

Kapitel 2

Experimentelle Methoden

2.1 Proben

2.1.1 Substanzen

Die synthetischen Phospholipide 1,2 Dioleoyl-*sn*-Glycero-Phosphatidylcholin (DO-PC), 1,2 Palmitoyl,Oleoyl-*sn*-Glycero-Phosphatidylcholin (POPC), 1,2 Stearoyl,-Oleoyl-*sn*-Glycero-Phosphatidylcholin (SOPC), 1,2 Dimyristoyl-*sn*-Glycero-Phosphatidylcholin (DMPC) sowie Ei-Phosphatidylcholin (EYPC) als natürliches Lipidextrakt wurden von Sigma (München) sowie Avanti Polar Lipids (USA-Alabaster, Alabama) in einer Chloroformlösung (1–2 *vol.*%) oder als kristallines Pulver bezogen. EYPC ist ein Gemisch verschiedener gesättigter sowie hauptsächlich einfach bzw. zweifach ungesättigter Phosphatidylcholone und wird aus Eigelb gewonnen. Die typische Kettenlänge liegt bei 16–18 C-Atomen. Ein anderes Lipidgemisch pflanzlicher Herkunft (Spinat, Schwarzwurzel), 1,2 Digalaktosyl-Diacylglycerol (DGDG), wurde bei Lipid Products (GB-Redhill, Surrey) als Chloroform-Methanol-Lösung (60/40 Volumenanteile) erstanden. Es hat, was die Ketten anbelangt, eine vergleichbare Zusammensetzung wie EYPC. Alle Lipide haben laut Angaben der Hersteller einen durch TLC¹ überprüften Reinheitsgrad größer als 99%. Die Lipide wurden bei -20°C gelagert und, sofern gelöst geliefert, unverdünnt als Stammlösung für die Probenpräparation eingesetzt (s. Kap.2.1.2, 2.1.3). Pulver diente vorwiegend, wie in Kap.2.1.3 beschrieben, zur Herstellung von Liposomen-Suspensionen.

Das Wasser zur Befüllung der Proben entstammt einer Millipore-Anlage (Seradest, Millipore) und hat einen spezifischen Widerstand größer als $18\text{M}\Omega\text{cm}$, was auf so gut wie keine ionischen Verunreinigungen hindeutet. Zur Herstellung von Elektrolytlösungen wurde NaCl-Salz pro analysi verwendet (Sigma, München).

2.1.2 Präparation für Mikroskopie

Ideal für die Lichtmikroskopie sind dünne planparallele Probenkammern bestehend aus Objektträger und Deckgläschen definierter Dicke. Kapillarenproben (vgl. Kap.2.1.3) werden daher in einer mit Wasser befüllten Flachkammer ihrer Höhe eingebettet. So kann zwar der Astigmatismus fast behoben werden, doch treten durch die beträchtliche Kammerdicke von mehr als 0.5mm vor allem in Bereichen hoher

¹Thin Layer Chromatography

Lipiddichte (vgl. Kap.2.1.3, 4.3.7) Überlagerungseffekte mehrerer dichter Objekte auf und führen zu einer verschlechterten Abbildungsqualität. Zur optimalen Ausnutzung der mikroskopischen Auflösung wurde daher der Quellprozeß zusätzlich in bis zu $80\mu\text{m}$ hohen Plankammern beobachtet.

Für die in Kap.5 vorgestellten optischen Untersuchungen des Systems DGDG/ H_2O /-NaCl wurden die Proben ausschließlich in planen Glaskammern mit einer Höhe zwischen 30 und $80\mu\text{m}$ präpariert (Abb.2.1).

Die Gläser wurden von Menzel (Braunschweig) und Kindler (Freiburg) bezogen. Für den Kammerboden wurde entweder ein herkömmlicher Objektträger (Natronglas) oder ein großes Deckglas (Spiegelglas) benutzt. Als Kammeraufsatz wurden

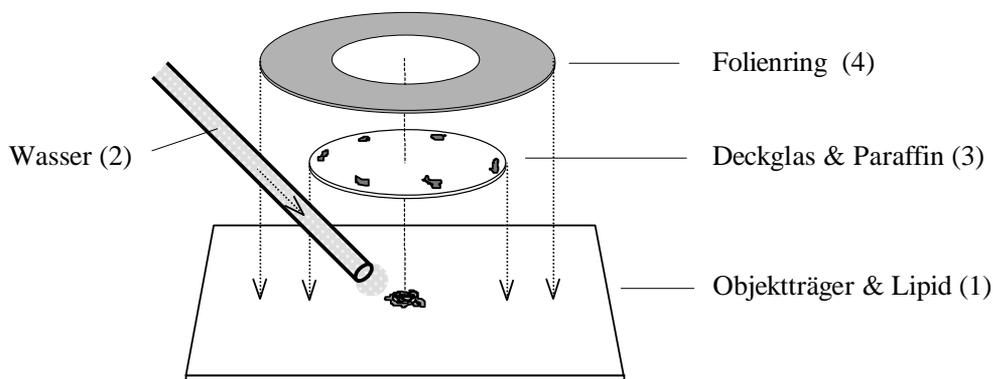


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Präparation einer Flachprobe für die Mikroskopie. Zunächst wird Lipid auf den Objektträger aufgebracht (1). Nachdem das Lösungsmittel abgezogen wurde, wird Wasser auf den Lipidfleck pipettiert (2) und ein Deckglas aufgelegt (3). Die Probe wird auf 65°C gebracht, bis das Paraffin schmilzt und der Folienring positioniert werden kann (4).

Deckgläser verwendet. Der Reinigungsvorgang der Kammergläser entspricht dem von Glaskapillaren (wie in Kap.2.1.3 beschrieben).

Die Stammlösung von $1-2\text{vol}\%$ wird in mehreren $0.5\mu\text{l}$ -Schritten auf den Träger pipettiert, so daß ein eingetrockneter, $1-3\text{mm}$ breiter Lipidfleck (ca. $20-80\mu\text{g}$) übrig bleibt. Restliche Lösungsmittel werden wie bei Kapillarenproben unter reduziertem Druck beseitigt (Kap.2.1.3). Die seitliche Abdichtung der Probenkammer erfolgt nach Zugabe von entgastem Millipore-Wasser und Aufbringen des Deckglases unter Verwendung von Paraffin (Sigma, München) oder gelegentlich Silikonpaste (Bayer, Leverkusen). Zur Versiegelung mit Paraffin wird die von Wachskrümeln umgebene Kammer für $1-2\text{min}$ auf 65°C gebracht, und während des Schmelzens ein Folienring aufgelegt, der einen Teil des Deckglases nach außen überdeckt (Abb.2.1). Das flüssige Paraffin schließt dann entlang der Folie die Kammer ab und härtet beim Abkühlen unterhalb von 62°C wieder aus. Es wurde kein Einfluß der verwendeten Versiegelungsart auf die Entwicklung der Probe festgestellt. Die Lipidkonzentration in der mit Wasser gefüllten Kammer variiert je nach Lipidmenge und Kammergröße zwischen 0.2 und $1\text{vol}\%$.

Auf die oben beschriebene Präparationsweise wird seit 1969 [24] in unterschiedlichen Variationen wiederholt zurückgegriffen, um mit einfachen Mitteln durch Quel-

len Einzelmembranen zu bekommen [41].

2.1.3 Präparation für Röntgenbeugung

Die Untersuchungen zum Quellen von Vielschichtsystemen mittels Röntgenbeugung wurden ausschließlich an Kapillarenproben durchgeführt. Die verwendeten Kapillaren (Müller, Berlin; Hilgenberg, Malsfeld) bestehen aus Borosilikat- oder Lindemannglas und besitzen bei einer Wandstärke von ca. $10\ \mu\text{m}$ einen Radius von $r_K = 0.25$ bis 0.5mm . Größtenteils wurden die Kapillaren einer Nachreinigung unterzogen: Beidseitig offen werden sie ca. 8 Minuten lang in einem Wasserbad mit Reinigungszusatz (1vol% Hellmanex² II bzw. Ultrasonol³ 7,11) bei ca. 60°C gehalten. Daraufhin werden sie abwechselnd im Durchfluß und im Bad mindestens 10 mal mit VE-Wasser⁴ und zweimal mit Bidest-Wasser gespült. Schließlich werden sie aus dem Bad entnommen und Wasserrückstände im Inneren mit einem feinen Stickstoffstrahl ausgeblasen. Es wurden zweierlei grundlegend verschiedene Präparationsarten durchgeführt:

Lipid-Ring: Hierzu wird die beidseitig offene Kapillare mit der Spitze in die ein- bzw. zweiprozentige Stammlösung⁵ mit einer Lipidkonzentration von $K_S=1 - 2\text{vol}\%$ getaucht und durch Benetzung per Neigung bis auf die erwünschte Höhe befüllt. Typischerweise beträgt die Füllhöhe $h_S = 25\text{mm}$, was bei einer einprozentigen Lösung und $r_K = 0.25\text{mm}$ zu einer Lipidmenge von ca. 5mg führt. Nachdem die Kapillare anfangs zum Austarieren der Lösungssäule möglichst waagrecht in einen Exikator positioniert wird, kann sie beim Evakuieren zunehmend aufgerichtet werden, ohne die Säule zu verschieben oder zu zerstäuben. Die endgültige Neigung⁶ liegt bei $30^\circ - 45^\circ$ und ist ca. eine Minute nach Einschalten der Membranpumpe erreicht. Das Lösungsmittel wird innerhalb von ungefähr 7 Minuten bei einem Druck von ca. $1 - 10\text{mbar}$ von oben abgezogen, so daß schließlich zuunterst ein Ring in der Kapillare aufkonzentriert wird (siehe Abb.2.2). Dieser hat eine typische Höhe von $h_R=0.2 - 0.5\text{mm}$ und grenzt mit einer Seite an ein idealerweise lipidfreies, mit der anderen an ein Gebiet deutlich geringerer Lipidkonzentration (Lösungsrückstände der Säule). Diese Präparationsweise wird im folgenden kurz als „MR1“ bezeichnet. Die Breite des Ringes $b_R \approx 0.1\text{mm}$ ist als Differenz zwischen seinem Innen- und Außenradius definiert.

Eine alternativ benutzte Methode („MR2“) der Ringpräparation besteht darin, die Lösung in eine einseitig geschlossene Kapillare zu injizieren und das Lösungsmittel aus der vertikal gehaltenen Kapillare unter atmosphärischem Druck in einer Stickstoffumgebung abdampfen zu lassen. Bei Raumtemperatur und $h_S = 25\text{mm}$ dauert dieser Prozeß um die 36h und liefert, was die Definiertheit der Ringe anbelangt, nicht so befriedigende Resultate wie das Einengen unter reduziertem Druck.

Zur weiteren Entfernung von Lösungsmitteln werden die Proben nach der Ringbildung mindestens 12h bei Raumtemperatur im Vakuum ($P \sim 1\text{mbar}$) aufbewahrt.

²Hellma GmbH & Co, Müllheim; alkalisches Konzentrat speziell für Glasküvetten

³Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe; Ultraschallreiniger, pH-Wert 7 bzw. 11

⁴Entionisiertes Wasser

⁵Vgl. Kap.2.1.1

⁶Winkel zwischen Kapillarenachse und Horizontalen

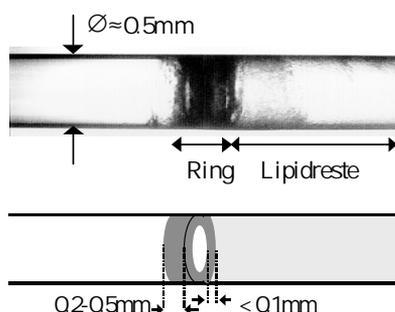


Abbildung 2.2: Oben ist eine Hellfeldmikroskopaufnahme einer Glaskapillare mit Lipidring dargestellt, eine schematische Zeichnung befindet sich darunter. Darin werden typische Werte für die Höhe $h_R = 0.2 - 0.5 \text{ mm}$ und Breite $b_R \approx 0.1 \text{ mm}$ des Ringes angegeben.

Erst wenige Minuten vor ihrer Befüllung mit entgastem Bidest-Wasser bei Raumtemperatur werden sie dem Vakuumschrank entnommen. Die Wasser-Füllhöhe wird so gewählt, daß die mittlere Lipidkonzentration $\overline{K}_L = V_{LIP}/(V_{H_2O} + V_{LIP})$ in der Probe im Bereich von einem Volumenprozent liegt. Am Ring selbst ist K_L lokal deutlich erhöht: Angenommen, sämtliches Lipid aus einer einprozentigen 25 mm hohen Stammlösung befände sich nach dem Einengen in einem 0.5 mm hohen Ring, so ergibt sich aus geometrischen Überlegungen der innere Ringradius zu $r_I = r_K \sqrt{1 - K_S h_S / 100 h_R} = 0.71 r_K$. Dies führt mit $r_K = 0.25 \text{ mm}$ unter der Voraussetzung gleicher Lipid- und Wasserdichte ⁷ zu $K_L = \text{vol}50\%$. Wird nun berücksichtigt, daß PC's in der L_α -Phase (vgl. Kap.1) Wasser bis zu einer Konzentration von $40 \text{ vol}\%$ aufnehmen [14][21], bevor sie voll hydratisiert sind, so wird deutlich, daß eine lokal höhere Lipidkonzentration $K_L \geq 60 \text{ vol}\%$ nicht als sinnvoll erachtet werden kann, da die erwünschten Strukturen unter Wassermangel leiden müßten und sich aus Platzgründen nur außerhalb des verdichteten Gebietes voll ausbilden könnten. Die obige Abschätzung stellt eine obere Grenze der Lipidkonzentration in der Ringregion dar und wird, wie in Kap.4.3.1 ausgeführt, nicht erreicht.

Nach der Befüllung der Kapillaren werden die offenen Enden mit Paraffin und in selteneren Fällen mit Siegelack versiegelt. Es werden nur Proben berücksichtigt, die über den Beobachtungszeitraum keinen merklichen Wasserverlust aufweisen. Die Proben wurden nach Fertigstellung möglichst zügig in die betreffende Apparatur einjustiert und auf die gewählte Temperatur gebracht. Größtenteils erfolgte dies in einem Zeitraum zwischen 7 und 25 Minuten nach Wasser-Zugabe. Auf Ausnahmen wird später eigens hingewiesen.

Die Ringpräparation hat sich zur Untersuchung des Quellverhaltens von Vielschichtsystemen mittels Röntgenbeugung als brauchbar erwiesen, da sie die Anforderung nach einer anfänglich ausreichenden Menge geordneter Struktur im Streuvolumen vereint mit freiem Volumen, das neu entstandene Strukturen ungehindert einnehmen können (vgl. Abb.4.28 und Kap.4.3.8). Die geordnete Struktur liegt allerdings nicht als Pulver im Sinne einer Debye-Scherrer-Aufnahme vor, sondern

⁷Diese Voraussetzung ist in guter Näherung für PC's in der fluiden Phase erfüllt, siehe z.B. [42]: DOPC bei 20° C hat eine Dichte $\rho = 1.01 \text{ g/cm}^3$

weist eine ausgeprägte Ausrichtung der Schichten parallel zur Kapillarenachse auf, was bei der Deutung der Röntgenspektren zu berücksichtigen ist (vgl. Kap.2.3.1 sowie Abb.2.9).

Liposomen–Dispersion: Zur Herstellung von Liposomen–Dispersionen wurde bevorzugt auf die sog. „freeze–thaw“–Technik zurückgegriffen. Dabei wird das Lipid–Wassergemisch mehrmals schockartig gefroren und wieder aufgetaut, wodurch eine gleichmäßige Hydratisierung des Systems erreicht wird. Das Verfahren wird beispielsweise angewendet, um Ultraschallvesikeln zu fusionieren und dadurch zu vergrößern [43] oder ausgehend von multilamellaren Liposomen (DOPC) in Elektrolyten kleine Vesikeln zu erzeugen [44].

Im einzelnen wurde wie folgt verfahren: Eine abgewogene Menge an kristallinem Lipidpulver wird mit entgastem Bidest–Wasser in einen Eppendorfbehälter eingebracht und durchmischt. Daraufhin werden typischerweise fünf Zyklen folgender Art durchlaufen: Der geschlossene Behälter mit der Lösung wird in flüssigen Stickstoff getaucht, bis er dessen Temperatur angenommen hat, und von dort direkt in ein warmes Wasserbad transferiert, dessen Temperatur deutlich über der Hauptübergangstemperatur des Lipids (vgl. Kap.1) liegt. Daraufhin wird das System solange durchmischt, bis es abgesehen von Luftpneumaten optisch homogen wirkt. Nachdem der letzte Zyklus beendet ist, wird die Probe zentrifugiert, um die Luftblasen zu entfernen. Abschließend wird sie nochmals kurz homogenisiert. Vor Beginn der Messung wird die um die zwei Tage alte Suspension in die Kapillare eingefüllt und diese versiegelt (s.o.). Diese Präparationsart wird bevorzugt zur Herstellung ungerichteter Röntgenproben verwendet und des weiteren mit „MFT“ abgekürzt. Es wurde vorwiegend mit Konzentrationen von 10vol.% Lipid/Wasser gearbeitet. In den Proben fand in der Regel kein Aufkonzentrieren der multilamellaren Liposomen (vgl. Kap.1) statt. Lichtmikroskopische Beobachtungen ergaben, daß sie auch noch nach mehreren Tagen Wartezeit getrennt vorlagen und einen Durchmesser in der Größenordnung von wenigen μm hatten. Die Lösung stellt somit ein Debye–Scherrer Pulver dar.

2.2 Lichtmikroskopie

Lipidmembranen in Wasser stellen auf Grund ihrer niedrigen Absorption im optischen Sinne Phasenobjekte dar. Der mittlere Brechungsindex von EYPC beträgt bei 30°C und $\lambda = 550\text{nm}$ $n_1 = 1.55$ [45], der von Wasser $n_2 = 1.33$ [46], was $\Delta n = n_1 - n_2 = 0.22$ ergibt. Durchquert ein Lichtstrahl eine einschalige sphärische Vesikel mit einem Durchmesser von $5\mu\text{m}$ und einer Membrandicke von 3.6nm [42], so durchläuft er im Lipid eine maximale Strecke von $0.27\mu\text{m}$. Dies führt zu einem Gangunterschied relativ zu Wasser von 60nm , welcher durch Phasendrehung der beiden Lichtstrahlen gegeneinander um 90° in einen Amplitudenkontrast übersetzt werden kann. Darauf beruht Zernicke’s Prinzip des Phasenkontrastmikroskops [47], welches in Kap.2.2.1 genauer erläutert wird. Es hat sich herausgestellt, daß damit einzelne Membranen beobachtet werden können [41][48].

Die Beobachtungen wurden hauptsächlich an einem Leitz–Mikroskop mit einer Köhlerschen Beleuchtungsanordnung [49] Ortholux II POL BK durchgeführt. Die

Objektiv	Vergrößerung	Apertur	Schärfentiefe [μm]	Transmission
LD PhI	20	0.32	16	0.2
LD PhI	32	0.40	10	0.2
Pl Apo PhII	40	0.75	2	0.2

Tabelle 2.1: Technische Daten der am Phasenkontrastmikroskop Ortholux II POL BK eingesetzten Objektive. Die Werte für die Schärfentiefe sind für eine mittlere Gesamtvergrößerung gültig und gehen auf [50] zurück. Die Transmission bezieht sich auf die vom Objektiv durchgelassene direkte Lichtintensität (Abb.2.3).

verwendeten Kondensoren sind vom Typ 402a (Apertur 0.9) sowie 402e (Apertur 0.7). Es wurden Objektive bis zu einer numerischen Apertur von 0.75 eingesetzt (Tab.2.1). Dies entspricht bei einer mittleren Wellenlänge $\lambda = 550nm$ einer lateralen Auflösung von $0.73\mu m$.

Zur Untersuchung der optischen Anisotropie der Objekte wurden Polarisator und Analysator in eine gekreuzte Stellung gebracht und das Objekt gedreht. Zusätzlich wurde ein Berek'scher Kompensator eingesetzt, um den Phasenhub innerhalb ausgedehnter Objekte zu bestimmen. Ausschließlich polarisationsmikroskopische Beobachtungen wurden mit einem Mikroskop von Olympus, BHS-2, durchgeführt. Dies trifft vor allem auf die mikroskopische Beobachtung des Quellvorgangs in Kapillaren zu (Kap.4.3.7).

Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony, Japan, DXC-107p) aufgenommen und direkt auf Videorekorder entweder in Echtzeit (JVC, HR0637, VHS, Bildabstand: $40ms$) oder im Zeitraffermodus (Mitsubishi HS-S5600, SVHS, Bildabstand bis zu $12.8s$) abgespeichert. Bei Langzeitaufnahmen wurden durchweg die Objektive vom Typ „LD“ eingesetzt (Tab.2.1). Sie besitzen gegenüber der Verschiebung des Objektes längs der optischen Achse eine größere Toleranz als Objektive höherer Auflösung. Zum Auslesen und Nachbearbeiten der Bilder wurde z.T. ein „frame grabber“ verwendet.

Die Temperatur der Mikroskopieproben kann zwischen $0^{\circ}C$ und $75^{\circ}C$ mit einem Wasserbadthermostat (Haake, F3-PG20, Karlsruhe) auf $0.1^{\circ}C$ genau gehalten werden. Eine Heizplatte für Parallelproben ist an dasselbe Wasserbad angeschlossen wie der Mikroskopiertisch, so daß sich die Proben temperatur beim Transfer kaum ändert. Ein weiterer an den Wasserkreislauf angeschlossener Thermostat (Haake, FK2, Karlsruhe) ermöglicht eine Temperaturänderung mit Raten bis zu $10^{\circ}C/min$. Rampen zwischen 0.01 und $0.5^{\circ}C/min$ werden direkt durch den Thermostaten F3-PG20 geregelt. Am Polarisationsmikroskop Olympus wurde ein programmierbares Thermosystem (FP900, Mettler, Gießen) eingesetzt, welches die Temperatur auf $0.4^{\circ}C$ genau regelt.

2.2.1 Phasenkontrast

Die durchgeführte Untersuchung optisch isotroper Objekte im System DGDG/ $H_2O/NaCl$ beruht hauptsächlich auf der Methode des Phasenkontrastmikroskops. Alle in Kap.5 gezeigten Objekte wurden durch ein Phasenkontrastmikroskop abgebildet. Durch Eigenarten der Abbildung sind die Bilder ausgedehnter Objekte nicht

immer auf direkte Weise zu deuten. Im Verlauf dieses Abschnittes gehen wir daher näher auf einige Besonderheiten ein.

Ein Ausschnitt des Strahlengangs im Mikroskop ist schematisch in Abb.2.3 dargestellt. Wir gehen von einem punktförmigen Phasenobjekt aus, welches nicht ab-

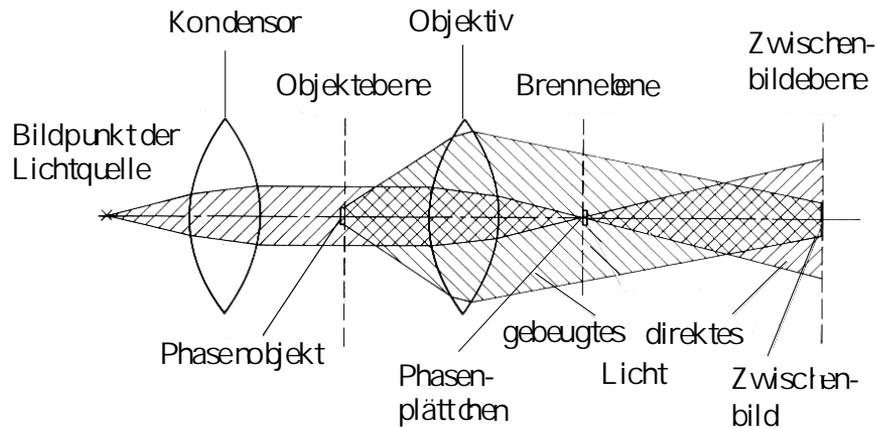


Abbildung 2.3: Ausschnitt eines schematisch dargestellten Strahlengangs im Phasenkontrastmikroskop in Anlehnung an Beyer [51]. Die Bildpunkte der Lichtquelle werden auf das Phasenplättchen abgebildet, es sei denn, die Lichtstrahlen werden vom Objekt abgelenkt. Neben der Phasenverschiebung des direkten Lichtes übernimmt das Phasenplättchen auch die Aufgabe seiner Abschwächung (vgl. Abb.2.4).

sorbiert und sich in einer Umgebung mit unterschiedlichem Brechungsindex befindet. Beim Durchqueren des Objektes wird das Licht relativ zu dem der Umgebung um die Phase $\Delta\varphi$ verschoben, behält jedoch seine Amplitude dem Betrag nach bei. Die Darstellung der Amplitude und Phase in Form eines Zeigerdiagramms zeigt demnach einen um $\Delta\varphi$ gedrehten Vektor \vec{A}_O (Abb.2.4). Zerlegt man diesen in den ungedrehten Anteil \vec{A}_U und den ergänzenden Vektor \vec{A}_B , so stellt ersterer den Zustand des Lichtes nach Durchqueren der Umgebung und letzterer den Zustand des vom Objekt gebeugten Lichtes dar. Sowohl die Phasenbeziehung als auch das Verhältnis der Amplituden von \vec{A}_O und \vec{A}_U bleibt bei der Abbildung in die Bildebene erhalten. Da dort nur Intensitäten und keine Phasenverschiebungen wahrgenommen werden, hebt sich das Objekt nicht vom Untergrund ab. Erst wenn der Phasenunterschied in der Objektebene in einen Amplituden- bzw. Helligkeitsunterschied in der Bildebene übersetzt werden kann, wird das Objekt sichtbar. Um dies zu erreichen wird das Licht des ungebeugten Strahlenganges um -90° phasenverschoben (\vec{A}'_U) und um einen solchen Betrag abgeschwächt (\vec{A}''_U), daß der Betrag der Amplitude in der Größenordnung des gebeugten Anteils ist. Die resultierende Amplitude ($\vec{A}_R = \vec{A}_B + \vec{A}''_U$) ist somit wesentlich geringer als die der Umgebung. Dadurch erscheint das Objekt in der Bildebene bei heller Umgebung dunkel (positiver Phasenkontrast). In der Praxis erreicht man eine Trennung des direkten vom gebeugten Strahlengang, indem das Objekt durch eine ringförmige Blende beleuchtet wird, die sich in der vorderen ⁸ Brennebene des Kondensators befindet. Die davon ausgehenden

⁸Die Richtungen sind in Bezug auf den Ort der Lichtquelle definiert. Die vordere Brennebene

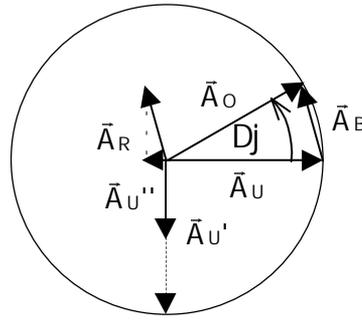


Abbildung 2.4: Momentane Aufnahme des Zeigerdiagramms von Lichtamplituden an zwei Orten im Strahlengang: Direkt hinter dem Objekt und in der Bildebene (durchgezogene Linien). Der gestrichelte Pfeil ist eine Hilfslinie (Erläuterungen siehe Text).

Strahlen durchtreten in der hinteren Brennebene des Objektivs ein ringförmiges, auf die Abmessungen des Strahls angepaßtes Phasenplättchen und werden dort gleichzeitig abgeschwächt. Eine vollständige Trennung beider Strahlengänge („Strenges Zernike-Verfahren“) ist nicht möglich, da ein Teil des vom Objekt gebeugten Lichtes auch das Phasenplättchen durchquert (Abb.2.3). Darauf sind die hellen Ränder um dunkle Phasenobjekte zurückzuführen („Halo“) (Abb.5.1). Sie lassen sich durch eine geringe Breite des Phasenringes und eine geringe laterale Ausdehnung des Objektes minimieren [51]. Im folgenden führen wir den Begriff des Bildkontrastes ein und greifen dann das Thema der Objektstreue einer Abbildung nochmals auf.

Der Bildkontrast K^B ist durch

$$K^B = \frac{I_O - I_U}{I_O + I_U} \quad , I_O = |\vec{A}_O|^2 \quad , I_U = |\vec{A}_U|^2$$

definiert. Dabei bezeichnen I_O bzw. I_U die abgebildete Helligkeit des Objektes bzw. der Umgebung. Für ein reines Phasenobjekt, welches nicht absorbiert, ist der Kontrast durch

$$K^B = \frac{1 - (\cos(\Delta\varphi) + t \sin(\Delta\varphi))}{1 + t^2 - (\cos(\Delta\varphi) + t \sin(\Delta\varphi))} \quad (2.1)$$

gegeben und kann durch die Auswahl der Transmission des Phasenplättchens $t^2 = |\vec{A}_U''|^2 / |\vec{A}_U'|^2$ für das direkte Licht auf den gegebenen Phasenhub eines Objektes optimiert werden (vgl. Abb.2.4). Die verwendeten Objektive (Leitz, Phaco I - LD20x/0.32 - LD32x/0.4, Phaco II - Pl Apo40x/0.75) besitzen laut Angaben des Herstellers eine Transmission von $t^2 = 0.2$ bei einer Wellenlänge von $550nm$. Der Verlauf des Kontrastes K^B (2.1) eines reinen Phasenobjekts ist gegen den Phasenhub $\Delta\varphi$ in Abb.2.5 aufgetragen. Der Wert für die Transmission des Phasenplättchens entspricht mit $t^2 = 0.2$ dem der verwendeten Objektive. Der Kontrast erreicht bei $\Delta\varphi = 24^\circ$ seinen kleinsten Wert, was der größten Dunkelheit der Objekte entspricht. Ein zusätzlicher Beitrag von 24° führt dazu, daß das Objekt sich nicht mehr von der Umgebung abhebt. Der genaue Wert für den Nulldurchgang ist durch die Bedingung $\cos(\Delta\varphi) + t \sin(\Delta\varphi) = 1$ gegeben und beträgt für die eingesetzten Objektive $\Delta\varphi =$

einer Linse liegt zwischen dieser und der Lichtquelle.

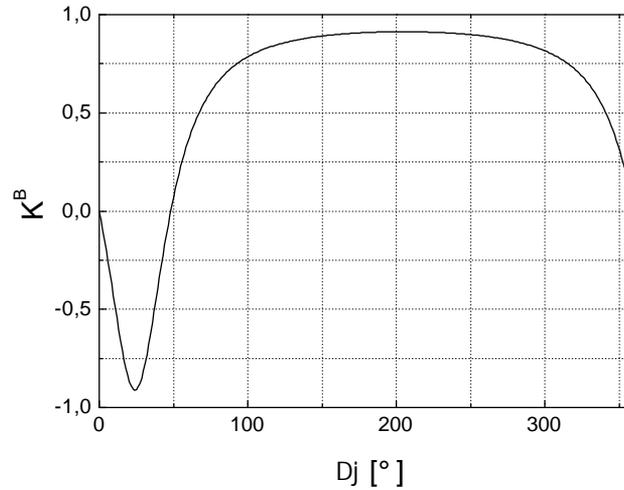


Abbildung 2.5: Abhängigkeit des Kontrastes K^B (2.1) zwischen einem reinen Phasenobjekt und seiner Umgebung von der Differenz des Phasenhubs $\Delta\varphi$ in Grad. Für die Transmission des Phasenplättchens wurde mit $t^2 = 0.2$ ein Wert angenommen, wie er bei den verwendeten Objektiven vorliegt. Die Phasenverschiebung des Plättchens beträgt -90° .

48.4° . Geht $\Delta\varphi$ über diesen Wert hinaus, tritt Kontrastumkehr auf, so daß das Objekt nun heller als die Umgebung ist.

Beyer führt in [51] durch

$$\Gamma = \frac{2\pi \cdot \Delta R_P \cdot R_O}{\lambda \cdot f_{Obj}} \quad (2.2)$$

einen Parameter, die sog. „Objekttreue“, ein, mit dessen Hilfe die Güte der Phasenkontrast–Abbildung eines Objektes beurteilt werden kann. Die Brennweite f_{Obj} des Objectives, die Wellenlänge λ sowie die Breite des Phasenringes ΔR_P sind durch die Apparatur vorgegeben. Das bei den Langzeitbeobachtungen häufig verwendete Objektiv (Leitz, PhI, 32xLD, 0.4) besitzt laut Angaben des Herstellers folgende Werte: $f_{Obj} = 8.1\text{mm}$, $\Delta R_P = 0.64\text{mm}$, woraus sich für ein Objekt mit einem Radius von $1\mu\text{m}$ und $\lambda = 550\text{nm}$ eine Objekttreue von $\Gamma = 0.9$ ergibt. Ein Kriterium für die Objekttreue ist, ob die relative Phasenverschiebung $\Delta\varphi$ eines scheibenförmigen Objektes konstanter Dicke als eine konstante relative Änderung der Helligkeit abgebildet wird. Beyer hat die Helligkeitsverteilung eines scheibenförmigen reinen Phasenobjektes, welches eine konstante Dicke und einen Radius R_O besitzt, innerhalb der Bildebene in Abhängigkeit von Γ berechnet [51]. Der Phasenhub des Objektes ist mit $\Delta\varphi = 25^\circ$ so bemessen, daß das Objektbild nach dem strengen Zernicke–Verfahren bei einer Transmission von $t^2 = 0.25$ gegenüber dem Hintergrund die geringste Helligkeit besitzt (vgl. Abb.2.5). Dies entspricht einem Kontrast von $K^B = -0.92$. Abb.2.6 zeigt, welche Effekte zu erwarten sind, wenn das Objekt und der Phasenring eine endliche Ausdehnung besitzen. Als Parameter dafür verwenden wir die in (2.2) eingeführte Objekttreue Γ . Für $\Gamma = 0$ besitzt die Bildfunktion genauso wie die Objektfunktion den Verlauf einer Stufe. Während sich die Form der Bildfunktion für $\Gamma = 1$ gegenüber $\Gamma = 0$ kaum ändert, ist nun die Umgebung des Objektes ($r > R_O$) aufgehellt. Eine weitere Zunahme von Γ bewirkt, daß die

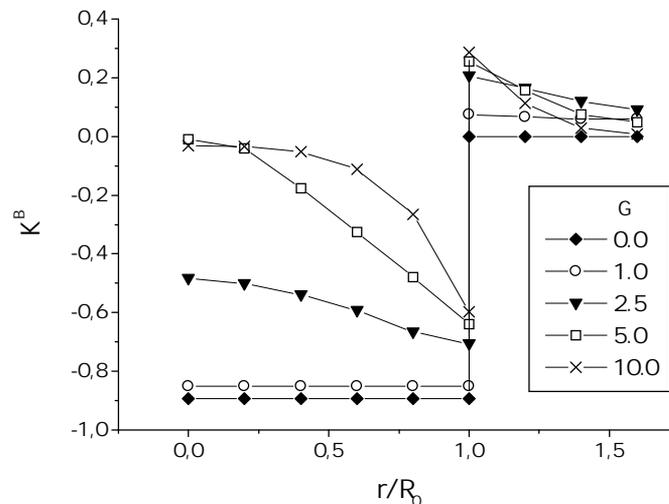


Abbildung 2.6: Berechneter Bildkontrast K^B eines scheibenförmigen reinen Phasenobjekts mit einem (Bild-) Radius R_0 innerhalb der Bildebene [51]. Der Phasenhub ist mit $\Delta\varphi = 25^\circ$ so bemessen, daß das Bild des Objektes für $t^2 = 0.25$ die größte Dunkelheit besitzt. Der Verlauf der Bildfunktion in Abhängigkeit vom Abstand r zum Bildmittelpunkt ist nach der Objekttreue (2.2) parametrisiert.

direkte Umgebung des Objektes heller wird („Halo“), während sich der Bereich der Aufhellung verkleinert. Gleichzeitig wird K^B auch zur Bildmitte größer. Für $\Gamma = 5$ zeigt das Objekt in der Mitte dieselbe Helligkeit wie die Umgebung. Dieser Bereich weitet sich bei größerem Γ zum Rand $r = R_0$ hin aus. Eine zunehmende Ausdehnung des Objektes hat demnach zur Folge, daß die Phasenkontrastwirkung immer mehr zu einem Randeffect wird. Merkbare Bildverfälschungen sind erst ab $\Gamma > 1$ zu erwarten und bis $\Gamma < 2.5$ sind sie nach Beyer [51] als geringfügig einzuschätzen. Aus $\Gamma = 2.5$ läßt sich durch Einsetzen der o.g. Kenndaten des verwendeten Objektivs in (2.2) die maximale Größe eines unverfälschten Objektes bestimmen. Es besitzt einen Radius von $2.8\mu m$.

2.3 Röntgenbeugung

Die Untersuchungen zum Quellverhalten von Vielschichtsystemen in Überschußwasser wurden im Labor an einem Drehanodengenerator sowie am DESY⁹ in Zusammenarbeit mit Dr. Gert Rapp in Hamburg an der Beamline X13 der Außenstation vom EMBL¹⁰ durchgeführt. Während die Experimente am Generator zunächst dazu dienten, die Probenpräparation zu optimieren, konnte daraufhin systematisch die Temperaturabhängigkeit des Abbaus der lamellaren Ordnung untersucht werden. Durch die höhere Winkelauflösung, das bessere „Peak- zu- Rausch-Verhältnis“ und den größeren Meßbereich zu kleinen Winkeln standen am Synchrotron Details des Quellvorgangs sowie die mögliche Bildung neuer Strukturen im Mittelpunkt.

⁹Deutsches Elektronen Synchrotron

¹⁰European Molecular Biology Laboratory

Auch die Untersuchungen isotroper Objekte im System DGDG/H₂O/Salz erfolgten an beiden Meßplätzen. Voruntersuchungen fanden am Laboraufbau statt, während die in der Arbeit gezeigten Messungen am Synchrotron durchgeführt wurden.

2.3.1 Drehanode

Als Röntgenquelle dient ein mit einer Kupferanode bestückter Drehanodengenerator der Firma Marconi Elliot (Modell GX-21), der im Feinfokus ($0.2 \times 0.2 \text{ mm}^2$) bei einer Leistung von 1.9 kW betrieben wird. Die Monochromatisierung des Strahles auf die $\text{CuK}\alpha$ -Linien bei $\bar{\lambda} = 1.5418 \text{ \AA}$ erfolgt durch Verwendung eines Nickelfilters, Bremsstrahlungsbeiträge im Detektorsignal werden elektronisch durch Setzen einer Diskriminatorschwelle unterdrückt. Bei Filmaufnahmen müssen sie allerdings in Kauf genommen werden.

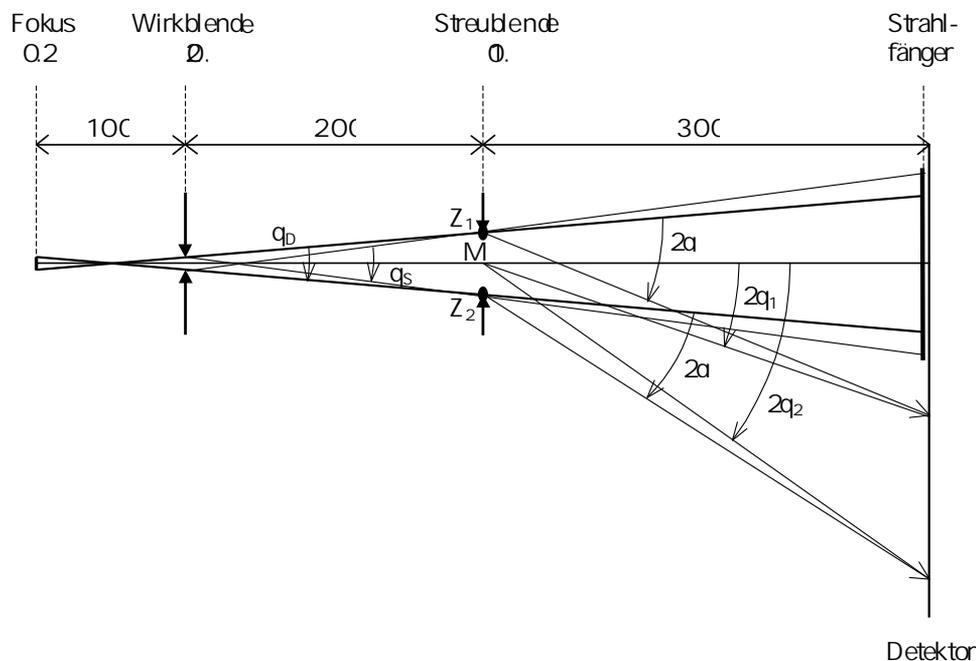


Abbildung 2.7: Röntgenstrahlengang am Laboraufbau. Die wichtigsten Blenden mit Durchmessern und Abstände zwischen denselben sind eingetragen. Der Kollimator umfaßt Wirk- und Streublende. Idealerweise befindet sich die Probe unmittelbar hinter der Streublende (vom Fokus aus gesehen), innerhalb der Temperaturkammer ist sie ca. 10 mm dahinter positioniert. Von den Rändern der Wirkblende gehen Streustrahlen aus, die einen Kegelmantel um den Primärstrahl bilden und ihn verbreitern (Öffnungswinkel θ_S). An den Positionen Z_1 und Z_2 sind Gebiete eingezeichnet, die für die Randstrahlen des Primärstrahls die Braggbedingung erfüllen (Streuwinkel 2θ) und daher – vom Mittelpunkt M aus gemessen – Reflexe unter den Winkeln $2\theta_1$ bzw. $2\theta_2$ liefern (Aufspaltung).

Da die erste Beugungsordnung für eine lamellare Schichtdicke von $d = 64 \text{ \AA}$ bei 1.38° erwartet wird, mußte bei der Konzipierung des Kollimators zur räumlichen Begrenzung des Strahles der Streuuntergrund um den Primärstrahl möglichst ge-

ring gehalten werden. Zum einen erfolgte dies durch Spülen des Kollimators mit He-Gas, zum anderen konnte durch einen großen Abstand zwischen Wirk- und Streublende der sichtbare Öffnungswinkel θ_S des Streuteils von der Wirkblende klein gehalten werden (Abb.2.7). Hauptsächlich wurden Lochblenden aus Platin mit Durchmessern von 0.2mm für die Wirkblende bzw. 1.0mm für die Streublende verwendet, so daß mit den in Abb.2.7 gezeigten Einstellungen der geometrische Strahldurchmesser am Probenort 1mm betrug und $\theta_S = 0.3^\circ$ erreicht wurde. Die Divergenz des Primärstrahls war dann $\theta_D = 0.22^\circ$. Bei Detektoraufnahmen wurde ein Primärstrahlfänger aus Blei eingesetzt, der einen Winkelbereich bis typischerweise 0.6° , d.h. $s < (150\text{\AA})^{-1}$, abdeckte.

Die Kapillarenproben wurden vertikal in einer Temperaturkammer montiert (Anton Paar, A-Graz). Sie funktioniert nach dem Peltierprinzip mit Gegenkühlung. Die Temperatur läßt sich zwischen 0°C und 70°C regeln und wird auf ca. 0.1°C konstant gehalten. Dies wird mit einem in die Kammer eingeführten NiCrNi-Temperaturfühler kontrolliert. Die mit $10\mu\text{m}$ dicker Mylarfolie verschlossenen Fenster begrenzen den zugänglichen Streuwinkelbereich bei dem üblichen Abstand zwischen Probe und Detektor von $d_{PD} = 300\text{mm}$ auf ca. 15° .

Die Beugungsspektren wurden mit einem ortsempfindlichen eindimensionalen (linearen) Detektor („OED“) aufgenommen (Braun, Garching, Modell OED-50-M). Er besitzt eine laterale Auflösung von bis zu $80\mu\text{m}$, was für $d_{PD} = 300\text{mm}$ einer Winkelauflösung von $\Delta 2\theta = 0.015^\circ$ entspricht. Dies macht bei einer Reflexposition bei $2\theta = 1.38^\circ$, d.h. 64\AA , eine Abweichung von fast 1\AA aus. Das Eintrittsfenster des OED verläuft horizontal und ist ca. 10mm hoch. Um Strahlen mit einer zu großen vertikalen Divergenz vom Spektrum auszuschließen, wurde ein Sollerspalt verwendet. Er besteht aus dünnen, regelmäßig übereinander gestapelten Metallplättchen, zwischen denen sich jeweils ein Luftspalt befindet, den die Röntgenstrahlen unter gewissen Winkeln durchqueren können. Ist der Sollerspalt so angeordnet, daß die Normale der Plättchen in die vertikale Richtung zeigt, werden Strahlen bis zu einer maximalen vertikalen Divergenz zugelassen. Sie beträgt hier 1.4° . Die Höhe des Fensters begrenzte volle Ringe mit einer Winkelbreite größer als ca. 2° . Daher sind im Fall einer Pulveraufnahme Reflexe mit Streuwinkeln um $2\theta_S = 1^\circ$ sehr stark verschmiert. Da jedoch die lamellaren Stapel in den Ringproben größtenteils parallel zur Kapillarenwand ausgerichtet sind (Kap.4.3.1), konzentriert sich der Hauptanteil des Streusignals bei vertikal justierten Proben in der Äquatorebene. Dies entspricht in der Abbildung 2.9 der yz -Ebene. Der gerichtete Beitrag innerhalb des OED-Spektrums hebt sich daher ab von zu kleineren Winkeln hin verschobenen schwächeren Projektionen derselben Beugungsordnung von ungerichteten Bereichen. Somit liefert diese Methode in einem eindimensionalen Spektrum zusätzliche Informationen über den Teil der Probe, der nicht gerichtet ist.

Ein weiterer Effekt der Ringbildung besteht darin, daß die beiden hauptsächlich zur Streuung beitragenden Bereiche fast einen Kapillarendurchmesser D_K voneinander entfernt liegen können. Daraus ergibt sich, wie in Abb.2.7 ersichtlich, eine Aufspaltung des Reflexes, die für $D_K = 0.5\text{mm}$ und die angegebenen Parameter $\Delta 2\theta_A = 2\theta_2 - 2\theta_1 = 0.2^\circ$ ausmacht. Im Fall kleiner Streuwinkel ($\sin(2\theta) \approx 2\theta$) gilt $\Delta 2\theta_A \propto D_K/d_{PD}$, woraus hervorgeht, daß die artifizielle Aufspaltung mit zunehmendem Abstand d_{PD} zwischen Probe und Detektor abnimmt. Ein Abstand von $D_K = 0.5\text{mm}$ am Ort der Streublende (Abb.2.7) führt zu $\Delta 2\theta_A = 0.21^\circ$ für

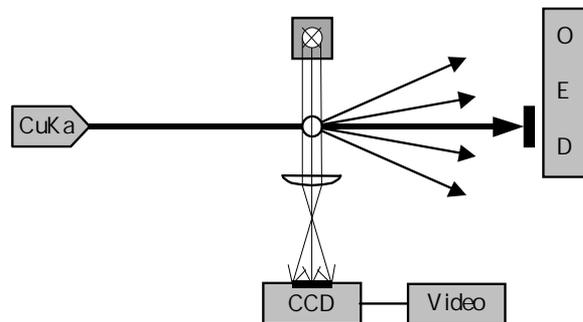


Abbildung 2.8: Schematischer Laboraufbau der Streuapparatur in Kombination mit niedrig auflösenden optischen Komponenten zur gleichzeitigen Beobachtung der Probe.

$2\theta = 1.38^\circ$. In Tabelle 2.2 kann dieser Wert mit dem für einen Synchrotronaufbau verglichen werden. Zur Optimierung der Streuintensität wurde einer der beiden Bereiche im Strahl zentriert. Anhand des näherungsweise gleichen Winkelabstands der ortsbedingten Aufspaltung für die ersten beiden Beugungsordnungen läßt sich dieser Effekt leicht unterscheiden von der Koexistenz mehrerer Abstände im Gitter. Im letzteren Fall nimmt nämlich der Winkelabstand der Reflexe von der ersten zur zweiten Ordnung um einen Faktor zwei zu.

Die volle Halbwertsbreite („FWHM“) des gebeugten Strahles spiegelt die laterale Ausdehnung der Gebiete wider, welche die Braggbedingung erfüllen und unterschreitet für Ringproben die FWHM des Primärstrahles deutlich. In Einzelfällen ermöglichte eine gut erkennbare Aufspaltung die gleichzeitige und eindeutige Beobachtung beider Bereiche innerhalb einer Kapillare, was einen Aufschluß über die Ortsabhängigkeit des Quellens erlaubt. Somit wird durch die Zuordnung einzelner Reflexe zu den entsprechenden Gebieten innerhalb der Probe und die damit verbundenen Interpretationsmöglichkeiten die Unübersichtlichkeit der Spektren mehr als kompensiert.

Als Maß für die Integrationsdauer dient die Intensität im Maximum der ersten Beugungsordnung, welche typischerweise bei einem Eintrag pro Sekunde liegt. Um einen relativen Fehler kleiner als 10% zu erzielen, wurde demnach die Meßdauer pro Einzelspektrum auf mindestens zwei Minuten veranschlagt. Bei langsamerer Veränderung der Spektren wurde bis zu $\Delta t_{INT} = 15$ Minuten aufintegriert.

In Einzelfällen wurde zeitgleich zu dem Beugungsspektrum einer Probe die Veränderung von sichtbaren Strukturen innerhalb des Streuvolumens beobachtet. Dazu wurde zusätzlich zu dem oben geschilderten Aufbau eine Kaltlichtquelle sowie ein Justierfernrohr aufgebaut, das mit einer Kamera und einem Videorekorder ausgestattet war (siehe Abb.2.8). Auf diese Weise konnte die Konstanz der Ringposition relativ zum Primärstrahl überprüft werden. Zudem wurde die Entwicklung einiger Objekte, wie z.B. Myelin-Zylinder, verfolgt sowie die Entstehung neuer Strukturen beobachtet. Für optische Untersuchungen mit höherer Auflösung wurden die in Kap.2.2 erläuterten Aufbauten verwendet.

2.3.2 Synchrotron

Der Synchrotronstrahl aus dem Speicherring Doris III wird an der beamline X13 durch Reflexion an einem Si- oder Ge-Einkristall auf eine Wellenlänge von $\lambda = 1.5\text{\AA}$ mit $\Delta\lambda/\lambda \sim 10^{-3}$ monochromatisiert. Die Fokussierung des Strahls sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung ermöglicht in Kombination mit dem Einsatz von evakuierten Strahlrohren – bis auf minimale Luftwege im Bereich der Probe – sehr große Kameralängen ohne eine deutliche Aufweitung des Primärstrahls. Dies hat einen geringen Streuuntergrund zur Folge. Ein vergrößerter Abstand zwischen Probe und Detektor bewirkt außerdem eine Zunahme der erreichbaren Winkelauflösung bei gleichzeitiger Abnahme des kleinsten meßbaren, durch die laterale Ausdehnung des Primärstrahles definierten Streuwinkels. Die hohe Intensität des Synchrotronstrahls ist Voraussetzung für die Ausnutzung der genannten Vorteile. Eine detaillierte Beschreibung des Meßaufbaus findet man in [52] und [53]. Der

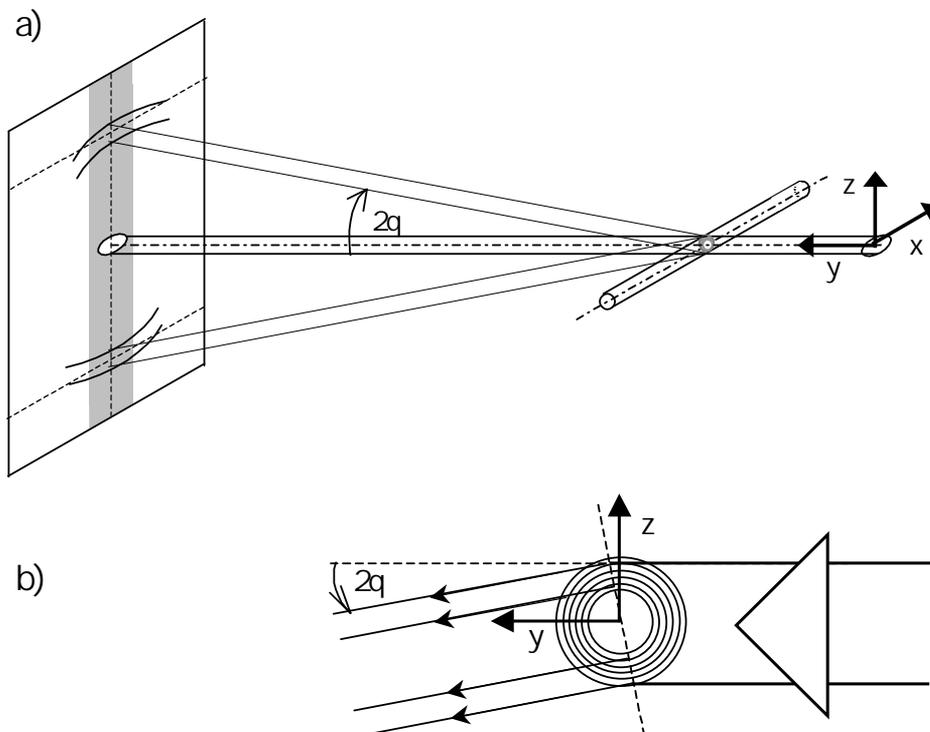


Abbildung 2.9: Streuverhalten einer gerichteten Kapillarenprobe. Teilbild a) zeigt, wie der Primärstrahl auf den Lipidring trifft und aufgrund der konzentrischen Membrananordnung in die yz -Ebene gestreut wird. Die Kreisbögen deuten an, daß die Membranen nicht vollständig orientiert sind. Der graue Bereich in der Detektorebene stellt das Öffnungsfenster eines OED dar. Teilbild b) ist eine Projektion innerhalb der yz -Ebene. Der Übersicht halber wurde die Beugung an den Schichten nur nach unten gezeichnet

Primärstrahlquerschnitt am Probenort wird dem Durchmesser der Kapillare durch variable Blenden angepaßt. Die Proben werden in einer mit Mylarfenstern abgedichteten Kammer auf die erwünschte Temperatur zwischen 10°C und 60°C gebracht,

	Drehanode	Synchrotron
Wellenlänge [Å]	1.54	1.50
Monochromator	Ni-Filter	Ge111
Meßbereich [Å]	17–150	22–650
FWHM [°]	0.2	0.013
Strahlquerschnitt [mm]	0.5–1.0	≈0.5
$\Delta 2\theta_A$ [°]	0.2	0.012
Detektor	OED/Film	OED/Image Plate
d_{PD} [mm]	300	2000–2500
Δt_{INT} [s]	100–1000	10–100

Tabelle 2.2: Technische Daten zu den Meßaufbauten an der Drehanode und am Synchrotron. $\Delta 2\theta_A$ ist die Aufspaltung eines Reflexes bei $s = (64\text{Å})^{-1}$ für einen Abstand der Streuzentren von 0.5mm , FWHM bezeichnet die volle Halbwertsbreite des Primärstrahls, der (Primär-)Strahldurchmesser bezieht sich bei einem elliptischen Querschnitt auf die volle Halbwertsbreite längs der kurzen Halbachse am Probenort, d_{PD} bezeichnet den Abstand zwischen Probe und Detektor, Δt_{INT} ist die Integrationsdauer für ein Spektrum.

der mit einem NiCrNi-Fühler gemessene Temperaturwert wird während der Messung aufgezeichnet. Die mit einer Halbwertszeit von ca. $8h$ exponentiell abfallende Primärstrahlintensität wird mittels einer Ionisationskammer gemessen und zur Normierung der Spektren verwendet. Der Abstand zwischen Probe und Detektor ist so gewählt, daß die zweite Ordnung im lamellaren Beugungsspektrum von PC's in Wasser bei ca. $2\theta=2.8^\circ$ noch gut sichtbar ist. Für eine Breite des Eintrittsfensters des verwendeten eindimensionalen OED von ca. 200mm ergibt dies einen Abstand von $d_{PD} = 2000 - 2500\text{mm}$. Eine Ortsauflösung von 0.2mm entspricht dann einer Winkelauflösung von $0.0045^\circ - 0.006^\circ$. Der Primärstrahl besitzt einen elliptischen Querschnitt und hat längs der Kapillarenachse eine Halbwertsbreite (FWHM) von 0.05° , quer dazu ca. 0.013° . Die Auflösung in der Streurichtung senkrecht zur Kapillarenachse ist demnach maximal. Der Strahlfänger deckte einen Winkel von 0.13° , d.h. $s = (650\text{Å})^{-1}$, ab. Eine schematische Darstellung der Meßgeometrie findet man in Abb.2.9. Im Prinzip ist sie auch für den Laboraufbau gültig, wenn man die Kapillare aufrecht stellt, d.h. die x-Achse mit der z-Achse vertauscht. Die Aufnahmezeit eines Spektrums betrug bis zu $60s$ für Proben mit geringer Streuintensität. Somit konnte die zeitliche Entwicklung von Proben mit einer Auflösung von mindestens einer Minute verfolgt werden. Vor und nach einer solchen Serie von Spektren wurde häufig zur Aufnahme des zweidimensionalen Beugungsdiagramms eine Image Plate (Fuji), (IP), ca. $\Delta t_{INT}=2-5$ Minuten belichtet und daraufhin mit einer Auflösung von 100 oder $200\mu\text{m}$ durch einen Scanner vom Typ BAS2000 ausgelesen.

Eine zusammenfassende Gegenüberstellung typischer Parameter für die Aufbauten im Labor und am Synchrotron findet sich in Tabelle 2.2.

2.3.3 Detektorkalibration

Am Synchrotronmeßplatz ist der Abstand zwischen Probe und Detektor innerhalb eines vorgegebenen Bereiches frei wählbar. Zur Bestimmung des Abstandes wur-

den Referenzsubstanzen verwendet, die im erforderlichen Winkelbereich ein definiertes und einfach interpretierbares Spektrum aufweisen. Für den Kleinwinkelbereich kommen bevorzugt Silberbehenat „AgBeh“ sowie die Fasern eines Rattenschwanzes „RTT3“ in Betracht. Beide liefern ein lamellares Spektrum, mit Schichtabständen von $d = 650\text{\AA}$ für RTT3 und $d = 58.38\text{\AA}$ für AgBeh. Die orientierte RTT3–Probe eröffnet auf Grund der großen Periode die Möglichkeit, zur Kalibration des Detektors viele Beugungsordnungen miteinzubeziehen. Im Fall von AgBeh können nur zwei Beugungsordnungen mit einer großen Halbwertsbreite ausgenutzt werden [54], um den Abstand zwischen Probe und Detektor zu bestimmen. Es liegt im Gegensatz zu RTT3 als Pulver vor, so daß aus den Beugungsringen auf der zweidimensionalen Bildplatte auf die Position des Primärstrahles in der Detektorebene zurückgeschlossen werden kann. Die Nullstrahlposition ist der Mittelpunkt von Kreisbögen, über die integriert wird, um aus dem Diffraktogramm einer Image Plate ein Spektrum zu gewinnen. Am Labormeißplatz wurden die OED–Spektren auch mit Hilfe von AgBeh–Spektren kalibriert.

Da die Position des Nullstrahls am Ort des Detektors bekannt ist, stehen die absoluten Winkelwerte aller Beugungsreflexe zur Verfügung. Daher sind zwei Beugungsordnungen eines Spektrums ausreichend, um zu beurteilen, ob eine lamellare Ordnung vorliegt. Dazu bildet man das Verhältnis der Winkelschwerpunkte $2\theta_i$ von dem zweiten zum ersten Beugungsreflex $R_W = 2\theta_2/2\theta_1$. Für $R_W=2$ liegt eine lamellare Ordnung vor. Aus der Braggformel $n\lambda = 2d_{n00}\sin\theta$ mit den Ordnungen $n=1$ und $n=2$ und der Wellenlänge λ erhält man die Ortsperiode d_{100} . Sie wird auch als *Schichtabstand* d bezeichnet.

2.3.4 Halbwertsbreite und Intensität einer Beugungsordnung

Die Form und Breite einer Beugungsordnung wird durch mehrere Faktoren bestimmt. Es kann zwischen instrumentellen und intrinsischen Beiträgen unterschieden werden. Erstere hängen von Eigenschaften des Primärstrahls, des Detektors und der Probengeometrie ab. Letztere gehen beispielsweise auf die Größenverteilung der Streudomänen¹¹, deren Richtungsverteilung sowie das Ausmaß der Unordnung zurück, wobei damit jedwede Abweichung von äquidistant angeordneten Braggebenen gemeint ist. Zusätzlich können zu einem gegebenen Zeitpunkt Domänen mit geringfügig voneinander abweichenden mittleren Schichtabständen zum Streusignal beitragen [55][56] (vgl. Kap.4.2, 4.3.5.2) oder im Fall einer zeitlichen Variation des Abstandes aufeinanderfolgende Zustände aufintegriert werden. Im folgenden werden diejenigen Beiträge zur Halbwertsverbreiterung diskutiert, von denen im Verlauf einer Messung eine Änderung erwartet werden kann. Hierzu zählen erwartungsgemäß die o.g. intrinsischen Anteile und unter gewissen Umständen auch die Probengeometrie. Vorab beschreiben wir, wie für eine gegebene Beugungsordnung die Intensität und Halbwertsbreite bestimmt wird.

¹¹Unter Streudomänen sind in diesem Zusammenhang Untereinheiten des Streuvolumens zu verstehen, deren Braggebenen alle kohärent zur Beugungsordnung beitragen.

2.3.4.1 Instrumentelle Beiträge und Datenanalyse

In diesem Abschnitt geht es weniger um die einzelnen Beiträge zur instrumentellen Breite als um deren Einfluß auf das Streuprofil einer Beugungsordnung. Im Anschluß daran wird beschrieben, wie die Spektren im Hinblick auf die Breite der Ordnungen ausgewertet werden.

Zur instrumentellen Breite tragen Eigenschaften des Detektors und des Strahls genauso bei wie die Probengeometrie (vgl. Kap.2.3.1, 2.3.1). Der Strahl kann durch die Monochromatisierung $\Delta\lambda/\lambda$, Divergenz und Breite am Probenort charakterisiert werden. Übertreffen die lateralen Abmessungen des Strahles am Probenort diejenigen der Probe, trägt nur die entsprechende Projektion zur gesamten Breite bei. Am Synchrotronmeßplatz wird zu jeder Strahleinstellung der abgeschwächte Primärstrahl auf einer Image-Plate aufgenommen, so daß sein Profil am Ort des Detektors bestimmt werden kann. Wenn nun die Position des Strahles in Bezug auf das Probenvolumen am Probenort bekannt ist, kann das Streuprofil um den instrumentellen Beitrag durch Entfaltung korrigiert werden. Da jedoch weder die genaue laterale Abmessung noch die Position des am Streuprozeß beteiligten Probenvolumens im Strahl bekannt ist, ist eine instrumentelle Korrektur nicht realisierbar. Dadurch erübrigt sich auch eine detaillierte Profilanalyse der Beugungsreflexe, welche im Grunde genommen unerlässlich ist, um eine verlässliche Unterscheidung zwischen den verschiedenen Modellen zur Verbreiterung zu treffen. Die aus den Meßdaten gewonnene Aussage über die Streupeaks beschränkt sich daher auf deren Position, Fläche, Höhe und Breite.

Unabhängig von der Art des eingesetzten Detektors wird grundsätzlich der Verlauf des Streuuntergrundes im Bereich der Ordnung linear interpoliert. Die Breite des Intervalls um eine Ordnung wird dabei so bemessen, daß der Untergrund innerhalb des gesamten Fensters linear approximierbar ist. Da die Reflexe einen schmalen Winkelbereich einnehmen, ist dies immer möglich. Nachdem der so bestimmte Untergrund vom Spektrum abgezogen ist, wird das Peakprofil beurteilt. Solange der Beugungsreflex nicht deutlich erkennbar deformiert ist, d.h. weder asymmetrische Flanken oder Schultern noch eine Aufspaltung aufweist, wird sein Verlauf durch eine Gaußfunktion angenähert. Ein quantitatives Kriterium für die Deformation eines Peaks läßt sich durch die statistische Analyse der Intensitätsverteilung ableiten. Man ermittelt als Positionen der Verteilung

- den Schwerpunkt, d.h. ihr erstes Moment,
- die Mitte zwischen beiden Halbwertspositionen,
- den Ort des Maximums

und vergleicht diese miteinander. Liegen sie weiter als 0.3% auseinander¹², ist die Annahme einer einheitlichen symmetrischen Verteilung fragwürdig. Auf solche Fälle wird im Ergebniskapitel jeweils hingewiesen (Kap.4.3.5.1). Die statistische Auswertung bietet außerdem eine Vergleichsmöglichkeit mit den durch Gaußfit bestimmten Größen der Verteilung. Insbesondere auf eine Übereinstimmung der Halbwertsbreite wurde geachtet. Mehrfachpeaks werden nur dann gefittet, wenn die Aufspaltung einer Ordnung in der Größenordnung einer Halbwertsbreite liegt (Kap.4.4).

¹²Der Grenzwert von 0.3% ist als ein rein empirischer Wert zu verstehen.

Die Auswertung wurde mit den Programmpaketen Origin5.0 Professional (Microcal, Northampton, USA) sowie DIFFRAC AT3.3 (Siemens, Karlsruhe) durchgeführt. Zusätzlich wurden die vom EMBL zur Verfügung gestellten Auswerteprogramme OTOKO (R.Koch) und SCACO (W.Ause) verwendet.

2.3.4.2 Streuintensität

Nach Zhang [57] läßt sich die Streuintensität eines Vielschichtsystems $I(\vec{q})$ in die Faktoren $S(\vec{q})$ und $|F(q)|^2$ zerlegen, wobei $S(\vec{q})$ der Strukturfaktor und $F(q)$ der Formfaktor einer einzelnen ruhenden Membran im Medium ist¹³. Das Konzept der Faktorisierung wurde allerdings schon wesentlich früher beispielsweise durch Guinier [58] auf kristalline Systeme angewendet. In den Strukturfaktor gehen Systemeigenschaften ein wie Unordnung, Ausdehnung der Streudomänen (Kohärenzlänge) sowie deren Orientierungsverteilung (Lorentzfaktor). Der Lorentzfaktor $L(q)$ kann häufig auch absepariert werden, so daß sich dann die Intensität durch

$$I(\vec{q}) = s(\vec{q})|F(q)|^2L(q) \quad (2.3)$$

ausdrücken läßt, wobei $s(\vec{q})$ nun als reduzierter Strukturfaktor bezeichnet wird und \vec{q} der Streuvektor ist. Für definierte Verteilungen der Orientierung läßt sich die q -Abhängigkeit des Lorentzfaktors explizit angeben. Für Pulverproben gilt $L(q) \propto q^{-2}$, für konzentrisch angeordnete Schichten $L(q) \propto q^{-1}$ und für planar orientierte Schichten je nach Divergenz des Strahles $L(q) \propto q^{-1}$ bzw. $L(q) \propto 1$ [59]. Bei den Ausführungen zur Caillé-Theorie (Kap.2.3.4.4, S.32) und parakristallinen Theorie (Kap.2.3.4.4, S.35) setzen wir $L(q)=1$ voraus, so daß dort eine Unterscheidung zwischen $S(\vec{q})$ und $s(\vec{q})$ unnötig ist.

Betrachten wir nun, wie sich die einzelnen Beiträge zur Intensitätsverteilung $I(\vec{q})$ aus Gleichung (2.3) im Verlauf des Quellprozesses ändern können. Änderungen der Intensitätsverteilung, die durch eine Umverteilung oder Umorientierung des Streumaterials zustande kommen, bleiben unberücksichtigt.

Dementsprechend kann der Lorentzfaktor als konstant angenommen werden.

Der Betrag des Formfaktors im Bereich der h -ten Streuordnung ($q = q_h$) ist nur von einer Änderung des Schichtabstandes, d.h. der Wasserschichtdicke, betroffen, wenn man annimmt, daß die Membran ihre Elektronendichteverteilung während des Quellprozesses beibehält. Davon ist auszugehen, da sich eine fluide Membran selbst bei großem Druck ($\approx 10\text{atm}$) nicht verformt [60]. Durch eine Zunahme der Periode im DOPC-Vielschichtsystem von 60\AA auf 64\AA ändert sich $|F(q)|$ nach Tristam-Nagle [42] in der ersten Ordnung in relativen Einheiten von 1.28 auf 1.35 bzw. in der zweiten von 1.63 auf 1.50.

Die wesentlichen Veränderungen von $I(\vec{q})$ sind durch die Beiträge in $s(\vec{q})$ zu erwarten. Auf die einzelnen Beiträge gehen wir in den folgenden Abschnitten näher ein.

2.3.4.3 Größe der Streudomänen

Der Anzahl der Bragg Ebenen innerhalb einer Probe, die kohärent in eine Richtung streuen, ist durch die Abmessung der Probe eine obere Grenze gesetzt. In den

¹³Die Nomenklatur für die einzelnen Faktoren wurde von Zhang [57] übernommen.

meisten Fällen ist die Kohärenzlänge L_K jedoch wesentlich kleiner und liegt z.B. für Vielschichtsysteme bestehend aus Lipidmembranen in der Größenordnung weniger hundert Schichten [52]. Damit unterschreitet sie sogar wesentlich die Abmessungen multilamellarer Liposomen, welche als die kleinsten makroskopischen Einheiten eines Debye-Scherrerpulvers für das System Lipid/Wasser angesehen werden können. Sie besitzen einen typischen Durchmesser im Bereich weniger μm [52]. Die intrinsische

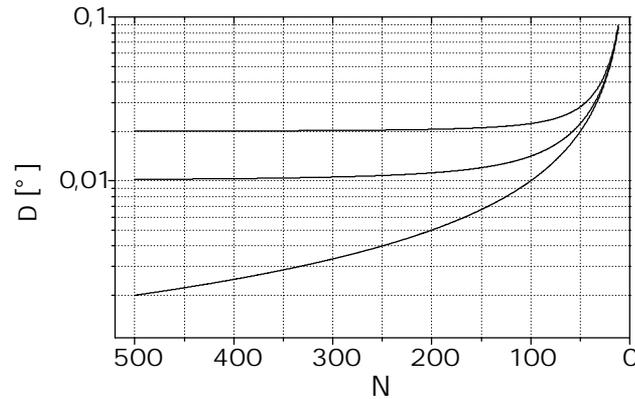


Abbildung 2.10: Nach (2.4) und (2.5) für unterschiedliche instrumentelle Breiten Δ_i berechnete gesamte Halbwertsbreite Δ in Grad gegen die Membranzahl N innerhalb einer Kohärenzlänge. Von oben nach unten beträgt Δ_i 0.02° , 0.01° und 0.00° . Es wurde eine Periode von 63\AA zugrunde gelegt.

Breite Δ_0 eines Reflexes kann nach Scherrer [61] mit der Kohärenzlänge L_K durch

$$\Delta_0 = f\lambda / (L_K \cos \theta) \quad (2.4)$$

in Beziehung gesetzt werden, wobei λ die Wellenlänge, θ den Beugungswinkel (vgl. Abb.2.9) und f den Gestaltfaktor bezeichnet. Er beträgt für Lamellenstapel ungefähr eins [62]. Setzt man sowohl für das intrinsische als auch für das instrumentelle Profil eine Gaußform voraus und berücksichtigt zudem, daß sich das Gesamtprofil aus einer Faltung beider Beiträge ergibt, so gilt für die resultierende Halbwertsbreite

$$\Delta^2 = \Delta_0^2 + \Delta_i^2, \quad (2.5)$$

wobei Δ_i die instrumentelle Breite bezeichnet. Für unendlich ausgedehnte Domänen ($L_K \rightarrow \infty$) stimmen Gesamtbreite und instrumentelle Breite überein. Der Verlauf von Δ als Funktion der Membranzahl N ist für unterschiedliche Anfangsbreiten Δ_0 in Abb.2.10 dargestellt. Mit abnehmendem N nimmt nach (2.4) und (2.5) der Anteil von Δ_0 immer weiter zu, so daß ursprüngliche Unterschiede in Δ_i weniger zum Tragen kommen.

2.3.4.4 Unordnung

Das herkömmliche Modell für temperaturbedingte Unordnung im Festkörper (Kristall) abseits von der Phasenumwandlung geht davon aus, daß die einzelnen Moleküle unabhängig voneinander um ihre Gleichgewichtslage schwingen. Die Abweichung

von der Ruheposition nimmt von einem ausgewählten Molekül aus betrachtet nicht mit der Entfernung zu. Die Auswirkung einer solchen Unordnung auf die Größe des Streusignals findet im Debye–Wallerfaktor seinen Niederschlag, welcher die temperaturabhängige Intensitätsabnahme der Beugungsordnungen zum Ausdruck bringt [61]. Die aus den Beugungsordnungen abgezogene Intensität findet sich zwischen diesen in Form eines diffusen Untergrundes wieder. Davon bleibt jedoch die Halbwertsbreite unbeeinflusst. Nach Hosemann und Biagchi [63] nennt man dies Unordnung „erster Art“. Eine Unordnung „zweiter Art“ liegt dann vor, wenn mit zunehmendem Abstand von einer Bezugsposition auch die mittlere Abweichung vom neuen Bezugspunkt anwächst. Im smektischen Flüssigkristall vom Typ A ist alleine durch die Fluktuationen die langreichweitige Ordnung aufgehoben. Ausgehend von einem Ansatz für die elastische Energie der thermisch angeregten Fluktuationen wird in der Caillé–Theorie [64] und darauf aufbauenden Modellen [65] die Auswirkung der Unordnung auf den Strukturfaktor behandelt. Daneben wurde auch die sog. „parakristalline Theorie“ eingesetzt, um die Verbreiterung der Beugungsordnungen nativer Nervenmyelinstrukturen zu deuten [7][8]. Diese Theorie basiert ausschließlich auf statistischen Annahmen für die Verteilung der Membranen im Vielschichtsystem. Beide Theorien werden im folgenden vorgestellt und ihre Vorhersagen im Hinblick auf die Halbwertsbreite und Intensität einer Beugungsordnung beschrieben.

Caillé–Theorie Ausgangspunkt für die Caillé–Theorie ist die elastische Energie des smektischen Flüssigkristalls vom Typ A¹⁴. Mit Hilfe des Landau–de Gennes Ansatzes [66] für die auf das Volumen bezogene elastische Energie des Flüssigkristalls

$$g_V = \frac{1}{2} \left(B \left(\frac{du}{dz} \right)^2 + K_d \left(\frac{d^2u}{dx^2} + \frac{d^2u}{dy^2} \right)^2 \right) \quad (2.6)$$

mit dem Kompressionsmodul B und dem auf eine Schichtdicke d normierten Krümmungsmodul K_d kann auf dieselbe Weise wie in Kap.3.1.3 hergeleitet werden, daß für das mittlere Schwankungsquadrat der Auslenkungsamplitude

$$\langle u^2 \rangle = \frac{k_B T}{4\pi(BK_d)^{\frac{1}{2}}} \ln \frac{L}{d} \quad (2.7)$$

gilt, worin L die Ausdehnung der Probe bezeichnet. Die Definition der Membranauslenkung u im Koordinatensystem ist in Kap.3.1.1 gegeben. Die logarithmische Divergenz der Fluktuationsamplitude in (2.7) ist ein Beleg für das Fehlen einer langreichweitigen Ordnung.

Die Auswirkungen der Fluktuationen auf das Peakprofil wurden für den Grenzfall unendlich vieler orientierter Schichten von Caillé theoretisch untersucht [64]. Im Bereich der auslaufenden Flanke der h -ten Beugungsordnung $q = q_h$ ist der Strukturfaktor in der Streurichtung parallel zu der Schichtnormalen durch

$$S_h(q) \propto (q - q_h)^{-2+h^2\eta_C} \quad (2.8)$$

¹⁴Dies entspricht der in Kap.1 eingeführten L_α -Phase.

gegeben, worin q den Betrag des Streuvektors bezeichnet und $q_h = hq_1 = h2\pi/d$ bei einem Schichtabstand d gilt. Der Parameter η_C ist mit

$$\eta_C = \frac{q_1^2 k_B T}{8\pi\sqrt{BK_d}} \quad (2.9)$$

ein Maß für die Stärke der Fluktuationen. Wie weiter unten näher erläutert, liegt η_C für PC-Wassersysteme bei Raumtemperatur im Bereich von 0.1 und kann für besonders flexible Membranen Werte um eins annehmen. Aus (2.8) ist ablesbar, daß zu höheren Ordnungen die Flanke des Streupeaks flacher ausläuft. Immer weniger Streuintensität geht also in den Bereich des Maximums ein, so daß höhere Ordnungen zunehmend im diffusen Streuuntergrund verschwinden. Dieser Effekt gewinnt mit wachsendem η_C zunehmend an Bedeutung und ist dafür verantwortlich, daß bei voll hydratisierten Vielschichtsystemen bestehend aus Lipidmembranen in der L_α -Phase im günstigsten Fall vier Beugungsordnungen zu beobachten sind.

Eine Herleitung des Strukturfaktors für unorientierte Proben unter Berücksichtigung ihrer endlichen Ausdehnung wurde von Zhang et al. durchgeführt [57]. Der Ausdruck für $S(q)$ hängt von η_C , der Schichtdicke d und der Anzahl der Membranen ab. Unter der Bedingung einer einheitlichen Kohärenzlänge für die gesamte Probe läßt sich $S(q)$ näherungsweise als eine diskrete Summe ausdrücken [57]. Bedingt durch die Beschränkung auf eine Kohärenzlänge ist der so berechnete Strukturfaktor mit artefaktischen Oszillationen behaftet, welche sich besonders in den Flanken der Ordnungen bemerkbar machen. Abb.2.11 zeigt in beiden Teilbildern für

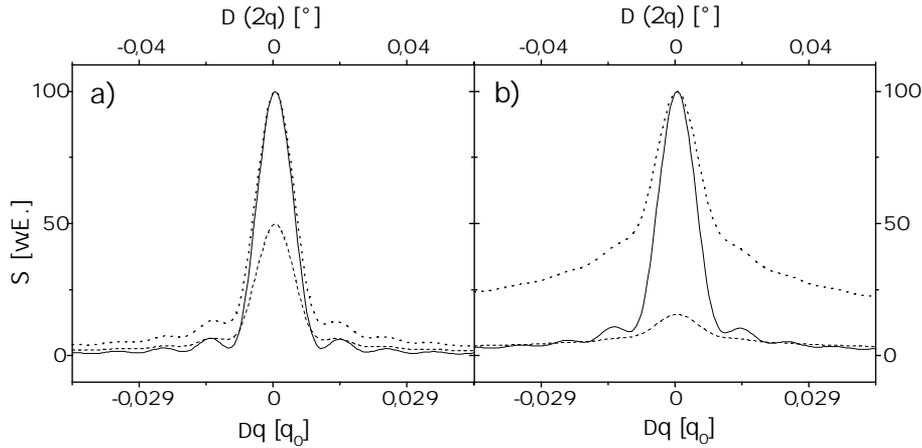


Abbildung 2.11: Verlauf des aus der Caillé–Theorie bestimmten Strukturfaktors $S(q)$ [57] im Bereich der ersten (durchgezogene Linie) und zweiten Beugungsordnung (dünn gestrichelt) für den Cailléparameter $\eta_C = 0.05$ a) und $\eta_C = 0.15$ b) (Gleichung (2.9)). Die zweite Ordnung ist zusätzlich auf den Maximalwert der ersten normiert eingetragen (dick gestrichelt). Die Position des Maximums der jeweiligen Ordnung wird bei $q = q_0$ angenommen, so daß dort $\Delta q = q - q_0 = 0$ gilt. Unter der Annahme einer einheitlichen Kohärenzlänge kann $S(q)$ nach Zhang [57] als diskrete Summe dargestellt werden und weist dadurch artefaktische Oszillationen in den Flanken auf. Es wurde eine Periode von 63\AA und 100 Membranen zugrunde gelegt.

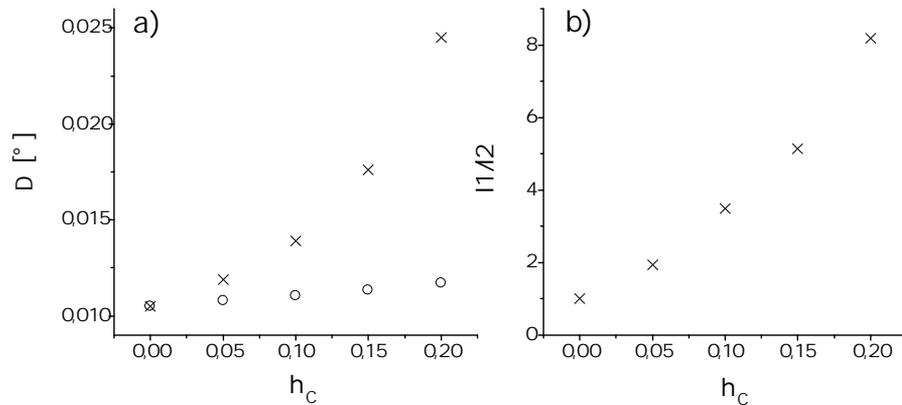


Abbildung 2.12: Aus dem Verlauf des Strukturfaktors $S(q)$ in der diskreten Näherung von Zhang [57] (vgl. Abb.2.11) durch Lorentzfit bestimmte Größen in Abhängigkeit vom Cailléparameter η_C (Gleichung (2.9)). Es wurde eine Periode von 63\AA und eine Domänengröße von 100 Membranen zugrunde gelegt.

- a) Halbwertsbreite Δ in Grad gegen η_C für die erste (\circ) und zweite (\times) Ordnung.
 b) Verhältnis der integrierten Intensität $I1/I2$ von der ersten zur zweiten Ordnung.

unterschiedliche η_C jeweils den Verlauf von $S(q)$ im Bereich der ersten und zweiten Ordnung für $d = 63\text{\AA}$ und 100 Membranen. Die zweite Ordnung ist jeweils in Originalgröße und auf das Maximum der ersten Ordnung normiert dargestellt. Man kann sich $S(q)$ im Bereich der Maxima ($q = q_0$) in zwei Anteile zerlegt denken. Während im zentralen Bereich $\Delta q = |q - q_0| \propto 1/L_K$ der Verlauf gaußförmig ist, geht er im Bereich der Flanken $|q - q_0| > 1/L_K$ zunehmend in ein Potenzgesetz über [57]. Für unorientierte Proben fällt Δq mit $-1 + h^2\eta_C$ ab und nicht wie in (2.8) mit $-2 + h^2\eta_C$ [57].

Für $\eta_C = 0.05$ ist die Breite beider Ordnungen vergleichbar (Abb.2.11a). Ein größerer Wert von η_C , z.B. $\eta_C = 0.15$, ist mit einer deutlichen Verbreiterung der zweiten Ordnung verbunden, während die erste sich kaum verändert (Abb.2.11b). Zudem wirkt sich ein größeres η_C durch eine geringere Streuintensität der zweiten Ordnung im Verhältnis zur ersten aus. Wir verwenden die Näherung für $S(q)$, um die Entwicklung der Peakbreite und des Intensitätsverhältnisses zwischen erster und zweiter Ordnung in Abhängigkeit vom Parameter η_C bei gegebener Membranzahl einzuschätzen. Dazu wird der Verlauf von $S(q)$ im Bereich des Maximums durch eine Lorentzfunktion angenähert und daraus die Halbwertsbreite und Fläche abgelesen. Da, wie weiter oben erläutert, die Fitfunktionen nicht dem eigentlichen Verlauf von $S(q)$ entsprechen, können die bestimmten Größen nur als eine grobe Näherung aufgefaßt werden. Am Beispiel einer Domänengröße von 100 Membranen bei einem mittleren Abstand von 63\AA sind in Abb.2.12 die volle Halbwertsbreite beider Ordnungen sowie das Flächenverhältnis der ersten zur zweiten Ordnung gegen η_C aufgetragen. Während die Breite der ersten Ordnung zwischen $\eta_C = 0$ und $\eta_C = 0.2$ nur geringfügig zunimmt, wird die Breite der zweiten Ordnung gegenüber dem Anfangswert mehr als doppelt so groß (vgl. Abb.2.11). Das Flächenverhältnis zwischen erster und zweiter Ordnung steigt dabei stark an, was darauf schließen läßt, daß der diffuse Streuanteil der zweiten Ordnung verglichen mit der ersten wesentlich schnell-

ler mit η_C zunimmt.

Experimente zu diesem Thema finden sich z.B. bei [67][42]: An Systemen mit einer geringen Biegesteifigkeit K wurden aus Meßdaten Werte in der Größenordnung von 1 interpretiert [67]. Neuere Messungen haben für DOPC-Liposomen einen Wert $\eta_C = 0.11$ bei 25°C ergeben [42].

Parakristalline Theorie In dieser Theorie geht man davon aus, daß der Abstand d zwischen zwei benachbarten Membranen eine Zufallsgröße ist, die im Mittel den

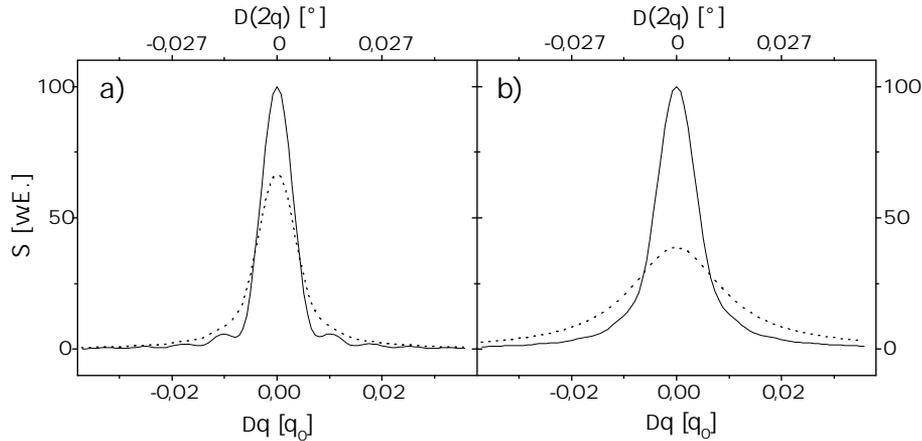


Abbildung 2.13: Verlauf des aus der parakristallinen Theorie bestimmten Strukturfaktors $S(q)$ [57] im Bereich der ersten (durchgezogene Linie) und zweiten Beugungsordnung (dünn gestrichelt) für den Unordnungsparameter $\Delta d = 1 \text{ \AA}$ a) und $\Delta d = 2 \text{ \AA}$ b). Sonstige Parameter stimmen mit denen aus Abb.2.11 überein. Weitere Erläuterungen siehe Text.

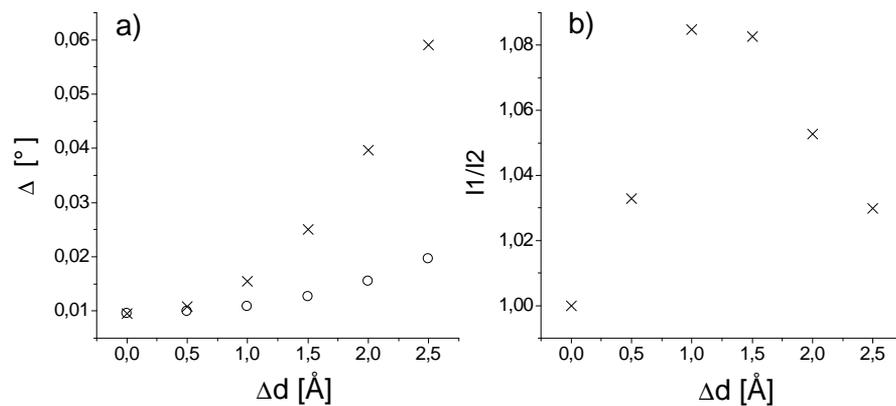


Abbildung 2.14: Aus dem Verlauf des Strukturfaktors $S(q)$ in der diskreten Näherung von Guinier [58] (vgl. Abb.2.13) durch Lorentzfit bestimmte Größen in Abhängigkeit vom Parameter Δd . Es wurde eine Periode von 63 \AA und eine Domänengröße von 100 Membranen zugrunde gelegt.

a) Halbwertsbreite Δ in Grad gegen Δd für die erste (○) und zweite (×) Ordnung.

b) Verhältnis der integrierten Intensität I_1/I_2 von der ersten zur zweiten Ordnung.

Wert \bar{d} einnimmt. Das mittlere Schwankungsquadrat $\Delta d^2 = \langle (\bar{d} - d)^2 \rangle$ ist ein Maß für die Unordnung. Da die jeweiligen Positionen der Membranen voneinander unabhängig sind, gilt für das Schwankungsquadrat zwischen der ersten und $(n - 1)$ -ten Membran $\Delta d_n^2 = n\Delta d^2$. Da die Abweichung von der mittleren Position mit dem Abstand divergiert, beschreibt die parakristalline Theorie nach Hosemann und Biagchi [63] Unordnung zweiter Art. Ein Ausdruck für den Strukturfaktor einer begrenzten Anzahl orientierter Membranen bei gegebenem mittleren Abstand und Schwankungsquadrat wurde von Guinier hergeleitet [58]. Wie schon im Fall der Caillé-Theorie läßt sich $S(q)$ vereinfacht durch eine diskrete Summe darstellen und ist im Bereich der Flanken mit artefaktischen Oszillationen versehen (Abb.2.13). Eine Zunahme des mittleren Schwankungsquadrates des Abstandes macht sich in der zweiten Ordnung stärker bemerkbar als in der ersten. Sie wird schneller breiter und verliert gegenüber der ersten Ordnung an Höhe. Eine Auswertung der Breite und Fläche beider Beugungsordnungen für einen Parametersatz ($d = 63\text{Å}$, 100 Membranen, Δd zwischen 0Å und 2.5Å) ist in Abb.2.14 dargestellt. Der Verlauf von $S(q)$ wurde dazu durch eine Lorentzfunktion angenähert. Diese Funktion ist gut zur Beschreibung des Profils von $S(q)$ geeignet, da die Flanken im Bereich des Maximums $q = q_0$ mit $(q - q_0)^{-2}$ abfallen. Zu höheren Ordnungen h nimmt die Breite Δ quadratisch mit h zu.