

2

Theoretischer Teil

Proteinkristalle entstehen aus wäßrigen Lösungen nach Erreichen einer Übersättigung. Der Sättigungspunkt hängt von der Proteinkonzentration, der Ionenstärke, der Temperatur, dem pH-Wert und der Bindung von Gegenionen oder spezifischen Liganden an das Protein ab.

Ein Protein kann als großes, polyvalentes Ion betrachtet werden. In wäßriger Lösung ist jedes Ion mit einer "Atmosphäre" von Gegenionen umgeben. Diese Ionenatmosphäre beeinflusst die Wechselwirkungen des Ions mit Wassermolekülen auch untereinander und bestimmt daher dessen Löslichkeit.

Bei niedriger Ionenkonzentration erhöht die Ionenatmosphäre die Löslichkeit, da sie die Möglichkeiten für günstige Wechselwirkungen mit Wassermolekülen erhöht. Ionen höherer Ladung sind in der Regel effektiver für Veränderungen der Löslichkeit. Die meisten Salze und Proteine sind bei geringer Ionenstärke besser löslich als in reinem Wasser. Dies wird auch als "salting in" bezeichnet.

Bei höherer Ionenstärke konkurrieren die Ionen um das sie umgebende Wasser. Daher werden dem gelösten Stoff Wassermoleküle entzogen, und die Löslichkeit sinkt. Der Ausalzeffekt "salting out" wird bei allen wasserlöslichen Spezies beobachtet, seien es Ionen, organische Moleküle, Gase oder Proteine.

Viele Faktoren, die die Löslichkeit eines Proteins bestimmen, sind temperaturabhängig, z.B. sinkt die Dielektrizitätskonstante mit steigender Temperatur oder gewinnt der Entropieterm in der freien Lösungsenthalpie ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) bei steigender Temperatur an Gewicht.

Der Temperaturkoeffizient der Löslichkeit hängt auch von den übrigen Bedingungen ab, z.B. der Ionenstärke. Ein Protein ist desto löslicher, je größer seine Nettoladung ist. Die geringste Löslichkeit liegt am isoelektrischen Punkt (pI) vor, da die Nettoladung Null ist. Es sollte bei der Kristallisation eines Proteins im allgemeinen zusätzlich der pH-Wert und die Gegen-Ionen variiert werden, um die optimalen Bedingungen zu finden.

Die zwei hauptsächlichen Schritte bei der Entstehung von Proteinkristallen aus einer Lösung sind Keimbildung (nuclei formation) und Kristallwachstum (crystal growth). Die Keimbildung erfordert meist eine höhere Übersättigung als das Kristallwachstum. Sowohl Keimbildung als auch Kristallwachstum sind Prozesse, die Stunden bis Monate in Anspruch nehmen können.

Die Voraussetzung für die Kristallbildung ist, daß es für ein gegebenes Kristallisationsexperiment einen metastabilen Übersättigungsbereich gibt, bei dem Keimbildung erfolgt, aber sich noch kein amorphes Präzipitat bildet. Je größer dieser Bereich ist, desto einfacher läßt sich ein Protein kristallisieren. Um die besten Ergebnisse zu erhalten, sollten die Kristalle bei einer niedrigeren Übersättigung gezüchtet werden, als für die Keimbildung nötig ist.

Die Standardmethoden zur Kristallisation sind so angelegt, daß die Konzentration an Fällungsmittel, z.B. Salz, Alkohol oder Polyethylenglykol, über einen weiten Bereich langsam erhöht wird. Zum einen wird damit die zur Keimbildung notwendige Übersättigung erreicht, zum anderen wird bei Kristallwachstum die sinkende Proteinkonzentration durch eine steigende Fällungsmittelkonzentration ausgeglichen. Damit bleibt die Kristallisationslösung länger übersättigt, und die gebildeten Kristalle werden größer.

In den nun folgenden Abschnitten werden die Aggregationsbedingungen sowie die -prozesse erläutert, die zum Verständnis des Phasenüberganges erster Ordnung beitragen. Des weiteren wird auf Aggregationskinetiken und auf die Wechselwirkungen von kolloidaler Größenordnung näher eingegangen.

2.1 Zur Physik der Kristallisation

Die Verfahren der Kristallzüchtung werden nach dem Aggregatzustand des Nährmediums unterschieden, aus dem der Kristall wächst. Es gibt die Kristallzüchtung aus der Gasphase, aus der Schmelze, aus Lösungen und die Kristallzüchtung in der festen Phase. Im weiteren

wird im wesentlichen auf die Kristallzüchtung aus Lösungen eingegangen, da nur diese bei Proteinen angewandt werden kann [28]-[30].

Jede Kristallisation wird durch Kristallisationskeime ausgelöst. Keime werden erst oberhalb einer bestimmten Größe stabil. In jeder Schmelze oder Lösung entstehen und zerfallen in jedem Augenblick lockere Aggregate von Molekülen, sog. Embryonen. Die Keimbildung kann homogen oder heterogen sein. Homogene Keime werden aus den Molekülen des kristallisierenden Stoffes selbst gebildet. Heterogene Keime werden dagegen durch fremde Grenzflächen erzeugt.

Aus Gründen der Keimbildungsenergie findet die Kristallisation vorzugsweise durch Anlagerung an die Oberfläche fester Partikel statt. Durch Verwendung bereits vorhandener kleiner Kristallstücke als Keim kann die Entstehung des Einkristalls gesteuert werden. Es ist möglich, daß Verunreinigungen in der Lösung, z.B. in Form von Staub, ebenfalls als Keime wirken. Da sich in diesem Fall das Material, d.h. die Proteine, nicht nur am vorbereiteten Fremdkeim anlagert, sondern auch an den Verunreinigungen kristallisiert, so daß die Züchtungserfolge geschmälert werden, erfordert die Proteinkristallzucht peinlichste Sauberkeit.

Als Nährmittel, aus dem der Kristall wachsen soll, dient hier eine Lösung. Es wird also eine Flüssigkeit benötigt, in der das zu kristallisierende Protein löslich ist. Das Grundprinzip besteht darin, daß eine gesättigte Lösung hergestellt wird, die anschließend durch Abkühlung oder Verdunstung in den übersättigten Zustand überführt wird. Wie z.B. bei den hängenden Tropfen, wo im Reservoir die Ionenstärke doppelt so hoch ist wie im Tropfen, welcher das zu kristallisierende Protein enthält. Zusätzlich läßt sich eine übersättigte Lösung auch direkt durch Zugabe eines Elektrolyten erzielen.

Die Lösung ist im übersättigten Zustand nicht stabil. Sie strebt danach, in zwei Phasen zu zerfallen, nämlich in die gesättigte Lösung und in den gelösten Stoff. Im Regelfall geschieht das in der Weise, daß die nun überzähligen gelösten Proteine in Form eines Niederschlages ausfallen. Ist die Übersättigung noch nicht zu hoch, indem weniger Elektrolyt zur gesättigten Proteinlösung gegeben wird, oder befindet sich in der Lösung bereits ein Kristall, so tritt der amorphe Niederschlag nicht auf, sondern der Gleichgewichtszustand stellt sich dadurch ein, daß der bestehende Kristall kohärent weiterwächst.

2.1.1 Thermodynamik der Keimbildung

Zur Beschreibung der Thermodynamik der Keimbildung wird der klassische Phasentübergang aus der Schmelze betrachtet, der flüssig-fest Übergang. Hierzu wird die phänomenologische Betrachtung mit extensiven Größen verwendet. Die Kristallisation einer Schmelze beginnt mit der Keimbildung. Im Regelfall entstehen viele Keime. Sie wachsen so lange weiter, bis sie auf benachbarte Kristalle stoßen. Auf diese Weise kristallisiert das gesamte Material und es entsteht ein polykristallines Gefüge, wenn die Energiebarriere klein genug ist.

Gleichgewichtsbedingung

Wir betrachten ein geschlossenes thermodynamisches System, in dem der Druck p und die Temperatur T homogen sind. Der erste und zweite Hauptsatz der Thermodynamik lauten für diesen Fall

$$\begin{aligned}\dot{Q} dt &= dU + pdV, \\ dS &\geq \frac{1}{T} \dot{Q} dt,\end{aligned}\tag{2.1}$$

wo im zweiten Hauptsatz das Gleichheitszeichen genau dann gültig ist, wenn Gleichgewicht vorliegt. Dabei bezeichnet U die innere Energie, V das Volumen, S die Entropie des Systems und \dot{Q} den Wärmestrom über die Systemgrenzen hinaus.

Durch Elimination des Wärmestromes \dot{Q} erhält man die Entropiegleichung

$$TdS \geq (dU + pdV).\tag{2.2}$$

Im Gleichgewicht wird daraus die Gibbsche Gleichung. Durch eine Umformung mit der freien Enthalpie

$$G = U + pV - TS\tag{2.3}$$

erhält man als alternative Formulierung der Entropiegleichung:

$$dG \leq Vdp - SdT.\tag{2.4}$$

Der Vorteil gegenüber der ersten Formulierung ist, daß die Differentiale auf der rechten Seite sich auf die vergleichsweise einfach zu kontrollierenden Größen Druck und Temperatur beziehen. Für den Fall, daß Druck und Temperatur konstant gehalten werden, zieht

man aus der obigen Gleichung den Schluß, daß die freie Enthalpie im Nichtgleichgewicht nur abnehmen kann. Sie muß also im Gleichgewicht minimal sein.

Diese Eigenschaft macht die ansonsten eher unanschauliche freie Enthalpie zu einer wichtigen Größe, da sie darüber entscheidet, welche Modifikation eines Materials energetisch stabil ist.

Bei der Abkühlung einer Schmelze beginnt der Erstarrungsvorgang nicht mit dem Erreichen des Schmelzpunktes, sondern bei einer deutlich niedrigeren Temperatur. Um dies zu verstehen, muß berücksichtigt werden, daß das System während des Kristallisationsvorganges in zwei Phasen zerfällt.

Mit dem Unterschreiten der Schmelztemperatur wird die homogene Schmelze zwar instabil, der stabile kristalline Zustand stellt sich aber nicht ein, weil der dazu notwendige zwischenzeitliche Zerfall in zwei Phasen zunächst mit einem Anstieg der freien Enthalpie des Systems verbunden ist.

Die Grenzfläche zwischen den beiden Phasen liefert nämlich einen positiven Beitrag zur freien Enthalpie. Ein spontan durch thermodynamische Fluktuation entstehender kristalliner Bereich vergeht sofort wieder, weil die Grenzflächenenergie die mit der Kristallisation verbundene Abnahme an freier Enthalpie überkompensiert. Damit der Phasentübergang stattfindet, muß das System einen energetisch ungünstigeren Zustand passieren. Die dazu notwendige zwischenzeitliche Energiezunahme heißt Keimbildungsbarriere. Die Keimbildungsbarriere sinkt mit zunehmender Unterkühlung.

Homogene Keimbildung

Es wird ein Zustand unterhalb der Schmelztemperatur betrachtet. Durch thermodynamische Fluktuationen bilden sich immer wieder kleine, kristalline Bereiche in der Schmelze aus. Es besteht eine direkte Konkurrenz zwischen der Abnahme der freien Enthalpie durch die Kristallisation (Volumeneffekte) und der Zunahme durch Grenzflächenenergien zwischen den beiden Phasen (Oberflächeneffekte).

Um ein qualitatives Bild von den Vorgängen bei der Keimbildung zu machen, wird angenommen, daß die Oberflächeneffekte einen Beitrag zur freien Enthalpie leisten, der proportional zur Oberfläche des Kristallisationskeimes ist. Weiterhin soll gelten, daß der Keim kugelförmig sei mit dem Radius R . Wir können also für die Änderung der freien Enthalpie aufgrund

von Oberflächeneffekten

$$\Delta G_O = +4\pi\sigma R^2 \quad (2.5)$$

schreiben, wo σ die Oberflächenspannung darstellt.

Unterhalb des Schmelzpunktes hat der Kristall eine geringere freie Enthalpie als eine Schmelze im gleichen Zustand. Die Bildung eines Keims bedeutet eine Abnahme der freien Enthalpie des Systems, die proportional zu R^3 ist:

$$\Delta G_V = -\frac{4}{3}\pi R^3 \rho \Delta g. \quad (2.6)$$

Dabei ist ρ die Massendichte der Keime und Δg die massenspezifische Enthalpieabnahme bei der Kristallisation.

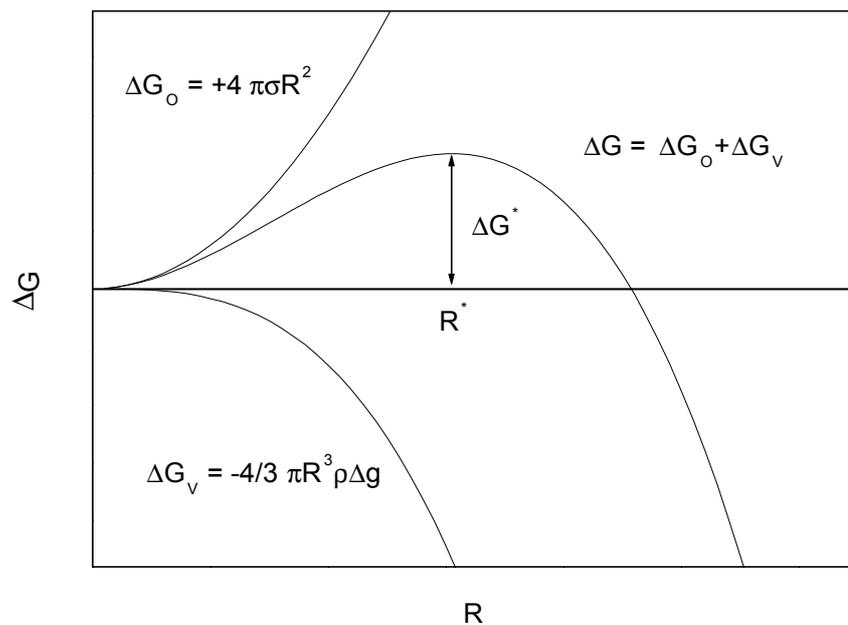


Abb.2.1: Darstellung der Freien Enthalpie ΔG , der Keimbildungsbarriere ΔG^* und des kritischen Keimbildungsradius R^*

Die Überlagerung der eben beschriebenen Oberflächen- und Volumenkräfte ergibt die

gesamte Änderung der freien Enthalpie

$$\Delta G = +4\pi\sigma R^2 - \frac{4}{3}\pi R^3 \rho \Delta g. \quad (2.7)$$

Der qualitative Kurvenverlauf ist in der Abb.(2.1) abgebildet.

Die gesamte freie Enthalpie steigt zunächst für kleine Keimradien an, erreicht dann aber ein Maximum, um anschließend rasant abzufallen. Der Wert des Maximums dieser Kurve ist die Keimbildungsbarriere ΔG^* , und der zugehörige Radius R^* heißt kritischer Keimradius.

Im Schmelzpunkt ist der kritische Keimbildungsradius unendlich, da die Volumeneffekte keinen Einfluß ausüben. Damit sich überhaupt wachstumsfähige Keime bilden können, ist ein gewisses Maß an Unterkühlung notwendig. Die Keimbildungsbarriere wird um so kleiner, je größer die Unterkühlung der Schmelze ist.

Bei einer großen Unterkühlung reichen deswegen bereits kleinräumige Fluktuationen aus, damit sich wachstumsfähige Keime bilden. Daher ist es unmöglich, eine Schmelze beliebig stark zu unterkühlen. Spätestens dann, wenn der kritische Radius in die Größenordnung des Keimdurchmessers kommt, setzt die Kristallisation ein.

Bei den elektrolythaltigen Proteinlösungen wird der Phasenübergang nicht durch eine Temperatursenkung, sondern mittels des Verdunstungsverfahrens bzw. durch direkte Übersättigung durch Zugabe eines Fällungsmittels erreicht. In diesen Lösungen liegt keine vollständige Mischbarkeit vor. Kristalle schwimmen in der Lösung aufgrund der Mischungslücke des Systems.

Heterogene Keimbildung

Im Gegensatz zur homogenen Keimbildung tritt die heterogene Kristallisation beispielsweise in einer Lösung auf. Diese benötigt zusätzliche Kristallisationskeime wie Staub, Kratzer an Gefäßwänden oder zusätzlich hinzugegebene Keime. Die Keimbildungsbarriere wird dadurch herabgesetzt. Eine heterogene Keimbildung tritt ein, wenn die aufwachsenden Moleküle die Keimoberfläche besetzen oder sich in Spalten und Löchern der Keime einlagern können.

Die Fremdkörper können die gleiche oder eine andere chemische Zusammensetzung als die Schmelze bzw. die gelösten Partikel haben. Die Kristallisationsgeschwindigkeit hängt sowohl von der Keimbildung als auch vom Keimwachstum ab.

Die phänomenologische thermodynamische Betrachtungsweise geht nicht auf die Art der möglichen Keime ein. Es wird lediglich von der allgemeinen Existenz einer Keimbildungsbarriere gesprochen, die den Phasenübergang beschreibt. Im folgenden Abschnitt wird auf mögliche Wachstumskriterien eingegangen, die aufgrund des kinetischen Verhaltens der Aggregatbildung auf mögliche Keimarten schließen lassen.

2.1.2 Fraktale Aggregationsprozesse

Die folgende Betrachtung berücksichtigt direkt die Teilchenreaktionen auf molekularer Ebene und verwendet dazu einen statistischen Ansatz.

Die Aggregationsphase von Proteinen als erster Schritt zur Bildung von Kristallen ist ein wichtiger Prozeß, der den späteren Kristallisationserfolg und die Güte der daraus entstehenden Kristalle bestimmt. Dieser Prozeß führt zumindest für einige Proteine in dieser Arbeit nicht zu Strukturen, die raumfüllend dicht sind, sondern verläuft unter Bildung von fraktalen Clustern. Dieses Aggregationsverhalten wurde schon für anorganische Kolloide beschrieben und untersucht [31]-[33].

Fraktale Körper bzw. Cluster sind Strukturen, deren Masse - Radius Verhältnis nicht durch eine ganzzahlige Potenz des Radius ausgedrückt werden können. Die fraktale Dimension d_f ist definiert durch

$$\frac{\overline{m(t)}}{m_0} = \left(\frac{\overline{R(t)}}{R_0}\right)^{d_f}. \quad (2.8)$$

Die Größen m_0 und R_0 sind die Masse bzw. der Radius des Monomers am Anfang der Aggregation, $\overline{m(t)}$ und $\overline{R(t)}$ die mittlere Masse und der mittlere Radius des Aggregates zur Zeit t .

Fraktale Körper zeichnen sich durch eine Selbstähnlichkeit aus, d.h. sie sind invariant gegenüber Skalenvariationen. Kolloidale Aggregate zeigen diese Selbstähnlichkeit, so daß sie als fraktale Strukturen beschrieben werden können.

Wie anorganische Kolloide aggregieren auch Proteine in verschiedenen Regimes, die von den Umgebungsparametern abhängen. Diese Regimes unterscheiden sich in der Kinetik des Wachstums der Cluster und bieten die Möglichkeit, Aussagen über die Struktur der Cluster und die weitere Entwicklung in bezug auf den Kristallisationserfolg des Experimentes zu treffen.

Die Struktur dieser Aggregate wird durch ihre Wachstumskinetik identifiziert, definiert nach dem Kernel der Smoluchowski Gleichung. Stark abstoßende Wechselwirkungen reduzieren die Reaktionsgeschwindigkeit und führen zu mehr kompakteren Strukturen mit einer größeren fraktalen Dimension d_f verglichen mit Systemen, bei denen nur schwach abstoßende Wechselwirkungen vorliegen.

Es lassen sich zwei Bereiche unterscheiden: Der langsame kinetische Prozess wird als "reaktionslimitiert" und der schnelle kinetische Prozess als "diffusionslimitiert" beschrieben.

Die diffusionslimitierte Cluster Aggregation (DLCA) zeichnet sich durch eine Anlagerungsrate von nahezu eins aus, d.h. fast jede Kollision zwischen Molekülen bzw. zwischen Molekülen und Clustern führt zu einer Anlagerung. In diesem Fall reicht die thermische Bewegungsenergie der Moleküle aus, um die Energiebarriere zu überwinden, d.h. es gilt $E_B < k_B T$. Hierbei stellt E_B die Energiebarriere zwischen zwei Molekülen, k_B die Boltzmann Konstante und T die absolute Temperatur dar.

Im Regime der reaktionslimitierten Cluster Aggregation (RLCA) wird eine bestimmte kinetische Energie benötigt, um die mittlere Energiebarriere E_B des Gesamtpotentials $W(r)$ zu überwinden, d.h. hier liegt der Fall $E_B \geq k_B T$ vor.

Im Übergangsbereich zwischen diesen Gebieten wird vom "Crossover" (XOVER) - Regime gesprochen.

Die gekoppelte Differentialgleichung von Smoluchowski [34],[35]

$$\frac{\partial N(j,t)}{\partial t} = \frac{1}{2} \sum_{k,l} K(k,l) N(k,t) N(l,t) (\delta_{k+l,j} - \delta_{k,j} - \delta_{l,j}), \quad (2.9)$$

beschreibt die Bildung bzw. die Dissoziation eines Clusters aus j Monomeren, wobei $K(k,l)$ die Geschwindigkeitskonstante der Bildung eines $k+l$ - mers aus Clustern mit k und l Monomeren und $N(j,t)$ die Zahlkonzentration eines j - mers zur Zeit t ist. Nach Smoluchowski hat die obige Differentialgleichung unter der Voraussetzung einer von t und k,l unabhängigen Geschwindigkeitskonstante die explizite Lösung

$$N(j,t) = \frac{(ct)^{j-1}}{(1+ct)^{j+1}}. \quad (2.10)$$

Das DLCA-Regime ist dadurch charakterisiert, daß die mittlere Masse $\overline{m(t)}$ der Cluster linear mit der Zeit zunimmt

$$\overline{m(t)} = m_0(1 + 2c\beta t), \quad (2.11)$$

wobei c folgendermaßen definiert ist:

$$c = \frac{4N_0k_B T}{3\eta}. \quad (2.12)$$

Hierbei ist N_0 die Anzahl der Monomere, k_B die Boltzmann Konstante, T die Temperatur, η die Viskosität der Lösung und β die Anlagerungswahrscheinlichkeit. Da in diesem Regime jedes Teilchen assoziiert, ist die Anlagerungswahrscheinlichkeit β gleich Eins. Mit der mittleren Masse-Radius Relation erhält man für die Wachstumskinetik einen einfachen Zusammenhang

$$\overline{R(t)} = R_0(1 + 2ct)^{1/d_f}. \quad (2.13)$$

Phänomenologisch ausgedrückt bedeutet dies: Je geringer die fraktale Dimension d_f , desto größer ist der Stoßquerschnitt und damit die Stoßrate der Cluster, was sich in einer gesteigerten Aggregation manifestiert.

Eine andere Situation liegt im RLCA - Regime vor: Ein überwiegend abstoßendes Potential verhindert eine Anlagerung bei Teilchen mit nicht ausreichender kinetischer Energie zur Überwindung der Energiebarriere E_B . In der Gleichgewichtskonstanten $K(k,l)$ wird dies berücksichtigt durch die Anlagerungswahrscheinlichkeit β und eine Beschränkung der Anlagerungsstellen, die proportional zur Größe der beteiligten Cluster ist

$$K(k, l) = \frac{1}{2}(k + l)\beta. \quad (2.14)$$

Die mittlere Masse wächst exponentiell mit der Zeit

$$\overline{m(t)} = m_0 \exp(2c\beta \cdot t) \quad (2.15)$$

und für das mittlere Größenwachstum ergibt sich folgende Relation:

$$\overline{R(t)} = R_0 \exp(2c\beta \cdot t). \quad (2.16)$$

Schließlich kann Clusteraggregation auch in einem Regime ablaufen, welches Eigenschaften von beiden DLCA- und RLCA- Regimes besitzt. Dieser Übergang ist das sogenannte XOVER - Regime und kann als eine Verringerung der Ionenatmosphäre betrachtet werden, d.h. der Grad der Abschirmung der Teilchen untereinander wird verändert [36],[37].

Typischerweise zeigt die Aggregation anfangs RLCA - Verhalten, beim Erreichen einer kritischen Größe überwiegt dann der DLCA - Anteil. Und genau hier liegt der Bereich, wo sich wenige größere Kristalle bilden.

In der folgenden Abb.(2.2) sind die Aggregationskinetiken aller drei Regimes qualitativ wiedergegeben.

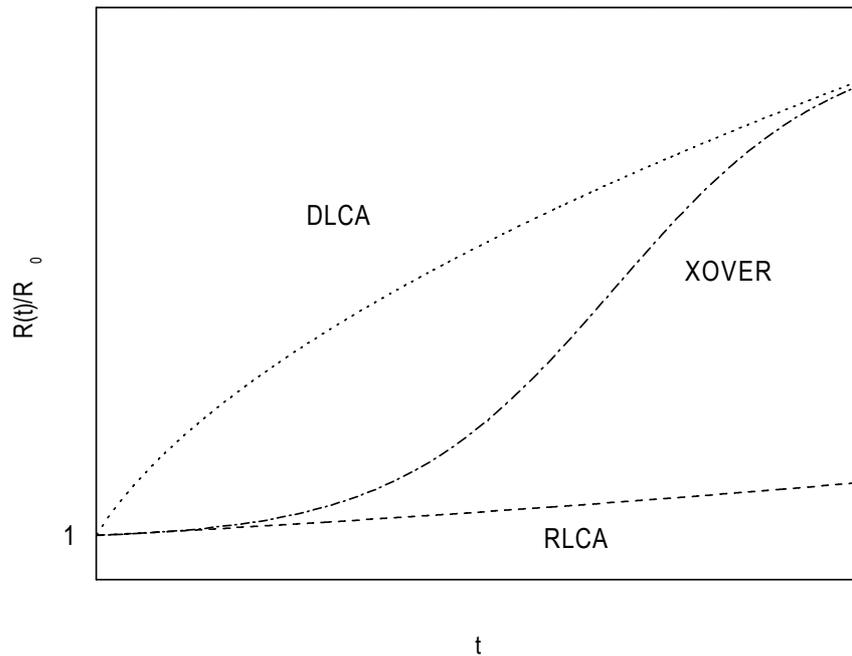


Abb.2.2: Qualitative Verläufe der Bereiche der verschiedenen Aggregationskinetiken

In dem nun folgenden Abschnitt wird die Proteinlösung mit Hilfe eines kolloidalen Systems beschrieben, um einen Einblick in die physikalisch-chemischen Wechselwirkungen von nm-großen Teilchen in Lösung zu bekommen. Dazu wird die Doppelschichttheorie und das daraus resultierende Gesamtwechselwirkungspotential der gelösten Teilchen erläutert. Das Verständnis dient dazu, die erwähnten Aggregationsbarrieren zwischen den wechselwirkenden Proteinen hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens in Zusammenhang zu bringen.

2.2 Grundlagen aus der Kolloidchemie

Die kolloiden Systeme stellen mikroskopisch ein Zweiphasensystem dar, wobei das Lösungsmittel als Kontinuum betrachtet werden kann, das durch seine makroskopischen Größen charakterisiert ist. Die Wechselwirkung der Partikel mit dem Lösungsmittel zeigt sich in der Brown'schen Molekularbewegung, die durch zufällige Stöße der Lösungsmittelmoleküle mit dem Kolloidpartikel hervorgerufen wird.

Die Eigenschaften der Suspension werden durch die Wechselwirkung der Partikel bestimmt. Sie beruht u.a. auf der elektrostatischen Abstoßung der Partikel. Abhängig von deren Stärke entspricht das Verhalten der Partikel dem eines Gas- oder Flüssigkeitsteilchens. Bei sehr starker Wechselwirkung treten dann kristalline oder amorphe Festkörperstrukturen auf.

Dispersionen bezeichnet man als physikalisch stabil, wenn sich ihre Partikelgrößenverteilung im Laufe der Zeit nicht oder nur geringfügig ändert. Bei physikalisch instabilen Dispersionen tritt während der Beobachtungszeit Teilchengrößenwachstum auf.

Zum Verständnis der Struktur und der Dynamik ist es wichtig, die Form des Wechselwirkungspotentials der Kolloidteilchen zu kennen. Mit Hilfe des experimentellen Strukturfaktors, z.B. in Abhängigkeit von der Temperatur, der Ionenstärke und der Konzentration der Kolloidteilchen, sollte das gesuchte Wechselwirkungspotential richtig vorhergesagt werden können [38].

2.2.1 Aufbau der elektrischen Doppelschicht

Als ein System werden in elektrolythaltigem Wasser dispergierte Teilchen betrachtet, die an der Oberfläche dissoziierbare Gruppen besitzen. In Abhängigkeit von der Art der dissoziierbaren Gruppen ist die Oberfläche negativ oder positiv geladen. Bei der Anwesenheit unterschiedlicher funktioneller Gruppen erhält das Teilchen je nach pH-Wert des Dispersionsmediums und daraus resultierender Dissoziation eine pH-abhängig wechselnde Gesamtladung.

Bei protonenabgebenden Gruppen wie Carboxyl- oder Sulfatgruppen erhalten die Partikel eine negative Oberflächenladung. Werden umgekehrt von der Teilchenoberfläche negative Ionen abgegeben, so erhält das Teilchen eine positive Oberflächenladung.

Die im folgenden beschriebene Modellvorstellung von Partikeln in Elektrolytlösungen beschreibt den Aufbau der das Teilchen umgebenden Ionenatmosphäre als Kombination einer fixen mit einer diffusen Schicht, der sogenannten elektrischen Doppelschicht [39]-[41]. Aufgrund der Komplexität kann es auch zur Auflagerung von mehreren Schichten kommen [42].

Die Oberflächenladung eines Moleküls mit einem Oberflächenpotential Ψ_0 , dem sogenannten Nernstpotential, verursacht eine Anreicherung von Gegenionen an der Grenzfläche und der nahen Umgebung. Die Konzentration der Gegenionen kann um mehrere Größenordnungen über der in der Lösung existierenden liegen. Die Konzentration dieser Gegenionen wird allerdings durch deren Eigenvolumen und ihre repulsiven Wechselwirkungen begrenzt.

Es bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus, die man im allgemeinen in zwei Bereiche unterteilen kann. Das Gebiet, in dem es zu einer Sättigung von Gegenionen kommt, heißt Stern-Schicht, und der Bereich, in dem die Verteilung der Ionen, d.h. Gegen- und Co-Ionen der Boltzmann-Statistik gehorcht, wird Gouy-Chapman Schicht, auch diffuse Schicht, genannt. Die Ausdehnung der diffusen Schicht ist gleich dem reziproken Wert des Debye-Hückel Parameters κ , d.h. $1/\kappa$ [43].

Ein positiv geladenes Partikel mit dessen Doppelschicht ist in Abb.(2.3) veranschaulicht. Zur einfachen Verdeutlichung des Sachverhaltes wird der Aufbau dieser Schichten anhand eines dispergierten Partikels mit einer positiven Oberflächenladung beschrieben. Zur besseren Übersichtlichkeit wird ein Dispersionsmedium mit einem 1 : 1- Elektrolyten betrachtet, z.B. NaCl.

Nach Dispergierung der Partikel kommt es zur Adsorption einer Schicht aus negativ geladenen Ionen (Cl^- , Anionen). Diese Adsorptionsschicht wird als Stern-Schicht bezeichnet. Während des Adsorptionsvorganges werden sie fest an die Teilchenoberfläche gebunden. Somit besteht diese Schicht aus fixierten negativen Ionen.

Aufgrund der Hydrathülle und der Größe der Ionen kann nur eine bestimmte Anzahl den unmittelbaren Raum an der Teilchenoberfläche ausfüllen. Daher wird die Nettoladung des Kolloidpartikels nicht vollständig durch Adsorption von negativen Ionen auf der Oberfläche kompensiert. Die restlichen zur Kompensation der positiven Ladungen auf der Teilchenoberfläche erforderlichen Gegen-Ionen (counterions) umgeben das Teilchen als eine diffuse "Wolke".

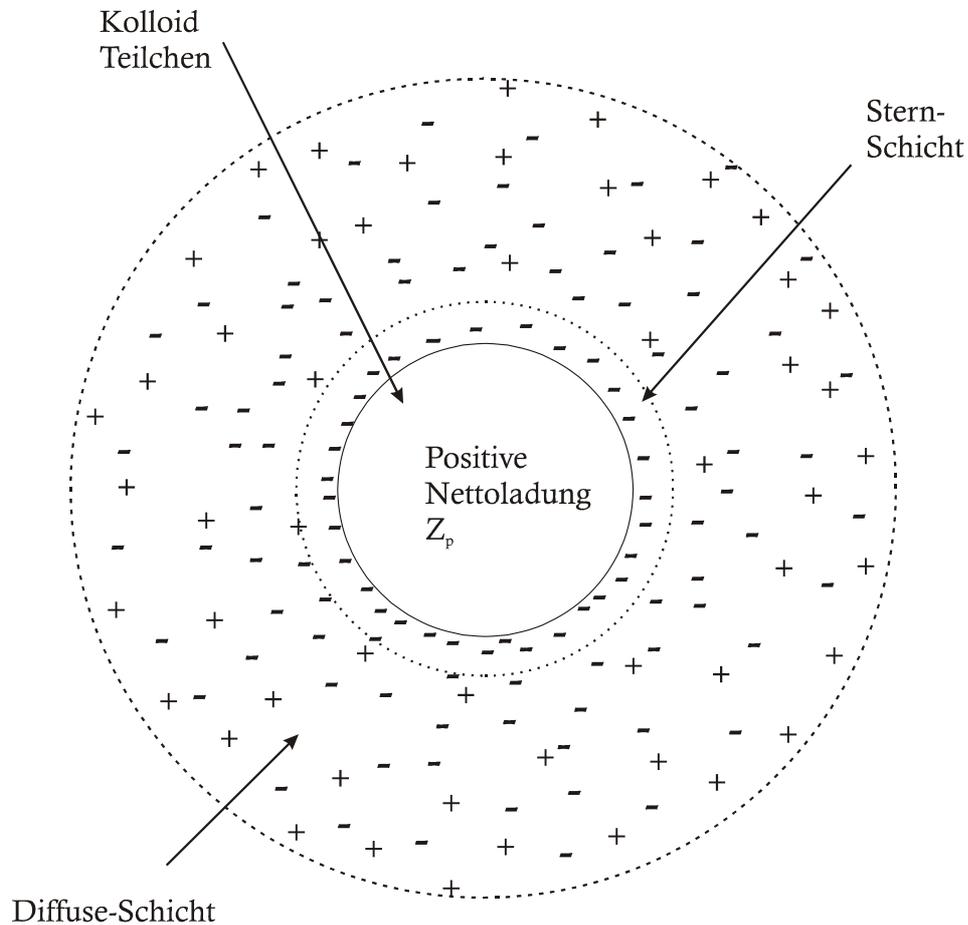


Abb.2.3: Positiv geladenes Kolloidion mit umgebender elektrischer Doppelschicht

In der diffusen Schicht sind die Gegen-Ionen nicht fixiert, sondern frei beweglich und unterliegen der Diffusion. Die Konzentration an negativen Gegen-Ionen ist in geringen Abständen zur Teilchenoberfläche noch hoch. Sie nimmt mit zunehmendem Abstand von der Teilchenoberfläche ab, während gleichzeitig vermehrt positive Ionen auftreten (Na^+ , Kationen). Die Konzentration der positiven Ionen nimmt weiter zu, bis schließlich die Konzentration an positiven und negativen Ionen gleich ist. Der Ladungsausgleich gegenüber der Teilchenoberfläche ist abgeschlossen, die diffuse Schicht endet hier, das Potential ist auf null abgefallen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die diffuse Schicht aus nicht fixierten, hydratisierten und negativen Gegen-Ionen und positiven Ionen (Co-Ionen) besteht, wobei die Konzentration an Gegen-Ionen mit zunehmendem Abstand von der Teilchenoberfläche abnimmt.

Im Gleichgewichtszustand wird die Ionenverteilung durch den Boltzmann-Faktor bestimmt, der das Verhältnis zwischen elektrostatischer Energie $Z_p e \Psi$ und thermischer Energie $k_B T$ eines Ions beschreibt. Somit berechnet sich die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines negativen Gegenions n^-/n_∞ in einem bestimmten Abstand x zu einer positiven Teilchenoberfläche (positives Ψ_0) nach folgender Gleichung:

$$\frac{n^-(x)}{n_\infty} = \exp(-Z_p e \Psi(x)/k_B T) \quad (2.17)$$

mit $n^-(x)$ Konzentration an Gegen-Ionen im Abstand x von der Teilchenoberfläche, n_∞ Konzentration der Gegen-Ionen in unendlicher Entfernung von der Oberfläche, $Z_p e \Psi(x)$ elektrostatische Energie eines Ions im Abstand x von der Teilchenoberfläche, Z_p Wertigkeit des Kolloidions, e Elementarladung, $\Psi(x)$ Potential im Abstand x von der Oberfläche (mV) und k_B Boltzmann-Konstante.

Für die Co-Ionen, d.h. Ionen mit gleicher Ladung wie die Oberfläche der Kolloidteilchen, erhält der Exponent in obiger Gleichung ein positives Vorzeichen, d.h. ihre Konzentration nimmt mit zunehmender Annäherung an die gleichsinnig geladene Oberfläche ab. Oder umgekehrt: Je weiter man sich von der Oberfläche entfernt, desto mehr nimmt die Konzentration an Co-Ionen zu, bis sie am Ende der diffusen Schicht die Konzentration der Gegen-Ionen erreicht ($n^+ = n^- = n_\infty$).

Potentialverlauf im Schichtenmodell

Im vorgenannten Beispiel besitzt das Teilchen eine positive Oberflächenladung. Das positive Potential wird durch die Adsorption von negativen Ionen in der Stern-Schicht gesenkt. Dieses Potential wird als das Sternpotential Ψ_s bezeichnet. Der Potentialabfall ist begrenzt, da die negativen Ionen einen bestimmten Platzbedarf haben. Es gibt eine maximale Besetzung der Schicht.

Der Potentialverlauf in der Stern-Schicht ist linear, da die Ionen hier regelmäßig angeordnet sind. Der weitere Potentialabfall gegen Null erfolgt nun in der diffusen Schicht. Der Potentialabfall in der diffusen Schicht ist im Gegensatz dazu exponentiell, da eine unregelmäßige Verteilung der negativen Gegen-Ionen vorliegt.

Die Konzentration der negativen Gegen-Ionen nimmt mit zunehmendem Abstand von der Teilchenoberfläche in der diffusen Schicht ab, bis schließlich am Ende der diffusen

Schicht die Anzahl der negativen Ionen gleich der Anzahl der positiven ist, d.h. $n^- = n^+$. Der Abfall auf Null findet strenggenommen nicht statt, da sich das Potential bei einem exponentiellen Verlauf Null nur asymptotisch annähert. In Abb.(2.4) ist der beschriebene Potentialverlauf graphisch dargestellt.

Zetapotential ζ und Schichtdicke κ^{-1}

Die diffuse Schicht besteht aus nicht fixierten, beweglichen Ionen und ist somit kein festes, starres Gebilde. Bei der Diffusionsbewegung eines Teilchens kommt es deshalb aufgrund von Reibungskräften zu einem teilweisen Abstreifen der diffusen Schicht. Durch den Verlust eines äußeren Teils der diffusen Schicht fehlen dem Teilchen Gegen-Ionen zur Kompensation der positiven Nettoladung von der Teilchenoberfläche.

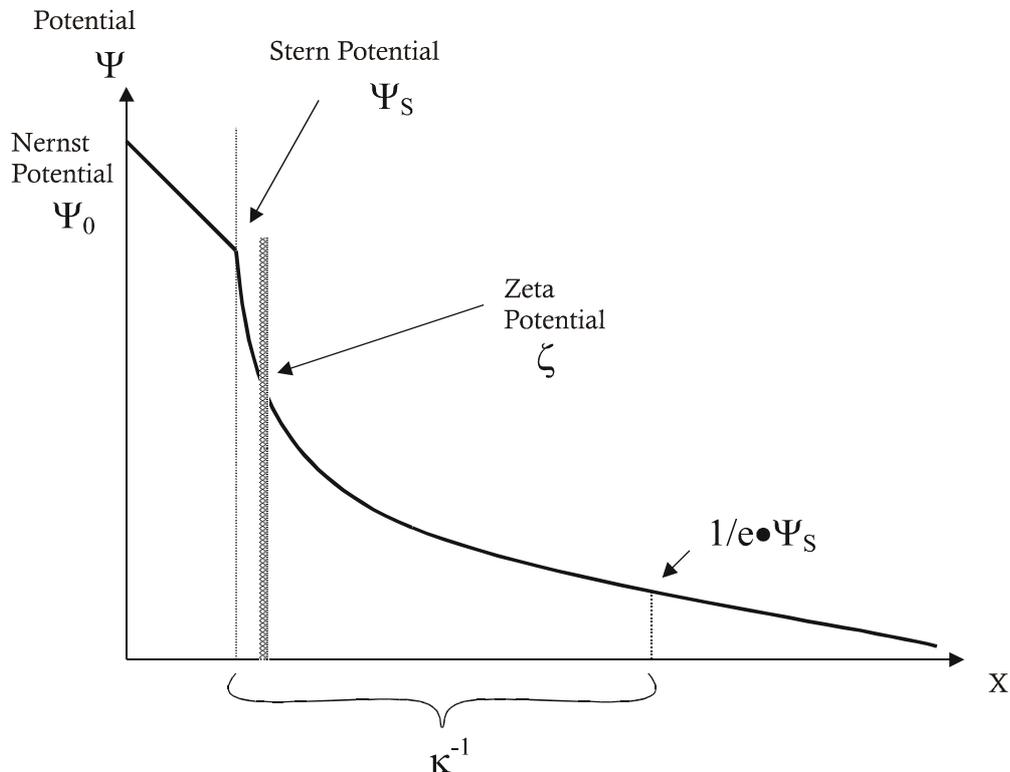


Abb.2.4: Potentialverlauf im Schichtenmodell mit der Definition der Debye-Hückel-Länge

$$1/\kappa$$

Aufgrund des an der Scherebene abgestreiften äußeren Teils der diffusen Schicht ist das Teilchen nach außen hin nicht weiter neutral. Da die für den Potentialabfall zwischen der Scherebene und dem Ende der diffusen Schicht verantwortlichen Gegen-Ionen entfernt wurden, entsteht nun eine wirksame Potentialdifferenz, die nicht mehr ausgeglichen wird. Da im unendlichen das Null-Potential vorliegt, ist das Potential an der Scherebene der diffusen Schicht gleich der Potentialdifferenz und wird als Zetapotential ζ bezeichnet.

Im eigentlichen Sinn ist das Zetapotential als das unter Einwirken eines elektrischen Feldes an der Scherebene meßbare Potential definiert und in der Abb.(2.4) hervorgehoben.

Bei der Diffusionsbewegung abgestreifte Teile der diffusen Schicht bauen sich wieder auf, werden danach jedoch erneut wieder abgestreift. Die äußeren Teile der diffusen Schicht unterliegen somit einem permanenten Ab- und Aufbau, als Relaxationseffekt bezeichnet. Das Abstreifen eines geringen äußeren Teils der diffusen Schicht erklärt auch, warum Partikel, die aufgrund der diffusen Schicht keine Nettoladung tragen, anfangen, in einem elektrischen Feld zu wandern.

Legt man an eine Dispersion mit diffundierenden Teilchen ein elektrisches Feld an, so erfahren die Teilchen eine Beschleunigung auf die entgegengesetzt geladene Elektrode (Anode +, Kathode -). Die Beschleunigung der Teilchen im elektrischen Feld führt zu einer Erhöhung der Teilchengeschwindigkeit. Nach dem Stokes'schen Gesetz ist die auftretende Reibungskraft proportional zur Geschwindigkeit:

$$\mathbf{F}_R = 6\pi R\eta\mathbf{v} \quad (2.18)$$

mit der Reibungskraft \mathbf{F}_R , dem Teilchenradius R , der Viskosität η und der Teilchengeschwindigkeit \mathbf{v} , die der Bewegung des Teilchens entgegengerichtet ist.

Bei ausreichend hoher Teilchengeschwindigkeit \mathbf{v} in einem ausreichend starken elektrischen Feld E wird schließlich nahezu die gesamte diffuse Schicht gestreift. Ein Abstreifen der Stern-Schicht ist nicht möglich, da die Ionen in der Stern-Schicht im Gegensatz zur diffusen Schicht fest fixiert (adsorbiert) sind. Von der diffusen Schicht bleibt ebenfalls noch ein sehr dünner restlicher Film erhalten, da die Hydrathülle der Sternschicht diesen Teil vor dem Abstreifen schützt.

Erreicht aufgrund der steigenden Teilchengeschwindigkeit die Reibungskraft die Größe der beschleunigenden Kraft

$$\mathbf{F}_E = Q\mathbf{E} = Z_p e\mathbf{E} \quad (2.19)$$

des elektrischen Feldes, d.h. $\mathbf{F}_R = \mathbf{F}_E$, so geht die beschleunigte Bewegung des Teilchens in eine konstante Teilchengeschwindigkeit über. Hierbei bezeichnet Q die Oberflächenladung und Z_p die Ladungszahl, d.h. die Anzahl der Elementarladungen e , des gelösten Partikels.

Das Potential an der Scherebene nach Abstreifen der diffusen Schicht ist das in der elektrophoretischen Messung bestimmte Zetapotential ζ . Aufgrund der Teilchengeschwindigkeit \mathbf{v} im elektrischen Feld E kann das an der Scherebene wirksame Potential berechnet werden.

Aus räumlichen Gründen gibt es eine Begrenzung in der Anzahl der Ladungen, die pro Flächeneinheit auf einem Teilchen vorhanden sein können. Demzufolge gibt es je nach Platzbedarf der vorhandenen dissoziierten Oberflächengruppen einen Maximalwert für das Nernst-Potential Ψ_0 . Da die Anzahl der zu adsorbierenden Ionen in der Stern-Schicht aus räumlichen Gründen ebenfalls begrenzt ist, ergibt sich für das Sternpotential Ψ_s bzw. Zetapotential ζ ebenfalls ein maximal möglicher Wert.

In Abhängigkeit vom chemischen Charakter der geladenen Gruppen an der Oberfläche sowie der adsorbierten Ionen in der Stern-Schicht werden maximale Zetapotentiale im Bereich von ca. $+100mV$ oder $-100mV$ gemessen.

Die Dicke der diffusen Schicht ist gleich dem reziproken Wert des Debye-Hückel-Parameters κ :

$$\kappa = \left[\frac{2e^2}{\varepsilon k_B T} I \right]^{1/2}. \quad (2.20)$$

Hierbei ist I die Ionenstärke mit $I = \frac{1}{2} \sum_i Z_i^2 n_i$, wobei Z_i die Wertigkeit und n_i die Anzahldichte von Gegen-Ionen in Lösung ist, e die Elementarladung, ε die Dielektrizitätskonstante, T die absolute Temperatur und k_B die Boltzmann Konstante.

Die Debye-Hückel-Länge κ^{-1} wird aus der linearisierten Poisson-Boltzmann Differenzialgleichung

$$\nabla^2 \Psi = \kappa^2 \Psi \quad (2.21)$$

für $\Psi_0 \ll k_B T / e$ abgeleitet. Hierbei ist ∇ der Nabla Operator [44].

Der Debye-Hückel Parameter ist abhängig von der Konzentration der im Dispersionsmedium vorhandenen Ionen, der Ladungszahl dieser Ionen (Wertigkeit) sowie der Dielektrizitätskonstanten ε des Dispersionsmediums. D.h. mit zunehmender Konzentration eines Elektrolyten oder bei gleicher Elektrolytkonzentration mit steigender Wertigkeit der Gegen-Ionen nimmt die Dicke der diffusen Schicht ab.

Für ein Teilchen z.B. mit einer positiven Nettoladung bzw. einem positiven Oberflächenpotential verringert sich die Dicke der diffusen Schicht vom 1:1 zum 1:2 und 1:3 Elektrolyten, also mit steigender Wertigkeit der Anionen.

Mit steigender Elektrolytkonzentration oder steigender Wertigkeit der Gegen-Ionen wird der Potentialabfall in der diffusen Schicht immer steiler. Das gemessene Zetapotential nimmt ab, die Differenz zwischen Zetapotential und Sternpotential nimmt dementsprechend zu.

Nach der beschriebenen Doppelschicht eines gelösten Teilchens, wird auf die davon abhängige Wechselwirkung zwischen den Partikeln eingegangen [45]-[48].

2.2.2 Teilchenwechselwirkungen in Lösung

Unabhängig vom Vorzeichen bewirkt eine höhere gleichsinnige Ladung eine höhere Abstoßung und damit Stabilität von Dispersionen, d.h. um den Proteinen ein Kristallwachstum zu ermöglichen, muß diese Abstoßung soweit verringert werden, daß die Potentialbarriere überwunden werden kann. Auf Moleküle und Cluster in Lösung wirken unterschiedliche Kräfte ein. Stöße mit Lösungsmittelmolekülen, die thermische Bewegungsenergie aufweisen, sowie elektrostatische und hydrodynamische Wechselwirkungen der gelösten Stoffe untereinander und mit dem Lösungsmittel spielen eine Rolle.

Als Brown'sche Bewegung bezeichnet man Bewegungen von Makromolekülen oder Clustern in Lösung, die durch Stöße der großen Teilchen mit den kleinen Lösungsmittelmolekülen hervorgerufen werden. Hierbei kommt es zu größeren Raumverschiebungen, je geringer die Masse bzw. der Radius der Makromoleküle ist, da die übertragene kinetische Energie konstant bleibt. Der Vorgang des Ortswechsels von Teilchen wird Diffusion genannt. Die Bewegung eines Partikels in einer Umgebung von gleichartigen Partikeln wird als Selbst- oder Eigendiffusion und die Bewegung in einem andersartigen Stoff, wie das Protein in wäßriger Lösung, als Fremddiffusion bezeichnet.

Die Theorie der Brown'schen Bewegung liefert für das mittlere Verschiebungsquadrat

$$\langle (r(\tau) - r(0))^2 \rangle = 6D\tau, \quad (2.22)$$

wobei D der translatorische Diffusionskoeffizient und τ die betrachtete Verschiebungszeit ist.

Der Diffusionskoeffizient D einer verdünnten monodispersen Lösung mit der Teilchenzahlkonzentration n und der Volumenfraktion Φ kann mit der allgemeinen Stokes-Einstein Relation [49]

$$D = \frac{(\partial\Pi/\partial n)_{P,T}}{f(n)}(1 - \Phi) \quad (2.23)$$

beschrieben werden. Hierbei ist Π der Osmotische Druck und $f(n)$ der Reibungskoeffizient der Teilchen. Die weitere Betrachtung bezieht sich auf kugelförmige Partikel mit dem Radius R , da es bisher noch keine Theorie gibt, die von der Kugelform abweicht, weder für kugelförmige Körper mit verschiedenen Radien (polydisperses System) darstellt, noch für verschiedene Partikelformen. Somit ergibt sich folgende Beziehung zwischen Φ und n

$$\Phi = \frac{4}{3}\pi R^3 n. \quad (2.24)$$

Der Faktor $(\partial\Pi/\partial n)_{P,T}$ wird als thermodynamischer Term bezeichnet, da der osmotische Druck Π aus dem chemischen Potential abgeleitet werden kann. In einer verdünnten Lösung läßt sich Π bezüglich der Zahlkonzentration n zu

$$\Pi = k_B T(n + B_2 n^2 + O(n^3)) \quad (2.25)$$

mit der Boltzmann Konstanten k_B , der absoluten Temperatur T und dem zweiten Virialkoeffizienten B_2 entwickeln. $O(n^3)$ beschreibt die Ordnung der Entwicklung.

Der Einfluß des Lösungsmittels auf den Diffusionskoeffizienten spiegelt sich in der Teilchenbeweglichkeit μ wider, was dem Ausdruck $(1 - \Phi)/f(n)$ entspricht. Dieser Parameter läßt sich ebenfalls in eine Reihe bezüglich des Volumenanteils entwickeln

$$\mu = \frac{(1 - \Phi)}{f(n)} = \frac{1}{6\pi\eta R}(1 + K_h\Phi + O(\Phi^2)), \quad (2.26)$$

wobei η die Scherviskosität und K_h die hydrodynamische Korrektur 1.Ordnung mit der Ordnung $O(\Phi^2)$ beschreibt.

Mit beiden Näherungen wird nun für den Diffusionskoeffizienten die lineare Form zu

$$D = D_0[1 + (K_t + K_h)\Phi] \quad (2.27)$$

berechenbar.

Hier ist die thermodynamische Korrektur 1.Ordnung mit

$$K_t = 2B_2/\left(\frac{4}{3}\pi R^3\right) \quad (2.28)$$

bereits enthalten. D_0 ist der Diffusionskoeffizient für unendliche Verdünnung, was einem wechselwirkungsfreien System entspricht. Für D_0 ist folgender Zusammenhang aus der Stokes-Einstein-Gleichung [50] mit

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (2.29)$$

bekannt. Solange die Wechselwirkungen vernachlässigt werden können, läßt sich der hydrodynamische Radius der Teilchen aus dem gemessenen Diffusionskoeffizienten mit der Boltzmann Konstanten k_B , der absoluten Temperatur T , der Viskosität der Lösung η und dem hydrodynamischen Radius R der diffundierenden Teilchen berechnen.

Bei diesem Diffusionskoeffizienten handelt es sich um einen extrapolierten Wert für unendliche Verdünnung. Die Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten resultiert aus den Wechselwirkungen der gelösten Teilchen untereinander.

Unter elektrostatischen Wechselwirkungen versteht man Coulomb'sche Kräfte mit langer Reichweite, die aus Nettoladungen der Moleküle resultieren, wie auch Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Kräfte, die eine kurze Reichweite haben. Für die Aggregation von Proteinen sind weiterhin hydrophobe Wechselwirkungen von Bedeutung, die auf der Abstoßung von Wassermolekülen von der Oberfläche beruhen und entropischer Art sind.

Sie beeinflussen die Brown'sche Bewegung der Teilchen in der Weise, daß abgesehen von Stößen der Teilchen mit Lösungsmittelmolekülen Kräfte auf die Moleküle wirken, die durch ihre Ladungen und durch die umgebenden Ionen bestimmt werden.

Zunächst wird mit Hilfe thermodynamischer Betrachtungen der Koeffizient K_t mit dem Wechselwirkungspotential $W(r)$ in Zusammenhang gebracht. Das Potential $W(r)$ beschreibt die Wechselwirkung zweier gelöster Teilchen in Lösung, die sich in einem Abstand r (jeweils vom Massenmittelpunkt gemessen) voneinander befinden:

$$K_t = \frac{3}{R^3} \int_0^\infty r^2 \{1 - \exp[-W(r)/k_B T]\} dr. \quad (2.30)$$

Das Wechselwirkungspotential $W(r)$ besteht im Allgemeinen aus drei Anteilen:

(i) einer Harte-Kugel Abstoßung W_{HK} mit

$$\begin{aligned} W_{HK}(r) &= 0 \text{ für } r \geq 2R \\ W_{HK}(r) &= \infty \text{ für } r < 2R \end{aligned} \quad (2.31)$$

(ii) einer elektrostatischen Abstoßung W_{AB} zwischen gleichsinnig geladenen Makromolekülen und der van der Waals Anziehung W_{AN} . Zusätzliche elektrostatische Kräfte zwischen gelösten Teilchen und Lösungsmittelmolekülen sind implizit in W_{AB} enthalten.

Zur Vereinfachung wird das Harte-Kugel Potential von dem gesamten Wechselwirkungspotential separiert und als

$$W(r) = W_{AB}(r) + W_{AN}(r) \quad (2.32)$$

definiert. Weiterhin läßt sich mit

$$x = (r - 2R)/2R \quad (2.33)$$

eine dimensionslose Form für den Korrekturkoeffizienten K_t angeben:

$$K_t = 8 + 24 \int_0^\infty (1+x)^2 \{1 - \exp[-W(x)/k_B T]\} dx. \quad (2.34)$$

Der konstante Term (+8) resultiert aus der Harte-Kugel Abstoßung, der in der linearisierten Diffusionsgleichung zu einer Erhöhung des Diffusionskoeffizienten bezüglich der Teilchenkonzentration führt.

Mit Hilfe von komplizierten hydrodynamischen Theorien (Smoluchowski-Gleichung) läßt sich unter Berücksichtigung von Rückströmungseffekten in der Lösung für den hydrodynamischen Korrekturkoeffizienten K_h ebenfalls eine dimensionslose Form angeben:

$$K_h = -HK - \int_0^\infty F(x) \{1 - \exp[-W(x)/k_B T]\} dx. \quad (2.35)$$

Hierbei hat Felderhof die folgenden Beziehungen ermittelt [51],[52]:

$$HK = 6,44 \text{ und} \quad (2.36)$$

$$F(x) = 12(1+x) - \frac{15}{8}(1+x)^{-2} + \frac{27}{64}(1+x)^{-4} + \frac{75}{64}(1+x)^{-5}. \quad (2.37)$$

Eine weitere Lösung wurde von Batchelor gefunden [53],[54]:

$$HK = 6,55 \text{ und} \quad (2.38)$$

$$F(x) = 11.89(1+x) + 0.706 - 1.69(1+x)^{-1}. \quad (2.39)$$

Unter Berücksichtigung beider Ergebnisse läßt sich ein mittlerer Wert für den Einfluß des Harte-Kugel Potentials in der Diffusionsgleichung zu 1,505 berechnen. Dieser Wert

verdeutlicht den relativ kleinen Effekt der Undurchdringbarkeit (excluded volume) der Teilchen:

$$D = D_0(1 + 1.505 \cdot \Phi). \quad (2.40)$$

Im folgenden wird der Wechselwirkungsparameter λ mit dem Wechselwirkungspotential $W(x)$ in Beziehung gebracht. Die Gesamterscheinung der thermodynamischen und hydrodynamischen Wechselwirkungen der Partikel untereinander und mit den Lösungsmittelmolekülen werden als erste Näherung in dem Wechselwirkungsparameter λ erfaßt:

$$\lambda = K_t + K_h. \quad (2.41)$$

Dies führt zu folgendem Ausdruck für den Wechselwirkungsparameter λ :

$$\lambda = (8 - HK) + \int_0^\infty [24(1+x)^2 - F(x)] \{1 - \exp[-W(x)/k_B T]\} dx, \quad (2.42)$$

mit den entsprechenden Berechnungen für HK sowie $F(x)$. Dieser gesamte Ausdruck wird zur Anpassung des Gesamtpotentials an die Meßwerte für den Wechselwirkungsparameter λ verwendet [55].

Die Anwendung der obigen linearisierten Diffusionsgleichung auf eine Suspension erfordert die Bestimmung des Wechselwirkungspotentials $W(x)$. Das System wird zur Vereinfachung aus gleichartigen, harten und kugelförmigen Teilchen mit einem Radius R und mit einer Nettoladung

$$Q = Z_p e = \sigma \cdot 4\pi R^2 \quad (2.43)$$

beschrieben, wobei eine konstante Ladungsdichte σ vorausgesetzt wird. Dieses Modell basiert auf der Theorie von Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek (DLVO), um die Stabilität von kolloidalen Systemen beschreiben zu können [56],[57].

Diese sogenannte DLVO-Theorie basiert auf dem Wechselspiel von anziehenden und abstoßenden Kräften. Das Gesamtpotential besteht aus dem elektrostatischen Abstoßungspotential W_{AB} , welches von langer Reichweite ist, und aus dem Anziehungs- oder auch van der Waals-Potential W_{AN} , welches kurzreichweitig ist [58].

Der genaue funktionale Zusammenhang für die Abstoßungsenergie $W_{AB}(x)$ hängt ab von der Größe der Teilchen R und dem Grad der Abschirmung jedes Teilchens, der durch die Ionenstärke des Lösungsmittels beeinflußt wird. Die Abschirmung wird durch die Debye-Hückel-Länge κ^{-1} beschrieben.

In der DLVO-Theorie lassen sich zwei Grenzfälle für $W_{AB}(x)$ in Abhängigkeit von der Relation κR in analytischer Form angeben [59],[60]:

(i) Für $\kappa R \ll 1$:

$$W_{AB}(x) = \Psi_{DH}^2 4\pi\epsilon R \frac{\exp(-2\kappa R x)}{2(1+x)} \quad (2.44)$$

mit dem Debye-Hückel-Potential Ψ_{DH} des geladenen Teilchens, was in erster Näherung dem Oberflächenpotential Ψ_0 entspricht. Die zugehörige Gleichung lautet

$$\Psi_{DH} = \Psi_0 = \frac{Z_p e}{4\pi R \epsilon (1 + \kappa R)}, \quad (2.45)$$

wobei Z_p die Zahl der Nettoladungen auf der Oberfläche des Teilchens und R der Teilchenradius ist.

(ii) Für $\kappa R \gg 1$:

$$W_{AB}(x) = \frac{\Psi_0^2 4\pi\epsilon R}{2} \ln[1 + \exp(-2\kappa R x)] \quad (2.46)$$

mit dem Oberflächenpotential des geladenen Teilchens

$$\Psi_0 = \left(\frac{2k_B T}{e}\right) \sinh^{-1}\left(\frac{Z_p e^2}{8\pi R^2 \kappa \epsilon k_B T}\right). \quad (2.47)$$

(\sinh^{-1} ist die Umkehrfunktion vom \sinh).

Für die Lysozym-Messungen ist der Bereich $2 \leq \kappa R \leq 10$ mit $R \approx 2nm$ relevant.

Eine weitere Gleichung, die die elektrostatische Wechselwirkungsenergie zwischen zwei gleichsinnig geladenen Teilchen mit dem Radius R beschreibt, jedoch allgemeingültiger ist, lautet nach Lagaly [61]

$$W_{AB}(x) = \frac{R}{Z^2} \frac{4\pi\epsilon}{2} \frac{16(k_B T)^2}{e^2} \gamma^2 \exp(-2\kappa R x), \quad (2.48)$$

wobei diese Näherung nur für symmetrische Elektrolyte gilt. Es bedeutet Z die Wertigkeit der Ionen, ϵ die Dielektrizitätskonstante ($\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$), $k_B T$ die thermische Teilchenenergie, e die Elementarladung und κ der Debye-Hückel-Parameter. Insbesondere gilt

$$\gamma = \left(\exp\left(\frac{Ze\Psi_0}{2k_B T}\right) - 1\right) / \left(\exp\left(\frac{Ze\Psi_0}{2k_B T}\right) + 1\right) \quad (2.49)$$

mit dem Oberflächenpotential Ψ_0 . $Ze\Psi_0$ beschreibt die elektrostatische Energie eines Ions auf der Teilchenoberfläche (elektrische Arbeit).

Bei all den obigen Gleichungen für die Abstoßungspotentiale ist eigentlich mit Ψ_0 das Sternpotential Ψ_s und nicht das wirkliche Oberflächenpotential gemeint. Die Herleitungen

beruhen auf dem Gay-Chapman Modell und berücksichtigen nicht die Stern-Schicht, da sich die Debye-Hückel-Länge κ^{-1} nur auf die Dicke der diffusen Schicht bezieht.

Somit wird bei Zetapotential-Messungen annähernd dieses gemeinte Oberflächenpotential Ψ_s in den Gleichungen gemessen und kann durch das Zetapotential ζ ersetzt werden. Nur bei genügend niedrigkonzentrierten Elektrolytlösungen ($< 10^{-6}$ M) wird dadurch das Nernstpotential Ψ_0 erfaßt. Daher kann auch nur bei geringen Elektrolytkonzentrationen das gemessene Zetapotential zur Berechnung der Oberflächenladung korrekt herangezogen werden.

Letztlich wird für den anziehenden Anteil im Wechselwirkungspotential der London-van der Waals [62] Ausdruck verwendet, welcher von Hamaker [63] zu

$$W_{AN}(x) = -\frac{A_H}{12}[(x^2 + 2x)^{-1} + (x + 1)^{-2} + 2 \ln\left(\frac{x^2 + 2x}{(x + 1)^2}\right)] \quad (2.50)$$

abgeleitet wurde. Dabei wird die Stärke der Anziehung durch die Hamaker Konstante A_H bestimmt, welche von der Art und dem umgebenden Medium abhängt. Der Bereich der Hamaker Konstanten liegt bei Raumtemperatur zwischen 10^{-21} und 10^{-19} J. In erster Näherung ist A_H vom Elektrolytgehalt der Dispersion und dem Abstand der Teilchen unabhängig.

In der folgenden Abb.(2.5) sind die einzelnen Anteile sowie der Gesamtpotentialverlauf in Abhängigkeit von κR mit der sich ändernden Potentialbarriere qualitativ wiedergegeben.

Bei einer niedrigen Ionenstärke der Lösung, d.h. $\kappa R \ll 1$, beherrschen die abstoßenden Coulomb Kräfte langer Reichweite die Wechselwirkungen, die anziehenden van der Waals Kräfte werden vollständig abgeschirmt. Unter diesen Verhältnissen wird es zu keiner Aggregation kommen, da die Teilchen eine zu große Potentialbarriere E_B bei der Annäherung überwinden müssen.

Bei hoher Ionenstärke der Lösung, also $\kappa R \gg 1$, wird die das Teilchen umgebende Ionen-schicht verdichtet und die anziehenden Kräfte kurzer Reichweite bestimmen die Wechselwirkung. Diese Bedingungen können ein Potential bewirken, bei dem in einem bestimmten Molekülabstand anziehende Kräfte überwiegen. Wenn die Potentialbarriere E_B überwunden ist, kann es zu einer Anlagerung kommen.

Nachdem das Grundgerüst für das theoretische Verständnis der möglichen Proteinaggregationsprozesse in erster Näherung gelegt ist, wird auf die theoretische Meßwerterfassung zur

Untersuchung der obigen Problemstellung eingegangen. Das Fundament liefert die Laserspektroskopie und im speziellen die Lichtstreuung, die den optischen Wellenlängenbereich mit abdeckt [64].

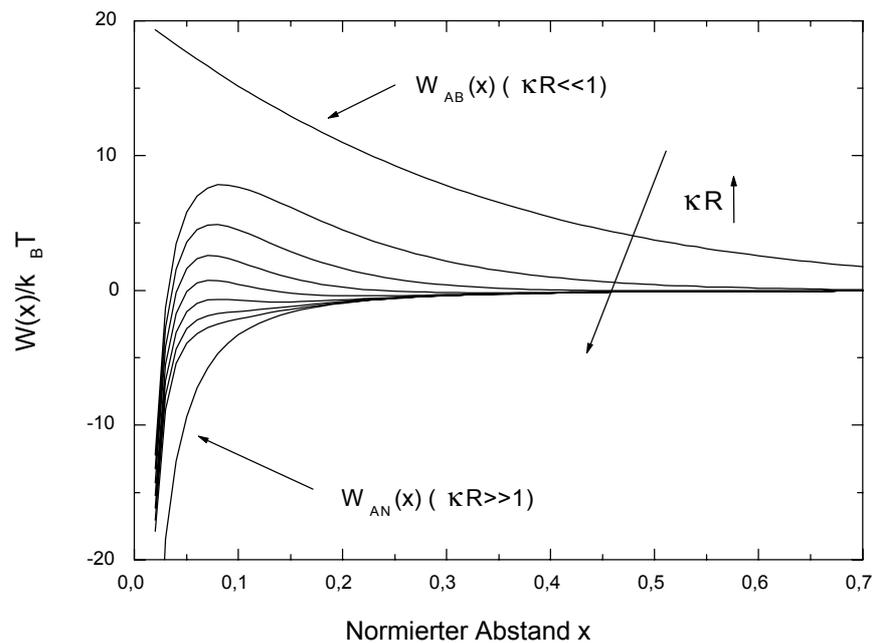


Abb.2.5: Qualitativer Verlauf des berechneten DLVO-Potentials als erste Näherung zur Beschreibung der Teilchenwechselwirkungen

2.3 Zur Theorie der Lichtstreuung

Streuung beruht auf der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein Atom oder Molekül, so kommt es je nach Größe und anderen Eigenschaften des Teilchens und der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes zu unterschiedlichen Wechselwirkungen. Liegt die Anregungsfrequenz über oder unter der Resonanzfrequenz des Streuers, wird in den Teilchen ein schwingender Dipol mit der Frequenz des eingestrahnten Lichtes induziert.

Es kann sich dabei um feste Teilchen oder um eine flüssig disperse Phase im gasförmigen Medium (Aerosol), feste Teilchen in Flüssigkeiten (Suspensionen), um nicht in beliebigen Verhältnissen mischbare Flüssigkeiten (Emulsionen) oder um transparente amorphe Festkörper wie z.B. Glas handeln [65].

Das bekannteste Beispiel ist sicherlich der Tyndall-Effekt (1869), der an kolloidal verteilten Partikeln auftritt: Fällt ein weißer Lichtstrahl auf eine Küvette mit klarem Wasser, das z.B. mit einem Tropfen Milch versetzt ist, so leuchtet dieses senkrecht zum Lichtstrahl bläulich auf und in Durchsicht erscheint das Licht rötlich.

Der Begriff Streuung ist eigentlich ein Sammelbegriff für verschiedene physikalische Phänomene wie Brechung, Beugung, Reflexion, die einen Lichtstrahl von seinem geometrisch vorgeschriebenen Weg ablenken und möglicherweise auch seine Wellenlänge verändern. Im letzteren Fall sprechen wir von inelastischer Streuung. Tritt jedoch keine Wellenlängenänderung auf, spricht man von elastischer Streuung.

Da im wesentlichen der sichtbare Wellenlängenbereich beschrieben wird, wird allgemein von Lichtstreuung gesprochen [66], [67].

Bei der Raman-Streuung als ein inelastischer Streuprozess werden aufgrund von Wechselwirkungen mit Schwingungsquanten eines streuenden Moleküls typische Frequenzverschiebungen von 10^{11} bis 10^{13} Hz (sichtbares Licht ca. 10^{14} Hz) beobachtet.

Auch Schallwellen können zu Streueffekten führen, diese Streuung wird nach dem französischen Physiker Brillouin-Streuung genannt. Diese werden durch normale thermische Molekülschwingungen angeregt; sind damit hochfrequent und liegen im Bereich von 10^8 bis 10^{10} Hz.

Aufgrund von Dopplerverschiebungen beobachtet man noch geringere Frequenzverschiebungen bei der Wechselwirkung von Licht mit Translations- oder gar Rotationsbewegungen von Molekülen und Partikeln: 10 bis 10^6 Hz. Man spricht dabei von quasielastischer Lichtstreuung. Während man bei der elastischen Streuung den zeitlichen Mittelwert der Streuintensität mißt, daher statische Lichtstreuung, interessieren bei der quasielastischen Streuung die zeitlichen Intensitätsvariationen, weshalb man hierbei auch von dynamischer Lichtstreuung spricht.

Die Lichtstreuung hängt primär vom Verhältnis der Lichtwellenlänge λ zur Partikelgröße mit dem Radius R ab, aber erst sekundär ist sie von Art und Form der streuenden Partikel abhängig.

Durch die Brown'sche Bewegung der Moleküle erfährt das Streulicht eine geringe Doppler-Verbreiterung. Diese Verbreiterung ist im Vergleich zur eingestrahnten Frequenz durch die geringe Geschwindigkeit der Teilchen sehr klein.

Weiterhin wird vereinfachend davon ausgegangen, daß die Konzentration der Probe so gering ist, daß es im Mittel nur zu einem einzigen Streuvorgang kommt. Die mittlere Streulänge, welche der mittlere Abstand zwischen zwei Streuprozessen ist, sei also deutlich größer als die durchstrahlte Probendicke. Es wird also Vielfachstreuung ausgeschlossen.

Statische Laser Lichtstreuung (SLS)

Entsprechend der Teilchengröße R unterscheidet man in Relation zur Lichtwellenlänge λ verschiedene Streubereiche:

(i) Die Rayleigh-Streuung zwischen $R = 0,5nm$ bis $\lambda/20$. Hier ist das gestreute Licht unabhängig von der Struktur des Streuzentrums, und die Phase der Welle ändert sich über die Dimension des Streuzentrums nur geringfügig. Das Streuzentrum wird durch die elektromagnetische Welle polarisiert und die lokal beschleunigten Ladungen strahlen ein Streufeld mit Dipolstrahlungscharakteristik ab (Rayleigh 1871,1881[68]).

(ii) Die Rayleigh-Gans-Debye-Streuung zwischen $\lambda/20$ bis $\lambda/6$. Hier wird nicht eine einheitliche Polarisierung über das Streuvolumen angenommen, sondern es werden infinitesimale Volumenelemente mit unterschiedlichen Dipolmomenten berücksichtigt. Das Gesamtstreufeld wird als Superposition der Einzelbeiträge berechnet. (Debye 1915, Gans 1925).

(iii) Die Mie-Streuung zwischen $\lambda/6$ bis 4λ . Diese liefert eine Theorie zur Streuung, die eine exakte Lösung des Randwertproblems für kugelförmige Teilchen mit komplexem Brechungsindex auf der Grundlage der Maxwell'schen Feldgleichungen darstellt. Streuung an Teilchen, deren Brechungsindex nicht konstant über das Volumen ist, kann damit näherungsweise behandelt werden (Mie 1908).

(iv) Schließlich die Fraunhofer-Streuung von 4λ bis hinauf in den mm -Bereich.

Durch Messung der Winkelabhängigkeit des Streulichts lassen sich die folgenden statischen Eigenschaften des Makromoleküls bestimmen: Molekulargewicht, Gyrationradius, Molekülform (Formfaktor) und der zweite Virialkoeffizient, der in erster Näherung ein Maß

für die Stärke der Wechselwirkung der Moleküle ist, und vom Gesamtsystem die Struktur, d.h. der statische Strukturfaktor.

Dynamische Laser Lichtstreuung (DLS)

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), auch als dynamische bzw. quasielastische Lichtstreuung (DLS, QELS) bezeichnet, ist eine Lichtstremethode, die zwischen der statischen und der inelastischen Lichtstreuung einzuordnen ist. Bei der DLS findet kein Energieübertrag zwischen einfallender Lichtwelle und Streuzentrum statt, sodaß es nicht zu intrinsischen Anregungen oder Relaxationen im Streuzentrum kommt.

Allerdings erfährt monochromatisch eingestrahktes Laserlicht eine Dopplerverbreiterung, die zurückzuführen ist auf die Brownsche-Bewegung der Teilchen in Lösung. Im Vergleich zur Frequenz des verwendeten Lasers ($6 \cdot 10^{14} Hz$) liegt die resultierende Linienbreite im kHz -Bereich und kann deshalb nicht durch Filter- oder Interferometrie-Methoden aufgelöst werden [69].

Durch zeitliche Auflösung der Streulichtfluktuationen lassen sich die folgenden dynamischen Eigenschaften bestimmen: Translationsdiffusionskoeffizient, sowie interne (intramolekulare) Bewegungen des Makromoleküls.

Elektrophoretische Laser Lichtstreuung (ELS)

Die Laser-Doppler-Elektrophorese (LDE) ist ein Sonderfall der Laser-Doppler-Anemometrie (LDA). Dieses laseroptische Meßverfahren dient der berührungslosen Messung von Strömungsgeschwindigkeiten, die auch als Laser-Doppler-Velocimetry (LDV) bekannt ist. In diesem Fall, d.h. es findet eine erzwungene Teilchenbewegung aufgrund eines äußeren elektrischen Feldes statt, wird von elektrophoretischer Lichtstreuung gesprochen. Sie gehört in den Bereich der quasielastischen Lichtstreuung [70].

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird der Gleichgewichtszustand der zu untersuchenden Systeme nicht verändert, d.h. die Messungen sind nicht-invasiv, wogegen in der elektrophoretischen Lichtstreuung eine kontrollierte Störung vorliegt. Dadurch ist die elektrophoretische Beweglichkeit von geladenen Teilchen meßbar.

2.3.1 Elastische Lichtstreuung

Das Streulicht, welches durch Einfall eines Lichtstrahles in einem Streumedium entsteht, ist ein elektromagnetisches Feld. Das Verhalten dieses elektromagnetischen Feldes wird durch die Maxwellgleichungen, die das Fundament der klassischen Elektrodynamik bilden, bestimmt [44].

Ein elektromagnetisches Feld kann mathematisch dargestellt werden in der Form

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0 \exp(i(\mathbf{k}_0 \mathbf{r} - \omega_0 t)), \quad (2.51)$$

wobei $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ die elektrische Feldstärke am Ort \mathbf{r} zur Zeit t , \mathbf{E}_0 die komplexe Amplitude des elektrischen Feldes, \mathbf{k}_0 der Wellenzahlvektor und ω_0 die Kreisfrequenz ist. Fällt diese Strahlung in ein Medium ein und regt in diesem einen elektrischen Dipol zum Schwingen an, so spricht man von Streuung.

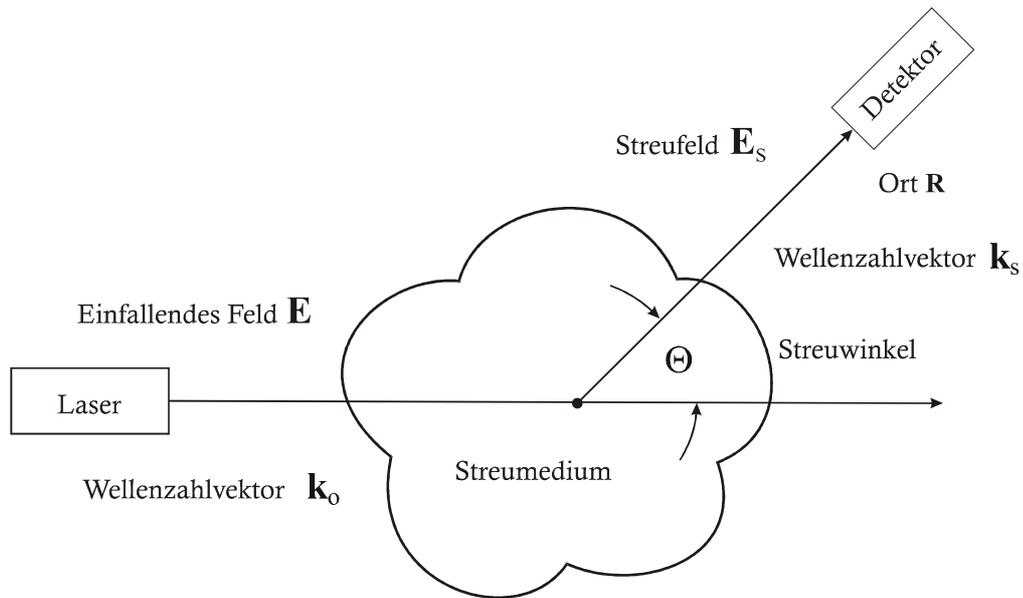


Abb.2.6: Schematische Darstellung der Streugeometrie.

Die Polarisation eines Mediums ist gegeben durch

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \underline{\alpha}(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \quad (2.52)$$

mit dem Polarisierbarkeitstensor $\underline{\alpha}(\mathbf{r}, t)$, der die Eigenschaften der streuenden Moleküle beschreibt. Bei den Messungen ist das elektrische Feld $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ stets vertikal zur Streuebene polarisiert.

Das gestreute elektrische Feld $\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t)$ im Aufpunkt \mathbf{R} zur Zeit t in der Richtung von \mathbf{k}_S ergibt sich aus Berechnungen mit Hilfe der Maxwell'schen Gleichungen, der Hertz'schen Dipoltheorie und der Fernfeldnäherung zu [71]

$$\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t) = \frac{k_S^2}{R\epsilon\omega_0^2} \int_V \frac{\partial^2 \mathbf{P}(\mathbf{r}, t)}{\partial t^2} d\mathbf{r} \quad (2.53)$$

mit der Dielektrizitätskonstanten ϵ , wobei der Zusammenhang zum Brechungsindex n gleich $n = \sqrt{\epsilon}$ ist. In Abb.(2.6) ist die Streugeometrie schematisch dargestellt.

Unter der Annahme, daß $\underline{\alpha}(\mathbf{r}, t)$ im Vergleich zur Einstrahlfrequenz ω_0 eine langsam veränderliche Funktion ist, also in Relation als quasistatisch behandelt werden kann, erhält man

$$\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t) = -\frac{k_S^2}{R\epsilon} \int_V \underline{\alpha}(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r}. \quad (2.54)$$

Für den Polarisierbarkeitstensor werden folgende Vereinfachungen vorgenommen:

(i) Isotropie der Polarisierbarkeit der Moleküle, was eine Richtungsunabhängigkeit der Ladungsverschiebungen innerhalb des Moleküls bedeutet

$$\underline{\alpha}(\mathbf{r}, t) = \alpha \underline{I}. \quad (2.55)$$

mit dem Einheitstensor \underline{I} .

(ii) Weiterhin wird die skalare Polarisierbarkeit α in einen konstanten Mittelwert α_0 und einen fluktuierenden Anteil $\delta\underline{\alpha}(\mathbf{r}, t)$ unterteilt:

$$\underline{\alpha}(\mathbf{r}, t) = \alpha_0 \underline{I} + \delta\underline{\alpha}(\mathbf{r}, t). \quad (2.56)$$

Letztere stellt die lokalen Inhomogenitäten dar, aufgrund dessen Streuung auch neben der Vorwärtsstreuung auftritt.

Wegen der Isotropie ist auch die Polarisation des gestreuten elektrischen Feldes parallel zur Schwingungsrichtung des eingestrahnten Feldes. Daher wird hier auch von polarisierter Lichtstreuung, im Gegensatz zu de- und unpolarisierter Lichtstreuung, gesprochen.

Der homogene Anteil α_0 liefert nur Streuung in Vorwärtsrichtung, andere Streuanteile werden nur durch die Inhomogenitäten $\delta\underline{\alpha}(\mathbf{r}, t)$ hervorgerufen. Diese Voraussetzungen ergeben letztlich ein gestreutes elektrisches Feld der Form:

$$\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t) = -\frac{k_S^2 E_0}{R\epsilon} \exp(i(\mathbf{k}_S \cdot \mathbf{R} - \omega_0 t)) \int_V \delta\underline{\alpha}(\mathbf{r}, t) \cdot \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r}. \quad (2.57)$$

Das Volumenintegral stellt die räumliche Fouriertransformierte der Polarisationschwankungen $\delta\alpha(\mathbf{r}, t)$ dar und wird folgendermaßen abgekürzt:

$$\delta\alpha(\mathbf{q}, t) = \int_V \delta\alpha(\mathbf{r}, t) \cdot \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) \, d\mathbf{r}. \quad (2.58)$$

Bragg-Gleichung

Die Information, die aus einem Streuexperiment gewonnen werden kann, hängt unmittelbar von der relativen Orientierung von Streuquelle und Detektor ab. Der Streuvektor \mathbf{q} oder Wellenzahlvektor ergibt sich als Differenzvektor aus den Wellenvektoren von einfallendem und gestreutem Licht

$$\mathbf{q} = \mathbf{k}_S - \mathbf{k}_0. \quad (2.59)$$

Der Betrag des Wellenzahlvektors \mathbf{q} ist durch die Bragg - Beziehung gegeben, worin der elastische Streuprozess mit $|\mathbf{k}_0| = |\mathbf{k}_S|$ enthalten ist,

$$q = |\mathbf{q}| = 2 \cdot \frac{\omega_0}{c_0} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.60)$$

mit λ_0 als der Wellenlänge des einfallenden Lichtes, c_0 der Vakuumlichtgeschwindigkeit und n als dem Brechungsindex. Die Abb.(2.7) veranschaulicht den obigen Zusammenhang für den Wellenzahlvektor q in cm^{-1} , in der die Energie- und die Impulserhaltung gleichzeitig erfaßt sind.

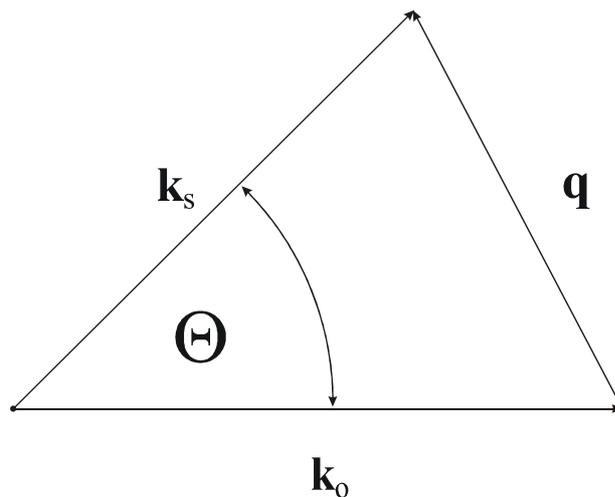


Abb.2.7: Geometrische Darstellung der Bragg-Gleichung für den Streuvektor \mathbf{q}

Der Streuvektor ist ein Maß für die erreichbare strukturelle Auflösung. Der reziproke Streuvektor $1/q$ gibt eine Längenskala vor, auf der die beobachteten Phänomene ablaufen. Der maximale Betrag von q ergibt sich bei $\theta = 180^\circ$ (Rückreflexion) zu $q_{\max} = \frac{4\pi n}{\lambda_0}$. Der Wertebereich von q ist damit beschränkt auf

$$0 \leq q \leq \frac{4\pi n}{\lambda_0} . \quad (2.61)$$

Durch den Zusammenhang $q = \frac{2\pi}{\lambda}$ ist der Betrag des Wellenzahlvektors ein Maß für die Ausdehnung einer Schwankung mit der Wellenlänge λ in dem Medium.

So erhält man die Kurzform für das gestreute elektrische Feld am Aufpunkt \mathbf{R} , wo der Detektor sitzt:

$$\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t) = -\frac{k_S^2 E_0}{R\epsilon} \exp(i(\mathbf{k}_S \cdot \mathbf{R} - \omega_0 t)) \delta\alpha(\mathbf{q}, t). \quad (2.62)$$

Hieran ist zu erkennen, daß dies eine Welle mit der Eingangsfrequenz ω_0 ist, die Richtung \mathbf{k}_S hat und mit den Eigenschaften der Moleküle $\delta\alpha(\mathbf{q}, t)$ moduliert ist.

Der Detektor am Ort \mathbf{R} mißt nicht das Feld \mathbf{E}_S direkt, sondern die Intensität I dieses Feldes. Zur Bestimmung der Intensität I wird die Autokorrelationsfunktion des elektrischen Feldes benötigt.

Diese ist wie folgt definiert:

$$\langle \mathbf{E}_S(\mathbf{R}, 0) \mathbf{E}_S(\mathbf{R}, \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T \mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t) \mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t + \tau) dt. \quad (2.63)$$

Die Autokorrelationsfunktion von $\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t)$ sagt aus, inwieweit das elektrische Feld als Schwankungsgröße zur Zeit $t + \tau$ von ihrem Wert zur Zeit t abhängt. Sie hat die Eigenschaft, eine gerade Funktion zu sein.

Desweiteren wird die Spektraldichte $I(\mathbf{q}, \omega)$ als die zeitliche Fouriertransformierte der Autokorrelationsfunktion des Streufeldes eingeführt:

$$I(\mathbf{q}, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \langle \mathbf{E}_S(\mathbf{R}, 0) \mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t) \rangle \exp(-i\omega t) dt . \quad (2.64)$$

Die Gesamtintensität ergibt sich aus der Integration der Intensitätsdichte über alle Frequenzen ω :

$$I(\mathbf{q}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\mathbf{q}, \omega) d\omega. \quad (2.65)$$

Dies ist gleich der Mittelung des quadrierten elektrischen Feldes, d.h. die Autokorrelation des elektrischen Feldes zum Zeitpunkt $\tau = 0$:

$$I(\mathbf{q}) = I(\mathbf{q}, t = 0) = \langle \mathbf{E}_S^*(\mathbf{R}, 0) \mathbf{E}_S(\mathbf{R}, 0) \rangle = \left\langle |\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, 0)|^2 \right\rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T |\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t)|^2 dt, \quad (2.66)$$

wobei sich wiederum durch Fouriertransformation folgender Zusammenhang ergibt:

$$I(\mathbf{q}, t) = \langle \mathbf{E}_S^*(\mathbf{R}, 0) \mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t) \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\mathbf{q}, \omega) \exp(i\omega t) d\omega. \quad (2.67)$$

Durch Einsetzen des berechneten elektrischen Feldes wird der Zusammenhang der gemessenen Größen mit den Systemgrößen, hier mit den Eigenschaften der Moleküle durch ihre Polarisierbarkeit, die letztendlich aufgrund von Translations- und Rotationsbewegungen der Teilchen fluktuiert, geschaffen.

Für die Gesamtintensität $I(\mathbf{q})$ folgt daraus

$$I(\mathbf{q}) = \frac{k_S^4 E_0^2}{R^2 \epsilon^2} \langle \delta\alpha^*(\mathbf{q}, 0) \delta\alpha(\mathbf{q}, 0) \rangle = \frac{k_S^4 E_0^2}{R^2 \epsilon^2} \left\langle |\delta\alpha(\mathbf{q}, 0)|^2 \right\rangle \quad (2.68)$$

bzw. für die spektrale Intensitätsdichte

$$I(\mathbf{q}, \omega) = \frac{k_S^4 E_0^2}{R^2 \epsilon^2} I\alpha(\mathbf{q}, \omega) \quad (2.69)$$

mit $I\alpha(\mathbf{q}, \omega)$ gegeben durch

$$I\alpha(\mathbf{q}, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} I\alpha(\mathbf{q}, t) \exp(-i\omega t) dt \quad (2.70)$$

und dessen zeitliche Rück-Fouriertransformation

$$I\alpha(\mathbf{q}, t) = \langle \delta\alpha^*(\mathbf{q}, 0) \delta\alpha(\mathbf{q}, t) \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} I\alpha(\mathbf{q}, \omega) \exp(i\omega t) d\omega. \quad (2.71)$$

Strukturfaktoren sind mit der Dichte, d.h. Verteilung, d.h. Bewegung und Form der Teilchen verknüpft. Durch die Ladungsverteilung der Teilchen, die sich in ihrer Polarisationsfähigkeit ausdrückt, werden die Strukturfaktoren erst meßbar. Daher werden nun die statischen wie dynamischen Strukturfaktoren bestimmt.

Struktur- und Formfaktor

Es wird der allgemeine Fall betrachtet, in dem eine Suspension von Makromolekülen vorliegt, bei der inter- sowie intramolekulare Wechselwirkungen auftreten. Die Lichtstreuung der Lösungsmittelmoleküle (hier Wasserteilchen) kann gegenüber den Makroteilchen vernachlässigt werden. Jedes Molekül besteht aus l -Segmenten und das relevante Streuvolumen enthält N -Moleküle. Die Polarisierungsschwankung $\delta\alpha(\mathbf{r}, t)$ ist dann gegeben durch

$$\delta\alpha(\mathbf{r}, t) = \sum_{i=1}^N \sum_{\beta=1}^l \alpha_{i\beta} \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_{i\beta}(t)), \quad (2.72)$$

wobei $\mathbf{r}_{i\beta}(t)$ die Position des Streuzentrums β im i -ten Molekül zur Zeit t festlegt. Dieser Ausdruck läßt sich noch zerlegen in den Schwerpunkt $\mathbf{r}_i(t)$ des Teilchens und in die relative Position $\mathbf{b}_{i\beta}(t)$ des β -ten Segmentes des i -ten Moleküls

$$\mathbf{r}_{i\beta}(t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{b}_{i\beta}(t). \quad (2.73)$$

Nun wird zur weiteren Vereinfachung angenommen, daß alle Teilchen gleich sind. Somit erhält man mit $\alpha_{i\beta} = \alpha$ für die mittlere Intensität aus Gleichung (2.68)

$$I(\mathbf{q}) = \frac{k_S^4 E_0^2}{R^2 \epsilon^2} \alpha^2 \left\langle \sum_{i,j,\beta,\gamma} \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)) \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{b}_{i\beta} - \mathbf{b}_{j\gamma})) \right\rangle. \quad (2.74)$$

Des weiteren werden folgende Definitionen mit der Annahme eingeführt, daß die inter- und intramolekularen Mittelungen getrennt durchgeführt werden können, d.h. daß diese beiden Wechselwirkungen unabhängig voneinander sind:

(i) Der intermolekulare Strukturfaktor, womit auch der statische Strukturfaktor gemeint ist

$$S(\mathbf{q}) = \frac{1}{N} \left\langle \sum_{i,j} \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)) \right\rangle, \quad (2.75)$$

welcher in integraler Form auch proportional zur räumlichen Fouriertransformierten der Paarverteilungsfunktion ist

$$S(\mathbf{q}) \sim \int g(r) \exp(i(\mathbf{q} \cdot \mathbf{r})) d\mathbf{r}. \quad (2.76)$$

Die Paarverteilungsfunktion gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich ein Teilchen am Ort r befindet, wenn am Ort $r = 0$ ebenfalls ein Teilchen existiert. Aus der winkelabhängigen Streulichtintensität wird durch Fouriertransformation die Paarverteilungsfunktion gewonnen, die Auskunft über die räumliche Anordnung der Streuzentren gibt, analog den Verfahren der Neutronen- und Röntgenstreuung an atomaren Systemen.

(ii) Der intramolekulare Strukturfaktor, welcher als molekularer oder statischer Formfaktor bezeichnet wird

$$P(\mathbf{q}) = \frac{1}{l^2} \left\langle \sum_{\beta, \gamma} \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{b}_{i\beta} - \mathbf{b}_{i\gamma})) \right\rangle. \quad (2.77)$$

Der molekulare Formfaktor $P(\mathbf{q})$ ergibt sich somit, indem die Phasenunterschiede sämtlicher Paare von Streuzentren des i -ten Makromoleküls aufsummiert und anschließend eine Mittelung über die räumliche Orientierung durchgeführt wird.

Eine hilfreiche Größe zur Beschreibung des statischen Formfaktors ist der Gyrationradius R_G , welcher über die Massenverteilung, d.h. über das Trägheitsmoment des gesamten streuenden Teilchens definiert ist,

$$R_G = \frac{\int_V \rho(r) r^2 d\mathbf{r}}{\int_V \rho(r) d\mathbf{r}}, \quad (2.78)$$

mit der Massendichte $\rho(r)$. Zum Beispiel gilt für ein kugelförmiges Teilchen $R_G = \sqrt{3/5}R$ mit dem Radius R .

Wird die obige Doppelsumme (2.77) auf die Streugeometrie bezogen, ergibt sich ein Ausdruck bezüglich des Streuvektors \mathbf{q} der folgenden Form:

$$P(\mathbf{q}) = \frac{1}{l^2} \sum_{\beta=1}^l \sum_{\gamma=1}^l \frac{\sin(\mathbf{q} \cdot \mathbf{b}_{\beta\gamma})}{\mathbf{q} \cdot \mathbf{b}_{\beta\gamma}}, \quad (2.79)$$

wobei $\mathbf{b}_{\beta\gamma}$ den vektoriellen Abstand zwischen den beiden Streuzentren β und γ eines Moleküls bezeichnet

$$\mathbf{b}_{\beta\gamma} = \mathbf{b}_\beta - \mathbf{b}_\gamma. \quad (2.80)$$

Die Gleichung (2.79) entspricht der Rayleigh-Gans-Debye Näherung, wenn eine Linearisierung der Sinus-Funktion bezüglich des Gyrationradius R_G durchgeführt wird. Diese Näherung gilt nur für kleine Streuwinkel q und wird auch in der Neutronen- und Röntgenstreuung (-beugung) verwendet.

Der molekulare Formfaktor ist für eine Reihe von Molekülgeometrien berechnet worden, wobei hier die für eine Kugel mit dem Kugelradius R angegeben wird

$$P(qR) = \left(\frac{3}{(qR)^3} (\sin(qR) - qR \cos(qR)) \right)^2. \quad (2.81)$$

Für fraktale Strukturen wird eine Formulierung von Fisher und Burford [72] häufig verwendet

$$P(\mathbf{q}) = \left(1 + \frac{2(qR_G)^2}{3d_f} \right)^{-\frac{d_f}{2}}. \quad (2.82)$$

Als Ergebnis ergibt sich mit den obigen Definitionen für die mittlere Intensität folgender Zusammenhang:

$$I(\mathbf{q}) = \frac{k_S^4 E_0^2}{R^2 \varepsilon^2} \alpha^2 N l^2 S(\mathbf{q}) P(\mathbf{q}). \quad (2.83)$$

Mit Hilfe der Clausius-Mosotti Gleichung in der Form

$$\varepsilon - \varepsilon_0 = 4\pi \frac{N}{V} l \alpha \quad (2.84)$$

mit der Teilchenzahldichte N/V , der Dielektrizitätskonstanten ε der Teilchen gegenüber ε_0 und mit der Polarisierbarkeit α in Einheiten von Volumen pro Teilchen und Segment, erhalten wir in erster Näherung (hinreichende Verdünnung) für α mit der Massenkonzentration c des gelösten Stoffes und mit $\varepsilon = n^2$:

$$\alpha \approx \frac{1}{4\pi \frac{N}{V} l} \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial c} \right)_{T,\mu} \cdot c = \frac{n_0}{2\pi \frac{N}{V} l} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)_{T,\mu} \cdot c. \quad (2.85)$$

Dies ergibt für die mittlere Intensität pro Volumen V mit $k_S = 2\pi n/\lambda_0$ folgende Gleichung, womit sich weiter die bekannte Rayleigh-Gleichung ableiten ließe

$$I(\mathbf{q}) = \frac{4\pi^2 I_0 n_0^2}{\lambda_0^4 R^2} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \frac{N}{V} \left(\frac{M}{N_A} \right)^2 S(\mathbf{q}) P(\mathbf{q}). \quad (2.86)$$

Mit der Beziehung

$$M = N_A m_T = N_A \rho V_T = N_A \rho \left(\frac{4}{3} \pi R^3 \right), \quad (2.87)$$

wobei R der Kugelradius, ρ die Massendichte eines Teilchens und N_A die Avogadro-Konstante ist, ergibt sich folgende Proportionalität kugelförmiger globulärer Teilchen:

$$I(\mathbf{q}) \sim N R^6 S(\mathbf{q}) P(\mathbf{q}), \quad (2.88)$$

d.h. die gemessene Intensität über eine Zeitdauer T gemittelt ist proportional zur Anzahl und zur 6. Potenz des Radius der Teilchen in der Suspension.

Für fraktale Strukturen muß dieser Zusammenhang folgendermaßen modifiziert werden [73],[74]:

$$I(\mathbf{q}) \sim N R^{2d_f} S(\mathbf{q}) P(\mathbf{q}), \quad (2.89)$$

mit der fraktalen Dimension d_f .

Aufgrund der Messung der Intensität und der Potenz-Proportionalität von Intensität zu Radius wird mit der Photonenkorrelationsspektroskopie eine intensitätsgewichtete Größemittelung der Teilchen durchgeführt. Dies erzeugt auch die Schwierigkeiten bei einigen

nm -Teilchen Messungen bei Vorhandensein von Aggregaten in der Lösung. Zur Umrechnung in Teilchenzahlengewichtung sind die Gleichungen (2.88, 2.89) zu verwenden.

Es folgen zwei Spezialfälle, die auch bei der Datenauswertung benutzt werden:

(i) Liegt eine Suspension bei so geringer Konzentration vor, sodaß intermolekulare Wechselwirkungen vernachlässigt werden können, bzw. werden nur kleine Schwankungen bei Rückwärtsstreuung beobachtet, so läßt sich $S(\mathbf{q}) = 1$ setzen. Dieser Zusammenhang gilt auch für den Fall $qR_G \gg 1$.

(ii) Sind dagegen die Teilchen in Relation zur Eingangswellenlänge λ_0 als klein anzusehen, sodaß intramolekulare Effekte keine Rolle spielen, so ist $P(\mathbf{q}) = 1$. Dieser Sachverhalt ist mit der Gleichung (2.79) durch den Grenzübergang $\sin x/x \rightarrow 1$ für $x \ll 1$ zu sehen.

Abschließend läßt sich die Verbindung von der gemessenen winkelabhängigen Gesamtintensität $I(\mathbf{q})$ über den statischen Strukturfaktor $S(\mathbf{q})$ zum gesuchten Wechselwirkungspotential $W(r)$ schließen.

Zur Veranschaulichung dient ein weiterer Spezialfall aus Gleichung (2.76), der sich bei wechselwirkenden sphärischen (kugelförmigen) Molekülen ergibt. Hier läßt sich der statische Strukturfaktor in erster Näherung mittels des 2. Virial Koeffizienten B_2 zu

$$S(\mathbf{q}) = 1 - 2\frac{N}{V}B_2 \quad (2.90)$$

angeben. Mit Gleichungen (2.28, 2.30) folgt die Abhängigkeit des statischen Strukturfaktors $S(\mathbf{q})$ von der Paarverteilungsfunktion $g(r)$:

$$S(\mathbf{q}) = 1 + 4\pi\frac{N}{V}\int_0^\infty (g(r) - 1) r^2 dr. \quad (2.91)$$

Die Paarverteilungsfunktion ist direkt proportional zum mittleren Wechselwirkungspotential des Systems

$$g(r) \sim \exp(-W(r)/kT), \quad (2.92)$$

was schon im vorherigen Kapitel zur Berechnung des Wechselwirkungsparameters λ Verwendung fand.

Für ein System von identischen harten kugelförmigen Teilchen gilt folgender Zusammenhang

$$g(r) = \begin{cases} 0 & \text{für } W(r) = \infty \ (r < 2R) \\ 1 & \text{für } W(r) = 0 \ (r > 2R) \end{cases}, \quad (2.93)$$

somit ist die Definition vom statischen Strukturfaktor auf ein wechselwirkungs-freies System mit $S(\mathbf{q}) = 1$ gegeben.

2.3.2 Photonenkorrelationsspektroskopie

Nun folgen zwei Definitionen:

(i) Die heterodyne Meßmethode wird durch die Autokorrelationsfunktion 1.Ordnung

$$G_1(\mathbf{q}, t) = I(\mathbf{q}, t) = \langle \mathbf{E}_S^*(\mathbf{R}, 0) \mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t) \rangle \quad \text{und} \quad (2.94)$$

(ii) die homodyne Methode mittels der Autokorrelationsfunktion 2.Ordnung

$$G_2(\mathbf{q}, t) = \langle |\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, 0)|^2 |\mathbf{E}_S(\mathbf{R}, t)|^2 \rangle = \langle I(\mathbf{R}, 0) I(\mathbf{R}, t) \rangle \quad (2.95)$$

beschrieben. Die Bezeichnung "heterodyne" rührt daher, da in diesem Detektionsverfahren das Streulicht mit dem Erregerlicht überlagert wird. Dagegen beschreibt "homodyne" den Zustand, daß das gemessene Streulicht mit sich selbst addiert wird.

Diese beiden Korrelationsfunktionen werden im Falle von normalverteilten, d.h Gaußverteilten Signalen durch die Siegert-Beziehung miteinander verknüpft [75]:

$$G_2(\mathbf{q}, t) = |G_1(\mathbf{q}, 0)|^2 + |G_1(\mathbf{q}, t)|^2. \quad (2.96)$$

Besteht das Streuvolumen aus diffundierenden Makromolekülen, so macht diese Gleichung nur Sinn, wenn die Anzahl der in ihm enthaltenen Teilchen groß genug ist. Die normierten Korrelationsfunktionen

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, t) = G_1(\mathbf{q}, t) / G_1(\mathbf{q}, 0) \quad (2.97)$$

und

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, t) = G_2(\mathbf{q}, t) / G_2(\mathbf{q}, 0) \quad (2.98)$$

hängen mit $G_2(\mathbf{q}, 0) = |G_1(\mathbf{q}, 0)|^2$ durch folgende Beziehung zusammen:

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, t) = 1 + \left| g^{(1)}(\mathbf{q}, t) \right|^2. \quad (2.99)$$

Aus der mathematischen Beschreibung geht daher auch hervor, daß $g^{(1)}(\mathbf{q}, t)$ nur durch Werte zwischen 0 und 1, $g^{(2)}(\mathbf{q}, t)$ zwischen 1 und 2 definiert ist. Die normierte Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\mathbf{q}, t)$ wird bei einem realen System noch erweitert zu

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, t) = U + K \cdot \left| g^{(1)}(\mathbf{q}, t) \right|^2, \quad (2.100)$$

wobei U einen konstanten Hintergrund darstellt und K einen Kohärenzfaktor, der aus der apparativen Geometrie stammt.

Zur Vereinfachung wird ein System von hinreichend kleinen Teilchen beschrieben, d.h. $P(q) = 1$, womit für die fluktuierenden Polarisationen geschrieben werden kann:

$$\delta\alpha(\mathbf{r}, t) = \alpha \sum_{i=1}^N \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_i(t)). \quad (2.101)$$

Dies ergibt mit Gleichung (2.75) den dynamischen Strukturfaktor zu

$$S(\mathbf{q}, t) = \frac{1}{N} \left\langle \sum_{i,j} \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_j(0))) \right\rangle, \quad (2.102)$$

wobei der statische Strukturfaktor mit dem dynamischen folgendermaßen zusammenhängt

$$S(\mathbf{q}) = S(\mathbf{q}, 0). \quad (2.103)$$

Daraus ergibt sich mit der Gleichung $I\alpha(\mathbf{q}, t) = \langle \delta\alpha^*(\mathbf{q}, 0)\delta\alpha(\mathbf{q}, t) \rangle$ die Beziehung zwischen der Autokorrelationsfunktion 1.Ordnung und den Strukturfaktoren:

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, t) = \frac{I\alpha(\mathbf{q}, t)}{I\alpha(\mathbf{q}, 0)} = \frac{\langle \delta\alpha^*(\mathbf{q}, 0)\delta\alpha(\mathbf{q}, t) \rangle}{\langle |\delta\alpha(\mathbf{q}, 0)|^2 \rangle} = \frac{S(\mathbf{q}, t)}{S(\mathbf{q})}, \quad (2.104)$$

hierfür existiert außer für vereinfachte Modellsysteme keine analytische Form.

Um nun eine Vorstellung vom zeitlichen Verhalten von $g^{(1)}(\mathbf{q}, t)$ zu bekommen, wird weiterhin eine Suspension von unabhängigen Molekülen betrachtet. In diesem Fall ist $S(\mathbf{q}, t) \sim F_S(\mathbf{q}, t)$ mit

$$F_S(\mathbf{q}, t) = \langle \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0))) \rangle, \quad (2.105)$$

da zu allen Zeiten die Position des i -ten Teilchens unkorreliert mit der Position des j -ten Teilchens ist. Damit liefern nur die Terme mit $i = j$ einen Beitrag zu der Summation in $S(\mathbf{q}, t)$.

Die Größe $F_S(\mathbf{q}, t)$ wird als intermediäre Streufunktion bezeichnet, wobei der Index S nur Selbstdiffusion anzeigt. Sie ist mit der van-Hove-Raum-Zeitfunktion

$$G_S(\mathbf{R}, t) = \langle \delta(\mathbf{R} - (\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0))) \rangle \quad (2.106)$$

über eine räumliche Fouriertransformation verknüpft

$$F_S(\mathbf{q}, t) = \int G_S(\mathbf{R}, t) \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}) d\mathbf{R}. \quad (2.107)$$

Diese Funktion beschreibt die Selbstdiffusion eines Teilchens und kann als die Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Ortsverschiebung des Teilchens i in der Zeit t angesehen werden.

Unter der Annahme der Brown'schen Bewegung des Teilchens kann die Funktion $G_S(\mathbf{R},t)$ durch die Diffusionsgleichung

$$\frac{\partial G_S(\mathbf{R},t)}{\partial t} = D \nabla^2 G_S(\mathbf{R},t), \quad (2.108)$$

beschrieben werden, wobei ∇ der Nabla-Operator ist, der räumliche Gradient.

Die Lösung dieser linearen partiellen Differentialgleichung erfolgt durch Fouriertransformation bezüglich \mathbf{R}

$$\frac{\partial F_S(\mathbf{q},t)}{\partial t} = -Dq^2 F_S(\mathbf{q},t) \quad (2.109)$$

und zeitliche Integration in der Zeitvariablen t zu

$$\frac{F_S(\mathbf{q},t)}{F_S(\mathbf{q},0)} = \exp(-q^2 D t) \quad (2.110)$$

mit der Relaxationszeit τ_q des Teilchens

$$\tau_q = \frac{1}{\Gamma} = \frac{1}{q^2 D}. \quad (2.111)$$

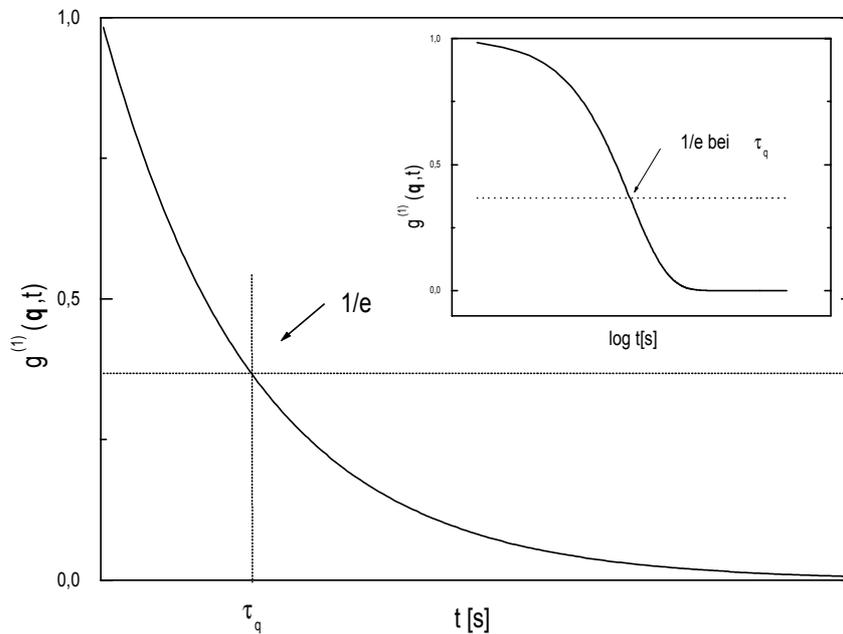


Abb.2.8: Exponentieller Abfall der Autokorrelationsfunktion 1.Ordnung $g^{(1)}(\mathbf{q}, t)$ mit einer zusätzlichen logarithmischen Darstellung über der Zeitkoordinate

Die Integrationskonstante ist willkürlich auf 1 gesetzt.

Mit diesem Ergebnis läßt sich das zeitliche Verhalten der Autokorrelationsfunktion $g^{(1)}(\mathbf{q}, t)$ für eine monodisperse und wechselwirkungsfreie Suspension durch eine abfallende Exponentialfunktion mit der Relaxationszeit τ_q in guter Näherung zu

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, t) = \exp(-t/\tau_q) \quad (2.112)$$

beschreiben. Diese Funktion ist in Abb.(2.8) dargestellt, wobei die logarithmische Darstellung verkleinert wurde.

Ausgehend von der Siegert-Beziehung sieht die Autokorrelationsfunktion 2.Ordnung $g^{(2)}(\mathbf{q}, t)$ folgendermaßen aus:

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, t) = 1 + \exp(-2q^2 Dt), \quad (2.113)$$

wobei nun der Faktor 2 in der Relaxationszeit auftaucht. Damit ist man in der Lage, den Selbstdiffusionskoeffizienten aus den Zeitkorrelationsfunktionen zu bestimmen.

Während bei ungeordneten, genügend verdünnten Suspensionen die Zeitkorrelationsfunktionen bei verschiedenen Streuvektoren einheitlich skaliert werden können und sich ein vom Streuvektor unabhängiger Diffusionskoeffizient ergibt, ist dieses Verhalten in wechselwirkenden Systemen nicht mehr zu beobachten.

Da reale Lösungen von Interesse sind, bei denen Wechselwirkungen zwischen den Teilchen das Diffusionsverhalten beeinflussen, müssen einige Modifikationen erläutert werden. Hier läßt sich neben einer starken Abhängigkeit der Zeitkorrelationsfunktionen vom Streuvektor auch ein starkes Abweichen der einzelnen Kurven vom einfach experimentellen Verlauf erkennen [76],[77].

Polymodalität

Ist die zu betrachtende Lösung nicht monomodal, sondern setzt sich aus zwei oder mehreren Komponenten zusammen, so besteht die Korrelationsfunktion aus einer Summe von Exponentialfunktionen. Der allgemeinste Fall, d.h. insbesondere bei wechselwirkenden Systemen, ist die Korrelationsfunktion mit einer Laplace-Transformation über alle Frequenzen $\Gamma = q^2 D$ mit der Frequenzverteilung $S(\Gamma)$ auf

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, t) = \int_0^\infty S(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma \quad (2.114)$$

zu erweitern.

Polydispersität

Sind die Teilchen nicht monodispers, sondern liegt jeweils eine Radiusverteilung vor, so besteht die Korrelationsfunktion 1.Ordnung aus einem Integral über alle Autokorrelationsfunktionen der einzelnen Komponenten, gewichtet mit der relativen Anzahl der Teilchen N vom Radius R (Berne und Pecora)

$$\left|g^{(1)}(\mathbf{q}, t)\right| = \frac{\int_0^\infty N(R)M^2 I(\mathbf{q}, R) \exp(-\Gamma(R)t) dR}{\int_0^\infty N(R)M^2 I(\mathbf{q}, R) dR}. \quad (2.115)$$

Hierbei ist $I(\mathbf{q}, R)$ die an einem Teilchen mit dem Radius R gestreute Intensität und M das Molekulargewicht, was im Falle von kugelförmigen globulären Teilchen, wie in (2.88), durch

$$M \sim R^3 \quad (2.116)$$

und entsprechend für fraktale Strukturen (2.89) mit der fraktalen Dimension d_f durch

$$M \sim R^{d_f} \quad (2.117)$$

zu modifizieren ist [73],[74].

Rotatorische Abkopplung des Diffusionskoeffizienten

Bei jedem anisotropen Teilchen, wie bei den Fraktalen, besteht der Diffusionskoeffizient aus einem translatorischen und einem rotatorischen Anteil. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius über die Stokes-Einstein-Gleichung geht aber nur der translatorische Diffusionskoeffizient ein. Der rotatorische Anteil trägt aber auch zur Korrelationsfunktion bei

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, t) = \frac{\sum_M N(M)M^2 \exp(-q^2 D_T t) \sum_{l=0}^{\infty} S_l(\mathbf{q}, R_G) \exp(-l(l+1)D_R t)}{\sum_M N(R)M^2 S(\mathbf{q}, R_G)} \quad (2.118)$$

mit dem statischen Strukturfaktor

$$S(\mathbf{q}, R_G) = \sum_{l=0}^{\infty} S_l(\mathbf{q}, R_G), \quad (2.119)$$

welcher als Formfaktor die Struktur der Fraktale beschreibt.

Die zweite Summe beschreibt den rotatorischen Anteil, wobei l die Terme der Multipolentwicklung des Strukturfaktors angibt. Es ist zu erkennen, daß der Anteil von D_T bei zunehmendem Streuwinkel mit q^2 abnimmt, wogegen D_R winkelunabhängig ist. Das bedeutet, daß zu größeren Streuwinkeln hin der rotatorische Anteil an der Gesamtintensität zunimmt. D_R ist durch

$$D_R = \frac{k_B T}{8\pi\eta R^3} \quad (2.120)$$

gegeben. Unter Verwendung eines effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} kann folgende Gleichung notiert werden:

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, t) = \frac{\sum_M N(M) M^2 \exp(-q^2 D_T t) \sum_{l=0}^{\infty} S_l(\mathbf{q}, R_G) \exp(-l(l+1) D_R t)}{\sum_M N(R) M^2 S(\mathbf{q}, R_G)}, \quad (2.121)$$

wobei eine Funktion $f(\mathbf{q}, R_G)$ den Effekt der rotatorischen Diffusion mit $D_{eff}(\mathbf{q}, R_G) = D_T(R_G) \cdot f(\mathbf{q}, R_G)$ berücksichtigt

$$f(\mathbf{q}, R_G) = \frac{D_{eff}(\mathbf{q}, R_G)}{D_T(R_G)} = 1 + \frac{3 \sum_{l=0}^{\infty} l(l+1) S_l(\mathbf{q}, R_G)}{4 (\beta q R_G) S(\mathbf{q}, R_G)}. \quad (2.122)$$

Dabei entspricht β dem Verhältnis zwischen dem hydrodynamischen Radius und dem Gyrationradius R_G (2.78) und beträgt für DLCA-Fractale 0.93 und für RLCA-Fractale 1.

Im Grenzfall sehr großer Zeiten sollte sich für kleine Streuvektoren aus den Zeitkorrelationsfunktionen ein kollektiver Langzeitdiffusionskoeffizient bestimmen lassen. Dagegen wird bei großen Streuvektoren der Abfall der Zeitkorrelationsfunktionen hauptsächlich durch die Einzelteilchendynamik bestimmt. Das heißt, mit der dynamischen Lichtstreuung kann je nach Wahl des Streuvektors kollektive oder Selbstdiffusion untersucht werden, abhängig vom Verhältnis der Größe der Teilchen zur Wellenlänge.

2.3.3 Laser-Doppler-Anemometrie

Es gibt verschiedene Meßanordnungen zur Durchführung der Laser-Doppler-Anemometrie; prinzipiell unterscheiden sie sich in der Anzahl der verwendeten Laserstrahlen, Detektionswinkeln in Abhängigkeit der Strahlführung, z. B. "homodyne - oder heterodyne mode".

Der wesentliche Nachteil der heterodynen Methode besteht in der Abhängigkeit des Meßergebnisses vom Richtungswinkel $\Theta/2$ des Referenzstrahles. Bei der homodynen Messung

dagegen ist die Frequenz des empfangenen Signals unabhängig von der Stellung des Detektors.

Bei der elektrophoretischen Lichtstreuung wird die Zeitkorrelationsfunktion nicht nur durch die Diffusionsbewegung der Teilchen, sondern zusätzlich durch elektrokinetische Effekte beeinflusst. Wird an eine Suspension mit elektrisch geladenen Teilchen ein elektrisches Feld angelegt, so findet eine gerichtete Bewegung der Partikel statt. Dieses Phänomen der gerichteten Bewegung ist auch unter dem Begriff Konvektion bekannt.

In diesem Fall wird die allgemeine Diffusionsgleichung von (2.108) erhalten

$$\frac{\partial G_S(\mathbf{R},t)}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla G_S(\mathbf{R},t) = D \nabla^2 G_S(\mathbf{R},t), \quad (2.123)$$

wobei $\mathbf{v} \cdot \nabla G_S(\mathbf{R},t)$ den Konvektionsterm angibt. Hierin gibt \mathbf{v} den mittleren Geschwindigkeitsvektor der Teilchen an. Fouriertransformation dieser linearen partiellen Differentialgleichung ergibt eine Differentialgleichung für die intermediäre Streufunktion $F_S(\mathbf{q},t)$ zu

$$\frac{\partial F_S(\mathbf{q},t)}{\partial t} + i\mathbf{q} \cdot \mathbf{v} F_S(\mathbf{q},t) = -q^2 D F_S(\mathbf{q},t). \quad (2.124)$$

Eine entsprechende Lösung für $F_S(\mathbf{q},t)$ und damit $g^{(1)}(\mathbf{q},t)$

$$g^{(1)}(\mathbf{q},t) = \frac{F_S(\mathbf{q},t)}{F_S(\mathbf{q},0)} = \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{v} t) \exp(-q^2 D t) \quad (2.125)$$

zeigt deutlich die Überlagerung einer konvektiven harmonischen Schwingung mit dem ursprünglichen diffusiven Verhalten der Teilchen, das im Gegensatz zur gleichgerichteten Bewegung als Dämpfung zu sehen ist. In Abb.(2.9) ist der Gesamtverlauf der Korrelationsfunktion linear und verkleinert logarithmisch über der Zeit t dargestellt.

Erfahren die geladenen Moleküle keine äußere Kraft hervorgerufen durch das angelegte elektrische Feld, so liegt wieder nur ein exponentieller Abfall vor.

Mit Hilfe der zeitlichen Fouriertransformation, Gleichung (2.64), läßt sich die Autokorrelationsfunktion $g^{(1)}(\mathbf{q},t)$, welche den dynamischen Strukturfaktor beschreibt, auch als Spektraldichte im Frequenzraum darstellen:

$$S(\mathbf{q},\omega) = S(\mathbf{q}) \cdot \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} g^{(1)}(\mathbf{q},t) \exp(-i\omega t) dt. \quad (2.126)$$

Mit dem normierten dynamischen Strukturfaktor $S_n(\mathbf{q},\omega) = S(\mathbf{q},\omega)/S(\mathbf{q})$, d.h.

$$S_n(\mathbf{q},\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{v} t) \exp(-q^2 D t) \exp(-i\omega t) dt, \quad (2.127)$$

und der Berechnung für $t > 0$, ergibt sich folgende Lorentzfunktion mit der Linienbreite $\Gamma(q) = q^2 D$ zu

$$S_n(\mathbf{q}, \omega) = \frac{1}{\pi} \left(\frac{q^2 D}{(\omega - \mathbf{q} \cdot \mathbf{v})^2 + (q^2 D)^2} \right). \quad (2.128)$$

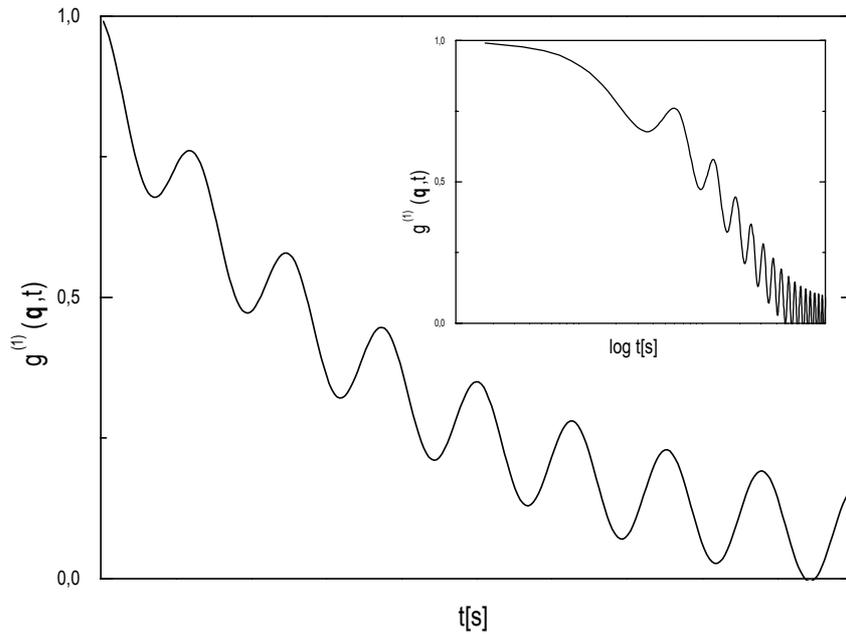


Abb.2.9: Superposition von Dämpfung und harmonischer Schwingung als Verdeutlichung der Diffusion und der Konvektion in $g^{(1)}(q, t)$. Verkleinert ist die logarithmische Darstellung.

Aufgrund periodischer Fluktuationen, hervorgerufen durch die elektrophoretischen Bewegungen der Partikel, kommt es zu einer Dopplerverschiebung der Spektrallinie, Abb.(2.10). Diese periodischen Fluktuationen werden von statistischen Fluktuationen verursacht durch die Brown'sche Diffusionsbewegung der Partikel überlagert, was sich im elastischen Peak manifestiert.

Hieran ist zu erkennen, daß die mittlere Driftgeschwindigkeit der Teilchen aus der Verschiebung des Lorentzpeaks zu $\omega = 0$ mit

$$\omega(\mathbf{q}) = \mathbf{q} \cdot \mathbf{v} = 2k_0 v \cos \phi \sin \frac{\Theta}{2} \quad (2.129)$$

meßbar ist. Diese Verschiebung wird auch Doppler-Shift genannt. k_0 ist der Wellenzahlvektor in Ausbreitungsrichtung des einfallenden Lichtes, ϕ der Winkel zwischen \mathbf{q} und \mathbf{v} und Θ der Detektionswinkel. Nur wenn \mathbf{q} parallel zur Driftrichtung \mathbf{v} der Teilchen liegt, führt dies zu einer maximalen Dopplerverschiebung.

Aufgrund des äußeren elektrischen Feldes \mathbf{E} erfahren die geladenen Teilchen mit der Nettoladung $Q = Z_p e$ eine Beschleunigung durch die Kraft

$$\mathbf{F} = Q\mathbf{E}. \quad (2.130)$$

Das Gleichgewicht von elektrischer und viskoser Kraft erreichen die Moleküle im μs Bereich und haben dabei die konstante Driftgeschwindigkeit \mathbf{v} , welche mit der elektrophoretischen Beweglichkeit μ_{el} durch

$$\mathbf{v} = \mu_{el}\mathbf{E} \quad (2.131)$$

gegeben ist.

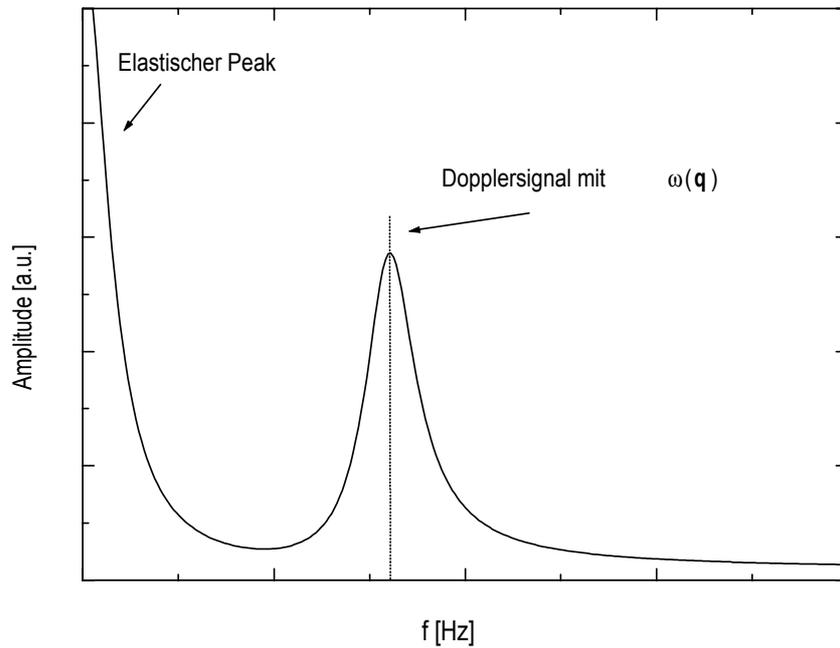


Abb.2.10: Spektrale Darstellung des normierten dynamischen Strukturfaktors $S_n(q, \omega)$ mit zwei Lorentzpeaks.

Die elektrophoretische Mobilität ist die Teilchengeschwindigkeit gemessen in $\mu m/s$ bezogen auf eine Feldstärke von einem V/cm :

$$\mu_{el} = \frac{v[\mu m/s]}{E[V/cm]}. \quad (2.132)$$

Damit ist die elektrophoretische Beweglichkeit aus dem gemessenen Spektrum anhand der Dopplerverschiebung meßbar. Dies ergibt für die Dispersionsrelation

$$\omega(\mathbf{q}) = 2k_0 \mu_{el} E \cos \phi \sin \frac{\Theta}{2}, \quad (2.133)$$

daß die Doppler-Verschiebung mit größerem elektrischen Feld E und größerem Detektionswinkel zunimmt. Das Verhältniss von Verschiebung zu Linienbreite beschreibt das Auflösungsvermögen. Mit $\phi = 0^\circ$

$$\frac{\omega(\mathbf{q})}{\Gamma(\mathbf{q})} = \frac{\mu_{el} E}{2Dk_0} \left(\frac{\cos(\Theta/2)}{\sin(\Theta/2)} \right) \quad (2.134)$$

ist zu erkennen, daß das größte Auflösungsvermögen dagegen bei kleineren Winkeln Θ vorliegt:

$$\frac{\omega(\mathbf{q})}{\Gamma(\mathbf{q})} = \frac{\mu_{el} E}{Dk_0 \Theta}. \quad (2.135)$$

Um nun Aussagen über das Zetapotential ζ zu machen, sind in Abhängigkeit von der Elektrolytkonzentration im Dispersionsmedium, der Art der vorhandenen Elektrolyte (z.B. 1:1 oder 1:2 Elektrolyt etc.) und der Teilchengröße, repräsentiert durch die Größe κR , unterschiedliche Berechnungsformeln einzusetzen. Dazu wird die folgende Beziehung verwendet:

$$\mu_{el} = \frac{2\varepsilon}{3\eta} \zeta H(\kappa R). \quad (2.136)$$

Hierbei ist $H(\kappa R)$ eine von Henry entwickelte Funktion, die in komplexer Weise von κR abhängt, $\varepsilon = \varepsilon_r \varepsilon_o$ die Dielektrizitätskonstante und η die Viskosität des Dispersionsmediums. Der obige Zusammenhang berücksichtigt nur den Retardationseffekt und ist aufgrund der Nichtbeachtung des Relaxationseffektes nur gültig für kleine Zetapotentiale $\zeta < 25mV$. Unter der Retardation wird die Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel durch die in die Gegenrichtung wandernden Gegen-Ionen verstanden, die durch die in die gleiche Richtung wandernden Co-Ionen nicht kompensiert wird.

Es werden die beiden Grenzwerte notiert:

(i) Für $\kappa R \ll 1$ geht die allgemeine Form mit $H(\kappa R) = 1$ in die Debye-Hückel-Gleichung

$$\mu_{el} = \frac{2\varepsilon}{3\eta} \zeta \quad (2.137)$$

über, die für kleine Partikel mit einer großen Doppelschicht gilt.

(ii) Dagegen gilt die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung mit $\kappa R \gg 1$ für große Partikel mit einer kleinen Doppelschicht, die mit $H(\kappa R) = 1,5$ die Gleichung

$$\mu_{el} = \frac{\varepsilon}{\eta} \zeta \quad (2.138)$$

ergibt.

Im mittleren Bereich, d.h. $\kappa R < 25$, läßt sich ein komplizierterer Ausdruck angeben:

$$H(\kappa R) = 1 + \frac{(\kappa R)^2}{16} - \frac{5(\kappa R)^3}{48} - \frac{(\kappa R)^4}{96} + \frac{(\kappa R)^5}{96} - \left[\frac{(\kappa R)^4}{8} - \frac{(\kappa R)^6}{96} \right] \cdot \exp(\kappa R) \int_{\infty}^{(\kappa R)} \frac{e^{-t}}{t} dt. \quad (2.139)$$

Ist nun das Zetapotential aus den gemessenen Werten von μ_{el} berechenbar, so ist es möglich, mit Hilfe der Doppelschichttheorie einen Zusammenhang mit der Oberflächenladung σ (Nettoladung Q) des Teilchens zu bekommen. Wird in erster Näherung das Oberflächenpotential Ψ_0 durch das Zetapotential ζ ersetzt, bekommt man folgenden allg. Zusammenhang laut Henry [78]:

$$\mu_{el} = \frac{Q}{6\pi\eta R} \frac{H(\kappa R)}{(1 + \kappa R)}. \quad (2.140)$$

Hiermit sind die Grundlagen der meßtechnischen Erfassung von Diffusionskoeffizient D sowie von elektrophoretischer Beweglichkeit μ_{el} vorgestellt, die über Theorien die notwendigen Parameter A_H und Ψ_S liefern. Dadurch wird ein Einblick in den Phasenübergang erster Ordnung aufgrund der Eigenschaften der Protein-Elektrolyt-Lösungen durch Bestimmung des Gesamtwechselwirkungspotentials $W(r)$ der gelösten Proteine möglich.

Auf den folgenden Seiten der Arbeit wird der experimentelle Teil eingeleitet, der die Meßmethoden, die Datenerfassung, die Materialien und die apparativen Aufbauten vorstellt.