

Bildung von Multischichten auf der gekrümmten Oberfläche eines Tropfens**

Jun Bai Li,* Yi Zhang und Ling Long Yan

Aus dem Adsorptionsverhalten der einzelnen Komponenten in Emulsionssystemen wie Proteinen oder Phospholipiden an Wasser/Luft- oder Flüssig/flüssig-Grenzflächen können Informationen über Kinetik und Grenzflächenaktivität erhalten werden.^[1] Mit der Entwicklung neuer Methoden wurde es möglich, die Untersuchungen auf Mehrkomponentensysteme an Flüssig/flüssig-Grenzflächen auszudehnen.^[2] Dies ist bei Nahrungsmittelmulsionen von besonderem Interesse, da hier oft eine flüssige Phase kolloidal in einer zweiten vorliegt. Die Grenzflächeneigenschaften bei Milchemulsionen werden beispielsweise durch β -Lactoglobulin bestimmt; diese Emulsionen sind oft thermodynamisch instabil.^[3] Zugesetzte niedermolekulare Tenside wie Phospholipide wechselwirken mit den adsorbierten Proteinschicht und fungieren so als Stabilisatoren oder Emulsionsbildner.^[1] Solch ein Modellsystem kann mit der Methode des hängenden Tropfens (pendent drop technique) gebildet werden, indem eine Lösung von DPPC in Chloroform durch einen Schlauch an die Spitze einer Teflonkapillare gepumpt wird, die in eine wässrige β -Lactoglobulin-Lösung eintaucht. Um einen Vergleich mit der Situation in einer Emulsion zu ermöglichen, wurde das Verhalten von zwei Komponenten auf den unterschiedlichen Seiten der Flüssig/flüssig-Grenzfläche untersucht.

Aus kinetischen Messungen der Coadsorption ergab sich die zeitabhängige dynamische Grenzflächenspannung γ der Mischschicht. Die Form und die Größe des hängenden Tropfens ändert sich mit der Adsorptionszeit sowohl bei Einsatz des reinen β -Lactoglobulins als auch bei Verwendung der Mischung mit dem Phospholipid. Nach einer gewissen Zeit begann der Tropfen zu schrumpfen und es entstand am konkav gekrümmten Teil seiner Oberfläche ein hautartiger, fältiger Film (Abbildung 1). Die Tropfengröße und die Zeit bis zum Beginn des Schrumpfens (Tabelle 1) hängen von der Volumenkonzentration ab. Bei höherer Proteinkonzentration musste die Anfangstropfengröße verringert werden, um einen Kollaps wegen zu schneller Adsorption zu verhindern. Für die höchste Proteinkonzentration von $c_{\beta\text{-Lactoglobulin}} = 3.6 \text{ mg L}^{-1}$ begann die Schrumpfung bereits nach 1890 s, was fast dreimal schneller als bei der niedrigsten Konzentration ist. Als Bezugspunkt für die weiteren Studien zur Coadsorption des Mischsystems Phospholipid/Protein wurde das System mit

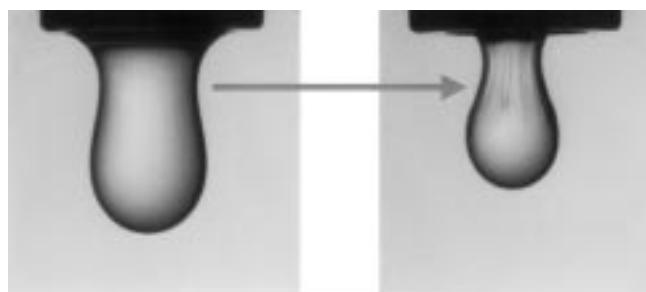


Abbildung 1. Kritische Änderung der Tropfenoberfläche, die mit einer monomolekularen Adsorptionsschicht oder einem Multischichtfilm bedeckt ist.

Tabelle 1. Tropfengröße (Anfangsvolumen V_i) und charakteristische Adsorptionszeiten von reinem β -Lactoglobulin bei unterschiedlichen Konzentrationen. t_1 : Zeit bis zum Beginn des Schrumpfens während der Adsorption; t_2 : Zeit, in der sich die fältige Struktur an der Chloroform/Wasser-Grenzfläche bildet.

| $c_{\beta\text{-Lactoglobulin}} [\text{mg L}^{-1}]$ | $V_i [\mu\text{L}]$ | $t_1 [\text{s}]$ | $t_2 [\text{s}]$ |
|---|---------------------|------------------|------------------|
| 0.6 | 15 | 5380 | 5670 |
| 1.2 | 15 | 3500 | 4300 |
| 1.8 | 13 | 2720 | 3150 |
| 2.4 | 12 | 2090 | 2600 |
| 3.0 | 12 | 1920 | 2430 |
| 3.6 | 12 | 1890 | 2270 |

einer β -Lactoglobulin-Konzentration von 1.2 mg L^{-1} gewählt. Der mit reinem Protein bedeckte Tropfen begann hierbei nach 3500 s zu schrumpfen (Abbildung 2 a und b), und nach 4300 s hatte sich die hautartige Oberfläche gebildet (Abbildung 2 c). Diese Prozesse wurden durch die Zugabe von L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) zur Chloroformlösung ($c_{\text{DPPC}} = 10^{-6} \text{ M}$) beschleunigt, sodass sich die fältige Oberfläche bereits nach 3000 s gebildet hatte. Der geschrumpfte Tropfen kollabierte nach 4300 s an der Kontaktfläche zur Kapillarspitze (Abbildung 2 d und e) und fiel

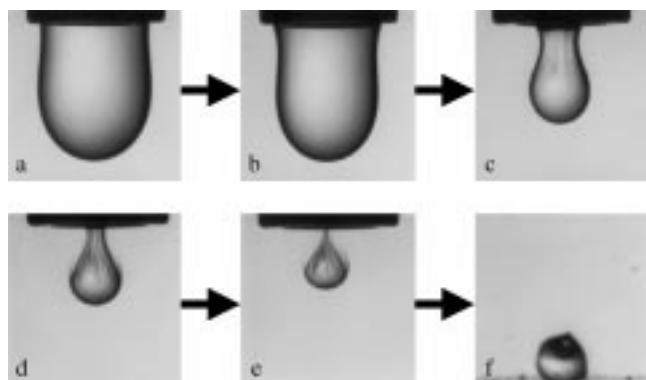


Abbildung 2. Bilder von Tropfen, die mit β -Lactoglobulin oder Lipid/ β -Lactoglobulin an der Chloroform/Wasser-Grenzfläche bedeckt sind, nach unterschiedlichen Adsorptionszeiten. a) Ein frisch produzierter β -Lactoglobulin-Tropfen ($c_{\beta\text{-Lactoglobulin}} = 1.2 \text{ mg L}^{-1}$). b) Nach 3500 s war der Tropfen mit einer Adsorptionsschicht aus reinem Protein bedeckt und begann zu schrumpfen. c) Eine hautähnlich gefaltete Tropfenoberfläche bildete sich nach einer Adsorptionszeit von 4300 s. d) Bei Zusatz von DPPC ($c_{\text{DPPC}} = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$) bildete sich die gefaltete Tropfenoberfläche bereits nach 3000 s. e) Nach 4300 s kollabierte der geschrumpfte Tropfen an der Kontaktfläche zur Kapillare. f) Der abgefallene Tropfen liegt wie ein Ball auf dem Boden der Kuvette.

[*] Prof. Dr. J. B. Li, Y. Zhang, L. L. Yan

International Joint Laboratory
Center for Molecular Science
Institute of Chemistry
Chinese Academy of Science
De Wai, Bei Sha Tan, Beijing 100101 (Volksrepublik China)
Fax: (+86) 10-6487-9375
E-mail: jbli@ultra1.ipc.ac.cn

[**] Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft, vom Präsidentenfonds der chinesischen Akademie der Wissenschaften und von der staatlichen chinesischen Stiftung für Naturwissenschaften (NNSFC) unterstützt. Wir danken Marc Schneider für die Durchführung der AFM-Messungen und Prof. Dr. Helmut Möhwald (MPI, Golm) für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

schließlich auf den Boden der mit der Protein-Pufferlösung gefüllten Küvette (Abbildung 2 f).

Die Bildung der hautähnlichen, fältigen Oberfläche (Abbildung 2c–e) deuten wir auf der Grundlage von Atomkraftmikroskopie(AFM)-Messungen als Bildung einer Multischicht auf der gekrümmten Oberfläche. Für diese Messungen wurde der abgelöste Tropfen (Abbildung 2 f) vom Boden der Küvette auf ein Glimmersubstrat übertragen, das wässrige Lösungsmittel abgepumpt und das organische durch Verdunstung entfernt. Der zurückbleibende Film wurde durch Oberflächenkraftmikroskopie in der Mitte und am Rand zur Glimmerunterlage untersucht (Abbildung 3 und 4).

In Abbildung 3 ist das kraftmikroskopische Profil eines Tropfens nach dem Trocknen abgebildet, der mit einer Schicht aus adsorbiertem DPPC und β -Lactoglobulin bedeckt war und auf das Glimmersubstrat übertragen wurde, bevor sich die fältige Oberfläche bildete (Abbildung 2 b). Anhand der Oberflächenmorphologie ist deutlich zu erkennen, dass es sich um eine Monoschicht handelt. Die maximale Peakhöhe beträgt 1.7 nm und der Durchmesser von Bereichen aggregierter Moleküle (helle Flächen) 35 nm, was vermuten lässt, dass das Protein nach dem Trocknen von Phospholipiden umgeben ist. Die Dicke der reinen Phospholipidschicht beträgt laut früheren Angaben^[4] 2 nm. Somit kann die Gesamtdicke des Films auf 4–5 nm abgeschätzt werden.

Abbildung 4 C zeigt die Oberfläche des getrockneten Tropfens nach der Faltenbildung auf dem Glimmersubstrat. Die maximale Höhe der Peaks liegt bei 1.8 nm, ihr Durchmesser an der Basis 35 nm. Ein Vergleich mit Abbildung 3 A zeigt, dass hier mehr Protein in die Phospholipidschichten eingebettet ist, ein Hinweis darauf, dass ein großer Anteil des Proteins an der Grenzfläche adsorbiert ist und sich mit dem Phospholipid vermischt hat. Wir vermuten, dass die beiden Komponenten an der Grenzfläche miteinander wechselwirken und so den Coadsorptionsfilm stabilisieren. Andernfalls würden sich wegen der aggregierten Proteineinheiten Löcher bilden, die in dem 3D-Bild in Abbildung 4 C zu sehen sein müssten. Dass β -Lactoglobulin in der Lage ist, infolge hydrophober Wechselwirkungen in Phospholipidschichten einzudringen, wurde bereits beschrieben.^[5]

Weiterhin haben wir die Faltenstruktur am Rand zum Glimmersubstrat durch schrittweise Messungen mit der AFM-Spitze untersucht. Es ergab sich für den fältigen Film eine Dicke von 2.5 μ m, was auf mehrere, einander überlagerte Schichten schließen lässt (Abbildung 4 A, B). Die Schichten sind nicht identisch. Es muss betont werden, dass es sich bei der dargestellten fältigen Schicht nicht um eine einzelne Monoschicht handelt, nicht zuletzt weil die Übertragung auf das Glimmersubstrat und das Trocknen des Tropfens

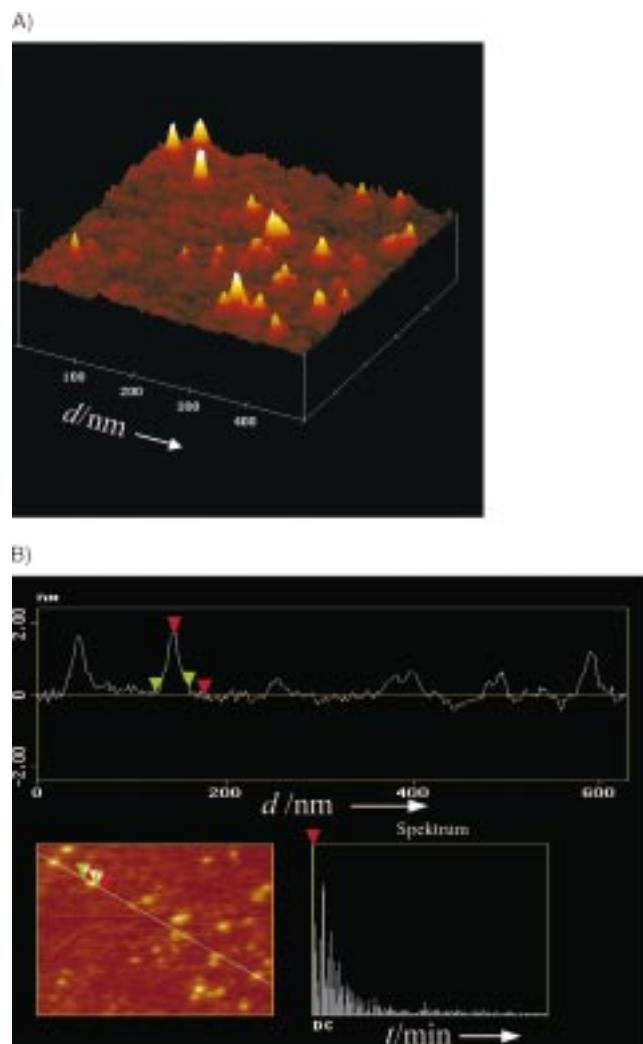


Abbildung 3. 3D-AFM-Bild (A) und Höhenprofil (B) des auf einem Glimmersubstrat platzierten komplexen DPPC/β-Lactoglobulin-Films von einer nichtgefalteten Tropfenoberfläche. Die Übertragung auf das Glimmersubstrat und die Trocknung erfolgten nach einer Adsorptionszeit von ca. 3000 s.

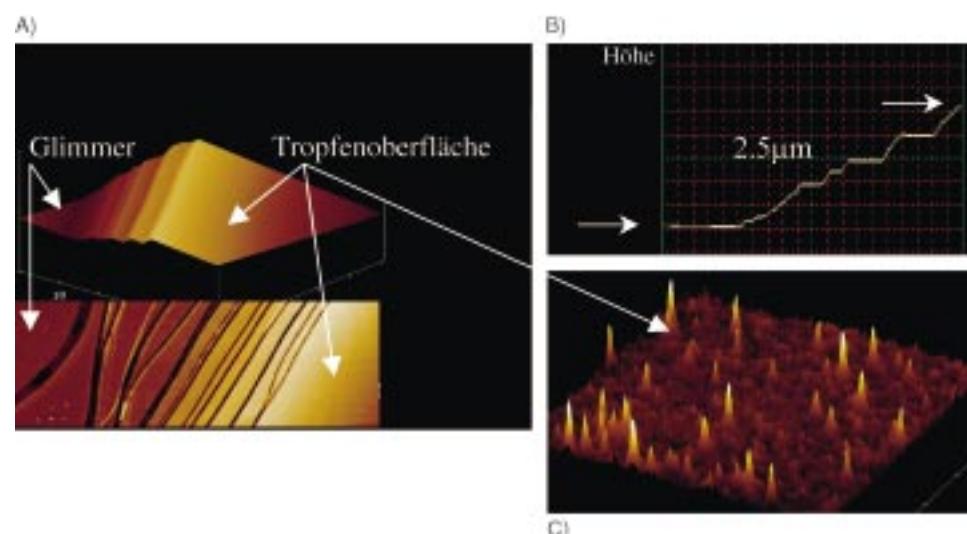


Abbildung 4. 3D-AFM-Bilder (A, C) und Höhenprofil (B) des auf einem Glimmersubstrat platzierten komplexen DPPC/β-Lactoglobulin-Films von einer fältigen, hautähnlichen Tropfenoberfläche. Die Übertragung auf das Glimmersubstrat und die Trocknung erfolgten nach dem Kollaps des Tropfens.

eine inhomogene Faltung an den Rändern hervorgerufen haben könnten. Unter der Annahme, dass eine DPPC/ β -Lactoglobulin-Mischschicht 5 nm dick ist, ergibt dies mit der Gesamtdicke von 2.5 μm eine Zahl von 500 Schichten. Daher ist anzunehmen, dass die hautartige Faltung am „Hals“ der Tropfen das Resultat der Bildung von Mehrfachschichten ist.

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass die Adsorption von reinem DPPC an der gleichen Grenzfläche mit steigender Volumenkonzentration zu einer Änderung der Tropfenform führen kann.^[6] Eine hautartig gefaltete Oberfläche wurde jedoch selbst bei sehr hohen Volumenkonzentrationen (oberhalb der kritischen Micellkonzentration), bei denen ein dicht gepackter Adsorptionsfilm den Tropfen bedeckt, nicht beobachtet.

Um diese Ergebnisse besser verstehen zu können, haben wir die Filmeigenschaften weiter untersucht und Experimente mit veränderten Lipid-Kopfgruppen und pH-Werten der wässrigen Phase durchgeführt. L- α -Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE) hat die gleiche Kettenlänge wie DPPC aber eine andere Kopfgruppe (NH_3^+ statt NMe_3^+). Unter gleichen Bedingungen ist die Adsorption von β -Lactoglobulin in Gegenwart von DPPE schneller als in Gegenwart von DPPC, wie die Kinetikkurven in Abbildung 5A zeigen. Entsprechend ist die Zeit bis zum Beginn des Schrumpfens des Tropfens mit DPPE 200 s kürzer als mit DPPC. Die Zeit, nach der sich eine hautähnlich gefaltete Oberfläche gebildet hat, ist ebenfalls kürzer. Die Coadsorptionskinetik von

gemischem Lipid/Protein beeinflusst erwartungsgemäß die Geschwindigkeit der Faltenbildung an der Oberfläche des Tropfens und somit auch die Bildung der Multischichten.

DPPC ist ein zwitterionisches Lipid.^[1, 7] Änderungen im pH-Wert der wässrigen Phase können den Ladungszustand von β -Lactoglobulin beeinflussen. Der isoelektrische Punkt von β -Lactoglobulin liegt bei pH 5.2.^[1] Daher erwarten wir zwischen pH 4 und 6 keinen merklichen Einfluss auf das Coadsorptionsverhalten. Tatsächlich zeigen die Kinetikkurven in Abbildung 5B die erwarteten Ergebnisse. Bei pH-Werten zwischen 7 und 8 haben sowohl das Lipid als auch β -Lactoglobulin eine negative Nettoladung, und die Adsorptionsgeschwindigkeiten sind ähnlich. Abbildung 5B zeigt, dass die Adsorption bei pH 7 oder 8 etwas schneller ist als bei pH 4–6. Dieser Effekt ist aber nicht besonders ausgeprägt. Das bedeutet, dass die Coadsorption hauptsächlich kinetisch kontrolliert ist und nicht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Substanzen beruht.

Alle Adsorptionskurven erreichen schließlich das gleiche Niveau, d. h., die Adsorption erreicht einen Gleichgewichtszustand. Der pH-Wert beeinflusst die Adsorptionsgeschwindigkeit der DPPC/ β -Lactoglobulin-Mischung wie erwartet nur wenig, und auch die Schrumpfzeit des Tropfen und die Zeit für die Bildung der hautähnlichen faltigen Oberflächenstruktur hängen kaum vom pH-Wert ab.

Fazit: Ein komplexer Film auf einer gekrümmten Oberfläche kann durch die Coadsorption zweier Komponenten aus unterschiedlichen Phasen gebildet werden. Sowohl reines β -Lactoglobulin als auch die DPPC/ β -Lactoglobulin Mischung können einen hautähnlichen faltigen Film auf einer Tropfenoberfläche an der Chloroform-Wasser-Grenzfläche bilden. Die Zugabe von DPPC beschleunigt die Bildung der faltigen Struktur an der Tropfenoberfläche durch eine Coadsorption mit β -Lactoglobulin. Die AFM-Analyse lieferte Informationen zur Morphologie des komplexen Films und bestätigte die Bildung von Multischichtstrukturen an der Flüssig/flüssig-Grenzfläche.

Das Design solcher komplexen Filme kann auf die Gas/Wasser-Grenzfläche und andere Zweikomponentensysteme, die aus einem wasserunlöslichen Amphiphil und einem wasserlöslichen Tensid bestehen, erweitert werden. Die Fähigkeit solcher Systeme, Multischichten zu bilden, ermöglicht die Konstruktion von Polymerhohlkörpern durch die Adsorption der Polyelektrolyte auf kolloidalen Templaten,^[8] was für kosmetische und pharmazeutische Anwendungen bedeutsam sein kann.

In weiteren Arbeiten konzentrieren wir uns auf die quantitative Kontrolle der Zusammensetzung und der Struktur der Mischfilme sowie auf die treibende Kraft, die zur Bildung von Multischichten auf einer gekrümmten Oberfläche führt. Mit einer kleineren Kapillare mit 1 μm Durchmesser sollte es möglich sein, einen Blasenfilm zu bilden.

Experimentelles

L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), L- α -Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE) und β -Lactoglobulin (Reinheit 99 % +) sowie

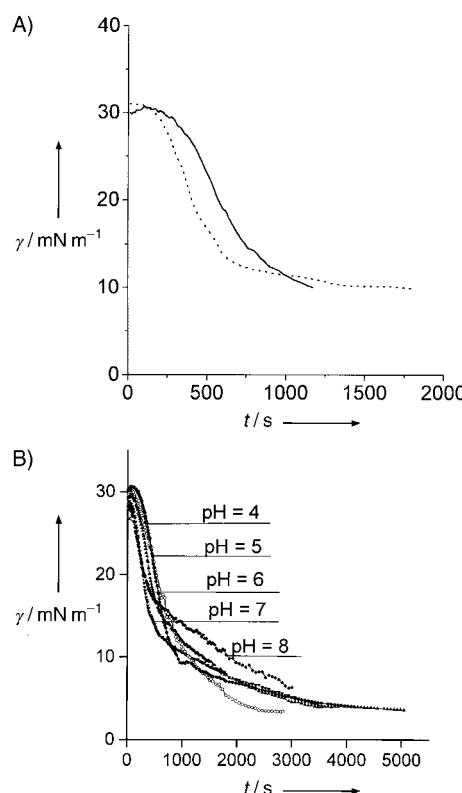


Abbildung 5. A) Kinetikkurven (γ = Grenzflächenspannung) der Coadsorption von DPPC (durchgezogene Linie) und DPPE (gestrichelte Linie) mit β -Lactoglobulin an der Chloroform/Wasser-Grenzfläche bei Raumtemperatur ($c_{\beta\text{-Lactoglobulin}} = 1.2 \text{ mg L}^{-1}$; $c_{\text{Lipid}} = 10^{-6} \text{ M}$). B) Einfluss des pH-Wertes auf die Kinetik der Coadsorption von DPPC und β -Lactoglobulin ($c_{\beta\text{-Lactoglobulin}} = 1.2 \text{ mg L}^{-1}$, $c_{\text{DPPC}} = 10^{-6} \text{ M}$) bei Raumtemperatur.

Chloroform (Reinheit 99 %) wurden von Sigma bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das Chloroform war mit Millipore-Wasser gesättigt. Das Protein wurde in 10 mM Phosphatpuffer gelöst. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um die Adsorption des reinen Proteins zu messen, wurde ein Chloroformtropfen ausreichender Größe an der Spitze einer Messingkapillare erzeugt, die in eine Lösung des Proteins in Phosphatpuffer eintaucht.

Für die Bestimmung der Coadsorption von Lipid und Protein wurden einige Tropfen einer Lösung des Lipids in Chloroform zunächst auf den Boden der mit wässriger Proteinlösung gefüllten Kuvette abgetropft, um eine gesättigte Umgebung zu bilden, und dann wurde ein neuer Tropfen erzeugt. Lipid- und Proteinmoleküle adsorbieren an der Innen- bzw. Außenseite der Chloroform/Wasser-Grenzfläche des hängenden Tropfens und bilden so einen Film. Die zeitliche Entwicklung der Tropfenform wurde mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Aus Form und Größe des Tropfens wurden unter Berücksichtigung der Adsorptionszeit der beiden Komponenten die Grenzflächenspannungen γ ermittelt. Die Aufnahme und Analyse der Bilder des hängenden Tropfens wurden wie in Lit. [2] beschrieben durchgeführt. Die Bildungszeit und die Lebensdauer des Tropfens wurden per Computer exakt erfasst.

Für die AFM-Messungen wurde eine gereinigte Glimmerplatte vorsichtig auf den Küvettenboden gelegt. Die Kuvette wurde mechanisch angehoben, sodass die Glimmerplatte den Tropfen berührte, bevor die Faltung der Oberfläche einsetzte (Abbildung 2b). Die wässrige Lösung in der Kuvette wurde mit einer Hamilton-Pumpe entfernt und das Lösungsmittel im Inneren verdampft. Der so erhaltene Film wurde mittels Oberflächenkraftmikroskopie untersucht. Eine ähnliche Prozedur wurde für den kollabierten Tropfen (Abbildung 2 f) angewendet.

Eingegangen am 4. November 1999,
veränderte Fassung am 14. September 2000 [Z14230]

- [1] M. Bos, T. Nylander, T. Arnebrant, D. C. Clark, *Food Emulsifiers and Their Applications* (Hrsg.: G. L. Hasenhüttl, R. W. Hartel), Chapman and Hall, New York **1997**, S. 95–146.
- [2] a) J. B. Li, V. B. Fainerman, R. Miller, *Langmuir* **1996**, *12*, 5138–5143;
b) J. B. Li, H. Chen, J. Wu, J. Zhao, R. Miller, *Colloids Surf. B* **1999**, *15*, 289–295.
- [3] M. A. Bos, T. Nylander, *Langmuir* **1996**, *12*, 2791–2797.
- [4] H. Clausen-Schaumann, M. Grandbois, H. E. Gaub, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 950–952.
- [5] V. B. Fainerman, J. Zhao, D. Vollhardt, A. V. Makievski, J. B. Li, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8998.
- [6] J. B. Li, R. Miller, H. Möhwald, *Colloids Surf. A* **1996**, *114*, 113–121.
- [7] U. Dahmen-Levison, G. Brezesinski, H. Möhwald, *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1998**, *110*, 269–274.
- [8] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem.* **1998**, *16*, 2324–2326; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *16*, 2201–2205.

Chirale molekulare Erkennung bei der Bildung eines Metalloanthocyan: ein supramolekulares Metallkomplexpigment aus blauen Blumen der Gattung *Salvia patens***

Tadao Kondo,* Kin-ichi Oyama und Kumi Yoshida

Meistens wird die Farbe blauer Blumen durch ein Metalloanthocyan hervorgerufen,^[1, 2] ein stöchiometrisches, selbst-organisiertes, supramolekulares Pigment aus sechs Molekülen eines Anthocyan und sechs eines Flavons sowie zwei Metallatomen.^[3, 4] Wir haben Metalloanthocyan aus den Blättern verschiedener blauer Blumen isoliert und deren Strukturen bestimmt sowie die Entstehung der blauen Farbe durch chemisches Nachbauen einiger Übermoleküle und NMR-spektroskopische sowie röntgenographische Strukturanalysen nachvollzogen.^[1, 3] Bei diesem Nachbauen zeigte sich, dass eine sehr fein strukturierte und strikte molekulare Erkennung^[5] vorliegt, zu der auch eine chirale molekulare Erkennung gehört. Die aromatischen Chromophore von Commelinin und Protocyan bilden chirale Stapel, wobei sich jeweils zwei Anthocyan- oder zwei Flavonmoleküle im Gegenuhrzeigersinn sowie Anthocyanidin- und Flavonkerne im Uhrzeigersinn stapeln (Copigmentierung).^[3] Diese Abläufe müssen durch die Chiralität der an die Anthocyanidin- und Flavon-Einheiten gebundenen Zuckerreste bedingt sein, obwohl bislang keine Belege für diese Hypothese vorliegen.

Wir beschreiben hier die chirale molekulare Erkennung bei der Bildung des Metalloanthocyan Protodelphin **1**.^[6] Die Bestimmung der Zusammensetzung von **1**, einem genuinen Pigment aus den blauen Blättern der Salbeiplanze *Salvia patens* (Abbildung 1), ergab als Bausteine das Anthocyan Malonylawobanin **2**,^[7] das Flavon Apigenin-7,4'-di-O- β -D-glucosid **3a**^[6, 8] und Mg²⁺-Ionen (Schema 1). Allgemein verwendbare und effiziente Synthesen für Anthocyane und/oder Flavone, die die optischen Antipoden der Glycoside enthalten, sind für Untersuchungen der molekularen Erkennung notwendig. Wir haben eine verlässliche Glycosylierungs methode für wenig reaktive Phenole in Flavonoiden entwickelt, bei der eine neuartige Lewis-Säure/Base-vermittelte Glycosylierung^[9] mit Peracetylglucosylfluorid **4**^[10] verwendet wird. Damit ließen sich natürliches Apigenin-7,4'-di-O- β -glucosid **3a** und nichtnatürliche Derivate herstellen, die (teilweise) L-Glucose enthalten (**3b–d**). Die Verwendung dieser synthetischen Apigeninderivate und von natürlichem **2** in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen ermöglichte die Untersuchung der

[*] Prof. Dr. T. Kondo, K.-i. Oyama
Chemical Instrument Center
Nagoya University
Furo-cho, Chikusa, Nagoya 464-8602 (Japan)
Fax: (+81) 52-789-3062
E-mail: tkmail@cic.nagoya-u.ac.jp
Prof. Dr. K. Yoshida
Graduate School of Human Informatics
Nagoya University
Furo-cho, Chikusa, Nagoya 464-8601 (Japan)

[**] Wir danken Y. Maeda (Chemical Instrument Center, Nagoya University) für Hilfe beim Molecular Modeling. Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Erziehung, Wissenschaft, Sport und Kultur unterstützt (COE-Forschungs-Nr. 07CE2004).