elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Untersuchungen zur Kinetik der Hauptphasenumwandlung wässriger Phospholipidsysteme mit Drucksprung-Relaxation

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät II
der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg

von Herrn Diplomchemiker Martin Schiewek
geboren am 4. September 1976
in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter:
1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Alfred Blume
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Roland Winter

Halle (Saale), den 13. Februar 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013484
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013484]

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

I Einführung **1**

1 Phospholipide **3**
1.1 Chemische Struktur und Nomenklatur 3
1.2 Selbstaggregation und Hydrophober Effekt 4
1.3 Phasenverhalten 6
1.4 Schwingungsspektroskopische Untersuchungen an Phospholipiden 9

2 Phasenübergänge **13**
2.1 Die Thermodynamik von Phasenübergängen 13
2.2 Die Kinetik von Phasenübergängen 15
2.2.1 Die Theorie der Relaxationskinetik 15
2.2.2 Kinetische Untersuchungen an Lipidphasen 17
2.2.3 Theoretische Beschreibungsansätze 20

3 Instrumentelle Methoden **23**
3.1 Zeitaufgelöste Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie 23
3.2 Zeitaufgelöste Dynamische Differenzkalorimetrie 25
3.3 Drucksprung-Techniken 27

4 Problemstellung und Motivation **29**

II Ergebnisse und Diskussion **31**

5 Bau einer Drucksprung-Relaxationsapparatur mit IR-Detektion **33**
5.1 Drucksystem 33
5.1.1 Mechanische Komponenten 33
5.1.2 Beschreibung der Hardware 37
5.1.3 Beschreibung der Software 38
5.1.4 Temperaturkontrolle 41
5.2 Konfiguration des Spektrometers 42
5.3 Bearbeitung der Spektren 43
5.4 Auswertung der Spektren 45

6 Drucksprung-Relaxationsexperimente mit IR-Detektion **51**
6.1 Materialien und Methoden . . . 51
6.1.1 Probenpräparation . . . 51
6.1.2 Messung der Spektren . . . 51
6.1.3 Regressionsanalyse der Daten . . . 54
6.2 Ergebnisse . . . 55
6.2.1 DSPC . . . 55
6.2.2 DPPC . . . 60
6.2.3 DMPC . . . 63
6.2.4 DMPA . . . 66
6.2.5 DMPE . . . 69
6.3 Diskussion . . . 69

7 Drucksprung-Relaxationsexperimente mit Kalorimetrie-Detektion **75**
7.1 Materialien und Methoden . . . 75
7.1.1 Probenpräparation . . . 75
7.1.2 Messung der Kalorigramme . . . 75
7.1.3 Entfaltung der zeitaufgelösten Kalorigramme . . . 77
7.1.4 Regressionsanalyse . . . 79
7.2 Ergebnisse . . . 79
7.2.1 DSPC . . . 79
7.2.2 DPPC . . . 84
7.2.3 DMPC . . . 86
7.2.4 DMPA . . . 88
7.2.5 DMPE . . . 90
7.3 Diskussion unter Berücksichtigung der Ergebnisse der IR-Untersuchungen aus Kap. 6 . . . 90

8 Zusammenfassung **97**

Literaturverzeichnis **101**

Glossar

ΔA	Differenz in der Basislinie zweier IR-Spektren
AD	Analog zu digital (Wandler)
ATR	Attenuated Total Reflectance
χ^2	Summe der Fehlerquadrate
c_p	Spezifische Wärmekapazität bei konstantem Druck
δ	Deformationsschwingung
DDE	Dynamic Data Exchange, Möglichkeit der Kommunikation zweier Software-Programme untereinander
DMPA	1,2–Dimyristoyl–*sn*–glycero–3–phosphorsäure
DMPC	1,2–Dimyristoyl–*sn*–glycero–3–phosphocholin
DMPE	1,2–Dimyristoyl–*sn*–glycero–3–phosphoethanolamin
DPPC	1,2–Dipalmitoyl–*sn*–glycero–3–phosphocholin
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DSPC	1,2–Distearyl–*sn*–glycero–3–phosphocholin
DTGS	Deuteriertes Triglycinsulfat
f_{konz}	Faktor zur Korrektur des Konzentrationsunterschiedes des Lösungsmittels im Lipidgemisch und als reine Substanz
FFT	Fast Fourier Transformation
FPM	Bezeichnet eine allgemeine Gruppe von Fluorkautschuken
FTIR	Fouriertransform-Infrarot (-Spektroskopie)
γ_{r}	„Rocking“-Schwingung
GUI	Graphical User Interface
$\Delta H_{\text{v.H.}}$	van't Hoff-Enthalpie
h	Enthalpie
HgCdTe	Quecksilber, Cadmium und Tellur – Materialien für Halbleiter-IR-Detektoren
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I/O	Input/Output

IR	Infrarot
Ising-Modell	Von Ernst Ising aufgestelltes Modell, ursprünglich zur Beschreibung von Ferromagnetismus in Festkörpern, zählt zu den meistuntersuchten Modellen der statistischen Physik
j	Anzahl der Exponentialterme des Regressionsmodells
Jitter	Fehler in der Periodendauer der Abtastrate beim Messen des Interferogramms
K	Gleichgewichtskonstante
L_β	Gelphase
L_c	Kristalline Phase
L_α	Flüssigkristalline Phase
μ	Chemisches Potential
Ma.-%	Massenprozent
MR	Methylrot – ein pH-Indikator
N	Kooperative Einheit
N_IFG	Punktanzahl des Interferogramms
ν_as	Antisymmetrische Streckschwingung
ν_s	Symmetrische Streckschwingung
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
OPUS	Programm der Firma „Bruker“ zur Steuerung der Spektrometer und Spektrenbearbeitung
P_kr	Kritischer Packungsparameter
$P_{\beta'}$	„Gerippelte“ Phase
p	Druck
Pipe	Möglichkeit der Kommunikation zweier Software-Programme untereinander
PM-DSC	Pressure-Modulated Differential Scanning Calorimetry
PPC	Pressure Perturbation Calorimetry
Pt100	Temperatursensor, dessen Messprinzip auf der Temperaturabhängigkeit des elektrischen Widerstandes von Platin beruht
RS232	Standard für eine serielle Schnittstelle

s	Entropie
sn	Stereochemical Numbering
ShoreA	Einheit des Wertes einer Härteprüfung von Weich-Elastomeren nach Shore
Strg	Steuerung
T	Temperatur
T_m	Temperatur der Hauptumwandlung
T_p	Temperatur der Vorumwandlung
τ	Relaxationskonstante
θ	Umwandlungsgrad
Trig	Trigger (Auslöser)
TTL	Transistor-Transistor-Logik, eine Schaltungstechnik für logische Schaltungen
UML	Unified Modeling Language – standardisierte Sprache für die Modellierung von Software, beinhaltet weiter eine graphische Notation für Software-Komponenten
$\Delta V_\mathrm{v.H.}$	van't Hoff-Volumen

Teil I

Einführung

1 Phospholipide

Phospholipide, dispergiert in Wasser, stellen ein lyotropes System dar. Aufgrund der amphiphilen Molekülgestalt und des hydrophoben Effektes kommt es zur Bildung von Aggregaten in wässrigen Medien. Es werden hauptsächlich lamellare, aber auch hexagonale und kubische Phasen gebildet. Durch die Änderung äußerer Parameter wird eine charakteristische Folge von Phasen durchlaufen. Die Ordnung der Phasenübergänge liegt zwischen der einer 1. und 2. Ordnung. Die Kinetik des Phasenüberganges kann untersucht werden, wenn sich der äußere Parameter sehr viel schneller als die Relaxationszeit des Phasenüberganges ändert. Konformationelle Änderungen der Moleküle lassen sich dabei z. B. mit Infrarot-Spektroskopie feststellen.

1.1 Chemische Struktur und Nomenklatur

Zu den Lipiden gehören z. B. Glycero- und Sphingolipide. Glycerolipide haben dabei ein Glycerol als zentralen Kern, während sich die Sphingolipide vom langkettigen Aminoalkohol Sphingosin ableiten. Letztere haben in dieser Arbeit keine Bedeutung, weshalb auf sie nicht weiter eingegangen werden soll. Das mittlere C-Atom des Glycerolrestes ist ein Stereozentrum und bei den natürlich vorkommenden Lipiden immer L-konfiguriert. Für Glycerolipide wurde eine spezielle Nummerierung der C-Atome eingeführt: An den Positionen *sn*-1 und *sn*-2 (*sn* steht dabei für *stereochemical numbering*) ist die OH-Gruppe mit einer langkettigen Fettsäure verestert (Abb. 1.1). Diese stellen, mit Ausnahme der Estergruppen, den hydrophoben Teil des amphiphilen Gesamtmoleküls dar. An Position *sn*-3 dagegen befindet sich ein polarer, hydrophiler Molekülrest. Bei den Phospholipiden enthält diese Gruppe einen Phosphatrest. Die Gesamtheit von Glycerin- und Phosphatteil wird als Phosphatidyl-Rest bezeichnet. Andere Kopfgruppen leiten sich von Zuckern ab und bilden die Klasse der Glycolipide. Eine Auswahl an Kopfgruppen und Fettsäuren, die bei den Phospholipiden häufig auftreten, zeigen die Tabellen 1.1 und 1.2.

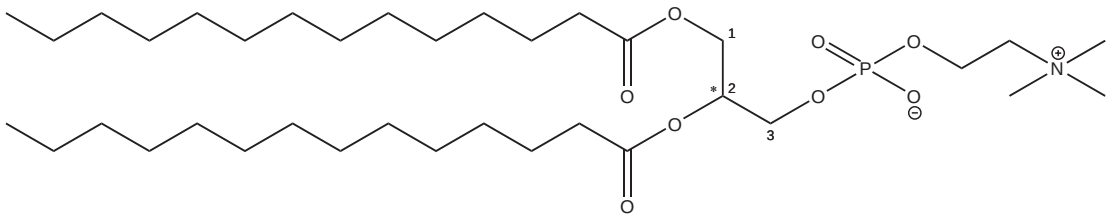

Abb. 1.1: Chemische Struktur des 1,2–Dimyristoyl–*sn*–glycero–3–phosphocholins (DMPC)

Tab. 1.1: Kopfgruppen von Phospholipiden, deren Namen und Abkürzungen

Phosphatidyl-Substituent	Bezeichnung
–CH_2–CH_2–$N^+(CH_3)_3$	Phosphatidylcholin (PC)
–CH_2–CH_2–NH_3^+	Phosphatidylethanolamin (PE)
–CH_2–CH(OH)–CH_2–OH	Phosphatidylglycerin (PG)
–CH_2–$CH(NH_3^+)$–COO^-	Phosphatidylserin (PS)
–H	Phosphatidsäure (PA)

Tab. 1.2: Strukturen und Trivialnamen einiger Fettsäuren

Fettsäure	Struktur
Laurinsäure	CH_3–$(CH_2)_{10}$–COOH
Myristinsäure	CH_3–$(CH_2)_{12}$–COOH
Palmitinsäure	CH_3–$(CH_2)_{14}$–COOH
Stearinsäure	CH_3–$(CH_2)_{16}$–COOH

1.2 Selbstaggregation und Hydrophober Effekt

In Wasser bilden Phospholipide spontan höhermolekulare Aggregate, deren Form und Stabilität zum Einen von der chemischen Struktur und zum Anderen von äußeren Parametern wie pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur und Druck abhängen. Durch Aggregation wird der Kontakt von Wasser mit hydrophoben Alkylketten minimiert. Dieser Kontakt ist mit einem stark positiven Beitrag zum chemischen Potential $\Delta\mu^{\ominus}$ des gelösten Stoffes verknüpft und daher energetisch ungünstig. Als Modellsystem der Wechselwirkung eines hydrophoben Stoffes mit Wasser soll das System Neopentan in Wasser betrachtet werden, also die Verteilung des Neopentan zwischen Wasser und seiner eigenen Phase. Im Gleichgewicht sind die chemischen Potentiale des Neopentan (C_5H_{12}) in beiden Phasen gleich[1]:

$$\mu_{C_5H_{12}} = \mu_{H_2O}, \tag{1.1}$$

$$\Delta\mu^{\ominus} = -RT \ln \frac{c_{H_2O}}{c_{C_5H_{12}}} = -RT \ln K. \tag{1.2}$$

Die chemische Potentialdifferenz $\Delta\mu^{\ominus}$ ist positiv und nur leicht temperaturabhängig (Abb. 1.2). Auffällig dagegen ist die starke Temperaturabhängigkeit von $\Delta h^{\ominus}$ und des Terms $T\Delta s^{\ominus}$. Es gibt eine Temperatur T_h, bei der die Enthalpie $\Delta h^{\ominus}$ und eine Temperatur T_s, bei der der Term $T\Delta s^{\ominus}$ gleich null ist. Das bedeutet, dass das System bei T_h entropisch und bei T_s enthalpisch getrieben ist. Diese außergewöhnliche Temperaturabhängigkeit der chemischen Potentialdifferenz wird als hydrophober Effekt bezeichnet [67, 76].

Als ein Maß für Hydrophobizität kann die Gleichgewichtskonstante K der Verteilung des Neopentan herangezogen werden. Sie hat ein Maximum bei der Temperatur, bei der

[1] Die subindexbehafteten Größen in Gl. 1.1 und 1.2 beziehen sich auf Neopentan im vom Index angegebenen Lösungsmittel.

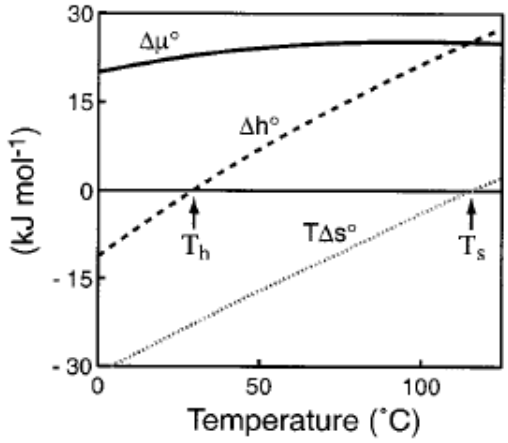

Abb. 1.2: Thermodynamik des Transfers von Neopentan aus Neopentan in Wasser [50, 76]

die Planck-Funktion $\Delta\mu^{\ominus}/T$ maximal wird. Mit Hilfe der Gleichung von Gibbs–Helmholtz kann gezeigt werden, dass dies genau bei der Temperatur T_h der Fall ist.[2] Es ist aus Abb. 1.2 somit ersichtlich, dass die Hydrophobizität von Neopentan bei Raumtemperatur am größten ist.

Der Umstand, dass die Hydrophobizität mit steigender Alkylkettenlänge steigt, zeigt, dass die Unverträglichkeit von Wasser und Alkylketten die Haupttriebkraft der Selbstaggregation von langkettigen Phospholipiden ist. Die Temperaturabhängigkeit dieser Unverträglichkeit lässt einen ausgeprägten thermotropen Polymorphismus erwarten.

Die Form der entstehenden Aggregate kann in einfacher Näherung aus der Form des Monomermoleküls abgeleitet werden. In seiner Theorie der Selbstaggregation von Kohlenwasserstoff-Amphiphilen führt Israelachvili et al. [41] einen kritischen Packungsparameter P_{kr} ein, der nach der Gleichung

$$P_{\mathrm{kr}} = \frac{V}{A_0 \cdot l_{\mathrm{c}}} \tag{1.3}$$

berechnet wird. Dabei ist V das Volumen des hydrophoben Molekülteils, l_{c} dessen Länge und A_0 der Flächenbedarf eines Moleküls an einer theoretischen Grenzfläche zwischen hydrophoben und hydrophilen Teil des Aggregates. Für einen zylindrischen Körper gilt: $P_{\mathrm{kr}} = 1$. Ein Wert größer oder kleiner eins gilt für stumpfe Kegel (Abb. 1.3). Zweikettige Phospholipide besitzen einen Wert von eins oder leicht darunter. Für solche Körper ist es energetisch günstig, zu lamellaren Doppelschichten zu aggregieren. Ist $P_{\mathrm{kr}} = 1$, so ist die Schicht nicht gekrümmt. Weicht der Wert dagegen stark von eins ab, bilden sich Mizellformationen. Diese haben die Lipid-Kopfgruppen außen ($P_{\mathrm{kr}} \ll 1$) oder sind invertiert für $P_{\mathrm{kr}} \gg 1$.

Durch mechanischen Einfluss können lamellare Strukturen gekrümmt werden, bis sie

[2] Die Gibbs-Funktion $\Delta\mu^{\ominus}$ wird dagegen bei T_s maximal.

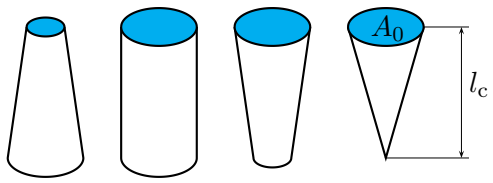

Abb. 1.3: Molekülform für Packungsparameter $P_{kr} > 1$, $P_{kr} = 1$, $1 > P_{kr} > 1/3$ und $P_{kr} = 1/3$. (von links nach rechts)

einen runden Hohlkörper formen. Diese Vesikel oder Liposomen genannten Gebilde schließen im Inneren Wasser ein. Befinden sich innerhalb eines Vesikels ein oder mehrere weitere, werden diese als multilamellare Vesikel (MLV) bezeichnet . Die Strukturen liegen in der Größenordnung von ≈400 nm. Einschalige (unilamellare) Vesikel lassen sich in verschiedenen Größen herstellen. Gewöhnlich werden diese entsprechend des Durchmessers klassifiziert und mit folgenden englischsprachigen Namen und Abkürzungen bezeichnet:

<25 nm, Small Unilamellar Vesicles (SUV);
<100 nm, Intermediate Unilamellar Vesicles (IUV);
<250 nm, Large Unilamellar Vesicles (LUV);
>250 nm, Giant Unilamellar Vesicles (GUV).

Die fehlende interlamellare Wechselwirkung führt zu unterschiedlichen Eigenschaften zwischen multilamellaren und unilamellaren Vesikeln. Weiterhin haben kleine unilamellare Vesikel aufgrund der großen Krümmung, die mit einem positiven Beitrag zur freien Enthalpie des Systems verknüpft ist, andere Eigenschaften als größere Vesikel.

1.3 Phasenverhalten

Wässrige Phospholipid-Dispersionen zeigen als binäres Mischsystem nicht nur einen thermotropen, sondern auch einen ausgeprägten lyotropen Polymorphismus. Das bedeutet, dass sie auch in Abhängigkeit des Wassergehaltes der Mischung verschiedene Phasen ausbilden. Es können lamellare, hexagonale und kubische Phasen gebildet werden, die mit den Zeichen L, H und Q abgekürzt werden. Das Symbol P steht für eine lamellare Phase, bei der die Schichten ein Zick-Zack-Profil aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit werden die hexagonalen und kubischen Phasen nicht weiter betrachtet. Die Indizes I und II werden verwendet, um normale bzw. inverse Phasen zu bezeichnen. Griechische Indizes dagegen zeigen unterschiedliche Ketten-Konformationen an: c steht für kristallin, α für fluid, β für geordnet und gelartig. Weiterhin bedeutet δ, dass die Ketten helikal verknäuelt sind und $\alpha\beta$, dass fluide und gelartige Regionen koexistieren. Interdigitierte Bischichten werden durch den Index I kenntlich gemacht.

Bei tiefen Temperaturen und/oder geringem Wassergehalt bilden die meisten Phospholipide lamellare, kristalline Phasen L_c, die Nah- und Fernordnungen in alle drei Raumrichtungen aufweisen. Je nach Lipid können pro Molekül ein oder mehrere Wassermoleküle

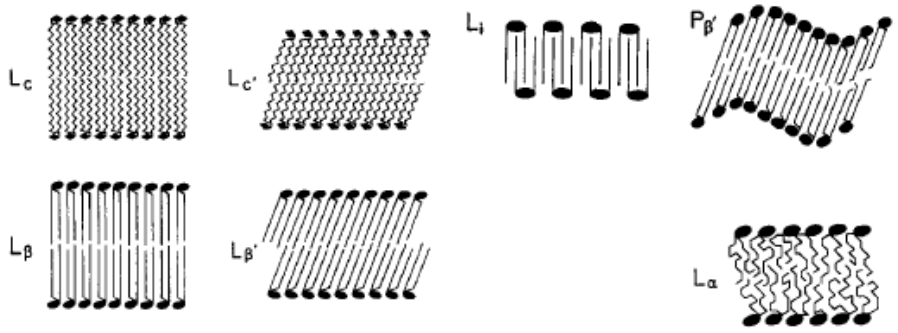

Abb. 1.4: Schematische Darstellung lamellarer Lipidphasen unterscheidlicher Ordnungsgrade [10]

kokristallisieren.

Wird eine Lipiddispersion mit hohem Wasserüberschuss aufgeheizt, so bildet sich oberhalb der Umwandlungstemperatur T_s die Gelphase L_β.[3] In dieser Phase sind die Alkylketten immer noch in der all-trans-Konformation und quasi-kristallin, jedoch ist die Ordnung der Kopfgruppen verringert. Ebenso ist die Korrelation zwischen den Schichten stark herabgesetzt oder nicht mehr existent. Bei Lipiden mit sehr großen Kopfgruppen, wie dies z. B. bei den Phosphatidylcholinen gegeben ist, sind die Ketten bezüglich der Schichtnormalen geneigt. Dadurch werden Packungsprobleme der Ketten ausgeglichen. Solche Phasen werden laut Nomenklatur mit $L_{\beta'}$ bezeichnet. Kann das erhöhte Volumen der Kopfgruppe durch Neigung nicht mehr kompensiert werden, bilden sich Phasen, bei denen die Ketten zweier gegenüberliegender Monoschichten interdigitiert sind ($L_{\beta I}$).

Viele Lipide, u.a. Phosphocholine, bilden oberhalb einer Vorumwandlungstemperatur T_p eine Rippelphase $P_{\beta'}$. Diese Gelphase hat die Besonderheit, dass die Bischichten periodische Modulationen aufweisen (Abb. 1.4). Diese Wellung könnte damit erklärt werden, dass die Ketten in bestimmten Regionen partiell schmelzen, wodurch es zu unterschiedlicher Krümmung der Oberfläche und damit zur Ausbildung der Wellenstruktur kommt [36].

Oberhalb der Hauptumwandlungstemperatur T_m bildet sich aus der Gelphase die flüssigkristalline Phase L_α. In dieser Phase sind die Ketten nicht mehr kristallin sondern aufgeschmolzen. Die Ketten befinden sich daher nicht mehr in der all-trans-Konfiguration, sondern haben einen hohen Anteil von gauche-Konformeren. Dies hat zur Folge, dass sich das Volumen pro Molekül vergrößert. Der genaue Wert hängt von der Länge der Kette ab und beträgt ungefähr 3–5 % bezogen auf die Gelphase [59].

Im Jahr 1983 veröffentlichten Grabielle–Madelmont und Perron einen Artikel [28], der ein erstes quantitatives Phasendiagramm von DPPC vorstellte, welches auf DSC-Messungen basierte. Wesentliche Linien des Diagramms (Abb. 1.5) sind die eutektischen Phasenüber-

[3] Der Begriff der Gelphase unterscheidet sich von dem Begriff des Gels, wie er in der Polymerphysik verwendet wird und dort eine dreidimensional-vernetzte Struktur bezeichnet. Auf dem Gebiet der Lipid-Forschung hat sich dieser Begriff erhalten, weil solche Phasen aufgrund der hohen Viskosität starke Ähnlichkeit mit einem Polymergel haben. Im strengen Sinne handelt es sich jedoch *nicht* um ein Gel.

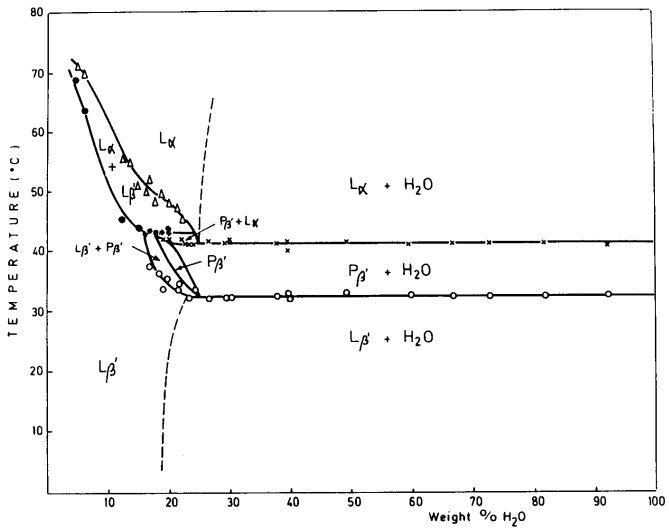

Abb. 1.5: Temperatur-Konzentrations-Phasendiagramm des DPPC-H_2O-Systems [28]

gänge bei 32,5 °C ($P_{\beta'} \rightleftharpoons L_{\beta'} + H_2O$) und 41,7 °C ($L_\alpha \rightleftharpoons P_{\beta'} + H_2O$). Sie erstrecken sich über einen weiten Konzentrationsbereich, der von 100 Ma.-% bis ungefähr 25 Ma.-% Wasser reicht. Im DSC sind sie als scharfe Peaks ersichtlich. Bei geringeren Wasseranteilen, also höheren Lipidanteilen, gibt es weitere Umwandlungen, so z.B. die peritektische Reaktion $L_{\beta'} + L_\alpha \rightleftharpoons P_{\beta'}$. Da in dieser Arbeit hauptsächling mit Lipidsuspensionen in großem Wasserüberschuss gearbeitet worden ist, soll auf diese Umwandlung nicht weiter eingegangen werden. Es ist jedoch wichtig festzuhalten, dass bei Lipidsuspensionen hoher Verdünnung die Umwandlungstemperaturen der Übergänge aufgrund des eutektischen Charakters der Reaktion über einen weiten Konzentrationsbereich *unabhängig* von der Verdünnung sind.

Die Phasenabfolge bei steigender Temperatur $L_c \rightarrow L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'} \rightarrow L_\alpha$ tritt bei allen Lipiden auf, deren Moleküle zur Schichtnormalen geneigt sind. Mit steigender Kettenlänge der Fettsäuren erhöhen sich lediglich die Umwandlungstemperaturen. Sind die Moleküle nicht geneigt, fehlt im Phasendiagramm die Rippelphase. So zeigen Phosphatidylethanolamine nur den direkten Übergang $L_\beta \rightarrow L_\alpha$. Mit der Aufklärung der Phasendiagramme in den 1980er Jahren wurde auch aufgedeckt, dass viele der soeben genannten nicht-kristallinen Phasen nur metastabil sind und auf längeren Zeitskalen eine Umwandlung in kristalline Phasen erfolgt. Dieser Umstand wurde zuerst bei den Ethanolaminen bemerkt, später aber auch für Phosphatidylcholine und einige weitere Lipide bestätigt [23, 51, 58, 69]. Besonders bei Lipiden mit kurzen Acylketten (DLPE, DLPC) macht sich diese Rekristallisation schon auf einer Stunden-Zeitskala bemerkbar.

1.4 Schwingungsspektroskopische Untersuchungen an Phospholipiden

FTIR-Spektroskopie wurde eine der Standardmethoden zur Untersuchung von Lipidphasen. Sie ist eine Technik, die Aussagen über das System auf molekularer Ebene zulässt. Dies liegt darin begründet, dass die IR-Spektroskopie eine schnelle Methode ist, deren Zeitskala in der Größenordnung von 10^{-10} s liegt. Dadurch können gleichzeitig Moleküle in unterschiedlichen Konformationszuständen beobachtet werden, da die Änderung der Konformation auf einer langsameren Skala abläuft.

Das IR-Spektrum eines Phospholipids ist sehr komplex. Wichtige beobachtbare Banden sind in Tab. 1.3 aufgeführt. Die Tabelle zeigt, dass Banden existieren, die Rückschlüsse auf den Zustand der hydrophoben Ketten zulassen ($\nu_{as}(CH_2)$, $\nu_s(CH_2)$ u. a.), oder aber Aufschluss über die Verhältnisse der hydrophilen Kopfgruppe geben (ν(C=O), $\nu_{as}(PO_2)$ u. a.). Da es sich bei der Probe jedoch um ein binäres System, bestehend aus Lipid und Wasser handelt, wobei Wasser meist im großen Überschuss vorhanden ist, können nicht alle Banden mit einem Experiment beobachtet werden, da die Absorption des Wassers (Tab. 1.4) zur Totalabsorption der IR-Strahlung in einem weiten Wellenzahlbereich führt. Als Ausweg kann statt H_2O, D_2O verwendet werden, um das experimentell zugängliche Wellenzahlfenster zu verschieben. Die Alkylketten des Lipids können aber auch perdeuteriert werden, um dessen Signale in ein Frequenzfenster zu bringen, das nicht der Totalabsorption unterliegt.

Nach Subtraktion des Spektrums des reinen Lösungsmittels (H_2O oder D_2O) wird ein Spektrum erhalten, welches nur auf die Absorption des Lipides zurückgeht. Das Lösungsmittelspektrum muss vorher durch Multiplikation mit einem Faktor um den Konzentrationsunterschied zur binären Mischung korrigiert werden. Änderungen in der Form des Lösungsmittelspektrums aufgrund von Lipid-Wasser-Wechselwirkungen müssen dabei als vernachlässigbar klein angenommen werden können [16, 82].

Das Durchlaufen der Hauptphasenumwandlung von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase ist mit einem Anstieg der Wellenzahl des Maximums und der Breite der CH_2-Schwingungsbande verknüpft [55]. Aus IR-spektroskopischen Untersuchungen langkettiger Alkane und Polymethylen-Ketten [56, 57, 73–75] ist bekannt, dass sich die Schwingungsfrequenzen der jeweiligen Konformere unterscheiden, wobei die all-trans-Kette die niedrigste Wellenzahl hat. Diese Erkenntisse wurden von verschiedenen Autoren auf Lipidphasen angewandt [9, 13, 14, 60, 61, 71]. Die Verschiebung der Banden beim Phasenübergang lässt sich demnach darauf zurückführen, dass die Ketten aufschmelzen, sich also unterschiedliche trans-gauche-Isomere bilden, die höhere Schwingungsfrequenzen haben.

Der Effekt des gleichzeitigen Auftretens verschiedener Konformere der Alkylketten in der Gelphase tritt bei den CH_2-Kippschwingungsbanden (1342–1180 cm^{-1}) deutlich hervor, die miteinander koppeln und dadurch Progressionsbanden erzeugen. So sind im Abstand von $\approx$10 cm^{-1} mehrere Banden sichtbar, die Ketten mit unterschiedlich langem alltrans-Anteil zugeordnet werden können. In Spektren, die bei Temperaturen oberhalb T_m gemessen worden sind, existieren diese Banden nicht mehr, weil die Ketten in der

Tab. 1.3: Wichtige Gruppenfrequenzen von Phospholipiden [1]. Die angegeben Wellenzahlen müssen als Richtwerte verstanden werden, da die genaue Lage der jeweiligen Bande vom chemischen System abhängt.

Wellenzahl [cm^{-1}]	Schwingung	Symbol
3028	as C–H-Valenzschwingng der CH_3-Gruppe im Cholin-Rest	$\nu_{as}(N^+–(CH_3)_3)$
2956	as C–H-Valenzschwingung der CH_3-Gruppe	$\nu_{as}(CH_3)$
2918	as C–H-Valenzschwingung der CH_2-Gruppe	$\nu_{as}(CH_2)$
2875	s C–H-Valenzschwingung der CH_3-Gruppe	$\nu_s(CH_3)$
2849	s C–H-Valenzschwingung der CH_2-Gruppe	$\nu_s(CH_2)$
2212	as C–D-Valenzschwingung der CD_3-Gruppe	$\nu_{as}(CD_3)$
2178	as C–D-Valenzschwingung der CD_2-Gruppe	$\nu_{as}(CD_2)$
2155	s C–D-Valenzschwingung der CD_3-Gruppe	$\nu_s(CD_3)$
2094	s C–D-Valenzschwingung der CD_2-Gruppe	$\nu_s(CD_2)$
1740	C=O-Valenzschwingung der Estergruppe	ν(C=O)
1470	CH_2-Scherschwingung	$\delta(CH_2)_n$
1380	s CH_3-Scherschwingung	$\delta_s(CH_3)$
1342–1180	CH_2-Kippschwingung (mit Progressionsbanden)	$\gamma_w(CH_2)_n$
1250–1220	as O–P–O-Valenzschwingung des Phosphat-Diesters	$\nu_{as}(PO_2)$
1170	as CO–O–C-Valenzschwingung der Estergruppe	ν_{as}(CO–O–C)
1086–1072	s O–P–O-Valenzschwingung des Phosphat-Diesters	$\nu_s(PO_2)$
1085	s CO–O–C-Valenzschwingung der Estergruppe	ν_s(CO–O–C)
970	as N–CH_3-Valenzschwingung der Cholingruppe	ν_{as}(C–N^+–C)
930	s N–CH_3-Valenzschwingung der Cholingruppe	ν_s(C–N^+–C)
725	CH_2-Rockingschwingung	$\gamma_r(CH_2)$
640	CD_2-Rockingschwingung	$\gamma_r(CD_2)$

s: symmetrisch; as: antisymmetrisch

flüssig-kristallinen Phase keinen längeren trans-konfigurierten Abschnitt mehr haben. Jedoch kann in dieser Phase aus den Schultern der CH_2-Kippschwingungsbanden auf die Art und Anzahl bestimmter trans-gauche-Abfolgen geschlossen werden [72, 81].

An Gelphasen wurde beobachtet, dass sich die CH_2-Scherschwingung bei 1470 cm^{-1} aufspaltet, da die Übergangsdipolmomente benachbarter Ketten koppeln können. Anhand der Lage der beiden Bande kann zwischen trikliner, orthorhombischer und hexagonaler Packung der Alkylketten unterschieden werden [8].

Die Lage der C=O-Valenzschwingung lässt Rückschlüsse auf die Hydratisierung der Kopfgruppe zu. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen schwächt die C=O-Doppelbindung, so dass sich deren Kraftkonstante und damit die Schwingungswellenzahl verringert. Die äußere Form der Bande lässt auf die Existenz mehrerer Komponenten schließen. Als Ursache dafür wurden unterschiedliche Grade der Hydratisierung ausge-

Tab. 1.4: IR-Banden der Lösungsmittel H_2O und D_2O [82]

	Wellenzahl [cm^{-1}]	Schwingung	Symbol
	3840	Kombination von $\nu_s(D_2O)$ und $\delta(D_2O)$	$\nu_s(D_2O)+\delta(D_2O)$
≈	3600	as H–O–H-Valenzschwingung	$\nu_{as}(H_2O)$
≈	3450	s H–O–H-Valenzschwingung	$\nu_s(H_2O)$
	3404	O–H-Valenzschwingung von HOD	ν(OH)
≈	3250	Oberton der $\delta(H_2O)$-Schwingung	$2\delta(H_2O)$
≈	2600	as D–O–D-Valenzschwingung	$\nu_{as}(D_2O)$
≈	2500	s D–O–D-Valenzschwingung	$\nu_s(D_2O)$
≈	2400	Oberton der $\delta(D_2O)$-Schwingung	$2\delta(D_2O)$
	2128	Kombination aus der Librations- und der $\delta(H_2O)$-Schwingung	$\nu_L(H_2O)+\delta(H_2O)$
	1644	H–O–H-Biegeschwingung	$\delta(H_2O)$
	1555	Kombination aus der Librations- und der $\delta(D_2O)$-Schwingung	$\nu_L(D_2O)+\delta(D_2O)$
	1462	H–O–D-Biegeschwingung	δ(HOD)
	1209	D–O–D-Biegeschwingung	$\delta(D_2O)$
	800–500	Librationsschwingung, eine Schwingung unter Beteiligung mehrerer Moleküle	$\nu_L(H_2O)$

s: symmetrisch; as: antisymmetrisch

macht, wobei die Zugänglichkeit der Estergruppe der *sn*-1- und *sn*-2-Kette für Wasser unterschiedlich ausfällt [3, 53].

Ebenfalls sensitiv auf Änderungen der Hydratation reagieren die $\nu(PO_2)$-Banden, jedoch fallen die Änderungen während der Hauptphasenumwandlung gering aus. Bei Phosphatidylcholinen zeigen sich die stärksten Änderungen jedoch während der Vorumwandlung, bei der die Bandenfrequenz um 2–3 cm^{-1} steigt [63]. Ungewöhnlich niedrige Frequenzen der Banden werden bei DMPE und DMPG gefunden. Bei diesen Lipiden gibt es eine intermolekulare Wechselwirkung zwischen der Phosphat- und der endständigen NH_3^+-Gruppe des DMPE, bzw. OH-Gruppe des DMPG, die sich auf die Bandenlage ähnlich auswirkt wie eine Hydratisierung [38, 52].

2 Phasenübergänge

2.1 Die Thermodynamik von Phasenübergängen

Die für die Thematik benötigten thermodynamischen Betrachtungen wurden 1980 in einem Artikel [33] von Gruenewald et al. durchgeführt. Die Autoren führen aus, dass sich die Phasenumwandlung gut durch den Umwandlungsgrad θ beschreiben lässt, der für den Fall einer einfachen Umwandlung $A \rightleftharpoons B$ von der Gleichgewichtskonstanten K abhängt:

$$\theta = \frac{K}{1+K}. \tag{2.1}$$

Der Umwandlungsgrad muss eine Funktion von Druck p und Temperatur T sein, da dies nach den Gleichungen von van't Hoff auch für die Gleichgewichtskonstante K zutrifft:

$$K(T) = K_{T_\mathrm{m}} \cdot \exp\left[\frac{-\Delta H_\mathrm{v.H.}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_\mathrm{m}}\right)\right], \tag{2.2}$$

$$K(p) = K_{p_0} \cdot \exp\left[-\frac{\Delta V_\mathrm{v.H.}}{RT}\left(p - p_0\right)\right]. \tag{2.3}$$

Dabei sind $\Delta H_\mathrm{v.H.}$ die van't Hoff-Enthalpie, bzw. $\Delta V_\mathrm{v.H.}$ das van't Hoff-Volumen.

Die Kombination der Gleichungen 2.1 und 2.2 ergibt für $\theta(T)$ die Beziehung

$$\theta(T) = \frac{K_{T_\mathrm{m}}}{K_{T_\mathrm{m}} + \exp\left[\frac{-\Delta H_\mathrm{v.H.}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_\mathrm{m}}\right)\right]}, \tag{2.4}$$

die in Abb. 2.1 schematisch dargestellt ist. Da die Lipidphasenumwandlungen keine Übergänge einer reinen 1. Ordnung sind, ändert sich die Funktion $\theta(T)$ bei der Umwandlungstemperatur T_m nicht sprunghaft, sondern hat bei T_m einen endlichen Anstieg. Weil sich das Molvolumen von Lipidphasen bei der Umwandlung vergrößert, $\Delta V_\mathrm{v.H.}$ also einen positiven Wert hat, verschiebt sich die $\theta(T)$-Kurve gemäß Gl. 2.3 bei größeren Drücken zu höheren Temperaturen. Für Relaxationsexperimente ist die Änderung des Umwandlungsgrades mit dem sich sprunghaft ändernden externen Parameter von Interesse. Die Gleichungen 2.5 und 2.6 beschreiben dies.

$$\left(\frac{\partial\theta}{\partial T}\right)_p = \Gamma \cdot \left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \Gamma \cdot \frac{\Delta H_\mathrm{v.H.}}{RT^2} \tag{2.5}$$

$$\left(\frac{\partial\theta}{\partial p}\right)_T = \Gamma \cdot \left(\frac{\partial \ln K}{\partial p}\right)_T = -\Gamma \cdot \frac{\Delta V_\mathrm{v.H.}}{RT} \tag{2.6}$$

Zur Vereinfachung wurde die Ableitung dabei $\partial\theta/\partial \ln K = \Gamma$ gesetzt, wobei Γ Amplitudenfaktor genannt wird. Die Kombination der Gleichungen 2.5 und 2.6 ergeben eine Beziehung zur Vergleichbarkeit von Drucksprung- und Temperatursprung-Experiment:

$$\left(\frac{\partial\theta}{\partial p}\right)_T = -\left(\frac{\partial\theta}{\partial T}\right)_p \cdot \underbrace{\frac{T \cdot \Delta V_{\text{v.H.}}}{\Delta H_{\text{v.H.}}}}_{=\left(\frac{\partial T}{\partial p}\right)_\theta}. \tag{2.7}$$

Die Gleichung 2.7 ist nützlich, um aus der Messung temperaturinduzierter Phasenübergänge Voraussagen über druckinduzierte Phasenübergänge zu machen. Ihr letzter Term entspricht der reziproken Clausius–Clapeyron-Beziehung. Die Amplitude $\Delta\theta$, welche sich unter isothermen Bedingungen bei einem Sprung von einem höheren Druck p_2 zu einem niedrigeren Druck p_1 ergeben würde, ist in Abb. 2.1 als blaue Kurve eingezeichnet. Sie hat ein Maximum bei einer Temperatur, die zentriert zwischen $T_{\text{m}}^{p_1}$ und $T_{\text{m}}^{p_2}$ liegt. Der blaue Pfeil repräsentiert den Sonderfall, bei dem der Endpunkt der Relaxation genau bei $T_{\text{m}}^{p_1}$ liegt. Bei dieser Temperatur erreicht die Relaxationszeit τ ein Maximum. Auf diese kinetischen Aspekte soll im Detail in Kap. 2.2.3 eingegangen werden.

Da sich bei einem Drucksprung-Experiment der Druck schneller ändert als die Wärme vom System abgeführt oder aufgenommen werden kann, muss Gl. 2.7 noch um einen adiabatischen Term ergänzt werden:

$$\left(\frac{\partial\theta}{\partial p}\right)_S = -\left(\frac{\partial\theta}{\partial T}\right)_p \cdot T\left(\frac{\Delta V^{\ominus}}{\Delta H_{\text{cal}}} - \frac{\alpha_p}{\rho c_p}\right). \tag{2.8}$$

Dabei stellt α_p in Gl. 2.8 den thermischen Ausdehnungskoeffizienten, ρ die Dichte und c_p die spezifische Wärmekapazität dar. Im Experiment würde sich die Temperaturänderung durch eine zusätzliche Änderung der Amplitude bemerkbar machen. Der blaue Pfeil in Abb. 2.1 würde damit nicht mehr senkrecht stehen, sondern leicht schräg bei einer geringeren Temperatur enden. Bei einer Abschätzung mit konkreten Werten fanden Gruenewald et al. heraus, dass sich die Amplitude dadurch nur um 10 % ändert [33].

Unter der Annahme, dass bei einem einfachen System mit zwei Zuständen gilt

$$\Gamma = \frac{\partial\theta}{\partial \ln K} = \theta(1-\theta), \tag{2.9}$$

wobei $\Gamma_{\text{m}} = 0{,}25$ bei $\theta(T_{\text{m}}) = 0{,}5$ ist, kann man anhand Gl. 2.5 erkennen, dass der Anstieg der $\theta(T)$-Funktion bei T_{m} unmittelbar mit $\Delta H_{\text{v.H.}}$ verknüpft ist. Das Verhältnis der van't Hoff-Größen $\Delta H_{\text{v.H.}}$ und $\Delta V_{\text{v.H.}}$ zu den molaren Größen ΔH_{cal} und $\Delta V^{\ominus}$, die durch kalorimetrische bzw. densimetrische Messungen zugänglich sind, wird als kooperative Einheit N bezeichnet. Es gilt:

$$N = 4\Gamma_{\text{m}} = \frac{\Delta H_{\text{v.H.}}}{\Delta H_{\text{cal}}} = \frac{\Delta V_{\text{v.H.}}}{\Delta V^{\ominus}}. \tag{2.10}$$

Die kooperative Einheit gilt als Maß der Kooperativität des Phasenüberganges [34, 79]. Für einen Übergang 1. Ordnung ist $N = \infty$, für eine total unkooperative Umwandlung

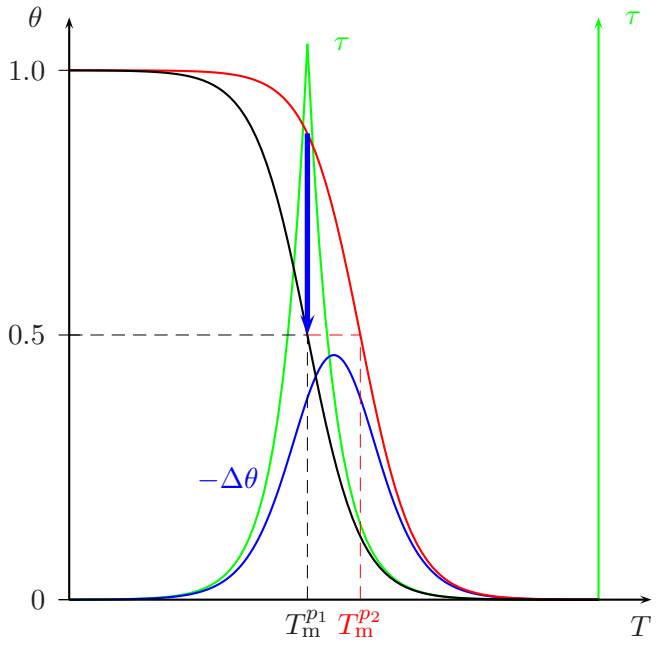

Abb. 2.1: Abhängigkeit des Umwandlungsgrades θ von der Temperatur T bei zwei verschiedenen Drücken $p_1 < p_2$ (schwarze und rote Kurve). Die blaue Kurve entspricht dem $\Delta\theta$ einer isothermen Phasenumwandlung, die durch Änderung des Druckes von p_2 auf p_1 induziert wurde. Der blaue Pfeil repräsentiert die Amplitude der Temperatur $T_m^{p_1}$, bei der die Relaxationskonstante τ (grüne Kurve, rechte Ordinate) ein Maximum hat (Kap. 2.2).

gilt $N = 1$. Sie kann aus kalorimetrischen Messungen berechnet werden. Zur Bestimmung von $\Delta H_{\text{v.H.}}$ nach Gl. 2.5 muss die DSC-Kurve integriert, normiert und der Anstieg der Kurve bei $\theta = 1/2$ bestimmt werden. Dabei muss sichergestellt sein, dass die Kurve nicht durch apparative Einflüsse verbreitert ist [21, 79].

2.2 Die Kinetik von Phasenübergängen

2.2.1 Die Theorie der Relaxationskinetik

Die Theorie der Relaxationskinetik soll am Beispiel der einfachen isomeren Umwandlung $A \rightleftharpoons B$ erläutert werden. Es wird davon ausgegangen, dass sich das System im Gleichgewicht befindet und zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ durch sprunghafte Änderung eines externen Parameters (Druck, Temperatur, elektrisches Feld) gestört wird. Die Störung soll als unendlich schnell angenommen werden (Rechteckfunktion). Die Ausgangskonzentrationen $[A]_0$ und $[B]_0$ zum Zeitpunkt t_0 entsprechen dabei den Gleichgewichtskonzentrationen des alten Zustandes. Im weiteren Verlauf relaxiert das System, bis die neuen Gleichgewichtskonzentrationen $\overline{[A]}$ und $\overline{[B]}$ erreicht sind. Die Abweichung x vom Gleichgewichtszustand

– unter der Annahme, dass $[A]_0 > \overline{[A]}$ und $[B]_0 < \overline{[B]}$ sei – ist somit gegeben durch

$$x = [A] - \overline{[A]} = \overline{[B]} - [B]. \tag{2.11}$$

Das differentielle Zeitgesetz des genannten Mechanismus lautet

$$-\frac{\mathrm{d}[A]}{\mathrm{d}t} = \frac{\mathrm{d}[B]}{\mathrm{d}t} = k_1[A] - k_{-1}[B], \tag{2.12}$$

wobei k_1 und k_{-1} die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion des genannten Mechanismus bezeichnen. Wird in Gl. 2.12 für die Konzentrationen $[A]$ und $[B]$ die Größe x entsprechend der Gl. 2.11 eingeführt, ergibt sich:

$$\begin{aligned} -\frac{\mathrm{d}(x - \overline{[A]})}{\mathrm{d}t} &= k_1(x + \overline{[A]}) - k_{-1}(\overline{[B]} - x) \\ -\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t} &= \underbrace{(k_1 + k_{-1})}_{=1/\tau} x + \underbrace{k_1\overline{[A]} - k_{-1}\overline{[B]}}_{=0} \\ -\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t} &= \frac{1}{\tau}x. \end{aligned} \tag{2.13}$$

Die zeitliche Änderung der Abweichung verhält sich demzufolge proportional zur Auslenkung selber. Die Integration der Gl. 2.13 ergibt

$$x(t) = x(t_0)\exp(-t/\tau). \tag{2.14}$$

Für den Fall einer mehrstufigen Relaxation ergibt sich für die Gl. 2.13 ein Satz gekoppelter Differentialgleichungen, deren Lösung eine Summe von Exponentialtermen ist (Gl. 2.15).

$$x(t) = \sum_i x_i(t_0)\exp(-t/\tau_i) \tag{2.15}$$

In der Praxis können die Konstanten τ_i bestimmt werden, wenn sie sich bei gleicher Amplitude x_i mindestens um den Faktor vier unterscheiden.

Diese soeben beschriebene Herleitung gilt in der Theorie unter der Annahme einer unendlich schnellen Änderung des externen Parameters. In der Praxis gilt sie näherungsweise, wenn die Dauer der Sprungfunktion gegenüber der Relaxationszeit τ des zu beobachtenden Prozesses vernachlässigbar ist. Umgekehrt gilt: Ist τ sehr viel kleiner als die Sprungdauer, existiert kein Ungleichgewichtszustand und die Methode kann nicht auf das System angewendet werden. Für Fälle, die zwischen diesen beiden Extrema liegen, muss die Antwort des Systems auf die Sprungfunktion mit eingerechnet werden. Die gemessene Antwort $(L * R)(t)$ ist dann die Faltung[1] der Relaxationsantwort $L(t)$ mit der Sprungfunktion $R(t)$ nach dem Faltungstheorem (Gl. 2.16).

$$(L * R)(t) = \int_0^t L(z)R(t - z)\,\mathrm{d}z \tag{2.16}$$

[1] Der Faltungsoperator wird durch das Symbol „$*$“ repräsentiert.

2.2.2 Kinetische Untersuchungen an Lipidphasen

Die ersten Untersuchungen zur Kinetik der Phasenumwandlungen von Phosphatidylcholinen stammen aus dem Jahr 1971 und wurden von Träuble [79] mit der Temperatursprung-Methode, realisiert durch joulesches Heizen, durchgeführt. Die Relaxation wurde durch das Fluoreszenzsignal des beigemischten t-Anilino-8-naphthalinsulfonats (ANS) verfolgt. Der Autor beschreibt das Auftreten *eines* Relaxationsprozesses, welcher bei der Temperatur der Umwandlungsmitte T_m am langsamsten verläuft. Die Zeitkonstanten τ bei dieser Temperatur liegen bei 12 ms für DMPC und 1,2 s für DPPC. Dagegen konnte Gruenewald bis zu *drei* Relaxationsprozesse unterscheiden [32]. Er fand, unter Benutzung mehrerer, verschiedener Fluoreszenz-Sonden, jedoch das gleiche Temperaturverhalten von τ mit einem Maximum bei T_m. Tsong und Kanehisa [80] verwendeten die Messung der optischen Trübung als Detektionsmethode. Dadurch ist die Fluoreszenz-Sonde unnötig, deren Einfluss auf das zu untersuchende System unbekannt ist. Die Autoren berichteten von zwei auflösbaren kinetischen Prozessen in der Größenordnung von Millisekunden und Sekunden.

Eine Verbesserung der Zeitauflösung der Temperatursprung-Methode wurde durch die Verwendung eines Iod-Lasers erreicht. Die Lösung erwärmt sich durch Photonenabsorption des Wassers. Aufgrund der kurzen Lebensdauer der so angeregten Zustände wird die Zeitauflösung lediglich durch die Dauer des Laserpulses bestimmt, die bei den Experimenten von Genz und Holzwarth [26] im Intervall von 100 ps bis 2 µs einstellbar war. Weiterhin treten, im Gegensatz zur Methode des jouleschen Heizens, keine starken elektrischen Felder auf, welche die Vesikel bersten lassen und damit zusätzliche, unerwünschte Kinetiken auslösen. Als Detektionsmethode wurde Trübungs- aber auch Floureszensmessung speziell markierter Lipidmoleküle gewählt.

Die Messungen an DMPC [26, 31] und DPPC [27] zeigten bis zu fünf auflösbare Relaxationsprozesse mit Zeitkonstanten im Bereich von Nano- bis Millisekunden. Alle Prozesse zeigten das schon von anderen Autoren gefundene Temperaturverhalten der Relaxationskonstanten mit einem Maximum bei T_m. Die Prozesse unterschieden sich jedoch hinsichtlich ihrer Kooperativität, die bei den schnelleren Prozessen nur sehr schwach ausgeprägt ist. Die Autoren führten die schnellen, nicht-kooperativen Prozesse auf Umordnungen der zuvor all-trans geordneten Acylkette („Kinkenbildung“) und eine Membranexpansion zurück (Abb. 2.2). Die Zeitkonstanten dieser Vorgänge lagen im Nano- bzw. Mikrosekundenbereich. Die sich anschließenden konzertierten Abläufe beinhalteten die Bildung weiterer gauche-Konformere sowie den Abbau der Cluster der alten Phase.

Mit der Drucksprung-Methode sind, wenn die Berstmembran-Technik verwendet wird (Kap. 3.3), nur Prozesse bis in den Mikrosekunden-Bereich zugänglich. Sie ist jedoch, neben der Laser-Temperatursprungmethode, eine weitere Alternative, um die dielektrischen Nebeneffekte des jouleschen Heizens zu umgehen. Die Apparatur von Gruenewald et al. [33] hatte eine Totzeit von 100 µs, so dass die von Genz und Holzwarth beobachteten schnellen nicht-kooperativen Prozesse nicht beobachtbar waren. Die Autoren berichteten von *zwei* auflösbaren Relaxationsvorgängen an DMPC und DPPC, die durch Messung der Trübung detektiert wurden. Schnellere Prozesse existierten, jedoch waren aufgrund der

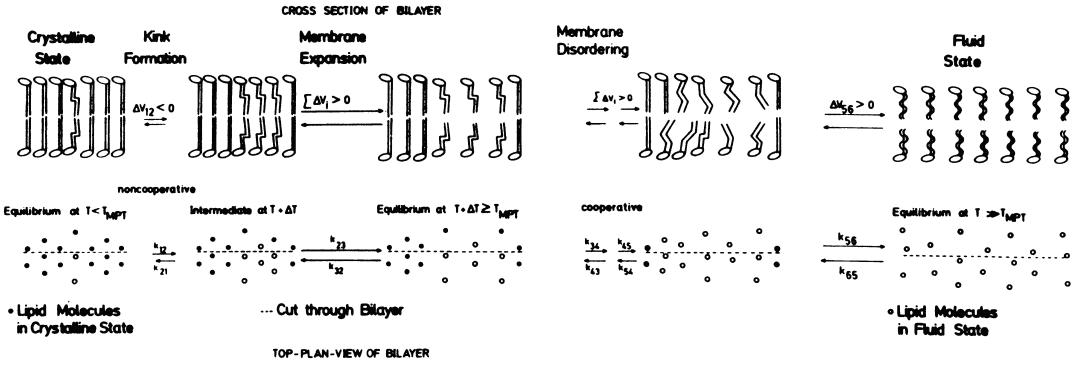

Abb. 2.2: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Lipid-Phasenumwandlung nach Eck und Holzwarth [17]

Totzeit der Apparatur nur deren Amplituden bestimmbar.

Ebenso wurden mit der gleichen Apparatur Phosphatidsäure-Vesikel untersucht [18]. Elamrani und Blume berichteten von (im Vergleich zu den Phosphatidylcholinen) um den Faktor 2–6 verlangsamten Kinetiken, so dass ein dritter Prozess zeitlich aufgelöst werden konnte. Alle Teilrelaxationen sind kooperativ, d. h. sie zeigen die typische Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstante τ mit einem Maximum bei T_m.

Bezüglich der Phosphatidsäuren ist bekannt, dass die Phasenumwandlungstemperatur T_m stark pH-abhängig ist und sich über einen weiten pH-Bereich mit zunehmender Protonierung der Kopfgruppe erhöht [2]. Dieser Umstand wurde von Elamrani und Blume ausgenutzt, um den Phasenübergang auch durch einen pH-Sprung zu induzieren und zeitaufgelöst zu verfolgen [19]. Dazu wurden in einer Stopped-Flow-Apparatur zu der Vesikellösung H^+- oder OH^--Ionen zugemischt und die Trübung über die Zeit beobachtet. Im Gegensatz zum Drucksprung-Experiment mit konstantem pH-Wert wird das zu untersuchende System komplexer, da sich in der Lösung zwei unterschiedlich geladene Lipid-Spezies befinden ($DMPA^-$ und $DMPA^{2-}$). Zwar ist die Protonierungs- bzw. Deprotonierungsreaktion diffusionskontrolliert, d. h. sehr schnell, jedoch muss die Kinetik der Permeation der Ionen in das Innere der Vesikel berücksichtigt werden. Weiterhin unterscheiden sich die Zeitkonstanten der Gel–Fluid-Umwandlung für $DMPA^-$ und $DMPA^{2-}$. Auch mit der pH-Sprung-Methode fanden Elamrani und Blume *drei* auflösbare kooperative Relaxationsvorgänge, allerdings können diese wegen der Unterschiedlichkeit der Methoden nicht mit denen des Drucksprung-Experimentes verglichen werden. Aus der Summe ihrer Ergebnisse schlussfolgerten die Autoren, dass die Keimbildung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Umwandlung sei.

In einer umfangreichen Arbeit stellten Erbes et al. [22] Ergebnisse von Drucksprung-Untersuchungen, detektiert mit Synchrotron-Strahlung, an Phosphatidylcholinen und Phosphatidylethanolaminen sowie Mischungen unterschiedlicher Lipide vor. Die Autoren untersuchten sowohl lamellar–lamellar-Übergänge als auch Umwandlungen lamellar–hexagonaler Art. Ihre Untersuchungen, deren Zeitauflösung auf einer Skala von 10^{-3} s

bis 1 s angesiedelt war, stellen das Verhalten des Wassers im lyotropen System in den Vordergrund. Zwar gäbe es eine Mehrprozesskinetik im ms-Bereich, die Keimbildungs- und Keimwachstumsschritten zuzuordnen sei, jedoch sei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Wasserfluss [22, S. 160]:

> „In most cases the rate of the transition is limited by the transport and redistribution of water into and in the new lipid phase, rather than being controlled by the time required for a rearrangement of the lipid molecules."

Diese Schlussfolgerung beruht auf der Messung der Gitterkonstanten α, die sich auf einer zweistelligen Sekundenskala ändert. Die Erkenntnis dieser Arbeit von Erbes et al. unterscheidet sich daher *methodenbedingt* von denen aller anderen bisher aufgeführten Artikel.

Die Röntgenstreumethode wurde auch bei Messungen von Seddon et al. [70] eingesetzt, um lamellar–hexagonal-Übergänge von Lipidphasen, z. T. auch in Mischung mit Fettsäuren, zu untersuchen. Der Autor unterstützt den Aufbau einer Drucksprung-Relaxationsapparatur mit Mikrosekundenauflösung am Diamond-Synchrothron in Großbritannien [40]. Dies zeigt, dass das Interesse an dieser Methode weiterhin sehr hoch ist.

Langsame Relaxationsvorgänge mit Zeitkonstanten im Sekundenbereich wurden auch von Grabitz et al. beobachtet [29]. Die Autoren kombinierten die Drucksprung-Technik mit der Mikrokalorimetrie als Detektionsmethode. Der apparative Aufbau wurde derart gestaltet, dass sich die Probe und die Referenz in Edelstahlkapillaren befanden, welche dann in die entsprechenden Kammern eines Flüssigkeitskalorimeters eingeführt wurden. Dadurch konnten Drucksprünge von 40 bar (und mehr) realisiert werden, die im Falle des direkten Komprimierens der Zellen das Kalorimeter zerstört hätten.

Das gemessene Signal kann mathematisch als die Faltung des Wärmesignals der Phasenumwandlung mit der Wärmeleitfunktion des Kalorimeters verstanden werden. Zur Bestimmung der Relaxationskonstanten τ wurde das kinetische Modell (die Autoren verwendeten lediglich eine monoexponentielle Funktion) mit der Antwortfunktion des Kalorimeters analytisch gefaltet und dann in einer nichtlinearen Regressionsanalyse verwendet.

Die Zeitkonstanten τ zeigen kooperatives Verhalten mit einem Maximum bei T_m. Für multilamellare Vesikel von DMPC und DPPC haben die langsamsten Umwandlungen eine Zeitkonstante τ von $\approx$30 s. Für große unilamellare Vesikel von DPPC sinkt diese auf ein Zehntel des Wertes. Die Autoren vermuteten Krümmungseffekte der Membran als Ursache für diesen großen Unterschied. Bemerkenswert an dieser Arbeit ist nicht nur die Tatsache, dass wiederum sehr langsame Prozesse mit Zeitkonstanten der Größenordnung 10^1 s gefunden wurden, sondern auch der Umstand, dass dieser langsame Prozess die volle bzw. einen Großteil der Gesamtamplitude beanspruchte. Dies steht im starken Widerspruch zu den frühen Arbeiten aus den 1970er und 1980er Jahren, bei denen die langsameren Prozesse einen immer geringeren Anteil an der Gesamtamplitude der Umwandlung hatten [18, 19, 26, 27, 32, 33].

Boehm et al. führten ebenfalls Drucksprungkalorimetrie-Experimente durch [5], jedoch mit viel kleineren Druckunterschieden (3 bar), da die Probe direkt in der Zelle komprimiert wurde. Die Autoren fanden ebenfalls *einen* Relaxationsprozess, dessen Zeitkonstante τ (wie auch bei Grabitz et al. [29]) bei DMPC, DPPC und DSPC einen Wert von $\approx$30 s hat. Die Autoren mutmaßten aufgrund der Tatsache, dass die Zeitkonstante unabhängig von der chemischen Struktur ist, dass es sich bei diesem Prozess um Wasserumlagerungen handeln könnte.

2.2.3 Theoretische Beschreibungsansätze

Als klassischer Ansatz zur Berechnung der Kinetik von Lipidphasen-Umwandlungen gilt das Cluster-Modell von Kanehisa und Tsong [46]. Der Begriff des „Clusters“ wurde jedoch schon lange vorher in der Physik kondensierter Materie verwendet [25]. Fisher führte das Ising-Modell in die Cluster-Theorie ein [24] und lieferte damit die Grundlage, die Kanehisa und Tsong auf Lipidphasen anwandten.

Die Lipidmembran wird in der Modellvorstellung auf ein zweidimensionales Spin-Gitter reduziert. Die Spins können zwei Zustände annehmen und repräsentieren damit die fluide Phase F und die Gelphase S. Beide Zustände unterscheiden sich in der Enthalpie ϵ und der Entropie α. Ein Cluster ist somit als eine Mikrodomäne nichtdominierender Spins gleichen Zustandes definiert. Bei Temperaturen unterhalb T_m sind also die F-Spins in der Unterzahl und können einen Cluster bilden, der aus einer Spinanzahl l besteht. Der Umfang s gibt an, wie viele Spins den Cluster zur Umgebung abgrenzen. Es wird angenommen, dass das Wachstum oder das Schrumpfen eines Clusters nur durch Spinumkehr an dieser Grenze stattfinden kann. Trotzdem können die Cluster aus entropischen Gründen im Inneren „Defekte“, d.h. entgegengesetzt ausgerichtete Spins, beinhalten. Die Cluster-Verteilungsfunktion $n_l(l)$ gibt an, wieviele Cluster der jeweiligen Größe l vorhanden sind.

Die Dynamik des Systems kann durch die gemittelte Cluster-Konzentration $\overline{n}_l(t) = \langle n_l^\alpha(t)\rangle_\alpha$ beschrieben werden, deren zeitliche Ableitung nach weiterer Bearbeitung die Form

$$\frac{\mathrm{d}\overline{n}_l(t)}{\mathrm{d}t} = \overline{f}_{l-1}\overline{n}_{l-1}(t) - (\overline{f}_l + \overline{b}_l)\overline{n}_l(t) + \overline{b}_{l+1}\overline{n}_{l+1}(t) \tag{2.17}$$

hat, was dem Zeitgesetz des kinetischen Schemas

$$\ldots \rightleftharpoons (l-1) \rightleftharpoons l \rightleftharpoons (l+1) \rightleftharpoons \ldots \tag{2.18}$$

entspricht, wobei f_i die Geschwindigkeitskonstante eines Wachstums– und b_i die Geschwindigkeitskonstante eines Abbauschrittes darstellt. Die Lösung der Differentialgleichung (2.17) lautet:

$$\overline{n}_l(t) = \overline{n}_l(\infty) + \sum_{j=1}^{l_\mathrm{max}} c_l^j \exp(-\lambda_j t). \tag{2.19}$$

Die Eigenwerte λ_j entsprechen dem Reziproken der Relaxationskonstanten τ_j:

$$\tau_j = 1/\lambda_j. \tag{2.20}$$

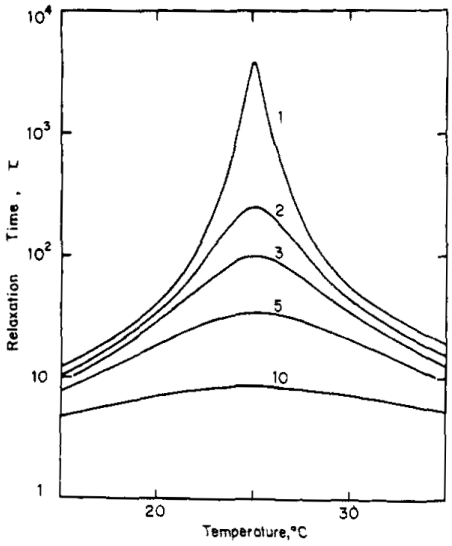

Abb. 2.3: Temperaturabhängigkeit der Relaxationskonstanten τ_j nach Gl. 2.19 für $l_{\max} = 30$ und $T_\mathrm{m} = 25\,^\circ\mathrm{C}$ [46]. Die Zahlen stehen für die entsprechende Nummer des Eigenwertes. (siehe Text)

Die Relaxationskonstanten zeigen eine starke Temperaturabhängigkeit mit einem Maximum bei T_m, der Temperatur des Mittelpunktes der Umwandlung (Abb. 2.3). Der langsamste Prozess ist die Nukleation, also die Bildung eines Keimes der neu entstehenden Phase. Die Keimwachstumsschritte sind dagegen sehr viel schneller. Das Modell liefert also ein Spektrum von Relaxationszeiten mit einer Abstufung der Zeitkonstanten um 0,5 bis einer Größenordnung.

Während das Cluster-Modell von Kanehisa und Tsong einen kinetischen Ansatz verfolgt, stellen Grabitz et al. [29] ein Modell vor, welches von thermodynamischen Grundsätzen ausgeht. Sie wählen das Fluktuations-Dissipations-Theorem, welches die Wärmekapazität c_p mit den Fluktuationen der Enthalpie H des Systems verknüpft:

$$c_p = \frac{\overline{H^2} - \overline{H}^2}{RT^2}. \tag{2.21}$$

Die Autoren nehmen eine Gauss-Verteilung der Enthalpien um den Gleichgewichtswert an, eine Näherung, die für hinreichend große Systeme mit großem Abstand vom kritischen Punkt gerechtfertigt ist. Der Zähler in Gl. 2.21 entspricht dabei dem Quadrat der Verteilungsbreite σ:

$$\sigma^2 = \overline{H^2} - \overline{H}^2. \tag{2.22}$$

Die Fluktuationen wurden durch Monte-Carlo-Simulation an einem zweidimensionalen Ising-Gitter berechnet [42]. Der Fluss J der Enthalpie zurück zum Gleichgewicht ist durch

die phänomenologische Gleichung

$$J = L \cdot X$$
$$\frac{\mathrm{d}(H - \overline{H})}{\mathrm{d}t} = L \cdot X(H - \overline{H}) = -L \cdot \frac{H - \overline{H}}{T\sigma^2} \tag{2.23}$$

gegeben, wobei X die das System rücktreibende Kraft ist und L ein phänomenologischer Koeffizient, der X mit dem Fluss J linear verknüpft. Damit ist das Zeitverhalten der Relaxation durch das Exponentialgesetz 1. Ordnung

$$(H - \overline{H})(t) = (H - \overline{H})(0) \cdot \exp(-\underbrace{\frac{L}{T\sigma^2}}_{=1/\tau} \cdot t) \tag{2.24}$$

gegeben. Unter Berücksichtigung von Gl. 2.22 und Gl. 2.21 gilt damit für die Relaxationskonstante τ:

$$\tau = \frac{RT^3}{L} c_p. \tag{2.25}$$

Die Zeitkonstante τ ist demzufolge proportional zu c_p. Die Temperaturabhängigkeit von τ wird folglich durch die Funktion $c_p(T)$ dominiert, die ein Maximum bei T_m hat. In diesem Punkt stimmen die Modelle von Grabitz et al. sowie Kanehisa und Tsong überein. Sie unterscheiden sich jedoch dahin gehend, dass das Modell von Grabitz et al. nur einen einzigen Relaxationsprozess liefert, obwohl zum gegenwärtigen Stand der Forschung experimentell mehrere Prozesse bestätigt worden sind. (Kap. 2.2.2)

3 Instrumentelle Methoden

3.1 Zeitaufgelöste Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Da sich die FTIR-Spektroskopie als methodische Variante der IR-Spektroskopie seit den 1970er Jahren als Standardmethode etabliert hat, soll in diesem Abschnitt lediglich auf die Besonderheit der zeitaufgelösten FTIR-Spektroskopie eingegangen werden. Im Zentrum der FTIR-Spektroskopie steht das Interferogramm, eine am Detektor gemessene Intensität eines IR-Strahls, die aufgrund des Durchgangs des Strahles durch ein Interferometer in Abhängigkeit der Interferometer-Spiegelposition systematische Auslöschung oder Verstärkung aufweist. Mit Hilfe der Fouriertransformation erhält man ein Spektrum und damit die Information über die Absorption bestimmter Frequenzen des Lichtes durch die Probe. Spektrum und Interferogramm enthalten dabei die gleichen Informationen.

Um zeitaufgelöste Interferogramme messen zu können, existieren zwei Möglichkeiten: die Step-Scan- und die Rapid-Scan-Methode. Bei der Rapid-Scan-Technik werden fortlaufend Interferogramme gemessen, im Gegensatz zur Step-Scan-Methode, bei der für jede Spiegelposition nacheinander die Intensität als Funktion der Zeit aufgezeichnet wird (Abb. 3.1). Während die Zeitauflösung des Systems bei der letzteren Möglichkeit nur vom Zeitverhalten der Elektronik und des Detektors bestimmt wird und damit sehr schnell sein kann ($< 10^{-6}\,\mathrm{s}$), hängt sie im Rapid-Scan-Modus von der Dauer der Messung eines ganzen Interferogrammes ab. Die Zeitauflösung verbessert sich demnach, wenn das Interferogramm mit hoher Spiegelgeschwindigkeit gemessen wird und aus einer geringen Punktzahl besteht.

Nach dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem (Gl. 3.1) muss die Abtastfrequenz $\tilde{\nu}_{\mathrm{abtast}}$ mindestens doppelt so groß wie die obere Bandfrequenz $\tilde{\nu}_{\mathrm{max}}$ sein. Die Punktdichte des Interferogramms erhöht sich dementsprechend mit einer steigenden oberen Grenzfrequenz $\tilde{\nu}_{\mathrm{max}}$. Die maximale Auslenkung des Interferometerspiegels d_{max} bestimmt dabei die spektrale Auflösung des Spektrums (Gl. 3.2).

$$\tilde{\nu}_{\mathrm{abtast}} \geq 2\tilde{\nu}_{\mathrm{max}} \tag{3.1}$$

$$\Delta\tilde{\nu} = (2d_{\mathrm{max}})^{-1} \tag{3.2}$$

$$N_{\mathrm{IFG}} = \frac{\tilde{\nu}_{\mathrm{abtast}}}{\Delta\tilde{\nu}} = \frac{2\tilde{\nu}_{\mathrm{max}}}{\Delta\tilde{\nu}} \tag{3.3}$$

Die Anzahl der zu messenden Interferogrammpunkte N_{IFG} kann demnach verringert werden, wenn die spektrale Auflösung $\Delta\tilde{\nu}$ auf ein vertretbares Maß reduziert und die obere Grenze des Spektrums herabgesetzt wird (Gl. 3.3). Durch den Einsatz optischer oder elektronischer Filter muss gewährleistet sein, dass die Intensitäten der Wellenzahlen oberhalb der Grenzfrequenz $\tilde{\nu}_{\mathrm{max}}$ null sind, weil diese sonst in das Spektrum rückgefaltet werden würden.

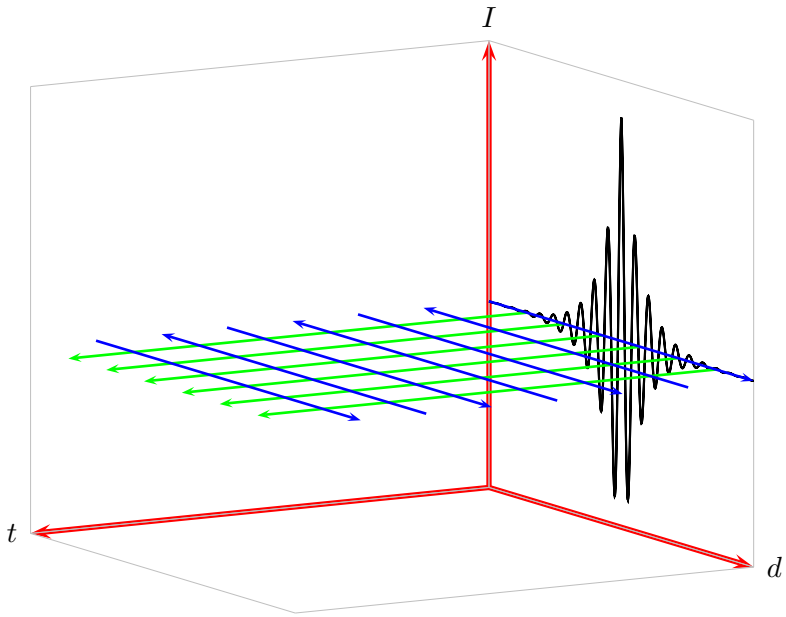

Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Prinzips der Messung zeitaufgelöster Interferogramme. Step-Scan-Modus: Messung der zeitlichen Änderung der Intensität $I(t)$ bei konstanter Spiegelauslenkung d (grüne Pfeile). Rapid-Scan-Modus: Fortlaufende Messung von Interferogrammen $I(d)$ im Spiegelvorhub und Rücklauf (blaue Pfeile).

Hohe Spiegelgeschwindigkeiten v_s von bis zu 10 cm/s verbessern ebenfalls die Zeitauflösung. Da zum Triggern der Messung eines Interferometerpunktes das Modulationssignal eines He-Ne-Lasers (633 nm $\equiv$ 15798 cm^{-1}) verwendet wird, kann das Interferogramm nach Gl. 3.4 mit einer maximalen Datenrate von 320 kHz abgetastet werden.

$$\nu_{\mathrm{abtast}} = 2\, v_s\, \tilde{\nu}_{\mathrm{He\text{-}Ne}} \tag{3.4}$$

Aufgrund dieser hohen Werte für v_s können die weitverbreiteten pyroelektrischen DTGS-Detektoren nicht mehr verwendet werden, da deren Empfindlichkeit proportional zu $1/\nu$ abfällt. Sie müssen durch Halbleiterdetektoren ersetzt werden, deren Sensitivität bis in den MHz-Bereich ansteigt. Verbreitet sind HgCdTe-Detektoren, die allerdings im Betrieb mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden müssen [30, 35].

Die Zeitauflösung im Rapid-Scan-Modus kann um den Faktor 4 verbessert werden, indem das Interferogramm in Spiegelvorhub- und Rücklaufteil gespalten und diese wiederum in die rechte und linke Hälfte getrennt werden (Abb. 3.2). Die Teile werden dann voneinander unabhängig weiterverarbeitet. Bei der Trennung in die rechte und linke Hälfte ist zu beachten, dass aufgrund der Phasenkorrektur eine geringe Anzahl von Punkten der jeweils anderen Seite benötigt wird. In der Konsequenz sind die Interferogramme damit nicht mehr strikt voneinander unabhängig. Als Kompromiss muss die Anzahl der Punkte für die Korrektur begrenzt werden, was wiederum der Phasenkorrektur entgegensteht.

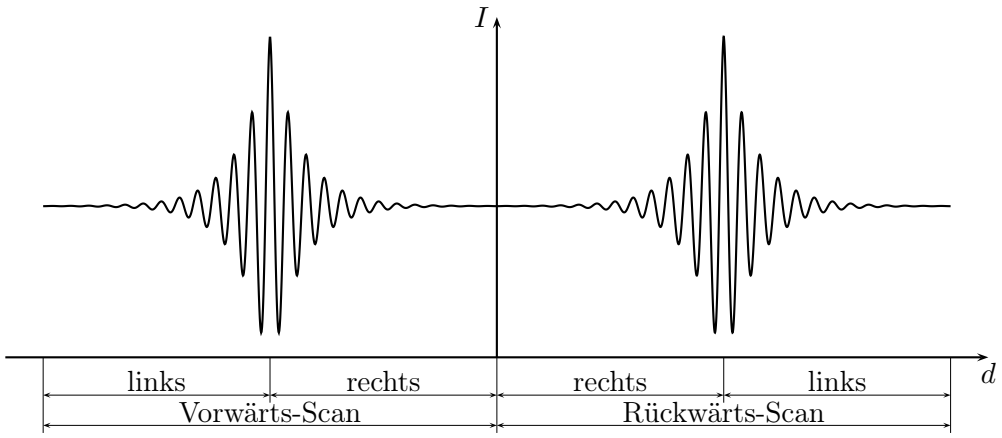

Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Spaltung des Interferogrammes zur Verbesserung der Zeitauflösung (s. Text)

Um das Signal-Rausch-Verhältnis einer Messung zu verbessern, sind in der Regel viele Akkumulationen notwendig. Während im Rapid-Scan-Modus das Relaxationsexperiment einfach n-mal unter gleichen Bedingungen wiederholt wird, sind bei der Step-Scan-Methode dagegen $n \cdot N_{\mathrm{IFG}}$ Relaxationsexperimente notwendig, weil die Akkumulation für jeden Interferogramm-Punkt durchgeführt werden muss. Es muss daher streng gewährleistet sein, dass sich die Probe während des Step-Scan-Experimentes nicht verändert.

3.2 Zeitaufgelöste Dynamische Differenzkalorimetrie

Geräte zur Dynamischen Differenzkalorimetrie[1] arbeiten nach dem Wärmefluss- oder Leistungskompensationsprinzip [37]. Der Aufbau eines Gerätes der zuletzt genannten Klasse ist in Abb. 3.3 dargestellt. Es besteht aus je einer Proben- und Referenzkammer, die sich unabhängig von einander temperieren lassen. Die Kammern sind durch einen Schild von der Umgebung abgetrennt, dessen Temperatur ebenfalls kontrolliert werden kann. Die Referenzkammer wird während einer Messung mit einer konstanten Rate beheizt. Die Temperaturdifferenz ΔT_1 wird verwendet, um die Probenkammer so zu beheizen, dass ΔT_1 immer gleich null ist (Leistungskompensation). Der Schild wird nach dem gleichen Verfahren temperiert, damit $\Delta T_2 = 0$ ist. Dadurch werden im Kalorimeter quasi-adiabatische Bedingungen eingehalten. Die gegenüber der Referenzzelle zusätzlich benötigte elektrische Leistung P wird aufgezeichnet. Bei Kenntnis der Heizrate $\mathrm{d}T/\mathrm{d}t$ kann die Wärmekapazität c_p bestimmt werden, die beide Größen in Beziehung setzt:

$$P = c_p \frac{\mathrm{d}T}{\mathrm{d}t}. \tag{3.5}$$

[1] engl.: Differential Scanning Calorimetry (DSC)

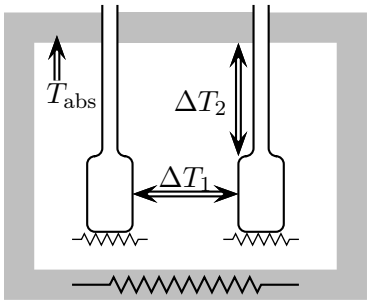

Abb. 3.3: Schematische und vereinfachte Darstellung des Aufbaus eines dynamischen Leistungsdifferenzkalorimeters, bestehend aus zwei separat beheizbaren Kammern und einem beheizbaren Schild. Diverse Temperatursensoren steuern die Temperierung.

Für kinetische Untersuchungen wird die Leistung P als Funktion der Zeit registriert. Das Kalorimeter muss dazu im isothermen Modus betrieben werden, wozu die Heizrate theoretisch den Wert null annehmen muss. In der Praxis wird die Heizrate auf den kleinstmöglichen Wert gesetzt, da sonst die Regelkreise des Gerätes versagen würden. Die Steuerung der Temperatur des Schildes kann im isothermen Modus aufgrund der Differenz ΔT_2 oder aber anhand der absoluten Temperatur T_{abs} (wahrer isothermer Modus) erfolgen. Letztere Variante bedingt jedoch ein erhöhtes Rauschen der Messgröße [65].

Eine Kombination der Drucksprung-Technik mit der Kalorimetrie stellte die Firma MicroCal (Northampton, USA) 2002 als „Pressure Perturbation Calorimetry“ (PPC) vor [54]. Diese Methode wurde entwickelt, um thermische Ausdehnungskoeffizienten bestimmen zu können. Dazu muss die nach einem Drucksprung von maximal 4 bar gemessene $P(t)$-Kurve integriert werden. Es lassen sich damit auch Kinetiken auswerten, ein Nebeneffekt, der in dieser Arbeit untersucht wurde. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Rosgen und Hinz [68] sowie Boehm et al. [5] mit einer Apparatur, bei der die Druckstörung aber auch Sägezahn-Charakter haben kann, weshalb die Autoren die Methode „Pressure-Modulated Differential Scanning Calorimetry“ (PM-DSC) nannten. Im Gegensatz zu Rosgen und Hinz ließen Grabitz et al. den Druck nicht direkt auf die Probenkammern des Kalorimeters wirken, sondern führten druckresistente Edelstahlkapillaren in die Kammern ein. Damit lassen sich Sprünge mit Differenzen größer 4 bar realisieren, ohne das Kalorimeter zu zerstören [29].

Die Zeitauflösung der isothermen Kalorimetrie liegt aufgrund langsamer Wärmeübergangsprozesse im Kalorimeter im Sekundenbereich. Das gemessene Leistungssignal $P_{\mathrm{experim}}(t)$ lässt sich als Faltung des Signals der Lipidkinetik $P_{\mathrm{Lipid}}(t)$ mit der Wärmeleitfunktion des Instruments $R_{\mathrm{Instr}}(t)$ verstehen:

$$P_{\mathrm{experim}}(t) = \int_{z=0}^{t} P_{\mathrm{Lipid}}(z) R_{\mathrm{Instr}}(t-z)\mathrm{d}z. \tag{3.6}$$

Die Instrumentenfunktion der Wärmeleitung wird bei den o. g. Arbeiten [5, 29] als

Gleichung mit zwei exponentiellen Termen gemäß des konsekutiven Mechanismus

$$\text{Wasser} \xrightarrow{k_1} \text{Wand} \xrightarrow{k_2} \text{Detektor} \tag{3.7}$$

mit den Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 angenommen:

$$R_{\text{instr}}(t) = \left(\frac{k_1 k_2}{k_2 - k_1}\right) \left[\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)\right]. \tag{3.8}$$

Die Zeitkonstante $\tau_2 = 1/k_2$ hat bei den genannten Quellen einen Wert von 5–10 s, τ_1 liegt eine Größenordnung darunter. Sind die Relaxationszeitkonstanten der Lipidumwandlung sehr viel größer als die der Kalorimeterfunktion, können sie mit einer Regressionsanalyse direkt anhand der Messdaten bestimmt werden. Haben sie jedoch die gleiche Größenordnung, muss entweder das gemessene Signal mit der Kalorimeterfunktion (Gl. 3.8) zuvor numerisch entfaltet werden oder das Regressionsmodell muss analytisch mit Gl. 3.8 gefaltet werden. Die Entfaltung kann fehlschlagen, wenn das gemessene Signal zu stark von Rauschen beeinflusst wird.

3.3 Drucksprung-Techniken

In der Literatur sind drei Möglichkeiten zum Durchführen von Drucksprung-Experimenten beschrieben. Die einfachste Variante beinhaltet die Benutzung zweier Ventile und einer Druckquelle. Viele Ventile haben den Vorteil, dass sie von einem Computer gesteuert werden können. Die Automatisierung ist Voraussetzung für Detektionsmethoden, die eine höhere Zahl von Akkumulationen benötigen. Die Totzeit der Apparatur hängt sowohl von der Öffnungszeit der Ventile als auch von der Geometrie der Apparatur (Querschnitt und Weglänge) ab. Zur Totzeit trägt aber auch das druckübertragende Mittel bei. Hydraulische Systeme [6, 15, 77] sind bedingt durch die geringe Kompressibilität des Mediums (in der Regel Wasser) meist schneller als pneumatische Systeme, müssen aber von der Probensubstanz durch einen Drucküberträger räumlich getrennt werden. Die pneumatisch betriebenen Apparaturen [47, 83] verwenden ein Inertgas (He, N_2), von dem angenommen wird, dass es mit der Probe nicht wechselwirkt. Die mit Ventilen betriebenen Apparaturen erreichen eine untere Totzeit von 10^{-3} s bis 10^{-4} s.

Eine Alternative besteht darin, ein (meist hydraulisches) System mit einer Pumpe solange zu komprimieren, bis eine Berstmembran bei einem definierten Druck bricht und die Probe entspannt [33, 48, 78]. Der Nachteil dieser Art des Drucksprunges liegt darin, dass der Wechsel der Membran einen manuellen Eingriff erfordert. Andererseits ist das Bersten einer Metallmembran schneller als das Öffnen eines Ventils. Strehlow und Becker [78] berichten von einer Totzeit von $6 \cdot 10^{-5}$ s. Einen Sonderfall der Berstmembran stellt das Stoßwellenrohr dar [45], bei dem allerdings ein Drucksprung von niedrigem zu hohem Druck erfolgt. Bedingt durch den Umstand, dass das Druckreservoir gegenüber dem Probenvolumen sehr viel größer ist, wird der Sprung mit bis zu 1000 bar Druckdifferenz von einer starken adiabatischen Temperaturerhöhung begleitet, so dass nicht mehr allein

von einem Drucksprung gesprochen werden kann. Die Methode spielt bei der Untersuchung von Lipidphasen-Umwandlungen keine Rolle. Daher soll auf sie nicht weiter eingegangen werden.

Eine weitere Möglichkeit einen Drucksprung zu generieren ist die direkte Komprimierung der Probe durch einen Kolben, wobei dieser durch einen Piezokristall-Stapel angetrieben wird [11, 43]. Die dadurch erreichbaren Sprungzeiten liegen in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-5} s, allerdings ist der Hub eines Piezostapels im Bereich von lediglich Mikrometern, so dass das Probenvolumen sehr klein gehalten werden muss. Dennoch erreichen die Autoren Druckdifferenzen von 200 bar.

4 Problemstellung und Motivation

Wie in Kap. 2.2.2 ausgeführt, wurde die Kinetik der Phasenumwandlungen wässriger Lipidsysteme bereits mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Die Experimente unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten Detektionsmethode (Trübung, Kalorimetrie, Fluoreszenz, Röntgenstreuung usw.) und Sprungmethode (Temperatur-, Druck- und pH-Sprung). Aus einer vergleichenden Betrachtung ergeben sich drei nachfolgend aufgeführte offene Probleme.

- Es wurde eine unterschiedliche Anzahl von Relaxationszeiten gefunden. Während eine Vielzahl von Autoren beobachteten, dass sich die mit der jeweiligen Detektionsmethode gemessene Gesamtamplitude auf mehrere Relaxationsprozesse mit Zeitkonstanten unterschiedlicher Größenordnungen verteilte, gingen Grabitz et al. von *einem einzigen* Prozess aus, dem die gesamte Amplitude zugeordnet wurde.

- Die von den Autoren gefundenen Relaxationsprozesse zeigen stark unterschiedliche Zeiten. Die von Erbes et al. und Grabitz et al. gefundenen langsamen Relaxationsprozesse auf einer Sekunden-Zeitskala wurden von anderen Autoren nicht beobachtet, obwohl die Zeitauflösung der Apparatur dieses technisch ermöglicht hätte.

- Es herrscht Unklarheit darüber, wie die zeitlich aufgelösten Vorgänge zu interpretieren sind und welche Prozesse die Kinetik bestimmen. Erbes et al. stellen die Wasserumlagerungen in den Mittelpunkt, während die Mehrzahl der Autoren die Konformerenbildung der Acylketten als langsamen Schritt ansehen. Die bisher verwendeten Methoden waren nur bezüglich makroskopischer Änderungen sensitiv und ließen somit keine Rückschlüsse auf Vorgänge der molekularen Ebene zu.

Die IR-Spektroskopie ist eine Methode, die – im Gegensatz zu den bisher verwendeten Methoden – nicht auf makroskopische Eigenschaften anspricht, sondern vielmehr bezüglich Änderungen am Einzelmolekül sensitiv ist. Die Möglichkeiten, um aus IR-Spektren Aussagen über die Konformation der Ketten und die Hydratation der Kopfgruppen zu gewinnen, wurden in Kap. 1.4 beschrieben. Aspekte zum Einsatz dieser Methode zur Untersuchung zeitaufgelöster Phänomene wurden in Kap. 3.1 abgehandelt.

Um die IR-Spektroskopie zur Aufklärung der Kinetik der Lipid-Phasenumwandlungen einsetzen zu können, wurde eine Drucksprung-Apparatur gebaut, die mit einem FTIR-Spektrometer synchronisiert werden kann. Der Drucksprung hat, wie in Kap. 3.3 beschrieben, den Vorteil, dass er sich homogen auf die Probe auswirkt. Weiterhin lässt er sich im Gegensatz zur Temperatursprung-Methode auch für große Zeitskalen verwenden, um die o. g. langsamen Relaxationsprozesse aufzuklären. Da die FTIR-Spektroskopie

die Akkumulation mehrerer Spektren erforderlich macht, wurde der Drucksprung unter Verwendung zweier Ventile erzeugt, da diese eine Automatisierung ermöglichen.

Ein erster Ansatz zum Aufbau der Methode wurde bereits in der Dissertation von Pax [64] beschrieben, der ATR-FTIR-Spektroskopie für diese Zwecke verwendete. Das Hauptproblem dieser Apparatur war die Dichtigkeit der ATR-Messzelle, die bei einem maximalen Enddruck von 40 bar aufgrund der prinzipbedingten großen Dichtungsfläche unzureichend war. Ein weiterer Nachteil bestand in dem mit Gasdruck realisierten Druckaufbau und die damit verbundene lange Drucksprungzeit. Weiterhin waren die großen Scanzeiten des verwendeten Spektrometers unbefriedigend. Für den Bau der neuen Apparatur wurde daher eine Transmissionszelle sowie ein hydraulisches System verwendet. Weiterhin stand ein Spektrometer einer neueren Generation zur Verfügung, welches besser für kinetische Messungen geeignet ist.

Um nicht nur auf die Detektionsmethode mit FTIR-Spektroskopie beschränkt zu bleiben, wurden weiterhin Drucksprung-Kalorimetrie-Experimente durchgeführt. Da ein solches Gerät der Firma MicroCal kommerziell erhältlich ist, entfiel hierbei die apparative Entwicklungsarbeit. Allerdings mussten Auswerteroutinen geschaffen werden, weil die PPC-Methode ursprünglich nicht für kinetische Gesichtspunkte entwickelt worden ist. Dabei wurden zum Einen Lipide vermessen, deren Phasenumwandlungskinetik bisher nicht untersucht wurden und zum Anderen wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Arbeiten von Grabitz et al. [29] sowie Rosgen und Hinz [68] überprüft.

Teil II

Ergebnisse und Diskussion

5 Bau einer Drucksprung-Relaxationsapparatur mit IR-Detektion

Bei der Drucksprung-FTIR-Spektroskopie wird als Detektionssystem auf das FTIR-Spektrometer „IFS66s/v“ der Firma Bruker (Ettlingen, Deutschland) zurückgegriffen. Das Drucksystem ist dagegen eine Eigenentwicklung, die in den folgenden Abschnitten beschrieben wird. Beide Systeme werden von je einem Computer gesteuert. Die Kommunikation beider Systeme ist derart gestaltet, dass das Drucksystem vom Spektrometerrechner Befehle erhält, die es abarbeitet, so dass die Kontrolle immer beim Spektrometerrechner verbleibt.

5.1 Drucksystem

Auf die verschiedenen Möglichkeiten der technischen Realisierung eines Drucksprunges wurde in Kap. 3.3 eingegangen. Für das hier vorgestellte System wurde die Möglichkeit der Verwendung schnell schaltender Ventile genutzt. Die Berstmembran-Version ist ungeeignet, da sie nicht automatisierbar und die Komprimierung mit dem Piezostapel aufgrund des zu großen Probenvolumens der vorhandenen Zelle nicht realisierbar ist. Im Gegensatz zur Apparatur von Pax [64] mit einem pneumatischen Aufbau wurde auf ein hydraulisches System gesetzt. Dadurch lässt sich die Druckdifferenz erhöhen und die Totzeit von 115 ms [64] auf 4 ms verringern.

5.1.1 Mechanische Komponenten

Der Druck wird von einer HPLC-Pumpe „K-501“ (Knauer GmbH, Berlin Deutschland) erzeugt. Die Pumpe hat einen Enddruck von 500 bar und wurde in einer Version mit Titan- statt Keramikeinlagen erworben, da letztere durch den Schock des Drucksprunges Schaden nehmen können. Die Pumpe ist über einen RS232-Anschluss fernsteuerbar. Alle Komponenten sind über 1/8 Zoll Stahlkapillaren (Swagelok, Frankfurt, Deutschland) miteinander verbunden. Wie in Abb. 5.1 dargestellt, sind die Ventile und die Messzelle in einer T-artigen Anordnung miteinander verbunden. Die Ventile (2/2-Wegeventile) der Firma „Norgren–Herion Fluidtronic GmbH“ (Fellbach, Deutschland) sind vom Typ „normal geschlossen“ und werden elektromagnetisch betrieben. Sie können einem maximalen Arbeitsdruck von 120 bar standhalten und sind so die drucklimitierenden Bauteile des Systems. Über eine Relais-Elektronik (Elektronikwerkstatt der Universität Kaiserslautern, Deutschland) können die Ventile via TTL-Signale vom Computer gesteuert werden.

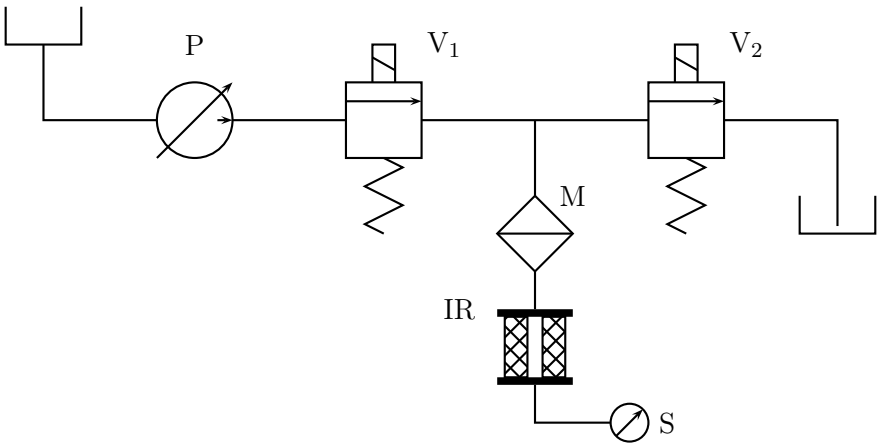

Abb. 5.1: Darstellung eines Flussschemas der Hydraulik des Drucksprungsystems, welches aus einer Pumpe (P), zwei Ventilen (V_1, V_2), einer flexiblen Membran (M, s. Abb. 5.3), einer IR-Messzelle (IR) und einem Drucksensor (S) besteht.

Die Messzelle ist eine bis 300 bar druckstabile Durchfluss-Transmissionszelle von Graseby–Specac (Kent, Großbritannien). Leider waren die Eigenschaften der Zelle unter Druck nicht optimal, so dass Modifikationen vorgenommen werden mussten. Bei Druckerhöhung veränderte sich der Fenster-Fenster-Abstand derart stark, dass bei einem Druck von 100 bar im gesamten spektralen Bereich Totalabsorption auftrat. Dem konnte etwas entgegen gewirkt werden, indem die fensterdichtenden O-Ringe, die bei erhöhtem Druck prinzipbedingt nachgeben und dadurch dichten, gegen solche aus härterem Material (FPM, 90 ShoreA) ausgetauscht wurden. Da diese Maßnahme allein nicht ausreichte, wurde die Dicke l der Abstandshalter auf 100 µm erhöht, damit die relative Dickenänderung $\Delta l/l$ hinreichend klein gehalten werden kann. Mit diesen Maßnahmen konnte der Wert für $\Delta l/l$ auf ≈ 1 reduziert werden. Die für die IR-Spektroskopie ungewöhnlich hohe Probenschichtdicke von 100 µm erfordert kleine Konzentrationen des Lipids, weil dessen Banden, wie in Kap. 1.4 beschrieben, auf den Ausläufern der Wasserbanden liegen und damit Gefahr laufen, im Rauschen der Totalabsorption unterzugehen.

Die Schichtdickenänderung hatte weiterhin zur Folge, dass die Abstandshalter, welche aufgrund der Auslegung der Zelle als Durchflusszelle eine Halbmondform hatten, verrutschten und den optischen Pfad des Lichtes blockierten. In Abb. 5.2 ist ein modifizierter Abstandshalter gezeigt, der durch seine unten geschlossene Art ein Verrutschen verhindert, jedoch trotzdem den Durchfluss der Lösung durch die Zelle gewährleistet. Abstandshalter dieser Art wurden aus Silberfolie (Ag 99,99 %, weichgewalzt, Schlenk Metallfolien GmbH & Co. KG, Roth-Barnsdorf, Deutschland) der entsprechenden Dicke gefertigt.

Die ZnSe-Fenster der Zelle wurden gegen solche aus MgO oder CaF_2 ersetzt, da die Erstgenannten einen sehr hohen Brechungsindex haben. Dies führt zu Interferenzen des zwischen den Küvettenfenstern mehrfach reflektierten Strahles und damit zu sinusmo-

Tab. 5.1: Bruchmodul, Brechungsindex und untere Grenze des Transmissionsbereiches einiger verwendeter Materialien für IR-Küvettenfenster im Vergleich [49]

Material	Bruchmodul/MPa	Brechungsindex n	$\tilde{\nu}_{\mathrm{min}}/\mathrm{cm}^{-1}$
ZnSe	55,0	2,40 (10,6 µm)	≈ 500
CaF_2	36,5	1,41 (4,4 µm)	≈ 900
MgO	138,0	n_o: 1,78 (0,37 µm)	≈ 1000
		n_e: 1,62 (5,35 µm)	

o: ordinary, e: extraordinary

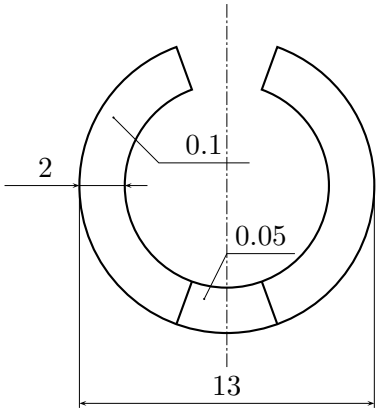

Abb. 5.2: Konstruktionszeichnung des modifizierten Küvettenfenster-Abstandshalters. Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu. (Angaben in mm).

dulierten Spektren, deren Bandenmaxima nicht mehr auswertbar sind. Dieser Effekt tritt vor allem auf, wenn die in D_2O präparierten Vesikel während einer langen Messung langsam aufschwimmen und ein Teil des IR-Strahles durch reines D_2O geht. CaF_2-Fenster haben den Nachteil, sehr bruchempfindlich zu sein. MgO-Fenster sind dagegen mechanisch sehr stabil (s. Bruchmodul in Tab. 5.1), jedoch nimmt die Transmission für IR-Strahlung unterhalb $1400\,\mathrm{cm}^{-1}$ sehr stark ab. In der Praxis ist die ν(C=O)-Bande bei $1740\,\mathrm{cm}^{-1}$ schon deutlich durch Rauschen beeinträchtigt. Weiterhin werden MgO-Fenster trüb, wenn Phosphatpuffer eingesetzt wird. Phosphat-gepufferte Lipidsuspensionen wurden daher unter Verwendung von CaF_2-Scheiben untersucht.

Um die Durchmischung der Probenlösung mit der druckübertragenden Flüssigkeit (destilliertes Wasser) zu verhindern, wurde der IR-Küvette ein Membran-Drucküberträger (Eigenbau) vorgeschaltet. Dabei handelt es sich, wie in Abb. 5.3 dargestellt, um zwei Flansche, die eine Plastikfolienmembran einschließen. Zwei O-Ringe dichten das System. Die Folie muss einerseits dehnbar sein, um sich ausbeulen zu können, andererseits aber auch dick genug, um den H/D-Austausch mit der in D_2O präparierten Probe hinreichend zu verzögern. Dieser macht sich in den IR-Spektren auf einer Stunden-Zeitskala negativ bemerkbar. Ein Flansch des Überträgers ist immer fest mit der IR-Zelle verbunden, so

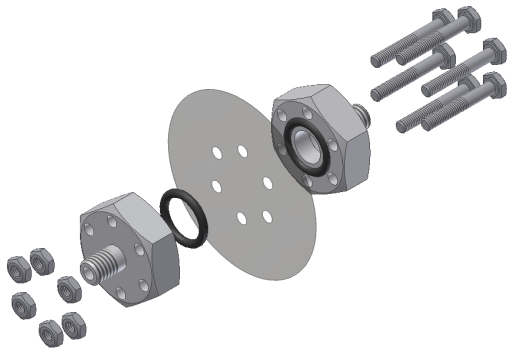

Abb. 5.3: Explosionsdarstellung des Membran-Druckübertragers zur Trennung der Probenlösung von der Hydraulikflüssigkeit

dass die Zelle einfach durch Teilen des Überträgers von der Apparatur getrennt werden kann.

Der IR-Zelle nachgeschaltet ist ein Einschraub-Drucksensor mit M5-Gewinde (EPX-M5IW-350G, Entran Sensoren GmbH, Ludwigshafen, Deutschland). Zum Befüllen der Zelle wird der Sensor entfernt und an dem Einschraubloch eine Spritze fest abdichtend angebracht. Die Lösung wird anschließend langsam eingespritzt. Dabei steigt diese von unten nach oben, damit das Entstehen von Luftblasen in der Zelle vermieden wird. Das Einspritzen wird gestoppt, wenn sich die Lösung mit einem konvexen Meniskus oben am geteilten Druckübertrager zeigt. Dieser Meniskus ist notwendig, damit beim Auflegen der flexiblen Membran ebenfalls keine Luftbläschen eingeschlossen werden können. Die Flansche werden zusammengeschraubt, die Spritze entfernt und der Drucksensor eingeschraubt. Anschließend kann die Zelle an die Apparatur montiert werden. Für die Messung wird ein Probenvolumen von 1 ml benötigt. Um das Einfüllen zu erleichtern, sollten Zelle und Lösung auf eine Temperatur oberhalb von T_m erwärmt werden. Dadurch wird die Viskosität der Probe herabgesetzt und somit die Gefahr der Blasenbildung verringert.

Der Druckabfall in der Zelle wird bei jedem Drucksprung aufgezeichnet. Die Dauer des Abfalles entspricht der Totzeit der Apparatur. Wie in Abb. 5.4 ersichtlich ist, bleibt der Druck nach dem Startsignal zunächst für 14 ms konstant und fällt dann innerhalb von 4 ms sigmoidal ab, so dass er bei ≈ 18 ms den Umgebungsdruck erreicht. Der Zeitpunkt des Durchganges der Kurve bei 50 bar wird als Startzeit t_0 des Relaxationsexperimentes gesetzt. Da mehrere Relaxationsexperimente akkumuliert werden, muss dieser Zeitpunkt gut reproduzierbar sein. Eine Statistik an über 20 fortlaufend durchgeführten Sprüngen zeigt, dass dieser Wert keinen systematischen Änderungen unterliegt und eine Standardabweichung von $\sigma_t = 0{,}043$ ms für die Verteilung aufweist. Dieser Fehler liegt damit zwei Größenordnungen unter der Zeitauflösung einer Apparatur mit Millisekundenauflösung und kann somit toleriert werden. Abb. 5.4 zeigt weiterhin, dass die Schwankungen der Drucksprungamplitude vernachlässigt werden können.

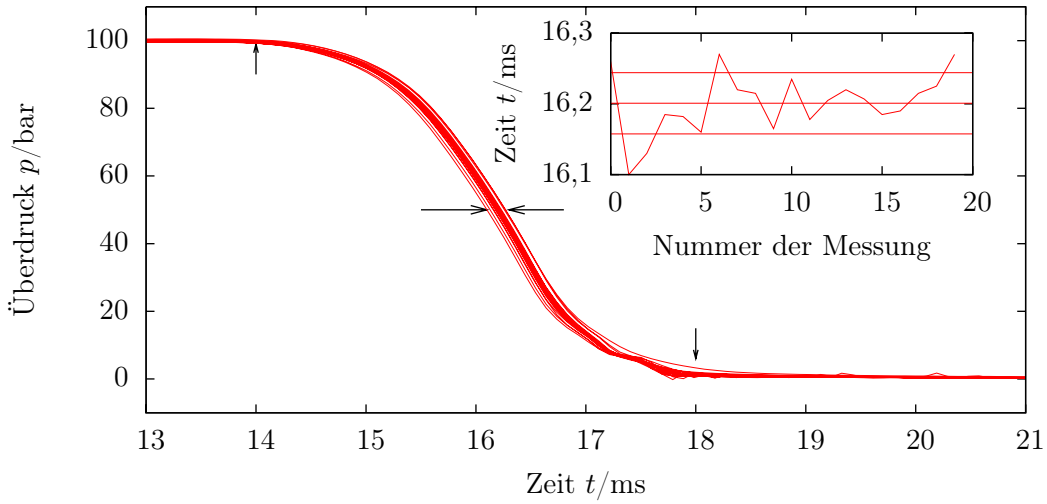

Abb. 5.4: Zwanzigfache Messung des Druckabfalles während eines Drucksprunges. Die Totzeit beträgt 4 ms (s. Pfeile). Der eingebettete Graph zeigt die Reproduzierbarkeit der Zeit des Durchgangs bei 50 bar mit einem Mittelwert bei $\bar{t} = 16{,}20$ ms und einer Standardabweichung von $\sigma_t = 0{,}043$ ms.

5.1.2 Beschreibung der Hardware

Alle steuerbaren Teile des Drucksystems werden von einem Computer kontrolliert. Die HPLC-Pumpe und der Wasserbad-Thermostat (Haake Phoenix II P1–C25P, Thermo Electron Karlsruhe GmbH, Karlsruhe, Deutschland), der die IR-Zelle temperiert, werden über je eine RS232-Schnittstelle angesprochen. Das Signal des Drucksensors wird nach Durchlaufen eines Operationsverstärkers (IAM-15/10/50-1W/L02M, Entran Sensoren GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) von einer AD-Wandlerkarte (CIO-DAS802/16, Measurement Computing Corp., Norton, USA) ausgelesen und digitalisiert. Weiterhin detektiert diese das Drucksignal der HPLC-Pumpe. Zur Steuerung der Ventile wird eine TTL-I/O-Karte der Firma Decision–Computer Jürgen Merz e.K. (Lienen, Deutschland) mit 192 Kanälen verwendet.

Da die Steuerung der Ventile während des Relaxationsexperimentes auch direkt vom Spektrometer erfolgen muss, ist zwischen der I/O-Karte und den Ventilen eine Logik-Schaltung (Eigenbau) installiert (Abb. 5.5). Die Kontakte V_1^{out} und V_2^{out} sind TTL-Ausgänge, welche direkt die Ventile schalten. Durch Anlegen eines 5 V-Pegels an den V_1^{in}- und/oder V_2^{in}-Eingang durch den „Druck-Computer“ kann entschieden werden, welches Ventil geschaltet werden soll. Das so ausgewählte Ventil öffnet sich jedoch erst, wenn vom Spektrometer zum Auslösen des Drucksprunges ein 5 V-Signal auf den Trig-Eingang gegeben wird. Da der „Druck-Computer“ zur Vorbereitung des Sprunges die Kontrolle über die Ventile benötigt, können diese auch durch Schalten des Strg-Einganges vom „Druck-Computer“ selber betätigt werden.

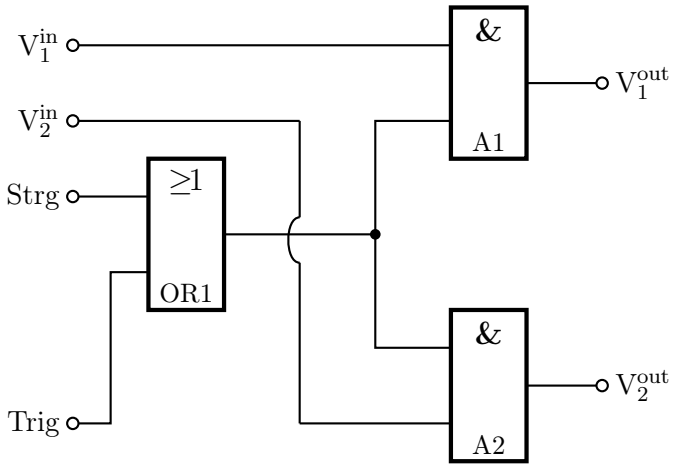

Abb. 5.5: Logikschaltung zur gemeinsamen Steuerung der Ventile durch den Drucksprung-Computer und das Spektrometer (weitere Erklärung im Text)

Die Kommunikation zwischen Druck- und Detektionssystem während einer zeitaufgelösten Messung beruht ebenfalls auf TTL-Signalen. Am Spektrometer können dafür jeweils vier lesende und schreibende Kanäle genutzt werden. Das Spektrometer fordert die Vorbereitung eines Drucksprunges durch Hochsetzen der „Beginn Druckaufbau“-Leitung an (Abb. 5.6). Der „Druck-Computer“ detektiert dies, steuert die Pumpe sowie die Ventile und bestätigt den erfolgreichen Druckaufbau durch einen kurzen Impuls auf dem „Ende Druckaufbau“-Kanal. Das Spektrometer wiederum setzt die „Beginn Druckaufbau“-Leitung zurück, misst eine Anzahl von Spektren bei hohem Druck (Pretrigger-Spektren) und löst dann den Drucksprung durch das Hochsetzen der „Ventil offen“-Leitung aus, die mit dem Trig-Eingang der Schaltung in Abb. 5.5 verbunden ist. Gleichzeitig nimmt das Spektrometer weiter die gewünschte Anzahl von Posttrigger-Spektren auf. Anschliessend startet der Vorgang erneut, wobei der „Druckrechner“ den nächsten Drucksprung nur dann vorbereitet, wenn die „Ventil offen“-Leitung vom Spektrometer wieder zurückgesetzt worden ist.

Eine weitere Kommunikation zwischen Druck- und Detektionssystem erfolgt über ein RS232-Kabel. Dieses dient der vorherigen Konfiguration des Drucksystems. Zu diesem Zweck muss der „Druckrechner“ zuvor mitgeteilt bekommen, welche Amplitude der vom Spektrometer via TTL angeforderte Drucksprung haben soll. Dazu wurde ein Befehlssatz entwickelt, der im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

5.1.3 Beschreibung der Software

Die im vorigen Abschnitt erwähnte Hardware wird über ein in der Programmiersprache „Delphi 6“ der Firma „Borland Software Corporation“ (Cupertino, USA) geschriebenes Programm gesteuert. Die Software besteht aus mehreren Komponenten (Klassen), welche jeweils einem Gerät zugeordnet sind und Methoden beinhalten, die der jeweiligen Funktion

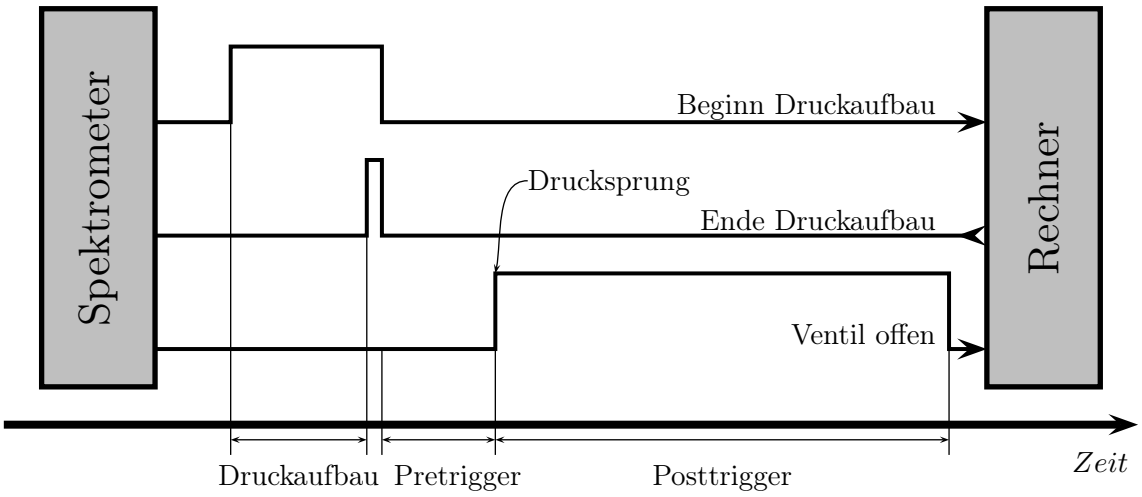

Abb. 5.6: Schematische Darstellung der TTL-Trigger-Kommunikation zwischen Spektrometer und Drucksprung-Computer während eines Relaxationsexperiments. Pfeile an den Leitungen zeigen an, welches Gerät Sender bzw. Empfänger ist.

entsprechen. Als Beispiel soll die Funktion „`ValveControl()`“ der Klasse „`TIOCard`“[1] genannt werden, die es dem Programm ermöglicht, über die I/O-Karte, die Ventile zu steuern. Weitere Klassen auf der Geräteebene wurden für die AD-Karte, den Haake-Thermostaten sowie die Pumpe geschrieben. Eine Übersicht aller Klassen und ihrer Beziehungen zueinander gibt ein UML-Klassendiagramm in Abb. 5.7. Eine Klasse „`TPJump`“ stellt Funktionen bereit, die das Zusammenspiel mehrer Geräte erfordern. So müssen zum Aufbauen eines Druckes (Funktion `TPJump.PressurizeSystem()`) die Ventile betätigt, die Pumpe geschaltet und mit der AD-Karte der Druck gemessen werden. Da alle diese Klassen keine graphischen Komponenten benötigen, sind sie von der Klasse „`TDataModule`“ abgeleitet, die Delphi für diese Zweckbestimmung bereithält. Klassen, welche die RS232-Schnittstelle verwenden, integrieren die freie Drittpartei-Komponente „ComPort Library“ von Crnila und Dybdahl [12]. Als GUI (Klasse „`TGUI`“) enthält das Programm lediglich ein Formular mit einem Auswahldialog zur Angabe einer Logdatei, eine Start-Stop-Schaltfläche und zwei Diagrammanzeigen jeweils für den Temperatur-Zeit-Verlauf an der Messzelle sowie den Druck-Zeit-Verlauf während des letzten Drucksprunges. Zur Darstellung der Diagramme wird die Drittpartei-Komponente „`XYGraph`“ von Emmens [20] verwendet.

Nach der Aktivierung wartet das Programm auf den Eingang von Befehlen an der RS232-Schnittstelle zum Spektrometer-Rechner. Der Befehlssatz zur Konfiguration des Drucksystems umfasst folgende Kommandos:

[1] Es ist eine Konvention, dass Namen von Klassen und Komponenten mit einem vorangestellten „T“ (für „Type“) beginnen.

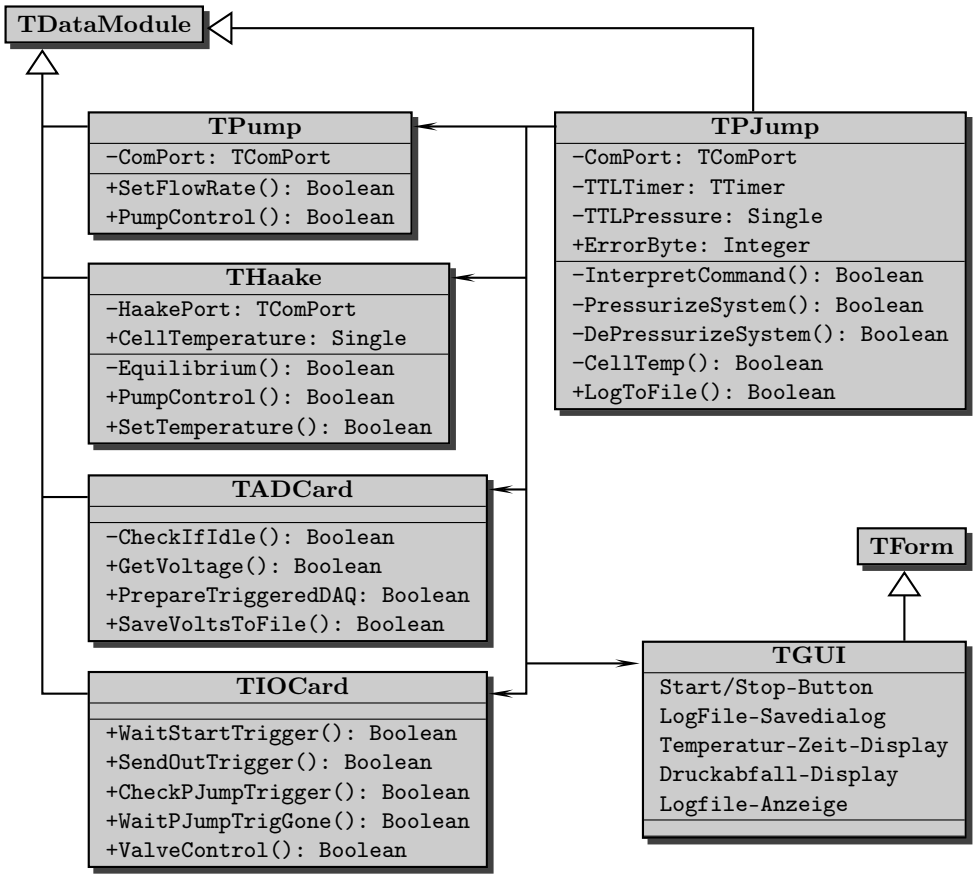

Abb. 5.7: UML-Klassendiagramm der Drucksprung-Steuersoftware. Aus Platzgründen sind nur relevante Attribute und Methoden der Klassen aufgeführt. „`TComPort`“ bezeichnet die unter [12] referenzierte Komponente. (Erläuterungen im Text)

celltemp=24.10 Stellt die Temperatur der Messzelle auf z. B. 24,10 °C ein. Wärmeverluste in der Zuleitung vom Thermostat zur Zelle werden durch eine Kalibrierung ausgeglichen. Das Programm stellt also am Thermostat eine geringfügig abweichende Temperatur ein, damit die geforderte Temperatur erreicht wird.

tprecision=true Schaltet die erweiterte Temperaturkontrolle ein. Bedingt durch geringe Schwankungen der Raumtemperatur kann trotz der o. g. Kalibrierung die angeforderte Temperatur um wenige Zehntelgrade verfehlt werden. Aufgrund der scharfen Umwandlungskurven der Lipidphasen kann diese Abweichung jedoch Bedeutung haben. In einem zweiten Temperierschritt korrigiert dann das System diese Differenz.

pressure=−100 Das System wird sofort für einen Drucksprung von 100 bar auf 0 bar Überdruck vorbereitet. Im Anschluss an diesen Befehl kann z. B. eine statische

Messung von Spektren bei erhöhtem Druck erfolgen.

ttlpressure=−100 Das System wird, im Gegensatz zum vorherigen Befehl, erst nach einem TTL-Signal auf der „Beginn Druckaufbau“-Leitung (Abb. 5.6) für einen Drucksprung von 100 bar Überdruck auf Normaldruck präpariert. Dazu wird der Timer der TPJump-Klasse aktiviert (Abb. 5.7), welcher in kurzen Abständen den Zustand der Leitung abfragt.

waittime=6000 Zwischen dem Druckaufbau und -sprung soll eine Äquilibrierungszeit von z. B. 6000 ms abgewartet werden, damit das System relaxieren kann. Diese Wartezeit stellt sicher, dass der Sprung aus einem Gleichgewichtszustand heraus startet.

control=stop Ermöglicht das automatisierte Herunterfahren des Systems nach einer Messung. Die Pumpe und die Messzelle werden entspannt, der Thermostat wird angehalten.

valvecontrol=111 Ermöglicht für Wartungszwecke das Schalten der Ventile. Die drei Ziffern entsprechen jeweils den logischen Zuständen der Eingänge nach Abb. 5.5.

Während einer Messung werden diese Kommandos von der Spektrometer-Software an den „Drucksprung-Computer“ übermittelt. Dieser antwortet mit der zuvor erhaltenen Phrase, korrigiert um die wahre Temperatur bzw. den wahren Druck, oder er übermittelt „`ERROR`“, sofern ein Fehler aufgetreten ist.

5.1.4 Temperaturkontrolle

Die Zelle wird, wie in Kap. 5.1.1 beschrieben, mit Hilfe eines Wasserbad-Thermostaten temperiert. Bedingt durch den Umstand, dass Lipid-Phasenübergänge hoch kooperativ sind und in einem engen Temperaturintervall ablaufen, ist eine präzise Temperaturkontrolle nötig. Wie in Abb. 2.1 dargestellt, können kleine Temperaturschwankungen große Änderungen in der Amplitude und den Zeitkonstanten der Umwandlung hervorrufen. Speziell bei spektroskopischen Methoden ist die Thermostatisierung erschwert, weil die Probe aufgrund des Strahlenganges nicht vollständig von allen Seiten temperiert werden kann. Über die Küvettenfenster findet ein Wärmeaustausch mit dem Spektrometerinnenraum statt, der die Temperierung beeinflusst und innerhalb der Probe einen Temperaturgradienten entstehen lässt. Weiterhin ist die Positionierung des Temperatursensors nur außerhalb des Strahlengangs möglich. Somit lässt sich die Temperatur des optisch zugänglichen Probenvolumens nur durch Vermessen eines internen Standards vornehmen.

Ein größerer Aufwand musste bezüglich der Frage betrieben werden, nach welchen Kriterien die Temperatur als konstant angesehen werden kann und welche Schwankungen während der Messung akzeptiert werden können. Weil lange Zuleitungen im Wasserkreislauf den Regelmechanismus des Thermostaten behindern, wurde dieser so konfiguriert, dass dessen interner Pt100-Sensor, statt des Fühlers an der IR-Zelle, für die Regelung verwendet wird. Ist ein stationärer Zustand erreicht, sorgt die Trägheit der Zelle und der Leitungen dafür, dass Temperaturfluktuationen geglättet werden. Wärmeverluste aufgrund der

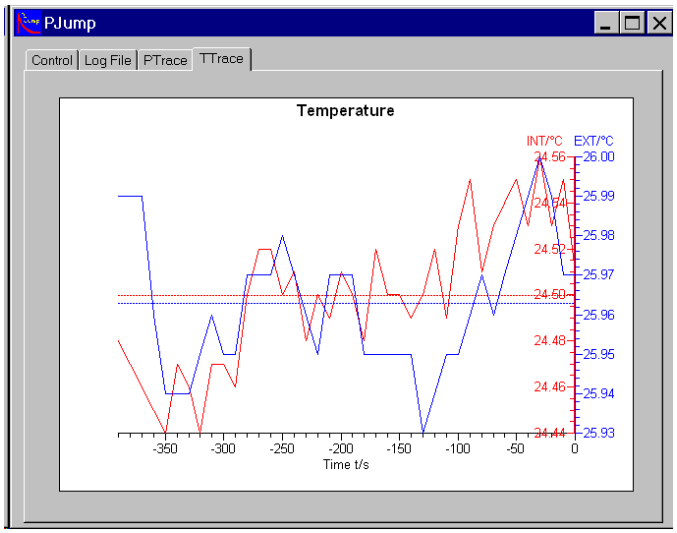

Abb. 5.8: Darstellung des Drucksprung-Steuerprogramms mit der Darstellung des Temperaturverlaufes an der Zelle (externer Sensor) und im Thermostaten (interner Sensor). Die gestrichelten Linien stellen den Mittelwert der Punkte dar.

Zuleitung zur Zelle wurden durch die Verwendung kurzer Schläuche und deren Isolierung minimiert. Eine Kalibrierung sorgt für die weitere Korrektur. Das Drucksprung-Programm fragt im Abstand von 10 s vom Thermostaten die Daten des internen und des Pt100-Sensors der IR-Zelle ab. Es behält immer die letzten 40 Werte im Speicher und deckt damit einen Zeitbereich von 400 s ab (Abb. 5.8).

Das Programm nimmt Temperaturkonstanz an, wenn der Mittelwert der Temperatur des internen Bades sich in einem Bereich von ±0,007 K um den gewünschten Wert befindet. Weiterhin muss sich der Anstieg einer linearen Regression über alle Punkte im Interval $\pm 2{,}5 \cdot 10^{-4}$ K/s befinden. Das bedeutet, dass sich die Werte im Interval von 400 s nicht um mehr als 0,1 K ändern dürfen. Zusätzlich muss auch die Standardabweichung aller Daten, die direkt an der Zelle gemessen wurden, unterhalb einer Grenze von 0,014 K liegen. Die Praxis hatte gezeigt, dass das Einhalten des letzten Kriteriums erschwert wurde, wenn der Spektrometerinnenraum zu stark mit trockener Luft gespült wurde. Bei einem moderaten Luftstrom kann die Temperatur mit einer Genauigkeit von 0,01 K (Standardabweichung) gehalten werden. Die Dauer der Äquilibrierung bei einer anfänglichen Temperaturdifferenz von 15 K kann bis zu 2 h betragen. Da die temperaturabhängigen Relaxationsexperimente jedoch mit Temperaturinkrementen von lediglich Zehntelgraden durchgeführt wurden, verkürzte sich die Justierungsdauer entsprechend auf Zeiten von $<$30 min.

5.2 Konfiguration des Spektrometers

Für die Experimente wurde ein IFS66s/v-Spektrometer der Firma Bruker (Ettlingen Deutschland) verwendet. Mit einer Erweiterung für Rapid-Scan-Messungen erreicht es

Spiegelgeschwindigkeiten, die eine Abtastrate von maximal 320 kHz zulassen. Das Interferogramm wird mit einem HgCdTe-Detektor „D313“ von der Firma „Graceby“ aufgezeichnet. Dieser ist sehr schmalbandig (10000–700 cm^{-1} Bandbreite), hat jedoch dadurch eine hohe Sensitivität von $4 \cdot 10^{10}$ $cmHz^{1/2}W^{-1}$. Die schmalbandige Charakteristik ist unerheblich, da die untere Grenzwellenzahl, wie in Kap. 5.1.1 beschrieben, vom Fenstermaterial bestimmt wird.

Im Strahlengang befindet sich ein optisches Filter (Filtrop AG, Balzers, Liechtenstein) mit einer oberen Grenzwellenzahl von 3100 cm^{-1}. Damit wird zwar die Valenzschwingung des Wassers ausgeblendet, die C–H-Valenzvibrationen der Lipide können jedoch noch detektiert werden. Die spektrale Auflösung wurde auf 8 cm^{-1} herabgesetzt, da die Banden des Spektrums eine ausreichend große Breite haben, um das Maximum nach der Interpolation noch hinreichend genau bestimmen zu können [7]. Die Interferogramme werden, wie in Abb. 3.2 gezeigt, aufgespalten, wobei die Überlappung der Spektren von der rechten und linken Seite auf 10 % der Punkte begrenzt wird. Durch die soeben beschriebenen Maßnahmen kann die Zahl der Interferogrammpunkte N_{IFG} auf 771 gesenkt werden, wodurch die Dauer der Messung eines Interferogramms und damit die Zeitauflösung 8,5 ms beträgt. Demzufolge ist die Zeitauflösung durch das Detektions- und nicht durch das Drucksystem (4 ms Sprungzeit, s. Abb. 5.4) bestimmt.

Es werden im Rapid-Scan-Modus hintereinander 500 bereits aufgespaltene Interferogramme gemessen und im Speicher des Spektrometers gehalten. Damit lässt sich ein Zeitbereich von 5,6 s nach dem Drucksprung detektieren. Diese Zeit ergibt sich aus dem Produkt von Interferogrammzahl und Zeitauflösung, ist jedoch länger als berechnet (4,25 s), da der Interferometerspiegel an seinem Ausgangspunkt zusätzliche Zeit benötigt. Dadurch sind immer vier Interferogramme durch eine Unterbrechung von 12 ms getrennt. In der Regel wurden 81 Drucksprung-Experimente akkumuliert, um ein hinreichend großes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen.

5.3 Bearbeitung der Spektren

Die weitere Verarbeitung der Interferogramme wird mit der Software „Bruker OPUS“ vorgenommen, die auch das Spektrometer steuert. Das Programm hat die Möglichkeit, Prozesse mit Hilfe einer Makrosprache zu automatisieren, was eine Vorraussetzung für die Bearbeitung von 500 Spektren in einer Serie ist. Ebenso kann die Software über eine Pipe oder über DDE von anderen Programmen ferngesteuert werden.

Durch Fouriertransformation erhält man aus den nach der Messung vorliegenden Interferogrammen die benötigten Spektren. Als unbefriedigend erwies sich dabei die Phasenkorrektur, die durchgeführt werden muss, weil die Interferogramme in der Praxis nicht perfekt symmetrisch sind und sich jene Interferogramme, die beim Vor- und Rücklauf des Spiegels aufgenommen wurden, aufgrund von Jitter-Effekten unterscheiden. Einer Phasenkorrektur steht allerdings entgegen, dass die Interferogramme aufgrund der Aufspaltung nur einseitig sind und von der Gegenseite nur wenige Punkte vorhanden sind (10 % der Gesamtpunktzahl). Dadurch hat das Phasenspektrum eine sehr viel geringere

Auflösung, die erst durch Interpolation an die Auflösung der Spektren angepasst werden muss. Weiterhin weisen die Spektren große Bereiche auf, in denen Totalabsorption auftritt, so z. B. :

- $> 3100\,\mathrm{cm}^{-1}$ wegen des Tiefpassfilters,
- 2700–2180 cm^{-1} aufgrund der O–D-Valenzschwingungsbande des D_2O und
- $< 1000\,\mathrm{cm}^{-1}$ bedingt durch die Absorption der Küvettenfenster.

Da der Phasenwinkel $\theta_{\tilde{\nu}}$ nach der Gleichung

$$\theta_{\tilde{\nu}} = \arctan \frac{\Im(\tilde{\nu})}{\Re(\tilde{\nu})} \tag{5.1}$$

aus dem Real- und Imaginärteil errechnet wird, schlägt die Berechnung fehl, wenn weite Teile der Spektren nur aus Rauschen bestehen und somit keine Informationen beinhalten. In der Praxis macht sich die ungenügende Phasenkorrektur dadurch bemerkbar, dass die Wellenzahlen der Bandenmaxima je nach Herkunft der Spektren aus dem ungespaltenen Interferogramm leicht verschoben sind. Bei der weiteren Bearbeitung wird daher das Prinzip angewandt, dass immer nur Spektren gleicher Herkunft bezüglich des ungespaltenen Interferogramms miteinander verrechnet werden dürfen, da diese Spektren den gleichen Phasenfehler haben. Eine endgültige Korrektur des Problems wird als letzter Schritt anhand der kinetischen Kurven der Bandenmaxima vorgenommen, wie es in Kap. 5.4 beschrieben wird.

Das durch die Fouriertransformation erhaltene Einkanalspektrum wird mit einem zuvor gemessenen Einkanalspektrum des Hintergrundes zum Absorptionsspektrum verrechnet und anschließend das Spektrum des reinen Lösungsmittels subtrahiert (Abb. 5.9). Zuvor muss das D_2O-Spektrum durch Multiplikation mit einem Faktor f_{Konz} um den Konzentrationsunterschied zur Lipid-D_2O-Suspension korrigiert werden. Basisliniendifferenzen beider Absorptionsspektren werden in der Variablen ΔA berücksichtigt. Die Variablen f_{Konz} und ΔA werden durch Minimierung der χ^2-Funktion (Gl. 5.2) bestimmt. Dazu muss ein Spektrenabschnitt verwendet werden, in dem nur das Lösungsmittel absorbiert, der aber eine ausgeprägte Bandenstruktur besitzen muss, da die Parameter sonst nicht zu unterscheiden sind. Es wurde die D_2O-Bande im Intervall von 2150–1520 cm^{-1} verwendet, die im Wesentlichen die D_2O-Assoziationsschwingung umfasst, wobei der Spektrenbereich von 1800–1660 cm^{-1} aufgrund der ν(C=O)-Schwingung des Lipids ausgeklammert wurde.

$$\chi^2 = \sum_{\tilde{\nu}} \left(A_{\tilde{\nu}}^{\mathrm{Probe}} - \left(f_{\mathrm{Konz}} \cdot A_{\tilde{\nu}}^{\mathrm{Wasser}} + \Delta A \right) \right)^2 \tag{5.2}$$

Die Subtraktion des H_2O- bzw. D_2O-Spektrums wird von einem in Delphi 6 geschriebenen Programm durchgeführt, welches über DDE mit der OPUS-Software kommuniziert. Es lädt von OPUS die zur Minimierung benötigten Spektrenbereiche des Proben- und D_2O-Spektrums und minimiert nach dem Nelder-Mead-Algorithmus [62], wie er im Buch

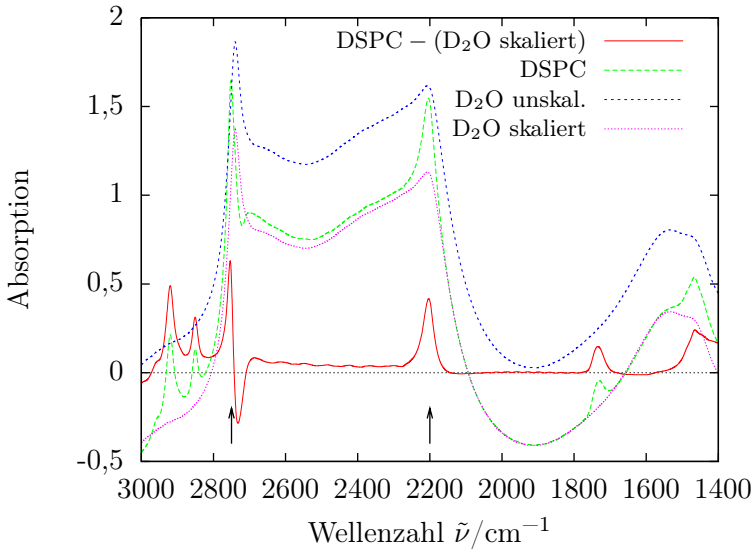

Abb. 5.9: Spektrensubtraktion: das D_2O-Spektrum wurde mit den Parametern $f_{\text{Konz}} = 0{,}975$ und $\Delta A = -0{,}437$ skaliert und vom DSPC-Spektrum (1,5 Ma.-% in D_2O) subtrahiert. Das Differenzspektrum hat aufgrund der unterschiedlichen Bandenform der O–D-Valenzschwingungsbande an den mit Pfeilen markierten Stellen Artefakte, die die weitere Auswertung jedoch nicht beeinflussen.

„Numerical Recipes“ [66] implementiert ist, χ^2. Nach der Bestimmung der Parameter veranlasst das Programm die Subtraktion der Gesamtspektren mit OPUS-eigenen Routinen. Dadurch wird unnötiger Transfer von Daten zwischen den Programmen vermieden.

5.4 Auswertung der Spektren

In einer Serie zeitaufgelöster, um die Lösungsmittel-Absorptionen korrigierter Spektren fallen die Pretrigger-Spektren deutlich durch die (im Vergleich zu den Posttrigger-Spektren) um einen Faktor 2 erhöhten Absorptionen auf (Abb. 5.10). Dies ist in der Druckabhängigkeit der Schichtdicke begründet und wurde in Kap. 5.1.1 beschrieben. Weiterhin tritt bei diesen Spektren im Bereich der O–D-Valenzschwingungsbande eine deutliche Verschiebung der Basislinie zu negativen Werten auf. Dies ist ein Artefakt aufgrund der Totalabsorption, das jedoch keine störenden Konsequenzen nach sich zieht.

Ein detaillierter Blick auf die Maxima der Banden, wie im eingebetteten Plot der Abb. 5.10 für die $\nu_{\text{as}}(CH_2)$-Bande dargestellt, zeigt bereits qualitativ eine Verschiebung der Maxima in Abhängigkeit der Zeit. Zur quantitativen Beschreibung der Zeitabhängigkeit muss die Wellenzahl des Maximums der Banden bestimmt werden. Da die Banden nahezu Basislinien-getrennt sind, ist die in OPUS implementierte „Standardmethode“, die zunächst eine Interpolation mit einem Polynom durchführt und dann den höchsten Wert sucht, ausreichend. Zur Vereinfachung der Maximumssuche werden die Spektren durch Hinzufügen

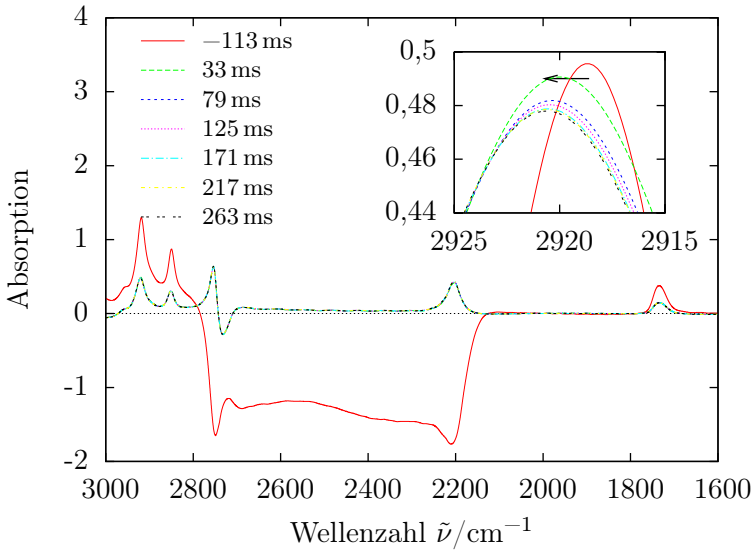

Abb. 5.10: Zeitliche Änderung der Spektren von DSPC (1,5 Ma.-% in D_2O) nach einem Drucksprung von 100 bar Überdruck bei 53,57 °C. Der eingebettete Graph zeigt den Ausschnitt des sich verschiebenden Maximums der $\nu_{as}(CH_2)$-Bande. Die rote Kurve wurde vertikal verschoben.

einer großen Zahl von Nullen zum Interferogramm (Faktor 32) vorher interpoliert, weil mit einer vergleichsweise geringen spektralen Auflösung von 8 cm^{-1} gemessen wurde. Das Erstellen der Zeitachse erfolgt anschließend, indem die in der Spektrendatei gespeicherte Anfangs- und Endzeit der Messung des Interferogramms ausgelesen und gemittelt wird. Diese Abläufe werden mit Hilfe von OPUS-Makros automatisiert.

Ein näherer Blick auf die kinetischen Daten offenbart das in Kap. 5.3 beschriebene Problem der unzureichenden Phasenkorrektur der Spektren. In Abb. 5.11 ist dies anhand der Maximumswellenzahl der $\nu_s(CH_2)$-Bande für 20 Spektren dargestellt. Die Rohdaten zeigen einen starken, systematischen, periodischen Trend (rote Linien). Dieser entsteht dadurch, dass die Wellenzahl je nach Herkunft i ($i = 1 \ldots 4$) des Spektrums aus dem ungespaltenen Interferogramm um den Wert $\Delta\tilde{\nu}_i$ abweicht. Diese Größe wurde bestimmt, indem fünf aufeinander folgende Datenpunkte gleicher Abstammung i zu einem Wert $\overline{\tilde{\nu}_i}$ gemittelt wurden. Diese vier Wellenzahlen $\overline{\tilde{\nu}_i}$ (blaue Linien in Abb. 5.11) wurden wiederum zu einer Größe $\overline{\overline{\tilde{\nu}}}$ gemittelt, so dass $\Delta\tilde{\nu}_i$ nach der Gleichung

$$\Delta\tilde{\nu}_i = \overline{\tilde{\nu}_i} - \overline{\overline{\tilde{\nu}}} \tag{5.3}$$

berechnet werden kann. Die korrigierte Wellenzahl ergibt sich dann durch Subtraktion der Differenz:

$$\tilde{\nu}_i^{\mathrm{korr}} = \tilde{\nu}_i^{\mathrm{unkorr}} - \Delta\tilde{\nu}_i. \tag{5.4}$$

Der so erhaltene Graph ist nur noch durch Rauschen verbreitert (grüne Linie in Abb. 5.11).

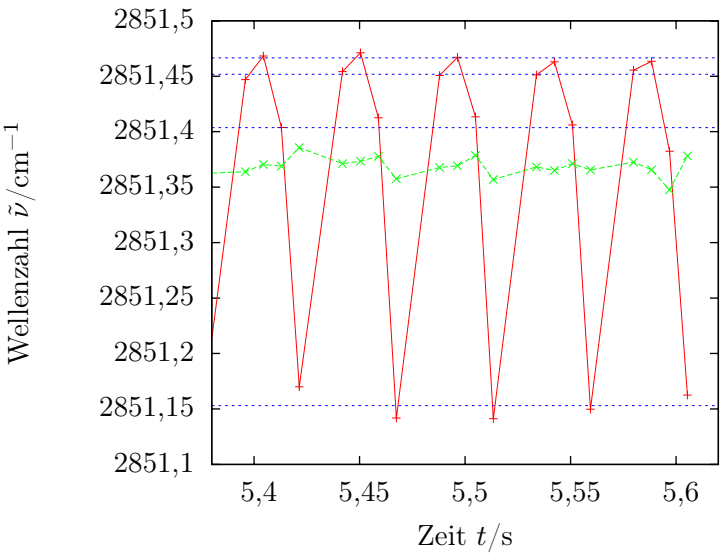

Abb. 5.11: Korrektur des Phasenproblems an den kinetischen $\nu_\mathrm{s}(CH_2)$-Daten. Rot: unkorrigierte Daten mit systematischen periodischen Abweichungen, blau: Mittelwerte $\overline{\tilde{\nu}_i}$, grün: um $\Delta\tilde{\nu}_i$ korrigierte Daten.

Es muss betont werden, dass sich durch diese Art der nachträglichen Bearbeitung die Form des Signals nicht verändert, da sowohl bei den ersten als auch bei den letzten Punkten derselbe konstante Wert $\Delta\tilde{\nu}_i$ subtrahiert wird. Es können somit keine Relaxationsprozesse „weggeglättet“ werden und auch keine neuen Artefakte entstehen. Auch das Rauschen der Kurve bleibt erhalten. Um die Werte sinnvoll zu korrigieren, muss die Zahl der für die Mittelung verwendeten Interferogramme klein gegenüber der Gesamtpunktzahl sein. Es wurden daher immer 20 von 500 Punkte (20 Punkte entsprechen 5 ungeteilte Interferogramme) vom Ende der Kurve verwendet, da dort der Anstieg der Kurve klein ist, so dass nur Werte mit überwiegend statistischen Streuungen in die Mittelung eingehen.

Die nach der unzureichenden Phasenkorrektur geglätteten Kurven der Maximumswellenzahl der $\nu_\mathrm{as}(CH_2)$-, $\nu_\mathrm{s}(CH_2)$- und ν(C=O)-Bande von DSPC in D_2O sind in Abb. 5.12 dargestellt. Wie in Kap. 1.4 ausgeführt, erhöht sich die Wellenzahl der CH_2-Valenzschwingungsbanden mit fortschreitender Zeit, während sich die der ν(C=O)-Bande verringert. Es zeigt sich, dass die Kurven vor Beginn des Drucksprungs ein deutlich größeres Rauschen aufweisen. Dies liegt an der vergrößerten Schichtdicke der Probe unter erhöhtem Druck, was die Absorption der Banden und damit deren Rauschen erhöht. Die ν(C=O)-Kurve hat allgemein ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis, weil im Frequenzbereich der Bande die D_2O-Assoziationsschwingung und das Fenstermaterial (MgO) ebenfalls absorbieren. Zusätzlich heben sich die Drucksprung-bedingten Frequenzverschiebungen nur schwach vom Rauschen ab.

Die ersten zwei Punkte unmittelbar nach dem Druckabfall zeigen deutliche Abweichungen von der erwarteten Kurvenentwicklung (s. eingebettete Graphen in Abb. 5.12). Dabei

handelt es sich um ein Artefakt, der durch die vom Drucksprung ausgelöste Schallwelle hervorgerufen wird. Diese setzt sich über die Kapillaren und die Zelle in das Spektrometer fort und löst Schwingungen des Interferometers aus, welche die Messung erheblich stören. Die betroffenen Interferogramme weisen eine unregelmäßige Basislinie auf, so dass die daraus resultierenden Spektren keinen sinnvollen physikalischen Hintergrund widerspiegeln. Diese zwei Punkte müssen daher vor der Regressionsanalyse (Kap. 6.1.3) der Kurve verworfen werden.

Weiterhin ist aus den eingebetteten Graphen ersichtlich, dass immer vier Punkte von einer geringfügig längeren Pause abgetrennt werden. Dies liegt an der Wartezeit, die das Interferometer einlegt, wenn sich der Spiegel in der Startposition befindet. Auf die Auswertung und Interpretation der erhaltenen kinetischen Daten soll in Kap. 6 eingegangen werden.

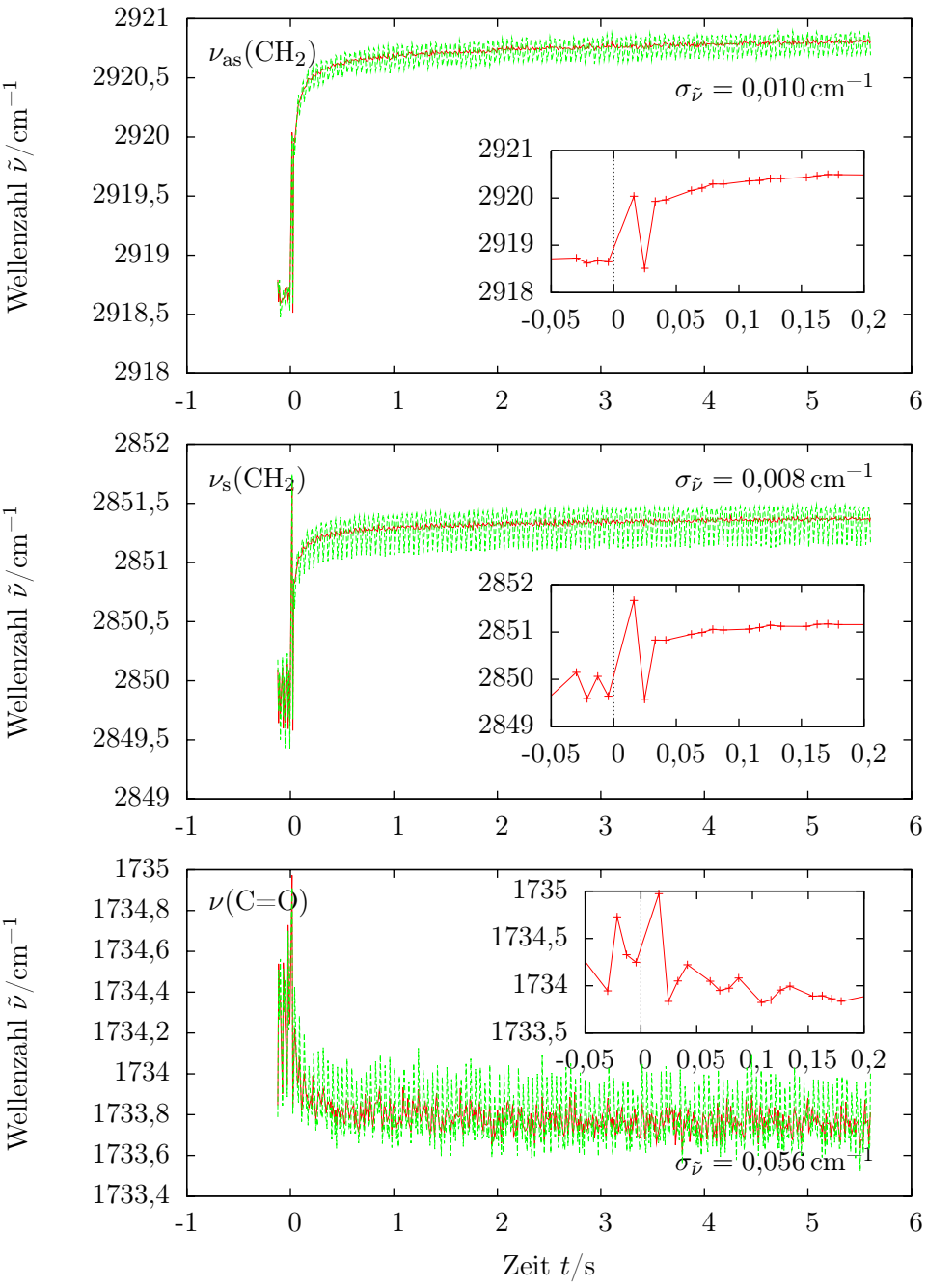

Abb. 5.12: Zeitliche Änderung der Wellenzahl des Maximums der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und $\nu(C{=}O)$-Bande (oben, mittig, unten) von DSPC unter den in Abb. 5.10 gegebenen Bedingungen. Gezeigt sind die Kurven vor (grün) und nach (rot) der Glättung. Angegeben ist die Standardabweichung $\sigma_{\tilde{\nu}}$ der letzten 20 Punkte der geglätteten Daten. Die eingebetteten Graphen zeigen die Entwicklung des Signals in einem engeren Intervall um den Drucksprung.

6 Drucksprung-Relaxationsexperimente mit IR-Detektion

6.1 Materialien und Methoden

6.1.1 Probenpräparation

Alle Lipide wurden bei Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, USA) erworben. Vor der Nutzung wurden sie je dreimal in D_2O suspendiert und wieder gefriergetrocknet, um einen weitestgehenden H/D-Austausch zu erreichen. Alle Lipide wurden als multilamellare Vesikel (1,5 Ma.-%) in D_2O (99,9 %, Glas-destilliert, Aldrich, St. Louis, USA) hergestellt. Dazu wurde die Probe auf eine Temperatur von 10 °C über T_m erwärmt und so lange im Vortexer geschüttelt sowie mit Ultraschall behandelt, bis sie vollständig hydratisiert war. Anschließend wurde sie mit einer Spritze in die IR-Zelle gefüllt, die ebenfalls auf 10 °C über T_m vorgeheizt wurde.

Die DMPA-Probe wurde in 100 mM Phosphatpuffer auf D_2O-Basis präpariert. Dazu wurden die nicht-deuterierten Phosphatsalze (Aldrich) ebenfalls je dreimal mit D_2O versetzt und anschließend im Vakuum getrocknet, um die D-haltigen Salze herzustellen. Die nachfolgend hergestellten Stammlösungen (100mM) wurden gemischt und die Lösung mit Hilfe eines pH-Meters (pMX3000, WTW GmbH, Weilheim, Deustchland) auf einen Wert pD = 6,0 gebracht.

6.1.2 Messung der Spektren

Die zeitaufgelösten Spektren wurden mit der in Kap. 5 beschriebenen Apparatur mit den im Kapitel ebenso angegebenen Parametern gemessen. Alle Spektren – mit Ausnahme der von DMPA – wurden mit MgO als Küvettenfenstermaterial aufgenommen. Da sich diese bei Kontakt mit der DMPA-Probe schnell eintrübten, wurde in diesem Fall CaF_2 verwendet. Da während der zum Teil recht langen Temperatur-Äquilibrierungszeit die Lipide aufschwimmen und dadurch den Strahlengang verlassen, wurden nach der Äquilibrierung, unmittelbar vor einer Messung, drei Drucksprünge ohne Messung durchgeführt, um die Probe wieder zu durchmischen. Die Drucksprungamplitude[1] betrug immer −100 bar.

Unter isothermen Bedingungen wurden jeweils 81 Relaxationsexperimente akkumuliert, um ein hinreichend großes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Bei der Spektrensubtraktion der zeitaufgelösten Spektren wurde von allen Spektren das D_2O- bzw. D_2O-Puffer-

[1] Ein negativer Wert der Druckamplitude bedeutet, dass der Sprung von Überdruck auf Umgebungsdruck durchgeführt worden ist.

Tab. 6.1: Aus der Temperaturabhängigkeit des Maximums der $\nu_s(CH_2)$-Bande bestimmte Umwandlungstemperaturen T_m bei Umgebungsdruck (0 bar) und Überdruck (≈100 bar), sowie die daraus berechneten Clausius-Clapeyron-Koeffizienten dT_m/dp und Volumenänderungen ΔV_m im Vergleich mit der Literatur

Lipid	$T_m^{0\,bar}$ [°C]	$T_m^{100\,bar}$ [°C]	$\Delta T_m/\Delta p$ [K · MPa^{-1}]	dT_m/dp [Ref.] [K · MPa^{-1}]	ΔV_m [ml/mol]	ΔV_m [Ref.] [ml/mol]
DSPC	53,7	55,7 (97 bar)	0,21	0,212 [39]	27,8	31,6 [39]
DPPC	42,1	44,2 (97 bar)	0,22	0,220 [39]	23,5	25,4 [39]
DMPC	27,0	28,9 (96 bar)	0,20	0,230 [39]	15,9	17,6 [39]
DMPA	53,3	54,6 (98 bar)	0,13	—	7,7	—
DMPE	50,1	51,6 (98 bar)	0,15	—	12,6	—

Spektrum der Temperatur $T_m^{0\,bar}$ subtrahiert. Dies erfolgte in der Annahme, dass das D_2O- bzw. D_2O-Puffer-Spektrum in dem engen beobachteten Temperaturintervall (≈1 K um T_m) keine Änderungen aufweisen würde.

Zur Bestimmung der Anfangs- und Endtemperatur des Intervalls, in dem zeitaufgelöste Messungen durchgeführt werden sollen, wurden zuvor statische, d. h. *nicht* zeitaufgelöste Spektren in Abhängigkeit der Temperatur bei Umgebungsdruck und erhöhtem Druck gemessen. Die Verschiebung der Wellenzahl des Maximums der $\nu_s(CH_2)$-Absorptionsbande ist für DSPC stellvertretend für alle vermessenen Lipide in Abb. 6.1 dargestellt. Der Beginn des Intervalls bei Temperaturen $T < T_m^{0\,bar}$ wird so festgelegt, dass die Wellenzahldifferenz beider Kurven bei dieser Temperatur mindestens 0,5 cm^{-1} beträgt. Zeitaufgelöste Messungen bei geringeren Temperaturen sind nicht sinnvoll, da sich die Amplituden der Relaxationsprozesse nicht vom Rauschen abheben würden.

Bei Temperaturen zwischen $T_m^{0\,bar}$ und $T_m^{100\,bar}$ hat die Wellenzahldifferenz beider Kurven in Abb. 6.1 hinreichend große Werte, um zeitaufgelöste Relaxationsmessungen durchführen zu können. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Relaxationskonstante τ bei $T_m^{0\,bar}$ am größten ist und mit steigender Temperatur abfällt, so dass sie bei höheren Temperaturen kleiner als die Totzeit der Apparatur wird und nicht mehr bestimmt werden kann. Als obere Grenze des Messintervalls wurde daher die Temperatur gewählt, bei der die 0 bar-Kurve[2] ihr Plateau erreicht. Bei DSPC ist dieses bei 54,1 °C der Fall. Zeitaufgelöste Messungen an dieser Probe wurden somit im Intervall von 53,2–54,1 °C durchgeführt (Abb. 6.1).

Das Temperaturinkrement der Messung muss größer als die Temperaturgenauigkeit der Apparatur sein. Für die Untersuchungen an DSPC wurde ein Wert von 0,05 K gewählt. Dieser ist damit um einen Faktor fünf größer als die Standardabweichung der Temperaturfluktuation an der Zelle ($\sigma_T \approx 0{,}01$ K, s. Kap. 5.1.4).

Die aus den zeitunabhängigen Messungen ermittelten Umwandlungstemperaturen, sowie die daraus berechneten Clausius-Clapeyron-Koeffizienten $\Delta T_m/\Delta p$ und molaren Umwandlungsvolumina ΔV_m sind in Tab. 6.1 aufgelistet. Die berechneten thermodynamischen

[2] Alle Druckwerte sind relative Angaben. Ein Wert von 0 bar bedeutet demnach Umgebungsdruck.

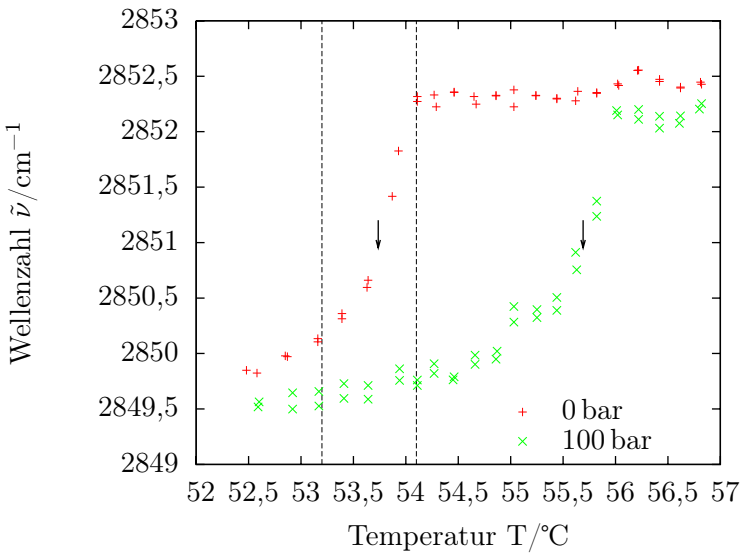

Abb. 6.1: Temperaturabhängigkeit der Wellenzahl des Maximums der $\nu_s(CH_2)$-Absorptionsbande einer Probe von DSPC (1,5 Ma.-% in D_2O) bei Umgebungsdruck (rot) und 100 bar Überdruck (grün). Die Pfeile markieren die Umwandlungstemperaturen $T_m^{0\,bar} = 53{,}7\,°C$ und $T_m^{100\,bar} = 55{,}7\,°C$. Das Temperaturfenster der zeitaufgelösten Messungen wird durch gestrichelte Linien repräsentiert.

Parameter stimmen mit bereits publizierten Werten anderer Autoren überein (Tab. 6.1). Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass die eigenen Werte nur Abschätzungen darstellen, die durch die Messung bei lediglich zwei verschiedenen Drücken ermittelt worden sind, da deren genaue Bestimmung nicht das vorrangige Ziel dieser Arbeit war.

Die tabellierten Umwandlungstemperaturen der untersuchten Lipide fallen bis auf jene der DSPC-Probe zu hoch aus. Die Abweichung von den aus der Literaur bekannten Daten ist dabei um so kleiner, je höher die Umwandlungstemperatur des Lipides ist. Bezüglich der DSPC-Probe wurde ein um 0,8 K zu niedriger T_m-Wert gemessen, so dass die Abweichung negativ ist. Insgesamt zeigt die Differenz, mit Ausnahme des zu DMPA gehörenden Punktes, eine nahezu lineare Abhängigkeit von der Umwandlungstemperatur (Abb. 6.2). Dieser Effekt ist auf Temperaturgradienten in der Zelle und damit verbundene Temperierungsschwierigkeiten, wie sie in Kap. 5.1.4 beschrieben sind, zurückzuführen. Etwaige Verunreinigungen der Substanzen können ausgeschlossen werden, da die mit Kalorimetrie bestimmten T_m-Werte von Proben identischer Charge gut mit Literaturdaten übereinstimmen (Tab. 7.1). Anhand der in Abb. 6.2 gezeigten Ausgleichsgeraden wurden alle in den folgenden Abschnitten genannten Temperaturangaben um die Differenz zwischen dem vom Pt100-Sensor ermittelten Wert und der in der Probe tatsächlich vorherrschenden Temperatur korrigiert.

Die Abweichung der Umwandlungstemperaturen der DMPA-Proben von diesem linearen Trend kann auf geringfügige Unterschiede bei der Probenpräparation und weitere

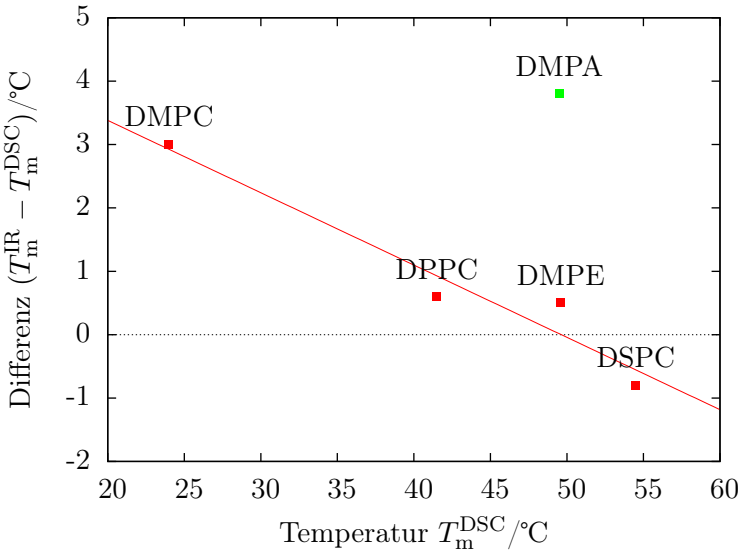

Abb. 6.2: Abweichung der mit FTIR-Spektroskopie bei Umgebungsdruck bestimmten Umwandlungstemperatur T_m^{IR} der Lipide von der mit DSC bestimmten (T_m^{DSC}). Die Daten zeigen mit Ausnahme des Punktes für DMPA einen linearen Abfall.

Veränderungen der Probe während der Messungen zurückgeführt werden. DMPA-Proben tendieren dazu, besonders kleine Vesikel zu bilden, die eine höhere Umwandlungstempertur aufweisen. Erfahrungsgemäß sind die Eigenschaften dieser Proben nicht langzeitstabil, was an einer Serie hintereinander gemessener Kalorigramme nachgewiesen werden kann.

6.1.3 Regressionsanalyse der Daten

Die mit der Spektrenauswertung (Kap. 5.4) erhaltenen kinetischen Daten ($\tilde{\nu}$-t-Kurven) wurden durch eine nichtlineare Regression mit einem multiexponentiellem Modell analysiert:

$$\tilde{\nu}(t) = \tilde{\nu}_0 + \sum_{i=1}^{j} \Delta\tilde{\nu}_i \left(1 - \exp(-t/\tau_i)\right) \qquad \tau_i < \tau_{i+1}. \tag{6.1}$$

Der Parameter $\tilde{\nu}_0$ repräsentiert die zeitunabhängige Wellenzahl des Systems vor dem Drucksprung (bei erhöhtem Druck). Er wurde durch Mittelwertbildung aller Pretriggerpunkte bestimmt und während der Regression konstant gehalten. Die Anzahl der exponentiellen Terme j wurde vor der Regression durch „Sichtbarkeit“ der Relaxationsprozesse beim Betrachten der Daten bestimmt. Da bei einem mit ms-Auflösung gemessenen Zeitintervall von 5,6 s drei Größenordnungen abgedeckt werden, wurden zumeist ebenso drei Exponentialterme angesetzt. Die Zahl wurde auf $j = 2$ verringert, wenn die Kurve stark verrauscht war. Eine höhere Zahl an exponentiellen Termen würde χ^2 weiter sinken lassen, jedoch haben die Werte der τ_i keinen physikalischen Hintergrund mehr, da sie

sich nicht mehr ausreichend unterscheiden. Geringfügige systematische Abweichungen der Residuen im Modell mit $j = 3$ müssen daher akzeptiert werden (Abb. 6.3).

Die τ_i-Parameter wurden Grenzwertbedingungen unterworfen, um sie unterscheidbar und in einer aufsteigenden Ordnung zu erhalten. Realisiert wurde dies durch die Funktion

$$\mathrm{AbsLim}(\tau_{\min}, \tau_i) = \begin{cases} \mathrm{Abs}(\tau_{\min}), & \mathrm{Abs}(\tau_i) \leq \mathrm{Abs}(\tau_{\min}) \\ \mathrm{Abs}(\tau_i), & \mathrm{Abs}(\tau_i) > \mathrm{Abs}(\tau_{\min}) \end{cases} \tag{6.2}$$

welche verhindert, dass die Zeitkonstanten negativ werden und eine untere Grenze $\tau_{\min}$ unterschreiten. Die schnellen, von der Apparatur nicht auflösbaren Prozesse wurden durch den Parameter $\tau_1 = 1\,\mathrm{ms}$ beschrieben, der nicht variiert wurde. Während die Bestimmung der Amplituden $\Delta\tilde{\nu}_i$ unproblematisch ist, müssen die Ergebnisse für die Zeitkonstanten τ_i kritisch betrachtet werden. Dies gilt speziell für die Fälle, wenn

- die Amplitude $\Delta\tilde{\nu}_i$ des Prozesse in der Größenordnung des Rauschens liegt,
- der Wert für τ_i nur wenig größer als die Zeitauflösung ist oder
- der τ_i-Wert größer als die Messdauer des Experimentes ist.

Die Ergebnisse haben dann keinen sinnvollen physikalischen Hintergrund.

Zur Behandlung der Pretrigger-Punkte wurde eine Funktion

$$\mathrm{Pos}(t) = \begin{cases} 0, & t \leq 0 \\ t, & t > 0 \end{cases} \tag{6.3}$$

eingeführt, die negative Zeiten auf den Zustand $t = 0$ einfriert. Diese Funktion wurde in der Art $\mathrm{Pos}(t - t_0)$ verwendet, so dass Daten mit einem Startzeitpunkt $t_0 \neq 0$ verwendet werden konnten. Die Regression wurde mit einem in Borland Delphi 6 geschriebenen Programm ausgewertet. Zur Minimierung der χ^2-Funktion wurde der Algorithmus nach Nelder und Mead [62, 66] verwendet.

6.2 Ergebnisse

Zeitaufgelöste IR-Spektren einer DSPC-D_2O-Suspension wurden bereits in Abb. 5.10 dargestellt. Die Spektren der anderen untersuchten Lipide sehen ähnlich aus, so dass auf eine Darstellung an dieser Stelle verzichtet werden soll. Die Temperaturangaben wurden um die Temperaturdifferenz, die zwischen Sensor und Probe auftritt (Abb. 6.2) korrigiert.

6.2.1 DSPC

Die zeitliche Entwicklung der Wellenzahl des Maximums der $\nu_{\mathrm{as}}(CH_2)$-, $\nu_{\mathrm{s}}(CH_2)$- und ν(C=O)-Absorptionsbande einer Probe von DSPC (1,5 Ma.-% in D_2O) nach einem Drucksprung von 100 bar Überdruck auf Umgebungsdruck bei verschiedenen Temperaturen

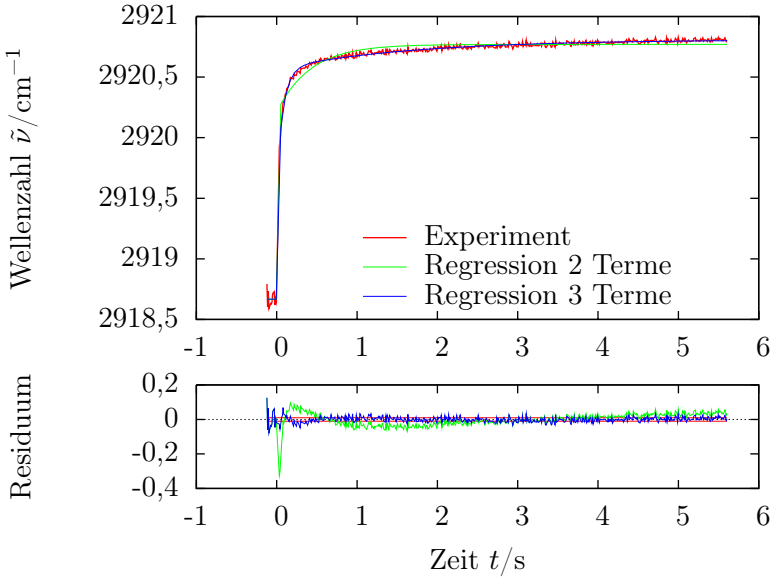

Abb. 6.3: Regression und Residuen (mit Standardabweichung der Posttriggerpunkte) der kinetischen Kurve aus Abb. 5.12 mit dem Modell nach Gl. 6.1 für $j = 2$ (grün) und $j = 3$ (blau). Mit steigendem j verringert sich χ^2, jedoch sind die Zeitkonstanten τ_i nicht mehr unterscheidbar. Parameter ($j = 2$): $\tau_2 = 0{,}42\,\mathrm{s}$; Parameter ($j = 3$): $\tau_2 = 81{,}6\,\mathrm{ms}$, $\tau_3 = 1{,}66\,\mathrm{s}$

um $T_\mathrm{m}^{0\,\mathrm{bar}}$ ist in Abb. 6.4 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass sich die Wellenzahl der C–H-Schwingungen mit zunehmender Zeit erhöht. Das Maximum der ν(C=O)-Bande verschiebt sich dagegen zu niedrigeren Wellenzahlen.

Während die bei 54,35 °C aufgenommen Kurven (grüne Daten) nahezu den Charakter einer Rechteckfunktion haben, sind die Kurven bei geringeren Temperaturen deutlich abgerundeter. Dies lässt bereits qualitativ erkennen, dass der Kurve mehrere Relaxationsprozesse zugrundeliegen, wobei ein Großteil der Amplitude zu Prozessen gehört, die zeitlich nicht aufgelöst werden können. Die größte im beobachteten Temperaturintervall gemessene Wellenzahlverschiebung beträgt bei den $\nu_\mathrm{as}(\mathrm{CH_2})$-Bande $3\,\mathrm{cm}^{-1}$, für die $\nu_\mathrm{s}(\mathrm{CH_2})$-Bande $2\,\mathrm{cm}^{-1}$ und nur $1\,\mathrm{cm}^{-1}$ bei der ν(C=O)-Absorptionsbande.

Die durch die Regression ermittelten Amplituden $\Delta\tilde{\nu}_i$ sind in Abb. 6.5 dargestellt. Die Diagramme, welche sich auf die C–H-Schwingungen beziehen, zeigen eine gute Übereinstimmung der Kurvenform, wenngleich die genauen Werte für $\Delta\tilde{\nu}_i$ unterschiedlich sind. Der Verlauf der $\sum \Delta\tilde{\nu}_i$-Kurve entspricht der des Umwandlungsgrades $\Delta\theta(T)$ (Abb. 2.1), die ein Maximum zwischen $T_\mathrm{m}^{100\,\mathrm{bar}}$ und $T_\mathrm{m}^{0\,\mathrm{bar}}$ hat. Dieses liegt bei den gemessenen Amplitudenkurven in Abb. 6.5 jedoch außerhalb des beobachteten Temperaturintervalls. Die Maxima der Einzelamplituden verschieben sich für die langsameren Prozesse zu geringeren Temperaturen. Das Maximum der $\Delta\tilde{\nu}_1$-Kurve liegt noch außerhalb des detektierten Temperaturintervalles, das der $\Delta\tilde{\nu}_2$-Daten bei 54,3 °C und 54,17 °C für $\Delta\tilde{\nu}_3$. Generell sind die $\Delta\tilde{\nu}_i$-Werte umso kleiner, je langsamer der Prozess abläuft. Die Amplitudendaten der ν(C=O)-Kurven streuen aufgrund des starken Rauschens und der geringeren Gesamtam-

plitude im Vergleich zu den $\nu(CH_2)$-Kurven sehr viel stärker, insbesondere am unteren Temperaturlimit.

Die $\tau_i(T)$-Daten in Abb. 6.5 zeigen starke Streuungen im unteren Temperaturbereich bis max. 53,8 °C. Aufgrund der dort vorherrschenden kleinen Amplitude sind die Zeitkonstanten nicht hinreichend genau bestimmbar. Bei den ν(C=O)-Daten ist diese Streuung nochmals verschärft. Die Relaxationskonstanten τ_1 und τ_2 unterscheiden sich um eine Größenordnung. Die Kurven zeigen ein Maximum bei 54,06 °C. Die Zeitkonstanten betragen bei dieser Temperatur 0,8 s (τ_2) und 1,8 s (τ_3), unabhängig davon, ob sie von der $\nu_{as}(CH_2)$- oder $\nu_s(CH_2)$-Kurve bestimmt worden sind.

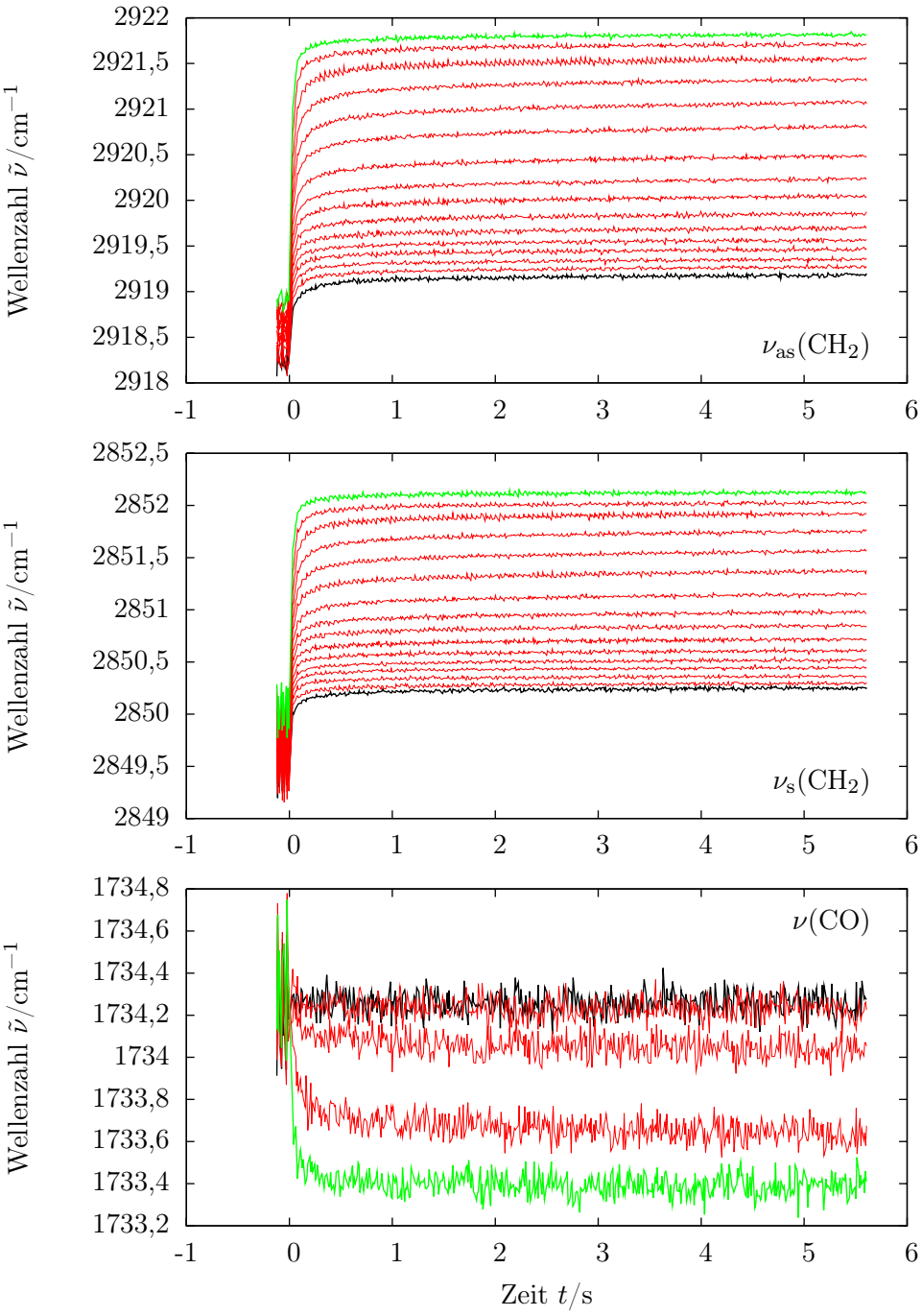

Abb. 6.4: Zeitliche Änderung der Wellenzahl des Maximums der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_{s}(CH_2)$- und ν(CO)-Bande (oben, mittig, unten) von **DSPC** bei 53,51 °C (—), 54,35 °C (—) und Zwischentemperaturen (—).

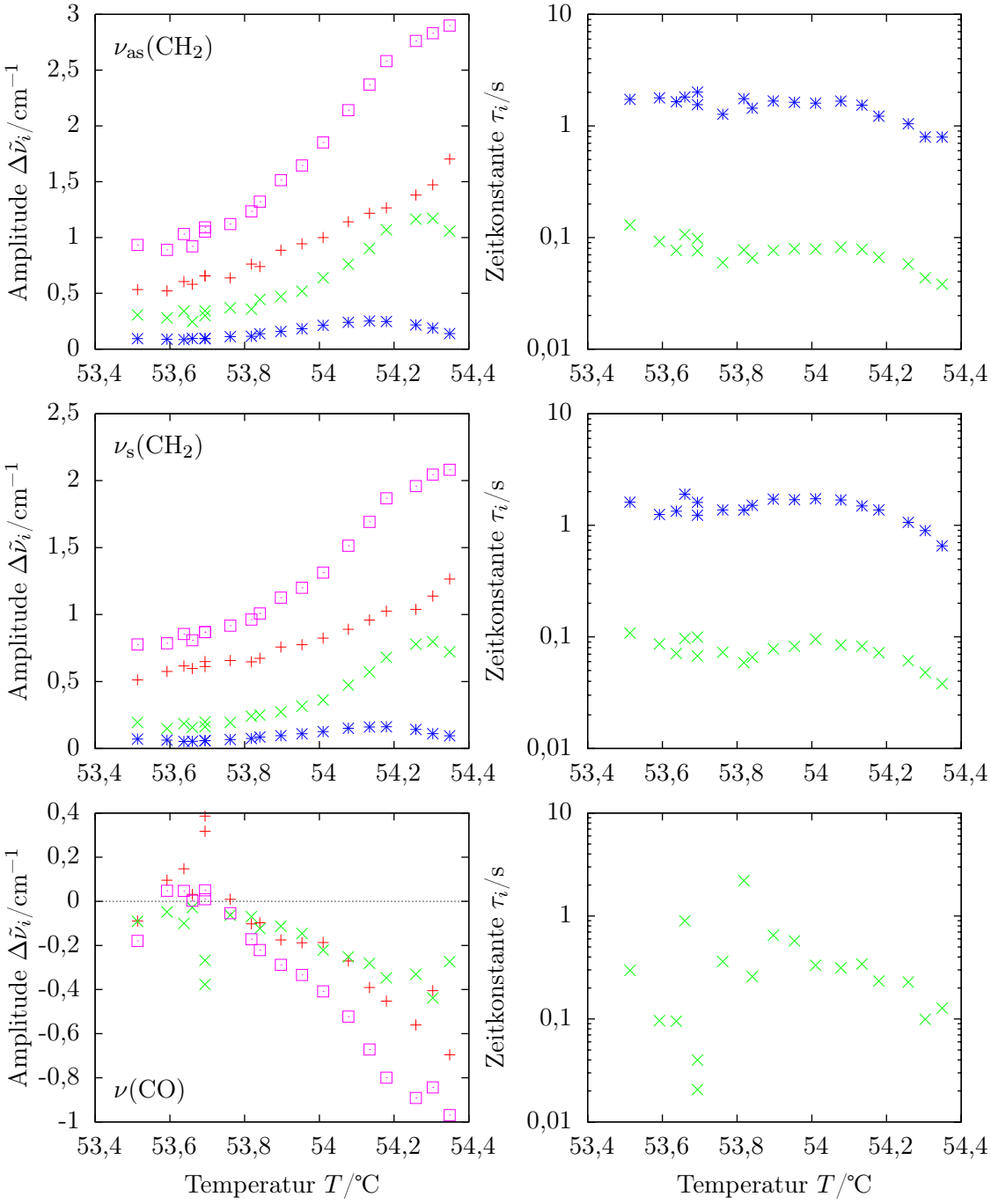

Abb. 6.5: Amplituden (links) und Zeitkonstanten (rechts) der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und $\nu(CO)$-Bande (oben, mittig, unten) von **DSPC**.
Amplituden: $\Delta\tilde{\nu}_1$ (+), $\Delta\tilde{\nu}_2$ (×), $\Delta\tilde{\nu}_3$ (∗), $\sum\Delta\tilde{\nu}_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (1 ms const., nicht gezeigt), τ_2 (×), τ_3 (∗)

6.2.2 DPPC

Die gemessenen kinetischen Kurven einer DPPC-Probe (1,5 Ma.-% in D_2O) sind in der Abb. 6.6 dargestellt. Der Trend der mit steigender Temperatur ansteigenden Gesamtamplitude der Wellenzahl ist auch bei DPPC zu beobachten. Auffällig ist der langsame, bei längeren Zeiten nahezu linear verlaufende Abfall jener Kurven, die aus den C–H-Streckschwingungsbanden gewonnen wurden. Diesen Kurven wurde ein Modell mit drei exponentiellen Termen ($j = 3$) angepasst. Da die Amplitude des Abfalles sehr klein und die Zeitkonstante dagegen sehr groß ist, liefert die Regressionsanalyse irregulär große Werte für τ_3 und $\Delta\nu_3$. Daher wurde auf die Darstellung dieser Regressionsergebnisse in Abb. 6.7 verzichtet. Diese wurden ebenso bei der Berechnung der $\sum \Delta\nu_i$-Kurve ignoriert. Die ν(C=O)-t-Kurven zeigen gleichermaßen ein abweichendes Verhalten gegenüber den entsprechenden Daten von DSPC (Kap. 6.2.1): Manche Kurven steigen zunächst an, bevor sie anschließend abfallen. Insgesamt ist der Effekt der Wellenzahlverschiebung zu klein, so dass das Rauschen der Kurven und die Fehler bei der Spektrensubtraktion in der Kurvenform dominieren.

Die $\sum \Delta\tilde{\nu}_i$-Kurve bleibt bei niedrigen Temperaturen für die ersten Punkte konstant und steigt ab 41,24 °C steil an, bzw. fällt bei den ν(C=O)-Daten steil ab. Alle Maxima der $\Delta\tilde{\nu}_i$-Werte liegen außerhalb des beobachteten Temperaturintervalls. Im Bereich von 40,90–41,24 °C sind die $\Delta\tilde{\nu}_2$-Daten der C–H-Streckschwingung im negativen Bereich.

Im Temperaturverhalten der Relaxationskonstanten τ_2 deutet sich in der $\nu_{as}(CH_2)$-Kurve bei 41,02 °C bzw. in den $\nu_s(CH_2)$-Daten bei 41,24 °C ein scharfer Peak an, der jedoch nicht gut aufgelöst ist, da die Temperaturpunkte nicht eng genug gesetzt werden konnten. Die aus den ν(C=O)-Daten gewonnenen Zeitkonstanten lassen keine systematischen Trends erkennen.

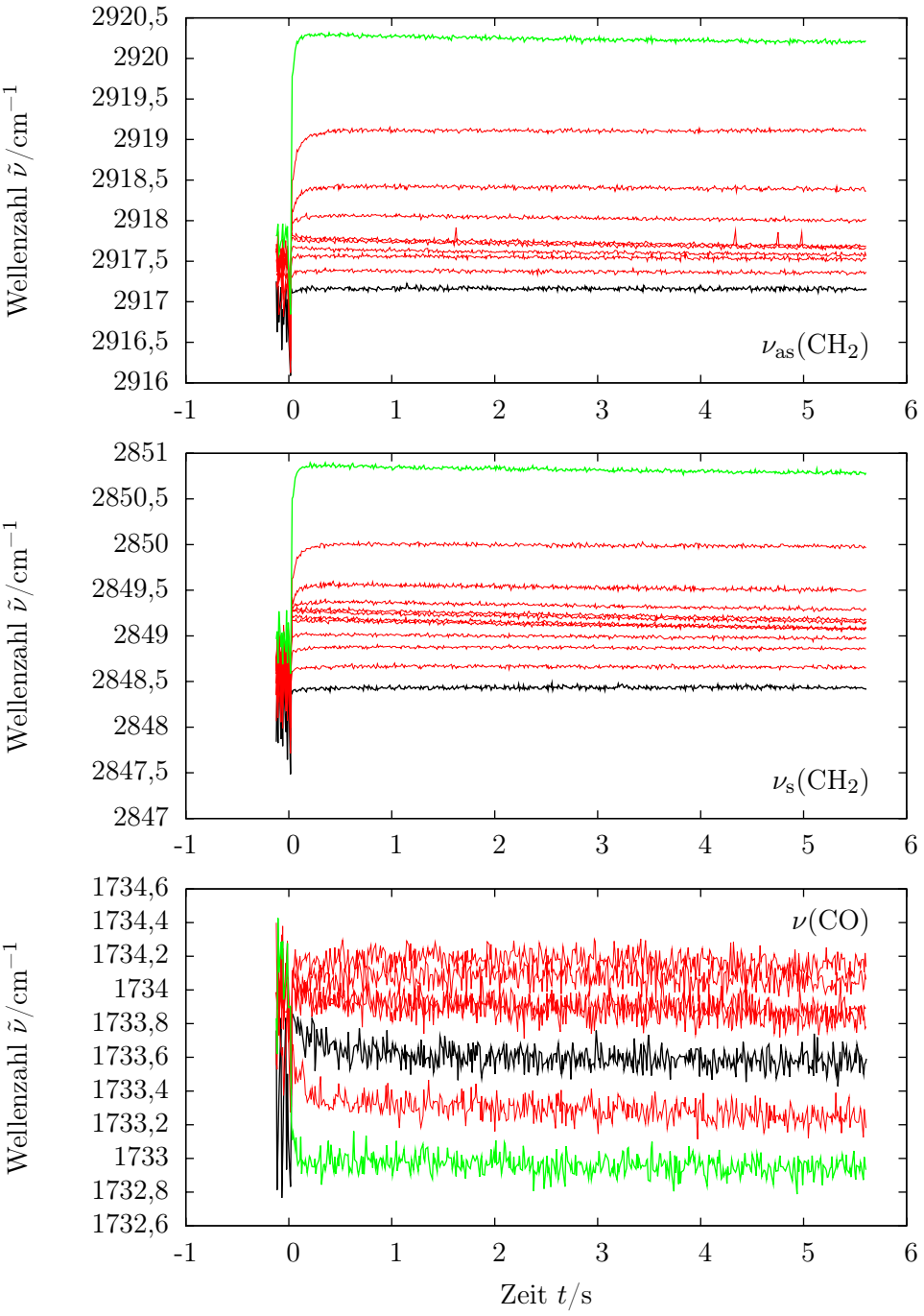

Abb. 6.6: Zeitliche Änderung der Wellenzahl des Maximums der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und ν(CO)-Bande (oben, mittig, unten) von **DPPC** bei 40,67 °C (—), 41,65 °C (—) und Zwischentemperaturen (—).

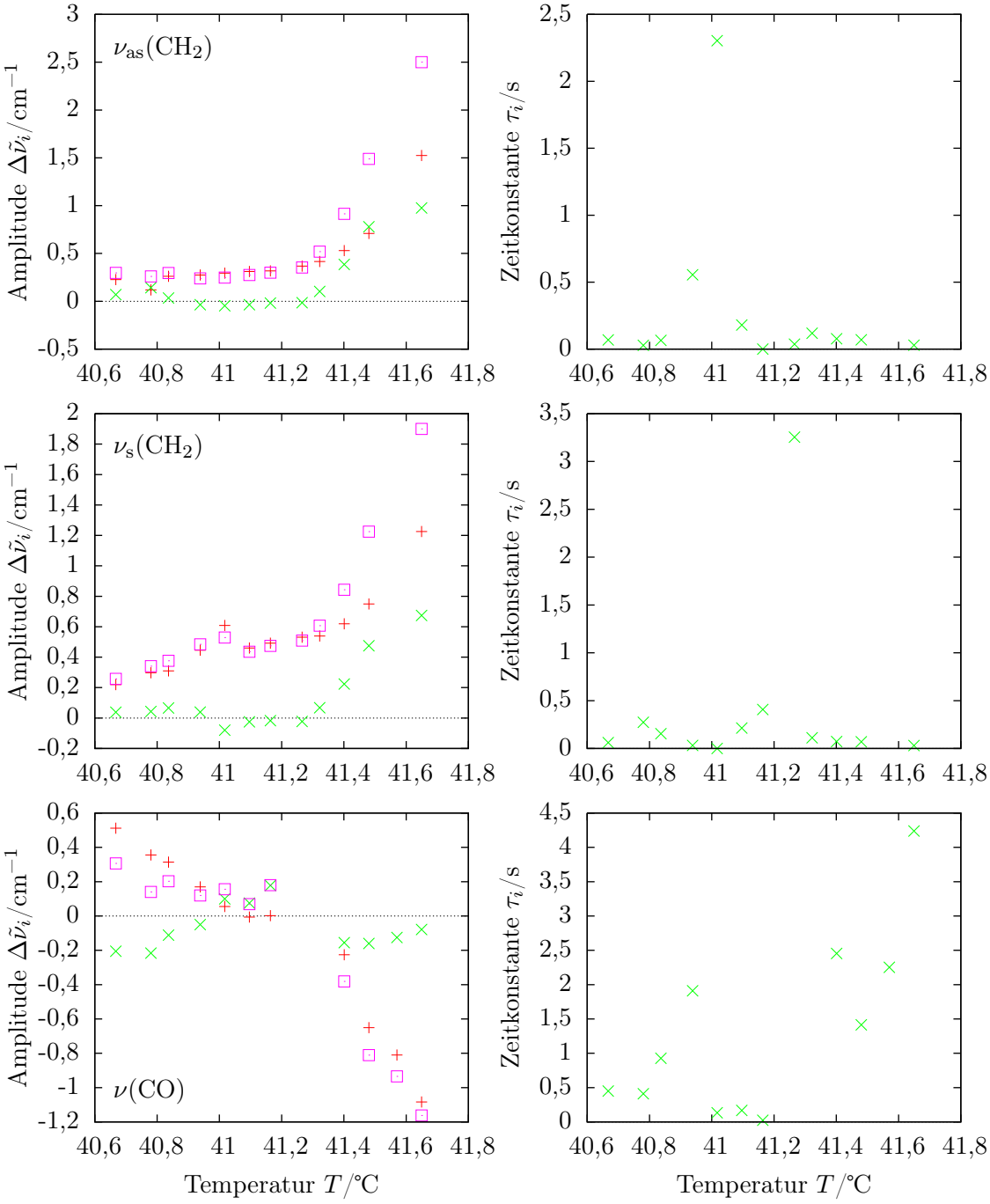

Abb. 6.7: Amplituden (links) und Zeitkonstanten (rechts) der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und $\nu(CO)$-Bande (oben, mittig, unten) von **DPPC**.
Amplituden: $\Delta\tilde{\nu}_1$ (+), $\Delta\tilde{\nu}_2$ (×), $\sum\Delta\tilde{\nu}_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (1 ms const., nicht gezeigt), τ_2 (×)

6.2.3 DMPC

Die zeitlich aufgelösten Maximaverschiebungen der IR-Banden von DMPC (Abb. 6.8) zeigen den gleichen Effekt des langsamen Abfallens der Wellenzahl der C–H-Streckschwingungsbanden wie DPPC. Es wurde deshalb gleichfalls ein Modell mit drei exponentiellen Termen zur Analyse benutzt, wobei der dritte Relaxationsprozess in Abb. 6.9 nicht dargestellt ist.

Der Temperaturverlauf der Gesamtamplitude $\Delta\tilde{\nu}_i$ hat eine sigmoide Form, wobei sich die Umwandlung in einem engen Intervall von lediglich 0,2 °C vollzieht (Abb. 6.9). Aufgrund dieser hohen Kooperativität reicht die Temperaturgenauigkeit der Apparatur nicht aus, um den Phasenübergang gut aufzulösen. Während die $\Delta\tilde{\nu}_1$-Kurve kein Maximum im vermessenen Temperaturintervall hat, zeigt die $\Delta\tilde{\nu}_2$-Kurve ein Maximum bei 24,37 °C. Die aus den ν(C=O)-Banden gewonnenen Amplituden und Zeitkonstanten ergeben aufgrund des starken Rauschens keine auswertbare Temperaturabhängigkeit. Bezüglich der C–H-Streckschwingungsbanden gilt dies lediglich für den Temperaturverlauf der Relaxationskonstanten.

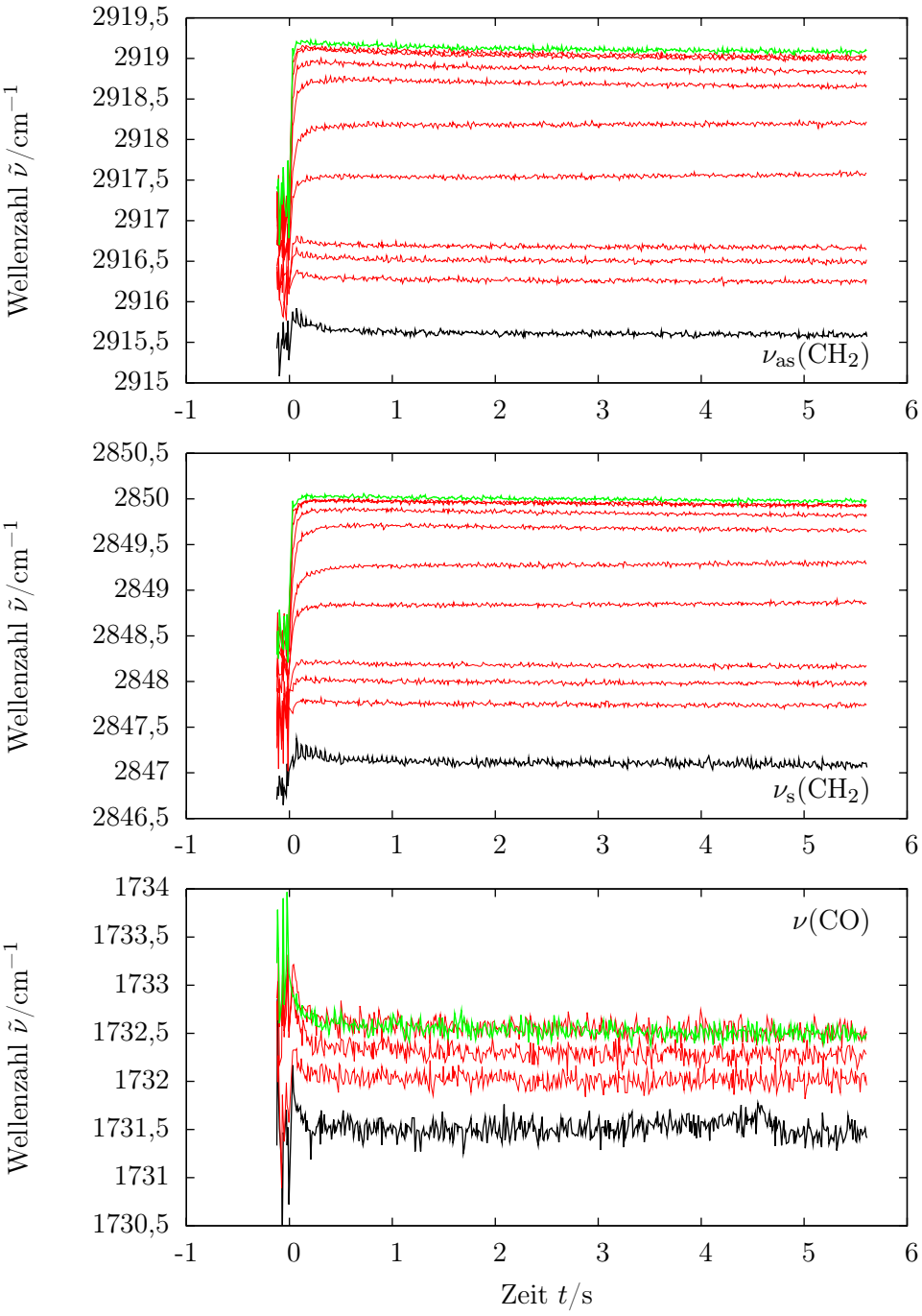

Abb. 6.8: Zeitliche Änderung der Wellenzahl des Maximums der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und ν(CO)-Bande (oben, mittig, unten) von **DMPC** bei 23,89 °C (—), 24,57 °C (—) und Zwischentemperaturen (—).

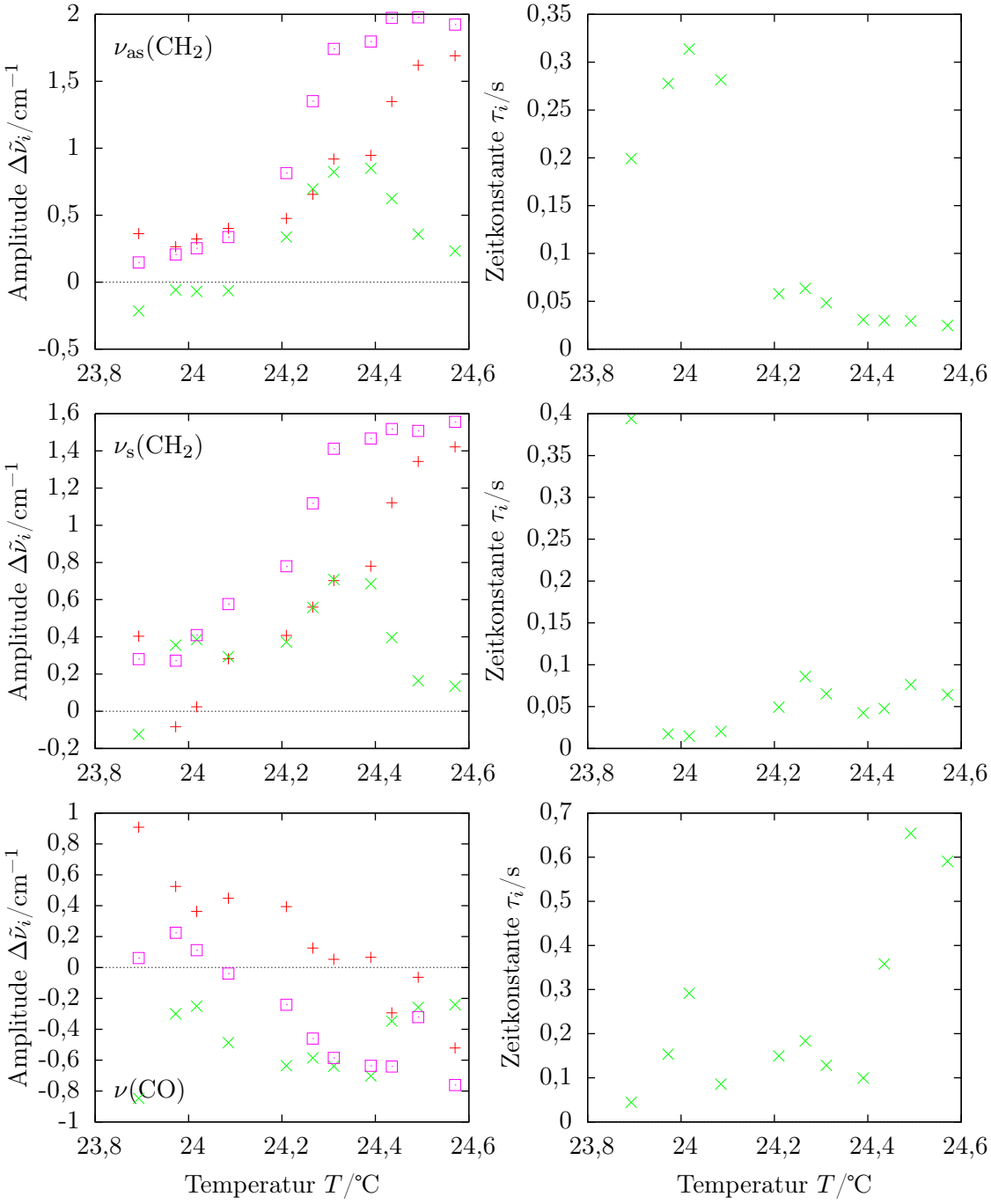

Abb. 6.9: Amplituden (links) und Zeitkonstanten (rechts) der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und $\nu(CO)$-Bande (oben, mittig, unten) von **DMPC**.
Amplituden: $\Delta\tilde{\nu}_1$ (+), $\Delta\tilde{\nu}_2$ (×), $\sum\Delta\tilde{\nu}_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (1 ms const., nicht gezeigt), τ_2 (×)

6.2.4 DMPA

Beim Betrachten des Verlaufs der kinetischen Umwandlungskurven von DMPA in Abb. 6.10 fällt auf, dass sich die Kurven zwar in der Amplitude unterscheiden, jedoch eine nahezu identische Kurvenform besitzen. Dies lässt eine nur schwach ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der Relaxationskonstante erwarten.

Die graphische Darstelllung der Amplituden in Abb. 6.11 zeigt, dass der Hauptteil der Umwandlung im Temperaturintervall von 53–55 °C stattfindet. Die Gesamtamplitude hat ein Maximum bei 54,3 °C. Die Kurven der Teilamplituden zeigen Maxima bei der gleichen Temperatur. Wiederum sind die Amplituden umso kleiner, je langsamer der Prozess abläuft. Generell sind die Wellenzahländerungen der C–H-Valenzschwingungen von DMPA kleiner als die der Phosphocholine. Das Maximum der Gesamtamplitude der ν(C=O)-Daten ist dagegen größer als bei den Phosphatidylcholinen.

Die Zeitkonstanten der C–H-Streckschwingungskurven zeigen übereinstimmend Werte der Größenordnung 10^{-1} s und 10^{0} s. Ein Kurvenmaximum deutet sich insbesondere bei den $\nu_{\mathrm{s}}(CH_2)$-Daten bei 53,4 °C als Häufung von Punkten an. Ein stark ausgeprägtes Extremum war aufgrund der nahezu parallelen Kurvenverläufe nicht zu erwarten.

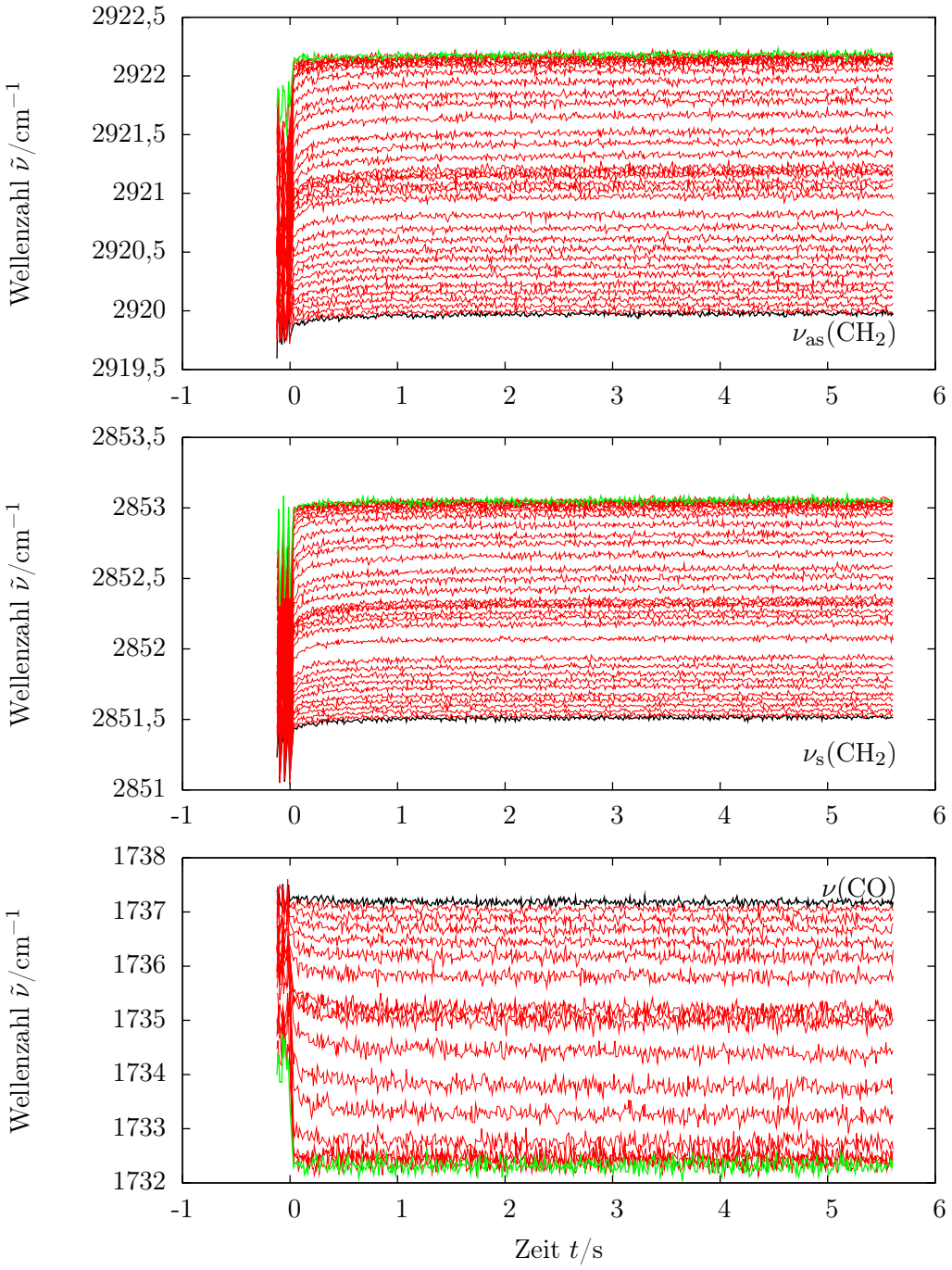

Abb. 6.10: Zeitliche Änderung der Wellenzahl des Maximums der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und $\nu(CO)$-Bande (oben, mittig, unten) von **DMPA** bei 48,90 °C (—), 54,96 °C (—) und Zwischentemperaturen (—).

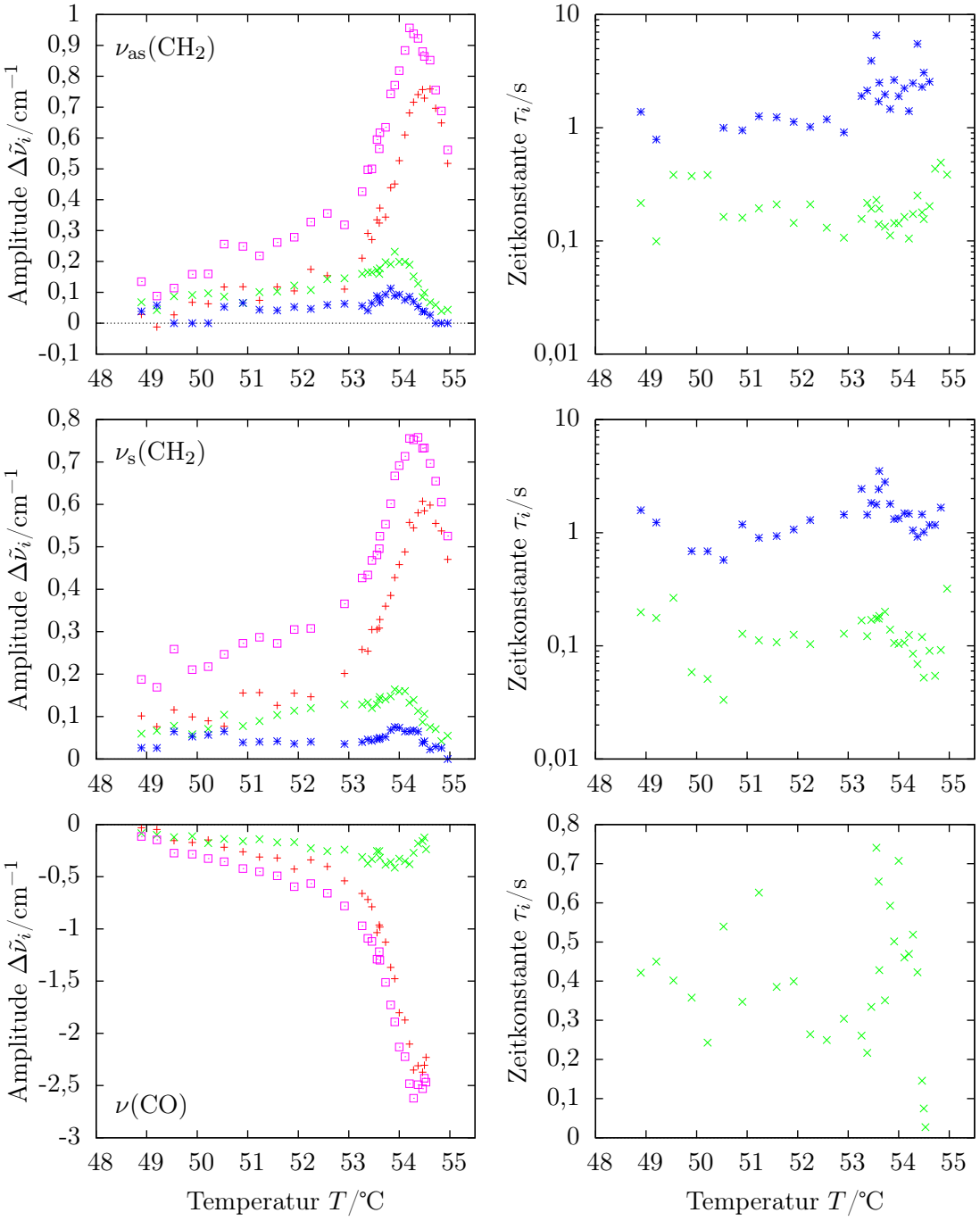

Abb. 6.11: Amplituden (links) und Zeitkonstanten (rechts) der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und $\nu(CO)$-Bande (oben, mittig, unten) von **DMPA**.
Amplituden: $\Delta\tilde{\nu}_1$ (+), $\Delta\tilde{\nu}_2$ (×), $\Delta\tilde{\nu}_3$ (∗), $\sum\Delta\tilde{\nu}_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (1 ms const., nicht gezeigt), τ_2 (×), τ_3 (∗)

6.2.5 DMPE

Im Gegensatz zu DMPA zeigen die Wellenzahl-Zeit-Daten von DMPE (Abb. 6.12) qualitativ deutliche Änderungen der Zeitkonstanten der Relaxationskurven in Abhängigkeit von der Temperatur. Beim Betrachten sind zwei Relaxationsprozesse sichtbar, so dass das Regressionsmodell Gl. 6.1 für alle Banden mit dem Parameter $j = 2$ angewandt wurde.

Die aus den C–H-Valenzschwingungsbanden extrahierten temperaturabhängigen Daten der Gesamtamplitude (Abb. 6.13) zeigen ein Maximum bei 50,27 °C. Dies ist auch für die $\Delta\tilde{\nu}_2$-Kurve derselben Bande der Fall. Bei den $\Delta\tilde{\nu}_1$-Daten kann lediglich von einem Plateau gesprochen werden. Die auf die ν(C=O)-Bande zurückgehenden Amplituden sind wegen der geringen Wellenzahlverschiebungen, welche sich nur in der Nachkommastelle ändern, stark von Artefakten geprägt. So sind die $\Delta\tilde{\nu}_1$-Werte durch Fehler bei der Spektrensubtraktion positiv. Dadurch verfälschen sich die $\sum \Delta\tilde{\nu}_i$-Daten. Lediglich die $\Delta\tilde{\nu}_2$-Werte zeigen ein Minimum bei 50,3 °C.

Die Relaxationskonstanten zeigen für die C–H-Streckschwingungsbanden ein ausgeprägtes Maximum bei 50,0 °C. Der langsamste Prozess hat eine Relaxationszeit τ_2 von 0,9 s. Die Kurvenform hat für beide C–H-Banden eine vergleichbare, nahezu symmetrische Peakform mit einer Breite von 1 °C bei halber Höhe. Die aus der ν(C=O)-Absorptionsbande berechneten Zeitkonstanten zeigen aufgrund starker Streuung keine derartige Peakform. Lediglich die Werte haben dieselbe Größenordnung.

6.3 Diskussion

Die meisten bisher publizierten Daten über die Kinetik der Lipid-Phasenumwandlung (Kap. 2.2.2) zeigen, dass während der Umwandlung eine Vielzahl von Prozessen ablaufen, die auf unterschiedlichen Zeitskalen angesiedelt sind. Jedoch lassen die gewählten Untersuchungsmethoden keine Rückschlüsse darüber zu, welcher Art diese Prozesse sind. Es konnte daher nur angenommen werden, dass konformationelle Änderungen der Alkylketten der Lipidmoleküle ein Glied in dieser Abfolge von Prozessen darstellen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten, mit FTIR-Detektion erhaltenen Daten zeigen nun, dass Konformationsänderungen, die eine Verschiebung der symmetrischen und antisymmetrischen C–H-Streckschwingungsbanden hervorrufen, nicht nur *einen* Prozess in dieser Abfolge darstellen, sondern vielmehr selber in *mehrere* Prozesse gegliedert sind, die wiederum auf Zeitskalen unterschiedlicher Größenordnungen angesiedelt sind. Wie im Kap. 6.1.3 ausgeführt wurde, lassen sich die Kurven mit einer festgelegten Zahl von Relaxationsprozessen *nicht* exakt beschreiben. Vielmehr zeigen die kinetischen Kurven, dass es sich um ein Spektrum von Zeitkonstanten handelt, welches nicht aufgelöst, sondern nur durch Annahme einer Mindestzahl von Prozessen angenähert werden kann.

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Systemen entfällt der Hauptteil der Gesamtamplitude (>50 %) auf Prozesse, die nicht aufgelöst werden können. Das bedeutet, dass die konformationellen Änderungen der Moleküle zu einem Großteil bereits innerhalb der Totzeit der Apparatur (≈ 4 ms) abgeschlossen sind. Die langsameren, auflösbaren Prozesse sind zu einem viel kleineren Teil an der Gesamtamplitude beteiligt. Dabei gilt die Regel,

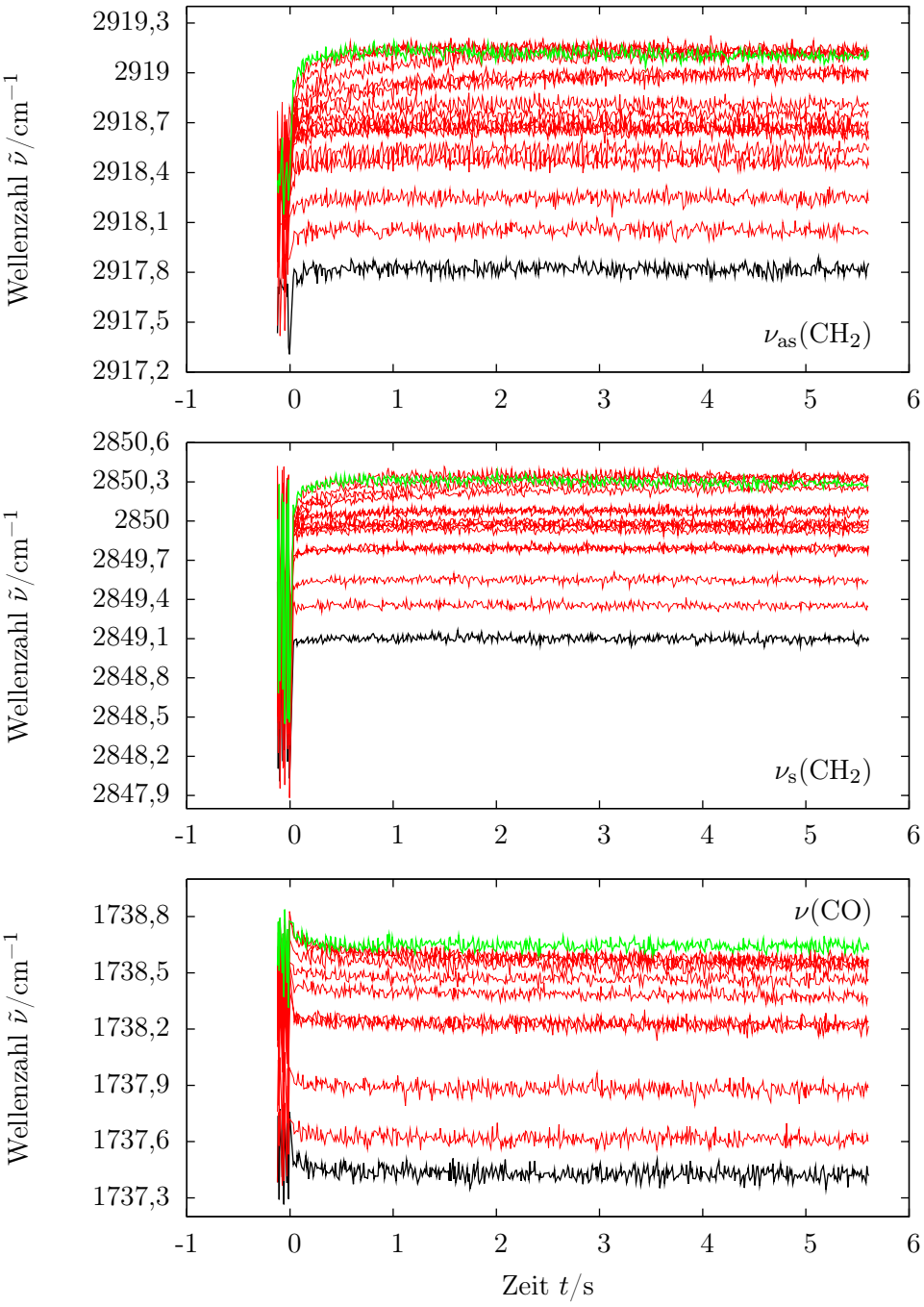

Abb. 6.12: Zeitliche Änderung der Wellenzahl des Maximums der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und ν(CO)-Bande (oben, mittig, unten) von **DMPE** bei 48,65 °C (—), 55,03 °C (—) und Zwischentemperaturen (—).

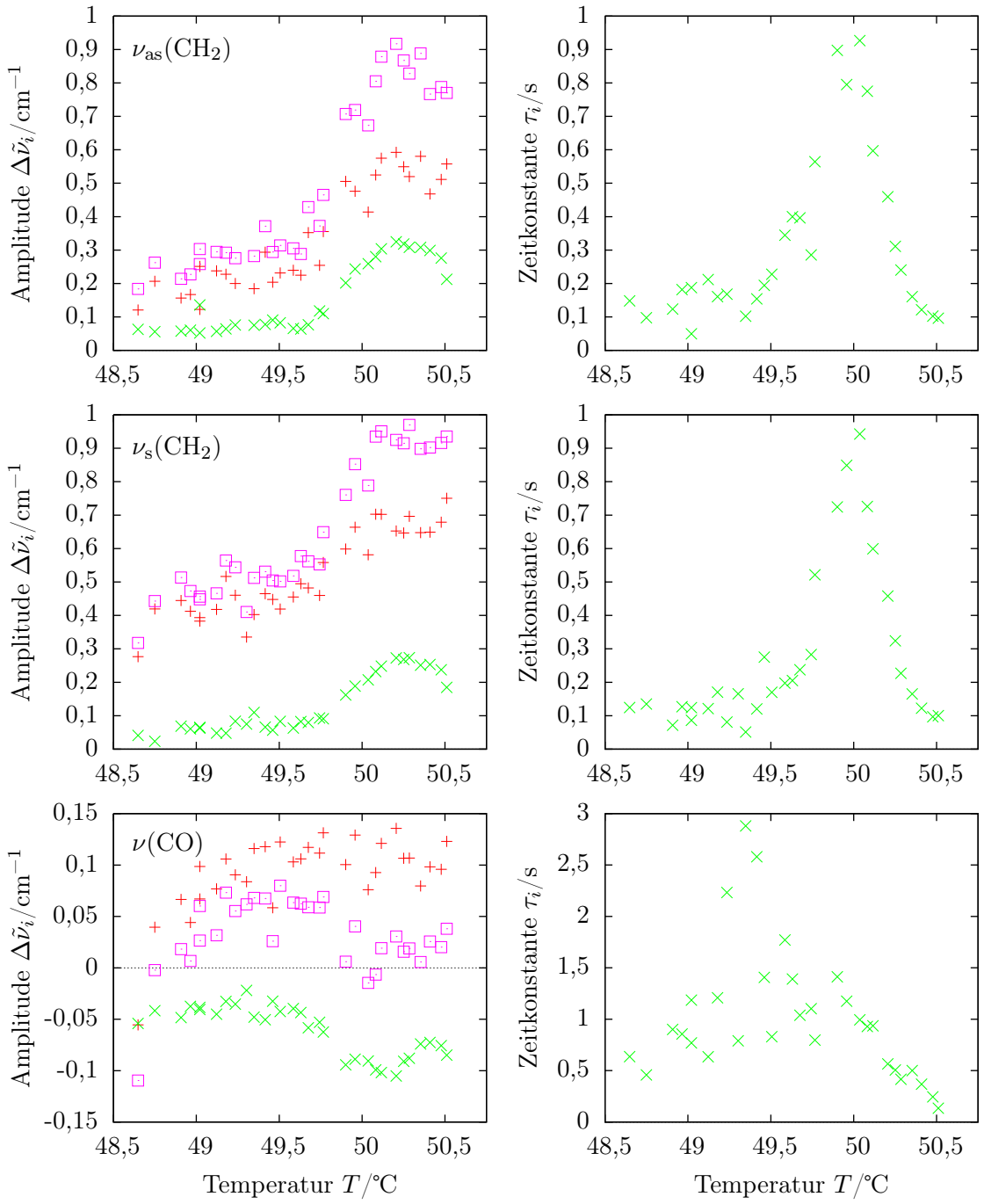

Abb. 6.13: Amplituden (links) und Zeitkonstanten (rechts) der $\nu_{as}(CH_2)$-, $\nu_s(CH_2)$- und $\nu(CO)$-Bande (oben, mittig, unten) von **DMPE**.
Amplituden: $\Delta\tilde{\nu}_1$ (+), $\Delta\tilde{\nu}_2$ (×), $\sum\Delta\tilde{\nu}_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (1 ms const., nicht gezeigt), τ_2 (×)

Tab. 6.2: Vergleich der größten bestimmten Relaxationszeiten mit den Literaturwerten. Weiterhin ist das Temperaturintervall der Umwandlung als Maß der Übergangsschärfe sowie die Anzahl der auflösbaren Prozesse angegeben.

Lipid	ΔT/ °C	Anzahl τ_i	$\tau_{\max}$/ s	$\tau_{\max}$ [Ref., (Methode)]
DSPC	1,3	2	2,1	30 s [5, (PPC)]
DPPC	1,0	1	≈0,4	40 ms [33, (UV)], 30 s [5, 29, (PPC)]
DMPC	0,9	1	≈0,1	12 ms [33, (UV)], 33 s [29, (PPC)]
DMPA	4,3	2	3,5	700 ms [18, (UV)]
DMPE	1,1	1	0,9	—

Detektionsmethoden: Kalorimetrie (PPC), Trübungsmessung (UV)

dass die Wellenzahländerung umso kleiner ist, je langsamer der Prozess wird.

Damit stehen diese Ergebnisse im Einklang mit jenen, die mit Hilfe von Trübungsmessungen [18, 33] gewonnen worden sind. Ebenso fügen sich die Erkenntisse in das in Kap. 2.2.2 beschriebene Kinkenmodell von Eck und Holzwarth [17] ein, die die Phasenumwandlung in die Anfangsschritte „Kinkenbildung“ und „Membranexpansion“ einteilen. Die Bildung von gauche-Konformeren ist mit einer Volumenzunahme verknüpft. Dieser Schritt ist damit an Prozesse gebunden, die zusätzliches Volumen zur Verfügung stellen. Sind diese Expansionsprozesse in mehrere Teilschritte untergliedert, müssen es demnach auch die Konformationsänderungen sein, was das Auftreten eines Spektrums von Relaxationszeiten erklärt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergenbnisse stehen im Widerspruch zu den Arbeiten von Grabitz et al. [29] sowie Boehm et al. [5], welche die Gesamtamplitude des kalorimetrischen Signals *einem einzigen* Prozess zuordnen. Dieser Umstand wird bei der Diskussion der Kalorimetrieergebnisse dieser Arbeit (Kap. 7.3) abgehandelt.

Die Relaxationszeiten τ der Phosphatidylcholine zeigen eine Abhängigkeit von der Kettenlänge der Fettsäurereste. Während bei DSPC (C_{18}-Kette) für den langsamsten Prozess $\tau_3 = 2{,}1\,\mathrm{s}$ gefunden wurde, sind die entsprechenden Relaxationskonstanten von DPPC (C_{16}) und DMPC (C_{14}) eine Größenordnung kleiner (Tab. 6.2). Zwar wurden an der DPPC-Probe auch Zeitkonstanten im Sekundenbereich gefunden (Abb. 6.7), allerdings sollten diese als Ausreißer betrachtet werden. Der Grund dafür liegt in der Überlagerung der Relaxationsprozesse mit dem Vorgang, der zum langsamen Wiederabfallen der Wellenzahl führt. Dieser Umstand kann vom Regressionsmodell nicht beschrieben werden, so dass die ermittelten Konstanten verfälscht werden.

Im Vergleich mit bereits publizierten Daten (Tab. 6.2) liegen die gefundenen Werte zwischen denen mit Trübungsmessung und Kalorimetrie gewonnenen Daten. Die mit Trübungsmessung gefundenen Werte sind allesamt kleiner als 1 s, während die mit Drucksprung-Kalorimetrie ermittelten Zeitkonstanten die bereits in Kap. 2.2.2 erwähnten, langsamen Prozesse mit Zeitkonstanten >10 s sichtbar machten. Es liegt dabei in der Methodik der Drucksprung-Kalorimetrie begründet, dass damit keine schnelleren Prozesse sichtbar gemacht werden können.

Als Artefakt muss das auf der Sekundenskala beobachtete Wiederabfallen der Wellenzahlen der C–H-Streckschwingungen von DMPC (Abb. 6.8) und DPPC (Abb. 6.6) gewertet werden. Der Umstand, dass dieses Phänomen bei DMPC stärker als bei DPPC und bei DMPE, DMPA und DSPC gar nicht auftritt, lässt darauf schließen, dass dieser Effekt mit steigender Temperatur verschwindet, da sich die Umwandlungstemperatur der Lipide in der genannten Reihenfolge erhöht. Es kann angenommen werden, dass Wärmeübergangsprozesse in die Umwandlungskinetik einkoppeln. Aufgrund der Tatsache, dass der Temperaturgradient zwischen optisch aktivem Volumen und dem Ort des Durchflusses der Temperierflüssigkeit bei Temperaturen um die Raumtemperatur sehr klein ist, laufen Wärmeübergangsprozesse auf einer langsamen Zeitskala ab. Da die IR-Zelle aus Edelstahl gebaut ist, welcher im Vergleich zu Kupfer eine sehr schlechte Wärmeleitfähigkeit hat, sind die Prozesse sehr langsam. Die mit dem Drucksprung einhergehende polytrope Zustandsänderung führt zu einer Abkühlung der Probe und damit, bedingt durch die Schärfe der Umwandlung, zu einer Verschiebung der Wellenzahl. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die so entstandenen Temperaturinhomogenitäten auf einer Sekundenzeitskala abgebaut werden. In einer Rechnung schätzten Gruenewald et al. [33] die durch adiabatische Abkühlung hervorgerufene Amplitudenänderung auf ≈10 % der Gesamtamplitude ab. Dieser Wert trifft in etwa auch auf den Abfall der Kurven von DMPC und DPPC entsprechend Abb. 6.8 und 6.6 zu.

Werden in Tab. 6.2 die Werte für DMPC, DMPE und DMPA verglichen, so lassen sich Kopfgruppeneinflüsse ablesen. Während für DMPE keine Vergleichsdaten gefunden werden konnten, fällt auf, dass für DMPA sowohl mit der eigenen als auch mit der Trübungsdetektion im Vergleich mit den anderen Lipiden die jeweils langsamsten Prozesse gefunden worden sind. DMPA ist im Gegensatz zu den anderen untersuchten Lipiden negativ geladen. Es tendiert zur Bildung besonders kleiner Vesikel, deren Kooperativität herab gesetzt ist, weshalb auch das Temperaturintervall der Umwandlung verbreitert ist. Ein Zusammenhang mit der Umwandlungskinetik ist jedoch unklar.

Der Wert der langsamsten Umwandlung für DMPE liegt zwischen dem von DMPC und DMPA. Besonders auffällig an den Ergebnissen von DMPE ist allerdings die stark ausgeprägte Peakform der τ_2–T-Daten, die in dieser Form bei keiner anderen Probe beobachtet werden konnte.

7 Drucksprung-Relaxationsexperimente mit Kalorimetrie-Detektion

7.1 Materialien und Methoden

7.1.1 Probenpräparation

Alle Lipide wurden von Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, USA) erworben und ohne weitere Reinigung verwendet. Die Proben wurden als Suspension (50 mmol/l) in mit Ionenaustauscher gereinigtem Wasser hergestellt. Um eine vollständige Hydratisierung sicherzustellen, wurde die Probe 10 °C über der jeweiligen Umwandlungstemperatur T_m hinreichend lange mit Ultraschall behandelt und auf einem Vortex-Gerät gerüttelt. Anschließend wurden die Proben im leichten Vakuum entgast.

7.1.2 Messung der Kalorigramme

Mit einer Spritze wurden 500 µl der Probe blasenfrei in die Probenkammer des VP–DSC-Kalorimeters (MicroCal LLC, Northampton, USA) gefüllt. Das Dispersionsmittel wurde ebenfalls entgast und in die Referenzzelle transferiert. Zur Bestimmung des Temperaturintervalls für die zeitaufgelösten, isothermen Messungen wurden statische, d. h. zeitunabhängige, Kalorigramme aufgezeichnet. Da sich die erste Kurve in der Regel von den weiteren Wiederholungsmessungen unterscheidet, wurden zunächst 2 Aufheizkurven mit einer schnellen Heizrate von 60 K/h gemessen, um die Probe zu äquilibrieren. Anhand eines dritten Heizganges wurde das Umwandlungstemperaturintervall für die zeitaufgelösten Experimente bestimmt. Um apparative Verbreiterungen des Umwandlungspeaks zu minimieren, wurde die Heizrate dabei auf 1,5 K/h reduziert.

Die Messung kinetischer Leistungskurven wurde anschließend im isothermen[1] Modus durchgeführt. Um die Zeitauflösung des Gerätes, die durch Wärmeübergänge in der Zelle bestimmt wird (Kap. 3.2), voll auszuschöpfen, wurde das Antwortverhalten der Regelautomatik des Kalorimeters auf die Stufe „hoch“ gesetzt. Die Regelung der Zelle erfolgte im „low noise“-Modus auf das ΔT_2-Signal (Abb. 3.3). Nach Erreichen der geforderten Messtemperatur wurde eine konstante Äquilibrierungszeit von 5 min eingehalten, um eine stabile Basislinie ohne systematische Temperaturgänge zu erreichen. Dabei hatte das Gerät mit Hilfe der PPC-Zusatzeinheit und einer N_2-Gasflasche den Druck bereits auf 4,6 bar Überdruck erhöht, so dass nach Ende der Äquilibrierung ein Drucksprung auf Umgebungsdruck durchgeführt und die Entwicklung des Signals mit einem Inkrement von

[1] Aus apparativen Gründen handelt es sich lediglich um einen quasi-isothermen Modus (Kap. 3.2).

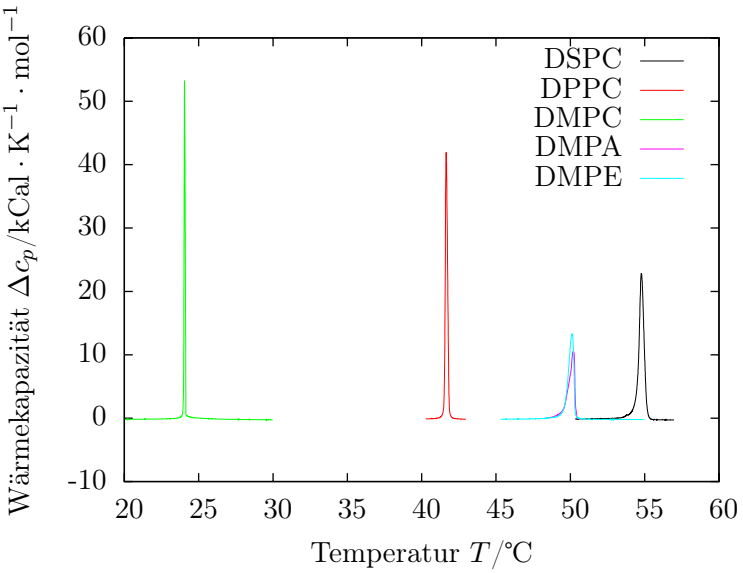

Abb. 7.1: Kalorigramme von DSPC, DPPC, DMPC, DMPA und DMPE (je 50 mM in H_2O) zur Bestimmung des Messintervalls der zeitaufgelösten Drucksprungmessung. Die Aufheizrate betrug geringe 1,5 K/h, um die Verbreiterung der Kurven durch apparative Einflüsse zu minimieren. Die thermodynamischen Parameter der Systeme sind in Tab. 7.1 aufgelistet.

Tab. 7.1: Umwandlungstemperaturen T_m und -Enthalpien ΔH_m, ermittelt anhand der Kalorigramme in Abb. 7.1 im Vergleich mit Literaturwerten. Weiterhin ist die Peakbreite bei halber Höhe $\Delta T_{1/2}$ angegeben.

Lipid	T_m [°C]	T_m [Ref.] [°C]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]	ΔH_m [kCal/mol]	ΔH_m [Ref.] [kCal/mol]
DSPC	54,5	55,3 [51], 54,3 [4]	0,36	10,4	9,8 [51], 10,9 [4]
DPPC	41,5	41,4 [51], 41,5 [4]	0,17	8,0	7,7 [51], 8,7 [4]
DMPC	24,0	23,9 [51], 24,0 [4]	0,09	5,6	5,9 [51], 6,5 [4]
DMPA	49,5	52,2 (pH 6) [4]	0,40	4,5	5,7 (pH 6) [4]
DMPE	49,6	49,9 [4]	0,41	6,5	6,6 [4]

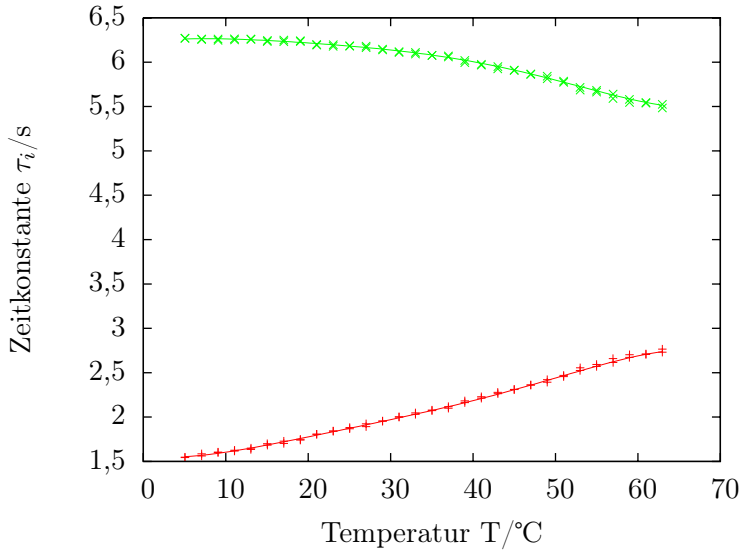

Abb. 7.2: Temperaturabhängigkeit der mittels Regression ermittelten Zeitkonstanten τ_1 (+) und τ_2 (×) der Wärmeübergangsfunktion des Kalorimeters. Die Daten wurden mit einem Polynom 5. Grades beschrieben.

1 s für die maximal vorgesehene Zeit von 999 s verfolgt wurde. Im Anschluss wurde ein Drucksprung in umgekehrter Richtung vollzogen und wiederum eine Messzeit von 999 s eingehalten.

7.1.3 Entfaltung der zeitaufgelösten Kalorigramme

Zur Verbesserung der Zeitauflösung der Apparatur wurden die mit PPC gemessenen *P*-*t*-Daten mit der Antwortfunkton des Kalorimeters entfaltet. Dazu wurde der Umstand ausgenutzt, dass die Faltung eines δ-Pulses mit der Antwortfunktion gleich dieser Antwortfunktion selber ist. In der Praxis wurde dazu die Relaxationskurve einer Lösung vermessen, deren Zeitkonstanten derart schnell sind, dass diese dem Drucksprung unmittelbar folgen können. Bekannt ist dies vom Protonierungsgleichgewicht des pH-Indikators Methylrot. Eine Lösung der Substanz wurde mit verdünnter HCl auf eine Umschlagfarbe zwischen rot und gelb[2] eingestellt und anschließend vermessen. Den Kurven (Abb. 7.3) wurde ein biexponentielles Modell nach Gl. 3.7 und 3.8 angepasst. Die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 der Wärmeübergänge im Kalorimeter zeigen eine leichte Temperaturabhängigkeit. Diese wurde mit einem Polynom 5. Grades beschrieben, um Kurven bei beliebigen Temperaturen im Intervall von 5–65 °C entfalten zu können (Abb. 7.2).

Die Dekonvolution der experimentellen Methylrot-Kurve mit einer simulierten Kalorime-

[2] Die Substanz wurde zur Bestimmung der Totzeit der Drucksprung-Apparatur mit Trübungsdetektion [33] verwendet, wobei deren optische Eigenschaft im Vordergrund stand. Für den Einsatz im Kalorimeter ist lediglich wichtig, dass die freigesetzte Wärme den Drucksprungverlauf abbildet.

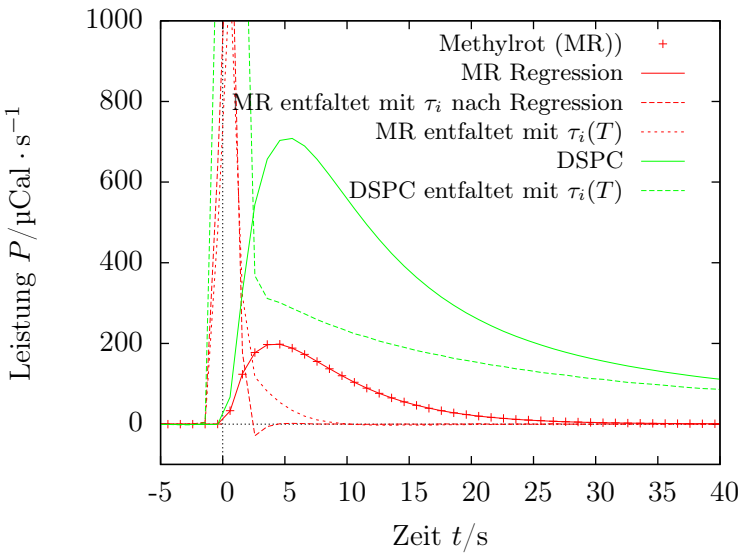

Abb. 7.3: *P-t*-Kurven von Methylrot in H_2O, an denen mit Regression die Konstanten $\tau_1 = 2{,}571\,\mathrm{s}$ und $\tau_2 = 5{,}682\,\mathrm{s}$ der Kalorimeter-Antwortfunktion nach (Gl. 3.8) bestimmt worden sind. Die mit diesen τ-Werten entfalteten Kurven sowie auch jene mit den Konstanten $\tau_i(54{,}982\,^\circ\mathrm{C})$ nach Abb. 7.2 ($\tau_1 = 2{,}573\,\mathrm{s}$, $\tau_2 = 5{,}677\,\mathrm{s}$) zeigen eine δ-ähnliche Funktion. Eine zum Vergleich dargestellte Kurve im originalen und entfalteten Zustand von DSPC zeigt die Veränderung der Kurvenform beim Auftreten von auflösbaren Relaxationsprozessen. Weitere Erklärungen folgen im Text.

ter-Antwortfunktion (Abb. 7.3) ergibt entsprechend der Theorie eine δ-ähnliche Funktion. Werden zur Simulation der Wärmeleitfunktion die unmittelbar aus der Regression der Methylrot-Kurve gewonnenen Zeitkonstanten verwendet, ist die Dekonvolutionskurve leicht überentfaltet, was dazu führt, dass negative Werte auftreten (rote, gestrichelte Kurve). Werden dagegen die temperaturgemittelten τ_1- und τ_2-Werte nach Abb. 7.2 angewandt, tritt der Effekt der Unterentfaltung auf, sichtbar am auftretenden „Pseudo“-Relaxationsprozess im Zeitintervall 0–10 s (rote, fein-gestrichelte Kurve). Diese Störamplituden erscheinen, weil der tatsächliche Verlauf der Kalorimeter-Antwortfunktion nicht hinreichend genau wiedergegeben werden kann. Dies hat seine Ursache darin, dass zum Einen die durch Regression bestimmten Zeitkonstanten der Antwortfunktion fehlerbehaftet sind und zum Anderen das Regressionsmodell an sich lediglich eine phänomenologische Beschreibung des Kurvenverlaufes ist. Abb. 7.3 zeigt jedoch, dass die Artefaktamplituden bei Zeiten $t > 10\,\mathrm{s}$ soweit abgeklungen sind, dass die entfaltete Kurve zur Auswertung herangezogen werden kann. Bei Verzicht auf die Dekonvolution wäre dies erst ab einem Zeitpunkt $>30\,\mathrm{s}$ möglich. Bei der ebenfalls in Abb. 7.3 gezeigten Beispielkurve von DSPC ist deutlich zu sehen, wie ein Relaxationsprozess durch Entfaltung auch im Zeitfenster von 10–30 s sichtbar gemacht werden kann.

Technisch wurde die Dekonvolution mit einem in „Delphi 6“ selbstgeschriebenen Pro-

gramm ermöglicht, welches auf dazu benötigte FFT-Algorithmen der „Numerical Recipes“ [66] zurückgreift.

7.1.4 Regressionsanalyse

Den kinetischen Kurven wurde ein multiexponentielles Modell (Gl. 7.1) angepasst. Es konnten nicht alle Punkte des gesamten Zeitintervalls der Messung für die Regression herangezogen werden, weil sich prinzipbedingt die Temperatur mit einer Rate der Größenordnung $10^{-5}\,\mathrm{K/s}$ ändert. Bei Temperaturen oberhalb der Raumtemperatur tritt dadurch ein Abkühlungs- und unterhalb ein Erwärmungseffekt auf. Dies hat zur Folge, dass aufgrund der großen c_p-Werte bei Temperaturen nahe T_m eine Basisliniendrift einsetzt, welche sich störend auswirkt. So ist in Abb. 7.4 zu sehen, dass nach dem ersten Abfall der Leistung diese ab 300 s wieder ansteigt. Die Kurve in Abb. 7.4 fällt auch durch die Relaxation nicht auf null ab, sondern nähert sich einem konstanten Wert an, bevor sie wieder langsam zu steigen beginnt. Das Zeitintervall für die Regression muss somit hinreichend kurz gewählt werden, damit die Basislinie in guter Näherung durch eine Konstante ΔP_Basis beschrieben werden kann.

$$P(t) = \Delta P_\mathrm{Basis} + \sum_{i=1}^{j} \Delta P_i \cdot \exp\left(\frac{t - t_0}{\tau_i}\right) \qquad (\tau_i < \tau_{i+1}, t > t_0) \tag{7.1}$$

Die Anzahl der Relaxationsprozesse wurde auf $j = 2$ begrenzt. Mit Grenzbedingungen wurde gewährleistet, dass sich die τ_i um mindestens einen Faktor 2 unterscheiden. Dazu wurde wiederum die Funktion „AbsLim()“ (Gl. 6.2) herangezogen. Ebenso gelten für die Beurteilung der Regressionsergebnisse kalorimetrischer Daten die Ausführungen aus Kap. 6.1.3, wonach u. a. die Werte für τ_i unrealistisch hoch werden, wenn die zugehörigen Amplituden in der Größenordnung des Rauschens liegen. Die Minimierung der χ^2-Funktion erfolgte gemäß des Algorithmus nach Nelder und Mead [62, 66] und wurde vom gleichen Programm übernommen, welches auch die Entfaltung durchführen kann (Kap. 7.1.3).

7.2 Ergebnisse

7.2.1 DSPC

Die kinetischen Kurven einer DSPC-Probe nach der Entfaltungsprozedur sind in Abb. 7.5 dargestellt. Die Gesamtamplitude der Kurven steigt mit sich erhöhender Temperatur zunächst an, erreicht bei 54,70 °C ein Maximum und fällt anschließend wieder ab. Im Zeitintervall von 40–500 s sind zwei Relaxationsprozesse sichtbar, so dass das Regressionsmodell (Gl. 7.1) für diesen Bereich mit dem Parameter $j = 2$ angewendet wurde.

Die Teilamplituden ΔP_i sowie auch die Gesamtamplitude zeigen ein ausgeprägtes Maximum bei 54,70 °C (Abb. 7.6). Dabei ist die Amplitude des langsameren Prozesses um einen Faktor 2 kleiner als die des schnelleren Prozesses. Insgesamt wird ein maximaler Wert von $\sum \Delta P_i = 600\,\mu\mathrm{Cal/s}$ erreicht. Die Basislinienverschiebung ΔP_Basis ist vom Betrag um

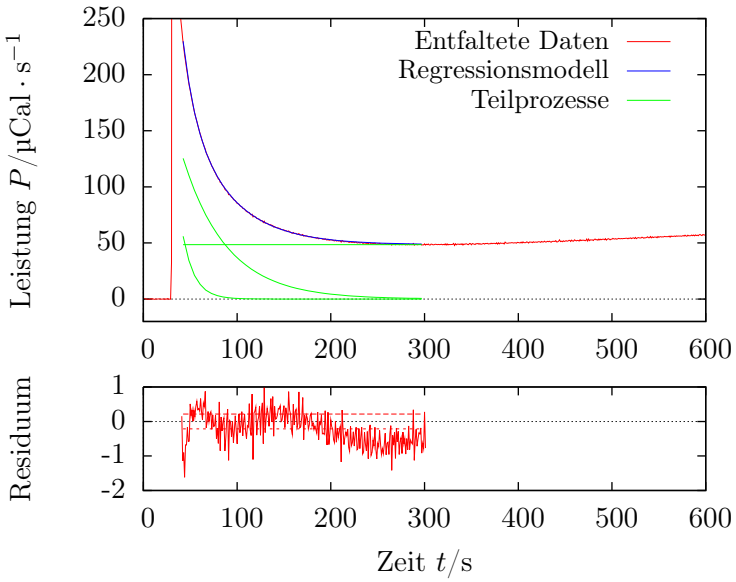

Abb. 7.4: Regressionsanalyse der entfalteten Kurven einer Probe von DMPC bei 24,01 °C. Dargestellt ist das Regressionsmodell nach Gl. 7.1 sowie dessen Teilterme mit den Amplituden (in µCal/s) $\Delta P_{\text{Basis}} = 48{,}6$, $\Delta P_1 = 139{,}8$ und $\Delta P_2 = 159{,}6$ sowie den Relaxationskonstanten $\tau_1 = 12{,}5\,\text{s}$ und $\tau_2 = 47{,}1\,\text{s}$. Der untere Graph zeigt die Residuen im Vergleich zur Standardabweichung der Messdaten für Zeiten $t < t_0$ ($\sigma_P = 0{,}21$ µCal/s).

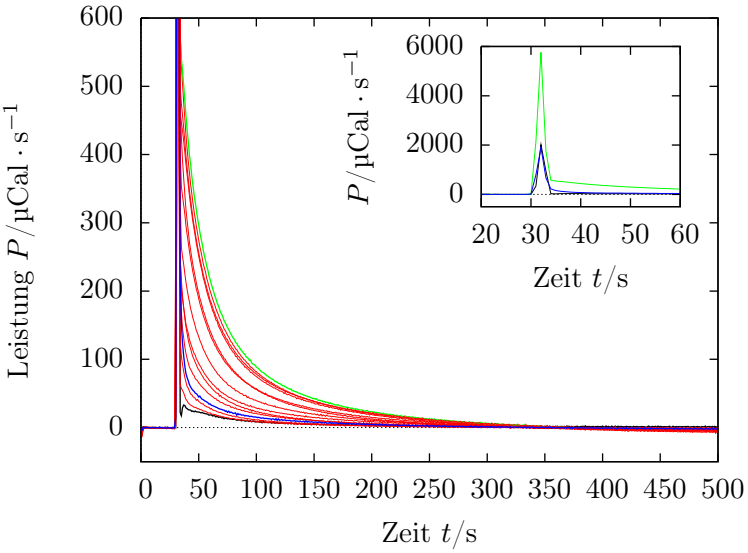

Abb. 7.5: Entfaltete P-t-Kurven einer Probe von **DSPC** bei steigenden Temperaturen: Beginn des Messintervalls bei 54,24 °C (—), Maximum der Gesamtamplitude bei 54,70 °C (—), Ende des Messintervalls bei 55,19 °C (—) sowie Zwischenwerte (—).

mindestens eine Größenordnung kleiner als die Teilamplituden, so dass Kreuzkorrelationen zwischen diesen Größen vernachlässigt werden können. Die Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstanten τ_i zeigen ebenfalls ausgeprägte Maxima bei 54,80 °C (τ_1) und 54,90 °C (τ_2). Die jeweils langsamsten Relaxationskonstanten unterscheiden sich um den Faktor 5 und betragen $\tau_1 = 18\,\mathrm{s}$ bzw. $\tau_2 = 103\,\mathrm{s}$. Der Anstieg der τ_i-Werte bei Temperaturen $T < 54{,}4\,^\circ\mathrm{C}$ muss als Artefakt ohne sinnvollen physikalischen Hintergrund angesehen werden, der auf die geringen Amplituden in diesem Temperaturbereich zurückzuführen ist.

Die Umwandlungswärmen der Teilprozesse wurden aus den Amplituden und Relaxationszeiten nach der Gleichung

$$Q_i = \int_0^\infty \Delta P_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \mathrm{d}t = \Delta P_i \tau_i \tag{7.2}$$

berechnet und in Abb. 7.6 den Gesamtwärmen (Q_{total}), die durch Integration der nichtentfalteten P-t-Kurven erhalten wurden, gegenübergestellt. Die Daten zeigen, wie auch die ΔP_i-Werte, ein Maximum bei 54,70 °C. Erwartungsgemäß sind die Gesamtenergien Q_{total} größer als die Wärmen der Teilprozesse. Auffällig ist jedoch, dass (entgegen der Erwartung) die Wärmen $\Delta P_2 \tau_2$, die dem langsameren Umwandlungsprozess zuzuordnen sind, größer sind als die des schnelleren Prozesses mit der Zeitkonstanten τ_1. Diese Wärmen $\Delta P_2 \tau_2$ werden durch die höheren Werte von τ_2 bestimmt, deren Berechnung jedoch durch den Basislinienparameter $\Delta P_{\mathrm{Basis}}$ beeinflusst wird. Die Basislinie wird, wie in Kap. 7.1.4 beschrieben, durch die Länge des Zeitintervalls bestimmt, so dass die Relaxationskonstanten τ_2 überbestimmt sind. Die Energie der schnellen, für die Apparatur nicht auflösbaren Prozesse ließe sich durch Bildung der Differenz $Q_{\mathrm{total}} - (\Delta P_1 \tau_1 + \Delta P_2 \tau_2)$ ermitteln. Bedingt durch die Überbestimmung der τ_2-Werte ist diese Bilanz jedoch verfälscht, so dass auf die Darstellung der Umwandlungswärmen (analog zu Abb. 7.6) für die anderen vermessenen Lipide verzichtet werden soll.

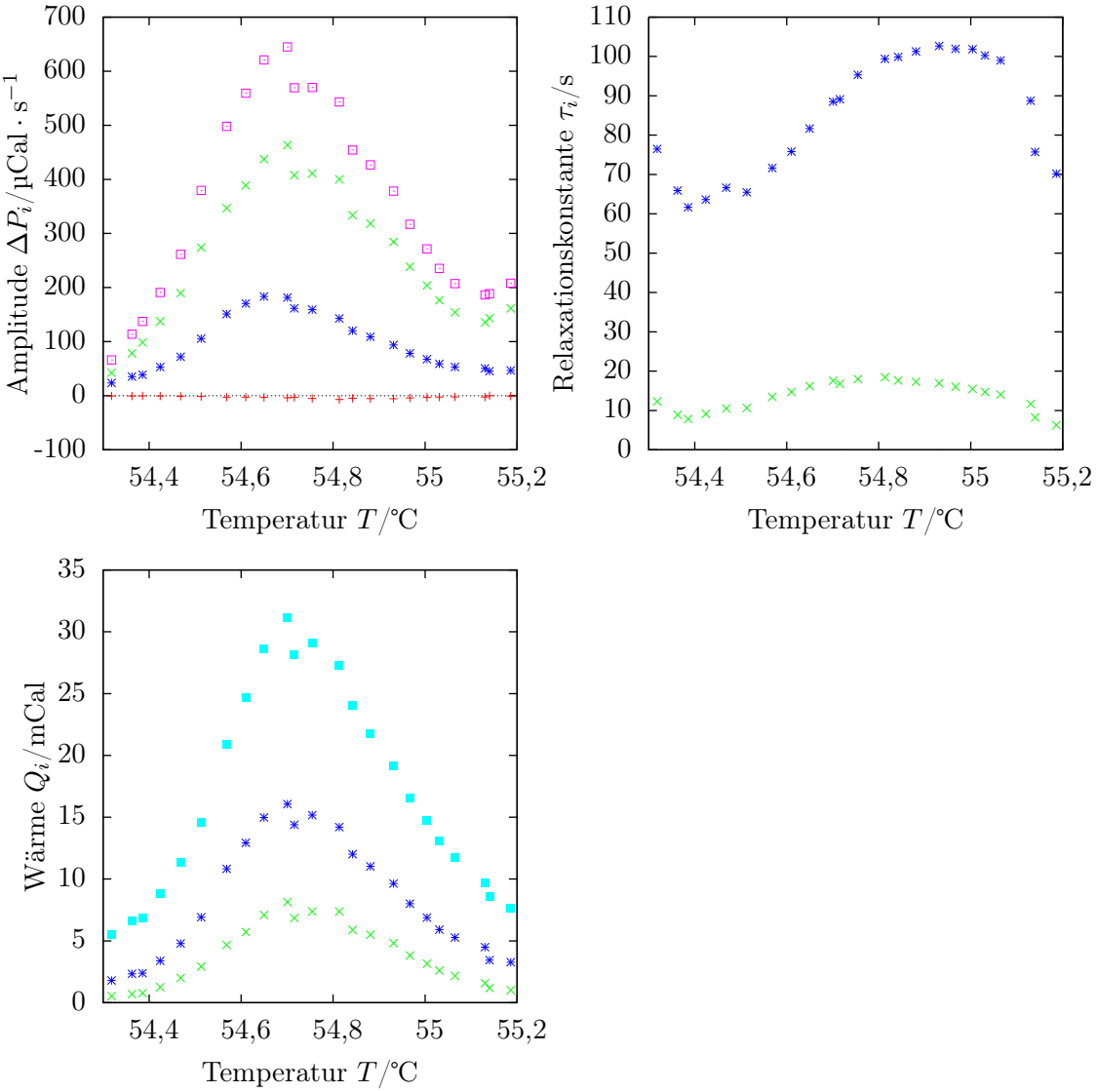

Abb. 7.6: Amplituden ΔP_i(links oben) und Zeitkonstanten τ_i (rechts oben) der P-t-Kurven von **DSPC** in Abhängigkeit der Temperatur. Im unteren Graph sind die durch Integration der P-t-Kurven ermittelten Wärmen Q_{total} sowie die aus den ΔP_i- und τ_i-Werten ermittelten Wärmen der Teilprozesse dargestellt.
Amplituden: ΔP_{Basis} (+), ΔP_1 (×), ΔP_2 (∗), $\sum \Delta P_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (×), τ_2 (∗)
Enthalpien: $\Delta P_1\tau_1$ (×), $\Delta P_2\tau_2$ (∗), Q_{total} (■)

7.2.2 DPPC

Die entfalteten PPC-Kurven der Messung an DPPC sind in Abb. 7.7 zu sehen. Wiederum steigt die Gesamtamplitude mit sich erhöhender Temperatur an, erreicht in der bei 41,65 °C gemessenen Kurve ein Maximum und fällt anschließend ab. Den Kurven wurden im Intervall von 40–500 s ein Modell mit zwei exponentiellen Termen nach Gl. 7.1 angepasst.

Die größte Amplitude ΔP_1 des schnellen Prozesses ist nur unwesentlich größer als die des langsameren Vorgangs ΔP_2, jedoch sind die Maxima auf der Temperaturskala verschoben. Während ΔP_1 bei 41,70 °C maximal wird, erscheint jenes von ΔP_2 um 0,1 K bei tieferen Temperaturen (Abb. 7.8). Die $\sum \Delta P_i$-Daten haben dadurch ein breites Maximum im Intervall von 41,6–41,7 °C. Die Beeinflussung der ΔP_i-Werte durch die Basislinienverschiebung kann aufgrund der kleinen Werte für ΔP_{Basis} vernachlässigt werden.

Sehr unterschiedlich sehen die Daten der Relaxationskonstanten aus. Während die Zeitkonstanten des schnelleren Prozesses τ_1 bei 41,65 °C mit einem Wert von 34 s ein Maximum aufweisen, kann ein solches bei den τ_2-Werten nicht gefunden werden. Stattdessen steigt die Kurve weiter an, allerdings nimmt die Streuung der Werte stark zu. Da die Amplitude bei diesen Temperaturen jedoch wieder abfällt, muss dieser weitere Anstieg der Zeitkonstanten τ_2 als Artefakt angesehen werden. Die Beschreibung der Basislinie durch den Parameter ΔP_{Basis} nach Modell 7.1 ist nicht hinreichend genau. Unter der Annahme, dass sich, wie auch bei den τ_1-Werten, das Maximum bei 41,65 °C befindet, ergibt sich damit eine Zeitkonstante von $\tau_2 = 111$ s als größter Wert.

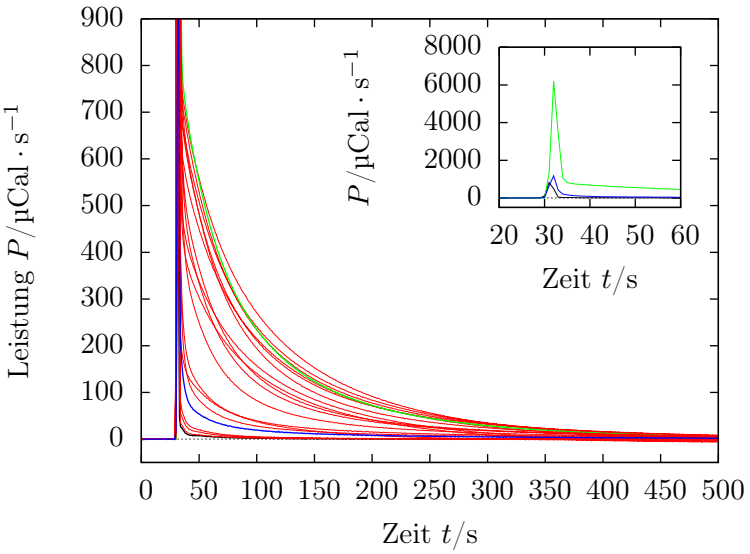

Abb. 7.7: Entfaltete P-t-Kurven einer Probe von **DPPC** bei steigenden Temperaturen: Beginn des Messintervalls bei 41,43 °C (—), Maximum der Gesamtamplitude bei 41,65 °C (—), Ende des Messintervalls bei 41,75 °C (—) sowie Zwischenwerte (—).

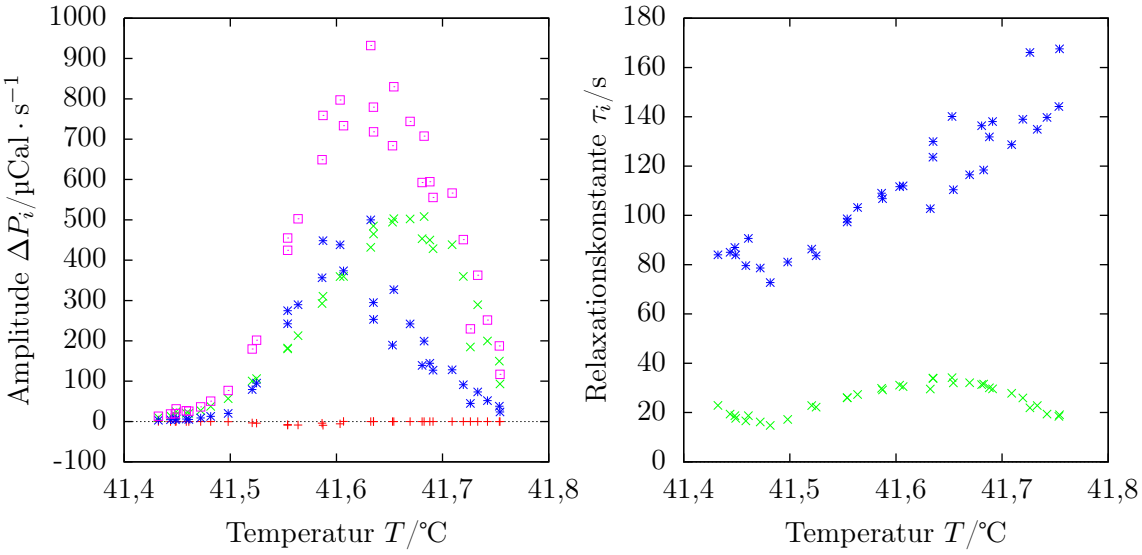

Abb. 7.8: Amplituden (links) und Zeitkonstanten (rechts) der P-t-Kurven von **DPPC** in Abhängigkeit der Temperatur.
Amplituden: $\Delta P_{\mathrm{Basis}}$ (+), ΔP_1 (×), ΔP_2 (∗), $\sum \Delta P_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (×), τ_2 (∗)

7.2.3 DMPC

Die entfalteten P-t-Daten von DMPC zeigen wiederum das schon aufgezeigte Temperaturverhalten mit einem Maximum der Gesamtamplitude bei 24,04 °C (Abb. 7.9). Der Sprung in der Basislinie nach dem Drucksprung ist bei der DMPC-Probe sehr viel stärker ausgeprägt als bei den anderen untersuchten Lipiden. Auch tritt der Effekt der anschließenden Basisliniendrift (Abb.7.4), bedingt durch die hohe Kooperativität der Umwandlung, störend in Erscheinung. Das für die Regressionsanalyse verwendete Zeitintervall musste daher auf den engeren Bereich von 40–300 s begrenzt werden. Kurven, die bei Temperaturen sehr nah an T_m aufgenommen wurden, konnten nicht zur Auswertung herangezogen werden, weil zum Einen die auftretenden Amplituden zu groß waren und vom Kalorimeter nicht kompensiert werden konnten und zum Anderen die Basisliniendrift aufgrund großer $\mathrm{d}c_p/\mathrm{d}T$-Werte zu stark war. Die Basislinienkorrektur im Regressionsmodell (Gl. 7.1) hätte dann durch einen Polynom niederen Grades erfolgen müssen, wobei die Regression aufgrund zu hoher Kreuzkorrelationen zu den Parametern der Exponentialterme fehlschlagen würde.

Die wesentlichen Änderungen der Amplituden und Relaxationskonstanten (Abb. 7.10) laufen in einem Temperaturintervall von lediglich 0,1 K ab. Maxima sind in beiden Diagrammen nicht ersichtlich, da im Bereich von 24,05–24,10 °C aus o. g. Gründen keine Daten bestimmt werden konnten. Bei den Amplituden ist auffällig, dass die ΔP_i nahezu gleich groß sind. Ebenso ist der Wert der Basislinienverschiebung ΔP_Basis nicht um eine Größenordnung, sondern lediglich um einen Faktor 2 kleiner als die Amplituden. Die größten gefundenen Relaxationszeiten betragen 18 s (τ_1) und 91 s (τ_2). Aus dem Kurvenverlauf ist jedoch ersichtlich, dass es im Temperaturintervall der nicht auswertbaren Kurven noch langsamere Prozesse geben sollte.

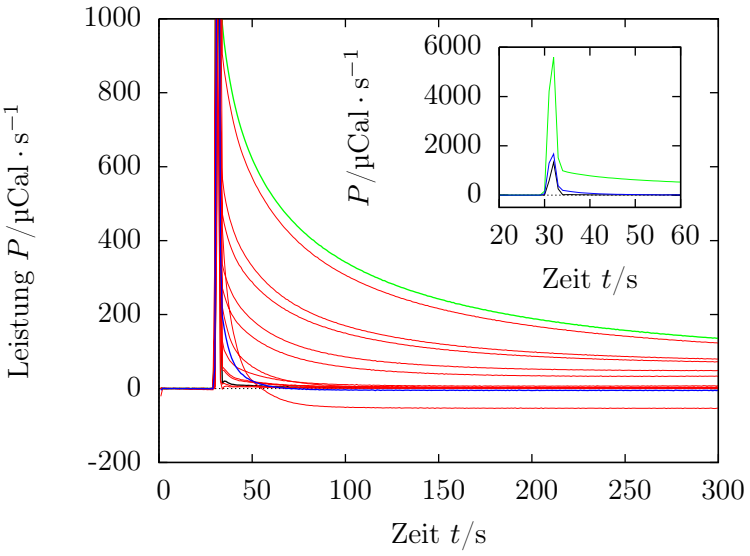

Abb. 7.9: Entfaltete P-t-Kurven einer Probe von **DMPC** bei steigenden Temperaturen: Beginn des Messintervalls bei 23,92 °C (—), Maximum der Gesamtamplitude bei 24,04 °C (—), Ende des Messintervalls bei 24,13 °C (—) sowie Zwischenwerte (—).

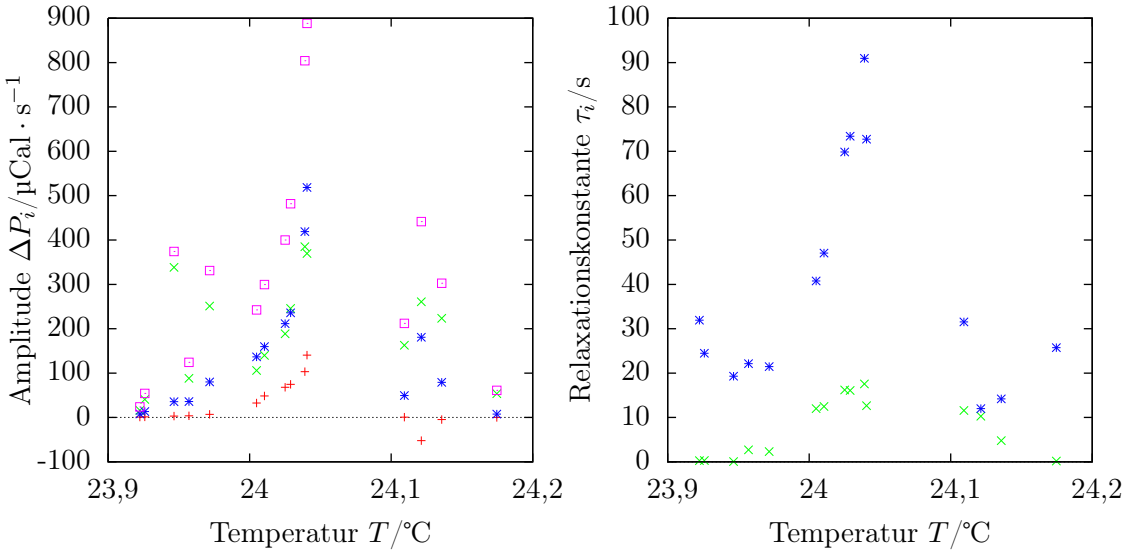

Abb. 7.10: Amplituden (links) und Zeitkonstanten (rechts) der P-t-Kurven von **DMPC** in Abhängigkeit der Temperatur.
Amplituden: $\Delta P_{\mathrm{Basis}}$ (+), ΔP_1 (×), ΔP_2 (∗), $\sum \Delta P_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (×), τ_2 (∗)

7.2.4 DMPA

Die kinetischen Kurven einer DSPC-Probe nach der Entfaltungsprozedur sind in Abb. 7.11 dargestellt. Die Gesamtamplitude der Kurve erreicht ein Maximum bei 49,90 °C. Den Daten wurde ein biexponentielles Regressionsmodell angepasst. Da ab einem Zeitpunkt $t > 300\,\mathrm{s}$ keine Änderungen ersichtlich waren, wurde dazu der Zeitbereich 40–300 s verwendet.

Alle Teilamplituden (Abb. 7.12) zeigen ein Maximum bei 49,90 °C. Daneben ist ein Maximum bei 49,65 °C mit kleinerer Gesamtamplitude ersichtlich. In den ΔP_2-Daten ist dieses lediglich als Schulter angedeutet. Generell sind die Amplituden des schnelleren Prozesses größer als die des langsameren Abfalls. Die Werte des Parameters $\Delta P_{\mathrm{Basis}}$ liegen in der Größenordnung $10^{-7}\,\mu\mathrm{Cal/s}$ und können daher praktisch vernachlässigt werden. Die Relaxationskonstanten in Abb. 7.12 zeigen kein ausgeprägtes Temperaturverhalten mit einem Maximum. Die Werte für τ_1 schwanken stattdessen zwischen 2 s und 10 s. Die Daten von τ_2 decken den Bereich von 20–60 s ab.

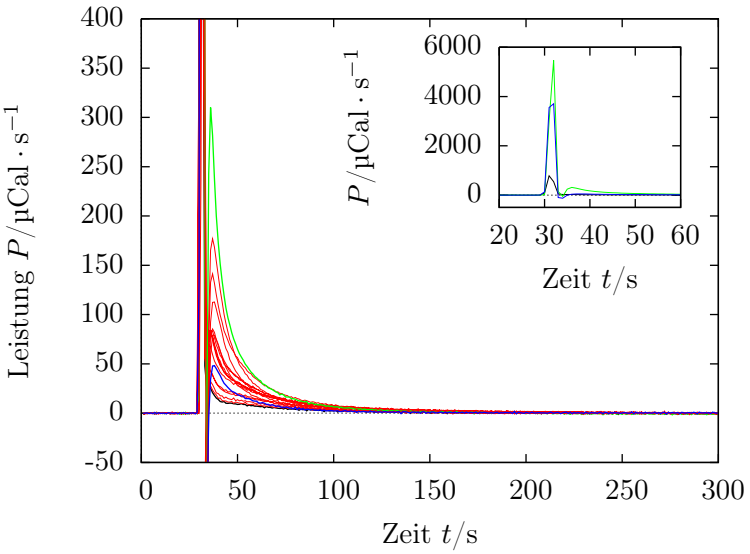

Abb. 7.11: Entfaltete P-t-Kurven einer Probe von **DMPA** bei steigenden Temperaturen: Beginn des Messintervalls bei 49,25 °C (—), Maximum der Gesamtamplitude bei 49,90 °C (—), Ende des Messintervalls bei 50,09 °C (—) sowie Zwischenwerte (—).

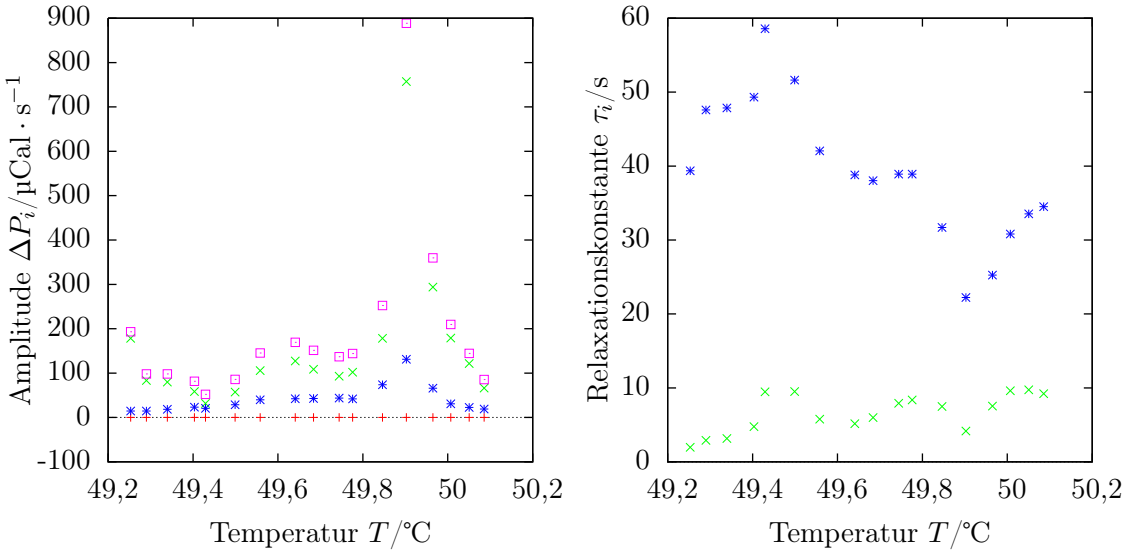

Abb. 7.12: Amplituden (links) und Zeitkonstanten (rechts) der P-t-Kurven von **DMPA** in Abhängigkeit der Temperatur.
Amplituden: $\Delta P_{\mathrm{Basis}}$ (+), ΔP_1 (×), ΔP_2 (∗), $\sum \Delta P_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (×), τ_2 (∗)

7.2.5 DMPE

Die entfalteten PPC-Kurven der Messung an DMPE sind in Abb. 7.13 abgebildet. Mit steigender Temperatur erreichen die Kurven ein Maximum der Gesamtamplitude bei 50,04 °C, die bei weiterer Temperaturerhöhung wieder abfällt. Auswertbare Amplitudenänderungen wurden im Bereich von 40–300 s beobachtet, so dass dieses Intervall einer Regression mit zwei Exponentialtermen nach Modell 7.1 unterworfen wurde.

Die Amplituden des Regressionsmodells (Abb. 7.14) zeigen alle ein Maximum bei 50,04 °C. Die Amplituden ΔP_1 sind um einen Faktor 6 größer als die ΔP_2-Werte. Die Werte der Basislinienverschiebung ΔP_{Basis} sind negativ und liegen in der Größenordnung 10^{-1} µCal/s und sind somit sehr viel kleiner als die der Teilamplituden. Die Relaxationskonstanten τ_1 zeigen ein breites Maximum bei 50,0 °C. Der größte Wert dieses schnelleren Prozesses beträgt 26 s. Die Höhe des langsameren Prozesses τ_2 lässt sich aufgrund der kleinen zugehörigen Amplitude schwer bestimmen. Unter der Annahme, dass die Daten bei 50,0 °C einen sinnvollen physikalischen Hintergrund widerspiegeln, ergäbe sich damit eine Relaxationskonstante $\tau_2 = 70$ s für den langsamsten Prozess.

7.3 Diskussion unter Berücksichtigung der Ergebnisse der IR-Untersuchungen aus Kap. 6

Die durch Regressionsanalyse ermittelten maximalen Relaxationszeiten der untersuchten Lipidproben sind in Tab. 7.2 zusammengefasst und Literaturdaten gegenübergestellt. Im Gegensatz zu den mit IR-Spektroskopie erhaltenen Daten (Kap. 6), bei denen aus der Literatur keine äquivalenten Messungen bekannt sind, können die im vorigen Unterabschnitt vorgestellten Kalorimetrie-Ergebnisse unter Berücksichtigung der ähnlichen Arbeiten von Grabitz et al. [29] und Boehm et al. [5] diskutiert werden. DPPC ist dabei das einzige Element der Schnittmenge der untersuchten Substanzen. Der Wert $\tau_1 = 34$ s, der den schnelleren Prozess der Umwandlung von DPPC symbolisiert, stimmt gut mit den veröffentlichten Werten dieser Autoren überein. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit jedoch ein weiterer langsamerer Prozess gefunden, ein Umstand, der nicht nur für DPPC, sondern für alle in dieser Arbeit vorgestellten Messungen gilt.

Die Ursache dafür kann in dem unterschiedlichen Vorgehen bei der Auswertung liegen. Grabitz et al. sowie auch Boehm et al. verwendeten ein Regressionsmodell, bei dem von vornherein ein einziger Relaxationsprozess angenommen wird und *analytisch* mit der Kalorimeter-Antwortfunktion gefaltet wird. Der Hauptteil der Amplitude der Daten befindet sich jedoch im Zeitbereich der Antwortfunktion des Kalorimters (0–30 s), während die der langsamen Prozesse sehr viel kleiner sind. Bei der Minimierung von χ^2 werden diese langsamen Prozesse somit weniger berücksichtigt, weil sie einen viel geringeren Anteil an der Summe der Fehlerquadrate χ^2 haben. Das in Kap. 7.1.3 und 7.1.4 beschriebene Vorgehen umgeht dieses Problem. Die Kurven werden hierbei *numerisch* entfaltet, was

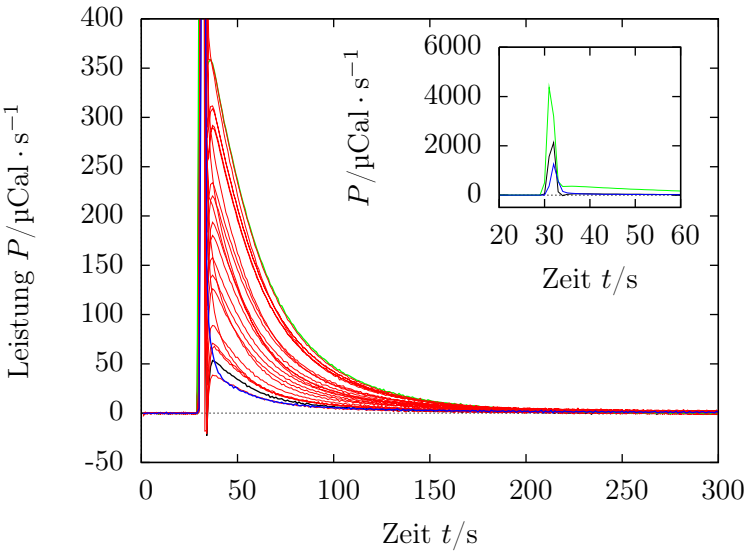

Abb. 7.13: Entfaltete P-t-Kurven einer Probe von **DMPE** bei steigenden Temperaturen: Beginn des Messintervalls bei 49,57 °C (—), Maximum der Gesamtamplitude bei 50,04 °C (—), Ende des Messintervalls bei 50,25 °C (—) sowie Zwischenwerte (—).

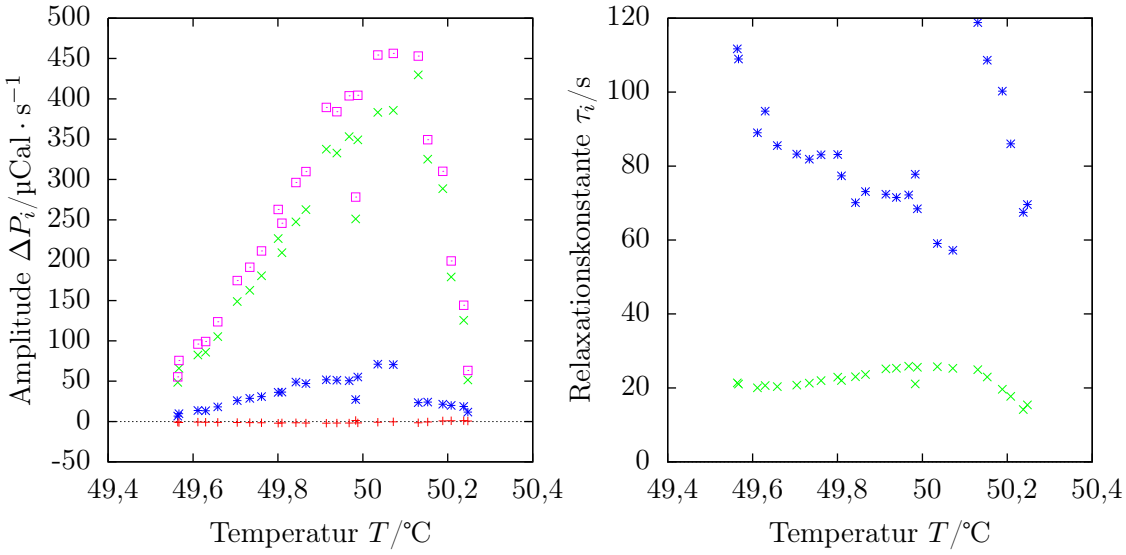

Abb. 7.14: Amplituden (links) und Zeitkonstanten (rechts) der P-t-Kurven von **DMPE** in Abhängigkeit der Temperatur.
Amplituden: $\Delta P_{\mathrm{Basis}}$ (+), ΔP_1 (×), ΔP_2 (∗), $\sum \Delta P_i$ (⊡)
Zeitkonstanten: τ_1 (×), τ_2 (∗)

Tab. 7.2: Vergleich der jeweils langsamsten Relaxationskonstanten τ_1 und τ_2 mit Werten aus der Literatur

Lipid	τ_1/s	τ_2/s	$\tau_{\max}$ [Ref., (Methode)]
DSPC	18	103	30 s [5, (PPC)]
DPPC	34	111	40 ms [33, (UV)], 30 s [5, 29, (PPC)]
DMPC	18	91	12 ms [33, (UV)], 33 s [29, (PPC)]
DMPA	7	40	700 ms [18, (UV)]
DMPE	26	70	—

Detektionsmethoden: Kalorimetrie (PPC), Trübungsmessung (UV)

zur Folge hat, dass die großen Amplituden, deren schnelles Zeitverhalten aufgrund der Totzeit des Instruments von vornherein nicht aufgelöst werden kann, unberücksichtigt bleiben und die Regressionsanalyse somit nicht mehr dominieren können.

Für DSPC fällt der Vergleich mit den Werten von Boehm et al. anders aus. Der eigene Wert ist mit 18 s um ein Drittel geringer als der in der Literatur. Im Fall von DMPC fehlen Daten in der Nähe von T_{m}, so dass ein Vergleich nicht sinnvoll erscheint. Die Umwandlung der Probe ist hoch kooperativ, so dass die Methode mit der nur annähernd gegebenen isothermen Bedingung aufgrund der starken Änderung von c_p mit der Temperatur an ihre Grenzen kommt. Ein eventueller Trend, der bei den Phosphatidylcholinen mit längeren Fettsäureketten langsamere Umwandlungen erwarten lassen würde, lässt sich nicht bestätigen.

Vergleicht man Substanzen gleicher Kettenlänge aber unterschiedlichen Kopfgruppen (DMPC, DMPA, DMPE), zeigen sich dagegen starke Änderungen. DMPE, dessen Kopfgruppe den Phosphatidylcholinen in chemischer Hinsicht am ähnlichsten ist, hat für τ_1 ähnliche Werte, wie sie von Grabitz et al. [29] aber auch von Boehm et al. [5] für Phosphatidylcholine gefunden wurden (Tab. 7.2). Der in dieser Arbeit neu beschriebene Prozess mit der Konstante τ_2 zeigt für DMPE im Vergleich mit den eigenen Ergebnissen jedoch deutlich kleinere Werte als die Choline. Dies trifft auch für die DMPA-Probe zu, welche die kleinsten Relaxationszeiten aufwies. Eine Besonderheit ist, dass das Temperaturprofil der Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 kein Maximum erkennen lässt. Dies lässt auf eine verminderte Kooperativität dieser Prozesse schließen, die damit erklärt werden kann, dass sich unter dem Eindruck der mechanischen Belastung der Probe durch die zunehmende Anzahl von Drucksprüngen während der Messung kleinere Vesikel bilden, die eine verringerte Temperatur und Kooperativität der Umwandlung aufweisen. Gestützt wird diese Annahme durch die Temperaturprofile der Amplituden, deren Daten Nebenmaxima zeigen, welche sich bei 49,65 °C und damit 0,25 K unterhalb der Temperatur des Hauptmaximums befinden (Abb. 7.12).

Die Ergebnisse der Drucksprung-Kalorimetrie und der Drucksprung-FTIR-Methode zeichnen kein einheitliches Bild der Umwandlungskinetiken. So unterscheiden sich z. B. die Entwicklungstendenzen der langsamsten Relaxationskonstanten bei den Phosphatidylcholinen. Während mit der IR-Spektroskopie eine Abnahme der Umwandlungsgeschwindigkeit bei kürzeren Alkylketten beobachtet werden konnte, geben die PPC-Ergebnisse ein unkla-

res Bild. Gleiches gilt bei der Betrachtung des Einflusses der Kopfgruppe bei den Lipiden mit C_{14}-Acylketten. Während mit der IR-Spektroskopie für DMPA die (bezogen auf die Zeitskala der Methode) langsamsten Umwandlungen gefunden worden sind, sind sie bei der Drucksprung-Kalorimetrie relativ schnell. Die Gründe dafür können vielfältig sein, da sich beide Methoden nicht nur in der Art der Detektion unterscheiden, sondern auch Kinetiken auf unterschiedlichen Zeitskalen betrachten, die wiederum mit stark unterschiedlichen Druckdifferenzen (4 bar gegen 100 bar) induziert werden.

Die Hauptursache dafür, dass mit der Drucksprung-FTIR-Spektroskopie keine langsamen Prozesse auf einer zweistelligen Sekundenskala gefunden werden können, liegt in den Temperaturschwankungen innerhalb der IR-Zelle begründet. Diese sind bei der IR-Apparatur eine Größenordnung höher als beim verwendeten VP–DSC-Kalorimeter. Die gemessenen Relaxationszeiten repräsentieren damit einen mittleren Wert aller Zeitkonstanten im Temperaturintervall dieser Schwankung. Da die Relaxationskonstanten ein Maximum durchlaufen, werden durch diese Mittelung Werte gemessen, die kleiner als die wahren (aber unbekannten) Werte sind.

Gemein ist den Ergebnissen beider Methoden, dass der Hauptteil der Gesamtamplitude schnelleren, nicht auflösbaren Prozessen gehört und die Teilamplituden der langsameren Prozesse kleiner sind. Dabei muss immer hervorgehoben werden, dass die zur Auswertung herangezogenen Regressionsmodelle Gl. 7.1 und Gl. 6.1 zwar eine feste Anzahl von Relaxationstermen vorgeben, die Daten jedoch eher den Anschein erwecken, dass sie eine Vielzahl von Prozessen widerspiegeln, deren Zeitkonstanten eng beieinander liegen oder gar ein kontinuierliches Spektrum bilden. Somit geben die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten einen Sachverhalt wieder, der auch im Cluster-Modell nach Kanehisa und Tsong (Kap. 2.2.1) verarbeitet und beschrieben worden ist. Da das Cluster-Modell annimmt, dass die Umwandlung nur an den Cluster-Grenzflächen stattfindet, sollte sich die Umwandlung von Lipid-Gemischen im Vergleich zu reinen Lipidproben verlangsamen, weil durch den Drucksprung auch ein Ungleichgewicht bezüglich der Konzentration der einzelnen Lipidspezies abgebaut werden muss, was nur durch laterale Diffusion erfolgen kann. Derartige Effekte wurden von Janetzki im Rahmen einer Diplomarbeit [44] bestätigt. Weitergehende Messungen mit Drucksprung-Kalorimetrie und der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Drucksprung-FTIR-Spektroskopie sind gute Anknüpfungspunkte für zukünftige Arbeiten.

Ein anderes Modell zur Beschreibung der Kinetik von Lipid-Phasenumwandlungen geht auf Grabitz et al. zurück (Kap. 2.2.3). Es ist kein kinetisches Modell, wie das o. g. Cluster-Modell, sondern hat einen thermodynamischen Ansatz. Nach dieser Theorie ist nach Gl. 2.25 die Relaxationskonstante τ proportional zur Wärmekapazität c_p. Die auf die jeweiligen Maximumswerte normierten Kurven $c_p(T)$ und $\tau(T)$ fallen demnach aufeinander. Aussagen über einzelne kinetische Elementarschritte kann das Modell dabei nicht geben.

In Abb. 7.15 ist die auf den jeweiligen Maximumswert normierte Relaxationskonstante τ_i und DSC-Kurve von DSPC dargestellt. Es soll geprüft werden, ob die Proportionalität von c_p und τ auf eine Mehrprozesskinetik übertragbar ist. Es zeigt sich jedoch, dass die normierten τ_i-Daten eine sehr viel breitere Verteilung als die der DSC-Kurve aufweisen. Weiterhin sind die Maxima der Zeitkonstanten gegeneinander verschoben (Abb. 7.15).

Die gleiche Auftragung wurde in Abb. 7.16 für DMPE vorgenommen. Da die anhand

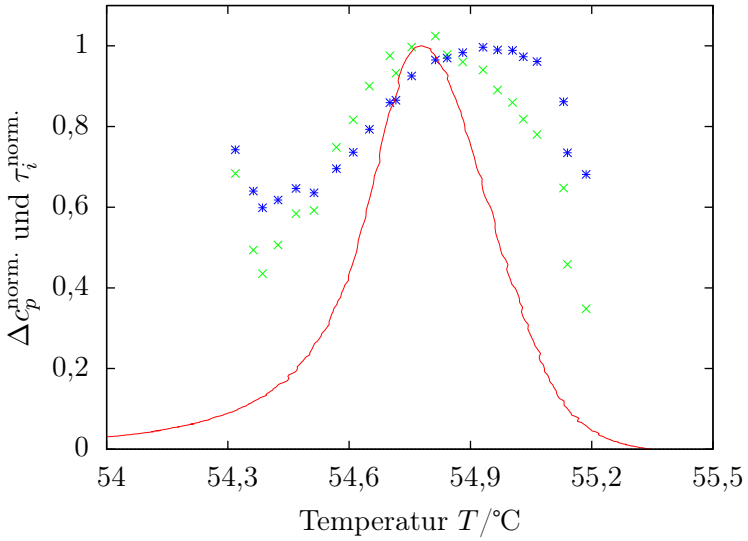

Abb. 7.15: Darstellung der auf die Maxima normierten Größen der Relaxationskonstanten τ_i (mit Drucksprung-Kalorimetrie bestimmt) und Wärmekapazitäten Δc_p von DSPC. Symbole: Δc_p (—), τ_1 (×), τ_2 (∗)

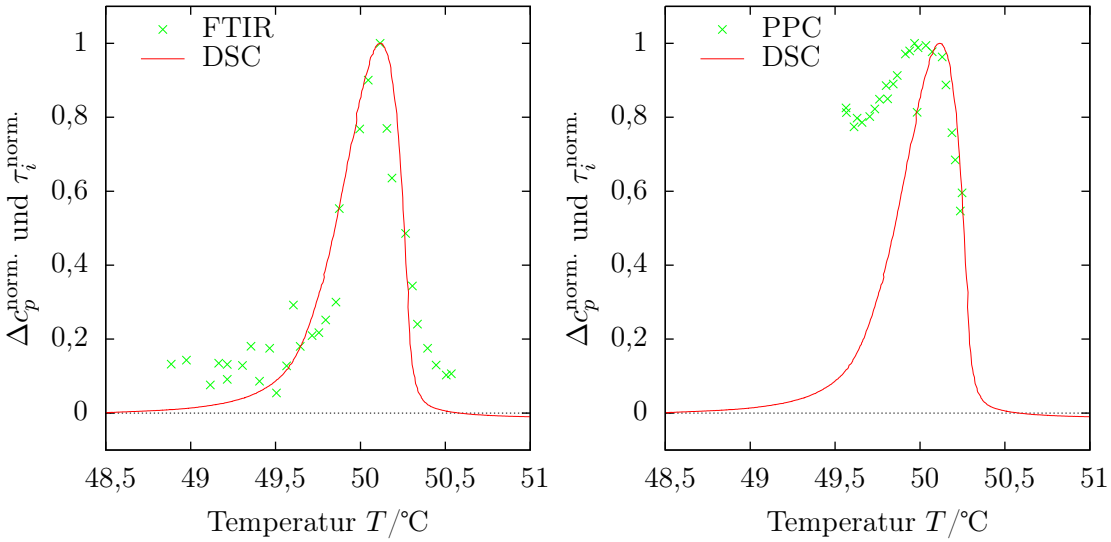

Abb. 7.16: Darstellung der auf die Maxima normierten Größen der Relaxationskonstanten τ_i bestimmt mit IR-Spektroskopie (links) und Kalorimetrie (rechts) sowie der Wärmekapazität Δc_p von DMPE. Es bedeuten: Δc_p (—), τ_1 (×).

der $\nu_s(CH_2)$-Bande bestimmten Relaxationskonstanten eine stark ausgeprägte Peakform der Temperaturabhängigkeit aufweisen (Kap. 6.2.5), werden in Abb. 7.16 die mit FTIR-Spektroskopie erhaltenen normierten Daten denen gegenübergestellt, die mit Kalorimetrie erhalten worden sind. Es zeigt sich, dass die IR-Daten von DMPE die Proportionalitätsbedingung nach Gl. 2.25 nahezu erfüllen, während die mit PPC erhaltenen temperaturabhängigen Kurven im Vergleich zur DSC-Kurve verbreitert sind. Die Daten in Abb. 7.15 und 7.16 sind lediglich eine Auswahl, bei denen eine normierte Auftragung sinnvoll erschien. Bei anderen Proben, wie DMPA, zeigen die Zeitkonstanten kein Maximum, so dass auf eine normierte Auftragung verzichtet wurde.

Abschliessend lässt sich sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Daten keine Aussage über die Gültigkeit oder Ungültigkeit der von Grabitz et al. [29] postulierten τ-c_p-Proportionalität zulassen. Bedingt durch die Annahme einer Einprozesskinetik ist diese Theorie jedoch sehr limitiert und es muss kritisch hinterfragt werden, ob es gerechtfertigt ist, ein Modell zu entwickeln, welches experimentelle Befunde vieler Autoren über die Existenz mehrerer Prozesse bei der Umwandlung von Lipidphasen einfach ignoriert.

8 Zusammenfassung

Motivation

- Das Anliegen dieser Arbeit war es, Aufklärung darüber zu verschaffen, welche Vorgänge auf molekularer Ebene während der Phasenumwandlung wässriger Lipidsysteme ablaufen. Bereits veröffentlichte Daten waren mit Methoden erzielt worden, die lediglich auf makroskopische Eigenschaften der Systeme ansprachen und somit keine Zuordnung der Prozesse ermöglichten.

- Als Ausweg wurde die IR-Spektroskopie verwendet, da sie gute Möglichkeiten bietet, konformationelle Änderungen der Alkylketten und Änderungen der Hydratisierung der Kopfgruppen zu verfolgen.

- Es wurden auch Drucksprung-Kalorimetrie-Experimente durchgeführt, um die experimentelle Basis zu verbreitern und auch globale Aussagen über die bei der Phasenumwandlung ablaufenden Prozesse ableiten zu können. Die Daten wurden sowohl den eigenen, mit IR-Spektroskopie erhaltenen Werten, als auch den Ergebnissen der Arbeiten von Grabitz et al. [29] und Boehm et al. [5] gegenübergestellt und diskutiert.

Apparative Arbeiten

- Es wurde eine Apparatur für die Drucksprung-FTIR-Spektroskopie beschrieben, die das zeitaufgelöste Messen von Spektren nach einem Drucksprung von bis zu 100 bar auf Umgebungsdruck ermöglicht.

- Das Drucksystem besteht aus folgenden Komponenten:
  - einer bis 300 bar druckstabilen IR-Transmissionszelle,
  - einer HPLC-Pumpe als Druckgeber eines hydraulisch arbeitenden Systems
  - zwei elektromagnetisch schaltende Ventile zum Auslösen des Drucksprunges (4 ms Totzeit) und
  - einem Drucküberträger auf der Basis einer flexiblen Membran zur räumlichen Trennung von Probe und Hydraulikflüssigkeit.

- Das Detektionssystem (FTIR-Spektrometer) kann Spektren über einen Zeitraum von 5,6 s mit einer Zeitauflösung von 8 ms aufnehmen. Um diese Messungen durchführen zu können, waren Kompromisse bei der maximalen Wellenzahlauflösung ($8\,\mathrm{cm}^{-1}$) und der Bandbreite der Spektren ($3100–1400\,\mathrm{cm}^{-1}$) notwendig. Weiterhin mussten

Probleme bei der Phasenkorrektur der Spektren bewältigt werden, die bei der statischen FTIR-Spektroskopie unter Normaldruck nicht auftreten.

- Es wurde eine Software programmiert, die das Zusammenspiel von Druck- und Detektionssystem ermöglicht.

Drucksprung-FTIR-Spektroskopie

- Mit der o. g. Apparatur wurden fünf Lipidsysteme (DSPC, DPPC, DMPC, DMPA und DMPE) untersucht.

- Die konformationellen Änderungen der Alkylketten während des Überganges von der geordneten zur fluiden Phase stellen nicht einen Prozess der bisher nicht zuordbaren Vorgänge dar, sondern zeigen vielmehr, dass die Umorientierung selber in mehrere Prozesse gegliedert ist. Diese Prozesse sind auf unterschiedlichen Zeitskalen angesiedelt. Dabei haben die langsameren Prozesse einen immer geringeren Anteil an der Umwandlung.

- Bei den Phosphatidylcholinen ist eine Kettenlängenabhängigkeit der anhand der $\nu_s(CH_2)$-Schwingung ermittelten langsamsten Relaxationskonstante τ festzustellen: τ wird mit kürzer werdender Kette kleiner.

- Bei Lipiden mit jeweils gleicher C_{14}-Kette, aber unterschiedlicher Kopfgruppe, unterscheiden sich die langsamsten Relaxationszeiten ebenfalls. DMPA zeigt ein breites Temperaturprofil der Relaxationskonstanten, dessen Maximum die größte mit dieser Apparatur bestimmte Zeitkonstante von 3,5 s hat. Der korrespondierende Wert von DMPE ist mit 0,9 s kleiner, jedoch hat das τ-T-Profil von DMPE die ausgeprägteste Peakform aller untersuchten Lipidsysteme. Da langsame Wärmeübergangsprozesse im niedrigen Temperaturbereich die kinetischen Kurven beeinflussen, kann keine Aussage über entsprechende Prozesse bei DMPC getroffen werden.

Drucksprung-Kalorimetrie

- Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren [5, 29] mit dieser Methode, konnten statt einem, zwei Relaxationsprozesse aufgelöst werden. Die Zeitkonstanten für diese Prozesse liegen im Bereich von 18–34 s und 70–111 s. Für DMPA fallen sie kleiner aus ($\tau_1 = 7$ s, $\tau_2 = 40$ s). Die Daten zeigen, dass auf die langsameren Prozesse ein immer kleinerer Anteil der Gesamtamplitude fällt. Schnellere, nicht auflösbare Prozesse existieren ebenfalls, lassen sich jedoch nur anhand der Differenz der Teilamplituden zur Gesamtamplitude identifizieren.

- Das PPC-Signal wurde vor der Regressionsanalyse numerisch entfaltet, um damit auch die im Vergleich zur Gesamtamplitude kleinen Amplituden der auflösbaren Prozesse besser erfassen zu können.

- Die ermittelten Zeitkonstanten des schnelleren auflösbaren Prozesses stimmen nicht in jedem Fall mit denen der genannten Autoren überein. So wurde für DSPC ein leicht kleinerer Maximalwert gefunden. Der Wert für DPPC passt dagegen gut zu den Daten aus der Literatur. Insgesamt kann die Kettenlängenabhängigkeit der Relaxationskonstanten, wie sie mit IR-Detektion gefunden worden ist, mit den Kalorimetriedaten nicht bestätigt werden. Gleiches gilt für die Kopfgruppenabhängigkeit.

Schlussfolgerungen

- Der Umstand, dass sowohl die kinetischen IR- als auch die Kalorimetrie-Daten nicht mit einer festen Zahl von zwei oder drei Exponentialtermen angepasst werden können, deutet darauf hin, dass den Kurven ein Spektrum von Relaxationszeiten zugrunde liegt. Damit sind die Daten konform zum Cluster-Modell von Kanehisa und Tsong [46], welches ein solches Spektrum vorhersagt.

- Die mit IR-Spektroskopie beobachtete konformationelle Umlagerung der Alkylketten stellt nicht einen Elementarschritt der Phasenumwandlung dar, sondern läuft über mehrere Prozesse der Umwandlung verteilt ab. Dies kann so verstanden werden, dass die Bildung von gauche-Konformeren zusätzliches Volumen benötigt, welches durch andere Prozesse bereitgestellt werden muss, bzw. zieht die Umlagerung auch weitere Veränderungen nach sich. Wird das benötigte Volumen über mehrere Prozesse verteilt bereitgestellt, kann die Bildung von gauche-Konformeren auch nur stufenweise erfolgen. Ähnliche Überlegungen impliziert das „Kinkenmodell“ von Eck und Holzwarth [17].

- Die Ergebnisse lassen sich nicht mit dem thermodynamischen Modell von Grabitz et al. [29] in Einklang bringen. Dieses Modell beschreibt den zeitlichen Ablauf der Umwandlung lediglich als Einprozesskinetik. In der eigenen Arbeit wurden jedoch Ergebnisse vorgestellt (Kap. 7), die – unter Verwendung einer sehr ähnlichen Apparatur – das Auftreten mehrerer Prozesse bestätigen. Dies steht im Widerspruch zu den Arbeiten von Grabitz et al. [29] und Boehm et al. [5].

Ausblick

- Als Anknüpfungspunkt an die hier vorgestellten Ergebnisse bietet sich die Untersuchung von Lipidgemischen an. Da bei diesen Systemen durch den Drucksprung ebenfalls eine Änderung des Lipidanteils der beider Phasen induziert wird, die durch Diffusion ausgeglichen werden muss, sind Verlangsamungen der Kinetiken zu erwarten.

- Weiterhin lassen sich die Experimente mit der vorgestellten Drucksprung-FTIR-Apparatur auch auf andere lyotrope Systeme, wie z. B. Block-Copolymere in Lösung, ausweiten.

Literaturverzeichnis

[1] Blume, A.: Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies. In: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1 (1996), S. 64–77

[2] Blume, A. ; Eibl, H.: Influence of charge on bilayer membranes: calorimetric investigations of phosphatidic-acid bilayers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 558 (1979), S. 13–21

[3] Blume, A. ; Hübner, W. ; Messner, G.: Fourier-transform infrared-spectroscopy of C–13=O-labeled phospholipids hydrogen-bonding to carbonyl groups. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 8239–8249

[4] Blume, Alfred: Application of calorimetry to lipid model membranes. In: Hidalgo, Cecilia (Hrsg.): *Physical Properties of Biological Membranes and Their Functional Implications.* Plenum Publishing Corporation, 1988, Kap. 3, S. 71–121

[5] Boehm, K. ; Guddorf, J. ; Hinz, H. J.: Application of pressure-modulated differential scanning calorimetry to the determination of relaxation kinetics of multilamellar lipid vesicles. In: *Biophys. Chem.* 126 (2007), S. 218–227

[6] Brower, K. R.: A method for measuring activation volumes of fast reversible reactions. ferric thiocyanate complex. In: *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968), S. 5401–5403

[7] Cameron, D. G. ; Kauppinen, J. K. ; Moffatt, D. J. ; Mantsch, H. H.: Precision in condensed phase vibrational spectroscopy. In: *Appl. Spectrosc.* 36 (1982), S. 245–250

[8] Casal, H. L. ; Mantsch, H. H.: Polymorphic phase-behavior of phospholipid-membranes studied by infrared-spectroscopy. In: *Biochim. Biophys. Acta* 779 (1984), S. 381–401

[9] Casal, H. L. ; Mcelhaney, R. N.: Quantitative determination of hydrocarbon chain conformational order in bilayers of saturated phosphatidylcholines of various chain lengths by fourier-transform infrared-spectroscopy. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 5423–5427

[10] Cevc, G.: Isothermal lipid phase-transitions. In: *Chem. Phys. Lipids* 57 (1991), S. 293–307

[11] Clegg, R. M. ; Maxfield, B. W.: Chemical kinetic studies by a new small pressure perturbation method. In: *Rev. Sci. Instrum.* 47 (1976), S. 1383–1393

[12] Crnila, Dejan ; Dybdahl, Lars: *ComPort Library*. Software-Komponente. 2003. – URL `http://sourceforge.net/projects/comport/`

[13] Davies, M. A. ; Hubner, W. ; Blume, A. ; Mendelsohn, R.: Acyl chain conformational ordering in 1,2–dipalmitoylphosphatidylethanolamine, integration of FT-IR and H-2 NMR results. In: *Biophys. J.* 63 (1992), S. 1059–1062

[14] Davies, M. A. ; Schuster, H. F. ; Brauner, J. W. ; Mendelsohn, R.: Effects of cholesterol on conformational disorder in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a quantitative IR study of the depth dependence. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 4368–4373

[15] Davis, J. S. ; Gutfreund, H.: Scope of moderate pressure changes for kinetic and equilibrium studies of biochemical systems. In: *FEBS Lett.* 72 (1976), S. 199–207

[16] Dousseau, F. ; Therrien, M. ; Pezolet, M.: On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous-solutions of proteins. In: *Appl. Spectrosc.* 43 (1989), S. 538–542

[17] Eck, V. ; Holzwarth, J. F.: Fast dynamic phenomena in vesicles of phospholipids during the phase transition. In: Mittal, K. L. (Hrsg.) ; Lindmann, B. (Hrsg.): *Surfactants in Solution*. Plenum Press, 1984, S. 2059–2079

[18] Elamrani, K. ; Blume, A.: Phase-transition kinetics of phosphatidic-acid bilayers, a pressure-jump relaxation study. In: *Biochemistry* 22 (1983), S. 3305–3311

[19] Elamrani, K. ; Blume, A.: Phase-transition kinetics of phosphatidic-acid bilayers, a stopped-flow study of the electrostatically induced transition. In: *Biochim. Biophys. Acta* 769 (1984), S. 578–584

[20] Emmens, W. C.: *XYGraph*. Software-Komponente. 2007. – URL `http://www.solcon.nl/wcemmens/xygraph.htm`

[21] Engel, J. ; Schwarz, G.: Cooperative conformational transitions of linear biopolymers. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 9 (1970), S. 389–472

[22] Erbes, J. ; Gabke, A. ; Rapp, G. ; Winter, R.: Kinetics of phase transformations between lyotropic lipid mesophases of different topology: a time-resolved synchrotron X-ray diffraction study using the pressure-jump relaxation technique. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2 (2000), S. 151–162

[23] Finegold, L. ; Singer, M. A.: The metastability of saturated phosphatidylcholines depends on the acyl chain-length. In: *Biochim. Biophys. Acta* 855 (1986), S. 417–420

[24] Fisher, M. E.: Theory of condensation and critical point. In: *Physics* 3 (1967), S. 255

[25] Frenkel, J.: *Kinetic Theory of Liquids*. Oxford University Press, 1946

[26] Genz, A. ; Holzwarth, J. F.: Laser temperature jump experiments with fluorescence polarization and turbidity detection on the phase-transition of single shell vesicles of dimyristoylphosphatidylcholine. In: *Colloid Polym. Sci.* 263 (1985), S. 484–493

[27] Genz, A. ; Holzwarth, J. F.: Dynamic fluorescence measurements on the main phase-transition of dipalmytoylphosphatidylcholine vesicles. In: *Eur. Biophys. J. Biophy.* 13 (1986), S. 323–330

[28] Grabielle–Madelmont, C. ; Perron, R.: Calorimetric studies on phospholipid-water systems. 1. DL-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)-water system. In: *J. Colloid Interface Sci.* 95 (1983), S. 471–482

[29] Grabitz, P. ; Ivanova, V. P. ; Heimburg, T.: Relaxation kinetics of lipid membranes and its relation to the heat capacity. In: *Biophys. J.* 82 (2002), S. 299–309

[30] Griffiths, Peter R. ; Haseth, James A. de: Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: Elving, P. J. (Hrsg.) ; Winefordner, J. D. (Hrsg.) ; Kolthoff, I.M. (Hrsg.): *Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications* Bd. 83. John Wiley & Sons, 1986

[31] Groll, R. ; Bottcher, A. ; Jager, J. ; Holzwarth, J. F.: Temperature dependent intermediate structures during the main phase transition of dimyristoyl phosphatidylcholine vesicles a combined iodine laser-temperature jump and time resolved cryo-electron microscopy study. In: *Biophys. Chem.* 58 (1996), S. 53–65

[32] Gruenewald, B.: On the phase-transition kinetics of phospholipid-bilayers relaxation experiments with detection of fluorescence anisotropy. In: *Biochim. Biophys. Acta* 687 (1982), S. 71–78

[33] Gruenewald, B. ; Blume, A. ; Watanabe, F.: Kinetic investigations on the phase-transition of phospholipid-bilayers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 597 (1980), S. 41–52

[34] Gruenewald, B. ; Stankowski, S. ; Blume, A.: Curvature influence on the cooperativity and the phase-transition enthalpy of lecithin vesicles. In: *FEBS Lett.* 102 (1979), S. 227–229

[35] Günzler, Helmut ; Heise, Herbert M.: *IR-Spectroskopie*. 3. VCH, 1996

[36] Heimburg, T.: A model for the lipid pretransition: Coupling of ripple formation with the chain-melting transition. In: *Biophys. J.* 78 (2000), S. 1154–1165

[37] Höhne, G. W. H. ; Hemminger, W. F. ; Flammersheim, H.-J.: *Differential Scanning Calorimetry*. 2. Springer, 2003

[38] Hübner, W. ; Blume, A.: Interactions at the lipid-water interface. In: *Chem. Phys. Lipids* 96 (1998), S. 99–123

[39] Ichimori, H. ; Hata, T. ; Yoshioka, T. ; Matsuki, H. ; Kaneshina, S.: Thermotropic and barotropic phase transition on bilayer membranes of phospholipids with varying acyl chain-lengths. In: *Chem. Phys. Lipids* 89 (1997), S. 97–105

[40] Imperial College London: *High Pressure X-ray Cell for Soft Matter*. Internet. – URL `http://www.imperial.ac.uk/pressurecell/index.htm`

[41] Israelachvili, J. N. ; Mitchell, D. J. ; Ninham, B. W.: Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. In: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. II* 72 (1976), S. 1525–1568

[42] Ivanova, V. P. ; Heimburg, T.: Histogram method to obtain heat capacities in lipid monolayers, curved bilayers, and membranes containing peptides. In: *Phys. Rev. E* 6304 (2001), S. 041914

[43] Jacob, M. ; Holtermann, G. ; Perl, D. ; Reinstein, J. ; Schindler, T. ; Geeves, M. A. ; Schmid, F. X.: Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure-jump technique. In: *Biochemistry* 38 (1999), S. 2882–2891

[44] Janetzki, Herbert: *Kinetische Untersuchungen an binären Phospholipidgemischen mit Hilfe der Drucksprung-Relaxationsmethode*, Universität Kaiserslautern, Diplomarbeit, 1997

[45] Jost, A. ; Olschewski, H. A. ; Wolfrum, J.: Das Stosswellenrohr: Einige Anwendungen in Chemie und Physik. In: *Chem. Ing. Tech.* 38 (1966), S. 1241

[46] Kanehisa, M. I. ; Tsong, T. Y.: Cluster model of lipid phase-transitions with application to passive permeation of molecules and structure relaxations in lipid bilayers. In: *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978), S. 424–432

[47] Kegeles, G. ; Ke, C. H.: Light-scattering pressure-jump kinetics apparatus. In: *Anal. Biochem.* 68 (1975), S. 138–147

[48] Knoche, W. ; Wiese, G.: Pressure-jump relaxation technique with optical detection. In: *Rev. Sci. Instrum.* 47 (1976), S. 220–221

[49] Korth Kristalle GmbH: *Eigenschaften der Materialien*. Produktbeschreibung der Internetseite des Herstellers. Am Jägersberg 3, D–24161 Altenholz (Kiel): Korth Kristalle GmbH (Veranst.). – URL `www.korth.de`

[50] Lee, B.: Solvent reorganization contribution to the transfer thermodynamics of small nonpolar molecules. In: *Biopolymers* 31 (1991), S. 993–1008

[51] Lewis, R. N. A. H. ; Mak, N. ; Mcelhaney, R. N.: A differential scanning calorimetric study of the thermotropic phase-behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing linear saturated fatty acyl chains. In: *Biochemistry* 26 (1987), S. 6118–6126

[52] Lewis, R. N. A. H. ; Mcelhaney, R. N.: Calorimetric and spectroscopic studies of the polymorphic phase-behavior of a homologous series of n-saturated 1,2-diacyl phosphatidylethanolamines. In: *Biophys. J.* 64 (1993), S. 1081–1096

[53] Lewis, R. N. A. H. ; Mcelhaney, R. N. ; Pohle, W. ; Mantsch, H. H.: Components of the carbonyl stretching band in the infrared-spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers, a reevaluation. In: *Biophys. J.* 67 (1994), S. 2367–2375

[54] Lin, L. N. ; Brandts, J. F. ; Brandts, J. M. ; Plotnikov, V.: Determination of the volumetric properties of proteins and other solutes using pressure perturbation calorimetry. In: *Anal. Biochem.* 302 (2002), S. 144–160

[55] Mantsch, H. H. ; Mcelhaney, R. N.: Phospholipid phase-transitions in model and biological-membranes as studied by infrared-spectroscopy. In: *Chem. Phys. Lipids* 57 (1991), S. 213–226

[56] Maroncelli, M. ; Qi, S. P. ; Strauss, H. L. ; Snyder, R. G.: Nonplanar conformers and the phase-behavior of solid normal-alkanes. In: *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982), S. 6237–6247

[57] Maroncelli, M. ; Strauss, H. L. ; Snyder, R. G.: On the CD_2 probe infrared method for determining polymethylene chain conformation. In: *J. Phys. Chem.* 89 (1985), S. 4390–4395

[58] Marsh, D.: Analysis of the chainlength dependence of lipid phase-transition temperatures: main and pretransitions of phosphatidylcholines; main and non-lamellar transitions of phosphatidylethanolamines. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1062 (1991), S. 1–6

[59] Melchior, D. L. ; Morowitz, H. J.: Dilatometry of dilute suspensions of synthetic lecithin aggregates. In: *Biochemistry* 11 (1972), S. 4558

[60] Mendelsohn, R. ; Davies, M. A. ; Brauner, J. W. ; Schuster, H. F. ; Dluhy, R. A.: Quantitative-determination of conformational disorder in the acyl chains of phospholipid-bilayers by infrared-spectroscopy. In: *Biochemistry* 28 (1989), S. 8934–8939

[61] Mendelsohn, R. ; Davies, M. A. ; Schuster, H. F. ; Xu, Z. C. ; Bittman, R.: CD_2 rocking modes as quantitative infrared probes of one-bond, 2-bond, and 3-bond conformational disorder in dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine cholesterol mixtures. In: *Biochemistry* 30 (1991), S. 8558–8563

[62] Nelder, J. A. ; Mead, R.: A simplex-method for function minimization. In: *Computer Journal* 7 (1965), S. 308–313

[63] Okamura, E. ; Umemura, J. ; Takenaka, T.: Orientation studies of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine multibilayers by polarized FTIR-ATR spectroscopy. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1025 (1990), S. 94–98

[64] Pax, Horst: *Konstruktion einer Drucksprung ATR-FT-IR-Meßzelle und Aufbau einer Meßanordnung zur zeitaufgelösten FT-IR-Spektroskopie. Untersuchungen zur Kinetik des Hauptphasenübergangs von Phospholipidmodellmembranen.*, Universität Kaiserslautern, Dissertation, 1997

[65] Plotnikov, V. V. ; Brandts, J. M. ; Lin, L. N. ; Brandts, J. F.: A new ultrasensitive scanning calorimeter. In: *Anal. Biochem.* 250 (1997), S. 237–244

[66] Press, William H. ; Flannery, Brian P. ; Teukolsky, Saul A. ; Vetterling, William T.: *Numerical Recipes - The Art of Scientific Computing.* Cambridge University Press, 1989

[67] Rio, J. M. del ; Jones, M. N.: Thermodynamics of the hydrophobic effect. In: *J. Phys. Chem. B* 105 (2001), S. 1200–1211

[68] Rosgen, J. ; Hinz, H. J.: Pressure-modulated differential scanning calorimetry: Theoretical background. In: *Anal. Chem.* 78 (2006), S. 991–996

[69] Seddon, J. M. ; Harlos, K. ; Marsh, D.: Metastability and polymorphism in the gel and fluid bilayer phases of dilauroylphosphatidylethanolamine. In: *J. Biol. Chem.* 258 (1983), S. 3850–3854

[70] Seddon, J. M. ; Squires, A. M. ; Conn, C. E. ; Ces, O. ; Heron, A. J. ; Mulet, X. ; Shearman, G. C. ; Templer, R. H.: Pressure-jump X-ray studies of liquid crystal transitions in lipids. In: *Phil. Trans. R. Soc. A* 364 (2006), S. 2635–2655

[71] Senak, L. ; Davies, M. A. ; Mendelsohn, R.: A quantitative IR study of hydrocarbon chain conformation in alkanes and phospholipids CH_2 wagging modes in disordered bilayer and HII phases. In: *J. Phys. Chem.* 95 (1991), S. 2565–2571

[72] Senak, L. ; Moore, D. ; Mendelsohn, R.: CH_2 wagging progressions as ir probes of slightly disordered phospholipid acyl chain states. In: *J. Phys. Chem.* 96 (1992), S. 2749–2754

[73] Snyder, R. G.: Vibrational study of chain conformation of liquid n-paraffins and molten polyethylene. In: *J. Chem. Phys.* 47 (1967), S. 1316

[74] Snyder, R. G. ; Maroncelli, M. ; Strauss, H. L. ; Elliger, C. A. ; Cameron, D. G. ; Casal, H. L. ; Mantsch, H. H.: Distribution of gauche bonds in crystalline n–$C_{21}H_{44}$ in phase-II. In: *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983), S. 133–134

[75] Snyder, R. G. ; Poore, M. W.: Conformational structure of polyethylene chains from infrared-spectrum of partially deuterated polymer. In: *Macromolecules* 6 (1973), S. 708–715

[76] Southall, N. T. ; Dill, K. A. ; Haymet, A. D. J.: A view of the hydrophobic effect. In: *J. Phys. Chem. B* 106 (2002), S. 521–533

[77] Steinhart, M. ; Kriechbaum, M. ; Pressl, K. ; Amenitsch, H. ; Laggner, P. ; Bernstorff, S.: High-pressure instrument for small- and wide-angle x-ray scattering. II. Time-resolved experiments. In: *Rev. Sci. Instrum.* 70 (1999), S. 1540–1545

[78] Strehlow, H. ; Becker, M.: Ein Drucksprung-Verfahren zur Messung der Geschwindigkeit von Ionenreaktionen. In: *Zeitschrift für Elektrochemie* 63 (1959), S. 457–461

[79] Träuble, H.: Phase transitions in lipids possible trigger-mechanisms in biological membranes. In: *Naturwissenschaften* 58 (1971), S. 277–284

[80] Tsong, T. Y. ; Kanehisa, M. I.: Relaxation phenomena in aqueous dispersions of synthetic lecithins. In: *Biochemistry* 16 (1977), S. 2674–2680

[81] Tuchtenhagen, J. ; Ziegler, W. ; Blume, A.: Acyl-chain conformational ordering in liquid-crystalline bilayers - comparative FT-IR and H-2-NMR studies of phospholipids differing in headgroup structure and chain-length. In: *Eur. Biophys. J.* 23 (1994), S. 323–335

[82] Venyaminov, S. Y. ; Prendergast, F. G.: Water (H_2O and D_2O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm^{-1} range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions. In: *Anal. Biochem.* 248 (1997), S. 234–245

[83] Yager, P. ; Peticolas, W. L.: The kinetics of the main phase-transition of aqueous dispersions of phospholipids induced by pressure jump and monitored by raman-spectroscopy. In: *Biochim. Biophys. Acta* 688 (1982), S. 775–785

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit durch ihre Anregungen und Diskussionsbereitschaft unterstützt haben.

- An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Alfred Blume für die kurzfristige Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, der Überlassung des Themas und der Möglichkeit dieses frei bearbeiten zu können. Ich danke weiterhin für wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen sowie für seinen Einsatz zur Finanzierung von Stellen, Substanzen und Apparaten.

- Ich danke weiterhin meinen Kooperationspartnern im Institut für Physik, namentlich Herrn Dr. Günter Hempel, Herrn Dr. Uwe Heuert und Frau Dr. Marina Krumova für die Zusammenarbeit im Rahmen des SFB 418.

- Der Bau einer Apparatur kann nicht ohne die sachkundige Hilfe von Werkstattmitarbeitern durchgeführt werden. Mein spezieller Dank gilt Herrn Andreas Lonitz für die stets offene Tür, der guten Beratung und das schnelle Anfertigen von Bauteilen bzw. elektronischen Komponenten. In gleicher Weise möchte ich Herrn Schlosser vom Bereich der Technischen und Makromolekularen Chemie für die Anfertigung, Beratung und das zeitnahe Anfertigen mechanischer Bauteile danken. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Werkstätten des Institutes für Physik, die von Herrn Schmetzdorf (Elektronik) und Herrn Benkwitz (Feinmechanik) geleitet werden. Ebenso danke ich Herrn Hartmann und Herrn Koschine von der Firma „Bruker“ für die unkomplizierte Hilfe bei der Beseitigung von Unklarheiten, die das Spektrometer betrafen.

- Frau Ingrid Schaller danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und das Auffüllen meines Detektors mit flüssigem Stickstoff an sehr, sehr frühen Morgenstunden. Frau Bettina Fölting möchte ich für die Hilfe bei DSC- und PPC-Messungen danken.

- Mein Dank gilt Dag Leine für das Einweisen in die Benutzung des IR-Spektrometers sowie für Tipps zu Programmierungs- und Softwarethemen. Frau Dr. Baumeister, Dr. Förster und Dr. Hauser danke ich für eine gute Zusammenarbeit im Rahmen des Praktikums.

- Ich danke den Lesern der Usenet-Gruppen `de.comp.lang.delphi.misc`, `de.comp.lang.pascal`, `de.sci.electronics` und `de.comp.text.tex` für die Beantwortung von Fragen zu Programmierung und Elektronik.

- Mein Dank gilt Frau Christine Dietel für die Hilfe bei der Jagd nach Rechtschreibfehlern.

- Katja Knauf, Christian Schwieger, Andreas Kerth, Elkin Amado und Jessie Lorenzo Chao danke ich für (nicht nur) wissenschaftliche Diskussionen bei viel Kaffee und Kuchen.
- Insgesamt möchte ich mich bei meinen Kollegen für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Gern denke ich an die gemeinsamen Grillabende am Mühlgraben, die Seminar-Nachsitzungen und unsere Sommerausflüge zurück.
- Meinen Eltern danke ich, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich nach allen Kräften unterstützt haben. Ebenso gilt mein Dank meiner Freundin für ihre Liebe, ihre Geduld und ihre Kraft in guten und schlechten Zeiten.

Lebenslauf

Person

Name:	Martin Schiewek
Geburtsdatum:	4. September 1976
Geburtsort:	Lutherstadt Wittenberg
Eltern:	Klaus–Peter Schiewek, Diplom-Ingenieur
	Rosemarie Schiewek, Krankenschwester
Familienstand:	ledig

Werdegang

1983–1991	POS „Walter Nicolai“ Wittenberg
1991–1995	Martin-Luther-Gymnasium Wittenberg
1995	Abitur
1995–1996	Zivildienst auf der chirurgischen Intensivstation des Krankenhauses „Paul-Gerhardt-Stift“ in Wittenberg
1996–2001	Chemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg
2001	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie (betreut von Prof. Dr. Martin Goez)
2001	Diplom
seit 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physikalische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg

Publikationen

- Goez, M.; Schiewek, M.; Musa, M.H.O.: Near-UV photoionization of [Ru(bpy)(3)](2+): A catalytic cycle with an excited species as catalyst. In: *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2002), 41, 1535–1538.
- Goez, M.; von Ramin-Marro, D.; Musa, M.H.O.; Schiewek, M.: Photoionization of [Ru(bpy)(3)](2+): A catalytic cycle with water as sacrificial donor. In: *J. Phys. Chem. A*, (2004), 108, 1090–1100.
- Schiewek, M.; Krumova, M.; Hempel, G.; Blume, A.: Pressure jump relaxation setup with IR detection and millisecond time resolution. In: *Rev. Sci. Instrum.*, (2007), 78, 045101.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich versichere weiterhin, dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Diese Dissertationsschrift habe ich an keiner anderen Hochschule vorgelegt und mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Halle (Saale), Dezember 2007