48
4.1.2	Strahllinie I22 an der DLS . . . . .	49
4.1.3	Strahllinie P03 am DESY . . . . .	50
4.2	Aufbau der Hochdruckexperimente . . . . .	51
4.3	Aufbau der Trübungsmessungen . . . . .	52
4.4	Probenherstellung . . . . .	53
4.5	Durchführung und Auswertung . . . . .	56
<b>5</b>	<b>Das Phasendiagramm von Lysozym</b>	<b>59</b>
5.1	Bestimmung der druckabhängigen Phasengrenze mit Röntgenkleinwinkelstreuung	60
5.2	Bestimmung der druckabhängigen Phasengrenze mit Trübungsmessungen . . .	65
5.3	Vergleich und Zusammenführung der SAXS- und TM-Phasengrenzen . . . . .	67
<b>6</b>	<b>Das Phasenverhalten von Nanopartikel-Polymer-Lösungen</b>	<b>71</b>
6.1	Vorbereitende Messungen . . . . .	72
6.2	Stabilität des Nanopartikel-Polymer-Systems . . . . .	77
6.3	Geringe Polymerkonzentration . . . . .	79
6.4	Hohe Polymerkonzentration . . . . .	82
6.5	Mittlere Polymerkonzentration . . . . .	93
6.6	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	94
6.7	Einordnung in die aktuelle Forschung . . . . .	96
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>101</b>
	<b>Literatur</b>	<b>105</b>
	<b>Anhang</b>	<b>117</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>121</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Der Einfluss grundlegender thermodynamischer Größen wie Druck und Temperatur auf in Wasser gelöste Makromoleküle ist für das Verständnis vieler Prozesse des täglichen Lebens relevant. Im Zentrum dieser Arbeit steht das Verständnis des Phasenverhaltens von kolloidalen Systemen. Von besonderem Interesse ist die Untersuchung hochkonzentrierter Proteinlösungen in biologisch relevanten Konzentrationsbereichen. Da Proteine als Katalysatoren und Transportvehikel in organischen Zellen wichtige Funktionen erfüllen, ist das grundlegende Verständnis von Proteinen und Proteinlösungen für viele Bereiche wichtig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lysozymlösungen untersucht. Lysozym kommt in der Natur beispielsweise in der menschlichen Tränenflüssigkeit oder in Hühnereiweiß vor und ist insbesondere Teil des menschlichen Immunsystems. Lysozym wurde bereits vielfach untersucht. Auf Grund seiner Eigenschaften ist es ideal geeignet für druck- und temperaturabhängige Untersuchungen. Beide Parameter können zu Konformationsänderungen oder Aggregation von Proteinen und Phasenübergängen in Proteinlösungen führen, Phänomene, die auch bei Krankheiten beobachtet werden oder mit ihnen in Verbindung stehen. Ein tieferes Verständnis der Ursachen von derartigen Prozessen ist also von großem Interesse. Neben der Temperatur, die ein häufig genutzter Parameter ist, um die thermodynamischen Zustände des Systems zu beeinflussen, wurde in dieser Arbeit der Fokus auf den hydrostatischen Druck gelegt. Hydrostatischer Druck beeinflusst sowohl das untersuchte Molekül selbst als auch das Lösungsmedium Wasser, sowie die Wechselwirkung der beiden. Dies ist einerseits mit Blick auf die Natur interessant: in der Natur existieren Lebensformen auch unter extremen Bedingungen wie beispielsweise im Marianengraben bei hydrostatischen Drücken von bis zu dem 1000-fachem Umgebungsdruck. Erkenntnisse über den Einfluss von Druck auf weiche Materie, insbesondere auf Proteine, können helfen, die biochemischen Prozesse besser zu verstehen, mit denen die Lebewesen sich an die extremen Bedingungen der Tiefsee anpassen konnten. Ein weiterer Vorteil der Variation des Druckes ist, dass durch hydrostatische Drücke verursachte

Änderungen in biologischen Systemen häufiger reversibel sind als die durch Temperaturänderung verursachten.

In Bezug auf Temperatur, Druck und Proteinkonzentration wurden die experimentellen Bedingungen so gewählt, dass sich die Lösungen in der Nähe der flüssig-flüssig-phasenseparierten Phase befanden. In dieser Phase koexistieren zwei Phasen unterschiedlicher Konzentration. Für derartige Bedingungen kann häufig nach Minuten, Stunden oder auch Tagen die Ausbildung von Proteinkristallen beobachtet werden. Proteinkristalle sind für die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen von herausragender Bedeutung. Verständnis und Kontrolle der Umgebungsbedingungen bei ihrer Herstellung tragen zu einer Verbesserung der Qualität bei. Ein Ziel dieser Arbeit ist die Erkundung des Phasenraumes für einen sehr großen Bereich unterschiedlicher Konzentrationen, Drücke und Temperaturen.

Das zweite im Rahmen dieser Arbeit untersuchte System besteht aus Nanopartikeln und Polymeren in wässriger Lösung. Dieses sehr einfache Probensystem wurde gewählt, um ein tieferes Verständnis grundlegender Wechselwirkungen von Materie in Lösung zu erlangen. Die Nanopartikel weisen eine Oberflächenladung auf und stoßen sich somit in Lösung üblicherweise gegenseitig ab. Werden einer Nanopartikellösung kleine, nicht adsorbierende Polymere zugegeben, so kann man beobachten, dass die Nanopartikel beginnen, sich gegenseitig anzuziehen. Eine weitere Zugabe von Polymeren kann dazu führen, dass sich die Nanopartikel und Polymere räumlich auftrennen. Die effektive Anziehung von großen Molekülen in der Gegenwart kleinerer ist ein gut verstandener fundamentaler Teil der Wechselwirkung von Systemen, deren Bestandteile unterschiedlich groß sind. Der Effekt kann in biologischen Systemen beobachtet werden und wird auch industriell genutzt. Überraschenderweise kann die Separation in einzelne Bestandteile durch eine weitere Zugabe von Polymeren wieder aufgehoben werden. Dies ist ein weit weniger beobachteter und verstandener Aspekt und wurde in den letzten Jahren vielfach diskutiert. Insbesondere die Variation von Polymerkonzentration in Kombination mit der Variation hydrostatischer Drücke kann zu einem qualitativen Verständnis des Phasenverhaltens beitragen.

Hauptsächlich wurde in dieser Arbeit Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. small-angle X-ray scattering, SAXS) benutzt, um Informationen über die gelösten Moleküle zu erhalten. Diese Technik gibt Zugang zu Probensystemen, deren Größe im Nanometer-Bereich liegt. Hierzu müssen die untersuchten Objekte keinerlei langreichweitige Ordnung besitzen. Mit Hilfe von Modellen, die sich der statistischen Mechanik bedienen, wurde aus den Streuexperimenten Rückschlüsse auf typische Abstände und Wechselwirkungen der Moleküle gezogen. Durch SAXS-Messungen können also quantitative Informationen über das Probensystem gewonnen werden. Ergänzend wurden in dieser Arbeit Trübungsmessungen durchgeführt, die Aufschluss darüber geben, ob die Probe ein klares Erscheinungsbild aufweist oder eingetrübt ist und somit phasensepariert vorliegt. Während die Phasenübergänge in SAXS-Experimenten stets indirekt

---

beobachtet werden, beispielsweise über eine Betrachtung der Wechselwirkung der untersuchten Partikel, sind Phasenübergänge durch Trübungsmessungen direkt zugänglich. Der Nachteil der Trübungsmessungen liegt darin, dass mit dieser Methode keine Informationen auf molekularer Ebene gewonnen werden können, die für eine Interpretation erforderlich sind.

Die Arbeit ist wie folgt gegliedert:

- Im zweiten Kapitel wird Röntgenkleinwinkelstreuung sowie der Zusammenhang zwischen dem Streusignal und dem Probensystem erläutert.
- Im dritten Kapitel werden die Probensysteme vorgestellt. Außerdem wird erläutert, was unter dem Phasenverhalten der Systeme zu verstehen ist und wie Phasenübergänge erklärt werden können.
- Im vierten Kapitel wird der Aufbau der Messplätze erklärt und die Durchführung der Experimente beschrieben.
- Im fünften Kapitel werden die Untersuchungen des Phasenverhaltens von Lysozymlösungen in Abhängigkeit vom hydrostatischen Druck, der Temperatur und der Proteinkonzentration vorgestellt.
- Im sechsten Kapitel wird das Phasenverhalten von Nanopartikel-Polymerlösungen für verschiedene Polymerkonzentrationen in Abhängigkeit vom hydrostatischen Druck präsentiert.
- Im siebten Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst und ein Ausblick gegeben.





## Kapitel 2

# Röntgenkleinwinkelstreuung

Seit der Entdeckung der Röntgenstrahlen 1895 wurden zahlreiche Nobelpreise im Bereich der Physik und Medizin für Leistungen verliehen, die im Zusammenhang mit der Strukturanalyse der Materie durch Röntgenstrahlen stehen; als Beispiel sei hier der Nobelpreis für Medizin im Jahr 1962 an Francis Crick, James Watson und Maurice Wilkins genannt, der auch für die Deutung der Röntgenbeugungsexperimente an DNA vergeben wurde.

Seit den 70er Jahren werden Speicherringe, in denen geladene Teilchen zirkulieren, als Quelle von Synchrotronstrahlung für Röntgenbeugungsexperimente genutzt. Diese liefern deutlich intensivere und auch brillantere Röntgenstrahlung als die zuvor genutzten Röntgenröhren, in denen durch Hochspannung beschleunigte Elektronen auf eine Anode treffen, die dann Röntgenstrahlung emittiert. Diese Verbesserung in der Erzeugung ermöglichte insbesondere, dass die Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. small-angle X-ray scattering, SAXS) zu einer weit verbreiteten Technik in der Untersuchung von kolloidalen Systemen der Größe im Bereich 1-100 nm wurde. Mit USAXS (ultra-small angle X-ray scattering) lassen sich deutlich größere, mit WAXS (wide-angle X-ray scattering) kleinere Strukturen auflösen. Über die Wahl des Streuwinkels, bei SAXS Experimenten typischerweise weniger als  $5^\circ$ , lassen sich Probensysteme verschiedener Größenordnungen betrachten. Die zu untersuchenden Systeme, zum Beispiel Proteine oder Nanopartikel, müssen hierbei nicht kristallin vorliegen, sondern können sich in Lösung befinden, sodass sie keinerlei langreichweitige Ordnung oder bevorzugte Ausrichtung besitzen. Durch SAXS-Experimente können sowohl Informationen über die Gestalt der Partikel, zum Beispiel in Hinblick auf die Form und Größe, als auch über die Wechselwirkung zwischen den Teilchen gewonnen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Protein Lysozym sowie Siliziumdioxid-Nanopartikel und Polyethylenglycol (PEG) in wässriger Lösung untersucht. Diese haben eine Größe im Nanometer-Bereich, sodass SAXS-Experimente genutzt werden konnten, um Informationen über das System zu gewinnen.

In den folgenden Kapiteln wird der elastische Streuprozess erläutert. Die Ausführungen orientieren sich strukturell an [Möl14a] sowie an [Lin02b; Spa02; Sch11a; Fei87; Gla82].

## 2.1 Grundlegende Streugeometrie

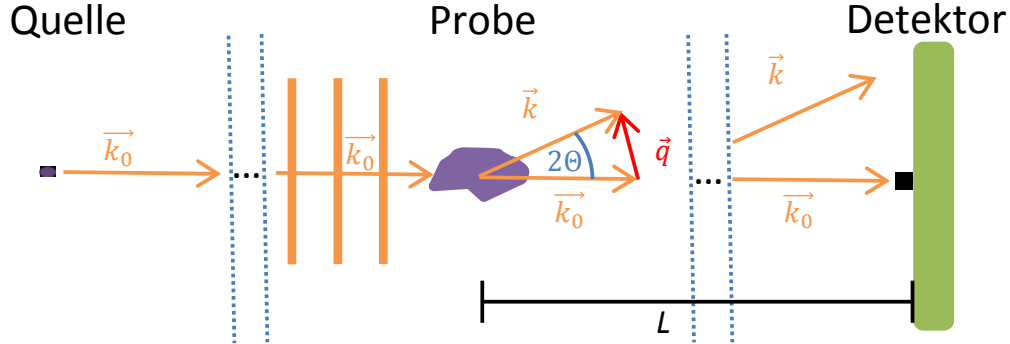
Die Streugeometrie in einem Röntgenbeugungsexperiment ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Ein monochromatischer Röntgenstrahl mit dem Wellenvektor  $\vec{k}_0$  trifft auf das zu untersuchende Probensystem und wird dort teilweise gebeugt. Am Detektor wird dann die Intensität der gebeugten Röntgenstrahlen gemessen, der Primärstrahl wird durch einen Strahlstopper absorbiert, bevor er auf den Detektor trifft. In Streuexperimenten sind sowohl der Abstand zwischen Quelle und Probe als auch der Abstand zwischen Probe und Detektor groß. Die Probengröße, über die Informationen gewonnen werden sollen, liegt im nm-Bereich auf. Die Wellenlänge  $\lambda$  der einfallenden elektromagnetischen Welle, für die betragsmäßig  $|\vec{k}_0| = 2\pi/\lambda$  gilt, ist typischerweise im sub-nm Bereich. Damit darf die einfallende Strahlung als ebene Welle betrachtet werden (Fraunhofer-Näherung, [Sve13]). An dem Probensystem wird der Röntgenstrahl elastisch gestreut, der Streuwinkel beträgt  $2\Theta$ . Der Wellenvektor der gestreuten Welle wird als  $\vec{k}$  bezeichnet,  $\vec{q} = \vec{k} - \vec{k}_0$  ist der Wellenvektorübertrag. Da in Röntgenbeugungsexperimenten nur der elastisch gestreute Anteil betrachtet wird, sind  $\vec{k}$  und  $\vec{k}_0$  betragsgleich. Der Zusammenhang zwischen dem Betrag des Wellenvektorübertrages  $|\vec{q}| = q$  und dem Streuwinkel  $2\Theta$  ist für isotrop streuende Proben durch

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(2\Theta/2) \quad (2.1)$$

gegeben. Die Messgröße in SAXS-Experimenten ist die gestreute Intensität  $I$  in Abhängigkeit vom Wellenvektorübertrag  $q$ . Die Streuintensität  $I(q)$  ist durch (2.1) auch für unterschiedliche experimentelle Aufbauten in Bezug auf den Probe-Detektor-Abstand  $L$  oder die Wellenlänge der einfallenden Röntgenstrahlung vergleichbar.

## 2.2 Streuung an einem Elektron

Bei der elastischen Streuung an einem freien oder schwach gebundenen Elektron wird das geladene Teilchen durch die elektromagnetische Welle zu einer Schwingung angeregt. Das oszillierende Elektron strahlt dann analog zu einem Dipol eine elektromagnetische Welle gleicher Frequenz ab. Für den Quotient aus einfallender Strahlung  $I_0$  und elastisch gestreuter Strahlung  $I$  an einem freien oder schwach gebundenen Elektron ergibt sich in der Dipolnäherung die



**Abbildung 2.1:** Streugeometrie in einem Röntgenbeugungsexperiment: Die von einer Quelle erzeugte Röntgenstrahlung mit dem Wellenvektor  $\vec{k}_0$  wird in großem Abstand von der Quelle am Probensystem elastisch um den Winkel  $2\Theta$  gestreut. Der gestreute Wellenvektor wird mit  $\vec{k}$ , der Wellenvektorübertrag mit  $\vec{q}$  bezeichnet. In großem Abstand vom Probensystem misst der Detektor die Intensität der gestreuten Röntgenstrahlung in Abhängigkeit vom Streuwinkel. In Schwarz dargestellt ist ein Strahlstopper, der verhindert, dass der Primärstrahl den empfindlichen Detektor beschädigt. Der Probe-Detektor-Abstand wird mit  $L$  bezeichnet.

Thomson'sche Streuformel

$$\frac{I}{I_0} = \left( \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2} \right)^2 \cdot \frac{1}{L^2} \cdot \Pi(2\Theta), \quad (2.2)$$

wobei  $e$  die Elementarladung,  $\epsilon_0$  die dielektrische Leitfähigkeit des Vakuums,  $m$  die Elektronenmasse,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit und  $L$  der Abstand zwischen Elektron und Detektor ist. In SAXS Experimenten kann der Polarisationsfaktor  $\Pi(2\Theta)$  mit  $1/2(1 + \cos(2\Theta)^2) \approx 1$  genähert werden;  $e^2/(4\pi\epsilon_0 mc^2)$  ist der klassische Elektronenradius  $r_0$ .

Für die Streuung an einem Atom kann der Atomformfaktor  $f(\vec{q}, \hbar\omega)$  geschrieben werden als [AN11, Kapitel 1]

$$f(\vec{q}, \hbar\omega) = f^0(\vec{q}) + f'(\hbar\omega) + i f''(\hbar\omega), \quad (2.3)$$

mit dem reduzierten Planck'schen Wirkungsquantum  $\hbar$  und der Kreisfrequenz  $\omega = 2\pi/\lambda$ . Hierbei ist nur der Term  $f^0(\vec{q})$ , den man durch eine Fouriertransformation der Ladungsdichte erhält, von dem Wellenvektorübertrag abhängig.  $f'$  und  $f''$  sind elementspezifische, dispersive Korrekturterme. Da bei SAXS-Experimenten die Energie konstant ist, liefern diese Terme einen konstanten Beitrag. Deshalb können diese Summanden vernachlässigt werden.

## 2.3 Streuung an einem Objekt

Zunächst soll hier die elastische Streuung von Röntgenstrahlung, die als monochromatische, ebene Welle dargestellt wird (s. Abbildung 2.2), an zwei Elektronen betrachtet werden [AN11, Kapitel 4]. Die Streuamplitude  $A(\vec{q})$  kann dann als

$$A(\vec{q}) = -r_0(1 + e^{i\vec{q}\vec{r}}) \quad (2.4)$$

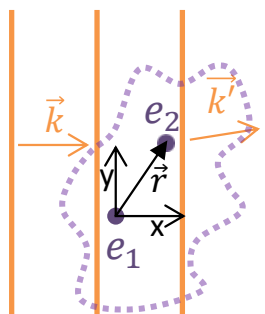
geschrieben werden, die Streuintensität wird durch

$$A(\vec{q})A(\vec{q})^* = r_0^2(1 + e^{i\vec{q}\vec{r}})(1 + e^{-i\vec{q}\vec{r}}) = 2r_0^2(1 + \cos(\vec{q}\vec{r})) \quad (2.5)$$

beschrieben. Für ein System aus  $j$  Elektronen an den Positionen  $r_j$  kann man die einzelnen Beiträge entsprechend aufsummieren:

$$A(\vec{q}) = -r_0 \sum_j e^{i\vec{q}\vec{r}_j} \quad (2.6)$$

Allgemein wird hier die Bornsche Näherung zugrunde gelegt: Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon gestreut wird, ist so gering, dass Mehrfachstreuung vernachlässigt werden kann. Die aus Elektronen bestehende Probe verursacht nur eine Störung des einfallenden Strahls. Um die Streuamplitude einer Struktur wie die eines Atoms, Moleküls oder auch eines Proteins zu erhalten, ist es sinnvoll, die Summe in ein Integral zu überführen. Hierbei wird die Ladungsverteilung



**Abbildung 2.2:** Streuung einer ebenen Welle an zwei Elektronen; erstes Elektron im Ursprung des Koordinatensystems.

mit der Elektronendichte  $\rho(\vec{r})$  beschrieben. Für die Streuamplitude folgt

$$A(\vec{q}) = -r_0 \int_{\text{Vol}} \rho(\vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (2.7)$$

$$= -r_0 \int_{\text{Vol}} \rho(\vec{r}) (\cos(\vec{q}\vec{r}) + i \sin(\vec{q}\vec{r})) d\vec{r} . \quad (2.8)$$

In dieser Beschreibung ist jeder Bereich, in dem die Elektronendichte von null verschieden ist, eine Quelle gestreuter Röntgenstrahlung.

Für ein Atom kann man nun für  $\vec{q} = 0$  folgern, dass das Integral genau der Elementarladung  $Z$  des Atoms entspricht. An (2.8) kann man erkennen, dass für  $\vec{q}$  Werte, die deutlich größer sind als der inverse Betrag der Ausdehnung des Atoms, die Phasenfaktoren sehr schnell oszillieren und sich im Integral gegenseitig kompensieren. Diese destruktive Interferenz führt dazu, dass die Streuamplitude des Atoms für  $\vec{q} \rightarrow \infty$  verschwindet [AN11, Kapitel 4].

Mit Hilfe des differentiellen Wirkungsquerschnitts

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = A(\vec{q}) \cdot A(\vec{q})^* , \quad (2.9)$$

der definiert ist als der Anteil der Photonen, der in das Winkelement  $d\Omega$  gestreut wird, kann man (2.2) angeben zu:

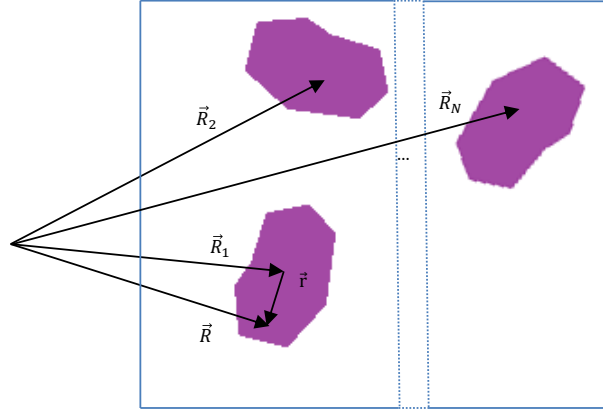
$$\frac{I(\vec{q})}{I_0} = \frac{1}{L^2} \cdot \frac{d\sigma}{d\Omega}(\vec{q}) . \quad (2.10)$$

Wie häufig bei Röntgenbeugungsexperimenten geht die Phaseninformation beim Übergang von der Streuamplitude zu der experimentell zugänglichen Größe der Intensität verloren. Als nächstes soll nun die Streuung an vielen Objekten diskutiert werden.

## 2.4 Streuung an vielen Objekten

Allgemein kann die Elektronendichte  $\rho(\vec{R})$  eines Systems, das aus  $N$  Streuobjekten der Elektronendichte  $\rho^O(\vec{r})$  besteht, gemäß Abbildung 2.3 mit

$$\rho(\vec{R}) = \sum_{j=1}^N \rho_j^O(\vec{R} - \vec{R}_j) \quad (2.11)$$



**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung der Streuung an vielen Objekten.

beschrieben werden, wobei  $\rho_j^O(\vec{R} - \vec{R}_j)$  die Elektronendichte des  $j$ -ten Partikels beschreibt. Der differentielle Wirkungsquerschnitt wird im Probenvolumen  $V$  durch

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_0^2 \sum_{j=1}^n e^{(i\vec{q}\vec{R}_j)} \int_V \rho_j^O(\vec{r}) e^{(i\vec{q}\vec{r})} d\vec{r} \cdot \sum_{k=1}^n e^{(i\vec{q}\vec{R}_k)} \int_V \rho_k^O(\vec{r}') e^{(i\vec{q}\vec{r}')} d\vec{r}' \quad (2.12)$$

$$= r_0^2 \sum_{j,k=1}^n e^{(i\vec{q}\vec{R}_j - \vec{R}_k)} \int_V \int_{V'} \rho_j^O(\vec{r}) \rho_k^O(\vec{r}') e^{(i\vec{q}\vec{r} - \vec{r}')} d\vec{r} d\vec{r}' \quad (2.13)$$

beschrieben. Für  $j = k$  erhält man den Streubeitrag eines einzelnen Streuobjekts, die Beiträge mit  $j \neq k$  beschreiben den Beitrag zweier unterschiedlicher Partikel. Die Summe kann zu

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(\vec{q}) = r_0^2 \left( \sum_{j=1}^n |F_j(\vec{q})|^2 + \sum_{j=1}^N \sum_{j \neq k} F_j(\vec{q}) F_k^*(\vec{q}) \cdot e^{i\vec{q}(\vec{R}_j - \vec{R}_k)} \right) \quad (2.14)$$

umgeschrieben werden, wobei

$$F_j(\vec{q}) = \int_{V_o} \rho_j^O(\vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (2.15)$$

die Streuamplitude des  $j$ -ten Partikels ist. Der erste Summand in (2.14) beschreibt die Summation der Streuintensitäten der einzelnen Partikel, der zweite Summand beschreibt die Interferenz der Streuamplituden, die eine Funktion des Abstandes der beiden Objekte ist. Nun wird berück-

sichtigt, dass die Objekte keine bevorzugte räumliche Ausrichtung besitzen. Nach dem hier gültigen Prinzip der Ergodizität führt eine räumliche Mittelung über alle möglichen Raumausrichtungen zu dem gleichen Ergebnis wie die Betrachtung der Ausrichtung der Teilchen über einen langen Zeitraum. Diese variiert aufgrund Brown'scher Molekularbewegungen oder Diffusion. Eine räumliche Mittelung über alle möglichen Ausrichtungen führt somit zu dem nur noch vom skalaren  $q$ -Wert abhängigen Wirkungsquerschnitt

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = \left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega}(\vec{q}) \right\rangle_{\Omega} . \quad (2.16)$$

Außerdem wird zur Vereinfachung angenommen, dass alle  $N$  Teilchen identisch sind. Des Weiteren wird die sogenannte „decoupling approximation“ verwendet: es wird angenommen, dass die Orientierung der Teilchen nicht mit ihrer Wechselwirkung untereinander und somit auch nicht mit dem Abstand verknüpft ist [Ped02; Kot83]. Dies ist für eine geringe Anisotropie bzw. schmale Größenverteilung der Teilchen gültig, außerdem darf die Konzentration nicht zu hoch sein. Für Gleichung (2.14) folgt

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = r_0^2 \left( N \langle |F(\vec{q})|^2 \rangle_{\Omega} + \langle F(\vec{q}) \rangle_{\Omega}^2 \left\langle \sum_{j=1}^N \sum_{j \neq k} e^{i\vec{q}(\vec{R}_j - \vec{R}_k)} \right\rangle_{\Omega} \right) . \quad (2.17)$$

Es ist zu beachten, dass für Teilchen ohne sphärische Symmetrie  $\langle |F_j(\vec{q})|^2 \rangle_{\Omega} \neq \langle F_j(\vec{q}) \rangle_{\Omega}^2$  gilt. An dieser Stelle kann der Formfaktor  $P(q)$  eingeführt werden, der in Kapitel 2.6 genauer diskutiert wird:

$$P(q) = \langle |F(\vec{q})|^2 \rangle_{\Omega} . \quad (2.18)$$

Außerdem kann an dieser Stelle die radiale Verteilungsfunktion  $g(r)$  eingeführt werden, die im Realraum definiert ist. Definitionsgemäß gibt  $4\pi nr^2 g(r) dr$  im dreidimensionalen Raum die Anzahl der Partikelzentren in einer Kugelschale des Radius  $r$  und der Dicke  $dr$  an [AN11, Kapitel 4]. Wenn die Partikelanzahldichte  $n$  im Abstand  $r'$  nicht mit dem Partikel am Ort  $r = 0$  korreliert ist, gilt  $g(r') = 1$ . Entsprechend gilt für Systeme ohne langreichweitige Ordnung, die in dieser Dissertation untersucht werden,  $\lim_{r' \rightarrow \infty} g(r') \rightarrow 1$ . Der zweite Summand aus Formel (2.17) ist (für isotrope Systeme und in kontinuierlicher Darstellung sowie für  $N \gg 1$ ) wie folgt mit der radialen Verteilungsfunktion verknüpft [Spa02]:

$$\left\langle \sum_{j=1}^N \sum_{j \neq k} e^{i\vec{q}(\vec{R}_j - \vec{R}_k)} \right\rangle_{\Omega} = \frac{4\pi N^2}{V} \int_{V^{1/3}} r^2 g(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr . \quad (2.19)$$

Um den experimentell zugänglichen Strukturfaktor zu erhalten, teilt man mit  $g(r) = (g(r) - 1) + 1$  das Integral auf und erhält als zweiten Summanden

$$\frac{4\pi N^2}{V} \int_{V^{1/3}} r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr. \quad (2.20)$$

Dieser entspricht einer Fourier-Transformation von  $V^{1/3}$  und ist demnach mit dem bestrahlten Probenvolumen verknüpft. Dieses ist verglichen mit den untersuchten Partikeln sehr groß und liefert deswegen nur einen Beitrag für experimentell nicht zugängliche, sehr kleine Winkel. Aufgrund von  $\lim_{r' \rightarrow \infty} g(r') \rightarrow 1$  können die Integralgrenzen verschoben werden und man findet mit

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_0^2 N \left( P(q) + \langle F(\vec{q}) \rangle_{\Omega}^2 \cdot 4\pi \frac{N}{V} \int_0^{\infty} r^2 (g(r) - 1) \cdot \frac{\sin(qr)}{qr} dr \right) \quad (2.21)$$

einen Zusammenhang zwischen dem differentiellen Wirkungsquerschnitt und der radialen Verteilungsfunktion. Der Strukturfaktor  $S(q)$  kann dann definiert werden als:

$$S(q) = 1 + 4\pi \frac{N}{V} \int_0^{\infty} r^2 (g(r) - 1) \cdot \frac{\sin(qr)}{qr} dr. \quad (2.22)$$

Der Strukturfaktor beschreibt die Korrelation der Teilchen im reziproken Raum und ist entsprechend mit der Paarkorrelationsfunktion  $g(r)$  verknüpft. Für Körper mit geringer Anisotropie kann weiterhin angenommen werden, dass die Wechselwirkung unabhängig von der Orientierung der Teilchen ist (decoupling approximation, [Kot83]), und mit

$$\beta(q) = \frac{\langle |F(\vec{q})| \rangle_{\Omega}^2}{\langle |F(\vec{q})|^2 \rangle_{\Omega}} \quad (2.23)$$

kann der effektive Strukturfaktor

$$S_{\text{eff}} = 1 + \beta(q) \cdot (S(q) - 1) \quad (2.24)$$

angegeben werden. Analog gilt diese Näherung auch für polydisperse Objekte, zum Beispiel für ein System aus Kugeln, die eine schmale Größenverteilung aufweisen. Es wird dann angenommen, dass die Wechselwirkung unabhängig von der Größe der Teilchen ist. Ein Ausdruck für  $\beta(q)$  für ein System aus Kugeln verschiedener Größe wird in Kapitel 2.6 gegeben. Die Gesamtintensität kann gemäß Gleichung (2.2) angegeben werden:

$$I(q) = I_0 \frac{r_0^2 N}{L^2} \cdot P(q) \cdot S_{\text{eff}}(q) . \quad (2.25)$$



## 2.5 Kontrast und Transmission

Bevor nun Form- und Strukturfaktor genauer betrachtet und die in dieser Arbeit relevanten Fälle diskutiert werden, wird die Bedeutung von Kontrast und Transmission für SAXS-Experimente dargelegt. Bisher wurde die Umgebung der Streuobjekte als Vakuum angenommen. Nun wird ein Objekt der mittleren Elektronendichte  $\rho_A$  und dem Volumen  $V_A$  beschrieben, das sich in einer Umgebungsmatrix mit einer konstanten, mittleren Elektronendichte  $\rho_M$  befindet. Das kann zum Beispiel für die hier relevanten Untersuchungen von Proteinen bzw. Nanopartikeln in wässriger Lösung angenommen werden. Wenn das Objekt nicht mit der Umgebungsmatrix wechselwirkt, können die Streuamplituden einfach aufsummiert werden und man erhält [Spa02]:

$$A(\vec{q}) = -r_0 \left\{ \int_{V_A} \rho_A e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} + \int_{V-V_A} \rho_M e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \right\} \quad (2.26)$$

$$= -r_0 \left\{ \int_{V_A} (\rho_A - \rho_M) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} + \rho_M \int_V e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \right\} \quad (2.27)$$

$$= -r_0 \left\{ \int_{V_A} \Delta\rho e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} + \rho_M \delta(\vec{q}) \right\}. \quad (2.28)$$

Es ist zu erkennen, dass die Elektronendichte des Lösungsmittels nur einen Beitrag für  $\vec{q} = 0$  liefert. Ebenso wie der Anteil der Röntgenstrahlung, der nicht mit der Probe wechselwirkt, wird die rein vorwärts gestreute Röntgenstrahlung bei  $I(\vec{q} = 0)$  nicht weiter betrachtet, da in SAXS Experimenten der vorwärts gestreute Anteil ebenso wie der Primärstrahl durch einen Strahlstopper direkt vor dem Detektor absorbiert werden. Ein großer Elektronendichtekontrast  $\Delta\rho$  ist vorteilhaft für die Qualität der Daten. Im Fokus dieser Arbeit sind die Substanzen Wasser (etwa  $334 \frac{e^-}{nm^3}$ ), Proteine (etwa  $420 \frac{e^-}{nm^3}$ ) und Siliziumdioxid (etwa  $700 \frac{e^-}{nm^3}$ ). Während  $\Delta\rho$  für in Wasser gelöste Proteine gering ist, ist auch für geringe Konzentrationen Siliziumdioxid in Wasser eine gute Qualität der Daten zu erwarten.

Auch die Absorption des Röntgenstrahls durch die Probe wurde bisher nicht betrachtet. Die Transmission  $T$  des Röntgenstrahls kann beschrieben werden durch  $T = \exp^{-\mu d}$ , wobei  $d$  die Dicke der Probe beschreibt und  $\mu$  ein probenspezifischer linearer Absorptionsfaktor ist [Lin02a]. Der Zusammenhang zwischen der idealen Intensität  $I(q)_{id}$  und der realen Intensität unter Berücksichtigung der Absorption  $I(q)_{real}$  ist also durch  $I(q)_{real} = I(q)_{id} \cdot T$  gegeben. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Absorption von Wasser und Proteinen vergleichbar ist, Siliziumdioxid wird nur in sehr geringen Konzentrationen verwendet. Da in dieser Arbeit keine Rückschlüsse von der einfallenden Intensität zu der exakten Anzahl der Moleküle im Strahl angestellt werden, muss der Absorptionsfaktor nicht weiter betrachtet werden.

## 2.6 Der Formfaktor

Im Folgenden wird der Formfaktor  $P(q)$  genauer beschrieben. Der Formfaktor enthält alle Informationen über die Form und Größe der Streuobjekte. Zwischen gemessener Intensität und  $P(q)$  besteht dann ein einfacher proportionaler Zusammenhang, wenn  $\lim S(q) \approx 1$  gilt. Das ist der Fall, wenn die Positionen der Streuobjekte keinerlei Korrelationen aufweisen und die Wechselwirkung vernachlässigt werden kann, weil die Konzentration der Streuobjekte gering ist und sie sich beispielsweise auch nicht durch starke elektrostatische Abstoßung beeinflussen. Die Grenzkonzentration, unterhalb der  $S(q) \approx 1$  eine sinnvolle Näherung ist, hängt deswegen auch von den Oberflächeneigenschaften der Streuobjekte sowie den Lösungsmiteleigenschaften ab. Typischerweise liegt die Grenzkonzentration im Bereich 0,1 – 0,5 wt.%. Prinzipiell lässt sich der Formfaktor bereits mit den Informationen aus Kapitel 2.3 bestimmen.

Die mit dem Formfaktor verknüpften Realraumfunktionen wie zum Beispiel die Autokorrelationsfunktion der Dichtefunktion werden nicht näher erläutert. Insbesondere wenn Streuexperimente an Objekten unbekannter Form durchgeführt werden, ist eine Betrachtung der Realraumfunktionen nützlich, um Informationen über die Gestalt der Objekte zu erhalten. Eine Beschreibung der mit dem Formfaktor verknüpften Realraumfunktionen findet sich in [Gla02]. Es existieren auch Computerprogramme, in denen komplexe Partikel aus so genannten 'Dummy-Atomen' aufgebaut werden und das Streusignal einer Struktur aus Atomen beliebiger Geometrie berechnet wird. Im Zentrum dieser Arbeit standen Experimente an Lysozym. Der Formfaktor wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten gemessen. Zur Bestimmung von  $\beta(q)$  in Formel (2.24) wurde die Beschreibung durch einen Ellipsoiden gewählt.

Darüber hinaus wurden Experimente an Nanopartikeln durchgeführt, deren Formfaktor in dieser Arbeit bestimmt werden musste. Die Nanopartikel werden als ein System aus polydispersen Kugeln mit homogener Elektronendichte beschrieben.

An dieser Stelle sollen nur die Formfaktoren für die in dieser Arbeit relevanten Systeme angegeben werden. Weitere Formfaktoren sind in [Ped02] aufgelistet.

- für Kugeln mit dem Radius  $R$  und Volumen  $V$  [Möl14a; Gla02]<sup>1</sup>:

$$P(q) = |F_k(q, R)|^2 = V(R)^2 \cdot |F_0(qR)|^2 \quad (2.29)$$

$$= V(R)^2 \left( \frac{3(\sin(qR) - qR \cos(qR))}{(qR)^3} \right)^2, \quad (2.30)$$

---

<sup>1</sup>Für Kugeln mit Radius  $R$  und der konstanten Elektronendichte  $\rho$  existiert keine Winkelabhängigkeit der Streuamplitude, und mit  $\langle \exp(i\vec{q}\vec{r}) \rangle = \sin(qr)/(qr)$  [Deb15] und Gleichung (2.28) gelangt man über den Zwischenschritt  $F(q) = 4\pi \int_0^R \rho r^2 \sin(qr)/(qr) dr$  zu Gleichung (2.30)

hier gilt  $\beta(q) = 1$ .

- für Rotationsellipsoiden mit den Halbachsen  $a$  und  $b$  [Gui39]:

$$P(q) = \int_0^1 F_0^2(q\sqrt{a^2 + x^2(b^2 - a^2)}) dx \quad (2.31)$$

und

$$\beta(q) = \frac{\left(\int_0^1 F_0(q\sqrt{a^2 + x^2(b^2 - a^2)}) dx\right)^2}{P(q)}. \quad (2.32)$$

- für Systeme aus polydispersen Kugeln [Ped02], deren Größe durch die normierte Größenverteilung  $D_N(R)$  beschrieben wird, gilt:

$$P_{\text{Poly}}(q) = \int_0^\infty D_N(R) V(R)^2 |F_0(qR)|^2 dR \quad (2.33)$$

sowie

$$\beta(q) = \frac{\left(\int_0^\infty D_N(R) V(R) F_0(qR) dR\right)^2}{\text{Poly}(q)}, \quad (2.34)$$

der Strukturfaktor wird dann für Teilchen mit dem effektiven Radius

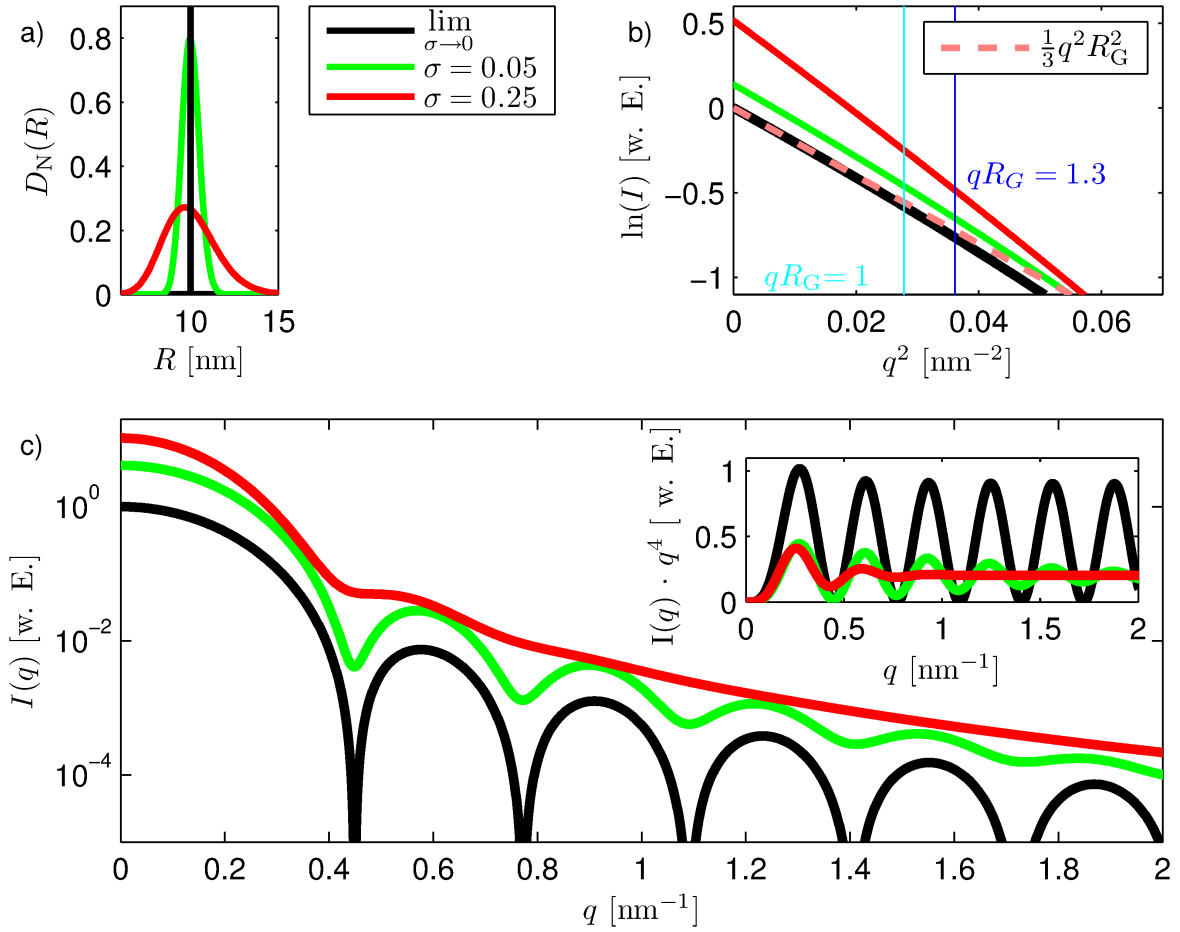
$$R_{\text{eff}} = \left(\int_0^\infty D_N(R) R^3 dr\right)^{1/3} \quad (2.35)$$

berechnet.

Als Beispiel für eine Größenverteilung wird hier die logarithmische Normalverteilung angeführt, die in vorherigen Arbeiten häufig verwendet wurde oder als Ausgangspunkt diente (u.a. [Möl11], [Sch13]). Die nicht-symmetrische Größenverteilung  $D_N(R, \mu, \sigma)$  kann durch

$$D_N(R, \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma R} \exp\left(\frac{-(\ln(R) - \mu)^2}{2\sigma^2}\right). \quad (2.36)$$

beschrieben werden. Abbildung 2.4 zeigt beispielhaft Formfaktoren und Größenverteilungen für ein System aus Kugeln mit dem Radius  $R = 10$  nm sowie zwei polydisperse Systeme mit Größenverteilungen gemäß (2.36), deren Erwartungswert des Radius  $\langle R \rangle$  ebenfalls 10 nm beträgt.



**Abbildung 2.4:** a) zeigt die Größenverteilung der Kugeln gemäß (2.36), der Erwartungswert des Radius  $\langle R \rangle$  beträgt stets 10 nm. Aus den Größenverteilungen aus a) ergibt sich die  $q$ -abhängige Streuintensität, dargestellt in c). In der in c) eingeschobenen Abbildung erkennt man die  $q^4$  Abhängigkeit der Intensität für große  $q$ -Werte (Porod'sches Gesetz). In b) ist  $\ln(I)$  gegen  $q^2$  für kleine  $q$  aufgetragen, sowie die Grenzen  $q \cdot R_G = 1$  bzw.  $q \cdot R_G = 1.3$  für das monodisperse System ( $R = 10$  nm,  $R_G = 6$  nm).

## 2.7 Asymptotisches Verhalten

Für die Grenzen  $\lim_{q \rightarrow 0} P(q)$  bzw.  $\lim_{q \rightarrow \infty} P(q)$  existieren Näherungen, die Informationen über die Streuobjekte liefern können. Dies soll in diesem Kapitel beschrieben werden.

In Analogie zur klassischen Mechanik ist der Gyrationradius  $R_G$  eines Streuobjekts definiert als [Gla82]

$$R_G^2 = \frac{\int_V \rho(r) \cdot r^2 dV}{\int_V \rho(r) dV} \quad (2.37)$$

und kann experimentell mit Hilfe der für kleine  $q$ -Werte gültigen Guinier'schen Näherung bestimmt werden:

$$I(q) \propto e^{\left(-\frac{(qR_G)^2}{3}\right)}. \quad (2.38)$$

Für kugelförmige Partikel wird der Gültigkeitsbereich in [Gla82] mit  $qR_G \leq 1.3$  angegeben, [Spa02] gibt  $qR_G < 1$  als Grenze an (s. Abbildung 2.4b)). Aus dem Gyrationradius  $R_G$  lässt sich für homogene Kugeln der Kugelradius  $R$  mit

$$R_G = \sqrt{\frac{3}{5}}R \quad (2.39)$$

bestimmen, für Rotationsellipsoiden mit den Halbachsen  $a$  und  $b$  gilt

$$R_G = \sqrt{\frac{2a^2 + b}{5}}. \quad (2.40)$$

Für kompakte, glatte Streuobjekte mit geringer Anisotropie, wie z.B. das in dieser Arbeit verwendete Lysozym in nativer Form sowie Nanopartikel, gilt für große  $q$  das sogenannte Porodsche Gesetz [Por51]:

$$\lim_{q \rightarrow \infty} I(q) \propto q^{-4}. \quad (2.41)$$

Dies wird im Einschub der Abbildung 2.4c) verdeutlicht.

## 2.8 Der Strukturfaktor

Zunächst wird in diesem Kapitel die Ornstein-Zernicke-Gleichung eingeführt, mit der sich die Korrelation der Position von Teilchen beschreiben lässt. Ursprünglich wurde die Gleichung von Ornstein und Zernicke für die Beschreibung von Fluiden in der Nähe des kritischen Punktes bei Untersuchungen der „kritischen Opaleszenz“ eingeführt [Orn14]. Danach werden verschiedene in dieser Arbeit verwendete kolloidale Interaktionspotenziale aufgeführt, für die sich die Ornstein-Zernicke-Gleichung lösen und  $g(r)$  bzw.  $S(q)$  berechnen lässt. Schließlich wird die Entwicklung des Strukturfaktors für kleine  $q$  in der Nähe der flüssig-flüssig phasengetrennten Phase diskutiert.

### 2.8.1 Ornstein-Zernike-Gleichung

In diesem Kapitel wird die Ornstein-Zernike-Gleichung eingeführt. Dabei wird sich an [Näg08] und [Möll14a] orientiert.

Der Zusammenhang zwischen der radialen Verteilungsfunktion  $g(r)$  und dem Strukturfaktor wurde bereits in Kapitel 2.4 definiert:

$$S(q) = 1 + 4\pi \frac{N}{V} \int_0^\infty r^2 (g(r) - 1) \cdot \frac{\sin(qr)}{qr} dr. \quad (2.42)$$

In sämtlichen für dieser Arbeit relevanten Fällen muss diese Gleichung für Kugeln mit einem konstanten Radius  $R$  gelöst werden. Die Korrekturterme, die sich aus der Anisotropie oder Polydispersität ergeben, sind in Formel (2.24) in  $\beta(q)$  enthalten. Die Beschreibung von  $g(r)$  erfolgt mit den Methoden der statistischen Mechanik einer einfachen Flüssigkeit gemäß [Kle02]. Ziel ist es dabei, einen Zusammenhang zwischen dem Paarpotenzial  $V(r)$  der Kugeln und ihrer radialen Paarabstandsverteilung zu bestimmen.

Hierzu wird die Ornstein-Zernike-Gleichung eingeführt. Sie beschreibt den Zusammenhang zwischen der totalen Korrelationsfunktion  $h(r) = g(r) - 1$  und der direkten Korrelationsfunktion  $c(r)$  für den Abstand zwischen zwei Orten  $r_{12} = |\vec{r}_1 - \vec{r}_2|$ . Sie lautet

$$h(r_{12}) = c(r_{12}) + n \int c(r_{13}) h(r_{23}) d\vec{r}_3, \quad (2.43)$$

wobei  $n$  die Anzahl der Teilchen pro Volumen ist. Die Ornstein-Zernike-Gleichung beschreibt also die totale Korrelation zweier Teilchen (linke Seite) als Summe ihrer direkten Korrelation (erster Summand) und einem Term, der die direkte Korrelation von Teilchen eins mit einem dritten Teilchen und die totale Korrelation von Teilchen zwei mit einem dritten Teilchen beinhaltet. Somit ist letztlich die Korrelation zwischen allen Teilchen enthalten. Durch Substituieren von  $r_{12} \rightarrow \vec{r}$  sowie  $r_{13} \rightarrow \vec{r}'$  und Fouriertransformationen erhält man mit  $S(q) = 1 + n \cdot h(q)$  schließlich über

$$S(q) = \frac{1}{1 - n \cdot c(q)} \geq 0 \quad (2.44)$$

einen Zusammenhang zwischen der Fouriertransformierten direkten Korrelationsfunktion und dem gesuchten, experimentell zugänglichen Strukturfaktor [Möl14a; Näg08; Kle02]. Ist für ein System  $c(r)$  berechnet worden, kann auch  $S(q)$  angegeben werden.

Zur Berechnung des Strukturfaktors aus dem Paarpotenzial muss ein Zusammenhang zwischen  $c(r)$  und  $V(r)$  hergestellt werden. Die Paarpotenziale sowie die notwendigen Näherungen für diese werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

## 2.8.2 Kolloidale Interaktionspotenziale

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten kolloidalen Interaktionspotenziale sowie die notwendige Näherung für zur Bestimmung von  $c(r)$  vorgestellt. Klar ist, dass für Teilchen mit dem Durchmesser  $\sigma$   $g(r < \sigma) = 0$  gelten muss, außerdem gilt für große Abstände und die meisten Paarpotenziale  $V(r)$  asymptotisch  $\lim_{r \rightarrow \infty} c(r) = -(k_B T)^{-1} V(r)$  [Näg08].

### Das Potenzial der harten Kugel

Das Potenzial der harten Kugel, welches aus der Undurchdringlichkeit der Schale der Kugeln resultiert, ist gegeben durch

$$\frac{V_{\text{HK}}(r)}{k_B T} = \begin{cases} \infty & r < \sigma \\ 0 & r \geq \sigma. \end{cases} \quad (2.45)$$

In diesem Modell besteht die einzige Wechselwirkung darin, dass die Teilchen mit dem Durchmesser  $\sigma$  nicht ineinander eindringen können. Für dieses Modell gibt es in der Percus-Yevick-Näherung [Per58], die durch

$$c_{\text{PY}}(r) = g(r)(1 - \exp((k_B T)^{-1} V(r))) \quad (2.46)$$

gegeben ist, eine analytische Lösung der Ornstein-Zernike-Gleichung (u.a. [Kin84; Ped02]).

### Das Potenzial der klebrigen Kugel

Das Potenzial der klebrigen, harten Kugel (engl. sticky hard sphere potential), im weiteren Verlauf KHK-Potenzial genannt, ist gegeben durch

$$\frac{V_{\text{KHK}}(r)}{k_B T} = \begin{cases} \infty & r < \sigma \\ \ln \left( 12\tau \frac{\Delta}{\sigma + \Delta} \right) & \sigma \leq r \leq \sigma + \Delta \\ 0 & \sigma + \Delta < r, \end{cases} \quad (2.47)$$

wobei  $\Delta$  die Reichweite des attraktiven Potenzials ist.

Im sogenannten Baxter-Modell ( $\lim \Delta \rightarrow 0$ ) existiert neben der Abstoßung durch die harte Schale ein sehr kurzreichweitiges, attraktives Potenzial. Das Modell liefert eine passende Beschreibung für kolloidale Systeme, wenn die Kolloide entweder keine Ladung tragen oder diese stark abgeschirmt ist, zum Beispiel mit Salzionen, die sich um die Kolloide ansammeln und für eine Abschirmung der Coulomb-Wechselwirkung sorgen. Baxter [Bax68] hat gezeigt, dass dieses

Modell für sehr attraktive kolloidale Systeme eine gute Beschreibung ist. Für dieses Modell gibt es in der Percus-Yevick-Näherung eine analytische Lösung der Ornstein-Zernike-Gleichung [Men91; Bax68]. Ein Vorteil dieses Modells liegt in der analytischen Lösung und dem geringen Rechenaufwand der benötigt wird, um aus dem Potenzial einen Strukturfaktor zu berechnen. Außerdem ist durch  $\tau$  das gesamte Potenzial beschrieben. Dieser Parameter kann dann für verschiedene experimentelle Bedingungen, die Einfluss auf die Wechselwirkung der Teilchen haben, verglichen werden.

### Das zwei-Yukawa-Potenzial

Das zwei-Yukawa-Potenzial ist gegeben durch

$$\frac{V_Y(r)}{k_B T} = \begin{cases} \infty & r < \sigma \\ J_r \cdot \sigma \cdot \frac{\exp(-(r - \sigma)/l_r)}{r} - J_a \cdot \sigma \cdot \frac{\exp(-(r - \sigma)/l_a)}{r} & r \geq \sigma \end{cases} \quad (2.48)$$

Für Abstände, die größer sind als die harte Schale ist das Paarpotenzial die Differenz aus einem repulsiven und einem attraktiven Anteil der Stärke  $J$  und Reichweite  $l$ .

Mit Hilfe dieses Potenzials lassen sich die typischen Wechselwirkungen in kolloidalen Systemen beschreiben: ein repulsiver Summand, der die Coulomb-Abstoßung der ggf. geladenen Teilchen beschreibt, und ein kurzreichweitiger, attraktiver Summand, der die van-der-Waals-Wechselwirkung beschreibt, die aus Dipol-Dipol-Kräften resultiert. Über die Stärke  $J_r$  kann die Oberflächenladung des Kolloids beschrieben werden, Lösungsmitelegenschaften legen die Reichweite fest. Beispielsweise kann über die Zugabe von Salzionen die Ladung abgeschirmt und somit die Reichweite der Coulombabstoßung verringert werden. Der Bezug zu dem hier verwendeten Probensystem wird in Kapitel 3.4 genauer erklärt.

In der „Mean-spherical approximation“ [Leb66], in der für  $r > \sigma$

$$c_{\text{MSA}}(r) = -(k_B T)^{-1} V(r) \quad (2.49)$$

gilt, existiert eine analytische Lösung für dieses Potenzial [Høy77; Høy76; Wai76]. In dieser Arbeit wurde eine Matlab-Implementierung genutzt, die in [Liu05] vorgestellt wird. Diese berechnet aus einem zwei-Yukawa-Interaktionspotenzial  $V(r)$  einen Strukturfaktor  $S(q)$ . Ein Nachteil dieser Näherung ist, dass in der Literatur z.B. für die Modellierung eines Strukturfaktors in der Nähe des Trübungspunkt für Tenside sehr große Potenziale in der Größenordnung 10-30  $k_B T$  benötigt werden, die deutlich größer als gemessene Paarpotenziale sind [Men91]. Deswegen wird in der Literatur [Tau85] geschlossen, dass die MSA unzuverlässig ist, wenn das Potenzial stark attraktiv und im Vergleich mit dem Durchmesser der Teilchen kurzreichweitig



ist. Trotzdem wird die MSA-Lösung des zwei-Yukawa-Potenzials in dieser Arbeit verwendet und die Resultate untereinander verglichen, ohne davon auszugehen, dass ihre Absolutwerte dem realen Paarpotenzial entsprechen.

### 2.8.3 Entwicklung des Strukturfaktors in der Nähe von Phasengrenzen

Als nächstes wird das Verhalten von  $S(q)$  in der Nähe des kritischen Punktes untersucht, hierbei wird sich an [Näg08] orientiert. In einem  $p$ - $T$ -Diagramm ist der kritische Punkt ist gekennzeichnet durch die kritische Temperatur  $T_c$  und den kritischen Druck  $p_c$ . In einem Einkomponenten-System existieren nur für effektiv attraktive kolloidale Interaktionspotenziale Phasendiagramme mit einem kritischen Punkt bzw. mit Bereichen, in denen es zur Phasentrennung kommt. In einem Mehrkomponentensystem kann es auch in Systemen aus einfachen harten Kugeln auf Grund von sogenannten „Verarmungseffekten“ zur Phasentrennung kommen. Dies wird in Kapitel 3.8 genauer erläutert. Am kritischen Punkt divergiert die isotherme Kompressibilität  $\chi_T$

$$\left(\frac{\delta p}{\delta V}\right)_{(T,N)} = 0, \quad \chi_T = \infty. \quad (2.50)$$

Zusammen mit der Kompressibilitätsgleichung

$$\frac{\chi_T}{\chi_T^{id}} = \lim_{q \rightarrow 0} S(q) = 1 + n \int (g(r) - 1) d\vec{r}, \quad (2.51)$$

in der  $\chi_T^{id}$  die Kompressibilität des idealen Gases angibt, und Gleichung (2.44) ergibt sich für den Strukturfaktor in der Nähe der kritischen Temperatur ( $T \rightarrow T_c$ )

$$\lim_{q \rightarrow 0} S(q) = 1 + n \int (g(r) - 1) d\vec{r} = \frac{1}{1 - nc(q \rightarrow 0)} \rightarrow \infty, \quad (2.52)$$

und somit

$$c(q \rightarrow 0) = 4\pi \int_0^\infty r^2 c(r) dr \rightarrow \frac{1}{n}. \quad (2.53)$$

Der Strukturfaktor nimmt in der Nähe des kritischen Punktes für  $q \rightarrow 0$  sehr große Werte an, es existiert eine langreichweitige Korrelation der Partikel. Da  $c(q)$  auch für die kritische Temperatur wohlbestimmt ist, kann man unter Benutzung von  $\sin(x)/x \approx 1 - x^2/6 + \mathcal{O}(x^4)$  die

Taylorentwicklung um  $q = 0$  durchführen und man erhält

$$nc(q) = 4\pi n \int_0^\infty r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} c(r) dr = c_0 - c_2 q^2 + \mathcal{O}(q^4) \quad (2.54)$$

mit den Koeffizienten

$$c_0 = 4\pi n \int_0^\infty r^2 c(r) dr \quad (2.55)$$

$$c_2 = \frac{2}{3} \cdot \pi n \int_0^\infty r^4 c(r) dr . \quad (2.56)$$

Dies führt zu einer von Ornstein und Zernike [Orn14] vorgestellten Näherung für den Strukturfaktor in der Nähe des kritischen Punktes, die für  $qR_U \ll 1$  gültig ist, mit der Reichweite  $R_U$  des Wechselwirkungspotenzials ist:

$$S(q) \approx \frac{1}{1 - c_0 - c_2 q^2} = \frac{1}{c_2 \cdot (\xi^{-2} + q^2)}, \quad (2.57)$$

wobei  $\xi$  die Korrelationslänge ist. Für  $\xi$  gilt

$$\xi = \left( \frac{c_2}{1 - c_0} \right)^{1/2} = (c_2 S(0))^{1/2}. \quad (2.58)$$

Entsprechend kann mit dem experimentell bestimmten Strukturfaktor  $S(q)$  die Korrelationslänge über

$$\frac{1}{S(q)} = \frac{1}{S(0)} \cdot (1 + \xi^2 q^2) \quad (2.59)$$

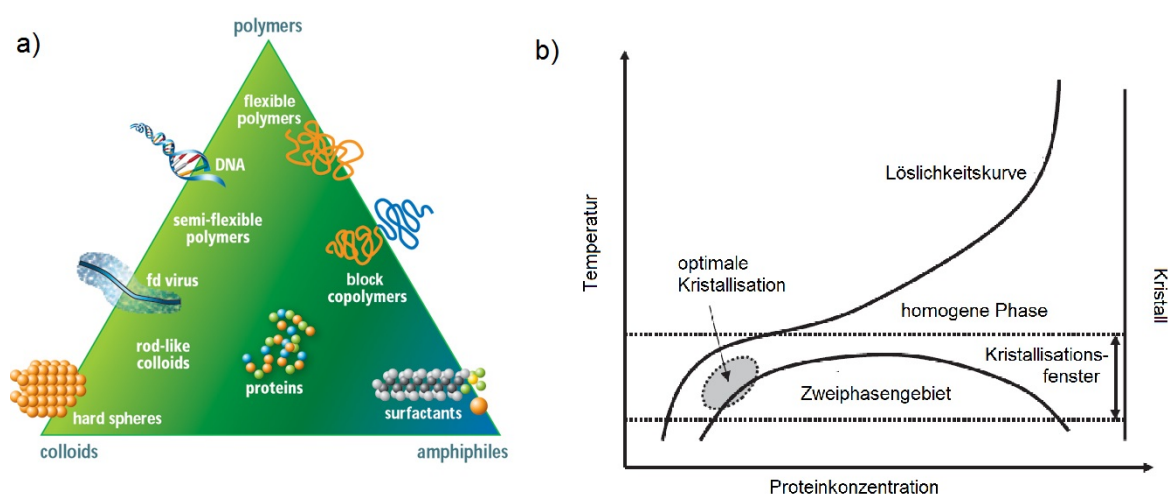
bestimmt werden. Nähert sich die Lösung dem kritischen Punkt, so kann eine Divergenz von  $\xi$  beobachtet werden. Eine (schwächere) Divergenz kann allgemein an der spinodalen Phasengrenze beobachtet werden [Hop08].

## Kapitel 3

# Probensysteme und deren Phasenverhalten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Probensysteme untersucht, die der weichen Materie zuzurechnen sind. Abbildung 3.1a) gibt einen Überblick über Systeme weicher Materie. Die drei in den Ecken genannten Vertreter (Kolloide, Polymere und Amphiphile) sind Repräsentanten von wesentlichen Eigenschaften der weichen Materie. Während sich ein System aus Kolloiden besonders durch die Stabilität und eine einfach beschreibbare räumliche Struktur auszeichnet, bestehen Polymere aus Ketten sich wiederholender Untereinheiten und weisen eine sehr flexible Raumstruktur auf. Amphiphile sind aus verschiedenen Bausteinen aufgebaut, die das Molekül sowohl hydrophil als auch lipophil machen. In dieser Arbeit werden gelöste Siliziumdioxid-Nanopartikel untersucht, die ein Vertreter der Kolloide sind. Diesen Lösungen werden verschiedene Mengen des Polymers Polyethylenglycol (PEG) zugesetzt. Außerdem wird das Protein Lysozym untersucht. Proteine sind in der Mitte des Dreiecks positioniert, da sie Eigenschaften von Polymeren, Kolloiden und Amphiphilen aufweisen: sie bestehen aus sich teilweise wiederholenden Untereinheiten, die sowohl hydrophil als auch lipophil sein können. Die Eigenschaften dieser Untereinheiten sorgen häufig für eine insgesamt kompakte, also kugelförmige oder ellipsoide, Gesamtstruktur in Lösung, in der die Proteine dann kolloidal vorliegen. In diesem Kapitel werden die Probensysteme vorgestellt. Alle hier verwendeten Probensysteme wurden in der Nähe ihrer Phasengrenzen untersucht, deswegen wird immer wieder der Bezug zu Phasendiagrammen hergestellt werden.

Zunächst werden Proteine im Allgemeinen diskutiert. Begonnen wird mit dem Aufbau der Proteine (Kapitel 3.1), dann wird der Einfluss von hydrostatischen Drücken auf Proteine erläutert sowie die Relevanz in Bezug auf die Funktionalität von Proteinen in Lebewesen (Kapitel 3.2). Diese Kapitel orientieren sich an [Möl14a; Sch11a].



**Abbildung 3.1:** a) Das Dreieck der weichen Materie. In dieser Arbeit werden sowohl Proteine untersucht, die Eigenschaften von Lipiden, Kolloiden und Polymeren aufweisen, als auch Kolloide und Polymere selbst. Abbildung entnommen aus [Dho08]. b) Schematisches Phasendiagramm von Proteinen. Abbildung entnommen aus [Cur], editiert.

Besonders im Fokus steht das Phasenverhalten von Lysozym im Bereich der flüssig-flüssig-Phasentrennung (s. Abb. 3.1b)) in Abhängigkeit vom Druck, der Temperatur sowie der Konzentration. Es werden Proteinkonzentrationen zwischen 6 und 30 wt.% verwendet. Dies liegt im Konzentrationsbereich von organischen Zellen, der in der Literatur mit etwa 20 wt.% [Lod] angegeben wird. Konformationsänderungen und Aggregation können zu vielen Krankheiten führen, beispielsweise der Sichelzellanämie [Gal02], Alzheimer [Chi06] oder Diabetes mellitus Typ 2 [Chi06; Jav07]. Eine Kühlung tierischer Augenlinsen kann eine Eintrübung dieser aufgrund einer Phasenseparation verursachen [Wan10; Toy77], eine Eintrübung der Linse tritt als Grauer Star auch bei Lebewesen auf. Eine flüssig-flüssig-phasenseparierte Phase wurde unter anderem für die Proteine  $\gamma$ -Kristallin [Tho87], Hämoglobin [Gal02] und auch Lysozym [Möl14b; Mus97; Ish77; Car07; Tar90] gefunden. Die bei Proteinen häufig beobachtete Phasentrennung kann als Mischungsdynamik eines quasibinären Systems verstanden werden. Dies wird in Kapitel 3.3 erläutert.

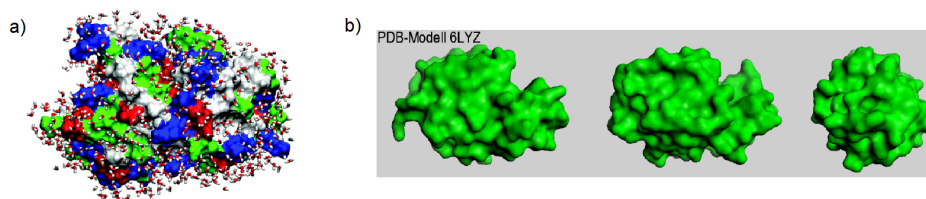
Proteinlösungen in der homogenen Phase werden in dieser Arbeit als kolloidale Systeme angesehen, deswegen wird in Kapitel 3.4 die kolloidale Wechselwirkung erläutert. Die detaillierte Kenntnis der Protein-Protein-Wechselwirkung ist bei der Herstellung von Proteinkristallen notwendig [Ash04; Cur06]. Diese können dann zur Strukturanalyse der Proteine genutzt werden. Abschließend wird in Kapitel 3.5 der Zusammenhang zwischen realen Gasen und Proteinlösungen in der homogenen Phase erläutert.

Außerdem wurde in dieser Arbeit das Phasenverhalten von Nanopartikel-Polymermischungen

untersucht. Deshalb werden in Kapitel 3.6 Siliziumdioxid-Nanopartikel und in Kapitel 3.7 Polymerlösungen eingeführt. In Kapitel 3.8 wird der sogenannte Verarmungseffekt erläutert, der zur Phasentrennung von Kolloid-Polymerlösungen führen kann. Verarmungseffekte und die daraus folgenden Phasentrennungen sind in vielen Anwendungsbereichen wichtig, beispielsweise im Bereich der Nahrungsmittelindustrie [Gri97], der Farbindustrie [Hug99] oder auch in Zellen [Zim93].

### 3.1 Aufbau von Proteinen

Proteine sind Ketten aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Für humane Organismen existieren 20 unterschiedliche proteinogene Aminosäuren. Der Aufbau der Aminosäuren legt ihre Eigenschaften fest, sie unterscheiden sich beispielsweise hinsichtlich ihrer Größe, Polarität und Ladung. Die Abfolge der Aminosäuren, Primärstruktur genannt, legt letztlich die dreidimensionale Struktur des Proteins fest. Die Sekundärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung von Aminosäuren, die nah beieinander liegen. Durch sogenannte Faltungen entsteht die Tertiärstruktur, unter der man die räumliche Anordnung der gesamten Polypeptidkette versteht. Die Quartärstruktur entsteht durch Zusammenlagerung verschiedener Polypeptidketten. Die Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren sind ausschlaggebend für die dreidimensionale Struktur. Hier sind Disulfid-Brücken (kovalente Bindungen zwischen zwei Schwefelatomen der Aminosäure Cystein), Ionenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte zu nennen. Insbesondere unter Berücksichtigung der Umgebungsbedingungen sowie Lösungsmiteleigenschaften können Proteine in verschiedenen Konformationen vorliegen. Die räumliche Struktur garantiert letztlich die Funktionalität des Proteins für den Organismus. Änderungen der natürlichen Struktur werden auch als Denaturierung bezeichnet und können somit zum Funktionsverlust führen. Alle Änderungen des Umgebungsmediums, die eine der genannten Wechselwirkungen beeinflussen, können auch einen Einfluss auf die räumliche Struktur des Proteins haben. Das gilt für thermodynamischen Größen wie Temperatur und Druck ebenso wie für den pH-Wert oder die Zugabe von Additiven, die einen Einfluss auf das Lösungsmittel, typischerweise Wasser, haben. Weitere Details zu den Wechselwirkungen, die zur Ausbildung der Struktur von Proteinen beitragen, sind beispielsweise in [Mee13; Win98] zu finden. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Protein-Protein-Wechselwirkung sind das dreidimensionale Erscheinungsbild sowie die Oberflächeneigenschaften von Lysozym in seiner natürlich vorkommenden Form von Bedeutung. In Abbildung 3.2b) ist zu erkennen, dass Lysozym ein globuläres Protein ist. Allgemein liegen geladene Bereiche eher an der Oberfläche des Proteins. In der Nähe von geladenen oder polaren Bereichen der Oberfläche bildet das Wasser eine sogenannte Hydrathülle um das Protein, in der die Dichte des Wassers



**Abbildung 3.2:** a) zeigt das Protein SNase, umgeben von Wassermolekülen. Polare Regionen sind weiß dargestellt, geladene rot und apolare grün. In der Nähe von hydrophilen Bereichen der Oberfläche sind mehr Wassermoleküle zu finden. Reproduced from [Mit06] with permission from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and The Royal Society of Chemistry. b) zeigt ein dreidimensionales Modell von Lysozym aus der PDB [Pdb]. Abbildung entnommen aus [Kry08a].

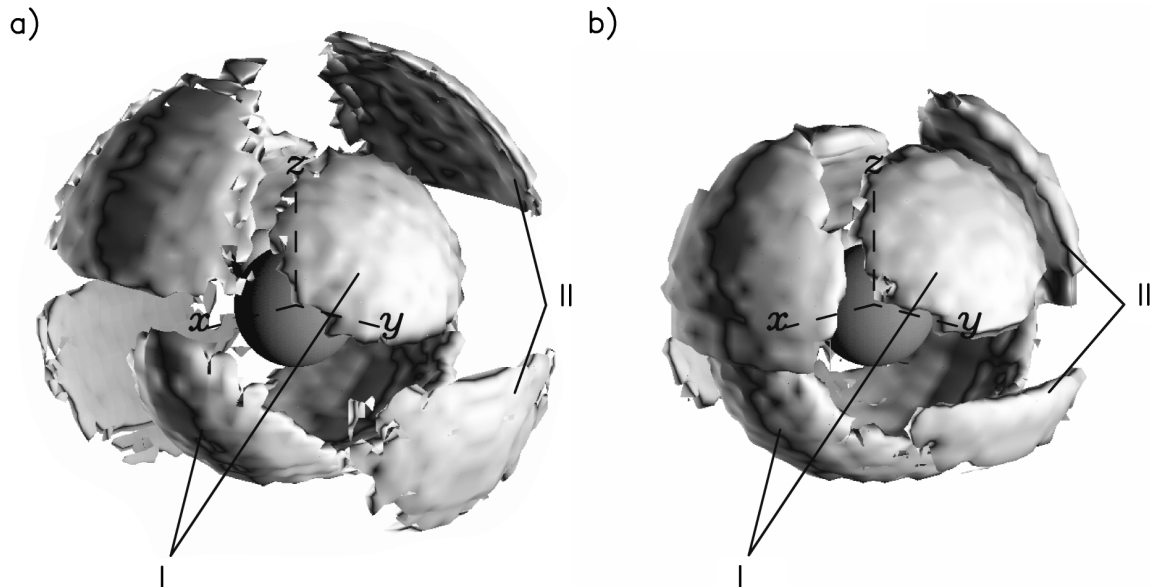
im Vergleich zum übrigen Wasser erhöht ist (s. Abbildung 3.2a)) am Beispiel von SNase). Die Auswirkungen von hydrostatischen Drücken auf Proteine werden im nächsten Kapitel genauer beschrieben.

## 3.2 Auswirkung von hydrostatischen Drücken auf Proteine

Die Natur findet immer wieder bemerkenswerte Wege, auch die scheinbar unwirtlichsten Gebiete mit Leben zu füllen, beispielsweise den Marianengraben. Die Lebewesen der Tiefsee müssen Drücke im kbar-Bereich aushalten. Da davon ausgegangen wird, dass die Vorfahren einiger Knochenfische ursprünglich Süßwasserfische waren [CV12], haben sie sich nach und nach an die extremen Umgebungsbedingungen angepasst. Der genaue Mechanismus der Proteinstabilisierung zum Erhalt ihrer Funktionalität sowie die Unterschiede dieser Mechanismen sind Gegenstand aktueller Debatten (z.B. [Yan14]). Zu der Frage, welche Auswirkungen hydrostatische Drücke auf hochkonzentrierte Proteinlösungen haben, die dann kompensiert werden müssen, kann diese Arbeit einen Teil beitragen.

Hydrostatische Drücke beeinflussen Proteine in vielfältiger Weise. Dies betrifft ebenso die Funktion des Proteins in Bezug auf die Aktivität [Mee13] wie auch die Struktur des Proteins, da hohe hydrostatische Drücke bei Proteinen auch den Prozess der Denaturierung auslösen können. Lysozym weist vier Disulfid-Brücken auf [Can65], was Lysozym stark vor druckinduzierter Entfaltung schützt. In [Sch11a] wird gezeigt, dass sich der in SAXS-Messungen ermittelbare Gyrationradius für Drücke bis 4 kbar nicht ändert. In [Sch11c] wird durch FTIR (Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie) gezeigt, dass die Sekundärstrukturen bis etwa 5 kbar unverändert sind. Somit sind für die in dieser Arbeit verwendeten Drücke von bis zu 4,5 kbar keine strukturelle Änderung des Lysozyms zu erwarten. Eine gute Beschreibung der Auswirkung hoher hydrostatischer Drücke auf die Struktur von Proteinen ist in [Mee13] zu finden.

Hohe hydrostatische Drücke beeinflussen jedoch die Struktur des Lösungsmittels, in dem das



**Abbildung 3.3:** Dichtefunktion für Wasser aus Simulationen für Wasser niedriger (links) und hoher (rechts) Dichte. Ist die zweite Hydrathülle, die in Antiphase mit der ersten ist, kollabiert, so rückt sie deutlich näher an das Wasseratom im Zentrum heran. Reprinted with permission from A. K. Soper and M. A. Ricci. In: *Phys. Rev. Lett.*, **84**(13) (2000), Copyright (2017) by the American Physical Society.

Lysozym gelöst ist, in diesem Fall Wasser. Dies betrifft die Struktur des Wassers, das nicht von den Proteinen beeinflusst wird ebenso wie die Struktur der Hydrathülle um die Proteine. Relevant in Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit ist der Kollaps der zweiten Hydrathülle des Wassers ab 2 kbar [Okh94; Sop00]. Die Dichteverteilung um ein Wassermolekül im Zentrum ist in Abbildung 3.3 für Wasser niedriger Dichte a) und hoher Dichte b) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die zweite Hydrathülle enger an das zentrale Wassermolekül heranrückt. In [Imo15] wird die Sauerstoff-Sauerstoff radiale Verteilungsfunktion für Umgebungsdruck und 10 kbar mit *ab initio* Molekulardynamik-Simulationen bestimmt. Es wird deutlich, dass die zweite Hydrathülle deutlich enger an die erste heranrückt, während die Position der ersten Hülle nahezu unverändert bleibt. Die erhöhte mittlere Anzahl von Wassermolekülen, die einander umgeben, führen zu einer Abnahme der mittleren Bindungsenergie der Wassermoleküle [Sci10]. Als ein Resultat der Reduktion der tetraedrischen Symmetrie des Netzwerkes aus Wasserstoffbrücken werden die relativen energetischen Kosten gesenkt, um Wassermoleküle in ungünstige nicht-polare Umgebungen einzufügen [Mee13]. Für ein wasserlösliches Polymer wurde experimentell die Zunahme der Hydratisierung sowohl für hydrophobe als auch für polare Anteile gezeigt [Mee05]. Dies kann einen enormen Einfluss auf die intermolekulare Wechselwirkung haben. Während der Einfluss von hydrostatischen Drücken auf die Proteinstruktur vielfach untersucht wurde, ist der Einfluss auf die Protein-Protein-Wechselwirkung deutlich weniger untersucht. Es besteht

eine enge Verbindung zwischen den Kräften, die strukturbildend wirken und den Protein-Protein-Wechselwirkungen, die hauptsächlich von den Oberflächeneigenschaften beeinflusst werden. Das Protein-Protein-Wechselwirkungspotenzial des hier untersuchten Proteins Lysozym wird in Kapitel 3.4 beschrieben. Dessen ungewöhnliche Druckabhängigkeit wird häufig auf den beschriebenen Kollaps der zweiten Hydratschale zurückgeführt [Sch11c].

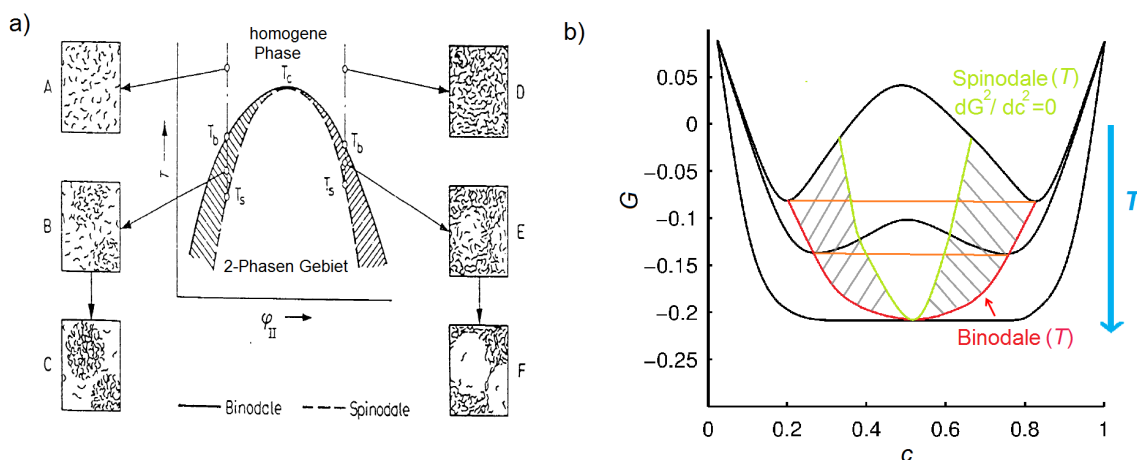
Für hohe Proteinkonzentrationen kann es zu einer Entmischung in eine proteinreiche und eine proteinarme Phase kommen. Diese Entmischung wird im folgenden Abschnitt diskutiert.



### 3.3 Phasentmischung in Kolloidlösungen

Das Phasenverhalten von Kolloidsystemen kann analog zu binären Systemen qualitativ durch die sogenannte Molekularfeldtheorie erklärt werden. Typischerweise wird das Phasenverhalten in einem Temperatur-Konzentrations-Phasendiagramm dargestellt. Aus dem Phasendiagramm kann dann abgelesen werden, in welcher Phase sich das System für verschiedene Konzentrationen und Temperaturen befindet. Neben der homogenen Phase existiert ein Zweiphasengebiet: Diese Phase wird auch als flüssig-flüssig-phasenseparierte Phase bezeichnet. In der phasenseparierten Phase lagern sich die Kolloide zu Tröpfchen mit sehr hoher Konzentration an, umgeben von Bereichen niedriger Konzentration. Abbildung 3.4a) verdeutlicht die Tröpfchenbildung in der Lösung. Die in dieser Arbeit untersuchten Lysozymlösungen weisen nach dem Übergang in die phasenseparierte Phase ein trübes Erscheinungsbild auf. In der Lösung bewirken Konzentrationsfluktuationen eine reduzierte Lichttransmission [Ish77; Rau16], außerdem verursachen die Tröpfchen, deren Größe im Mikrometer-Bereich liegt, ebenfalls eine reduzierte Lichttransmission [Sch16].

Zur qualitativen Beschreibung der Lage der Phasen und Erklärung der Fluktuationen kann man die freie Enthalpie  $G$  für verschiedene Temperaturen in Abhängigkeit der Konzentration  $c$  betrachten (s. Abbildung 3.4b)). Die temperaturabhängige, spinodale Grenze wird durch all jene Punkte definiert, an denen die zweite Ableitung der freien Enthalpie (in diesem Fall nach der Konzentration, für eine feste Temperatur) gleich null ist. Innerhalb des Gebietes ist die Ableitung negativ und schon infinitesimale Fluktuationen (in diesem Fall der Konzentration) führen zu einer Phasentmischung, da die Koexistenz einer niedrig konzentrierten Phase und einer hoch konzentrierten Phase thermodynamisch günstiger ist. Zwischen der spinodalen und der binodalen Phasengrenze, die auch Koexistenzkurve genannt wird, ist das System metastabil. In diesem Gebiet können die beiden unterschiedlichen Phasen koexistieren, man kann eine (langsame) Nukleation beobachten. Die binodale Phasengrenze findet man über eine Betrachtung der Tangenten der freien Enthalpie. Für zwei Punkte gilt  $dG(c_1)/dc = dG(c_2)/dc$ , die Tangenten stimmen also überein, was einem identischen chemischen Potenzial  $\mu$  entspricht. In Abbildung 3.4b) ist dies etwa dann der Fall, wenn  $dG(c)/dc \approx 0$  gilt. Am sogenannten kritischen Punkt treffen die binodale und die spinodale Kurven zusammen. In der Nähe des kritischen Punktes kann man eine enorme Zunahme der Fluktuationen beobachten, was zu einer Eintrübung der Lösung führt. In Abbildung 3.4a) ist eine schematische Darstellung eines Phasendiagramms eines quasibinären Systems gezeigt, in diesem Fall einer Polymerlösung. Die Phasen sind in Abhängigkeit der Temperatur  $T$  und der Konzentration, in Abbildung 3.4a) mit  $\Phi$  bezeichnet, dargestellt. Oberhalb der binodalen Grenze sind die Polymere homogen in der Lösung verteilt. Unterhalb der spinodalen Grenze liegt das Gebiet phasentmisch vor. Neben einer sehr hoch-

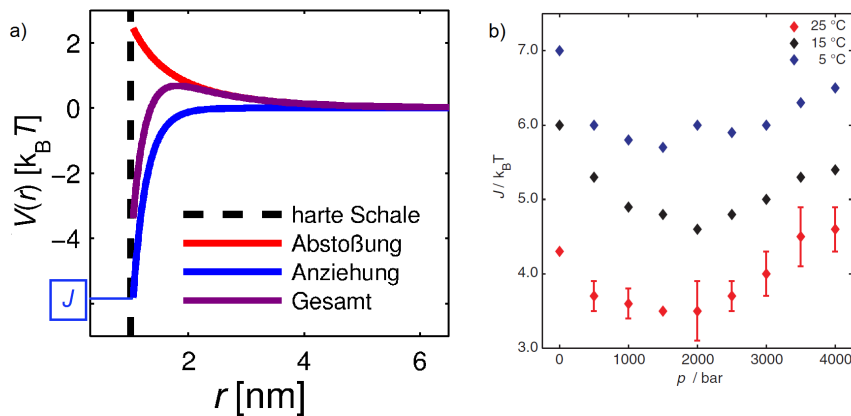


**Abbildung 3.4:** a) Schematische Darstellung eines Teils des Konzentrations-Temperatur-Phasendiagramms einer Polymerlösung.  $T_b$  bezeichnet die Temperatur der Binodalen,  $T_s$  die Temperatur der Spinodalen. Abbildung entnommen aus [Der74], editiert von R. Horst und B. A. Wolf sowie dem Autor dieser Arbeit. b) Schematische Darstellung der freien Enthalpie  $G$  eines binären Systems als Funktion der Konzentration  $c$  sowie die binodale Phasengrenze (rot), die Tangenten  $dG/dc$  (orange) und Wendepunkte (grün, spinodale Grenze). Der metastabile Bereich zwischen den Phasengrenzen ist grau schraffiert dargestellt.

konzentrierten Polymerphase existiert eine Phase sehr geringer Polymerkonzentration. Zwischen der binodalen und spinodalen Phasengrenze kann es zu einer Keimbildung kommen. Zwar ist das System stabil gegenüber kleinen Fluktuationen, örtlich stellt sich im Falle großer Fluktuationen trotzdem die thermodynamisch bevorzugte Phasentrennung ein. Die Zeitskala, auf der die Keimbildung beobachtet werden kann, ist von sehr vielen Faktoren abhängig, beispielsweise der Temperatur des Systems. Experimentell wird die Binodale häufig über Trübungsmessungen bestimmt (z.B. [Ish77; Car07]). Die Spinodale kann hingegen über eine Betrachtung der Korrelationslänge in der Lösung gefunden werden, die an der spinodalen Phasengrenze divergiert [Hop08].

### 3.4 Wechselwirkung von Kolloiden in Lösung

In lebenden Organismen wechselwirken und interagieren Proteine auf vielfältige und komplexe Art und Weise. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von hydrostatischem Druck auf das Phasenverhalten von Lysozym-Lösungen, das auf eine Änderung des Protein-Protein-Wechselwirkungspotenzials zurückgeführt werden kann. In diesem Kapitel wird erläutert, wie die Wechselwirkung von Kolloiden beschrieben werden kann und ein Bezug zu den Interaktionspotenzialen aus Kapitel 2.8.2 hergestellt.



**Abbildung 3.5:** a) DLVO-artiges Potenzial (violett) als Summe eines kurzreichweitigen, anziehenden Anteils (blau) und eines abstoßenden, langreichweitigen Anteils (rot) sowie eines Potentials der harten Schale.  $J$  ist die Stärke des anziehenden Anteils, dessen Druckabhängigkeit in b) gezeigt ist. b) Reprinted with permission from M. A. Schroer, J. Markgraf, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Möller, M. Paulus, M. Tolan and R. Winter. In: *Phys. Rev. Lett.*, **106**(17) (2011), Copyright (2017) by the American Physical Society.

Eine komplette Beschreibung eines Systems von Kolloiden in Lösung ist sehr aufwendig, da neben den Eigenschaften der Kolloide auch die Eigenschaften der Lösung relevant sind. Beispielsweise beeinflusst der pH-Wert einer Lösung die Ladung der Oberfläche der Kolloide. Auf der anderen Seite haben auch die Kolloide einen Einfluss auf die Struktur einer wässrigen Lösung. Um die Kolloide bildet sich eine Hydrathülle, die sich strukturell vom übrigen Wasser unterscheidet. Eine häufig genutzte Möglichkeit der Beschreibung der Wechselwirkung von Kolloiden ist, diese ähnlich wie Atome zu beschreiben, beispielsweise durch die Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie (DLVO-Theorie) [Der41; Ver47]. Diese berücksichtigt neben der Oberflächenladung der Partikel, die eine abstoßende Coulombwechselwirkung verursacht, eine anziehende, kurzreichweitige van-der-Waals-Wechselwirkung, die aus Dipol-Dipol-Wechselwirkungen resultiert. Die dielektrische Leitfähigkeit des Lösungsmediums sowie eine mögliche Abschirmung der Ladungen durch Salzionen in der Lösung, die sich um das Kolloid anlagern und die Reichweite des Coulomb-Potenzials senken, sind Beispiele dafür, wie das Lösungsmedium der Kolloide im Potenzial berücksichtigt wird.

Abbildung 3.5a) zeigt ein solches Potenzial. Die Stärke der attraktiven Wechselwirkung als wird hier als  $J$  bezeichnet. In diesem Potenzial ist zusätzlich ein abstoßender Anteil enthalten, der aus der harten Schale der Kolloide resultiert, die nicht ineinander eindringen können. In vorhergehenden Arbeiten wurde eine nicht-monotone Druckabhängigkeit des Parameters  $J$ , also der Stärke der attraktiven Wechselwirkung, für das Protein Lysozym gefunden. Hydrostatische Drücke senken zunächst die Attraktion bis etwa 1,5 kbar [Ort09]. Dieser Effekt wird bei

einer weiteren Erhöhung des Drucks umgekehrt, was auf den zuvor beschriebenen Kollaps der zweiten Hydratschale zurückgeführt wird [Sch11c]. Abbildung 3.5b) zeigt die Druckabhängigkeit von  $J$  für Lysozym. In dieser Arbeit werden Phasenübergänge zwischen der homogenen und der flüssig-flüssig-phasenseparierten Phase betrachtet, siehe Kapitel 3.3. Typischerweise wird in solchen Systemen die Oberflächenladung der Kolloide durch eine hohe ionische Stärke der Lösung abgeschirmt, sodass die Wechselwirkung von anziehenden Anteilen dominiert wird. Die in dieser Arbeit verwendeten Wechselwirkungspotenziale wurden in Kapitel 2.8.2 näher erläutert. Auch wenn es Hinweise gibt, dass die DLVO-Theorie nicht vollständig ist [Roi99] und die sie das Potenzial stark vereinfacht darstellt (beispielsweise ist die Ladung auf der Proteinoberfläche nicht homogen verteilt), wurden derartige Potenziale vielfach genutzt, um flüssig-flüssig Phasenübergänge zu beschreiben (z.B. [Möl14b; Ros96; Pel03]).

### 3.5 Beschreibung von Kolloiden als reale Gase

An dieser Stelle sollen nun grundlegende Überlegungen dargestellt werden, die nötig sind, um ein System aus homogen gelösten Makromolekülen mit Hilfe der van-der-Waals-Gleichung beschreiben zu können. Dabei wird sich an [Wil05] orientiert. Die van-der-Waals-Gleichung für ein reales Gas lautet

$$(P + \frac{a}{v^2})(v - b) = RT, \quad (3.1)$$

mit dem Druck  $P$ , dem molaren Volumen  $v$ , definiert als Quotient aus dem Volumen des Systems  $V$  und der Anzahl der Gasteilchen in molaren Einheiten  $n$  ( $v = V/n$ ), der Gaskonstanten  $R$ , der Temperatur  $T$ , dem Kohäsionsdruck  $a$ , der aus einer Attraktion gleichartiger Gasteilchen resultiert und dem Kovolumen  $b$ , durch den die Ausdehnung der Teilchen berücksichtigt wird; für  $a = b = 0$  erhält man die ideale Gasgleichung. Durch Umformen erhält man

$$\frac{Pv}{RT} = \frac{v}{v - b} - \frac{a}{RTv}, \quad (3.2)$$

was auf die Virialgleichungen führt:

$$\frac{Pv}{RT} = 1 + (b - \frac{a}{RT})\frac{1}{v} + \frac{b^2}{v^2} + \dots \quad (3.3)$$

$$= 1 + B_2\frac{1}{v} + B_3\frac{1}{v^2} + \dots \quad (3.4)$$

Der Vorteil dieser Virialgleichungen ist, dass mit Hilfe der statistischen Mechanik die Koeffizienten  $B_i$  berechnet werden können.

Beim Übergang zu einem System aus Makromolekülen in Lösung muss der Druck  $P$  durch den osmotischen Druck  $\Pi$  ersetzt werden und das molare Volumen  $\nu$  durch die inverse molare Konzentration  $1/c_P$  und man erhält

$$(\Pi + ac_P^2)\left(\frac{1}{c_P} - b\right) = RT . \quad (3.5)$$

Die Virialgleichung ergibt sich analog zu

$$\frac{\Pi}{RTc_P} = 1 + B_2c_P + B_3c_P^2 + \dots . \quad (3.6)$$

Für  $B_2$  gilt im Falle sphärisch symmetrischer Wechselwirkung und des Protein-Protein-Paarpotenzials  $u(r)$

$$B_2 = -2\pi \int_0^\infty (e^{-u(r)/k_B T} - 1)r^2 dr. \quad (3.7)$$

Positive  $B_2$ -Werte repräsentieren überwiegend abstoßende Kräfte, anziehende Kräfte führen zu negativen  $B_2$ -Werten. Auch wenn die  $B_2$ -Werte von Proteinen zunächst nur das Paarpotenzial repräsentieren und nichts über die kollektive Bewegung von Kolloiden in einer Lösung aussagen, so werden diese Werte doch häufig genutzt, um das Phasenverhalten von Proteinen in der Nähe des flüssig-flüssig-Phasenübergangs oder des Kristallisationsfensters zu beschreiben und zu vergleichen (z.B. [Bon97; Haa99; Möl14b]). Um die Virialkoeffizienten von Kolloiden verschiedener Größe besser vergleichen zu können, wird der normierte zweite Virialkoeffizient  $b_2$  eingeführt

$$b_2 = \frac{B_2}{B_{HS}}, \quad (3.8)$$

wobei  $B_{HS} = 2/3\pi\sigma^3$  der zweite Virialkoeffizient eines Systems aus harten Kugeln mit dem Radius  $\sigma$  ist.

Der zweite Virialkoeffizient lässt sich wie folgt für die in dieser Arbeit verwendeten Interaktionspotenziale bestimmen (s. Kap. 2.8.2).

Für ein zwei-Yukawa-Potenzial  $V_Y$  kann man  $b_2$  durch

$$b_2 = 1 + \frac{3}{4(\sigma + \delta)} \int_{\sigma+\delta}^\infty (1 - \exp(V_Y(r)/k_B T))r^2 dr \quad (3.9)$$

berechnen. Der Parameter  $\delta = 0.1437$  nm wurde in früheren Studien genutzt, um eine Divergenz bei  $r = \sigma$  zu unterdrücken, die je nach Form von  $V_Y$  auftreten kann [Poo00; Sed07; Möl14b]. Dies war in dieser Arbeit nicht notwendig ( $\delta = 0$ ).

Für ein KHK-Potenzial vereinfacht sich der normierte zweite Virialkoeffizient zu [Vli00]

$$b_2 = 1 - \frac{1}{4\tau}. \quad (3.10)$$

In den vergangenen Jahren wurden für verschiedene Modelle kurzreichweitig attraktiver Wechselwirkung die  $b_2$ -Werte für Phasenübergänge sowohl am kritischen Punkt als auch abhängig von der Kolloidkonzentration berechnet [Vli00; Nor00]. In der Nähe des kritischen Punktes können Phasenübergänge für  $b_2 < -1.5$  beobachtet werden. Dies stimmt auch mit experimentellen Resultaten überein [Möl14b]. Für abweichende Bedingungen, also höhere oder geringere Kolloidkonzentrationen, werden entsprechend niedrigere  $b_2$  Werte benötigt, was attraktiveren Bedingungen entspricht.

Die hier vorgestellte Theorie lässt sich auch auf Siliziumdioxid-Nanopartikel und Siliziumdioxid-Nanopartikel-Polymerlösungen anwenden. Diese Probensysteme werden in den kommenden Abschnitten vorgestellt.

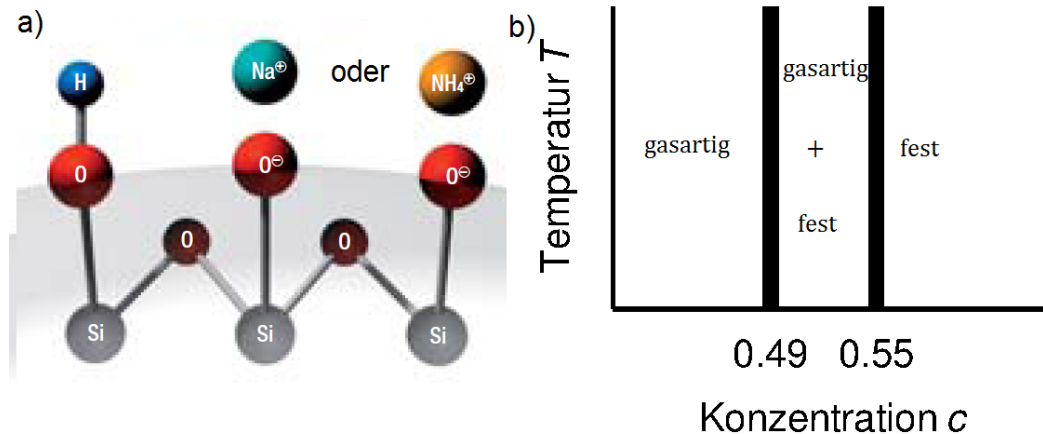
### 3.6 Siliziumdioxid-Nanopartikel

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Ludox LS Siliziumdioxid( $\text{SiO}_2$ )-Nanopartikellösung vom Lieferanten Sigma Aldrich verwendet. Laut Produktspezifikationsblatt des Lieferanten [Sig] beträgt das Molekulargewicht der Nanopartikel 60,08 g/mol. Die Kolloide werden in wässriger Lösung mit einer Partikelkonzentration von 30 wt.% geliefert, mit einem  $\text{pH} \approx 8$  bei Raumtemperatur und einer Gesamtdichte der Lösung von etwa 1,2 kg/l. Ludox  $\text{SiO}_2$ -Partikel sind in einem alkalischen Medium gelöst, in diesem Fall wurde Dinatriumoxid ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) verwendet. Dieses Medium reagiert mit der Oberfläche der Partikel und erzeugt eine negative Oberflächenladung, welche die Aggregation verhindert (s. Abb. 3.6a)). Die Konzentration von Dinatriumoxid beträgt etwa 0,1 wt.%.

Die verdünnten Lösungen dieser Arbeit wurden bei einem pH-Wert von 7 untersucht. Eine Senkung des pH-Wertes kann prinzipiell eine Aggregation verursachen, wurde jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet.

Die Siliziumdioxid-Nanopartikel wechselwirken hauptsächlich durch elektrostatische Abstoßung. Somit kann ihre Wechselwirkung ebenfalls mit der DLVO-Theorie beschrieben werden. Bleibt der pH-Wert der Lösung konstant, so ist nur eine sehr geringe Änderung der Wechselwirkung für erhöhte hydrostatische Drücke aufgrund von geänderten Permittivität des Wassers zu erwarten. Der Radius der Partikel wird in Kapitel 6.1 durch SAXS-Messungen zu etwa 8 nm bestimmt. Das Kompressionsmodul von Siliziumdioxid-Nanopartikel liegt für Umgebungsdruck bei etwa 35 GPa [Dit12]. Damit ist eine Volumenreduktion von etwa 1% für Drücke bis 4000 bar realis-

tisch. Das Phasendiagramm für wechselwirkungsfreie, also nicht geladene harte Kugeln, ist in Abbildung 3.6b) gezeigt. Für kleine Konzentrationen  $c$  liegen die Kolloide in einer gasartigen Phase vor, zwischen einem Volumenanteil von 0,49 und 0,55 existiert ein Gleichgewicht zwischen der gasartigen und der kristallinen, festen Phase. Für große Konzentrationen sind alle Kugeln kristallisiert.



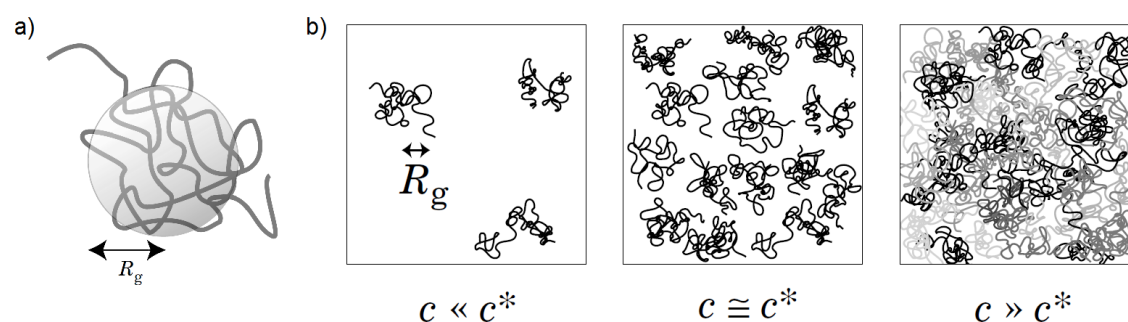
**Abbildung 3.6:** a) Darstellung der Oberfläche für Siliziumdioxid-Partikel im alkalischen Medium (Herstellerbroschüre, [Gra]). b) Phasendiagramm von wechselwirkungsfreien harten Kugeln.

### 3.7 Polymerlösungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Polymer Polyethylenglycol (PEG) verwendet, um eine Phasenseparation der Nanopartikel herbeizuführen. In diesem Kapitel werden grundlegende Überlegungen dargelegt, die zum späteren Verständnis des Phasenverhaltens notwendig sind. Hierbei wird sich auf die qualitative Beschreibung der räumlichen Ausdehnung der Polymere beschränkt. Genauere Beschreibungen von Polymerlösungen sind in [Ter02] zu finden. Hieran orientieren sich die Ausführungen in diesem Kapitel.

Polymere werden häufig als Ketten beschrieben, die aus identischen Untereinheiten, den Monomeren, aufgebaut sind. Die atomare Struktur von PEG lautet  $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$  [Sig], wobei die Struktur in Klammern die Struktur des Monomers ist, das sich für ein PEG-Molekül  $n$ -mal wiederholt. Eine Möglichkeit der Konfigurationsbeschreibung von Polymeren ist das Modell des zufälligen Weges (random walk). Der Gyrationradius von Polymeren lässt sich mit dem Flory-Exponent  $\nu \approx 0,6$  abschätzen zu

$$R_g \approx bN^\nu, \quad (3.11)$$



**Abbildung 3.7:** a) Eine Polymerkette hat ein Volumen, das in etwa einer Kugel mit dem Radius  $R_g$  entspricht. b) Darstellung der verschiedenen Konzentrationsbereiche, links: verdünnte Lösung, mittig: Überlappkonzentration, rechts: halbverdünnte Lösung. Beide Abbildungen entnommen aus [Ter02, Kapitel 1].

wobei  $b$  die Länge und  $N$  die Anzahl der Monomere ist. Hier ist bereits berücksichtigt, dass es sich um eine reale Kette handelt. Im Modell idealer Ketten können zwei Glieder denselben Raum besetzen; dies ist für realen Ketten nicht möglich. In einem einfachen Modell, das zunächst nicht die Anwesenheit weiterer Polymere berücksichtigt, wird davon ausgegangen, dass die Polymere in Lösung einen Bereich besetzen, der einer Kugel mit dem Radius  $R_g$  entspricht (Abbildung 3.7a)). Die Präsenz anderer Polymere in konzentrierten Lösungen senkt die Möglichkeit, sehr ausgedehnte Konformationen einzunehmen.

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist die Einteilung in verschiedenen Konzentrationsbereiche von Interesse, in denen sich die Eigenschaften der Polymerlösungen stark unterscheiden. Das betrifft thermodynamische Größen, zum Beispiel die Abhängigkeit des osmotischen Drucks von der Polymerkonzentration, genauso wie die Dynamik, zum Beispiel in Bezug auf die Viskosität. Die Konzentrationsbereiche sind in Abbildung 3.7b) dargestellt. Für geringe Polymerkonzentrationen wechselwirken die Polymere nur mit dem Lösungsmittel. Entspricht die Konzentration in etwa der sogenannten Überlappkonzentration  $c^*$ , so ist fast die gesamte Lösung mit Sphären ausgefüllt, es findet aber fast keine Verschränkung der Polymere ineinander statt. Abschätzen lässt sich die Überlappkonzentration durch

$$c^* = \frac{M}{N_A(\sqrt{2}R_g)^3}, \quad (3.12)$$

wobei  $N_A$  die Avogadrokonstante und  $M$  die molare Masse ist. Ausgehend von der molaren Masse (6 kg/mol), die der Hersteller angibt und dem Gyrationsradius von 2,8 nm [Kum14] folgt  $c^* \approx 0,11$  g/ml, was in etwa 11 wt.% entspricht, da die Dichte der Lösung durch die Zugabe von PEG in diesem Konzentrationsbereich nur um etwa 2-3 % erhöht wird [GT94].



Liegt die Polymerkonzentration (deutlich) oberhalb der Überlappkonzentration, so wird die Lösung als halbverdünnt bezeichnet. Während im verdünnten Bereich die Polymer-Polymer-Wechselwirkung vernachlässigt werden kann, muss diese spätestens im halbverdünnten Bereich berücksichtigt werden. Die Polymere verschränken sich ineinander, was die Viskosität der Lösung erhöht. Die Verschränkung führt auch dazu, dass die Polymere nicht mehr als Kugeln mit dem Radius  $R_g$  beschrieben werden können. Vereinfacht kann man den sphärischen Raum mit dem Radius  $\xi$ <sup>1</sup>, den ein Polymer effektiv einnimmt, mit dem sogenannten Blob-Modell beschreiben. Der Radius der Polymere oberhalb von  $c^*$  kann unter Benutzung von  $\nu \approx 0,6$  mit  $\xi = R_g(c/c^*)^{-3/4}$  angegeben werden.

Auch für das Lösungsmedium ergeben sich Konsequenzen. Nahezu das gesamte Wasser ist in diesem Bereich als Hydratwasser außen an die Polymere oder zwischen den Monomeren gebunden.

Nun wird der Einfluss von hydrostatischen Drücken auf Polymerlösungen beschrieben. Wie bereits in der Beschreibung der Auswirkung von hydrostatischen Drücken auf Proteine diskutiert, beeinflusst dieser die Wasserstoffbrückenbindungen und kann die Stärke hydrophober Wechselwirkung reduzieren. Da diese beiden Wechselwirkung entscheidend sind für die Löslichkeit von PEG in Wasser, sind auch Auswirkungen von hydrostatischen Drücken auf die Struktur der Polymere zu erwarten [Coo92a]. In [Coo92a; Ven87] wird gezeigt, dass eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf PEG-Lösungen zu einer deutlichen Reduktion der Ausdehnung des Polymers führt. Ein hydrostatischer Druck von 4 kbar konnte hier eine Reduktion der Ausdehnung von etwa 30 % verursachen, was auf veränderte Lösungsbedingungen zurückgeführt wird. Abschließend soll nun das Phasenverhalten von Polymerlösungen betrachtet werden. Polymerlösungen können ebenso wie Proteine ein Zweiphasengebiet ausbilden (s. Kapitel 3.3). Die Existenz und Lage dieses Gebietes ist unter anderem abhängig von der Struktur des Polymers, der Länge des Polymers, dem Lösungsmittel, der Temperatur und der ionischen Stärke der Lösung. Auch hydrostatische Drücke können eine Entmischung verursachen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Polymere mit einem Molekulargewicht von 6 kg/mol konnte aufgrund der Struktur (Zufallsknäuel) und der geringen Elektronendichtedifferenz zum Lösungsmedium Wasser in SAXS-Messungen nicht explizit untersucht werden. Frühere Studien bei Umgebungsdruck unter ansonsten identischen Bedingungen haben keine Phasentrennung beobachtet [Kum14; Kum16]. Unter Berücksichtigung weiterer Studien [Sun98; Sae77a; Coo92a] erscheint auch eine druckinduzierte Phasentrennung unter den hier durchgeführten Bedingungen sehr unwahrscheinlich, da hierfür höhere Temperaturen, längere Polymere oder höhere Drücke

---

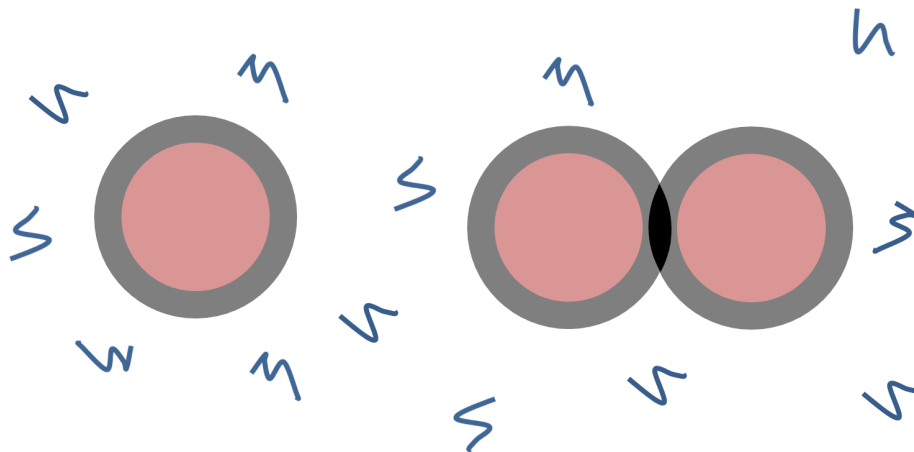
<sup>1</sup>Genauer gesagt bezeichnet  $\xi$  die Korrelationslänge. Sind zwei Polymere teilweise ineinander verschränkt, so ist die Dynamik des Polymers trotzdem nur über eine Kugel mit dem Radius  $\xi$  korreliert, auch wenn das Polymer teilweise in eine andere Kugel eingedrungen ist.

benötigt würden. In [Coo92a] wird für die hier verwendeten Polymere ein Phasenübergang erst bei etwa 7 kbar beobachtet. Die verwendete Polymerkonzentration lag zwar nur bei 2 g/l, eine starke Konzentrationsabhängigkeit des Phasenverhaltens ist aber nicht zu erwarten [Sae77b].

### 3.8 Das Phasenverhalten von Kolloid-Polymer-Lösungen

In diesem Kapitel wird das Phasenverhalten von Polymer-Kolloid-Lösungen beschrieben. Sogenannte Verarmungseffekte spielen eine zentrale Rolle für die Wechselwirkung von Polymeren und Kolloiden. Diese können beobachtet werden, wenn Polymere in eine Lösung mit größeren Kolloiden gegeben werden. Wenn die Polymere nicht an den Kolloiden adsorbieren, können sich beide Komponenten entmischen. In einem Bereich konzentrieren sich die Polymere, im anderen Bereich die Kolloide [Vri76]. Die Entmischung verringert die freie Enthalpie des Systems. An dieser Stelle soll schematisch die Ursache für Verarmungskräfte erklärt werden, die der Phasentrennung zu Grunde liegt.

In Abbildung 3.8 sind zwei sphärische Kolloide gezeigt (rosa Fläche) sowie in blau die deutlich



**Abbildung 3.8:** Grafische Darstellung von Verarmungseffekten: sphärische Kugeln (rosa) haben eine Verarmungsschicht (grau gefärbt), in den der Mittelpunkt der blauen Polymere nicht eindringen kann. Während auf die linke Kugel der osmotische Druck isotrop wirkt, resultiert aus der Überschneidung der Verarmungsbereichen der rechten Kugeln eine attraktive Kraft.

kleineren Polymere. Weil die nicht adsorbierenden Polymere in der Nähe der Oberfläche an Konfigurationsentropie verlieren, bildet sich in der Nähe der Oberfläche der Kolloide eine Verarmungsschicht aus (grau). Während auf eine einzelne Kugel der osmotische Druck isotrop wirkt, ist das für zwei Kolloide in kleinem Abstand nicht der Fall: die beiden Verarmungsschichten überlappen sich (schwarz gefärbt), was in einer effektiv attraktiven Kraft resultiert. Eine erste mathematische Beschreibung dieser Kraft wurde durch Asakura und Oosawa veröffentlicht

[Asa54]. In dieser Beschreibung, in der die Ausdehnung und Wechselwirkung der Polymere untereinander nicht berücksichtigt wird, führt eine Zugabe von Polymeren immer zu einer Zunahme der attraktiven Kraft zwischen den Kolloiden, ausgelöst durch eine Zunahme der osmotischen Druckdifferenz. Dies destabilisiert die Lösung und kann dazu führen, dass oberhalb einer bestimmten Polymerkonzentration eine Phasentrennung beobachtet werden kann.

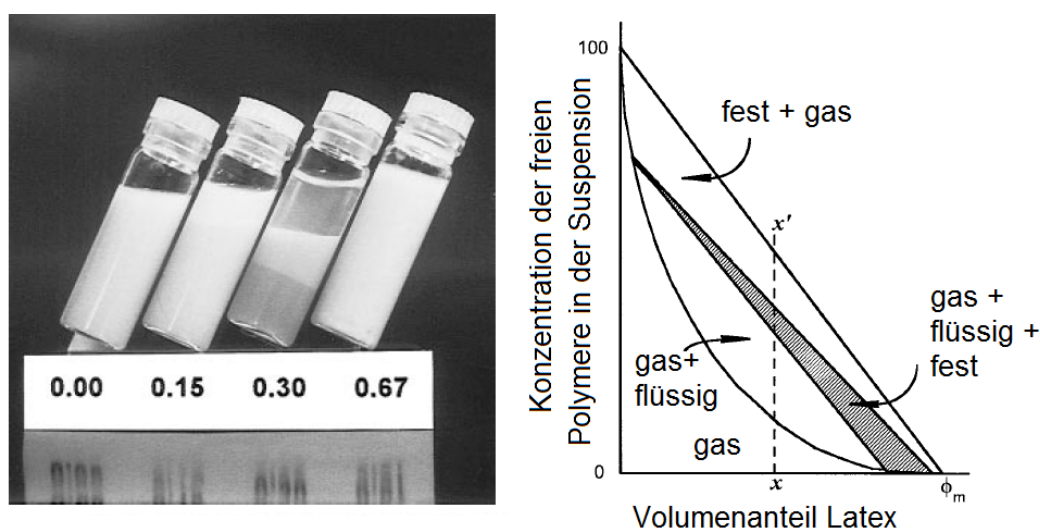
Auf Basis der statistischen Mechanik konnten Gast *et al.* [Gas83] mit Hilfe der thermodynamischen Störungstheorie das Phasendiagramm für verschiedene Größenverhältnisse von nicht adsorbierenden Polymeren<sup>2</sup> (Gyrationsradius  $R_g$ ) und harten Kugeln (Radius  $R$ ) in Abhängigkeit von der Polymer- bzw. Kolloidkonzentration bestimmen. Das Größenverhältnis spielt eine zentrale Rolle, da sie die Reichweite der attraktiven Kräfte des Systems festlegt. Je größer das Polymer, desto breiter die Verarmungsschicht in Abbildung 3.8. Die Phasengrenzen lassen sich dann über eine Betrachtung der freien Enthalpie vorhersagen. Für das Größenverhältnis  $R_g/R < 0,32$  führt eine Zugabe von Polymeren zu einer Verbreiterung des Koexistenzbereiches der festen und gasförmigen Phase, für  $R_g/R > 0,32$  kann auch eine flüssig-flüssig-Phasentrennung in eine kolloidreiche und kolloidarme Phase beobachtet werden.

Eine Erweiterung stellt die osmotische Gleichgewichtstheorie [Lek92] dar, die zusätzlich das effektiv für die Polymere verfügbare Volumen berücksichtigt [Tui08]. Diese sagt ein später experimentell bestätigtes Dreiphasen-Koexistenzgebiet voraus [Gas86]. Ein typisches derartiges Phasendiagramm ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Bei den Proben [Fae97] handelt es sich um sterisch stabilisierte, 67 nm große Latexteilchen mit verschiedenen Konzentrationen von Hydroxyethylcellulose (HEC), die die Rolle der nicht-adsorbierenden Polymere erfüllen. Im Phasendiagramm liegen die Konzentrationen aufsteigend entlang der gestrichelten  $x-x'$ -Linie. Die Probe ohne HEC ist homogen, die Latexteilchen liegen in einer gasförmigen Phase vor. Bei 0,15 vol% HEC erkennt man (schwach) eine Phasentrennung zwischen der höher konzentrierten flüssigen Phase (unten, etwas dunkler) und einer weniger konzentrierten Phase (oben). Für 0,3 vol% lässt sich deutlich eine Trennung in eine feste Phase brauner Partikel, eine flüssige, trübe Phase und eine sehr schwach konzentrierte, gasartige Phase erkennen. Für 0,67 vol% ist die Lösung wieder trüb. Es koexistieren eine gasartige und eine feste Phase, die bestimmt wird von der festen Phase mit einer kleinen Menge weißlicher Lösung dazwischen. Eine Verkipfung um  $30^\circ$  beeinflusst nicht die Oberfläche der festen Phasen, zu sehen im Sediment der 0,3 vol% Probe sowie für die 0,67 vol%-Probe. Die Probe wurde zuvor einige Tage aufrecht gelagert.

Die bisher vorgestellten Modelle vernachlässigen die Polymer-Polymer-Wechselwirkung. Wird die Überlappkonzentration erreicht, so kann die Polymer-Polymer Wechselwirkung aber keinesfalls vernachlässigt werden. In [Kum14; Kum16] wird experimentell ein System von Kolloiden untersucht, das durch Zugabe von Polymeren in die flüssig-flüssig-phasenseparierte Phase eintritt,

---

<sup>2</sup>Genauer: Kugeln, die ineinander eindringen können



**Abbildung 3.9:** Links: Foto von Proben mit Latex Teilchen und verschiedenen HEC-Konzentrationen. Rechts: Phasendiagramm nach Lekkerkerker *et al.* für ein Polymer: Partikel Größerverhältnis größer als 0,32. Reprinted with permission from: M. A. Faers and P. F. Luckham. Effect of the Steric Stabilizing Layer on the Phase Behavior and Rheology of Small Polystyrene Latex Dispersions Induced by Changes to the Concentration of Nonadsorbing Hydroxyethylcellulose. In: *Langmuir*, **13**(11) (1997), Copyright (2017) American Chemical Society.

bei einer weiteren Erhöhung der Polymerkonzentration jedoch wieder in die homogene Phase zurückkehrt. Dies wird der Polymer-Polymer-Wechselwirkung zugeschrieben. In der Literatur werden beispielsweise Modelle diskutiert, die zu einer sogenannten Verarmungsstabilisierung der Lösung führen (u.a. [Fei80; Shv13]). In [Fei80] wird gezeigt, dass sehr hohe Polymerkonzentrationen ein besonders ausgeprägtes Maximum der freien Enthalpie in der Wechselwirkung der Kolloide verursachen können, das von den Kolloiden möglicherweise nicht überwunden werden kann um die eigentlich bevorzugte Phasentrennung zu erreichen.

Eine deutlich qualitativere Beschreibung der Polymer-Polymer-Wechselwirkung wird durch die PRISM-Theorie (engl. Polymer Reference Interaction Site Model, [Sch87; Cur87a; Cur87b]) geliefert. Hierzu musste die RISM-Theorie (engl. Reference Interaction Site Model, [Cha72]) auf Polymere verallgemeinert werden. Die 1972 von Chandler und Andersen vorgeschlagene RISM-Theorie erweiterte die Ornstein-Zernicke Gleichung für einatomige Flüssigkeiten auf molekulare Flüssigkeiten in einer Art und Weise, die sowohl inter- als auch intramolekulare Wechselwirkung berücksichtigte. Grundsätzlich basiert RISM auf der Idee, dass intramolekulare chemische Bindungen der starren Moleküle auch die intermolekulare Packung beeinflussen können. Sie verwendeten eine Percus-Yevick-artige Näherung, um die direkten Korrelationsfunktionen analog zum einatomigen Fall zu berechnen [Sch97].

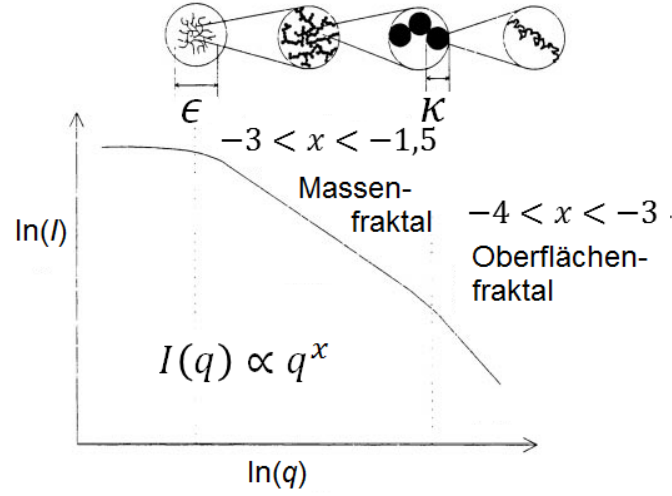
Durch PRISM können grundsätzlich die zweiten Virialkoeffizienten auch für polydisperse Systeme,

verschiedene Größenverhältnisse von Kugeln und Polymere sowie alle Polymerkonzentrationen berechnet werden. Durch PRISM konnte vielfach gezeigt werden, dass durch Erhöhung der Polymerkonzentration über die Überlappkonzentration hinaus die Kolloid-Kolloid-Wechselwirkung wieder repulsiver wird. Die Reduktion der attraktiven Wechselwirkungsstärke resultiert aus der in Kapitel 3.7 beschriebenen Reduktion der effektiven Polymergröße für Konzentrationen oberhalb der Überlappkonzentration. Außerdem können sich die Polymere in der Nähe der Partikel deformieren und thermodynamisch nicht bevorzugte Konformationen einnehmen, um Lücken in der Lösung zu füllen, was ebenfalls zu einem reduzierten Potenzial führt [Han99]. Eine Abnahme der Attraktion kann auch für Systeme mit sehr geringen Kolloidkonzentrationen gelten, für die angenommen wird, dass die Kolloide die Struktur der Polymerlösung nicht beeinflussen [Fuc01].

### 3.9 Die Struktur der Nanopartikel in der hochkonzentrierten Phase

In diesem Kapitel wird ein System aus Nanopartikeln und Polymeren vorgestellt, welches phasensepariert vorliegt. Phasensepariert bedeutet, dass die Nanopartikel in einer hochkonzentrierten Phase, in Tröpfchen, vorliegen. Es wird diskutiert, inwiefern die Nanopartikel in der hochkonzentrierten Phase eine fraktale Struktur bilden, da zumindest aggregierte Kolloide typischerweise eine fraktale Struktur aufweisen [Kum14]. Fraktale sind durch ihre hohe Selbstähnlichkeit gekennzeichnet; selbstähnliche Strukturen weisen unabhängig von der Größenskala, auf der sie betrachtet werden, ähnliche Strukturen auf. Abbildung 3.10 zeigt Fraktale in verschiedenen Größenskalen und typische Streuintensitäten. Massenfraktale können ein aus Einzelelementen aufgebautes, chaotisch zusammenhängendes System beschreiben. Oberflächenfraktale hingegen bestehen aus einem homogenen Kern und einer rauen Oberfläche.

Bei der Betrachtung von Fraktalen ist es sinnvoll, zunächst verschiedene Längenskalen zu betrachten. Im reziproken Raum lässt sich abschätzen, dass das Modell der Fraktale nur für  $q > 2\pi/\epsilon$  gelten kann, wobei  $\epsilon$  die Größe der Fraktale ist. Betrachtet man die Fraktale in einem großen Maßstab, so gelangt man zur Größe  $\kappa$ . Ab dieser Größe bildet die Messung die Oberfläche der Fraktale ab. Die Größe  $\kappa$  kann nicht abgeschätzt werden, da die genaue Struktur der Objekte nicht bekannt ist. Schließlich ist der Durchmesser  $d$  der einzelnen Elemente, aus denen das Fraktal aufgebaut ist, die kleinstmögliche Längen, auf der Fraktalität gelten kann. Der Durchmesser der Nanopartikel beträgt etwa 16 nm, es gilt also  $q < 2\pi/16 \text{ nm} \approx 0,4 \text{ nm}^{-1}$ . Nun wird die zu erwartende Streuintensität für Massen- und Oberflächenfraktale betrachtet. Für ein System aus aggregierten Kugeln mit dem Radius  $R$  und dem Formfaktor  $P_K(q)$ , sowie dem



**Abbildung 3.10:** Darstellung der verschiedenen Größenskalen und daraus resultierenden Streuintensitäten. Die schwarzen Kugeln sind aus einzelnen Kugeln aufgebaut. Die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel entsprechen diesen Untereinheiten. Abbildung entnommen aus [Moo].

Strukturfaktor  $S_{MF}$  gilt nach [Tei88] für die zu erwartende Streuintensität eines Massenfraktals

$$I(q) \propto P_K(q) \cdot S_{MF}(q) \quad (3.13)$$

$$\propto P_K(q) \cdot \left( 1 + \frac{1}{(qR)^D} \cdot \frac{D\Gamma(D-1)}{(1 + 1/(q^2\nu^2))^{(D-1)/2}} \cdot \sin[(D-1)\text{atan}(q\nu)] \right) \quad (3.14)$$

$$\propto q^{-D} . \quad (3.15)$$

Hierbei ist  $D$  die sogenannte fraktale Dimension, welche die Komplexität des Fraktals angibt,  $\Gamma(x)$  ist die Gammafunktion mit dem Argument  $x$  und  $\nu$  ist die Korrelationslänge im Massenfraktal. Für große Korrelationslängen  $\nu^{-1} \ll q$  gilt

$$S_{MF} \approx 1 + \left( \frac{D\Gamma(D-1)}{(qR)^D} \right) \cdot \sin[(D-1)\pi/2] . \quad (3.16)$$

Als nächstes wird die Streuintensität für fraktale Oberflächen beschrieben. Eine Verallgemeinerung des Porodschen Gesetzes für den Fall fraktaler Oberflächen führt auf [Tei88]

$$I(q) \propto P_{OF}(q) \quad (3.17)$$

$$\propto \Gamma(5 - D_O) \cdot \sin[(D_O - 1)\pi/2] \cdot q^{-(6-D_O)}, \quad (3.18)$$

wobei  $P_{OF}$  der Formfaktor der fraktalen Oberfläche ist und  $2 < D_O < 3$  gilt.

Neben den Fraktalmodellen wird an dieser Stelle ein reines Potenzgesetz gemäß

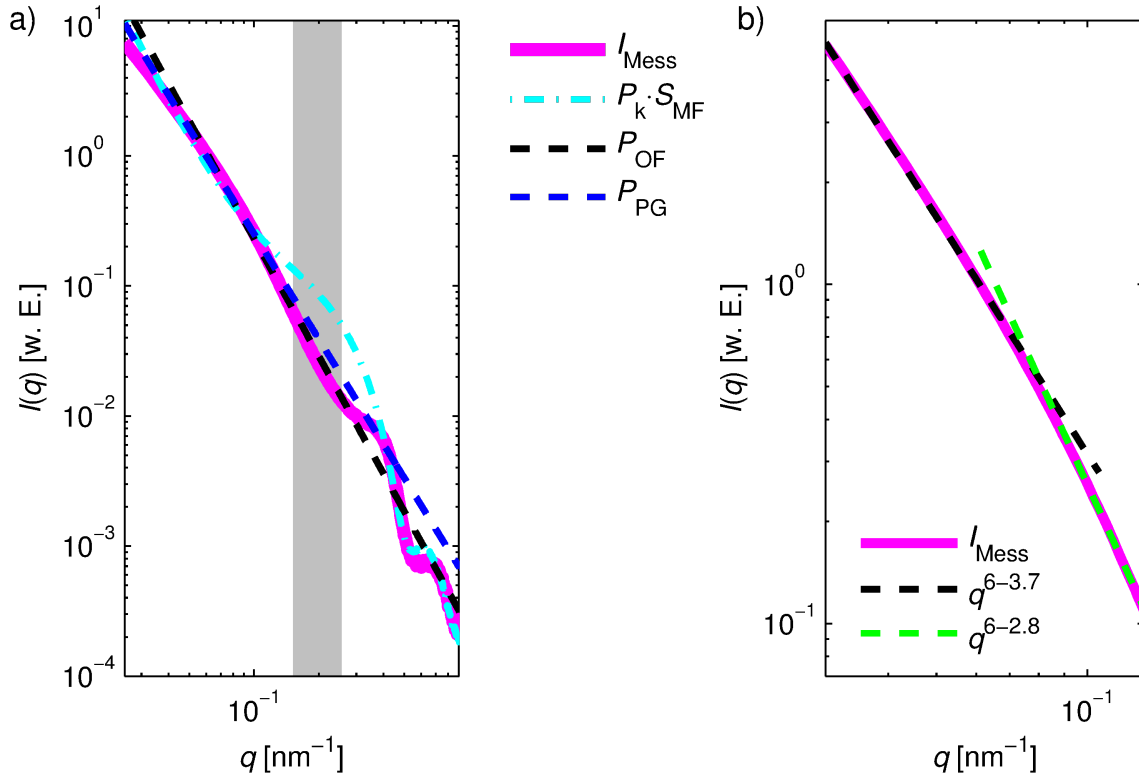
$$I(q) \propto k \cdot q^{-(6-D_{PG})} \quad (3.19)$$

mit den Parametern  $k$  und  $D_{PG}$  gezeigt, das zur besseren Vergleichbarkeit analog zur Formel (3.18) formuliert wird. Die Parameter sind dabei völlig frei und lassen keine Rückschlüsse auf die Struktur der untersuchten Objekte zu.

Die Modelle sollen nun anhand einer Messung diskutiert werden. Abbildung 3.11a) (magenta) zeigt die gemessene Streuintensität für ein System aus Kolloiden (Durchmesser etwa 16 nm) in der phasenseparierten Phase. Anhand dieser Daten wird nun geprüft, welches der vorgestellten Modelle gut zu den Daten passt. Auch für sehr kleine  $q$  kann man einen starken exponentiellen Abfall beobachten. Ein Vergleich mit 3.10 zeigt, dass für den hier alle hier zugänglichen  $q > 2\pi/\epsilon$  gilt. Offensichtlich ist nur für  $q < 0,15 \text{ nm}^{-1}$  eine exponentiell abfallende Intensität zu beobachten. Dies legt nahe, dass spätestens bei dem doppelten Kugeldurchmesser die mögliche Fraktalität verloren geht. Deswegen wird nur  $I(q < 0,15 \text{ nm}^{-1})$  zur Prüfung der Modelle verwendet. Es ist zu erkennen, dass keine der vorgeschlagenen Modelle die Daten ausreichend beschreiben kann. In Abbildung 3.11b) werden für große bzw. kleine  $q$  Tangenten an  $\ln(I(q))$  gezeichnet, um zu zeigen, dass die Steigung nicht über den gesamten  $q$ -Bereich konstant ist. Für kleine  $q$  fällt die Intensität langsamer ab als für große  $q$ . Dies lässt darauf schließen, dass entweder  $q \approx 2\pi/\kappa$  in den Messbereich fällt oder das untersuchte System keine Fraktalität aufweist. Aus diesem Grund wurde für die Auswertung der Daten stets das modellfreie Potenzgesetz verwendet. Wie bereits erwähnt, können aus den Parametern keine Rückschlüsse auf die Parameter der untersuchten Objekte gezogen werden. In dieser Arbeit werden die Exponenten nur verwendet, um zu beschreiben, ob hydrostatische Drücke Auswirkungen auf die Struktur der hochkonzentrierten Nanopartikelphase haben. Deswegen wurde ein mittlerer Exponent über den gesamten verfügbaren  $q$ -Bereich, also  $0,03 < q < 0,15 \text{ nm}^{-1}$  bestimmt, da eine Änderung des Exponenten einen Hinweis auf strukturelle Änderungen der untersuchten Objekte gibt.

Nun soll die Messung für  $q > 0,25 \text{ nm}^{-1}$ , also rechts des in 3.11a) grau gefärbten Bereiches, betrachtet werden. Der Verlauf der Streukurve lässt erkennen, dass ein Maximum bei etwa  $q \approx 0,45 \text{ nm}^{-1}$  vorliegt. Es ist naheliegend anzunehmen, dass sich das System auf der nm-Skala als ein System geordneter, harter Kugeln beschreiben lässt. Gemäß  $q \cdot r \approx 2\pi$  findet man, dass  $g(r)$  ein Maximum bei  $r \approx 14 \text{ nm}$  aufweist. Dies entspricht in etwa dem Teilchendurchmesser und legt nahe, dass ein System aus dicht gepackten Kugeln eine gute Beschreibung ist (s. Kapitel 2.8.2). Abweichungen entstehen aus dem schwer bestimmbareren Untergrundsignal.

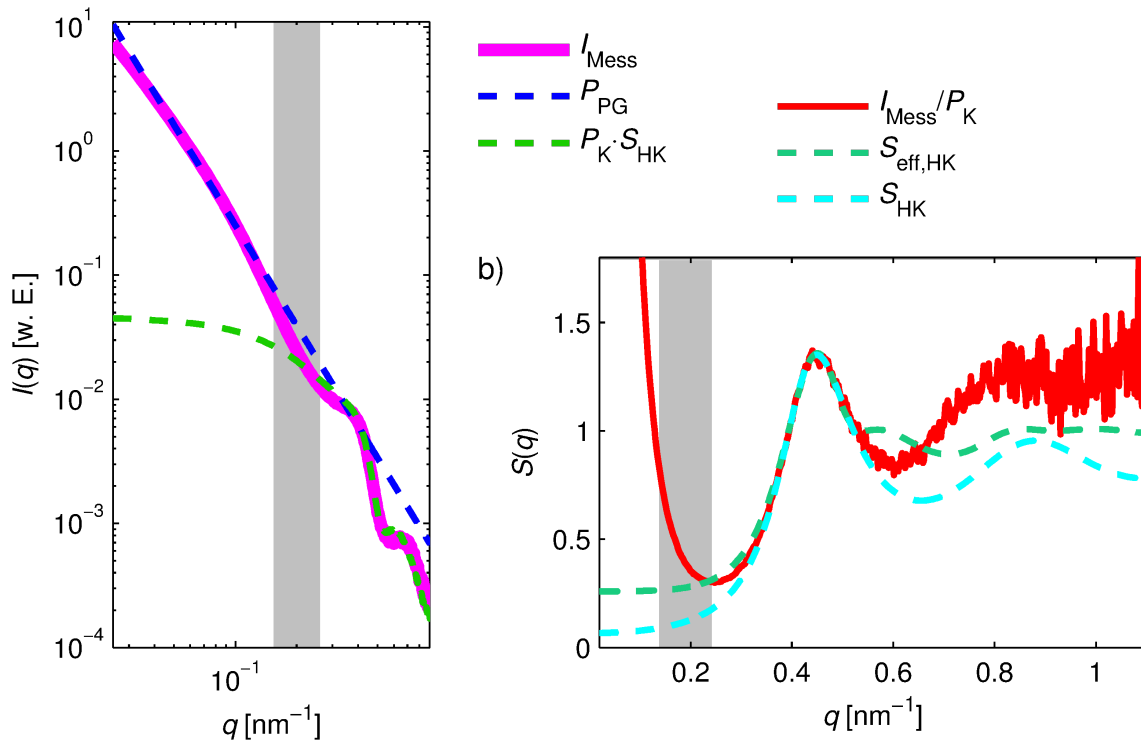
In Abbildung 3.12 sind zwei verschiedenen Modelle zur Beschreibung der Daten grafisch



**Abbildung 3.11:** a) Darstellung der gemessenen Intensität (magenta) zusammen mit der berechneten Intensität für das Modell der Massenfraktalität (cyan,  $D=2,9$ ), der Oberflächenfraktalität (schwarz,  $D_O = 3,0$ ), dem modellfreien Potenzgesetz ( $D_{\text{PG}} = 3,3$ ). b) zeigt den Bereich für links des in a) grau gefärbten Bereiches für andere  $D_{\text{PG}}$ .

dargestellt,  $P_{\text{PG}}$  ist weiterhin die Streuintensität nach dem reinen Potenzgesetz,  $P_K$  ist der Formfaktor der Nanopartikel. Hier wurde an die Daten der Strukturfaktor für ein System aus harten Kugeln  $S_{\text{HK}}$  angepasst. Der effektive Strukturfaktor  $S_{\text{eff,HK}}$  berücksichtigt mit  $\beta(q)$  auch die Polydispersität der Partikel. In beiden Fällen bilden die Strukturfaktoren den Bereich um das Maximum bei  $q \approx 0,45 \text{ nm}^{-1}$  gut ab. Aus dem ersten Maximum lassen sich Informationen über typische Volumenanteile  $\text{vol}F$  der Kugeln in den Tröpfchen sowie den Radien  $R$  der Kugeln gewinnen.  $S_{\text{eff,HK}}$  wurde mit  $R = 6,77 \text{ nm}$  und  $\text{vol}F = 0,32$  berechnet, für  $S_{\text{HK}}$  gilt  $R = 7,12 \text{ nm}$  und  $\text{vol}F = 0,30$ . In beiden Fällen wird das Minimum des Strukturfaktors nicht gut abgebildet und für  $q > 0,7 \text{ nm}^{-1}$  weicht die gemessene Intensität deutlich nach oben ab. Der Grund hierfür kann in dem schwer bestimmbareren Untergrundsignal der Tröpfchen liegen. Da das charakteristische Maximum in beiden Fällen gut abgebildet wird und sich auch  $R$  und  $\text{vol}F$  für die beiden Modelle nur geringfügig unterscheiden, wird im Folgenden stets der effektive Strukturfaktor verwendet, der auch zur Beschreibung aller anderen Messungen verwendet wurde. Der grau gefärbte Bereich in den Abbildungen markiert somit den Übergang zwischen dem





**Abbildung 3.12:** a) Darstellung der gemessenen Intensität (rot) zusammen mit der berechneten Intensität für ein System harter Kugeln (grün). b) zeigt den gemessenen Strukturfaktor sowie einen Strukturfaktor für harte Kugeln mit dem Radius 7,12 nm und dem Volumenanteil 0,32 (cyan) und den effektiven Strukturfaktor für harte Kugeln mit dem Radius 6,77 nm und dem Volumenanteil 0,30 (grün).

Größenbereich, in dem die Streuintensität die Streuung an den Tröpfchen im abbildet sowie dem Bereich, in dem die Streuung an dem System geordneter Kugeln dominiert.



# Kapitel 4

## Aufbau und Durchführung

In diesem Kapitel wird der experimentelle Aufbau vorgestellt. Zunächst werden die Messplätze gezeigt 4.1. Die Messungen wurden in einer speziell angefertigten Hochdruckzelle durchgeführt, die in Kapitel 4.2 dargestellt ist. Kapitel 4.3 zeigt den Aufbau der Trübungsmessungen. In Kapitel 4.4 wird die Probenherstellung erläutert, abschließend wird in Kapitel 4.5 die Durchführung und Auswertung der Experimente erklärt.

### 4.1 Messplätze

In diesem Abschnitt werden nach einer allgemeinen Einführung in den grundlegenden Aufbau von SAXS-Experimenten die genutzten Messplätze vorgestellt.

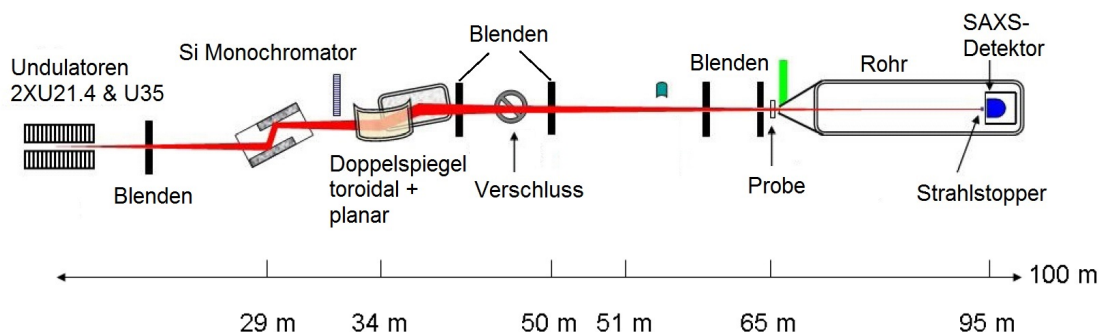
Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten SAXS-Experimente wurden an Synchrotronstrahlungsquellen durchgeführt. Synchrotronstrahlungsquellen sind Speicherringe, in denen sich Elektronenpakete in einer vakuumierten Speicherkammer etwa mit Lichtgeschwindigkeit auf geschlossenen Bahnen bewegen und Röntgenstrahlung erzeugen. Der Aufbau der Messplätze kann in vier Bereiche gegliedert werden: Erzeugung eines monochromatischen und fokussierten Röntgenstrahls, die Probenumgebung, der Bereich zwischen der Probenumgebung und Detektor und der Detektor.

Die Röntgenstrahlen werden in modernen Synchrotronstrahlungsquellen vorzugsweise durch Undulatoren erzeugt. Bei der Passage der Elektronenpakete durch diese werden die Elektronenpakete durch Magnetfelder auf sinusartige Bahnen gelenkt, was zu einer Abgabe von Synchrotronstrahlung führt. Diese ist zunächst noch polychromatisch und wird üblicherweise mittels einer Doppelkristallanordnung durch Braggreflektion monochromatisiert, für weiche Röntgenstrahlung können Gitter verwendet werden. Die sogenannte Strahloptik legt die Strahlgröße fest. Gegebenenfalls kann mit einem Absorber die Strahlungsintensität verringert werden,

um eine Beschädigung der Probe oder des Detektors zu verhindern. Außerdem gibt es vor der Probenumgebung einen oder mehrere Verschlüsse, die der Sicherheit dienen, den Strahl absorbieren und so ein Arbeiten am Messplatz ermöglichen. An der Probe wird der Strahl dann teilweise gestreut. Hinter der Probe befindet sich ein vakuumiertes oder mit Helium geflutetes Rohr, das Streuung an Luft verhindert. Die von der Probe gestreute Strahlung wird dann am Detektor gemessen. Die Details dieses Strahlweges von der Erzeugung bis zum Detektor können sich sehr stark unterscheiden. Die Gesamtheit der verschiedenen Bauteile zwischen Erzeugung des Strahls und Detektierung kann als Strahllinie bezeichnet werden. Die verschiedenen Strahllinien, an denen die Experimente durchgeführt wurden, werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

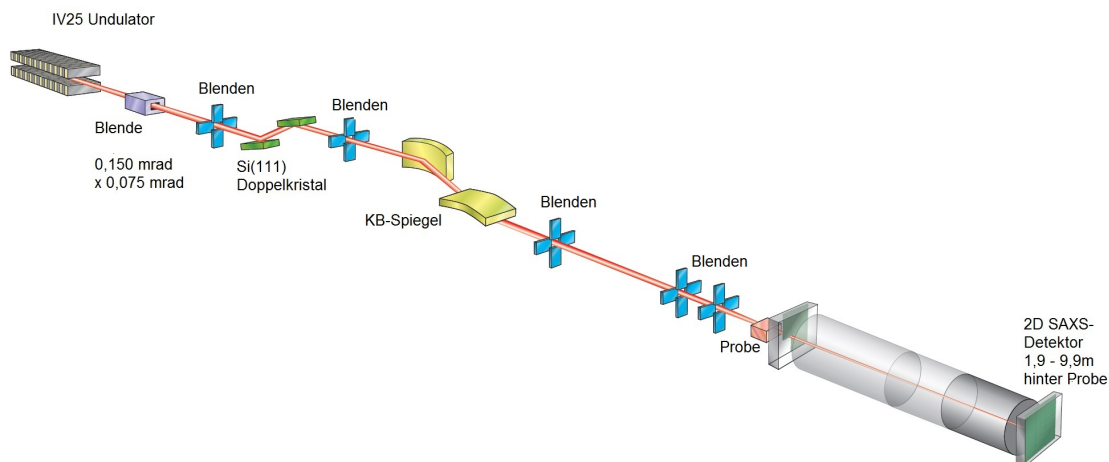
#### 4.1.1 Strahllinie ID02 an der ESRF

Die European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) ist eine internationale Forschungseinrichtung in Grenoble, Frankreich. Die für diese Arbeit genutzte Strahllinie ID02, deren Charakteristik nun erläutert wird, ist besonders für SAXS-Experimente geeignet. Die schematische Darstellung der Strahllinie (Abbildung 4.1) sowie alle weiteren Informationen sind der Website der Strahllinie [Id0a] entnommen. Die Röntgenstrahlung wird in den drei Undulatoren mit einem



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Strahllinie ID02 an der ESRF ([Id0b], Beschriftung übersetzt und vereinfacht).

hohen Photonenfluss und geringer Divergenz erzeugt. Der Strahl wird in einem mit flüssigen Stickstoff gekühlten Silizium(111)-Doppelkristallmonochromator monochromatisiert, es folgt eine Anordnung aus einem fokussierenden toroidalen Spiegel und einem planaren Spiegel. Insgesamt verfügt die Strahllinie über sechs Blenden, die das Strahlprofil definieren und unerwünschte Streustrahlung absorbieren, die zum Beispiel an den Kanten der vorhergehenden Blenden erzeugt wird. Die an der ESRF durchgeführten Experimente an Lysozym wurden mit einer Photonenenergie von 16 keV durchgeführt, typischerweise mit einem Graphit-Absorber von



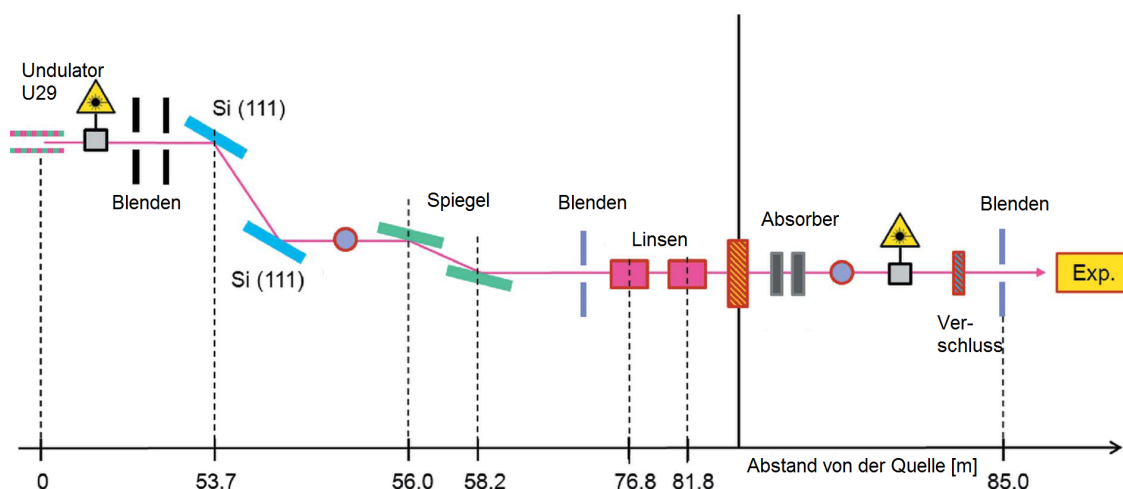
**Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung der Strahllinie I22 an der Diamond Light Source ([I22], Beschriftung übersetzt und vereinfacht).

mindestens 1-2 mm Dicke. Die Messzeit betrug zwischen 0,05 Sekunden bis 1 Sekunde pro Druckschritt. Der Probe-Detektor-Abstand betrug 1,5 m. Die Nanopartikel-PEG Proben wurden bei einer Photonenenergie von 16,48 keV ohne Absorber gemessen, bei einer Belichtungszeit von etwa 0,1 Sekunden. Der Probe-Detektor-Abstand betrug 5 m, bei einigen vorbereitenden Messungen wurden auch größere oder kleinere Abstände verwendet. Die gestreute Intensität wurde mit einem Rayonix MX-170HS Detektor gemessen. Hierbei handelt es sich um einen CCD-Detektor mit einer sensitiven Fläche von  $170 \times 170 \text{ mm}^2$ , es wurde eine Pixelgröße von  $89 \times 89 \text{ }\mu\text{m}^2$  verwendet. Direkt vor dem Detektor wurde am Strahlstopper die transmittierte Intensität gemessen. Der Strahlstopper schützt den Detektor vor dem Primärstrahl. Die Größe des Strahls betrug in  $450 \times 750 \text{ }\mu\text{m}^2$ , wobei eine Verbreiterung des Strahls hinter den Blenden nicht berücksichtigt ist.

#### 4.1.2 Strahllinie I22 an der DLS

Die Diamond Light Source (DLS) ist eine Synchrotronstrahlungsquelle in Oxfordshire, England. Im Rahmen dieser Arbeit wurden an der Strahllinie I22 (Abbildung 4.2) hochkonzentrierte Proteinlösungen gemessen. Die Informationen über die Strahllinie wurden [I22] entnommen. Die Röntgenstrahlung wird in einem Undulator erzeugt. Die Strahllinie verfügt über fünf Blenden, die das Strahlprofil definieren, die Monochromatisierung findet in einem Silizium(111)-Doppelkristallmonochromator statt, gefolgt von zwei Kirkpatrick-Baez-Spiegeln (KB-Spiegeln), die für die Fokussierung des Strahls sorgen.

Die Experimente wurden bei einer Photonenenergie von 18 keV durchgeführt, der Abstand von



**Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung der Erzeugung der an der P03 genutzten Röntgenstrahlung ([Buf12], Beschriftung übersetzt und vereinfacht).

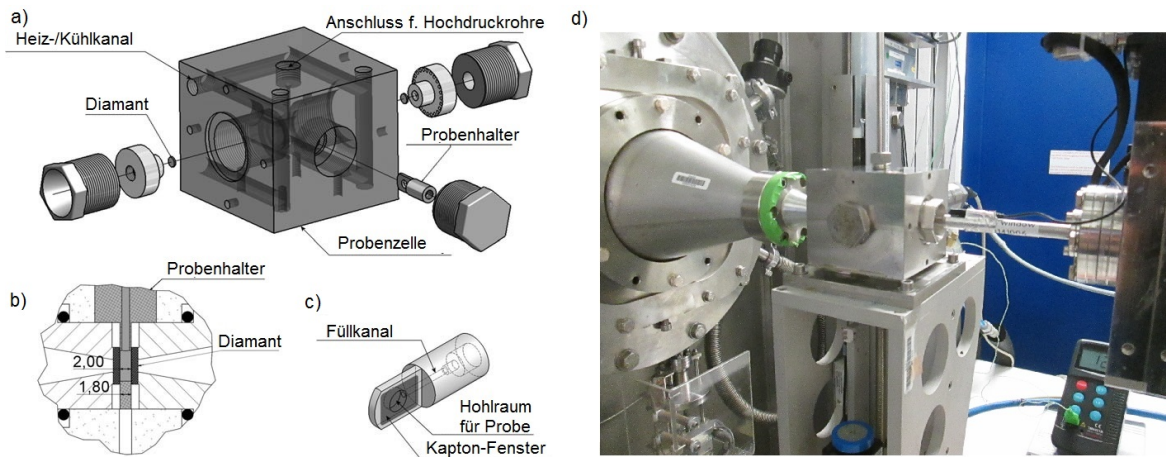
Probe und Detektor betrug 4,7 m, die Belichtungszeit pro Druckschritt betrug in der Regel eine Sekunde, die Größe des Strahls bei SAXS-Messungen an der I22 ist üblicherweise  $320 \times 80 \mu\text{m}^2$  am Probenort. Zwischen Druckzelle und Detektor befindet sich erneut ein vakuumiertes Rohr. Die gestreute Strahlung wurde mit einem Pilatus P3-2M detektiert. Dabei handelt es sich um einen Silizium-Hybrid-Pixel-Detektor mit einer sensitiven Fläche von  $253 \times 289 \text{ mm}^2$  und einer Pixelgröße von  $172 \times 172 \mu\text{m}^2$ .

### 4.1.3 Strahllinie P03 am DESY

Das Deutsche Elektronen-Synchrotron DESY ist ein Forschungszentrum in Hamburg. Im Rahmen dieser Arbeit wurden an der Strahllinie P03 Nanopartikel-PEG Proben untersucht. Der Weg der Röntgenstrahlen zwischen Undulator und Experiment ist in Abbildung 4.3 gezeigt. Die Röntgenstrahlen werden in einem Undulator erzeugt, es wird ebenso ein Silizium(111)-Doppelkristallmonochromator verwendet [Buf12], Spiegel sorgen für eine weiter Unterdrückung unerwünschter Wellenlängen, über Beryllium-Linsen wird der Strahl fokussiert. Die Strahlgröße beträgt  $42 \times 20 \mu\text{m}^2$ . Die Experimente wurden bei einer Photonenenergie von 13 keV und einem Probe-Detektor Abstand von 2,2 m durchgeführt. Zwischen Probe und Detektor befindet sich erneut ein evakuiertes Rohr zur Vermeidung von Streustrahlung an Luft. Es wurde ein Pilatus 1 M Detektor mit einer Pixelgröße von  $172 \times 172 \mu\text{m}^2$  und einer sensitiven Fläche von  $169 \times 179 \text{ mm}^2$  verwendet. An dieser Strahllinie wurden nur die in Kapitel 6.4 gezeigten Experimente durchgeführt.

## 4.2 Aufbau der Hochdruckexperimente

Die Hochdruckexperimente wurden in einer maßgefertigten Hochdruckzelle durchgeführt, die von Christina Krywka konstruiert und auch in vorhergehenden Studien benutzt wurde (z.B. [Kry08b; Sch11c; Möl14b]). Die Hochdruckzelle wird in Abbildung 4.4 a)-c) gezeigt und erläutert. In d) ist die Hochdruckzelle während eines Experiments gezeigt: von oben führt ein Rohr in die Zelle. Durch dieses wird das Wasser in die Zelle gepumpt um hohe hydrostatische Drücke zu erzeugen. Der Probenhalter aus Abbildung 4.4c) wird in dieser Darstellung von vorne in die Zelle geschoben, der Probenhalter füllt den Platz zwischen den Diamanten (2 mm) fast vollständig aus. Die Öffnung ist mit einer Schraube verschlossen. Der Röntgenstrahl trifft von rechts kommend auf die Probe, wird gestreut und tritt nach links wieder aus der Zelle aus. Im Hintergrund ist ein Temperaturmessgerät gezeigt. Mit einer angeschlossenen Kältemaschine wurde die Temperatur zwischen Raumtemperatur und  $1^\circ\text{C}$  variiert. Der zugehörige Sensor wird durch ein kleines Loch mit 2 mm Durchmesser, in dieser Darstellung nicht zu sehen, auf der Rückseite der Zelle eingebracht. Die Öffnung endet knapp unterhalb des Probenträgers. Ebenfalls nicht gezeigt sind O-Ringe, die zwischen Diamantträger bzw. der Schraube hinter dem Probenhalter platziert sind und die Probenzelle abdichten. Weitere Details, die beispielsweise das Material der Probenzelle sowie genaue Maße beinhalten, sind in [Kry08a] zu finden. Modifikationen der Schrauben bzw. der Materialien werden in [Möl14a] gezeigt. Relevant für SAXS-Messungen ist das Kaptonfenster,



**Abbildung 4.4:** a) Skizze der Hochdruckzelle. Der Röntgenstrahl trifft durch eines der Diamantfenster auf die von Kapton umhüllte Probe, wird gestreut, und tritt durch das andere Diamantfenster wieder aus der Zelle aus. In b) ist gezeigt, wie der Probenhalter zwischen den Diamantfenstern positioniert ist. In c) ist der Probenhalter dargestellt. Durch eine Kanüle kann die Probenflüssigkeit in den Hohlraum gefüllt werden. Der Kanal kann dann mit einer Nylon Schraube verschlossen werden. Abbildung entnommen aus [Kry08b], editiert und übersetzt. d) ist ein Foto der Hochdruckzelle während eines Experiments an der ID02.

das die Probe umschließt und somit einen Streubeitrag liefert, der nicht aus der Flüssigkeit resultiert. Die Diamantfenster absorbieren einen großen Anteil der Röntgenstrahlung. Die Absorption ist abhängig von der Energie der einfallenden Strahlung, bei den in dieser Arbeit verwendeten 13-18 keV beträgt die Transmission durch zwei 1 mm dicken Diamanten etwa 50-70% [Hen].

### 4.3 Aufbau der Trübungsmessungen

Die Trübungsmessungen an Lysozym wurden in einem Labor der TU Dortmund durchgeführt, deren Aufbau in Abbildung 4.5 gezeigt ist. Links befindet sich eine Pumpe (1), mit der Wasser in die Hochdruckzelle (6) befördert wird. Mit Drucksensoren (2) wird der Druck in der Pumpe und in der Zelle gemessen, der dann an Druckmessgeräten (4) abgelesen werden kann. Ein von einem Laser (Klasse 1, Wellenlänge 650 nm) (7) erzeugter Laserstrahl trifft auf die Probe, die sich in der Zelle befindet. Ist die Probe klar, so trifft ein großer Anteil des Strahls auf die Photodiode (5). Die Spannung an der Diode ist dann mit einem Voltmeter (8) messbar. Weist die Probe ein trübes Erscheinungsbild auf, so misst man eine deutlich reduzierte Diodenspannung. Mit einer angeschlossenen Kältemaschine kann die Temperatur in der Zelle reguliert werden. Diese wurde für die Experimente zunächst mit einem alten Messgerät (3, ähnlich) gemessen. Ein Vergleich der gemessenen Temperatur an der Zelle mit der an den Kältemaschine eingestellten und überprüften Temperatur sowie der Umgebungstemperatur hat im Nachhinein ergeben, dass das Messgerät mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zutreffende Temperaturen angezeigt hat. Die Abweichungen betragen etwa 2°C. Um eine genauere Temperaturbestimmung zu erreichen, wurden die Experimente nachgestellt und die Temperatur mit einem Pt-100 Element erneut gemessen. Diese Temperaturkalibrierung wurden dann für die Auswertung der Daten genutzt. Sämtliche Transmissionsexperimente wurden von Jonathan Weine durchgeführt, die Auswertung wurde vom Autor vorgenommen. Für die Transmissionsmessungen der Polymerlösungen, die nur bei Umgebungsdruck durchgeführt wurden, wurde abweichend der Aufbau aus Abbildung 4.6 verwendet. Der Laser (Klasse 3R) hatte eine Wellenlänge von 450 nm. Der Vorteil war, dass eine Küvette mit 1 cm Durchmesser verwendet werden konnte. Dies ermöglichte die Bestimmung der Transmission für nur leicht eingetrübte Proben.



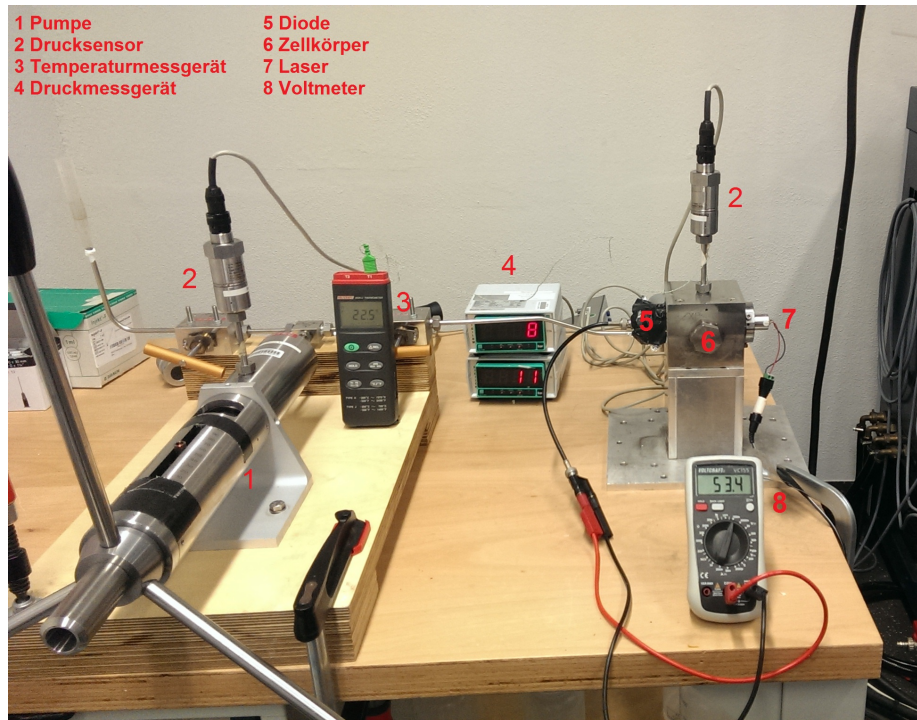


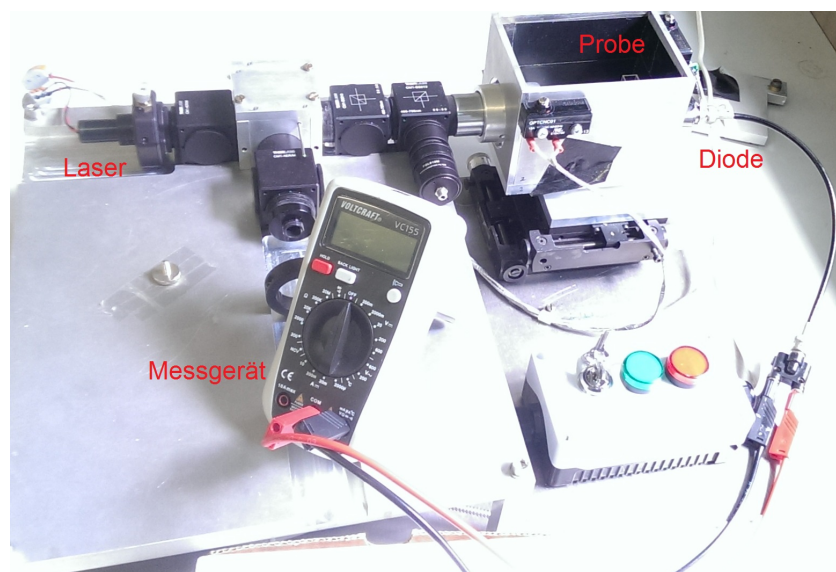
Abbildung 4.5: Aufbau der Trübungsmessungen der Lysozymbösungen.

## 4.4 Probenherstellung

Als Puffer wurde jeweils BisTris verwendet, um den pH-Wert des Systems auch für hohe hydrostatische Drück stabil zu halten [Kit87]. Als Wasser wurde stets gefiltertes und entsalztes Wasser genommen, typischerweise mit einem Widerstand von  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ . Im Zusammenhang mit Experimenten unter hohen Drücken wird in den folgenden Kapiteln die Konzentration des Lysozyms, der Nanopartikel und der Polymere in der Einheit Gewichtsprozent (wt.%) angegeben, da der Volumenanteil (vol.%) sich bei Druckerhöhung ändern kann. In vorhergehenden Arbeiten [Möl14b] wurde für Lysozym gezeigt, dass sich die wesentlichen Parameter, die die Wechselwirkungsstärke von Lysozym beschreiben, nur um wenige Prozent ändern. Für Nanopartikel und Polymere wird dies später genauer diskutiert.

Das Protein Lysozym (14,3 kDa, pI 11) wurde von der Firma Roche GmbH, Mannheim, Deutschland bezogen und verwendet, ohne weitere Reinigungs- oder Filterungsprozesse durchzuführen. Mittlerweile wird das Lysozym der Firma Roche von Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland vertrieben.

Für die Untersuchung der Phasengrenzen hochkonzentrierter Lysozymbösungen wurde 25 mM BisTris Puffer verwendet, um den pH-Wert bei 7 zu stabilisieren. Die Herstellung von Lyso-



**Abbildung 4.6:** Aufbau der Trübungsmessungen der Nanopartikel-Polymerlösungen.

zylmösungen, deren Proteinkonzentration in der Nähe der Löslichkeitsgrenze liegt, ist nicht ohne Hilfsmittel realisierbar. Ein Zentrifugieren oder Dialysieren der Proteinlösung ist hier hilfreich. Zur Herstellung von Konzentrationen oberhalb von 15 wt.% wurde eine 15 wt.% Lysozymlösung dialysiert. Die Flüssigkeit, in der die Dialyse durchgeführt wird, besteht aus etwa 200 g/l PEG 35 kg/mol, das von Sigma Aldrich erworben wurde.

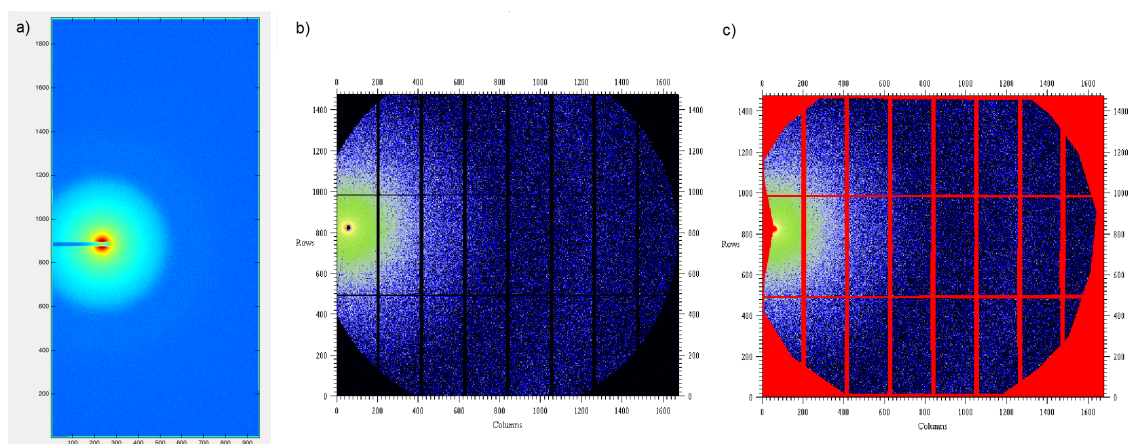
Zunächst wurden die Dialysekassetten (Slide-A-Lyzer, 2,000 MWCO, 15 mL, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) befeuchtet und anschließend mit der Lysozymlösung befüllt. Das Lysozym bzw. das PEG kann die semipermeable Membran der Kassette nicht durchdringen. Durch einen Magnetrührer wurde die Flüssigkeit und die Kassette in Bewegung gehalten. Durch ein osmotisches Ungleichgewicht wurde der Proteinlösung über höchstens 7-12 Stunden Wasser entzogen. Eine längere Nutzung schränkt die Funktion der Kassette ein, da ein zu geringes Flüssigkeitsvolumen zu einer Beschädigung der Membranen führen kann, wenn sich diese berühren. Um Konzentrationen von 27 wt.% oder mehr zu erreichen, kann der Prozess mit bereits dialysierter Lösung wiederholt werden. Danach wurde die Proteinkonzentration der Lösung durch UV-Vis Spektroskopie bestimmt. Hierzu wurden an den Experimenten verfügbare Spektrometer genutzt, mit denen die Extinktion der Lösungen bestimmt wurde. Der Extinktionskoeffizient von Lysozym beträgt 2,64 mL/(mg·cm) bei 280 nm [Sop62]. Vor jedem Experiment wurde die Lysozymlösung im Verhältnis 1:5 mit einem 3 M NaCl Puffer gemischt, um die gewünschten Bedingungen von 500 mM NaCl der Probe herzustellen. Somit stimmen der Herstellungsprozess sowie die verwendeten Koeffizienten mit [Möll14b] überein. In der Regel wurden drei Proben direkt hintereinander

vermessen. Proben mit deutlicher Kristallbildung wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Insbesondere bei hohen Konzentrationen sorgte die erhöhte Viskosität für Schwierigkeiten bei der Pipettierung. Zur Sicherstellung der richtigen Menge wurde stets das Gewicht der pipettierten Lösung überprüft und gegebenenfalls ergänzt. Zur Bestimmung des Gewichtes wurde davon ausgegangen, dass das Lysozym mit  $1,35 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  und Wasser bzw. Puffer mit  $1,0 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  zum Gewicht der Lösung beiträgt, was gut mit [Fre94] übereinstimmt. Abweichend wurden in [Gio79] Lysozymdichten von  $1,15 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  für niedrig konzentrierte Lysozymbisungen bis  $1,26 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  für Konzentrationen oberhalb von 20 wt.% bestimmt. Unter Berücksichtigung dieser Abweichungen ist ein Fehler in der Konzentration der Gesamtlösung von höchstens 4% möglich.

Für die Untersuchung von Nanopartikel-Polymerlösungen wurde 75 mM BisTris Puffer verwendet, um den pH-Wert bei 7 zu stabilisieren. Die ionische Stärke der Lösung betrug 200 mM. Hierzu wurden die Polymere in einem NaCl-Puffer gelöst, die ionische Stärke des Puffers wurde bei der NaCl-Konzentration bereits berücksichtigt.

Als Nanopartikel wurde Ludox LS colloidal silica der Firma Sigma Aldrich verwendet. Die Konzentrationsangabe des Herstellers lautet 30 wt.% Suspension in  $\text{H}_2\text{O}$ , die Dichte beträgt  $1,21 \text{ g/ml}$  bei  $25^\circ\text{C}$ . Aus diesen Angaben wurde berechnet, dass  $0,333 \text{ mg}$  der Ludox LS Lösung in  $9,67 \text{ mg}$  einer Pufferlösung eine Lösung mit 1 wt.% Silica-Partikel ergeben. Des Weiteren wurde aus der Angabe der Dichte und Konzentration berechnet, dass 1 wt.% Silica in  $\text{H}_2\text{O}$  einem Volumenanteil von 0,42 vol% entspricht. Hierbei wird von einer Dichte von etwa  $2,4 \text{ g/ml}$  der Silica-Partikel ausgegangen. Die Größenverteilung der Nanopartikel wird in Kapitel 6.1 bestimmt.

Als Polymere wurde PEG 6k der Firma Sigma Aldrich verwendet. Da die Struktur der Polymere in SAXS-Experimenten aus technischen Gründen nicht zugänglich ist, muss auf Literaturwert zurückgegriffen werden. In [Kum14] wurde die Struktur der Polymere mit Neutronenkleinwinkelstreuung untersucht. Die Struktur der Polymere entspricht der einer Gauß'schen Kette mit einem Gyrationradius von  $2,8 \text{ nm}$ . Im Verlauf der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde beobachtet, dass das Streusignal nach Änderungen des hydrostatischen Drucks für Nanopartikel-Polymerlösungen in den ersten Sekunden eine starke Zeitabhängigkeit aufweist. Insbesondere bei Bedingungen nahe der Phasengrenze ist dies auch zu erwarten. Deswegen wurde nach dem Einstellen des Drucks eine Minute gewartet, bevor die Messung gestartet wurde. Dies gewährleistete einen reproduzierbaren Ablauf. Von diesem Verfahren wurde nur in dem Kapitel 6.4 abgewichen, um die Zeitabhängigkeit genauer zu untersuchen.



**Abbildung 4.7:** Detektorbilder. a) 1 wt.% Siliziumdioxid-Nanopartikel, gemessen an der ESRF. Von links ragt der Strahlstopper in das Bild. b) 30 wt.% Lysozym an der DLS. In c) sind Bereiche ausmaskiert, die bei der Integration nicht berücksichtigt werden.

## 4.5 Durchführung und Auswertung

Zu Beginn der SAXS-Experimente musste stets die Position der Probe im Vergleich zum Detektor festgestellt werden. Hierzu wurde Silberbehenat ( $\text{AgC}_{22}\text{H}_{43}\text{O}_2$ ) vermessen, das auf Grund seiner großen Einheitszelle Bragg-Reflexe in detektierbare Winkelbereiche liefert. Durch die Position der Bragg-Reflexe können dann der Detektor-Probe-Abstand, der Mittelpunkt des Primärstrahls sowie geringe Verkippungen des Detektors festgestellt und bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Abbildung 4.7 zeigt typische Detektorbilder. Um aus dem Detektorbild die Streuintensität  $I(q)$  zu erhalten, wird das Detektorbild azimuthal integriert. Hierbei werden Bereiche nicht berücksichtigt, in denen keine Intensität detektiert werden kann, beispielsweise der Bereich um den Strahlstopper oder die Segmentierung des Detektors, siehe Abbildung 4.7b) und c). In diesen Abbildungen nicht zu sehen sind sogenannte Pseudo-Kossell Linien. Diese können durch Reflektionen an den Gitterebenen der Diamanten entstehen und laufen entsprechend als gerade oder gekrümmte Linie durch das Detektorbild. Diese sind insbesondere bei schwach streuenden Proben zu erkennen und müssen ausmaskiert werden. In [Möl14a] sind Detektorbilder mit derartigen Linien gezeigt. Da sowohl die Position als auch Intensität der Linien von der Position der Diamanten abhängen, kann durch Rotation der Diamantstempel gegebenenfalls die Intensität der Linien verringert oder auch die Position der Linien in unkritische Bereiche verschoben werden. Eine azimuthale Integration der Streuintensität ermöglicht dann die Reduktion auf die Intensität  $I(q)$ , in der die Streuintensität nur noch vom Betrag des Wellenvektorübertrags abhängt. Zu Beginn der Experimente an Synchrotronstrahlungsquellen wurden stets Messungen einer

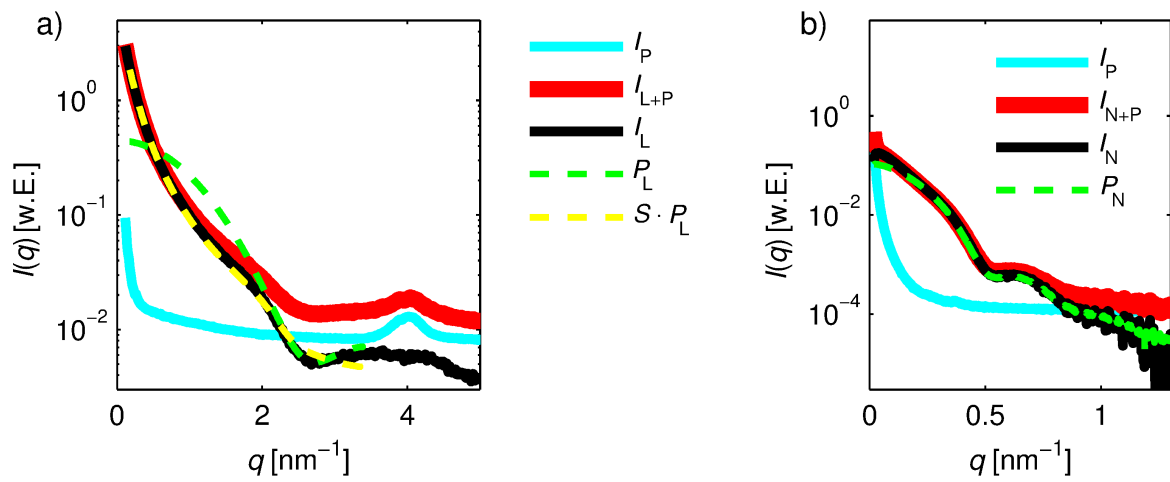
Probe bei identischen Umgebungsbedingungen durchgeführt, um zu testen, ab welcher Belichtungszeit die Probe Veränderungen im Streubild zeigt, die aus Strahlenschäden resultieren. Die Gesamtbelichtungszeit einer Probe wurde dann insgesamt deutlich kürzer gewählt, beispielsweise halb so lang. Bei ausreichender Datenqualität konnte die Belichtungszeit zur Sicherheit auch während der Experimente noch einmal verringert werden.

Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, wie Messsignal vom Untergrund bereinigt wird. Allgemein wurde zur Auswertung das Programm Matlab [Mat] genutzt. Es wurde die Funktion „lsqcurvefit“ verwendet, das nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate die Koeffizienten bestimmt, die das Programm zur Anpassung der Funktion an die Daten variieren darf.

Die Subtraktion des Untergrundes wird anhand von Abbildung 4.8 erläutert. In a) ist in rot das Messsignal  $I_{L+P}$  einer in Puffer gelösten 24 vol.% Lysozym-Probe dargestellt, in b) das Messsignal  $I_{N+P}$  einer in Puffer gelösten 0,42 vol.% Siliziumdioxid-Nanopartikel mit 7,5 wt.% PEG. In cyan ist jeweils der die Streuintensität  $I_P$  des Puffers dargestellt, die als Messung des Untergrundes fungiert. In a) erkennt man bei  $q \approx 4 \text{ nm}^{-1}$  das Streusignal der Kapton-Folie. Sowohl in a) als auch in b) unterscheidet sich das Streusignal sehr deutlich von dem Untergrund, da in a) eine sehr hochkonzentrierte Probe verwendet wurde und in b) ein sehr hoher Elektronendichtekontrast zwischen Puffer und Probensystem vorliegt. Deshalb ist die Subtraktion des Untergrundes der SAXS-Messungen in dieser Arbeit weit weniger problematisch als beispielsweise in Arbeiten, in denen niedrig konzentrierte Proteinlösungen untersucht werden. Die Skalierung des Untergrundes, bestehend aus Streuung an Luft, dem Diamantfenster und möglicherweise dem Strahlstopper sowie dem Signal des Kaptons unter Berücksichtigung der gegebenenfalls unterschiedlichen Absorption der Proben kann ein sehr komplexes Unterfangen sein. An dem Detektor wird meistens der Transmissionsstrom  $I_T$  gemessen, der ein Maß für die einfallende Intensität ist. Das gewünschte Signal des Probensystems, zum Beispiel des Lysozyms  $I_L(q)$ , erhält man durch

$$I_L(q) = \frac{I_{N+P}(q)}{I_{T,N+P}} - k \cdot \frac{I_P(q)}{I_{T,P}}, \quad (4.1)$$

wobei  $k \approx 1 - c[\text{vol}\%] \cdot 100$  häufig eine sinnvolle Abschätzung darstellt. Für den Fall, dass vorhergehende Untersuchungen zweifelsfrei gezeigt haben, dass der Formfaktor  $P(q)$  während des Experiments unverändert bleibt, ist eine Übereinstimmung von Formfaktor und Messsignal für große  $q$  zu erwarten, wenn keine langreichweitige Ordnung vorliegt. Der Formfaktor ist in Abbildung 4.8 in grün (gestrichelt) dargestellt. Außerdem ist in a) noch  $S \cdot P_L$  (gelb) dargestellt, wobei  $S$  der errechnete Strukturfaktor ist. Die Übereinstimmung mit den Messdaten für weite Bereiche des Messbereiches ist gut zu erkennen.



**Abbildung 4.8:** Darstellung von zwei typischen Messungen, a) 24 vol.% Lysozym und b) 0,42 vol.% Siliziumdioxid-Nanopartikel. In cyan jeweils der Puffer, in rot das Messsignal der in Puffer gelösten Partikel. In den schwarzen Kurven ist das Signal des Puffers subtrahiert worden, übrig bleibt das Signal der Probe. Außerdem ist in grün (gestrichelt) der Formfaktor der jeweiligen Proben zu sehen. In a) ist noch eine Kurve dargestellt, die sich aus einer Multiplikation des berechneten Strukturfaktor mit dem Formfaktor ergibt (gelb).

## Kapitel 5

# Das Phasendiagramm von Lysozym

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden bereits veröffentlicht [Sch16] und mit Erlaubnis der PCCP-Gesellschafter erneut abgedruckt und teilweise überarbeitet.

In diesem Kapitel wird mit Hilfe von SAXS- und Trübungsmessungen (TM) das Phasenverhalten von hochkonzentrierten Proteinlösungen in der Nähe der flüssig-flüssig phasenseparierten Phase (engl. liquid-liquid phase separation, LLPS) untersucht. Eine allgemeine Einführung in das Phasenverhalten von Proteinen wurde in Kapitel 3.3 gegeben.

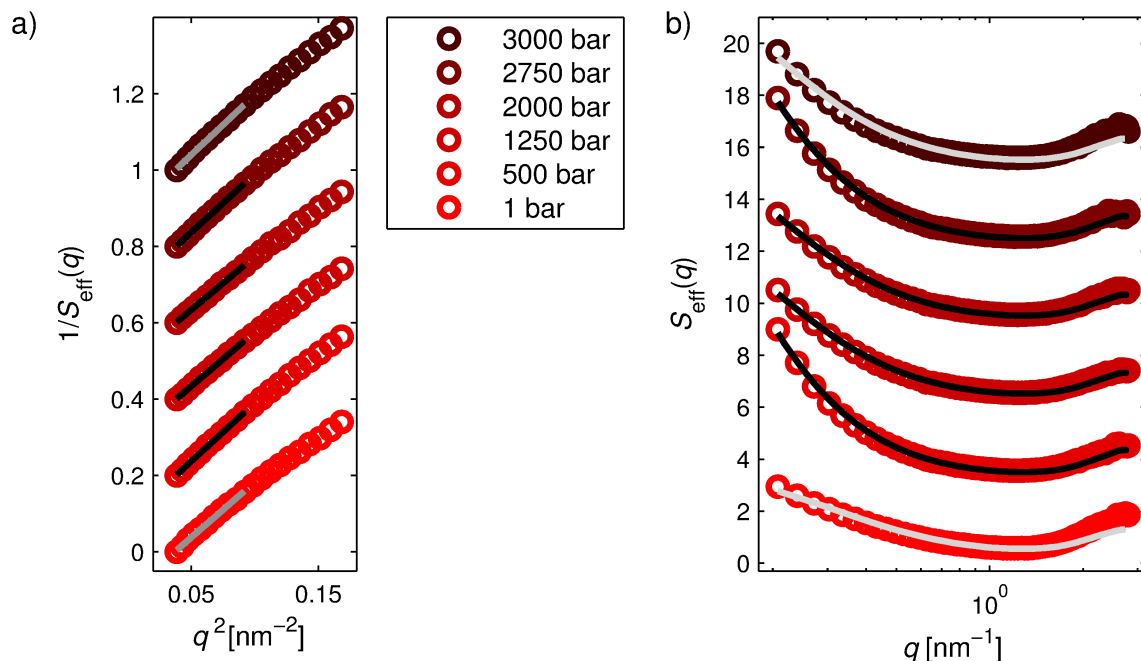
Für Lysozym wurden für verschiedene Umgebungsbedingungen in der Literatur bereits die Phasengrenze und deren Verlauf in Abhängigkeit von Parametern wie z. B. Temperatur  $T$ , Proteinkonzentration  $c$ , ionische Stärke des Salzes  $I$ , Art des Salzes oder pH untersucht [Car07; Tar90; Ish77; Mus97]. Insbesondere in [Möl14b] wurde mit Hilfe von SAXS-Messungen das Phasenverhalten in Abhängigkeit vom Druck  $p$  für den Konzentrationsbereich zwischen 18.5 und 21.5 wt.% bestimmt. Eine Erweiterung dieses Konzentrationsbereichs auf niedrigere sowie höhere Konzentrationen wird in dieser Arbeit vorgestellt, inklusive der Bestimmung des kritischen Punktes für die vorliegenden Lösungsmittelbedingungen. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, können mit SAXS-Messungen Aussagen über die spinodale Phasengrenze getroffen werden (Kapitel 5.1), während TM Informationen über die Nukleation innerhalb der Lösung liefert, die bereits im metastabilen Bereich beobachtet werden kann (Kapitel 5.2). Als Resultat wird am Ende des Kapitels ein  $c$ - $p$ - $T$  Phasendiagramm von Lysozym dargestellt (Kapitel 5.3). Ebenso wie in [Möl14b] enthalten sämtliche Proben 0.5 M NaCl und 25 mM BisTris Puffer, der pH-Wert liegt bei 7.

## 5.1 Bestimmung der druckabhängigen Phasengrenze mit Röntgenkleinwinkelstreuung

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie mit Hilfe von Röntgenkleinwinkelstreuung die Lage der Phasengrenze zwischen der homogenen Phase und der flüssig-flüssig phasenseparierten Phase bestimmt werden kann. Dies kann über die Betrachtung der Korrelationslänge  $\xi$  der Proteine in Lösung geschehen. Wie in Kapitel 2.8.3 beschrieben divergiert diese, wenn sich die Bedingungen denen des kritischen Punktes nähern; nähern die Bedingungen sich der spinodalen Phasengrenze, beobachtet man ebenfalls eine (schwächere) Divergenz. Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung der Strukturfaktoren der Lösungen. Um die Vergleichbarkeit mit [Möll14b] zu gewährleisten, wurde für die Bestimmung des effektiven Strukturfaktors in der homogenen Phase aus der Streuintensität derselbe, von GNOM bestimmte Formfaktor benutzt (s. [Möll14a, S.64]). GNOM kann aus einem experimentell bestimmten Formfaktor die Paarabstandsverteilungsfunktion eines Objektes bestimmen und daraus wiederum einen Formfaktor errechnen, der frei ist von Intensitätsschwankungen auf Grund der statistisch verteilten Streuintensität. Für die Bestimmung von  $\beta(q)$  wurden ein Rotationsellipsoid mit den Halbachsen  $a = 1,52$  nm und  $b = 2,43$  nm verwendet, der Durchmesser der harten Kugel betrug  $\sigma = 2,9$  nm. Es wurde das KHK-Modell aus Kapitel 2.8.2 verwendet. Dieses liefert den normierten zweiten Virialkoeffizienten, dessen Druck- und Temperaturabhängigkeit wiederum ebenfalls Hinweise auf die Phasengrenze liefert. Diese beiden Methoden (Bestimmung der Phasengrenze über die Korrelationslänge und den Virialkoeffizienten) werden im Folgenden für eine 24 wt. %-Probe detailliert beschrieben. Die Auswertung anderer Konzentrationen erfolgte analog. In der Regel wurden drei Proben unter identischen Bedingungen vermessen, deren Ergebnisse gemittelt wurden. Proben, bei denen deutliche Kristallisation beobachtet wurde, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die angegebenen  $q$ -Bereiche, in denen der Strukturfaktor betrachtet wurde, variiert leicht je nach Qualität der Daten sowie der Synchrotronstrahlungsquelle, an dem die Experimente durchgeführt wurden.

Um die Korrelationslänge  $\xi$  zu bestimmen, wird der inverse gemessene Strukturfaktor  $1/S_{\text{eff}}$  betrachtet und gegen  $q^2$  aufgetragen. Abbildung 5.1a) zeigt den inversen gemessenen Strukturfaktor  $1/S_{\text{eff}}$  gegen  $q^2$  (Ornstein-Zernicke-Darstellung) für eine 24 wt. %-Probe bei  $15^\circ\text{C}$  für verschiedene hydrostatische Drücke  $p$  (rot-braune Punkte). Gemäß Gleichung (2.59) kann das Quadrat der Korrelationslänge in dieser Darstellung über eine lineare Ausgleichsrechnung für  $\lim_{q \rightarrow 0}$  bestimmt werden. Da  $I(q = 0)$  auf Grund der experimentellen Gegebenheiten nicht zugänglich ist, wurde der kleinstmögliche, experimentell zugängliche  $q$ -Bereich verwendet (hier:  $0.2 \text{ nm}^{-1} \leq q \leq 0.3 \text{ nm}^{-1}$ ; lineare Anpassung in schwarzen und grauen Linien in Abbildung 5.1a)). Die so ermittelten Korrelationslängen sind in Abbildung 5.2a) dargestellt. Zur besseren

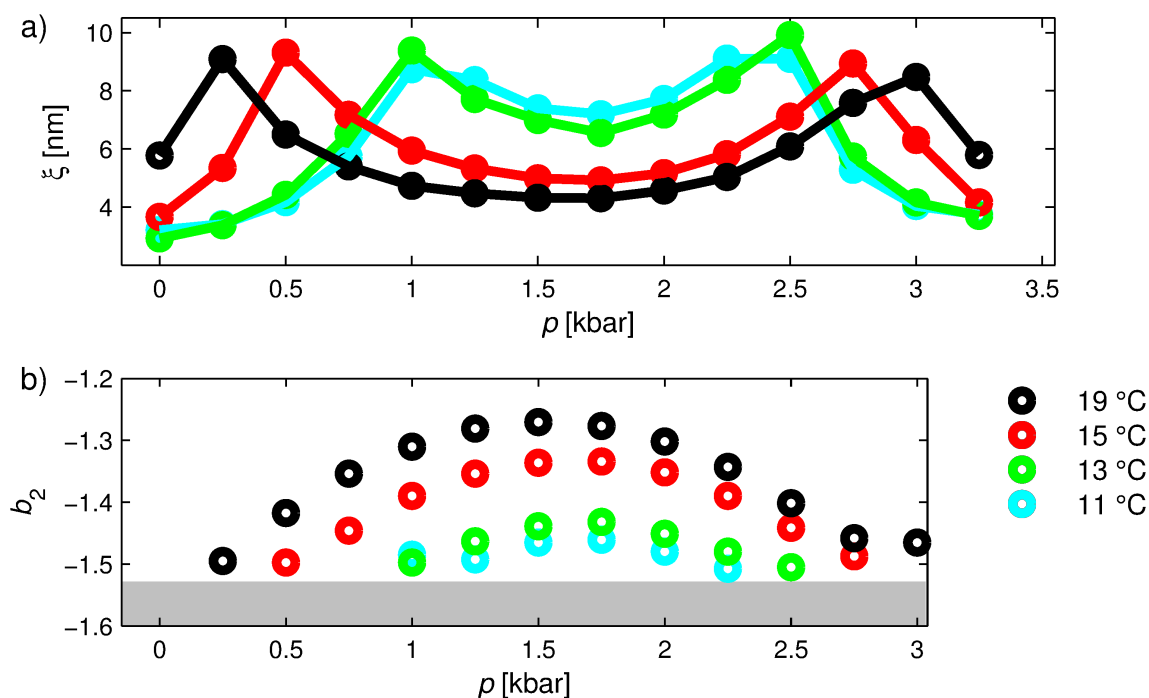




**Abbildung 5.1:** a) Ornstein-Zernicke Darstellung von  $S_{\text{eff}}(q)$  für die in b) gezeigten Strukturfaktoren. b) gemessener, effektiver Strukturfaktor  $S_{\text{eff}}(q)$  einer 24 wt.% Lysozylmösung bei ausgewählten Drücken und  $15^\circ\text{C}$  (rot-braune Punkte). Die schwarzen Linien sind die angepassten, berechneten Strukturfaktoren in der homogenen Phase, in grau dargestellt für die LLPS Phase. Zur besseren Übersicht wurden nur die Strukturfaktoren ausgewählter Drücke gezeigt (veröffentlicht in [Sch16], editiert).

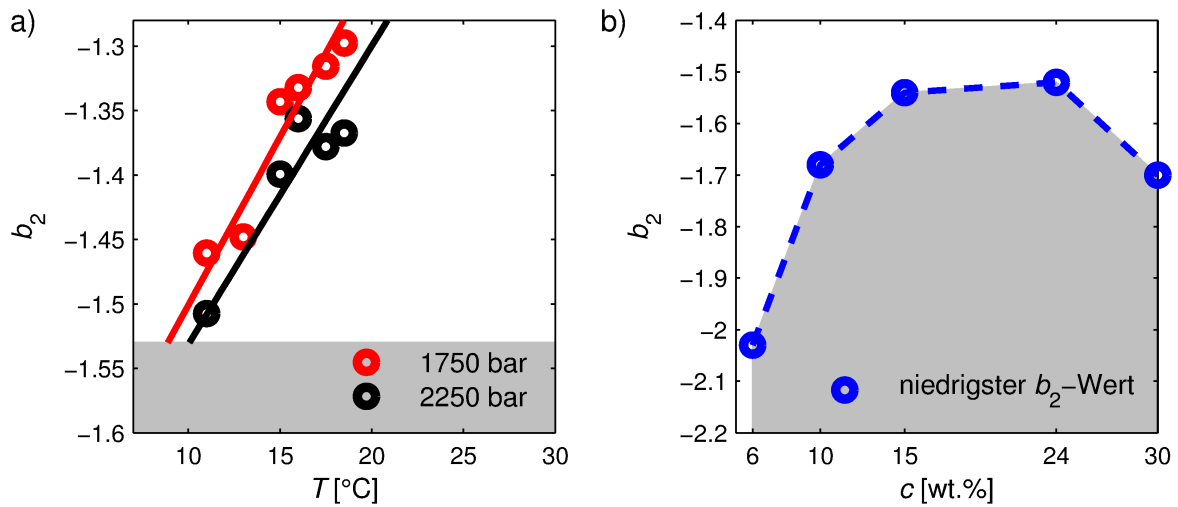
Übersicht wurden nur einige Drücke ausgewählt, außerdem wurden die Daten in  $y$ -Richtung gegeneinander verschoben. Eine Übersicht über alle Strukturfaktoren dieser Messreihe ist im Anhang zu finden (Abbildung 7.1). Das Phasenverhalten für eine 24 wt.% Lysozylmösung bei  $15^\circ\text{C}$  kann daraus wie folgt bestimmt werden: bei Umgebungsdruck ist die Probe zunächst im phasenseparierten Zustand. Man erkennt zwischen 1 bar und 500 bar eine deutliche Zunahme der Korrelationslänge. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die Umgebungsbedingungen sich denen des kritischen Punktes nähern, an dem die Korrelationslänge divergiert. Der Druck, bei dem ein Phasenübergang beobachtet wird, ist  $500 \text{ bar} \pm 125 \text{ bar}$ . Danach beobachtet man bis etwa 1750 bar eine Abnahme der Korrelationslänge, gefolgt von einer erneuten Zunahme sowie dem Erreichen eines Maximums bei 2750 bar. Bei  $2750 \pm 125 \text{ bar}$  wird also ein Phasenübergang zurück in die phasenseparierte Phase beobachtet. Dies kann für jede Probe bei jeder gemessenen Temperatur bestimmt werden; alle auf diese Art bestimmten Punkte des Phasenübergangs tragen zu dem in Abbildung 5.4 gezeigten Phasendiagramm bei (Dreiecke).

Weitere Phasenübergangspunkte können mit Hilfe der Temperaturabhängigkeit des normierten zweiten Virialkoeffizienten  $b_2$  gefunden werden. Abbildung 5.1b) zeigt zunächst den gemessenen



**Abbildung 5.2:** a) Korrelationslänge  $\xi$  der in Abbildung 5.1 gezeigten, gemessenen Struktur Faktoren. b) normierte zweite Virialkoeffizienten der in 5.1 gezeigten, berechneten Struktur Faktoren (veröffentlicht in [Sch16], editiert).

effektiven Strukturfaktor  $S_{\text{eff}}$  für eine 24 wt.% Probe bei 15 °C für verschiedene hydrostatische Drücke  $p$  (rot-braune Punkte). Zur besseren Übersicht wurden die Struktur Faktoren mit steigendem Druck jeweils um den Betrag von 3 nach oben geschoben und es werden nur ausgewählte Struktur Faktoren gezeigt. Für die Anpassung der Struktur Faktoren im Bereich  $0.2 \text{ nm}^{-1} < q < 1.7 \text{ nm}^{-1}$  wird ein Potenzial gemäß Gleichung (3.10) angenommen, das durch  $\tau$  bestimmt ist und für das im Baxter-Modell in der Percus-Yevick-Näherung eine analytische Lösung existiert (s. Kapitel 2.8.2). In schwarzen Linien ist jeweils der berechnete Struktur Faktor in der homogenen Phase zu sehen. Für die grau dargestellten Struktur Faktoren befindet sich die Probe in der phasengetrenten Phase, was zuvor bei der Analyse der Korrelationslängen festgestellt wurde. Insbesondere für große sowie kleine  $q$  sind auch Abweichungen zu erkennen: der Struktur Faktor, berechnet aus dem Modell der homogen gelösten Kugeln, weicht von den gemessenen Daten deutlich ab. Die normierten zweiten Virialkoeffizienten für die Lysozylmösungen in der homogenen Phase sind in Abbildung 5.2b) dargestellt. Die Werte des normierten zweiten Virialkoeffizienten, der ein Maß für die Repulsion des Wechselwirkungspotenzials ist, weisen einen Extremwert im Druckbereich von 1,5 - 1,75 kbar auf. Dies hat eine Entsprechung in dem Minimum der attraktiven Wechselwirkungsstärke von Lysozym, das zuvor gefunden wurde

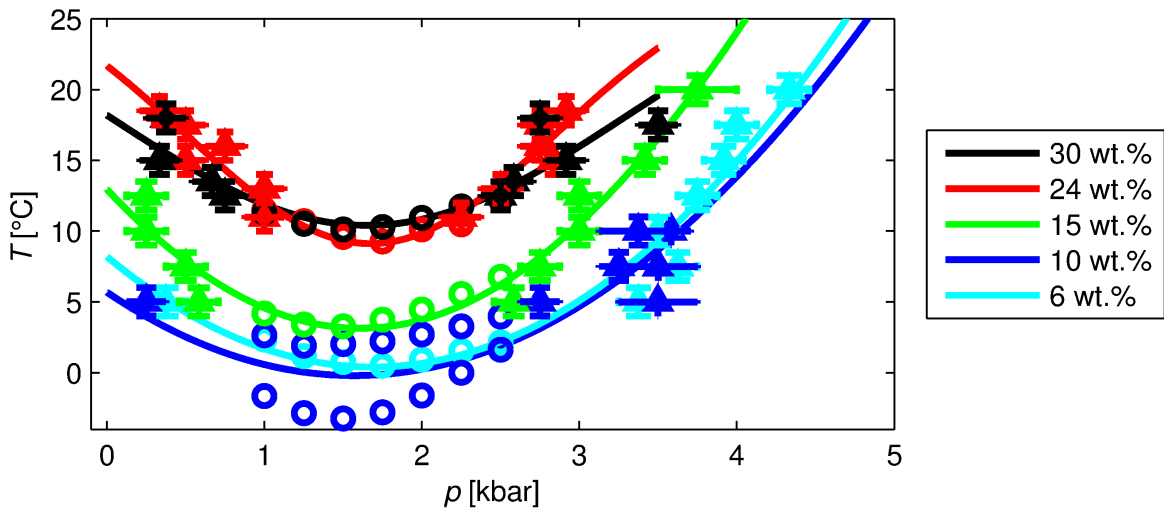


**Abbildung 5.3:** a) Temperaturabhängigkeit der normierten zweiten Virialkoeffizienten für zwei ausgewählte Drücke - erreichen die  $b_2$ -Werte den grau dargestellten Bereich, wird ein Phasenübergang in die phasenseparierte Phase erwartet. b) Konzentrationsabhängigkeit der Grenzwerte von  $b_2$ . Für den weiß dargestellten Bereich befindet sich die Probe in der homogenen Phase (veröffentlicht in [Sch16], editiert).

[Sch11c]. Außerdem zeigt diese Abbildung (ebenso wie die Analyse weiterer, hier nicht gezeigter Messreihen), dass ein Phasenübergang beim Unterschreiten eines  $b_2$ -Grenzwertes (grauer Bereich in Abbildung 5.2b)) zu erwarten ist. Dieser Grenzwert ist spezifisch für die jeweilige Proteinkonzentration. Als  $b_2$ -Grenzwert  $b_{2,G}$  wurde für jede Konzentration der niedrigste berechnete  $b_2$ -Wert verwendet. Das entspricht dem attraktivsten gemessenen Wechselwirkungspotenzial sowie dem Strukturfaktor mit der höchsten Korrelationslänge.

Der  $b_2$  Wert weist allgemein eine Abhängigkeit von Umgebungsbedingungen ( $p$ ,  $T$ ) sowie der Proteinkonzentration  $c$  auf. In Abbildung 5.3a) ist die Temperaturabhängigkeit von  $b_2$  dargestellt. Bei festem  $p$  wird mit Hilfe linearer Extrapolation diejenige Temperatur bestimmt, bei der ein Phasenübergang erwartet wird, weil der Grenzwert  $b_{2,G} = -1,53$  unterschritten wird. So kann für Drücke zwischen 1 kbar und 2,25 kbar die Phasengrenze bestimmt werden (Kreise in Abbildung 5.4). In diesem Bereich ist die Bestimmung der Phasengrenze über die Korrelationslänge schwierig, weil es nur wenige Messpunkte zwischen den Maxima gibt.

Nun wird die in dieser Arbeit gefundene Konzentrationsabhängigkeit des Grenzwertes, also  $b_{2,G}(c)$ , mit Werten aus der Literatur verglichen. In Referenz [Vli00] wird  $b_{2,G}(c)$  für ein 12-6 Lennard-Jones-Potenzial betrachtet. Am kritischen Punkt, der in Referenz [Vli00] bei einem Volumenanteil von etwa 0,15 (entspricht etwa 19 wt.% Lysozym) liegt, wird ein  $b_2$ -Grenzwert von -1,5 gefunden. Dieser ist für Volumenanteile zwischen 0,1 und 0,225 (13 und 30 wt.% Lysozym) in etwa konstant. Bei größeren oder geringeren Konzentrationen fällt er zu negativeren Werten ab. In Abbildung 5.3b) sind die in dieser Arbeit gefundene  $b_{2,G}(c)$  gezeigt. Obwohl

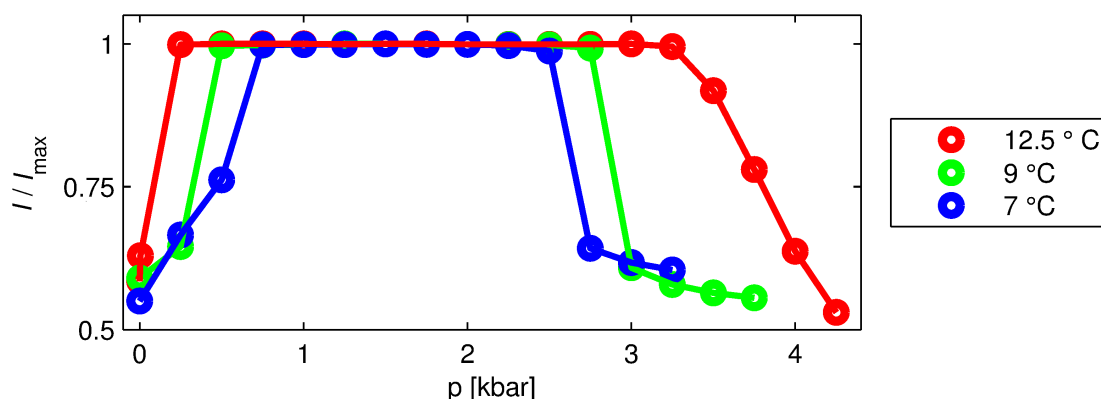


**Abbildung 5.4:** Übersicht über alle Punkte des  $p$ - $T$ -Phasendiagramms, an denen mit Hilfe von SAXS-Messungen ein Phasenübergang gefunden wurde, sowie einer Gauß-Kurve, unterhalb derer das System in der phasenseparierten Phase ist. Oberhalb der Kurve ist das System für die jeweilige Konzentration in der homogenen Phase (veröffentlicht in [Sch16], editiert).

die experimentellen Ergebnisse mit den Berechnungen eines sehr einfachen Modells verglichen werden, ist die qualitative Übereinstimmung erkennbar. Für  $c \approx 20$  wt.%, also in der Nähe des kritischen Punktes, wurde in dieser Arbeit ein Grenzwert von etwa  $-1,52$  gefunden. Für Proteinkonzentrationen zwischen  $18,5$  und  $21,5$  wt.% wurden (experimentell) in [Möl14b] Grenzwerte von  $b_{2,G} \approx -1,54$  gefunden. Der (berechnete) reduzierte zweite Virialkoeffizient am kritischen Punkt für verschiedene Modelle von Interaktionspotenzialen ist in [Nor00] aufgelistet. Vielfach wurde für diese Bedingungen  $b_{2,G} \approx -1,5$  gefunden. Abbildung 5.3b) legt einen kritischen Punkt zwischen  $15$  und  $24$  wt.% nahe. Somit stimmen die in dieser Arbeit gefundenen  $b_2$  gut mit der Literatur überein.

Abbildung 5.4 zeigt alle Punkte im  $p$ - $T$ -Phasendiagramm, bei denen ein Phasenübergang gefunden wurde. Die Dreiecke zeigen Werte, die durch Analyse der druckabhängigen Korrelationslänge erhalten wurden, die Kreise zeigen die Werte, die durch Interpolation der Temperaturabhängigkeit des normierten zweiten Virialkoeffizienten ermittelt wurden. Dies wurde für die Konzentrationen  $30$  wt.%,  $24$  wt.%,  $15$  wt.%,  $10$  wt.% (zwei verschiedene Experimente) und  $6$  wt.% durchgeführt. Zur Beschreibung der Phasengrenze zwischen der phasenseparierten und der homogenen Phase für eine feste Konzentration wurde eine Gauß-Kurve der Form

$$f(p) = -A \cdot e^{-\frac{(p-b)^2}{2\sigma^2}} + C \quad (5.1)$$



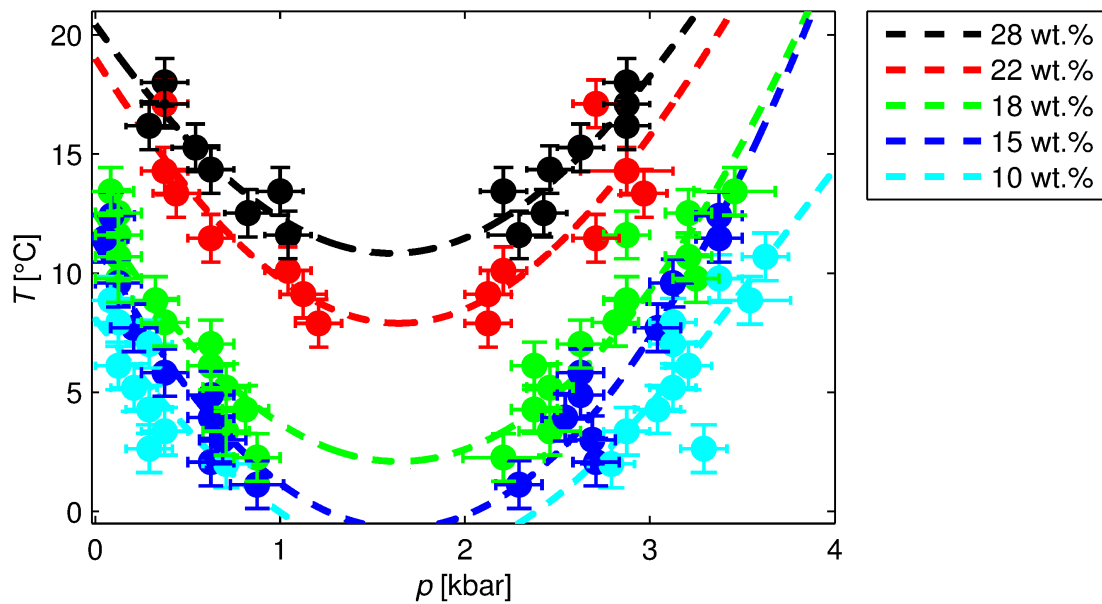
**Abbildung 5.5:** Trübungsmessungen für eine Probe mit 18 wt.% Lysozym bei ausgewählten Temperaturen, normiert auf die maximal gemessene Intensität. Im Plateaubereich durchstrahlt der Laser ungehindert die Probe, die sich in der homogenen Phase befindet. Der Intensitätsabfall zu höheren bzw. niedrigeren Drücken resultiert aus der zunehmenden Trübheit auf Grund des Phasenübergangs in die LLPS-Phase.

an die Messpunkte angepasst. Diese Funktion wurde bereits in Referenz [Möl14b] verwendet, spiegelt den Verlauf der gefundenen Phasenübergangspunkte angemessen wider und wurde aus rein empirischen Gründen gewählt. Unterhalb der Kurven befindet sich eine Lysozymlösung entsprechender Konzentration stets in der phasenseparierten Phase, oberhalb befindet sie sich in der homogenen Phase.

## 5.2 Bestimmung der druckabhängigen Phasengrenze mit Trübungsmessungen

Im Folgenden wird erläutert, wie mit druckabhängigen Trübungsmessungen (TM) das Phasenverhalten hochkonzentrierter Proteinlösungen bestimmt werden kann. Abbildung 5.5 zeigt Trübungsmessungen einer 18 wt.% Lysozymlösung für Drücke zwischen 1 bar und 4 kbar und ausgewählte Temperaturen. Die Intensität wurde auf die maximal gemessene Intensität der Diode  $I_{max}$  normiert. Bei 9 °C beobachtet man eine reduzierte Transmission bei Umgebungsdruck, die Probe befindet sich also in der phasenseparierten, trüben Phase. Zwischen 250 und 500 bar kann man eine deutliche Zunahme der Intensität beobachten. Bei 500 bar kann der Laserstrahl die Probe vollständig passieren. Zwischen 250 und 500 bar hat also ein Übergang in die homogene Phase stattgefunden. Zwischen 500 bar und 2750 bar verändert sich die Intensität nicht, die Probe befindet sich durchgehend in der homogenen Phase. Zwischen 2750 und 3000 bar sinkt die Intensität wieder und die Probe kehrt in die phasenseparierte Phase zurück. Für die hier vorgestellte Messung findet bei  $375 \pm 125$  bar bzw.  $2875 \pm 125$  bar ein Phasenübergang statt. Abbildung 5.6 zeigt alle so gefundenen Phasenübergangspunkte im  $p$ - $T$ -Diagramm. Dies

wurde für die Lysozymkonzentrationen 28 wt.%, 22 wt.%, 18 wt.%, 15 wt.% und 10 wt.% durchgeführt. Ebenso wie für die Bestimmung der Phasengrenzen in SAXS-Experimenten wurde eine Gauß-Kurve gemäß Formel (5.1) verwendet, um eine kontinuierliche Phasengrenze angeben zu können.



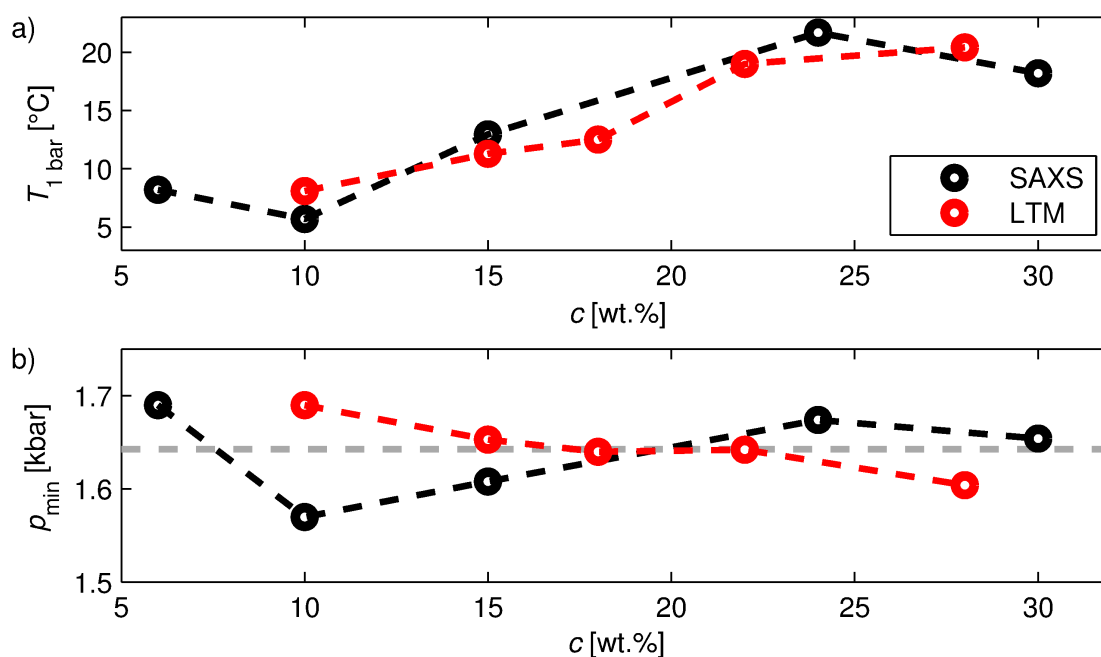
**Abbildung 5.6:** Übersicht über alle Punkte des  $p$ - $T$ -Phasendiagramms, an denen mit Hilfe von Trübungsmessungen ein Phasenübergang gefunden wurden, sowie entsprechender Gauß-Kurven, unterhalb denen das System in der phasenseparierten Phase ist. Oberhalb der Kurven ist das System für die jeweilige Konzentration in der homogenen Phase (veröffentlicht in [Sch16], editiert).

### 5.3 Vergleich und Zusammenführung der SAXS- und TM-Phasengrenzen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der verschiedenen Messmethoden verglichen und zusammengeführt.

Wie in Kapitel 3.3 erläutert, liefert die Analyse der Korrelationslänge die spinodale Phasengrenze. In TM-Messungen beobachtet man Nukleation; diese tritt bereits im metastabilen Bereich des Phasendiagramms auf, deutlich verstärkt bzw. in kürzerer Zeit ebenfalls an der spinodalen Phasengrenze. Die binodale und spinodale Phasengrenze stimmen nur am kritischen Punkt überein. In der Vergangenheit wurden für leicht unterschiedliche Bedingungen und Methodiken bereits der Phasenübergang von Lysozymbiosungen bei Umgebungsdruck untersucht [Ish77; Car07]. In Abhängigkeit von der Temperatur und Konzentration wurde die Grenze bestimmt, an der die Lysozymbiosung trüb wird. Dies entspricht der in dieser Arbeit durchgeführten Trübungsmessungen. Die spinodale Phasengrenze ist in SAXS-Messungen zugänglich. In Anbetracht der in den Abbildungen 5.4 und 5.6 gezeigten Ergebnisse erscheint eine Abschätzung der Genauigkeit, mit der die Phasengrenze für Umgebungsdruck angegeben werden kann, auf etwa  $2^\circ\text{C}$  sinnvoll. Unterscheidet sich die Temperatur, bei der die Lösung trüb wird um weniger als  $2^\circ\text{C}$  von der spinodalen Phasengrenze, kann dies nicht mehr aufgelöst werden. Die Ergebnisse in der Literatur [Ish77; Car07] zeigen, dass der Unterschied der Phasengrenzen für Umgebungsdruck bei Konzentrationen von  $c \geq 15 \text{ wt.}\%$  weniger als  $2^\circ\text{C}$  beträgt.

Ein weiterer Unterschied der für TM- und SAXS-Experimente bestimmten Gauß-Kurven liegt in den unterschiedlichen Methodiken begründet. TM-Messungen wurden im Labor durchgeführt, deshalb konnte die Phasengrenze in kleineren Temperaturschritten durchgeführt werden, da für die Messungen mehr Zeit zur Verfügung stand. Das führt zu einer besseren Statistik in den Bereichen, die weit vom Minimum der Gauß-Kurve entfernt liegen. Es ist also anzunehmen, dass die in Abbildung 5.7a) gezeigte Temperatur, an der ein Phasenübergang für Umgebungsdruck erwartet wird, durch TM-Messungen genauer bestimmt werden kann. SAXS-Messungen hingegen lieferten qualitativ hochwertigere Informationen über die Probe: neben der Bestimmung der Korrelationslänge konnte über eine Bestimmung der Temperaturabhängigkeit des normierten zweiten Virialkoeffizienten die Phasengrenze auch im Bereich des Minimums der Gauß-Kurve bestimmt werden. Die Minima der Gauß-Kurven sind in Abbildung 5.7b) gezeigt. Außerdem konnten in SAXS-Messungen Proben ausgeschlossen werden, bei denen Kristallbildung beobachtet wurde. Darüber hinaus besteht bei Untersuchungen von Phasenübergängen generell das Problem, dass eine schwer bestimmbare Zeitabhängigkeit vorhanden ist. Bei Trübungsmessungen wurde nach jeder Druckerhöhung 20 Sekunden gewartet, bevor die Diodenspannung abgelesen wurde. Das entsprach in etwa der Zeit, die bei SAXS-Messungen zwischen Einstellen des



**Abbildung 5.7:** a) Phasengrenze bei Umgebungsdruck in Abhängigkeit von der Temperatur und Proteinkonzentration für die beiden unterschiedlichen Methoden (unterhalb der Kurve liegt die Lösung phasensepariert vor). b) Druckabhängige Minima der Gauß-Kurven für die verschiedenen Proteinkonzentrationen. Es ist weder eine Abhängigkeit von  $c$  noch ein Unterschied für die verschiedenen Methoden zu erkennen. Die grau gestrichelte Linie ist der Mittelwert aller Werte.

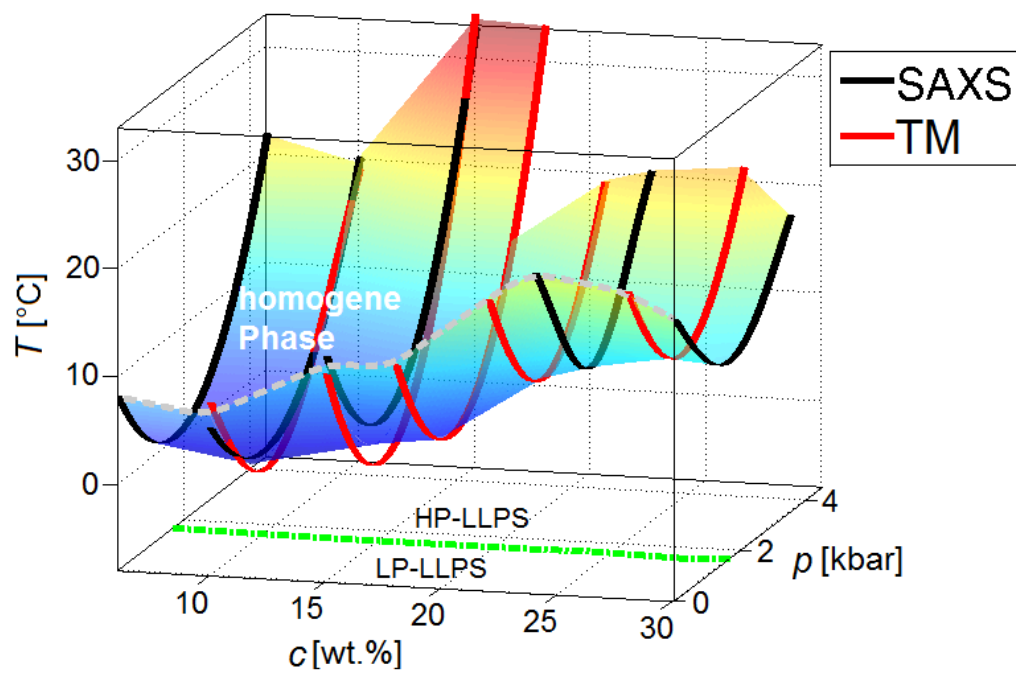
Drucks und Belichtung der Probe lagen. Somit sind die Ergebnisse untereinander vergleichbar. Insbesondere bei Drücken unterhalb von 1100 und oberhalb von 1900 bar änderte sich die Diodenspannung bei LT-Messungen schon nach wenigen Sekunden nicht mehr - es kann davon ausgegangen werden, dass für die allermeisten Punkte, bei denen ein Phasenübergang direkt beobachtet wurde (Korrelationslänge oder maximaler Lichttransmission), das Phasenverhalten auch bei einer Wartezeit im Bereich von Minuten mit dem hier gefundenen Phasenverhalten überein stimmt. Im Bereich des Minimums der Wechselwirkungsstärke, in dessen Nähe eine Druckänderung nur eine geringe Änderung der Wechselwirkung verursacht, waren auch nach den 20 Sekunden gelegentlich noch Änderungen der Spannung zu beobachten. In diesem Bereich konnten aber kaum Phasenübergänge identifiziert werden. Die Zeitabhängigkeit hat also einen geringen Einfluss auf die Punkte in Abbildung 5.4 und 5.6.

Trotz der genannten Unterschiede liefern die beiden Messmethoden miteinander vergleichbare Ergebnisse. Abbildung 5.7a) zeigt die Temperatur, an der ein Phasengang erwartet wird, in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration für die beiden Methoden bei Umgebungsdruck. Die dort gezeigten Werte sind die Ergebnisse der Anpassung der Gauß-Kurve an die Messdaten. Man erkennt, dass Trübungsmessungen für 10 wt.% eine etwa 2,5 °C höhere Temperatur für den



Phasenübergang im Vergleich zu den SAXS-Messungen liefern. Man beobachtet wie erwartet bereits bei höheren Temperaturen einen Phasenübergang. Dies ist die einzige Konzentration, bei der eine Unterscheidbarkeit angesichts der Unsicherheit der berechneten Phasengrenzen möglich erscheint. Für alle anderen Konzentrationen ist der Unterschied nicht auflösbar und Unterschiede in den Phasengrenzen sind auf die Unsicherheiten in den Gauß-Kurven oder auch systematische Fehler zurückzuführen. Als systematische Fehler kommen Unsicherheiten bei der Konzentrationsbestimmung der Proteine ebenso wie Fehler bei der Probenherstellung in Betracht, beispielsweise bedingt durch die Dickflüssigkeit der Proteinlösung. Die kritische Konzentration liegt für die verwendeten Bedingungen zwischen 24 und 28 wt.% Lysozym. In früheren Untersuchungen wurden kritische Konzentrationen zwischen 22 und 31 wt.% gefunden [Car07; Tar90; Ish77].

Abbildung 5.7b) zeigt die Position der Minima der Gauß-Kurven, die die Phasengrenzen modelliert, in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration, in grau ist der Mittelwert aller Minima dargestellt. Man sieht, dass keine Abhängigkeit der Position der Minima von der Proteinkonzentration oder Messmethode erkennbar ist. Mit  $(1643 \pm 12)$  bar liegt das Minimum etwa 200 bar oberhalb des Minimums, das in der Literatur [Möl14b] gefunden wurde (1450 bar). Ein methodischer Unterschied liegt darin, dass in der Literatur [Möl14b] unterhalb von 1500 bar kleinere Druckschritte gewählt wurden (bei nicht näher definierter Zeit zwischen den Messungen). Grundsätzlich stimmen die Ergebnisse im vergleichbaren Konzentrationsbereich aber überein. Die gefundenen Ergebnisse sind auch konsistent mit dem des in früheren Arbeiten bestimmten druckabhängigen Protein-Protein Interaktionspotenzial, dessen attraktiver Anteil ein Minimum bei etwa 1,5 bis 2 kbar aufweist. Dies wird auf einen Kollaps der zweiten Hydratationsschale bei etwa 2 kbar zurückgeführt [Sch11c; Sch11b]. Abbildung 5.8 zeigt alle druckabhängigen Phasengrenzen für die gemessenen Konzentrationen und Temperaturen. Oberhalb der eingefärbten Fläche befindet sich das System in der homogenen Phase, unterhalb liegt es phasensepariert vor.



**Abbildung 5.8:**  $c$ - $p$ - $T$ -Phasendiagramm von Lysozym. Unterhalb der Fläche ist das System in der phasenseparierten Phase, oberhalb ist es in der homogenen Phase. Die Linie auf dem Boden markiert die gemittelten Positionen der Minima der Grenzen bei 1643 bar. Für Drücke unterhalb dieser Grenze kann man von der LLPS-Phase für geringe Drücke (low pressure) sprechen, oberhalb dieser von einer Hochdruck-LLPS Phase (veröffentlicht in [Sch16], editiert).

## Kapitel 6

# Das Phasenverhalten von Nanopartikel-Polymer-Lösungen

In diesem Kapitel werden die Messungen vorgestellt, die an Systemen durchgeführt wurden, die aus 1 wt.% Siliziumdioxid-Nanopartikel in Lösung mit unterschiedlichen PEG-Konzentrationen bestehen. Zunächst werden in Kapitel 6.1 die Größenverteilungen der Nanopartikel bestimmt. Hierzu werden SAXS-Messungen an drei niedrig konzentrierten Proben durchgeführt und miteinander verglichen. Danach wird die Druckabhängigkeit des Formfaktors geprüft. Anschließend werden Proben verschiedener Polymerkonzentrationen optisch bei Umgebungsdruck vermessen (Kapitel 6.2).

In einem nächsten Schritt werden die Ergebnisse der druckabhängigen SAXS-Messungen von gering konzentrierten Polymerlösungen vorgestellt (Kapitel 6.3), gefolgt von den Ergebnissen für hoch konzentrierte Polymerlösungen (Kapitel 6.4). Der Vollständigkeit halber werden abschließend die Ergebnisse für mittlere Polymerkonzentrationen vorgestellt (Kapitel 6.5). Diese Proben waren jedoch sehr instabil. In Kapitel 6.6 werden die Ergebnisse zusammengefasst und in Kapitel 6.7 schließlich in den aktuellen Forschungsstand eingeordnet. In diesem Kapitel wird die Bezeichnung „Umgebungsdruck“ bzw. die Druckangabe 1 bar für Drücke von bis zu 50 bar (in der Regel deutlich weniger) verwendet, um die Lesbarkeit zu verbessern. Drücke von wenigen bar wurden im Experiment verwendet, um sicherzustellen, dass die Druckzelle komplett mit Wasser gefüllt war, um einen guten Untergrundabzug zu ermöglichen. Einen Einfluss dieser niedrigen Drücke auf das Phasenverhalten oder die Wechselwirkung konnte nicht festgestellt werden.

## 6.1 Vorbereitende Messungen

Für die Analyse der interpartikulären Wechselwirkung der Nanopartikel muss zunächst der Formfaktor der Partikel bestimmt werden. Ein grundlegendes Problem dabei ist, dass sehr verdünnte Proben keine Streuintensitäten mit ausreichender Statistik liefern, während das Signal weniger verdünnter Proben durch einen interpartikulären Strukturfaktor beeinflusst wird. Durch den Vergleich des Streusignals dreier unterschiedlicher Konzentrationen (2 wt.%, 1 wt.%, 0,5 wt.%) wurde versucht, einen möglichst genauen Formfaktor zu finden.

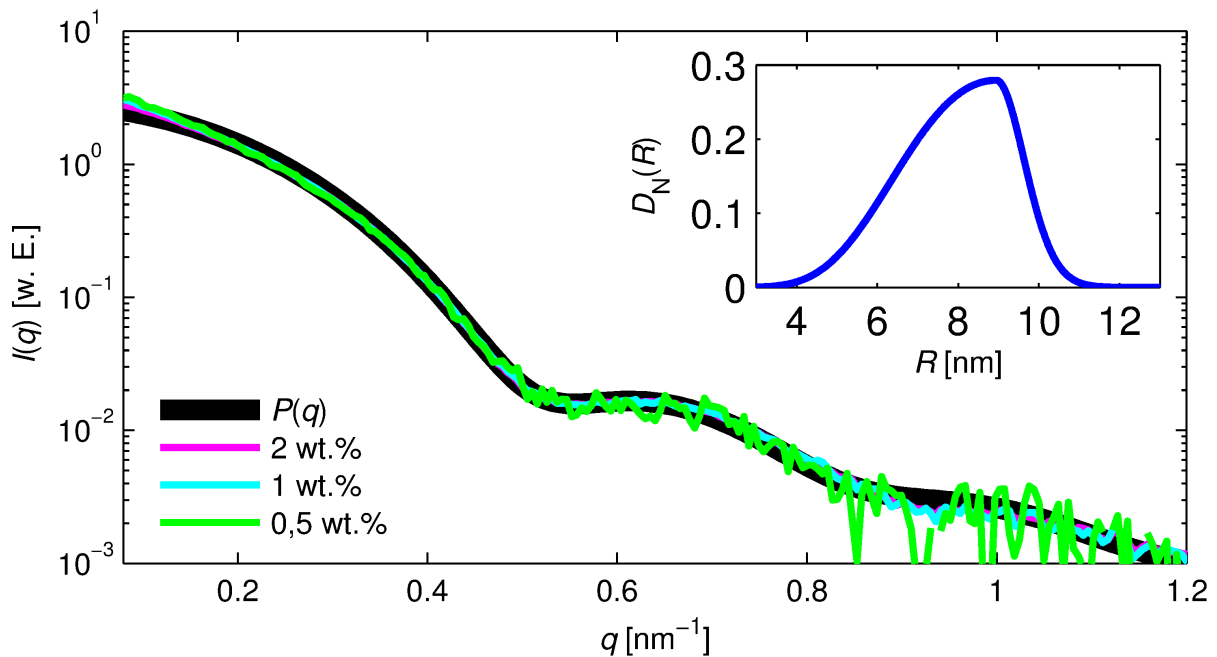
Ausgangspunkt für die Bestimmung der Größenverteilung der Nanopartikel ist eine logarithmische Normalverteilung nach Formel (2.36). Das Maximum dieser Funktion liegt bei  $R_m = e^{\mu - \sigma^2}$ , der Wert an dieser Stelle ist durch

$$D_{N,m}(e^{\mu - \sigma^2}, \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{0.5 \cdot \sigma^2 - \mu} \quad (6.1)$$

beschrieben, woraus  $\mu = \ln(R_m) + \sigma^2$  folgt; Funktion (2.36) lässt sich nun als  $D_N(R, R_m, \sigma)$  schreiben. Um eine flexiblere Größenverteilung zu ermöglichen, wurde eine Umsetzung gewählt, in welcher der Parameter  $\sigma$  auf beiden Flanken der Größenverteilung unterschiedliche Werte annehmen kann. Die Größenverteilung der Partikel lässt sich dann mit der Formel

$$D'_N(R, R_m, \sigma_1, \sigma_2) = \begin{cases} \frac{1}{D_N(R_m, R_m, \sigma_1)} \exp\left(\frac{-(\ln(R) - \mu_1)^2}{2\sigma_1^2}\right), & R \leq R_m \\ \frac{1}{D_N(R_m, R_m, \sigma_2)} \exp\left(\frac{-(\ln(R) - \mu_2)^2}{2\sigma_2^2}\right), & R > R_m \end{cases} \quad (6.2)$$

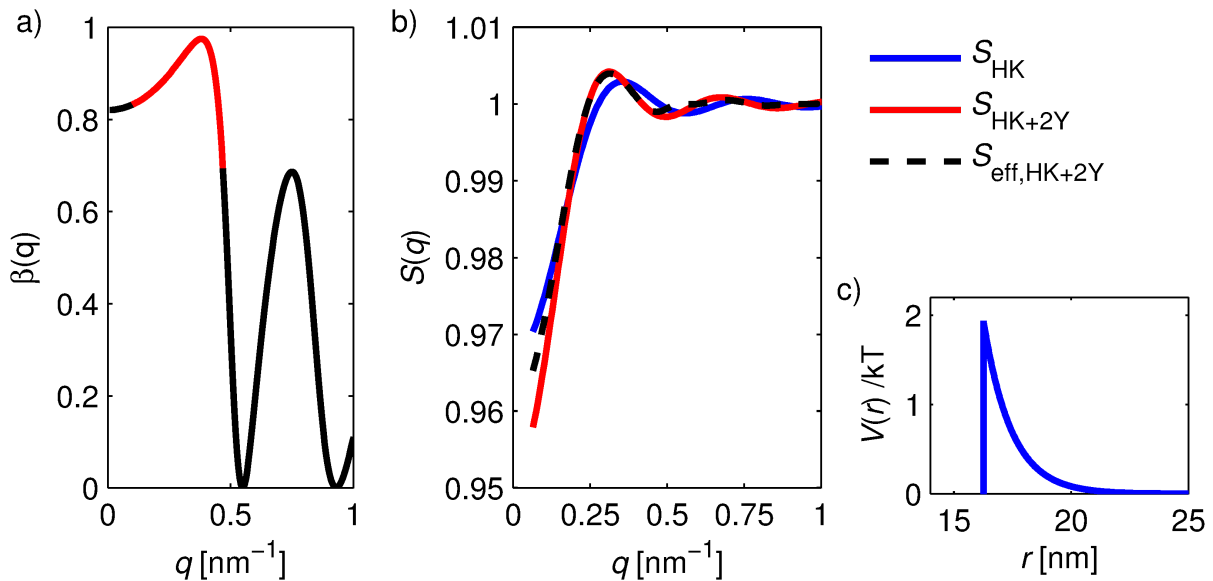
beschreiben; der Faktor  $D_N(R_m, R_m, \sigma)^{-1}$  wurde eingefügt, um die Stetigkeit für  $R = R_m$  zu gewährleisten; anschließend kann  $D'_N$  normiert werden. Ein analoges Verfahren wurde bereits in [Sch13] gewählt. Abbildung 6.1 zeigt die gemessene Intensität für Proben mit drei verschiedenen niedrigen Konzentrationen von Siliziumdioxid-Nanopartikeln sowie einen berechneten Formfaktor  $P(q)$  in schwarz. Man erkennt, dass Kugeln, die eine Größenverteilung nach Formel (6.2) aufweisen (dargestellt im Einschub der Abbildung 6.1;  $R_m = 8,95$  nm,  $\sigma_1 = 0.299$ ,  $\sigma_2 = 0.075$ ), ein gutes Modell für die Beschreibung der Streuintensität gemäß Formel (2.33) sind. Eine Erklärung für  $\sigma_1 > \sigma_2$  könnte sein, dass größere Partikel und Aggregate beim Produktionsprozess mit einem Filter mit entsprechender Porengröße herausgefiltert wurden. Dies führt dazu, dass die Größenverteilung für  $R > R_m$  schnell abfällt. Ähnliche Größenverteilungen wurden für andere von Sigma Aldrich gelieferte Partikel bereits in [Sch13] gefunden. Für die Berechnung des Strukturfaktors ist ein Radius  $R_{\text{eff}} = 8,13$  nm der harten Schale gemäß Formel (2.35) zu erwarten.



**Abbildung 6.1:** Gemessene Intensität für drei niedrig konzentrierte Nanopartikellösungen sowie der berechnete Formfaktor (schwarz). Eingeschoben die Größenverteilung der Partikel.

Die Auswirkungen von Polydispersität auf den Strukturfaktor wird in Kapitel 2.4 beschrieben. Aus der gefundenen Größenverteilung der Partikel folgt ein  $\beta(q)$  gemäß Formel (2.23), dies ist in Abbildung 6.2 a) gezeigt. In Rot ist der  $q$ -Bereich markiert, der für spätere Analysen des Strukturfaktors relevant ist.

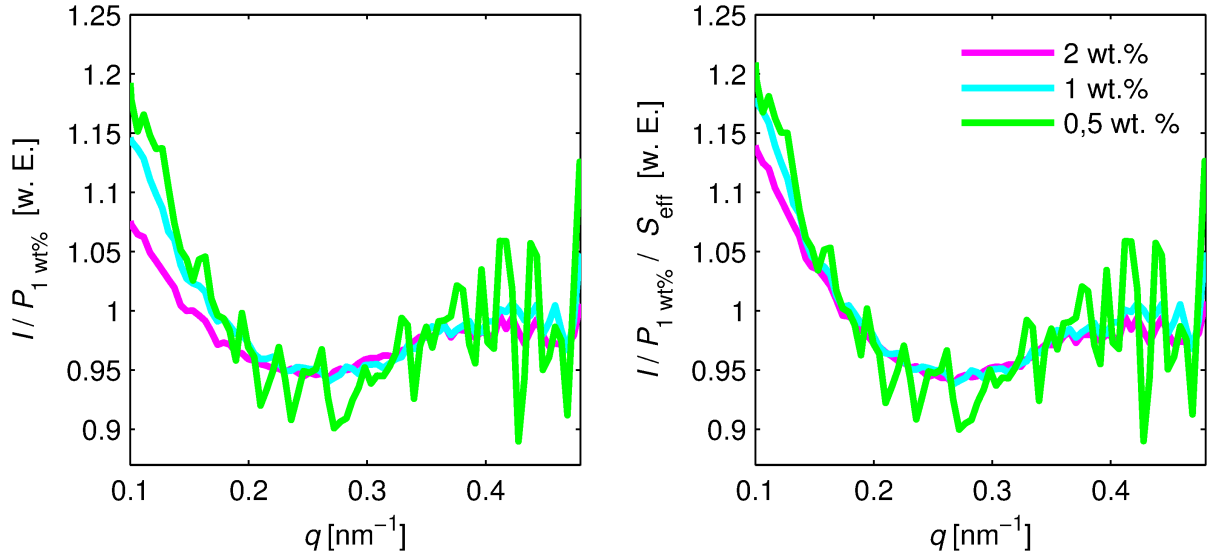
Wie zuvor erwähnt, muss bei der Bestimmung des Formfaktors ein Kompromiss zwischen einer gut messbaren Streuintensität, die eine möglichst hohe Konzentration erfordert, und der Vermeidung eines Strukturfaktors aufgrund der Partikel-Partikel-Wechselwirkung gefunden werden. Für die drei hier gezeigten Konzentrationen ist der Strukturfaktor nicht komplett vernachlässigbar. Deswegen wird im folgenden Abschnitt erläutert, wie er nachträglich berücksichtigt und somit die Genauigkeit des Formfaktors erhöht werden kann. In Abbildung 6.2a) ist zunächst das  $\beta(q)$  gezeigt, welches aus der Polydispersität der Größenverteilung resultiert. In Abbildung 6.2b) sind verschiedene Strukturfaktoren einer Lösung mit 0,42 vol% Kugeln des Radius'  $R = 8,13$  nm gezeigt. In blau ist der Strukturfaktor  $S_{\text{HK}}$  dargestellt, der aus dem Potenzial der harten Schale resultiert. In vorhergehenden Untersuchungen [Kum14] wurde die interpartikuläre Wechselwirkung von Ludox LS 30 Nanopartikeln in 0.2 M NaCl durch die Summe aus Abstoßung der harten Schale und einem schwachen, kurzreichweitigen, abstoßenden Potenzial gemäß 6.2c) beschrieben. Dieses ist in der roten Kurve in Abbildung 6.2b) berücksichtigt, die schwarz gestrichelte berücksichtigt zusätzlich  $\beta(q)$ . Formal benötigt das in [Liu05] vorgestellte Matlab-Paket zur



**Abbildung 6.2:** a) zeigt  $\beta(q)$  für die gefundene Größenverteilung, in Rot markiert der später relevante Bereich. b) zeigt einen Strukturfaktor einer 0,42 vol.% Probe für unterschiedliche Potentiale. c) zeigt ein leicht repulsives Potenzial.

Berechnung des Strukturfaktors aus dem Potenzial ein zwei-Yukawa-Potenzial. Auch wenn eines der beiden unterdrückt wird, werden die durch [Liu05] bestimmten Strukturfaktoren in dieser Arbeit als  $S_{2Y}$  bezeichnet.

Die schwarz gestrichelte Kurve entspricht also dem zu erwartenden effektiven Strukturfaktor einer 1 wt.% Siliziumdioxid-Lösung. Im nächsten Abschnitt wird geprüft, ob unter Berücksichtigung der jeweiligen Strukturfaktoren die gemessene Streuintensität der 0,5 wt.%, 1 wt.% und 2 wt.%-Probe übereinstimmen. In Abbildung 6.3a) sind die Streuintensitäten der verschiedenen Konzentrationen durch den berechneten Formfaktor geteilt dargestellt. Hier wurde stets der Formfaktor verwendet, der an die 1 wt.%-Daten angepasst wurde. Für kleine  $q$  sind Abweichungen zwischen den verschiedenen Messungen erkennbar. Wird nun zusätzlich der konzentrationsabhängige effektive Strukturfaktor berücksichtigt, nähern sich die Kurven deutlich an, was belegt, dass das gewählte Strukturfaktormodell sinnvoll ist (Abbildung 6.3b)). Die Kurven weichen für kleine  $q$  maximal 5% voneinander ab. Deswegen wird davon ausgegangen, dass der Formfaktor der Partikel durch  $I(q)/S_{\text{eff}}$  der 1 wt.% Probe genähert werden kann. Dieses Modell wurde mit simplen Annahmen erstellt und liefert eine ausreichende Genauigkeit für die in Kapitel 6.3 vorgestellten Analysen der interpartikulären Wechselwirkung. Abschließend wurde unter Berücksichtigung des Strukturfaktors noch einmal eine Größenverteilung der Partikel bestimmt, die Parameter für Gleichung 6.2 änderten sich minimal ( $R_m = 8,84$  nm,  $\sigma_1 = 0,280$ ,  $\sigma_2 = 0,084$ ,  $R_{\text{eff}} = 8,17$  nm). Der Wert  $R_{\text{eff}}$  schwankte je nach Messung und berücksichtigtem

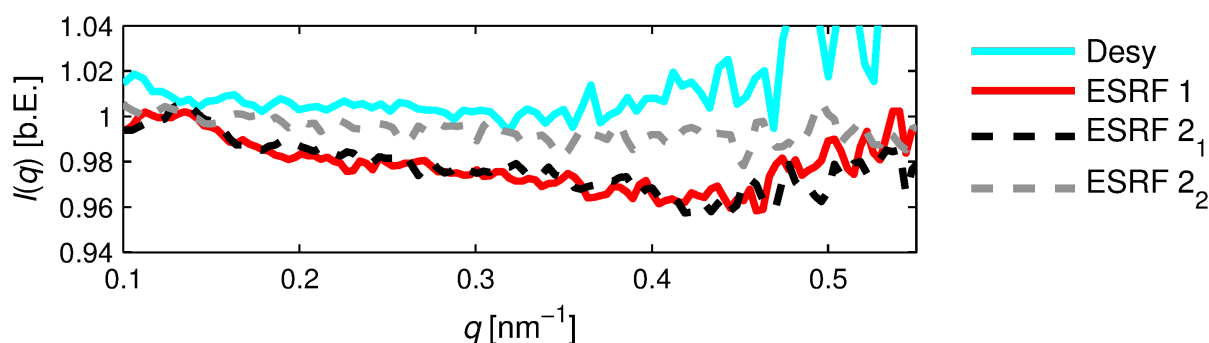


**Abbildung 6.3:** a) Gemessene Intensität für drei verschiedene Konzentrationen geteilt durch den an die 1 wt.% -Kurve angepassten Formfaktor. In b) wurde zusätzlich noch der jeweils zu erwartende Strukturformfaktor berücksichtigt.

$q$ -Bereich etwas.  $R_{\text{eff}} = 8,15 \pm 0,10 \text{ nm}$  ist eine realistische Abschätzung. Für eine Größenverteilung, die der exakten Größenverteilung der Partikel entspricht, gilt  $I/S_{\text{eff}} = 1$ . Abweichungen resultieren beispielsweise daraus, dass die berechnete Größenverteilung keinerlei Modelle für Aggregate enthält. Ebenso ist nicht anzunehmen, dass die Nanopartikel einer idealen Kugel entsprechen. In den folgenden Kapiteln wird zur Bestimmung des Strukturformfaktors häufig durch den gemessenen Formfaktor geteilt, hierbei wird  $S_{\text{eff,HS+2Y}}$  aus Abbildung 6.2 berücksichtigt. Der reale Formfaktor für den Druck  $p$ ,  $P(q,p)$ , ergibt sich also aus dem gemessenen  $P(q,p)_{\text{mess}}$  durch

$$P(q,p) = \frac{P(q,p)_{\text{mess}}}{S_{\text{eff,HS+2Y}}} \quad (6.3)$$

Nun soll die Druckabhängigkeit des Formfaktors untersucht werden. Hierfür wurde die gemessene Intensität bei Umgebungsdruck durch die gemessene Intensität bei 3,5 kbar geteilt. In Abbildung 6.4 ist dies für eine am DESY gemessene Probe und für zwei an der ESRF gemessenen Proben dargestellt. Insbesondere für die an der ESRF gemessene Probe lässt sich erkennen, dass die Intensität zwischen 0,1 und 0,4  $\text{nm}^{-1}$  abnimmt. Eine Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden, zumal der Effekt am DESY nicht reproduziert wurde. Da die Änderung reversibel ist (grau-gestrichelte Linie), kann ein Strahlschaden ausgeschlossen werden. Eine Anpassung einer Größenverteilung an den gemessenen Formfaktor ergab eine Änderung von  $R_{\text{eff}}$  um weniger als



**Abbildung 6.4:** Zur Bestimmung der Druckabhängigkeit des Formfaktors wurde die gemessene Intensität bei Umgebungsdruck durch die gemessene Intensität bei 3,5 kbar geteilt (cyan: am DESY gemessene Intensität; rot und schwarz: an der ESRF gemessene Intensität)

1 %, also innerhalb typischer Schwankungen des Wertes.

Zum Schluss dieses Kapitels soll beurteilt werden, ob das Modell der polydispersen Kugeln gut gewählt war. Es lässt sich festhalten, dass sich die Daten mit dem gewählten Modell nicht exakt modellieren lassen; gerade für kleine  $q$  sind Abweichungen von bis zu 20% erkennbar. Eine mögliche Ursache liegt darin, dass die hier verwendete Größenverteilung keine Aggregate zulässt. Aggregierte Nanopartikel weisen eine größere Streuintensität bei kleinen  $q$  auf. Außerdem existieren im Modell keine asymmetrischen Körper. Eine genauere Bestimmung der Größenverteilung war jedoch nicht notwendig für die Interpretation der folgenden Experimente. Im weiteren Verlauf verwendet wurde lediglich  $R_{\text{eff}}$  als zu erwartender Radius sowie  $\beta(q)$ , das einen geringen Einfluss auf den Strukturfaktor hat, wie in Abbildung 6.2b) zu erkennen ist.

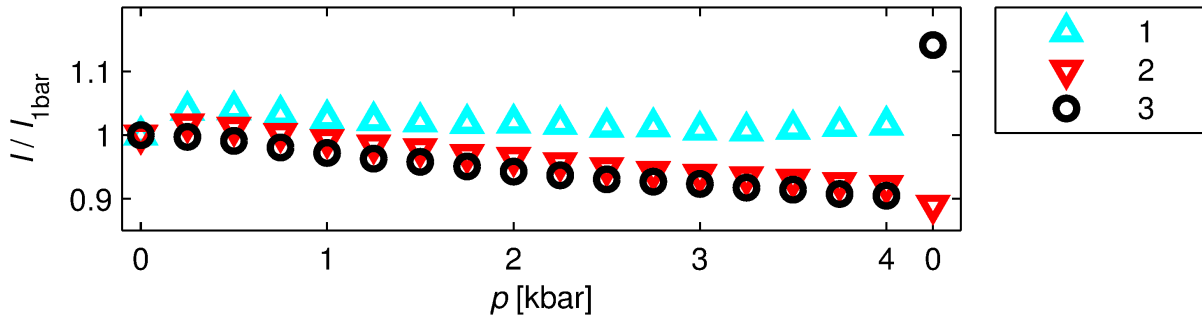
Im nächsten Abschnitt wird betrachtet, inwiefern Druckerhöhungen den Elektronendichtekontrast und somit die gemessene Gesamtintensität beeinflussen, um in späteren Experimenten eine mögliche Senkung der gemessenen Intensität aufgrund des geänderten Kontrastes von einem Ausfallen des Systems unterscheiden zu können. Hierzu wurde für drei druckabhängige Formfaktormessungen die gemessene Intensität für  $0,35 \text{ nm}^{-1} < q < 0,50 \text{ nm}^{-1}$  aufsummiert und durch den Wert bei Umgebungsdruck geteilt (Abbildung 6.5). Unter Beachtung des Kompressionsmoduls, dem geringen Einfluss des Drucks auf den Formfaktor sowie des geänderten Elektronendichtekontrastes kann davon ausgegangen werden, dass es zu keinen Änderungen der Form der Partikel kam und Änderungen der Intensität auf eine geänderte Menge der Nanopartikel im Strahlengang oder ungenaue Normierung durch die Strahllinie zurückzuführen sind. Relevant für spätere Experimente sind zwei Aspekte:

1. Eine Änderung des Normierungsfaktors in Bezug auf die Formfaktormessungen bei Umgebungsdruck von maximal 10 % zwischen 1 bar und 4 kbar ist im Rahmen des zu erwartenden Fehlers und wird bei den folgenden Experimenten nicht weiter beachtet; es wird im weiteren



Verlauf davon ausgegangen, dass die Probe nicht ausgefallen ist.

2. Wird nach der 4 kbar Messung erneut bei 1 bar gemessen, kann es zur Änderung der Intensität im Bereich von 10 % kommen. Ein Grund hierfür könnten Verformungen des Kaptonfensters des Probenhalters sein.

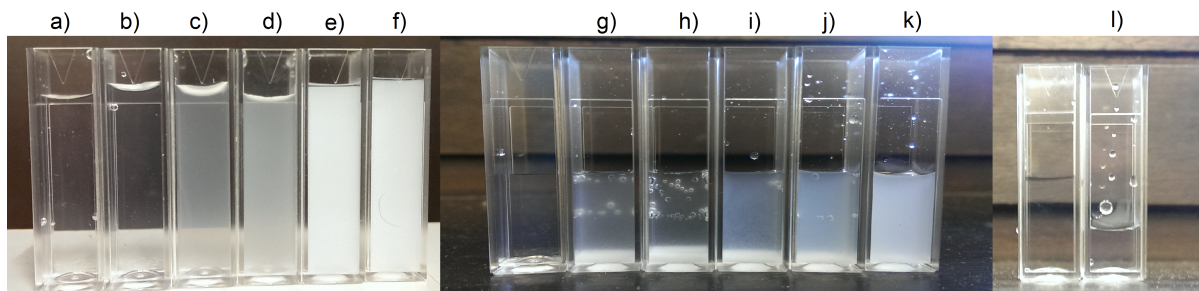


**Abbildung 6.5:** Normierte Intensität für drei druckabhängige Formfaktormessungen desselben Systems.

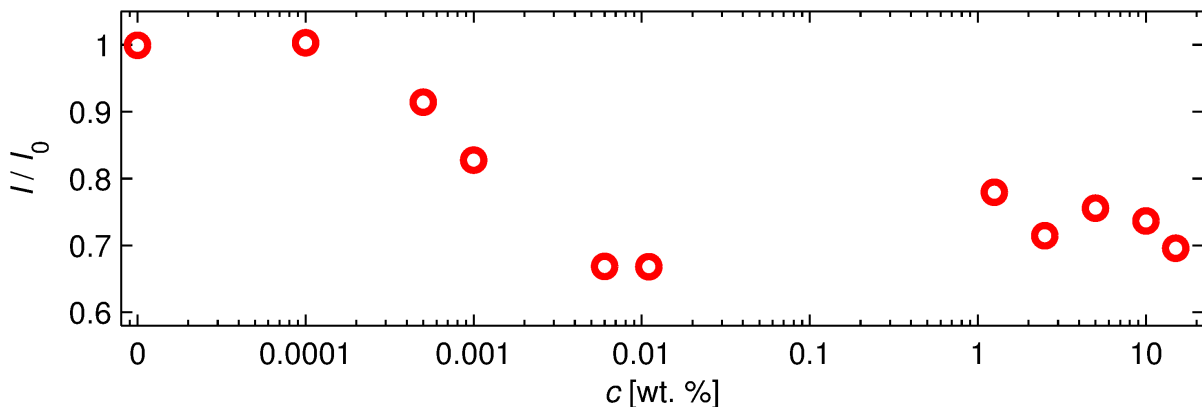
## 6.2 Stabilität des Nanopartikel-Polymer-Systems

In diesem Kapitel wird die Stabilität von Nanopartikel-PEG-Systemen betrachtet. In der Nähe der flüssig-flüssig-Phasengrenze von kolloidalen Systemen ist das Wechselwirkungspotenzial so attraktiv, dass eine mögliche Aggregation der Kolloide berücksichtigt werden muss. Außerdem kann sich ein phasensepariertes System auch auf makroskopischer Ebene separieren, indem beispielsweise die dichtere Phase nach unten absinkt. Die Zeitspanne, in der dies im Labor beobachtet wurde, variierte je nach Lösung zwischen zehn Minuten und einigen Stunden. Deswegen muss bei der späteren Interpretation der druckabhängigen Experimente immer auch berücksichtigt werden, dass es sich um eine rein zeitlich bedingte Änderung handeln könnte. In [Kum14] wurden neben Neutronenkleinwinkelstreuung auch Transmissionsmessungen vorgestellt, um zu beurteilen, ob ein Nanopartikel-PEG System in der homogenen oder phasenseparierten Phase ist. Die Probensysteme dieser Arbeit wurden mit Transmissionsmessungen sowie fotografisch charakterisiert. Die Proben wurden in drei Konzentrationsbereiche eingeteilt. Proben desselben Konzentrationsbereiches wurden gleichzeitig hergestellt, nacheinander in Kuvetten gefüllt und direkt mit Transmissionsmessungen vermessen. Die Fotos in Abbildung 6.6 sind jeweils nach Abschluss aller Transmissionsmessungen eines Bereiches entstanden, die Proben befanden sich deshalb unterschiedlich lange in den Kuvetten.

Abbildung 6.6 zeigt Proben, die 1 wt.% Nanopartikel sowie unterschiedliche PEG-Anteile enthalten. Von a) nach l) nimmt die PEG-Konzentration zu. Auf den Fotos erkennt man von b) bis



**Abbildung 6.6:** Fotos von Proben in Kuvetten, alle enthalten 1 wt.% Nanopartikel, a) kein PEG, b)  $10^{-4}$  wt.%, c)  $5 \cdot 10^{-4}$  wt.%, d) enthält  $10^{-3}$  wt.%, e)  $6 \cdot 10^{-3}$  wt.% und f)  $1,1 \cdot 10^{-2}$  wt.% PEG. Diese Lösungen zeigten keinerlei zeitlichen Instabilitäten. g) 1,25 wt.% PEG (ca. 5 Min nach Einfüllen in die Kuvette), h) 2,5 wt.% (8 Min), i) 5 wt.%(10 min), j) 10 wt.%(12 Min), k) 15 wt.%(15 Min), l) 20 wt.%(keinerlei optische Veränderung).



**Abbildung 6.7:** Ergebnisse der Transmissionsmessung von a) nach k). Die Transmissionsmessungen wurden jeweils direkt nach dem Einfüllen in die Kuvette durchgeführt. Eine Transmissionsmessung für l) wurde nicht durchgeführt, da das Probenvolumen nicht ausreichte.

e) eine Zunahme der Trübung, f) ist ebenso wie e) sehr trüb; sicher kann gesagt werden, dass in a) keine Trübung vorliegt, während in e) und f) eine eindeutige Phasentrennung beobachtet werden kann. Auch von g) bis k) nimmt die PEG Konzentration zu. Zu erwarten ist nach [Kum14] eine Abnahme der Trübung. Tatsächlich ist jedoch nur Probe k) trüb und, weniger deutlich, i) und j). Bei g) bis j) ist eine Schicht weißer Ablagerungen am Boden der Kuvette zu erkennen. Das könnte ein Hinweis auf aggregierte und zu Boden gesunkene Partikel sein. Zu beachten ist hier jedoch, dass die Proben etwa 30 Minuten nach dem Herstellungsprozess fotografiert und außerdem nicht zur selben Zeit in die Kuvetten gefüllt wurden. l) hingegen ist klar, Ablagerungen am Boden sind nicht zu erkennen. In Abbildung 6.7 ist die Transmission des Laserlichtes durch die Nanopartikel-Polymerlösungen in Abhängigkeit der Polymerkonzentration dargestellt. Eine Trübung ist zwischen  $5 \cdot 10^{-4}$  wt.% bis 15 wt.% erkennbar, während 20 wt.%

wieder ein klares Erscheinungsbild aufweist. Aufgrund der geringen Probenmenge wurde die Probe nicht mit Transmissionsmessungen charakterisiert. Zwischen 1 und 15 wt.% muss jedoch eine mögliche Fällung beachtet werden. In [Kum14] ist nur zwischen  $1 \cdot 10^{-3}$  wt.% bis 1 wt.% eine Eintrübung festgestellt worden. Der Zweiphasen-Bereich für das in dieser Arbeit verwendete System ist also deutlich verbreitert.

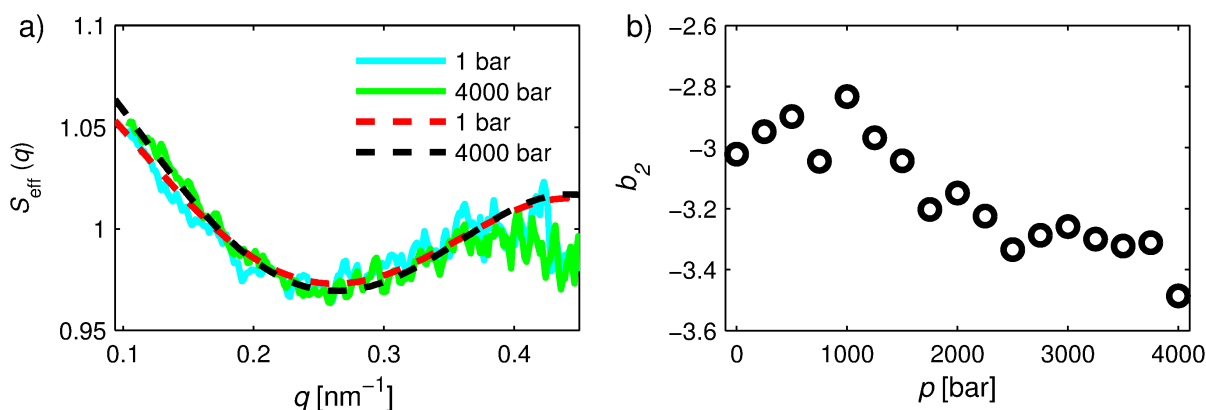
### 6.3 Geringe Polymerkonzentration

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von hydrostatischen Drücken auf ein System aus 1 wt.% Siliziumdioxid-Nanopartikeln und niedrigen PEG-Konzentrationen betrachtet. Systeme mit PEG-Konzentrationen zwischen  $10^{-4}$  und  $5 \cdot 10^{-4}$  wt.% werden als gering bezeichnet. Exemplarisch werden nun zwei Messreihen vorgestellt. Ziel ist, die Druckabhängigkeit des Wechselwirkungspotenzials zu bestimmen und den daraus resultierenden reduzierten zweiten Virialkoeffizient  $b_2$  zu bestimmen. Hierzu müssen die Strukturfaktoren der Nanopartikel analysiert werden.

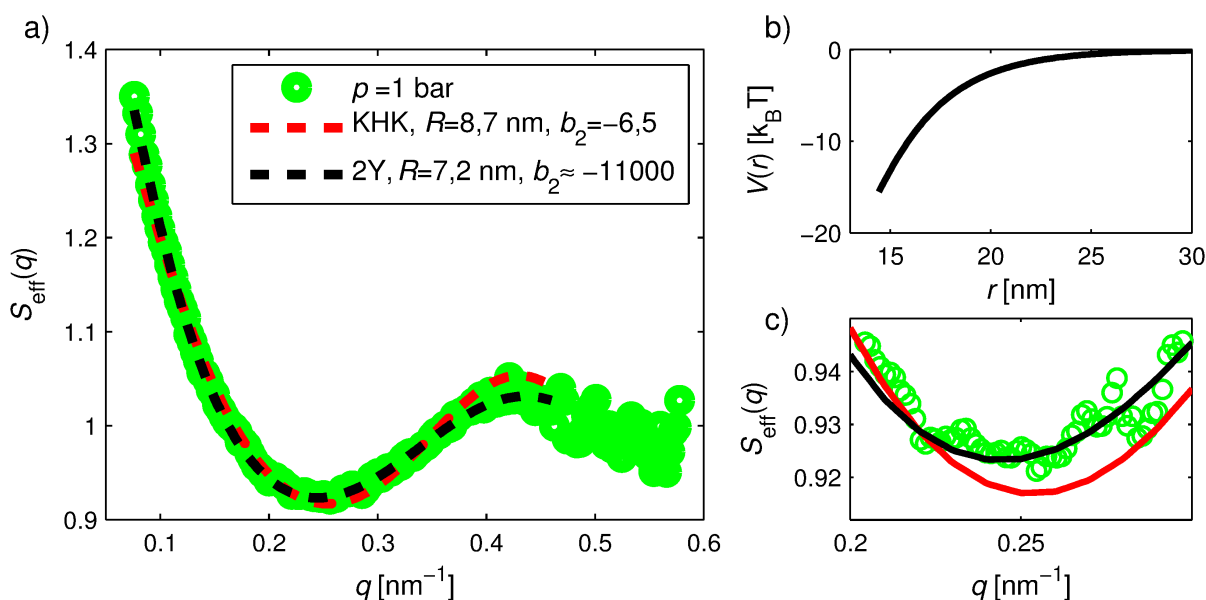
Zunächst wird eine Messung mit  $10^{-4}$  wt.% PEG vorgestellt. Der druckabhängige effektive Strukturfaktor  $S_{\text{eff}}$  wurde bestimmt, indem die gemessene Intensität  $I(q)$  durch den gemessenen Formfaktor bei dem jeweiligen Druck geteilt wurde. Dies ist in Abbildung 6.8a) für Umgebungsdruck und dem höchsten gemessenen Druck, 4 kbar, gezeigt. Bei der Bestimmung des zweiten Virialkoeffizienten mit dem KHK-Modell wurde der Partikelradius konstant gehalten, um vergleichbare Resultate zu erhalten. Zur Verringerung der Abweichungen der gemessenen und berechneten effektiven Strukturfaktoren wurde ein leicht erhöhter Radius von  $R_{\text{eff}} = 8,3$  nm verwendet. Abbildung 6.8b) zeigt die zweiten Virialkoeffizienten in Abhängigkeit des Drucks. Es ist eine leichte Tendenz zu negativeren  $b_2$  zu erkennen, was attraktiveren Bedingungen entspricht. Wie in Abbildung 6.8a) zu erkennen ist, sind die Unterschiede in den Strukturfaktoren aber in der Nähe der Auflösungsgrenze.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass bei sehr geringen PEG-Konzentrationen eine attraktive Wechselwirkung festgestellt werden kann. Die Änderung der Wechselwirkung durch hydrostatische Drücke ist aber gering und es kann kein Phasenübergang beobachtet werden.

Nun wird ein System mit einer PEG-Konzentration von  $5 \cdot 10^{-4}$  wt.% bei Umgebungsdruck betrachtet (Abbildung 6.9). Es werden die unterschiedlichen Ergebnisse für eine Strukturfaktorberechnung mit dem zwei-Yukawa-Modell und dem KHK-Modell diskutiert. Wie in Abbildung 6.9a) zu erkennen, kann sowohl mit dem KHK-Modell als auch mit dem zwei-Yukawa-Modell ein effektiver Strukturfaktor berechnet werden, der die Daten beschreibt. Das ausgeprägte Minimum ermöglichte dieses Mal die Anpassung der Wechselwirkungsstärke und des Radius. Die Modelle liefern unterschiedliche Radien der harten Schale. Während das KHK-Modell mit  $R_{\text{eff}} = 8,7$  nm einen größeren Radius als erwartet liefert, liefert das zwei-Yukawa-Modell mit  $R_{\text{eff}} = 7,2$  nm



**Abbildung 6.8:** a) zeigt den gemessenen  $S_{\text{eff}}$  eines Systems mit 1 wt. % Ludox und  $10^{-4}$  wt. % PEG für Umgebungsdruck und 4000 bar sowie berechneten Strukturfaktoren (gestrichelt). Die nicht gezeigten Messdaten sind im Anhang zu finden (Abb. 7.2). In b) ist die Druckabhängigkeit von  $b_2$  dargestellt.



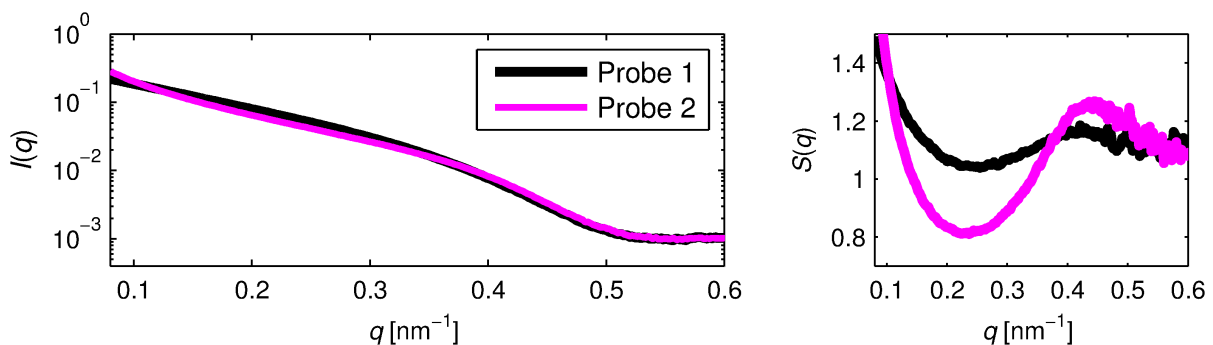
**Abbildung 6.9:** a) zeigt den effektiven gemessenen Strukturfaktor eines Systems mit 1 wt.% Ludox und  $5 \cdot 10^{-4}$  wt.% PEG für Umgebungsdruck sowie die berechneten Strukturfaktoren nach dem KHK- bzw. dem zwei-Yukawa-Modell. In b) ist das Interaktionspotenzial abgebildet, in c) ist das Minimum der Strukturfaktoren genauer dargestellt.

einen kleineren Radius. Abbildung 6.9c) stellt die Minima des gemessenen und der berechneten Strukturfaktoren vergrößert dar. Die Position des Minimums ist ein charakteristisches Merkmal der Teilchengröße. Man erkennt, dass der Unterschied in der  $q$ -Position des Minimums gering ist. Dies könnte ein Hinweis sein, dass beide Ergebnisse in etwa gleichberechtigt sind. Der gemittelte Wert der gefundenen Radien entspricht dem erwarteten Wert gemäß der Formfaktormessungen

der Nanopartikel.

Nun werden die verschiedenen  $b_2$ -Werte, die die unterschiedlichen Modelle liefern, verglichen. Für das zwei-Yukawa-Potenzial findet man einen Wert von etwa -11000. Dies ist betragsmäßig ein deutlich zu großer Wert. In [Men91] wird darauf hingewiesen, dass in der Nähe von Phasengrenzen die durch das zwei-Yukawa-Modell berechneten Paarpotenziale deutlich zu große Werte aufweisen. Das KHK-Modell liefert  $b_2 = -6.2$ , dies ist die Größenordnung, in der zweite Virialkoeffizienten für ein System aus Kolloiden in der Nähe der Phasengrenze liegen. Dieser Wert markiert auch die Phasengrenze im KHK-Modell [Vli00], attraktivere Bedingungen führen zu einem Phasenübergang. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass sowohl das KHK- als auch das zwei-Yukawa-Modell einen Strukturfaktor liefern können, mit dem sich ein System aus 1 wt.% Nanopartikel und  $5 \cdot 10^{-4}$  wt.% PEG beschreiben lässt. Nur das KHK-Modell liefert jedoch zweite Virialkoeffizienten, die in einer realistischen Größenordnung liegen.

Eine Druckerhöhung führte für diese Probe zu einer weiteren Zunahme der Attraktivität der Wechselwirkung. Ob dies jedoch der Wirkung des Drucks auf die Probe zuzuschreiben ist oder ob es eine zeitlich bedingte Änderung war, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Anschließend wurde ein System identischer Konzentration vermessen. In diesem System hat sich bereits ein deutliches, breites Maximum bei  $0,45 \text{ nm}^{-1}$  herausgebildet (s. Abbildung 6.10), welches ein Indikator dafür ist, dass die Phasen bereits separiert vorlagen (s. Kap. 3.9). Eine Polymerkonzentration von  $5 \cdot 10^{-4}$  wt.% PEG markiert also die Grenze zwischen der homogenen und der phasenseparierten Phase.



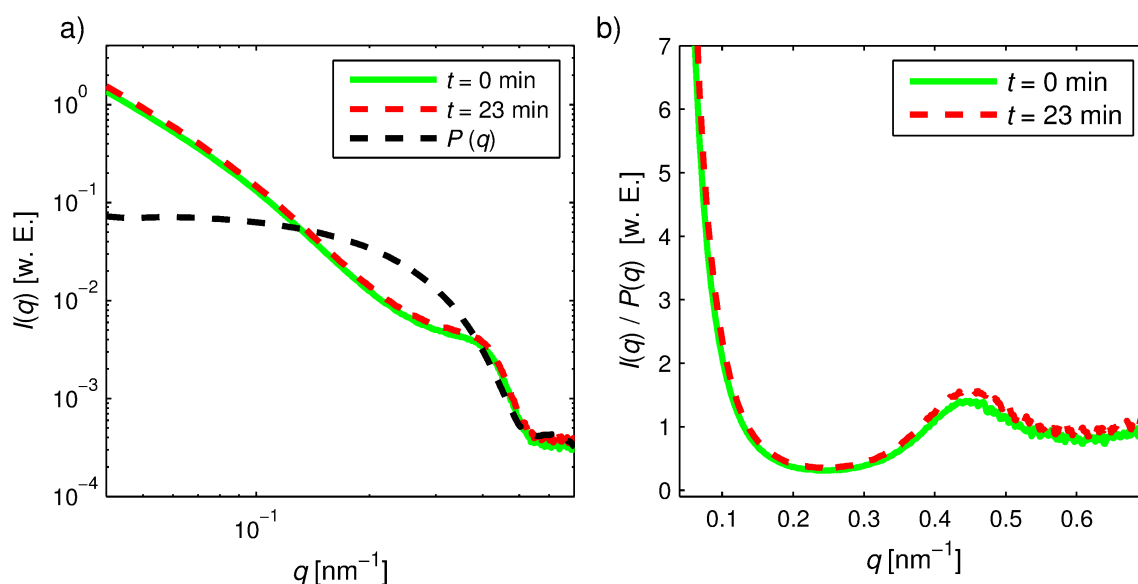
**Abbildung 6.10:** Zwei nacheinander vermessene Proben mit einer PEG Konzentration  $5 \cdot 10^{-4}$  wt.% bei Umgebungsdruck. Während bei der ersten Probe noch davon ausgegangen werden kann, dass die Probe in homogener Lösung vorliegt, hat schon bei zweiten Probe ein deutliches Maximum bei etwa  $0,45 \text{ nm}^{-1}$  herausgebildet.

## 6.4 Hohe Polymerkonzentration

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von hydrostatischen Drücken auf ein System aus 1 wt.% Siliziumdioxid Nanopartikel und PEG-Konzentrationen von mindestens 5 wt.% betrachtet. In diesem Konzentrationsbereich wurde beobachtet, dass durch hydrostatischen Druck ein Phasenübergang von der phasenseparierten in die homogene Phase induziert werden kann. Zunächst wird gezeigt, dass der Phasenübergang bei Umgebungsdruck nach 30 Minuten für eine 7,5 wt.%-Probe nicht beobachtet werden kann. Danach werden die druckabhängigen Messungen von 7,5 wt.%, 15 wt.% und 5 wt.% PEG vorgestellt. Zum Abschluss des Kapitels wird eine 15 wt.%-Probe nur für Umgebungsdruck, 1,5 kbar sowie 3,0 kbar gemessen, es wurden Äquilibrierungszeiten von 20 Minuten verwendet. Ein Vergleich der Ergebnisse für die unterschiedlichen Konzentrationen findet in Kapitel 6.7 statt.

### 7,5 wt% PEG

In diesem Kapitel wird das zeit- und druckabhängige Phasenverhalten einer 7,5 wt.%-PEG-Probe vorgestellt. Zunächst wird die Stabilität bei Umgebungsdruck (1 bar) geprüft. Hierzu wurde die Probe bei Umgebungsdruck mehrfach vermessen. In Abbildung 6.11 sind Messungen direkt nach Einsetzen der Probe in die Messapparatur dargestellt sowie 23 Minuten später (19. Bild der Messreihe). Außerdem ist der Formfaktor zum Vergleich dargestellt. Die Intensität steigt



**Abbildung 6.11:** a) zeigt die gemessene Intensität zum Zeitpunkt  $t=0$  und  $t=23$  Minuten, der Formfaktor der Nanopartikel ist in schwarz dargestellt. In b) ist die gemessene Intensität geteilt durch den Formfaktor dargestellt. In der homogenen Phase würde das dem effektiven Strukturfaktor entsprechen.

während der 23 Minuten um etwa 10 % an. Dies könnte ein Hinweis auf eine Phasenseparation auf makroskopischer Ebene sein. Insgesamt ist jedoch festzuhalten, dass keinerlei strukturelle Änderungen des Streusignals erkennbar sind. Es wurde also weder ein Strahlenschaden beobachtet, noch erkennt man einen Phasenübergang.

Es wurden für gleiche Konzentrationen druckabhängige Messungen durchgeführt. Der Druck wurde in 250 bar Schritten erhöht, mit einer Äquilibrierungszeit von einer Minute. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 6.12a) nur ausgewählte Messungen gezeigt. Zur besseren Übersicht sind  $I(q)$  und  $S(q)$  für die verschiedenen Drücke relativ zueinander verschoben. Die nicht gezeigten Messdaten sind im Anhang zu finden (Abb. 7.3). Die Proben befinden sich zwischen Umgebungsdruck und 2000 bar in der phasenseparierten Phase, zu erkennen am deutlich ausgeprägten Maximum bei etwa  $0,45 \text{ nm}^{-1}$ , das aus der hohen Ordnung der Partikel innerhalb der Nanopartikelphase resultiert. Bei 2500 bzw. 4000 bar ist dieses Maximum nicht deutlich sichtbar; die Lösung befindet sich in der homogenen Phase. Im Folgenden wird die Auswertung der Daten detailliert diskutiert.

Zunächst wird erläutert, wie die Messdaten für diejenigen Drücke ausgewertet wurden, in denen das System phasensepariert vorlag. Die gemessene Streuintensität wurde für  $0,05 \text{ nm}^{-1} < q < 0,15 \text{ nm}^{-1}$  mit Hilfe des Potenzgesetzes (Kap. 3.9) gemäß

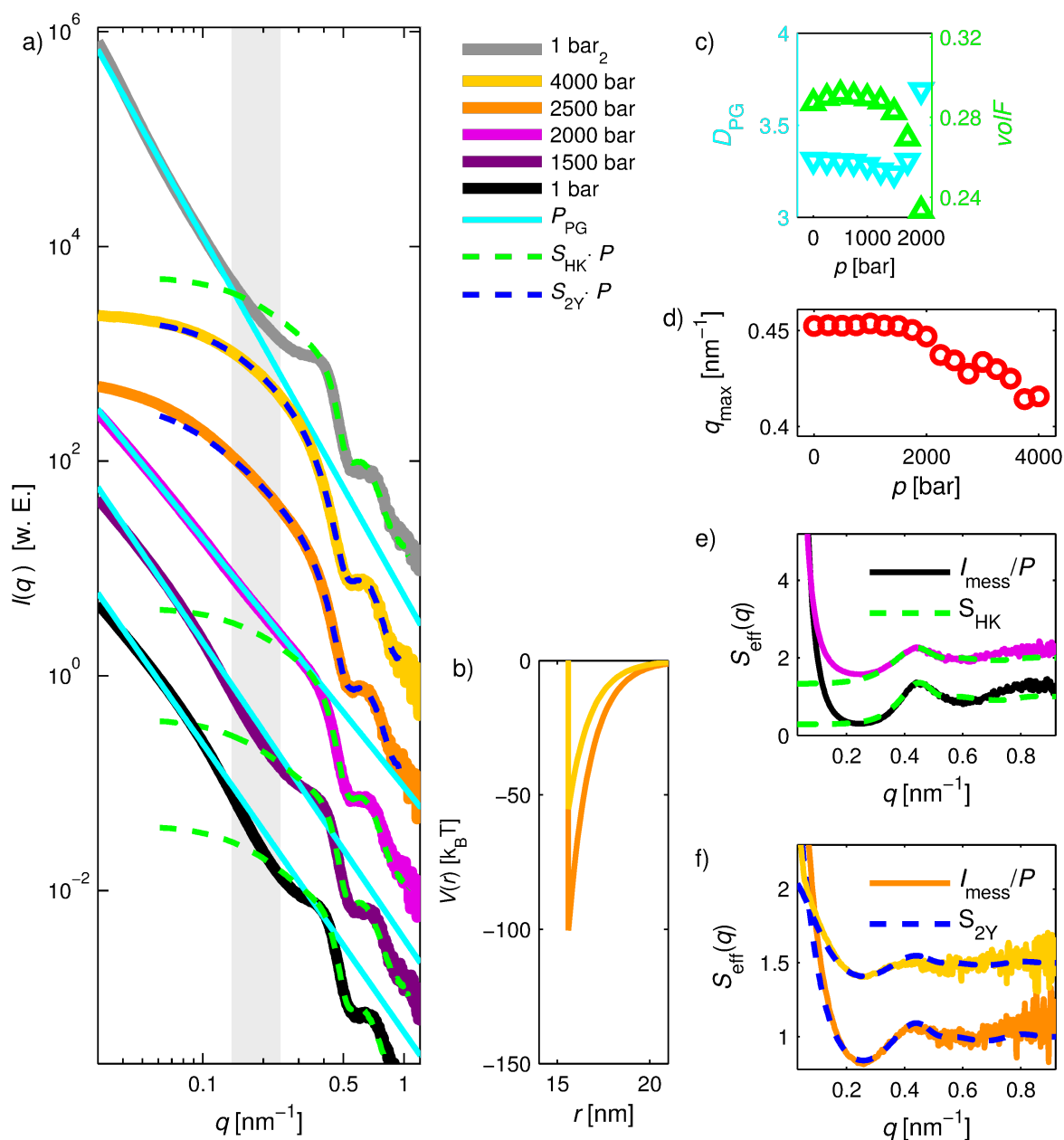
$$I(q) \propto k \cdot q^{-(6-D_{\text{PG}})} \quad (6.4)$$

berechnet (cyane Kurven in Abbildung 6.12a)), die Druckabhängigkeit des Parameters  $D_{\text{PG}}$  ist in Abbildung 6.12c) gezeigt. Es ist in der doppelt logarithmischen Darstellung zu erkennen, dass ein Abfall der Intensität nach dem Potenzgesetz auch für kleine  $q$  die Intensität nicht exakt modelliert, da die  $I(q)$  deutliche Krümmungen aufweisen. Parameter  $D_{\text{PG}} > 3$  zeigen auch, dass das System sich nicht durch fraktale Oberflächen ausreichend beschreiben lässt, für deren Dimension stets  $2 \leq D \leq 3$  gilt. Dennoch ist die Druckabhängigkeit von  $D_{\text{PG}}$  von Bedeutung, da eine Veränderung des Parameters ein Indiz für druckabhängige Veränderungen in der Lösung ist.

Für  $q > 0,2 \text{ nm}^{-1}$  lässt sich das System bei Umgebungsdruck als ein System aus harten Kugeln (grüne Kurven in a) und e)) beschreiben. Ein System aus harten Kugeln ist charakterisiert durch den Volumenanteil  $\text{vol}F$ , den die Kugeln einnehmen, sowie den Radius der Kugeln. Aus der Position des ersten Maximum des Strukturfaktors<sup>1</sup>  $q_{\text{max}}$  kann gemäß  $q_{\text{max}} \cdot R \approx 2\pi$  auf das erste Maximum der radialen Verteilungsfunktion  $g(r)$  geschlossen werden.

In Abbildung 6.12e) sind berechnete, effektive Strukturfaktoren für ein System aus harten Kugeln gezeigt, zusammen mit dem gemessenen Strukturfaktor. Der Volumenanteil liegt bei

<sup>1</sup>Zur Bestimmung von  $q_{\text{max}}$  wurde in einem geeigneten Bereich um das Maximum von  $I_{\text{mess}}/P(q)$  eine Parabel angepasst. Das Maximum der Parabel wird als  $q_{\text{max}}$  bezeichnet.



**Abbildung 6.12:** a) zeigt die gemessene Intensität  $I_{mess}$  einer Probe, die 7,5 wt.% PEG enthält für ausgewählte hydrostatische Drücke. Außerdem enthält die Abbildung die Beschreibung der Daten durch das Potenzgesetz (cyane Kurve,  $D_{PG}$  in c)), durch das Modell aus harten Kugeln (grün gestrichelt, Volumenanteil  $volF$  der Kugeln in c)), sowie der Strukturfaktoren, die aus einem zwei-Yukawa-Potenzial resultieren (gestrichelt, Potenziale in b)). In d) sind die Maxima der Strukturfaktoren für verschiedene Drücke gezeigt, in e) und f) die Strukturfaktoren für die phasenseparierte bzw. homogene Phase.



Umgebungsdruck bei 0,29. Dieser Wert ist deutlich geringer als der Wert für die dichteste Kugelpackung (0,74) oder auch für das dichteste kubisch primitiven Gitters (0,52). Zufällige Aggregation führt in der Regel zu  $volF$  von deutlich oberhalb von 0,5 [Tor00]. Dies deutet darauf hin, dass die Kugeln räumlich getrennt sind und keine Aggregation vorliegt. Der Radius der Kugeln liegt mit etwa 6,7 nm etwa 18% unterhalb des erwarteten Radius  $R_{\text{eff}} = 8,15$  nm, aber in Übereinstimmung mit der Position des Maximums des Strukturfaktors  $q_{\text{max}}$  bei etwa  $0,45 \text{ nm}^{-1}$  (Abb. 6.12d)), was einem Maximum in  $g(r)$  bei 7,15 nm entspricht. Man erkennt in e), dass das erste Maximum des Strukturfaktors gut durch das Modell beschrieben werden kann, insbesondere die Breite des Maximums, die charakteristisch ist für die Ordnung der Partikel in der Lösung. Für  $q > 0,7 \text{ nm}^{-1}$  erkennt man, dass die gemessene Intensität etwas höhere Werte hat als die berechneten Intensität. Dies könnte durch das nicht bestimmbare Untergrundsignal der Oberfläche der Nanoartikelphase verursacht worden sein. Ein Hinweis auf den Ursprung ist, dass die Abweichung in der homogenen Phase deutlich zurückgeht bzw. bei 4000 bar ganz verschwunden ist. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass die Radien der harten Kugeln etwas kleiner ausfallen als erwartet.

Nun wird die Veränderung von  $D_{\text{PG}}$ ,  $volF$  sowie  $q_{\text{max}}$  beschrieben, die bei einer Erhöhung des Drucks beobachtet wurde. Die Parameter ändern sich bis etwa 1250 bar kaum. Das System kann somit als unverändert betrachtet werden. Zwischen 1500 und 2000 bar beginnt bei jedem der Parameter ein Veränderungsprozess:

- $volF$  sinkt, ein Zeichen, dass die Kugeln weniger dicht gepackt sind. Für 2000 bar erkennt man in e) eine deutliche Verbreiterung des Maximums, was ebenfalls ein Zeichen für einen Verlust der Ordnung ist.
- $q_{\text{max}}$  sinkt, was größeren Abständen im Realraum entspricht: ein Zeichen, dass die Nanopartikel größere Abstände einnehmen.
- $D_{\text{PG}}$  steigt. Dies ist ein Zeichen für strukturelle Änderungen der Lösung.

Bei hydrostatischen Drücken von mehr als 2000 bar kann die gemessene Intensität nicht mehr durch das Potenzgesetz und die harten Kugeln beschrieben werden, da das System in die homogene Phase eintritt. Ab etwa 2500 bar kann mit Hilfe eines sehr attraktiven zwei-Yukawa-Kolloid-Kolloid-Wechselwirkungsspotenzials (Potenziale in Abbildung 6.12b)) ein Strukturfaktor errechnet werden, der das System gut beschreibt. Bei 4000 bar ist das Potenzial deutlich weniger attraktiv als bei 2000 bar und nähert sich somit dem wechselwirkungsfreien Zustand an. In allen Fällen wurde der Radius der harten Kugel auf  $R \geq 7,8 \text{ nm}^{-1}$  festgesetzt, damit die Position des ersten Minimums und Maximums des Strukturfaktors gut abgebildet wurde. Die Strukturfaktoren sind in Abbildung 6.12f) gezeigt.

Auch in der homogenen Phase führt eine Druckerhöhung zu einer Verringerung von  $q_{\max}$ , was ebenfalls für eine Verringerung der Attraktion spricht.

Nachdem die Probe bei 4000 bar gemessen wurde, wurde der Druck wieder auf Umgebungsdruck abgesenkt (graue Kurve in a)). Man erkennt, dass der Phasenübergang reversibel ist: die Probe durchläuft erneut die Phasengrenze in die phasenseparierte Phase.

### 15 wt.% PEG

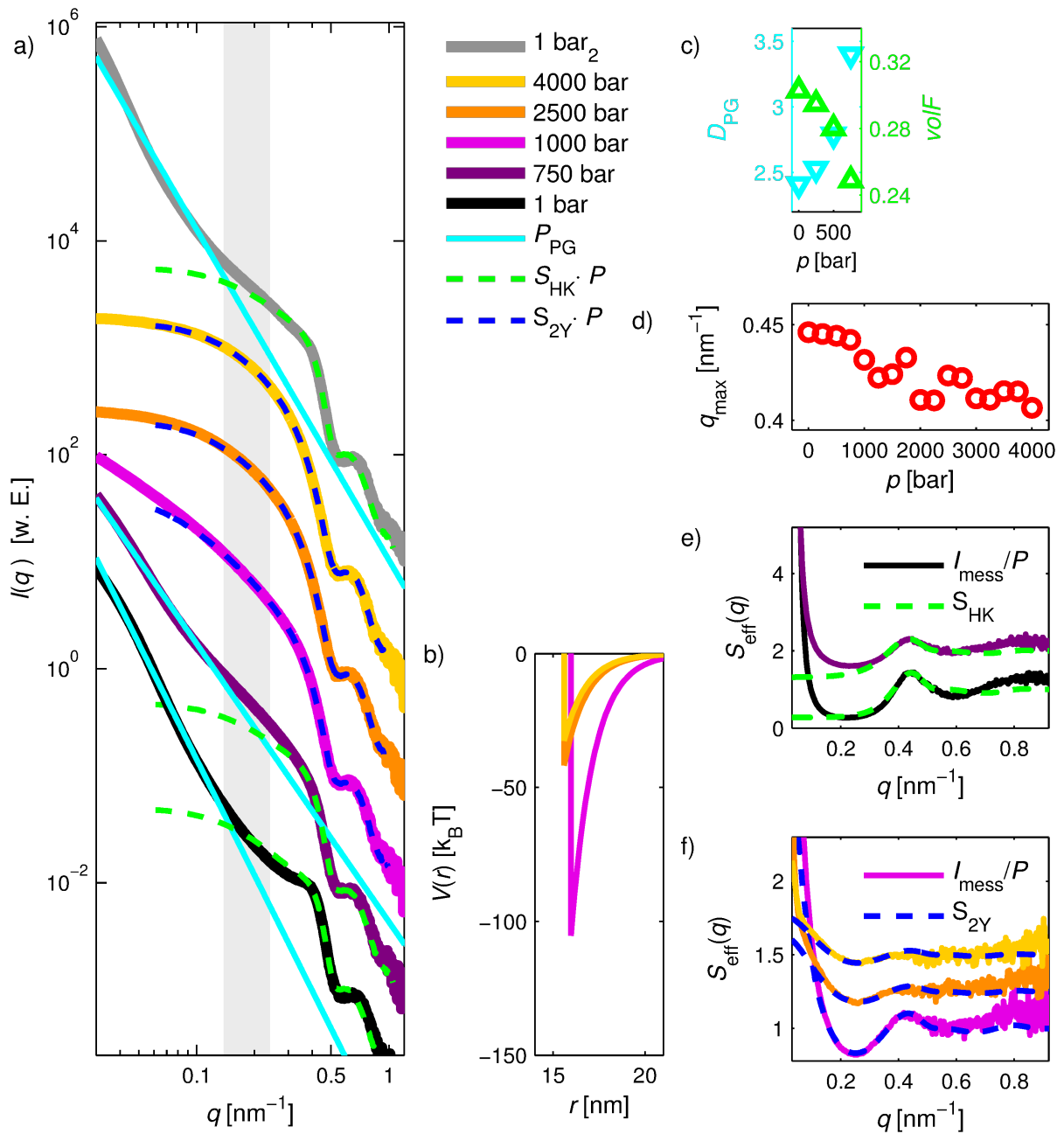
In diesem Kapitel wird das druckabhängige Phasenverhalten einer Probe beschrieben, die 15 wt.% PEG enthält. Hierzu wurde ebenfalls der Druck in 250 bar Schritten erhöht, bei jedem Druck wurde eine Minute gewartet, erst dann wurde die Messung gestartet. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 6.13a) nur ausgewählte Messungen gezeigt.

Ebenso wie für 7,5 wt.% PEG ist die Probe für Umgebungsdruck in der phasenseparierten Phase, durch Erhöhung des hydrostatischen Druckes ist ein Phasenübergang in die homogene Phase induzierbar. Die Auswertung der Daten erfolgte auf die gleiche Weise wie in Kapitel 6.4. Für Umgebungsdruck ist die Probe in der phasenseparierten Phase, der Volumenanteil  $volF$  der harten Kugeln liegt mit etwa 0,30 sehr nah an dem im vorhergehenden Abschnitt gefundenen Wert. Mit  $D_{PG} \approx 2,5$  käme eine Streuung an einer fraktalen Oberfläche in diesem Fall in Frage, da dies aber für andere Konzentrationen nicht gilt, wird nicht davon ausgegangen, dass eindeutig fraktale Strukturen beobachtet wurden.

Schon die erste Druckerhöhung um 250 bar führt zu strukturellen Änderungen im Streusignal:

- $volF$  sinkt, ein Zeichen, dass die Kugeln weniger dicht gepackt sind. Für 750 bar erkennt man in e) eine deutliche Verbreiterung des Maximums.
- $q_{\max}$  sinkt, was größeren Abständen zwischen den Kugeln entspricht.
- $D_{PG}$  steigt. Dies ist ein Anzeichen für strukturelle Veränderungen in der Lösung.

Bis 750 bar kann ein Strukturfaktor an die Daten angepasst werden, der nur die Abstoßung durch die harte Schale berücksichtigt. Die besten Resultate wurden mit einem Kugelradius von 7,0 nm erzielt. Ab 1000 bar befindet sich die Probe in der homogenen Phase, die Wechselwirkungspotenziale sind in Abbildung 6.13b) dargestellt, die entsprechende Struktur Faktoren der homogenen Phase in 6.13f). Sowohl an den Wechselwirkungspotenzialen als auch an den effektiven Struktur Faktoren ist zu erkennen, dass sich die Wechselwirkung von sehr attraktiven Bedingungen ausgehend immer mehr dem wechselwirkungsfreien Zustand annähert.



**Abbildung 6.13:** a) zeigt die gemessene Intensität  $I_{mess}$  einer Probe, die 15 wt.% PEG enthält für ausgewählte hydrostatische Drücke. Außerdem enthält die Abbildung die Beschreibung der Daten durch das Potenzgesetz (cyane Kurve,  $D_{PG}$  in c)), durch das Modell aus harten Kugeln (grün gestrichelt, Volumenanteil  $volF$  der Kugeln in c)) sowie der Strukturfaktoren, die aus einem zwei-Yukawa-Potenzial resultieren (gestrichelt, Potenziale in b)). In d) sind die Maxima der Strukturfaktoren für verschiedene Drücke gezeigt, in e) und f) die Strukturfaktoren für die phasenseparierte bzw. homogene Phase.

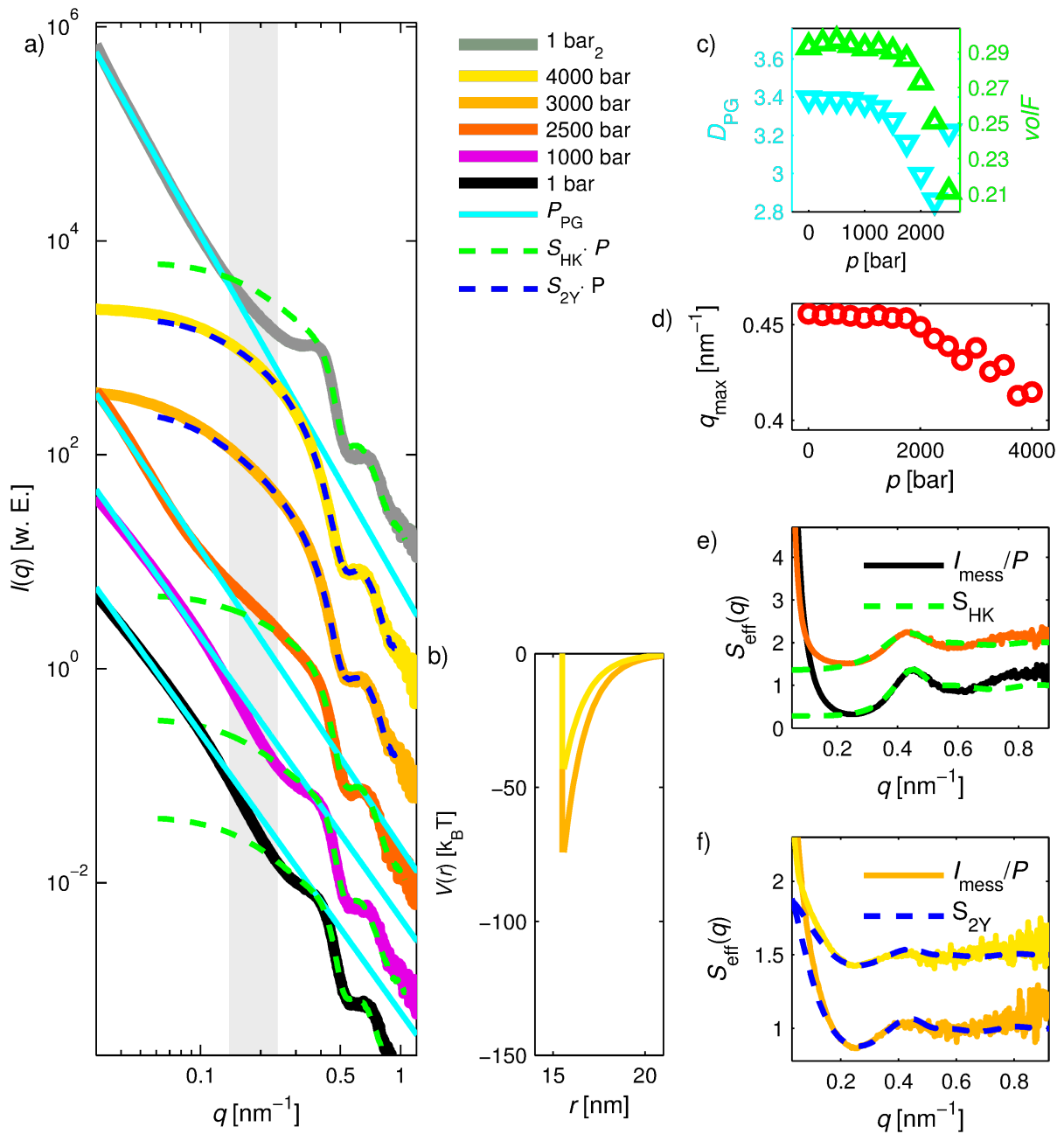
## 5 wt.% PEG

In diesem Kapitel wird das druckabhängige Phasenverhalten einer Probe beschrieben, die 5 wt.%-PEG enthält. Hierzu wurde ebenfalls der Druck in 250 bar Schritten erhöht. Bei jedem Druck wurde eine Minute gewartet, erst dann wurde die Messung gestartet. Erneut sind zur besseren Übersicht in Abbildung 6.14a) nur ausgewählte Messungen gezeigt.

Ebenso wie die zuvor beschriebenen Lösungen ist diese bei Umgebungsdruck in der phasen-separierten Phase. Durch Erhöhung des hydrostatischen Druckes ist ein Phasenübergang in die homogene Phase induzierbar. Der Volumenanteil  $volF$  der harten Kugeln ist mit etwa 0,29 den zuvor gefundenen Werten sehr ähnlich,  $D_{PG} \approx 3,4$  liegt ebenfalls im Bereich der zuvor bestimmten Exponenten. Anders als zuvor sind bis etwa 1500 bar  $volF$ ,  $q_{max}$  und  $D_{PG}$  unverändert, wie in Abbildung 6.14c) und d) zu erkennen ist. Höhere Drücke führen dann zu der bekannten Änderung des Streusignals:

- $volF$  sinkt, ein Zeichen, dass die Kugeln weniger dicht gepackt sind. Für 2500 bar erkennt man in 6.14e) eine deutliche Verbreiterung des Maximums.
- $q_{max}$  sinkt, was größeren Abständen im Realraum entspricht.
- $D_{PG}$  sinkt in diesem Fall, während der Parameter zuvor angestiegen ist. Der Grund hierfür ist unklar, jedoch deutet die Veränderung auf eine strukturelle Änderung in der Probe hin.

Bis etwa 2500 bar lässt sich die Streuintensität für kleine  $q$  mit dem Potenzgesetz beschreiben, für größere  $q$  liefern Strukturfaktoren, die aus dem Potenzial harter Kugeln resultieren, eine gute Beschreibung. In diesem Fall wurde für einen Radius  $R \approx 6,7$  nm die besten Ergebnisse erzielt. Ab 3000 bar befindet sich die Probe in der homogenen Phase, das Interaktionspotenzial ist in Abbildung 6.14b), die zugehörigen Strukturfaktoren in f) dargestellt. Erneut führt eine Druckerhöhung zu einer Reduktion der Wechselwirkungsstärke.



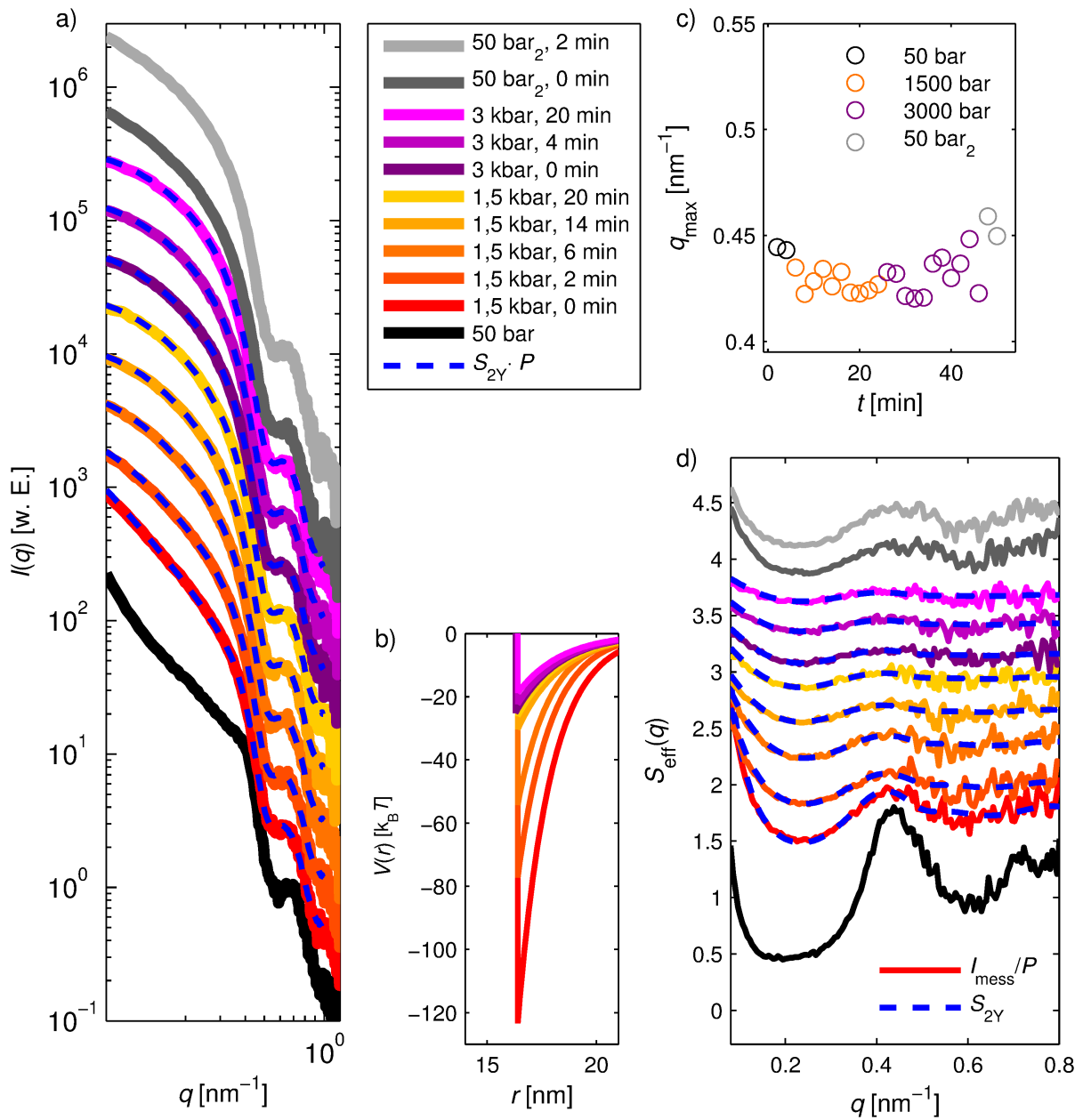
**Abbildung 6.14:** a) zeigt die gemessene Intensität  $I_{mess}$  einer Probe, die 5 wt.% PEG enthält für ausgewählte hydrostatische Drücke. Außerdem enthält die Abbildung die Beschreibung der Daten durch das Potenzgesetz (cyane Kurve,  $D_{PG}$  in c)), durch das Modell aus harten Kugeln (grün gestrichelt, Volumenanteil  $volF$  der Kugeln in c)), sowie der Strukturfaktoren, die aus einem zwei-Yukawa-Potenzial resultieren (gestrichelt, Potenziale in b)). In d) sind die Maxima der Strukturfaktoren für verschiedene Drücke gezeigt, in e) und f) die Strukturfaktoren für die phasenseparierte bzw. homogene Phase.

## Zeitabhängige Änderung der Wechselwirkungsstärke nach einem Phasenübergang

In den bisher beschriebenen Kapiteln wurde gezeigt, dass eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks einen Phasenübergang von der phasenseparierten in die homogene Phase verursachen kann. Eine weitere Druckerhöhung führte stets zu einem weniger attraktiven Interaktionspotenzial in der homogenen Phase. In diesem Abschnitt wird untersucht, ob nach dem Übergang in die homogene Phase auch bei konstantem Druck das Interaktionspotenzial schwächer wird.

Hierfür wurde eine 15 wt.% PEG-Probe zunächst zweimal bei 50 bar vermessen. Dann wurde der Druck direkt auf 1500 bar erhöht und 20 Minuten gewartet, wobei die Probe ein Mal pro Minute belichtet wurde. Anschließend wurde der Druck auf 3000 bar erhöht und erneut 20 mal im Abstand von einer Minute belichtet. Abschließend wurde der Druck wieder auf 50 bar gesenkt. Die Messungen sind in Abbildung 6.15 dargestellt. Man erkennt in a), dass die Probe direkt nach dem Sprung auf 1500 bar in die homogene Phase wechselt. Zur besseren Übersicht sind nur ausgewählte Messungen gezeigt. In 6.15d) sind die effektiven Strukturfaktoren gezeigt, zusammen mit den errechneten Strukturfaktoren. Die entsprechenden Potenziale sind in 6.15b) gezeigt. Man erkennt, dass die Attraktivität kontinuierlich abnimmt, während der Druck konstant 1500 bar beträgt. Eine Druckerhöhung auf 3000 bar bewirkte keine spontane Änderung. Das Interaktionspotenzial bei 1500 bar und 20 Minuten Wartezeit (gelb) unterscheidet sich kaum von dem Interaktionspotenzial bei 3000 bar (0 Minuten, lila). Langfristig nähert sich das Potenzial dem wechselwirkungsfreien Zustand. Bei einer Druckverminderung auf 50 bar nach insgesamt 40 Minuten erkennt man, dass der Strukturfaktor sich wieder auszubilden beginnt und die Wechselwirkung wieder attraktiver wird. Für eine genaue Analyse des Maximums des Strukturfaktors (c)) ist die Datenqualität nicht ausreichend, deswegen lassen sich daraus keine Informationen gewinnen.

Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass nach dem Übergang in die homogene Phase auch bei konstantem Druck die Wechselwirkungsstärke abnimmt.



**Abbildung 6.15:** a) zeigt die gemessene Intensität  $I_{\text{mess}}$  in Abhängigkeit vom Druck bzw. der Zeit, c) zeigt die Position der Maxima. In d) sind die Strukturfaktoren dargestellt, die zugehörigen Potentiale sind in b) gezeigt.

## 20 wt.% PEG

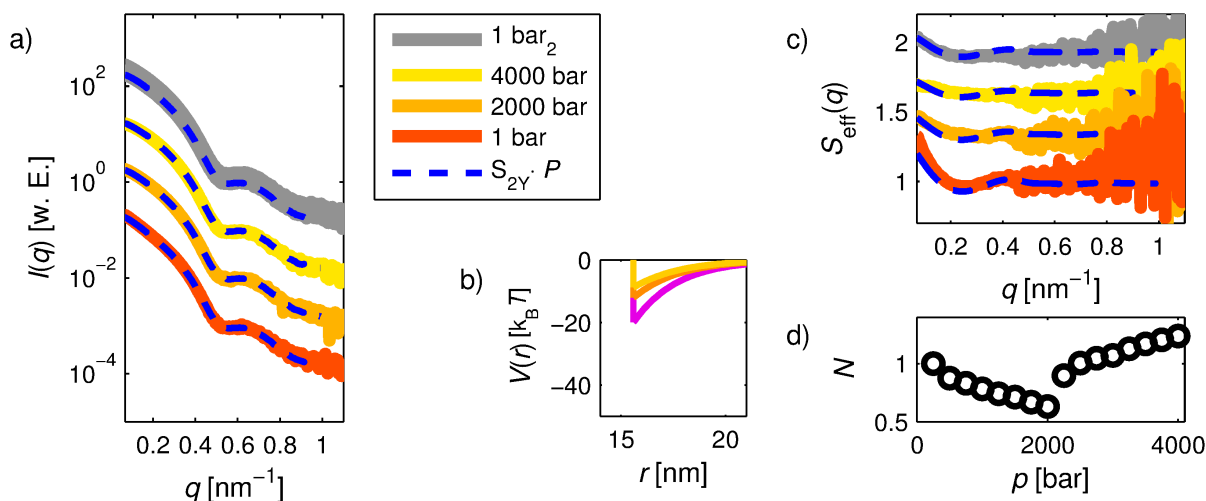
Die höchste PEG-Konzentration, die untersucht wurde, betrug 20 wt.%. Abbildung 6.16 zeigt die Streuintensität sowie den druckabhängigen Strukturfaktor einer solchen Probe. Das gezeigte

Experiment wurde an der ESRF durchgeführt. Proben dieser Konzentration weisen ein klares Erscheinungsbild auf, die Probe befindet sich in der homogenen Phase. Bei Umgebungsdruck kann man in Abbildung 6.16c) einen Strukturfaktor erkennen, der auf attraktive Bedingungen schließen lässt. Eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks führte zu einem Rückgang der Attraktivität, die Potentiale sind in 6.16b) dargestellt.

Die gemessene Intensität lag allerdings 20% unterhalb der Streuintensität, die für eine 15 wt.-%-Probe gemessen wurde, es scheinen sich also weniger Nanopartikel im Strahlengang befunden zu haben. Außerdem wurde bis 2000 bar eine ungewöhnlich starke Abnahme der gemessenen Intensität beobachtet. Anschließend stieg die Intensität wieder. Die Normierungsfaktoren der Strukturfaktoren  $N$  sind in d) dargestellt.

Am DESY wurde das Experiment wiederholt, ebenfalls mit dem Ergebnis einer stark schwankenden Intensität. Erst oberhalb von 750 bar wurde am DESY ein Streusignal gemessen, das sich vom Untergrund unterschied.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gemessene Intensität sich innerhalb der 20 Minuten, in denen die Messungen durchgeführt wurden, stark verändert hat. Am DESY, bei dem der Strahlquerschnitt deutlich kleiner ist als an der ESRF, wurde eine deutlich stärkere Variation beobachtet. Dies legt eine sehr inhomogene Verteilung der Nanopartikel in der Lösung nahe. Statt freier Diffusionsbewegungen durch die Lösung könnten sich die Nanopartikel zwischen den verschränkten Polymeren befinden.

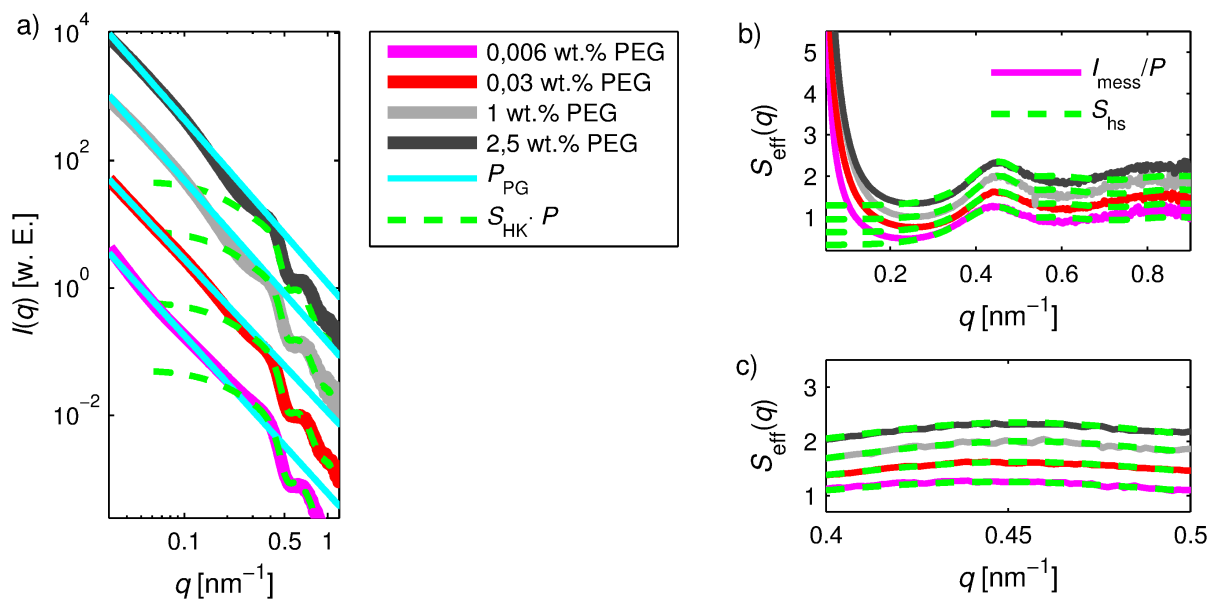


**Abbildung 6.16:** a) Streuintensität für eine 20 wt.-% PEG Probe bei verschiedenen Drücken, in c) sind die Strukturfaktoren dargestellt, in b) die zugehörigen Potentiale. In d) ist die druckabhängige Veränderung der normierten Intensität aufgetragen.



## 6.5 Mittlere Polymerkonzentration

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente mit mittlerer Polymerkonzentration beschrieben. Diese Lösungen lagen bei Umgebungsdruck phasentrennt vor, durch Druck konnte kein Phasenübergang induziert werden. Darüber hinaus waren diese Lösungen instabil, erkennbar an deutlichen Schwankungen der gemessenen Intensität. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen von Drücken auf das System nicht näher untersucht. Trotzdem wurden bei Umgebungsdruck  $D_{PG}$ ,  $q_{max}$  sowie  $volF$  bestimmt, die später zum Vergleich herangezogen werden können. Messungen für Umgebungsdruck sind in Abbildung 6.17a) gezeigt. Für kleine  $q$  kann die Intensität erneut mit dem Potenzgesetz beschreiben werden, für größere  $q$  lässt sich die Intensität mit dem Modell der harten Kugeln beschreiben (Abbildung 6.17b)). Ein auffälliger Unterschied liegt in dem deutlich breiterem Maximum für die kleinste Konzentration, 0,006 wt.%. Dies lässt auf eine weniger deutlich ausgeprägte Ordnung des Systems schließen, was durch den geringeren osmotischen Druck erklärt werden kann.



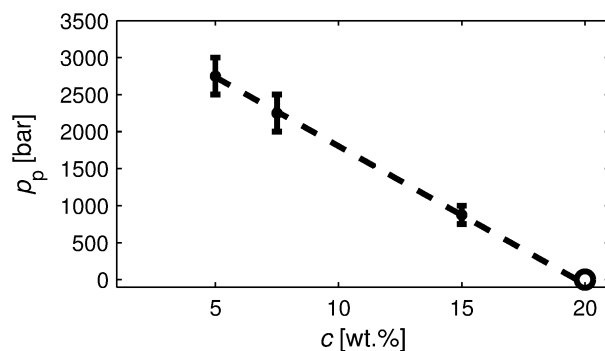
**Abbildung 6.17:** Vergleich der in a) dargestellten Streusignale für mittlere Polymerkonzentrationen und Umgebungsdruck. Alle Proben liegen phasensepariert vor. Geringe Unterschiede gibt es in der Ausprägung des in b) gezeigten Strukturfaktors (b): rote, graue und schwarze Linie verschoben). c) ist eine vergrößerte Darstellung des Bereiches um das Maximum.

## 6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse für den gesamten Konzentrationsbereich zusammengefasst. Die Parameter, die für den Vergleich herangezogen werden, sind in Tabelle 6.1 aufgelistet. Hierbei wird der Fokus auf Proben gelegt, die bei Umgebungsdruck phasensepariert vorliegen. Die Struktur der Lösung lässt sich dann durch  $q_{\max}$ ,  $D_{\text{PG}}$  und  $\text{vol}F$  beschreiben. Außerdem wird für Polymerkonzentrationen  $c$ , bei denen ein Phasenübergang beobachtet wurde, der Strukturfaktor in der homogenen Phase und das Wechselwirkungspotenzial für den maximalen Druck, 4 kbar, verglichen.

Für Umgebungsdruck wurde folgendes Phasenverhalten beobachtet: für  $c \leq 5 \cdot 10^{-4}$  wt.% waren die Nanopartikel homogen in der Flüssigkeit verteilt. Für diesen Konzentrationsbereich hatten hydrostatische Drücke keinen Einfluss auf das Phasenverhalten der Nanopartikel, es wurde eine sehr geringe Vergrößerung der Nanopartikel-Nanopartikel-Attraktion mit steigendem Druck gefunden. Dies ist überraschend, da in der Literatur [Coo92a; Ven87] für hohe hydrostatische Drücke eine Reduktion der Ausdehnung der Polymere beobachtet wurde. Dies führt zu einer Reduktion der Verarmungsschicht und somit auch der Reichweite der Attraktion. Allerdings reduziert sich auch das Volumen des Wassers, was zu einem höheren Anteil der Polymere in der Lösung führt. Die Effekte könnten sich gegenseitig kompensieren.

In einem Konzentrationsbereich von  $6 \cdot 10^{-3} \leq c \leq 15$  wt.% lag die Probe phasentrennt vor, in einer 20 wt.% Probe konnte keine Phasentrennung beobachtet werden. Durch hydrostatische Drücke bis 3750 bar konnte in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 15 wt.% ein Phasenübergang erzeugt werden. Der Druck  $p_p$ , bei dem ein Phasenübergang beobachtet wurde, ist in Abbildung 6.18 gezeigt. Je geringer die PEG-Konzentration, desto größere hydrostatische Drücke werden benötigt, um das System in die homogene Phase zu zwingen. Während für eine 5 wt.%



**Abbildung 6.18:** Darstellung der gefundenen druckabhängigen Phasenübergänge für 5, 10 und 15 wt.%. Bei 20 wt.% lag die Probe schon bei Umgebungsdruck in der homogenen Phase vor. Für Konzentrationen, die geringer als 5 wt.% sind, liegen keine Daten vor.

$c$ [wt.%]	$p_P$ [kbar]	1 bar			4000 bar	
		$volF$	$D_{PG}$	$q_{max}$ [nm <sup>-1</sup> ]	$S_{eff, q \approx 0,1 \text{ nm}^{-1}}$	$V_{r=\sigma}$ [kT]
0,006	-	0,24	3,5	0,447	-	-
0,03	-	0,26	3,6	0,451	-	-
1	-	0,27	3,5	0,453	-	-
2,5	-	0,28	3,4	0,455	-	-
5	2,5-3	0,29	3,4	0,456	1,3	-45
7,5	2-2,5	0,29	3,3	0,452	1,3	-55
15	0,75-1	0,30	2,4	0,446	1,1	-33

**Tabelle 6.1:** In dieser Tabelle werden verschiedene Parameter für Umgebungsdruck und 4000 bar für die drei verschiedenen Konzentrationen aufgelistet: der Druck  $p_P$ , bei dem der Phasenübergang beobachtet wird, der Volumenanteil  $volF$  der Kugeln in der hochkonzentrierten Nanopartikelphase, der Parameter  $D_{PG}$ , der den Abfall der Intensität für kleine  $q$  beschreibt, der Wert des effektiven Struktur factors  $S_{eff}$  bei  $q = 0.1 \text{ nm}^{-1}$  in der homogenen Phase bei 4000 bar, den Wert des attraktiven Potentials  $V(r)$  bei  $r=\sigma$  sowie das Maximum des Struktur factors  $q_{max}$ . Typischerweise variierte  $q_{max}$  um etwa  $\pm 0,002 \text{ nm}^{-1}$ , wenn der betrachtete Bereich leicht geändert wurde.

PEG-Probe etwa bei 2750 ein Phasenübergang beobachtet wird, wird dies bei 15 wt.-%-PEG schon bei etwa 880 bar beobachtet.

Nun wird die Struktur der Nanopartikel-Lösungen in der phasenseparierten Phase bei Umgebungsdruck diskutiert. Für PEG-Konzentrationen zwischen 1 wt.% und 15 wt.% beträgt der Volumenanteil der Nanopartikel in der hochkonzentrierten Phase bei Umgebungsdruck etwa 0,27-0,30. Die Maxima der Struktur factors liegen bei allen Proben bei  $q_{max} \approx 0,45 \text{ nm}^{-1}$ . Zumindest in diesem Konzentrationsbereich hat die PEG Konzentration also keinen Einfluss auf die Packungsdichte der Nanopartikel in der hochkonzentrierten Phase. Unterhalb von 1 wt.% ist die Packungsdichte vermindert,  $q_{max}$  steigt leicht an. Dies kann auf den verringerten osmotischen Druck in der Probe zurückgeführt werden, durch den die Nanopartikel größere Abstände einnehmen können. Für alle Konzentrationen liegt die Packungsdichten deutlich unterhalb der dichtesten Kugelpackung (0,74) oder auch beispielsweise für das dichteste kubisch primitive Gitter (0,52) oder der Packungsdichte zufälliger Aggregation [Tor00]. Die Nanopartikel scheinen also nicht aggregiert oder kristallisiert zu sein.

Bei allen Proben, bei denen ein druckinduzierter Phasenübergang beobachtet wurde, wurde in dieser Arbeit ein etwa 1 kbar breiter Übergangsbereich festgestellt, in dem sich die Lösung langsam der homogenen Phase nähert. Innerhalb dieses Bereiches wird eine kontinuierliche Reduktion von  $volF$  beobachtet, was auf einen Verlust der Ordnung des Systems schließen lässt. Außerdem deutet eine Verringerung von  $q_{max}$  darauf hin, dass die Partikel größere Abstände einnehmen. Ist die Phasengrenze noch mehr als 1000 bar entfernt, so hatte eine Druckänderung keinen bedeutenden Einfluss auf  $q_{max}$ ,  $volF$  oder auch die Struktur der Streusignale bei  $q < 0,1 \text{ nm}^{-1}$ , beschrieben durch  $D_{PG}$ . Erst bei Erreichen des Übergangsbereiches zeigt sich

also eine in SAXS-Experimenten messbare Änderung der Struktur der Lösung.

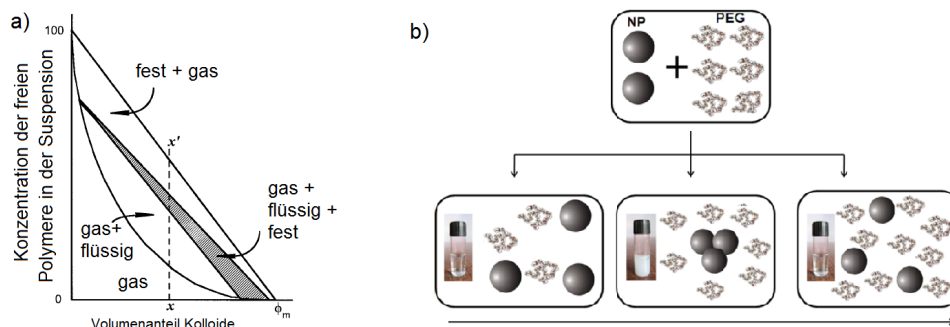
In der homogenen Phase konnten die effektiven Strukturfaktoren mit einem 2-Yukawa-Potenzial in der Mean-Spherical-Approximation (s. Kap. 2.8.2) berechnet werden. Auch das intermolekulare Wechselwirkungspotenzial konnte bestimmt werden. Zu beachten ist allerdings, dass die durch dieses Modell berechneten Potenziale in der Literatur bei besonders attraktiven Bedingungen deutlich von direkt gemessenen Wechselwirkungspotenzialen abweichen [Men91]. Trotzdem ist ein Vergleich der Potenziale untereinander sinnvoll, um die Änderung der Wechselwirkung zu quantifizieren. Nach dem Phasenübergang von der phasenseparierten in die homogene Phase wurde sowohl bei einer Erhöhung des Drucks in 250 bar-Schritten im Abstand von einer Minute als auch bei konstantem Druck oberhalb des Phasenübergangs eine Verringerung des Wechselwirkungspotenzials beobachtet.

Bei dem Vergleich der Potenziale für verschiedene Konzentrationen ist zu beachten, dass eine mögliche Ausfällung der Nanopartikel vor dem Einfüllen in den Probenhalter nicht berücksichtigt wurde. Bei der druckabhängigen Messung der Probe mit 15 wt.% PEG wurde beispielsweise eine 20 bis 25% geringere Intensität für große  $q$  detektiert als bei der Formfaktormessung, die eine identische Partikelkonzentration bei der Herstellung aufwies. Die Strukturfaktoren mussten mit Faktoren von etwa 1,25 normiert werden. Dies ist ein Hinweis, dass die Anzahl der Nanopartikel in der Probe geringer war als erwartet.

## 6.7 Einordnung in die aktuelle Forschung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse in die aktuelle Forschung eingeordnet. Zunächst werden die Ergebnisse für Umgebungsdruck mit der Literatur verglichen. Danach wird auf Ergebnisse für hohe hydrostatische Drücke eingegangen.

In Referenz [Kum14] und [Kum16] wurden durch Trübungsmessungen bereits die Phasengrenzen für ein System aus 1 wt.% Ludox LS 30 Nanopartikeln, 0.2 mol/l NaCl sowie einer variablen PEG-Konzentration bei Umgebungsdruck bestimmt. Für Polymerkonzentrationen zwischen  $2 \cdot 10^{-3}$  und 1 wt.% wurde eine reduzierte Transmission festgestellt, was ein Hinweis auf die Phasengrenze zwischen der homogenen und der phasenseparierten Phase ist. In dieser Arbeit wurde für einen deutlich verbreiteten Konzentrationsbereich eine Eintrübung festgestellt ( $5 \cdot 10^{-4}$  bis 15 wt.%, Kapitel 6.1). Kleinwinkelstreuungsmessungen bestätigen jeweils die Ergebnisse der Trübungsmessungen und damit den unterschiedlichen Bereich, in dem das System phasensepariert vorliegt. Die Unterschiede müssen also in der Probenpräparation liegen. In [Kum14] und [Kum16] wurden die Nanopartikel abgewogen, wobei keine Angaben über Trocknungs- oder Reinigungsprozesse gemacht wurde. In dieser Arbeit wurde die von Sigma Aldrich gelieferte Lösung direkt verwendet. Hierbei wurde aus den Herstellerangaben die Konzentration



**Abbildung 6.19:** Mögliche Interpretationen des Phasenverhaltens. a) Eine Zugabe von Polymeren führt insgesamt zu drei Phasenübergängen: von gasförmig zu flüssig-gasförmig, von dort zu fest-flüssig-gasförmig und von dort zu fest-gasförmig. In diesem Modell ist die Polymer-Polymer-Wechselwirkung nicht berücksichtigt. Reprinted with permission from: M. A. Faers and P. F. Luckham. Effect of the Steric Stabilizing Layer on the Phase Behavior and Rheology of Small Polystyrene Latex Dispersions Induced by Changes to the Concentration of Nonadsorbing Hydroxyethylcellulose. In: *Langmuir*, **13**(11) (1997), Copyright (2017) American Chemical Society, übersetzt. b) Durch Zugabe von Polymeren wird zunächst eine flüssig-flüssig-Phasentrennung erzeugt, die durch Zugabe weiterer Polymere wieder rückgängig gemacht wird. Als Ursache wird vermutet, dass die Zunahme der Polymer-Polymer-Abstoßung die Verarmungsanziehung reduziert. Reprinted with permission from: S. Kumar, V. K. Aswal and J. Kohlbrecher. Small-Angle Neutron Scattering Study of Interplay of Attractive and Repulsive Interactions in Nanoparticle-Polymer System. In: *Langmuir* (**32**)6 (2016), Copyright (2017) American Chemical Society.

der Nanopartikel berechnet. Ein weiterer Unterschied liegt in der Verwendung eines 75 mM BisTris Puffers (im Vergleich zur ungepufferten Lösung in [Kum14] und [Kum16]), der bei der Bestimmung der ionischen Stärke der Lösung berücksichtigt wurde. Der pH-Wert der in dieser Arbeit untersuchten Lösung betrug 7, der pH Wert in [Kum14] und [Kum16] ist nicht genauer spezifiziert. Der Phasenübergang von der homogenen in die phasenseparierte Phase bei Polymerzugabe wird auf Verarmungskräfte zurückgeführt (s. Kapitel 3.8) und ist ein bekanntes und vielfach beschriebenes Phänomen (u.a. [Tui03]).

Oberhalb einer gewissen Grenzkonzentration (in [Kum14] und [Kum16] 1 wt.%, in dieser Arbeit 15-20 wt.%) liegt die Lösung wieder in der homogenen Phase, also gasartig, vor. Dies ist außergewöhnlich, weil die Verarmungskräfte in der klassischen Beschreibung monoton mit der Polymerkonzentration steigen. In dieser Beschreibung fehlt jedoch die Polymer-Polymer-Wechselwirkung, die für Konzentrationen nahe der Überlappkonzentration nicht mehr vernachlässigt werden kann. Die Überlappkonzentration liegt für die hier verwendeten Polymere bei etwa 11 wt.% und kommt somit als Ursache für dieses Phasenverhalten in Frage. Dies entspricht einer Interpretation gemäß der schematischen Abbildung 6.19b).

Im PRISM-Modell [Fuc01] nimmt die Attraktion bei einer Zugabe von Polymeren über die Überlappkonzentration hinaus ab, da es zu einer effektiven Verringerung der Polymergröße und

somit der Verarmungsschicht kommt. Ein weiterer relevanter Effekt ist, dass Polymere in der Nähe der Partikel ihre Konformation ändern können und sich somit die Lücken besser ausfüllen können als die Kugeln [Han99]. Auch wenn dies in dem Modell hauptsächlich in Bezug auf die Wechselwirkungsstärke und nicht auf Phasenübergänge diskutiert wird, so liegt doch eine qualitative Übereinstimmung vor. Insbesondere die Änderung der Konformation der Polymere zum Ausfüllen von Lücken könnte eine der Ursachen für den Phasenübergang sein.

Jedoch erscheint auch eine weitere Möglichkeit plausibel: Bei einer Betrachtung des von Lekkerkerker vorgeschlagenen Phasendiagramms (Abb. 6.19a)) scheint es auch möglich, das Phasenverhalten entlang der gestrichelten  $x-x'$  Linie (aufsteigend) zu verstehen: Photos der Proben (Abbildung 6.6) legen nahe, dass es oberhalb von 1,25 wt.% zu Ausfällungen kommt, trotzdem ist die Probe trüb. Denkbar wäre also, dass man sich für  $1 \text{ wt.}\% < c < 15 \text{ wt.}\%$  im drei-Phasengebiet (fest, flüssig, gasförmig; in Abbildung 6.19a) grau gefärbt) befindet, wobei eine Trennung flüssig-gasförmig bei längerer Äquilibrierung auftreten könnte. Eine Erhöhung der Konzentration auf  $c \approx 20 \text{ wt.}\%$  könnte einen Phasenübergang in ein Zweiphasengebiet (fest, gasförmig; oberhalb der grauen Fläche) verursachen. Allerdings ist der Anteil der Kolloide in der Gesamtlösung sehr gering, was in dem Diagramm zu einem sehr schmalen drei-Phasengebiet führt.

In dieser Arbeit wurde hydrostatischer Druck als weiterer Parameter verwendet, um den Phasenraum zu erkunden. Als Ergebnis der druckabhängigen Experimente kann festgehalten werden, dass hydrostatischer Druck bei hohen Polymerkonzentrationen das Phasenverhalten stark beeinflusst und einen Phasenübergang von einer flüssig-flüssig-phasengetrennten Phase in eine gasartige Phase bewirken kann, eine Phase, die ohne hydrostatischen Druck erst bei noch größeren Polymerkonzentrationen vorliegt. Hierbei wird umso mehr Druck benötigt, je geringer die Polymerkonzentration ist, je größer also der Abstand zur gasartigen Phase in Bezug auf die Polymerkonzentration bei Umgebungsdruck ist. Möglich ist auch, dass eine Koexistenz mit der festen Phase vorliegt.

Der nächstliegende Grund für den beobachteten Phasenübergang ist die Kompression des Wassers, die zu einem höheren Volumenanteil der Polymere und Kolloide führt. Dies hätte zur Folge, dass sich die Position der Probe im Phasendiagramm verschiebt. Ein geänderter Volumenanteil hätte in der Nähe der Überlappkonzentration auch Auswirkungen auf die effektive Polymergröße  $\xi$ , was zu einer Abnahme der Reichweite der attraktiven Wechselwirkung führt [Sch97]. Insbesondere bei hohen Konzentrationen ist eine genaue Bestimmung der Änderung der Volumenanteile auf Grund der unterschiedlichen Kompressibilitäten von Wasser, Hydratwasser, der Polymere sowie der Nanopartikel schwierig. Geht man davon aus, dass das Volumen der Polymere und Kolloide konstant bleibt, der Wasseranteil komprimiert wird, so erhält man eine Abschätzung des größtmöglichen Kompressionseffektes. Das Volumen von reinem Wasser sinkt bei einem Druck von 3 kbar und Raumtemperatur um etwa 12%, während 3 kbar einen

Phasenübergang in der Probe erzeugt, für den bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck mehr als die dreifache Menge Polymere benötigt wird. Dies legt Nahe, dass das reduzierte verfügbare Volumen nicht die einzige Erklärung für den Phasenübergang ist.

Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss von hydrostatischen Drücken auf die Wasserstruktur und somit auf die Lösungsmittelbedingungen. Hohe hydrostatische Drücke beeinflussen die Konformation des Wassers, und die Lösungsmittelstruktur hat einen Einfluss auf die Struktur der Polymere. In der Literatur [Coo92a; Ven87] führen hydrostatische Drücke zu einer deutlichen Verkleinerung der Ausdehnung der Polymere, was zu einer Verringerung der Breite der Verarmungsschicht und somit zu einer Reduktion der Nanopartikel-Nanopartikel Anziehung führt. In [Coo92a] beispielsweise wurde für PEG mit einem Gyrationradius  $R_g \approx 7,3$  nm (Molargewicht 20 kg/mol) für einen Druck von 2 kbar eine Reduktion des Gyrationradius von etwa 6% beobachtet. In [Ven87] sorgten Drücke von 4 kbar für eine Reduktion des dort gemessenen Viskositätsradius'  $R_\eta$  von 26 nm auf 18 nm. Allerdings muss erwähnt werden, dass Polymere anderer Größe verwendet wurden und der Viskositätsradius nicht exakt mit dem Gyrationradius übereinstimmt (Details hierzu sind in [Coo92a] zu finden). Die Struktur der Polymerlösungen ist durch die hier durchgeführten SAXS-Messungen nicht zugänglich.

Eine Reduktion der Größe der in dieser Arbeit verwendeten Polymere um 10% würde dazu führen, dass  $R_{g,\text{Polymere}}/R_{\text{Nanopartikel}} < 0,32$  nicht mehr gilt. Dann ist laut Lekkerkerker keine Phasentmischung mehr möglich. Allerdings liegen die Proben schon phasensepariert vor, so dass der Prozess des Phasenübergangs bereits statt gefunden hat.

Die von Feigin [Fei80] vorgeschlagene Ursache für eine Stabilisierung der Lösung bei großen Polymerkonzentrationen, dass ein besonders schwer zu überwindendes Maximum der freien Enthalpie die Lösung an einer eigentlich favorisierten Phasenseparation hindert, kann in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da das System bei niedrigen Drücken bereits phasensepariert vorliegt und danach die Phase wechselt.





## Kapitel 7

# Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung des Phasenverhaltens und die Untersuchung des druckabhängigen Wechselwirkungspotenzials von Lysozym- sowie Nanopartikel-Polymerlösungen. Die Lösungen wurden nahe der Grenze zwischen der homogenen und der flüssig-flüssig-phaseseparierten Phase untersucht. In der phaseseparierten Phase existieren neben Bereichen sehr hoher Kolloidkonzentration auch Bereiche sehr niedriger Kolloidkonzentration. In der phaseseparierten Phase weisen die Lösungen auf Grund von Konzentrationsfluktuationen und Tröpfchenbildung ein trübes Erscheinungsbild auf. Es wurden Experimente mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) sowie ergänzende Trübungsmessungen durchgeführt.

Das druckabhängige Phasenverhalten von Lysozym wurde in Kapitel 5 beschrieben und die Resultate in [Sch16] veröffentlicht. Hydrostatische Drücke können für Lysozymlösungen zu einem Phasenübergang von der phaseseparierte in die homogene Phase führen. Eine weitere Druckerhöhung kann interessanterweise zu einem entgegengesetzten Phasenübergang, zurück in die phaseseparierte Phase führen. Dies kann auf das nicht-monotone Wechselwirkungspotenzial von Lysozym in Lösung [Sch11c] zurückgeführt werden. Durch Röntgenkleinwinkelstreuung konnte die Korrelationslänge von Proteinen in Lösung bestimmt werden. Ein Maximum der druckabhängigen Korrelationslänge wurde hierbei als Indiz für einen Phasenübergang der Lösung verwendet. Außerdem wurde die Wechselwirkungsstärke der Proteine in der homogenen Phase bestimmt. Eine Extrapolation der temperaturabhängigen Wechselwirkungsstärke trug ebenfalls zur Bestimmung der Phasengrenzen bei. Schließlich konnten durch druckabhängige Trübungsmessungen weitere Phasengrenzen identifiziert werden. In [Möl14b] wurden das druck- und temperaturabhängige Phasenverhalten von Lysozymlösungen bereits mit SAXS-Messungen für einen kleinen Konzentrationsbereich bestimmt. Diese Ergebnisse wurden in dieser Arbeit bestätigt. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten druckabhängigen Trübungsmessungen gelang erstmals eine direkte Beobachtung der druckabhängigen Phasenübergänge und

somit eine Absicherung der Ergebnisse von Möller *et al.* [Möl14b]. Darüber hinaus wurden die Experimente für einen erweiterten Konzentrationsbereich durchgeführt. Somit wird das erste dreidimensionale Phasendiagramm präsentiert, aus dem für große Konzentrations-, Temperatur- und Druckbereiche die Phase der Lösung abgelesen werden kann. In weiteren Untersuchungen könnte man prüfen, ob durch die Zugabe von Cosolventien das Phasenverhalten von Proteinen beeinflusst werden kann. Die Cosolventien TMAO und Urea wurden in Tiefseefischen nachgewiesen und werden für die Funktionalität und Stabilität von Proteinen in Tiefseefischen verantwortlich gemacht [Yan14]. Diese Stoffe beeinflussen das Protein-Protein-Wechselwirkungspotenzial [Sch11b] und eine Verschiebung der Phasengrenzen zu höheren Drücken ist für TMAO zu erwarten. Eine weitere anstehende Aufgabe ist die Bestimmung des druckabhängigen Wechselwirkungspotenzials für weitere Proteine neben Lysozym, um zu klären, ob die nicht-monotone Wirkung hydrostatischer Drücke auf das Potenzial ein lysozymspezifischer Effekt ist oder allgemein für Proteine beobachtet werden kann.

Das druckabhängige Phasenverhalten für Lösungen, die Siliziumdioxid-Nanopartikel und PEG-Polymere enthalten, wurde in Kapitel 6 vorgestellt. In vorbereitenden Messungen wurden die Siliziumdioxid-Nanopartikel charakterisiert und für verschiedene Polymerkonzentrationen das Phasenverhalten durch Trübungsmessungen bei Umgebungsdruck bestimmt. In polymerfreier Lösung befanden sich die Nanopartikel in der homogenen Phase. Eine Zugabe von Polymeren führte zunächst zu einem attraktiven Interaktionspotenzial der Nanopartikel, eine weitere Erhöhung der Polymerkonzentration verursachte eine Phasentrennung. Eine weitere Zugabe von Polymeren führte zu einer Rückkehr in die homogene Phase. Diese Ergebnisse sind qualitativ im Einklang mit in der Literatur dokumentierten Experimenten [Kum14; Kum16]. Anschließend wurde mit SAXS-Messungen das druckabhängige Phasenverhalten dieser Systeme bestimmt. Während für geringe Polymerkonzentrationen keine Phasenübergänge durch hohe hydrostatische Drücke beobachtet wurden, konnte ab einer Polymer-Konzentration von 5 wt.% durch hydrostatische Drücke von etwa 3 kbar ein Phasenübergang von der phasenseparierten in die homogene Phase erzeugt werden. Eine Erhöhung der Polymerkonzentration führte dazu, dass schon bei niedrigeren Drücken ein Phasenübergang beobachtet werden konnte, bis schließlich für 20 wt.% die Probe schon bei Umgebungsdruck in der homogenen Phase vorlag. Bei der Erklärung dieses Phänomens spielen eine Vielzahl von Effekten eine Rolle. Ein Aspekt ist, dass Polymere in der Nähe der Oberfläche von Nanopartikeln ihre Konformationen ändern können, um besser Lücken in der Lösung auszufüllen [Han99]. Dieses Ausfüllen der Lücken könnte eine Erklärung der beobachteten Phasenübergänge sein. Ein weiterer Aspekt ist, dass sowohl eine Erhöhung der Konzentration [Ter02] als auch eine Erhöhung des Drucks [Coo92a; Ven87] eine geringere Ausdehnung des Polymers zur Folge haben. Eine Reduktion der Ausdehnung führt zu einer Abnahme der interpartikulären Attraktion der Nanopartikel. Schlussendlich

---

sorgt die Kompression des Wassers bei erhöhtem Druck für einen effektiv höheren Anteil der Polymere an dem Gesamtvolumen der Lösung. Eine theoretische Beschreibung des Systems durch Simulationstechniken könnte Aufschluss darüber geben, ob einer der genannten Effekte eine dominante Rolle spielt. Zu einem besseren Verständnis der Ergebnisse könnte auch eine Variation des Polymers hilfreich sein. Die Reduktion der Ausdehnung unter Druck ist für PEG besonders ausgeprägt [Coo92a], während beispielsweise hydrolisiertes Polyacrylamid in einer NaCl-Wasserlösung seine Größe kaum verändert [Coo92b]. Außerdem wären ergänzende Experimente mit Neutronenkleinwinkelstreuung interessant, da in diesen über eine Variation des Kontrastes mit D<sub>2</sub>O auch die Struktur der Polymere aufgelöst werden kann.



# Literatur

- [AN11] J. Als-Nielsen und D. McMorrow. *Elements of Modern X-ray Physics*. 2. Aufl. London: Wiley, 2011. ISBN: 978-0-470-97395-0.
- [Asa54] S. Asakura und F. Oosawa. “On Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of Macromolecules”. In: *J. Chem. Phys.* **22**(7) (1954), 1255–1256. DOI: 10.1063/1.1740347.
- [Ash04] N. Asherie. “Protein crystallization and phase diagrams”. In: *Methods* **34**(3) (2004), 266–272. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.03.028.
- [Bax68] R. J. Baxter. “Percus-Yevick Equation for Hard Spheres with Surface Adhesion”. In: *J. Chem. Phys.* **49**(6) (1968). DOI: 10.1063/1.1670482.
- [Bon97] F. Bonneté, M. Malfois, S. Finet, A. Tardieu, S. Lafont und S. Veessler. “Different tools to study interaction potentials in  $\gamma$ -crystallin solutions: Relevance to crystal growth”. In: *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **53**(4) (1997), 438–447. DOI: 10.1107/S0907444499700200X.
- [Buf12] A. Buffet, A. Rothkirch, R. Döhrmann, V. Körstgens, M. M. Abul Kashem, J. Perlich, G. Herzog, M. Schwartzkopf, R. Gehrke, P. Müller-Buschbaum und S. V. Roth. “P03, the microfocus and nanofocus X-ray scattering (MiNaXS) beamline of the PETRA III storage ring: The microfocus endstation”. In: *J. Synchrotron Radiat.* **19**(4) (2012), 647–653. DOI: 10.1107/S0909049512016895.
- [Can65] R. E. Canfield und A. K. Liu. “The Disulfide Bonds of Egg White Lysozyme (Muraminidase)”. In: *J. Biol. Chem.* **240**(5) (1965), 1997–2002.
- [Car07] F. Cardinaux, T. Gibaud, A. Stradner und P. Schurtenberger. “Interplay between spinodal decomposition and glass formation in proteins exhibiting short-range attractions”. In: *Phys. Rev. Lett.* **99**(11) (2007), 118301. DOI: 10.1103/PhysRevLett.99.118301.

- [Cha72] D. Chandler und H. C. Andersen. “Optimized Cluster Expansions for Classical Fluids. II. Theory of Molecular Liquids”. In: *J. Chem. Phys.* **57**(5) (1972), 1930–1937. DOI: 10.1063/1.1678513.
- [Chi06] F. Chiti und C. M. Dobson. “Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease”. In: *Annu. Rev. Biochem.* **75** (2006), 333–366. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
- [Coo92a] R. L. Cook, H. E. King Jr. und D. G. Peiffer. “Pressure-induced crossover from good to poor solvent behavior for polyethylene oxide in water”. In: *Phys. Rev. Lett.* **69**(21) (1992), 3072–3075. DOI: 10.1103/PhysRevLett.69.3072.
- [Coo92b] R. L. Cook, H. E. King und D. G. Peiffer. “High-pressure viscosity of dilute polymer solutions in good solvents”. In: *Macromolecules* **25**(11) (1992), 2928–2934. DOI: 10.1021/ma00037a022.
- [Cur] Reprinted from: A molecular approach to bioseparations: Protein-protein and protein-salt interactions, R. A. Curtis und L. Lue. In: *Chem. Eng. Sci.* **61**(3) (2006), 907–923, Copyright (2017), with permission from Elsevier.
- [Cur06] R. A. Curtis und L. Lue. “A molecular approach to bioseparations: Protein-protein and protein-salt interactions”. In: *Chem. Eng. Sci.* **61**(3) (2006), 907–923. DOI: 10.1016/j.ces.2005.04.007.
- [Cur87a] J. G. Curro und K. S. Schweizer. “Theory of Polymer Melts : An Integral Equation Approach ”. In: *Macromolecules* **20**(8) (1987), 1928–1934. DOI: 10.1021/ma00174a040.
- [Cur87b] J. G. Curro und K. S. Schweizer. “Equilibrium theory of polymer liquids: Linear chains”. In: *J. Chem. Phys.* **87**(3) (1987), 1842–1846. DOI: 10.1063/1.453197.
- [CV12] G. Carrete Vega und J. J. Wiens. “Why are there so few fish in the sea?” In: *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **279**(1737) (2012), 2323–2329. DOI: 10.1098/rspb.2012.0075.
- [Deb15] P. Debye. “Zerstreuung von Röntgenstrahlen”. In: *Ann. Phys.* **351**(6) (1915), 809–823. DOI: 10.1002/andp.19153510606.
- [Der41] B. V. Derjaguin und L. Landau. “Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes”. In: *Acta Phys. Chem. URSS* **14** (1941), 633–662.
- [Der74] K. W. Derham, J. Goldsbrough und M. Gordon. “Puls-induced critical scattering (PICS) from polymer solutions”. In: *Pure Appl. Chem.* **38**(1-2) (1974), 97–116. DOI: 10.1351/pac197438010097.

- 
- [Dho08] J. K. G. Dhont und G. Gompper. “Introduction: Soft Matter”. In: *Soft Matter - From Synthetic to Biological Materials : Lecture Notes of the 39th Spring School 2008*. Jülich: Forschungszentrum Jülich, 2008. ISBN: 978-3-89336-517-3.
- [Dit12] P. Dittanet und R. A. Pearson. “Effect of silica nanoparticle size on toughening mechanisms of filled epoxy”. In: *Polymer* **53**(9) (2012), 1890–1905. DOI: 10.1016/j.polymer.2012.02.052.
- [Fae97] M. A. Faers und P. F. Luckham. “Effect of the Steric Stabilizing Layer on the Phase Behavior and Rheology of Small Polystyrene Latex Dispersions Induced by Changes to the Concentration of Nonadsorbing Hydroxyethylcellulose”. In: *Langmuir* **13**(11) (1997), 2922–2931. DOI: 10.1021/1a9610718.
- [Fei80] R. I. Feigin und D. H. Napper. “Depletion stabilization and depletion flocculation”. In: *J. Colloid Interface Sci.* **75**(2) (1980), 525–541. DOI: 10.1016/0021-9797(80)90475-0.
- [Fei87] L. A. Feigin und D. I. Svergun. *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. New York: Plenum Press, 1987. ISBN: 0-306-42629-3.
- [Fre94] W. J. Fredericks, M. C. Hammonds, S. B. Howard und F. Rosenberger. “Density, thermal expansivity, viscosity and refractive index of lysozyme solutions at crystal growth concentrations”. In: *J. Cryst. Growth* **141**(1-2) (1994), 183–192. DOI: 10.1016/0022-0248(94)90111-2.
- [Fuc01] M. Fuchs und K. S. Schweizer. “Macromolecular theory of solvation and structure in mixtures of colloids and polymers”. In: *Phys. Rev. E* **64**(2) (2001), 21514. DOI: 10.1103/PhysRevE.64.021514.
- [Gal02] O. Galkin, K. Chen, R. L. Nagel, R. E. Hirsch und P. G. Vekilov. “Liquid-liquid separation in solutions of normal and sickle cell hemoglobin.” In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(13) (2002), 8479–8483. DOI: 10.1073/pnas.122055299.
- [Gas83] A. P. Gast, C. K. Hall und W. B. Russel. “Polymer-Induced Phase Separations in Nonaqueous Colloidal Suspensions”. In: *J. Colloid Interface Sci.* **96**(1) (1983), 251–267. DOI: 10.1016/0021-9797(83)90027-9.
- [Gas86] A. P. Gast, W. B. Russel und C. K. Hall. “An Experimental and Theoretical Study of Phase Transitions in the Polystyrene Latex and Hydroxyethylcellulose System”. In: *J. Colloid Interface Sci.* **109**(1) (1986), 161–171. DOI: 10.1016/0021-9797(86)90291-2.

- [Gio79] R. Giordano, A. Salleo, S. Salleo und F. Wanderlingh. “Viscosity and density of lyszyme in water”. In: *Phys. Lett. A* **70**(1) (1979), 64–66. DOI: 10.1016/0375-9601(79)90329-3.
- [Gla02] O. Glatter. “The Inverse Scattering Problem in Small-Angle Scattering”. In: *Neutrons, X-ray Light Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Hrsg. von P. Lindner und T. Zemb. Amsterdam: North-Holland, 2002. ISBN: 0-444-51122-9.
- [Gla82] O. Glatter und O. Kratky. “Data Treatment”. In: *Small Angle X-ray Scattering*. Hrsg. von O. Glatter und O. Kratky. London: Academic Press, 1982. ISBN: 0-12-286280-5.
- [Gra] Broschüre des Herstellers, abgerufen am 21.06.2017. [https://grace.com/general-industrial/en-us/Documents/ludox\\_br\\_E\\_2012\\_f120504\\_web.pdf](https://grace.com/general-industrial/en-us/Documents/ludox_br_E_2012_f120504_web.pdf).
- [Gri97] V. Grinberg und V. Tolstoguzov. “Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions”. In: *Food Hydrocoll.* **11**(2) (1997), 145–158. DOI: 10.1016/S0268-005X(97)80022-7.
- [GT94] P. Gonzalez-Tello, F. Camacho und G. Blazquez. “Density and Viscosity of Concentrated Aqueous Solutions of Polyethylene Glycol”. In: *J. Chem. Eng. Data* **39**(3) (1994), 611–614. DOI: 10.1021/je00015a050.
- [Gui39] A. Guinier. “La diffraction des rayons X aux tres petits angles: applications a l’etude de phenomenes ultramicroscopique”. In: *Ann. Phys. (Paris)*. **12** (1939), 161–237.
- [Haa99] C. Haas, J. Drenth und W. W. Wilson. “Relation between the Solubility of Proteins in Aqueous Solutions and the Second Virial Coefficient of the Solution”. In: *J. Phys. Chemistry B* **103**(14) (1999), 2808–2811. DOI: 10.1021/jp9840351.
- [Han99] A. Hanke, E. Eisenriegler und S. Dietrich. “Polymer depletion effects near mesoscopic particles”. In: *Phys. Rev. E*, **59**(6) (1999), 6853. DOI: 10.1103/PhysRevE.59.6853.
- [Hen] Abgerufen am 30.05.2017. [http://henke.lbl.gov/optical\\_constants/filter2.html](http://henke.lbl.gov/optical_constants/filter2.html) basierend auf: Henke, B. L., Gullikson, E. M. und Davis, J. C. ‘X-Ray interactions: photoabsorption, scattering, transmission and reflection at E=50-30,000 eV, Z=1-92’, In: *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **54** (1993), 181-342.
- [Hop08] P. Hopkins, A. J. Archer und R. Evans. “Interfacial and wetting properties of a binary point Yukawa fluid”. In: *J. Chem. Phys.* **129**(21) (2008), 1–11. DOI: 10.1063/1.3027515.
- [Hug99] D. F. K. Hughes, I. D. Robb und P. J. Dowding. “Stability of copper phthalocyanine dispersions in organic media”. In: *Langmuir* **15**(16) (1999), 5227–5231. DOI: 10.1021/1a981389v.



- 
- [Høy76] J. S. Høy, G. Stell und E. Waisman. “Ornstein-Zernike equation for a two-Yukawa  $c(r)$  with core condition”. In: *Mol. Phys.* **32**(1) (1976), 209–230. DOI: 10.1080/00268977600101731.
- [Høy77] J. S. Høy und L. Blum. “Solution of the Yukawa closure of the Ornstein-Zernike equation”. In: *J. Stat. Phys.* **16**(5) (1977), 399–413. DOI: 10.1007/BF01013184.
- [I22] Webseite der Strahllinie, abgerufen am 30.05.2017. <http://www.diamond.ac.uk/Beamlines/Soft-Condensed-Matter/small-angle/I22/specs.html>.
- [Id0a] Webseite der Strahllinie, abgerufen am 30.05.2017. <http://www.esrf.eu/home/UsersAndScience/Experiments/CBS/ID02.html>.
- [Id0b] Webseite der Strahllinie, abgerufen am 30.05.2017. <http://www.esrf.eu/home/UsersAndScience/Experiments/CBS/ID02/BeamlineLayout.html>.
- [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: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**(37) (2015), 24224–24237. DOI: 10.1039/C5CP03069B.
- [Ish77] C. Ishimoto und T. Tanaka. “Critical Behavior of a Binary Mixture of Protein and Salt Water”. In: *Phys. Rev. Lett.* **39**(8) (1977), 474–477.
- [Jav07] N. Javid, K. Vogtt, C. Krywka, M. Tolan und R. Winter. “Capturing the Interaction Potential of Amyloidogenic Proteins”. In: *Phys. Rev. Lett.* **99**(2) (2007), 28101. DOI: 10.1103/PhysRevLett.99.028101.
- [Kin84] D. J. Kinning und E. L. Thomas. “Hard-sphere interactions between spherical domains in diblock copolymers”. In: *Macromolecules* **17**(5) (1984), 1712–1718. DOI: 10.1021/ma00139a013.
- [Kit87] Y. Kitamura und T. Itoh. “Reaction volume of protonic ionization for buffering agents. Prediction of pressure dependence of pH and pOH”. In: *J. Solution Chem.* **16**(9) (1987), 715–725. DOI: 10.1007/BF00652574.
- [Kle02] R. Klein. “Interaction Colloidal Suspensions”. In: *Neutrons, X-ray Light Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Hrsg. von P. Lindner und T. Zemb. Amsterdam: North-Holland, 2002. ISBN: 0-444-51122-9.
- [Kot83] M. Kotlarchyk und S. Chen. “Analysis of small angle neutron scattering spectra from polydisperse interacting colloids”. In: *J. Chem. Phys.* **79**(5) (1983), 2461–2469. DOI: 10.1063/1.446055.

- [Kry08a] C. Krywka. “Ein Aufbau für Röntgenkleinwinkelstreuung an Protein-Lösungen an der Synchrotronstrahlungsquelle DELTA”. Dissertation. TU Dortmund, 2008. DOI: 10.17877/DE290R-871.
- [Kry08b] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, M. Tolan, C. Royer und R. Winter. “Effect of Osmolytes on Pressure-Induced Unfolding of Proteins : A High-Pressure SAXS Study”. In: *ChemPhysChem* **9**(18) (2008), 2809–2815. DOI: 10.1002/cphc.200800522.
- [Kum14] S. Kumar, D. Ray, V. K. Aswal und J. Kohlbrecher. “Structure and interaction in the polymer-dependent reentrant phase behavior of a charged nanoparticle solution”. In: *Phys. Rev. E* **90**(4) (2014), 042316. DOI: 10.1103/PhysRevE.90.042316.
- [Kum16] S. Kumar, V. K. Aswal und J. Kohlbrecher. “Small-Angle Neutron Scattering Study of Interplay of Attractive and Repulsive Interactions in Nanoparticle-Polymer System”. In: *Langmuir* **32**(6) (2016), 1450–1459. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b03998.
- [Leb66] J. L. Lebowitz und J. K. Percus. “Mean spherical model for lattice gases with extended hard cores and continuum fluids”. In: *Phys. Rev.* **144**(1) (1966), 251–258. DOI: 10.1103/PhysRev.144.251.
- [Lek92] H. N. W. Lekkerkerker, W. C.-K. Poon, P. N. Pusey, A. Stroobants und P. B. Warren. “Phase Behaviour of Colloid + Polymer Mixtures”. In: *Europhys. Lett.* **20**(6) (1992), 559–564. DOI: 10.1209/0295-5075/20/6/015.
- [Lin02a] P. Lindner. “Scattering Experiments: Experimental Aspects, initial Data Reduction and Absolute Calibration”. In: *Neutrons, X-ray Light Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Hrsg. von P. Lindner und T. Zemb. Amsterdam: North-Holland, 2002. ISBN: 0-444-51122-9.
- [Lin02b] P. Lindner und T. Zemb, Hrsg. *Neutrons, X-ray and Light: Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Amsterdam: North-Holland, 2002. ISBN: 0-444-51122-9.
- [Liu05] Y. Liu, W. R. Chen und S. H. Chen. “Cluster formation in two-Yukawa fluids”. In: *J. Chem. Phys.* **122**(4) (2005), 044507. DOI: 10.1063/1.1830433.
- [Lod] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell. *Molecular Cell Biology*. Vierte Edition. New York: W. H. Freeman, 2000. Verfügbar durch: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>.
- [Mat] Matlab 2011a, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.
- [Mee05] F. Meersman, J. Wang, Y. Wu und K. Heremans. “Pressure Effect on the Hydration Properties of Poly(N -isopropylacrylamide) in Aqueous Solution Studied by FTIR Spectroscopy”. In: *Macromolecules* **38**(21) (2005), 8923–8928. DOI: 10.1021/ma051582d.

- [Mee13] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael und P. F. McMillan. “High-Pressure Biochemistry and Biophysics”. In: *Rev. Mineral. Geochemistry* **75**(1) (2013), 607–648. DOI: 10.2138/rmg.2013.75.19.
- [Men91] S. V. G. Menon, V. K. Kelkar und C Manohar. “Application of Baxter model to the theory of cloud points of nonionic surfactant solutions”. In: *Phys. Rev. A* **43**(2) (1991), 1130–1133. DOI: doi:10.1103/PhysRevA.43.1130.
- [Mit06] L. Mitra, N. Smolin, R. Ravindra, C. Royer und R. Winter. “Pressure perturbation calorimetric studies of the solvation properties and the thermal unfolding of proteins in solution-experiments and theoretical interpretation”. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**(11) (2006), 1249–1265. DOI: 10.1039/b516608j.
- [Moo] Reprinted from: SAXS/WAXS study on the formation of precursors and crystallization of silicalite, P.-P. E. a. de Moor, T. P. M. Beelen, R. A. van Santen. In: *Microporous Mater.* **9**(3-4) (1997), 117-130, Copyright (2017), with permission from Elsevier.
- [Mus97] M. Muschol und F. Rosenberger. “Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization”. In: *J. Chem. Phys.* **107**(6) (1997), 1953–1962. DOI: 10.1063/1.474547.
- [Möl11] J. Möller, M. Cebi, M. A. Schroer, M. Paulus, P. Degen, C. J. Sahle, D. C. F. Wieland, S. Leick, A. Nyrow, H. Rehage und M. Tolan. “Dissolution of iron oxide nanoparticles inside polymer nanocapsules.” In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**(45) (2011), 20354–20360. DOI: 10.1039/c1cp22161b.
- [Möl14a] J. Möller. “Liquid-Liquid Phase Separation and Intermolecular Interactions in Dense Protein Solutions”. Dissertation. TU Dortmund, 2014. DOI: 10.17877/DE290R-542.
- [Möl14b] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erkamp, M. Paulus, M. Tolan und R. Winter. “Reentrant liquid-liquid phase separation in protein solutions at elevated hydrostatic pressures”. In: *Phys. Rev. Lett.* **112**(2) (2014), 028101. DOI: 10.1103/PhysRevLett.112.028101.
- [Nor00] M. G. Noro und D. Frenkel. “Extended corresponding-states behavior for particles with variable range attractions”. In: *J. Chem. Phys.* **113**(8) (2000), 2941–2944. DOI: 10.1063/1.1288684.
- [Näg08] G. Nägele. “Theories of Fluid Microstructures”. In: *Soft Matter - From Synthetic to Biological Materials : Lecture Notes of the 39th Spring School 2008*. Hrsg. von J. K. G. Dhont, G. Gompper, G. Nägele, D. Richter und R. G. Winkler. Jülich: Forschungszentrum Jülich, 2008. ISBN: 978-3-89336-517-3.

- [Okh94] A. V. Okhulkov, Y. N. Demianets und Y. E. Gorbaty. “X-ray scattering in liquid water at pressures of up to 7.7 kbar: Test of a fluctuation model”. In: *J. Chem. Phys.* **100**(2) (1994), 1578–1588. DOI: 10.1063/1.466584.
- [Orn14] L. S. Ornstein und F. Zernike. “Accidental deviations of density and opalescence at the critical point of a single substance”. In: *Proc. K. Akad. Van Wet. Te Amsterdam* **17** (1914), 793–806.
- [Ort09] M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, A. Paciaroni, L. R. S. Barbosa, H. Amenitsch, M. Steinhart, J. Ollivier und D. Russo. “Combining structure and dynamics: non-denaturing high-pressure effect on lysozyme in solution”. In: *J. R. Soc. Interface* (2009), rsif20090163. DOI: 10.1098/rsif.2009.0163.focus.
- [Pdb] RCSB Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org>.
- [Ped02] J. S. Pedersen. “Modelling of Small-Angle Scattering Data”. In: *Neutrons, X-ray Light Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Hrsg. von P. Lindner und T. Zemb. Amsterdam: North-Holland, 2002. ISBN: 0-444-51122-9.
- [Pel03] G. Pellicane, D. Costa und C. Caccamo. “Phase coexistence in a DLVO model of globular protein solutions”. In: *J. Phys. Condens. Matter* **15**(3) (2003), 375–384. DOI: 10.1088/0953-8984/15/3/305.
- [Per58] J. K. Percus und G. J. Yevick. “Analysis of Classical Statistical Mechanics by Means of Collective Coordinates”. In: *Phys. Rev.* **110**(1) (1958), 1–13. DOI: 10.1103/PhysRev.110.1.
- [Poo00] W. C. K. Poon, S. U. Egelhaaf, P. A. Beales, A. Salonen und L. Sawyer. “Protein crystallization: scaling of charge and salt concentration in lysozyme solutions”. In: *J. Phys. Condens. Matter* **12**(35) (2000), L569–L574. DOI: 10.1088/0953-8984/12/35/103.
- [Por51] G. Porod. “Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen”. In: *Kolloid Z.* **142**(2) (1951), 83–114.
- [Rau16] A. S. Raut und D. S. Kalonia. “Pharmaceutical Perspective on Opalescence and Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Solutions”. In: *Mol. Pharm.* **13**(5) (2016). DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00937.
- [Roi99] R. van Roij, M. Dijkstra und J.-P. Hansen. “Phase diagram of charge-stabilized colloidal suspensions: van der Waals instability without attractive forces”. In: *Phys. Rev. E* **59**(2) (1999), 2010–2025. DOI: 10.1103/PhysRevE.59.2010.

- [Ros96] D. Rosenbaum, P. C. Zamora und C. F. Zukoski. “Phase Behavior of Small Attractive Colloidal Particles”. In: *Phys. Rev. Lett.* **76**(1) (1996), 150–153. DOI: 10.1103/PhysRevLett.76.150.
- [Sae77a] S. Saeki, N. Kuwahara, M. Nakata und M. Kaneko. “Phase separation of poly(ethylene glycol)-water-salt systems”. In: *Polymer* **18**(10) (1977), 1027–1031. DOI: 10.1021/ma970705u.
- [Sae77b] S. Saeki, N. Kuwahara, M. Nakata und M. Kaneko. “Phase separation of poly(ethylene glycol)-water-salt systems”. In: *Polymer* **18**(10) (1977), 1027–1031. DOI: 10.1021/ma970705u.
- [Sch11a] M. A. Schroer. “Small angle X-ray scattering studies on proteins under extreme conditions”. Dissertation. TU Dortmund, 2011. DOI: 10.17877/DE290R-2928.
- [Sch11b] M. A. Schroer, Y. Zhai, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan und R. Winter. “Exploring the piezophilic behavior of natural cosolvent mixtures”. In: *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**(48) (2011), 11413–11416. DOI: 10.1002/anie.201104380.
- [Sch11c] 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: *Phys. Rev. Lett.* **106**(17) (2011), 178102. DOI: 10.1103/PhysRevLett.106.178102.
- [Sch13] J. Schulze. “Untersuchung der Wasserstruktur sowie der Wechselwirkungsstärke von Nanopartikeln bei hohen hydrostatischen Drücken mittels Röntgenstreuung”. Masterarbeit, nicht veröffentlicht. TU Dortmund, 2013.
- [Sch16] J. Schulze, J. Möller, J. Weine, K. Julius, N. König, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan und R. Winter. “Phase behavior of lysozyme solutions in the liquid-liquid phase coexistence region at high hydrostatic pressures”. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**(21) (2016), 14252–14256. DOI: 10.1039/C6CP01791F.
- [Sch87] K. S. Schweizer und J. G. Curro. “Integral-equation theory of the structure of polymer melts”. In: *Phys. Rev. Lett.* **58**(3) (1987), 246–249. DOI: 10.1103/PhysRevLett.58.246.
- [Sch97] K. S. Schweizer und J. G. Curro. *Integral Equation Theories of the Structure, Thermodynamics, and Phase Transitions of Polymer Fluids*. Hrsg. von I Prigogine und S. A. Rice. Bd. 98. Hoboken, NJ, USA. Hoboken, NJ, USA: Advances in Chemical Physics, Volume 98, John Wiley & Sons, Inc., 1997. ISBN: 047116285X. DOI: 10.1002/9780470141571.ch1.

- [Sci10] F. Sciortino, A. Geiger und H. Eugene Stanley. “Effect of defects on molecular mobility in liquid water”. In: *Nature* **354**(6350) (2010), 218–221. DOI: 10.1038/354218a0.
- [Sed07] H. Sedgwick, J. E. Cameron, W. C. K. Poon und S. U. Egelhaaf. “Protein phase behavior and crystallization: Effect of glycerol”. In: *J. Chem. Phys.* **127**(12) (2007), 125102. DOI: 10.1063/1.2771168.
- [Shv13] A. A. Shvets und A. N. Semenov. “Effective interactions between solid particles mediated by free polymer in solution”. In: *J. Chem. Phys.* **139**(5) (2013), 054905. DOI: 10.1063/1.4816469.
- [Sig] Webseite des Lieferanden, abgerufen am 10.11.2016. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/420808?lang=de&region=DE>.
- [Sop00] A. K. Soper und M. A. Ricci. “Structures of High-Density and Low-Density Water”. In: *Phys. Rev. Lett.* **84**(13) (2000), 2881–2884. DOI: 10.1103/PhysRevLett.84.2881.
- [Sop62] A. J. Sophianopoulos, C. K. Rhodes, D. N. Holcomb und K. E. Van Holde. “Physical Studies of Lysozyme”. In: *J. Biol. Chem.* **237**(4) (1962), 1107–1112.
- [Spa02] O. Spalla. “General Theorems in Small-Angle Scattering”. In: *Neutrons, X-ray Light Scattering Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Hrsg. von P. Lindner und T. Zemb. Amsterdam: North-Holland, 2002. ISBN: 0-444-51122-9.
- [Sun98] T. Sun und H. E. King. “Discovery and Modeling of Upper Critical Solution Behavior in the Poly(ethylene oxide)/Water System at Elevated Pressure Thomas”. In: *Macromolecules* **31**(18) (1998), 6383–6386. DOI: 10.1021/ma970705u.
- [Sve13] D. Svergun, M. H. J. Koch, P. A. Timmins und R. P. May. *Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules*. Oxford: Oxford University Press, 2013, 13–26. ISBN: 978-0-19-963953-3.
- [Tar90] V. G. Taratuta, A. Holschbach, G. M. Thurston, D. Blankschtein und G. B. Benedek. “Liquid-Liquid Phase Separation of Aqueous Lysozyme Solutions: Effects of pH and Salt Identity”. In: *J. Phys. Chem.* **94**(5) (1990), 2140–2144. DOI: 10.1021/j100368a074.
- [Tau85] M. Tau und L. Reatto. “Phase diagram and correlations of fluids with very steep attractive forces”. In: *J. Chem. Phys.* **83**(4) (1985), 1921–1926. DOI: 10.1063/1.449328.
- [Tei88] J. Teixeira. “Small-angle scattering by fractal systems”. In: *J. Appl. Crystallogr.* **21**(6) (1988), 781–785. DOI: 10.1107/S0021889888000263.

- [Ter02] I. Teraoka. *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*. New York: Wiley Interscience, 2002, 360. ISBN: 0-471-38929-3.
- [Tho87] J. A. Thomson, P. Schurtenberger, G. M. Thurston und G. B. Benedek. “Binary liquid phase separation and critical phenomena in a protein/ water solution”. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**(20) (1987), 7079–7083. DOI: 10.1063/1.1288684.
- [Tor00] S. Torquato, T. M. Truskett und P. G. Debenedetti. “Is Random Close Packing of Spheres Well Defined?” In: **84**(10) (2000), 2064–2067. DOI: 10.1103/PhysRevLett.84.2064.
- [Toy77] T. Toyochi, C. Ishimoto und L. T. Chylack. “Phase separation of a protein-water mixture in cold cataract in the young rat lens”. In: *Science (80- )*. **197**(4307) (1977), 1010–1012. DOI: 10.1126/science.887936.
- [Tui03] R. Tuinier, J. Rieger und C. G. De Kruif. “Depletion-induced phase separation in colloid-polymer mixtures”. In: *Adv. Colloid Interface Sci.* **103**(1) (2003), 1–31. DOI: 10.1016/S0001-8686(02)00081-7.
- [Tui08] R. Tuinier. “Depletion”. In: *Soft Matter - From Synthetic to Biological Materials : Lecture Notes of the 39th Spring School 2008*. Hrsg. von J. K. G. Dhont, G. Gompper, G. Nägele, D. Richter und R. G. Winkler. Jülich: Forschungszentrum Jülich, 2008. ISBN: 978-3-89336-517-3.
- [Ven87] N. Vennemann, M. D. Lechner und R. C. Oberthür. “Thermodynamics and conformation of polyoxyethylene in aqueous solution unter high pressure: 1. Small-angle neutron scattering and denistometric measurements at room temperature”. In: *Polymer* **28**(10) (1987), 1738–1748. DOI: 10.1016/0032-3861(87)90018-8.
- [Ver47] E. J. W. Verwey. “Theory of the Stability of Lyophobic Colloids”. In: *J. Phys. Colloid Chem.* **51**(3) (1947), 631–636. DOI: 10.1021/j150453a001.
- [Vli00] G. A. Vliegthart und H. N. W. Lekkerkerker. “Predicting the gas-liquid critical point from the second virial coefficient”. In: *J. Chem. Phys.* **112**(12) (2000), 5364–5369. DOI: 10.1063/1.481106.
- [Vri76] A Vrij. “Polymers at interfaces and the interactions in colloidal dispersions”. In: *Pure Appl. Chem.* **48**(4) (1976), 471–483. DOI: 10.1351/pac197648040471.
- [Wai76] E. Waisman, J. S. Høye und G. Stell. “Ornstein-Zernike equation for a two-Yukawa  $c(r)$ ”. In: **40**(3) (1976), 514–516. DOI: 10.1016/0009-2614(76)85132-9.
- [Wan10] Y. Wang, A. Lomakin, J. J. Mcmanus, O. Ogun und G. B. Benedek. “Phase behavior of mixtures of human lens proteins Gamma D and Beta B1”. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**(30) (2010), 13282–13287. DOI: 10.1073/pnas.1008353107.

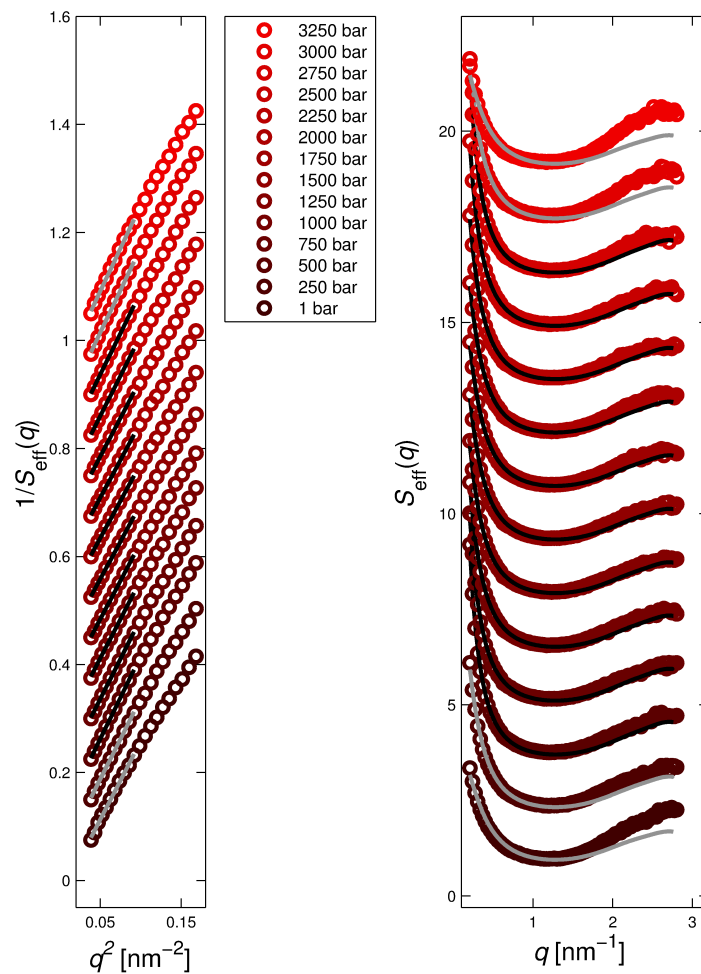
## LITERATUR

---

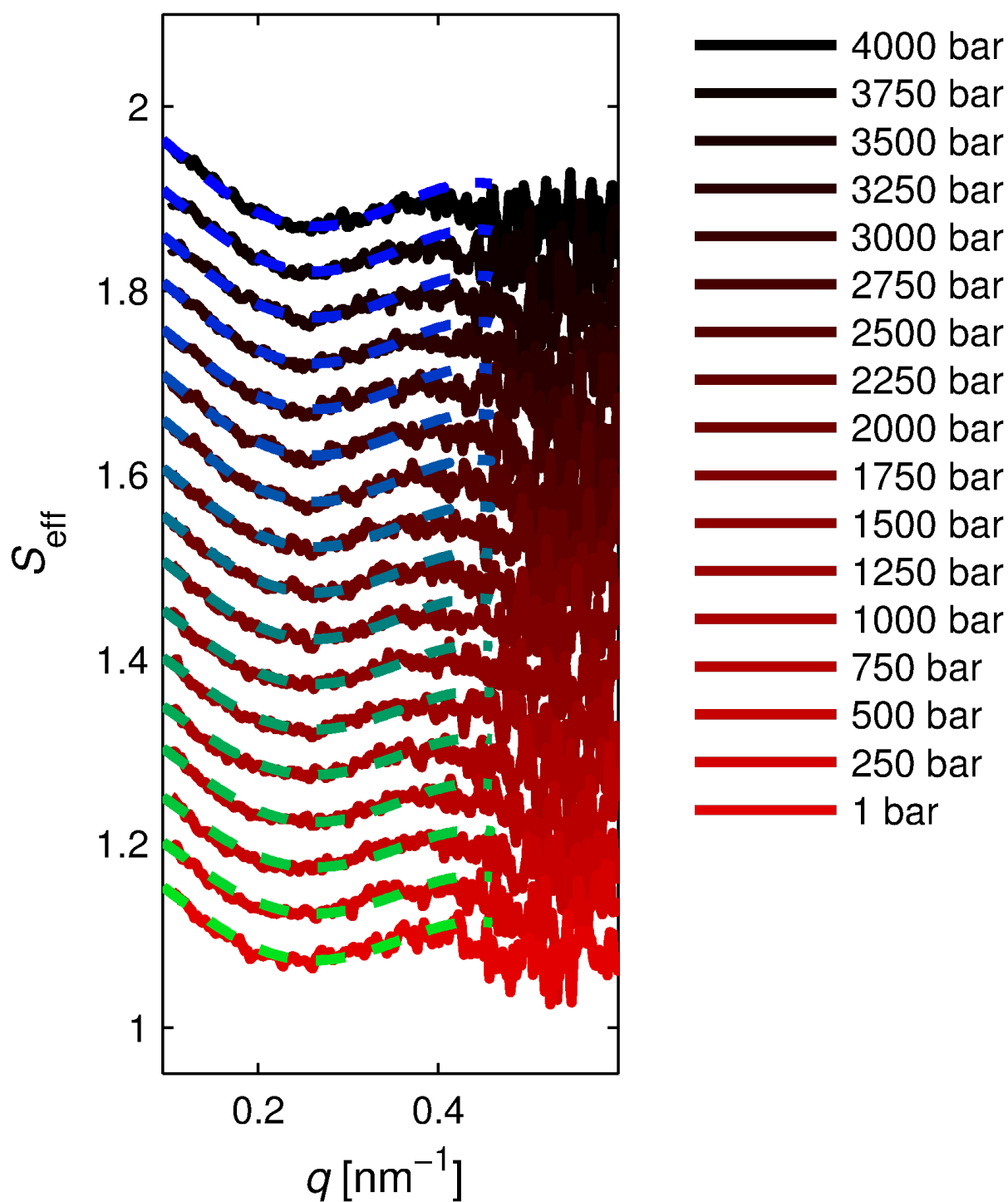
- [Wil05] P. R. Wills und D. J. Winzor. “Van der Waals phase transition in protein solutions”. In: *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **61**(6) (2005), 832–836. DOI: 10.1107/S0907444905013569.
- [Win98] R. Winter und F. Noll. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Hrsg. von C. Elschenbroich, F. Hensel und H. Hopf. Stuttgart: Teubner, 1998. ISBN: 3-519-03518-9.
- [Yan14] P. H. Yancey, M. E. Gerring, J. C. Drazen, A. A. Rowden und A. Jamieson. “Marine fish may be biochemically constrained from inhabiting the deepest ocean depths”. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**(12) (2014), 4461–4465. DOI: 10.1073/pnas.1322003111.
- [Zim93] S. B. Zimmerman und A. P. Minton. “Macromolecular crowding: biochemical, biophysical and physiological consequences”. In: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**(1) (1993), 27–65. DOI: 10.1146/annurev.bb.22.060193.000331.



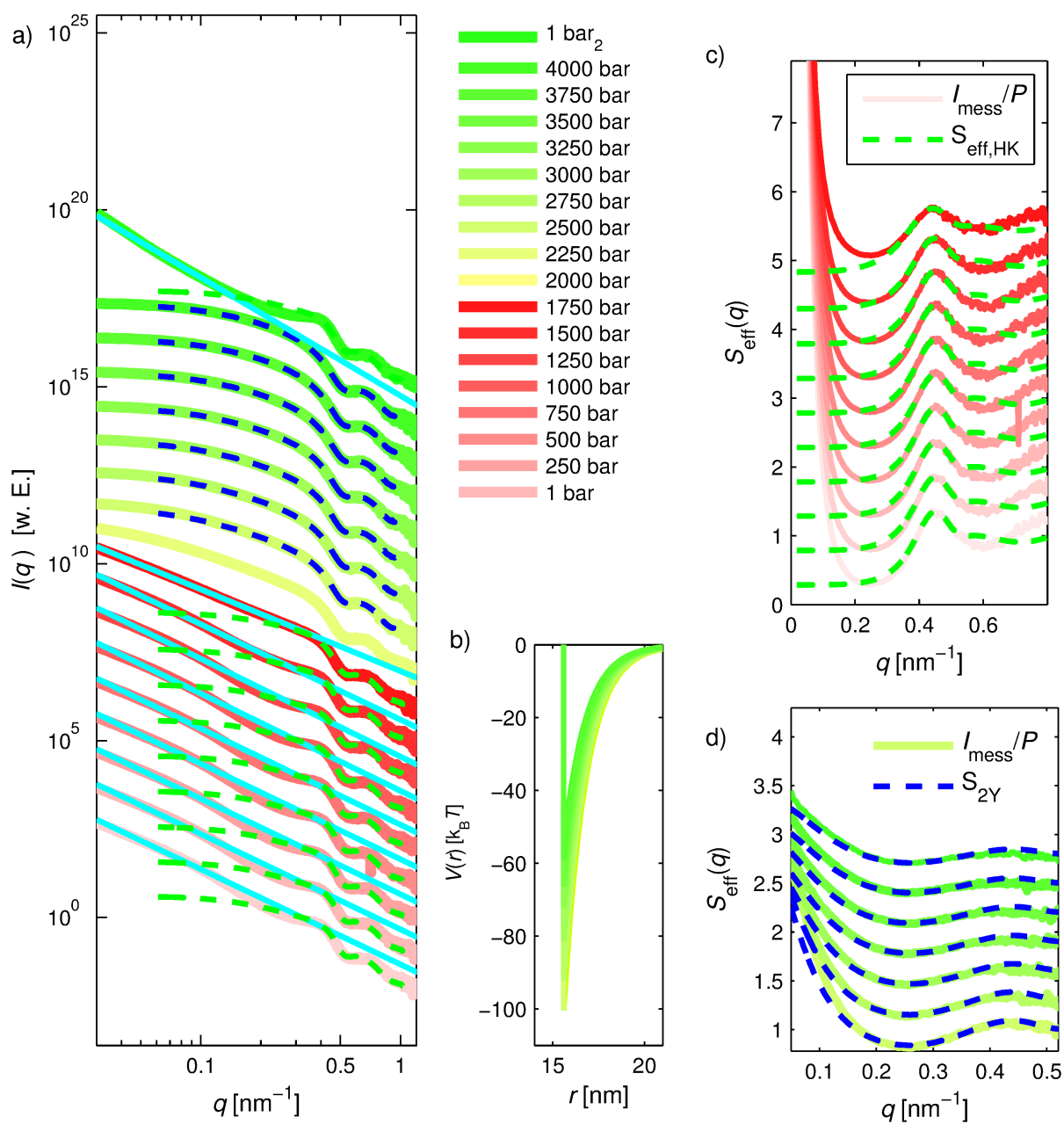
# Anhang



**Abbildung 7.1:** a) Ornstein-Zernicke Darstellung von  $S_{\text{eff}}(q)$  für die in b) gezeigten Strukturfaktoren. b) gemessener, effektiver Strukturfaktor  $S_{\text{eff}}(q)$  einer 24 wt.% Lysozymbilösung bei ausgewählten Drücken und 15 °C (rot-braune Punkte). Die schwarzen Linien sind die angepassten, berechneten Strukturfaktoren in der homogenen Phase, in grau dargestellt für die LLPS Phase.



**Abbildung 7.2:** zeigt den gemessenen  $S_{\text{eff}}$  eines Systems mit 1 wt.% Ludox und  $10^{-4}$  wt.% PEG für Umgebungsdruck und 4000 bar sowie berechneten Strukturfaktoren (gestrichelt).



**Abbildung 7.3:** a) gemessene Intensität  $I_{\text{mess}}$  einer Probe, die 7,5 wt.% PEG enthält, für alle gemessenen Drücke sowie die Strukturformeln  $S(q)$  für die phasenseparierte (c) bzw. homogene Phase (d) sowie die Interaktionspotenziale  $V(r)$  (b).



# Danksagung

In diesem Abschnitt möchte ich den Menschen danken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben. Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Metin Tolan dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, am Lehrstuhl E1a der TU Dortmund in dem von mir gewünschten Themenfeld promovieren zu können. Außerdem danke ich ihm sowie Herrn Prof. Dr. Roland Winter für die Anfertigung der Gutachten sowie dem Vorsitzenden der Kommission Herrn Prof. Dr. Jan Kierfeld und Frau Dr. Bärbel Siegmann, die als wissenschaftlicher Mitarbeiter des Fachbereichs die Kommission komplettiert hat.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Dr. Julia Nase, Herrn Dr. Michael Paulus, Herrn Dr. Christian Sternemann und Herrn Dr. Johannes Möller für die hilfreichen Diskussionen bei der Interpretation der Daten, die zahlreichen Ratschläge sowie die Korrekturen dieser Arbeit.

SAXS-Messzeiten sind immer ein besonderer Spaß für Jung und Alt und bei so manchem haben zwölf pausenfreie Stunden an der Pumpe deutliche Spuren hinterlassen. Für die Inkaufnahme bleibender oder vorübergehender Schäden und Unterstützung bei den Experimenten möchte ich Jonathan Weine, Karin Julius, Nico König, Melanie Berghaus, Mimi Gao, Stefanie Roesse, Dr. Steffen Bieder, Dr. Christoph Schröder, Göran Surmeier, Dr. Julia Nase und Samy Al-Ayoubi danken. Die Zeit im Lehrstuhl war durchgehend geprägt von einer guten Arbeitsatmosphäre, dafür möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Lehrstuhlmitgliedern danken. Besonders danken möchte ich meinem Studiums-, Praktikums- und Bürokollegen Dr. Paul Salmen, der immer ein offenes Ohr für meine Probleme des täglichen (Matlab-)Lebens hatte und sie meiner Erinnerung nach ausnahmslos lösen konnte. Außerdem bedanken möchte ich bei meiner Kaffee-und-Tee-Gruppe Holger Göhring, Dr. Julia Nase, Stefanie Roesse und Dominik Wolter sowie Dr. Thomas Büning, Susanne Dogan, Göran Surmeier (gute Arbeit!), Dr. Steffen Bieder, Dr. Michael Paulus und Dr. Christian Sternemann.

Für die Unterstützung während des Studiums möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mir immer den Rücken frei gehalten haben und mir ermöglicht haben, das zu studieren, was mir Freude bereitet.