3 Experimenteller Teil

3.1 Untersuchte Proben und Probenvorbereitung

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proben wurden in den Laboratorien von Unilever R&D Vlaardingen angefertigt und der Autorin für die Messungen zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Die Monoglycerid-Gel-Proben

Es wurden zwei Monoglycerid-Gel-Serien mit verschiedenen Gewichtskonzentrationen von Monoglyceriden unterschiedlicher Kettenlänge (s. Kap.2.1.2) untersucht. Die verwendeten Monoglyceridkonzentrationen waren 3, 6, 9, 12 und 15% für das Monomyristate (Glycerinmonomyristat, Kohlenstoffkettenlänge C14), sowie 6, 9, 12 und 15% für das Hymono (Gemisch aus Glycerinmonopalmitat und Glycerinmonostearat, Kohlenstoff-kettenlängen C16 und C18). Den restlichen Prozentanteil machte jeweils Wasser aus. Die beiden Serien werden im weiteren Verlauf mit C14 und C16/18 bezeichnet. Alle Proben wurden direkt in 10mm NMR-Röhrchen hergestellt, so dass keine weitere Probenvorbereitung zur Durchführung der NMR-Messungen notwendig war. Die Füllhöhe betrug jeweils ca. 1cm.

3.1.2 Die Wasser-in-Öl-Emulsion-Proben

Zur Untersuchung standen drei Probenserien mit unterschiedlich hochkonzentrierten Wasser-in-Öl(W/O)-Emulsionen von 40 und 20% Wasseranteil zur Verfügung. Jeweils die Hälfte der Emulsionen war nicht flokkuliert bzw. flokkuliert. Als erster Emulgator wurde für alle Emulsionen bei der Herstellung Polyglycerol Polyricinoleat, ein stark lipophiles Tensid, verwendet. Bei den flokkulierten Emulsionen wurde zusätzlich eine Mischung von ungesättigten Monoglyceriden, gewonnen aus Sonnenblumenöl, als zweiter Emulgator zur Initiierung der Flokkulation zugegeben. Sowohl die nicht flokkulierten als auch die flokkulierten Emulsionen enthielten jeweils ein Biopolymer als Geliermittel in der wässrigen

Phase. Es wurden entweder gelatine, ein Polypeptid aus tierischem Collagen, gellan gum, ein vom Mikroorganismus *Pseudomonas elodea* erzeugtes Polysaccharid, oder whey protein, ein Molke-Protein, verwendet. Die verschiedenen Geliermittel wurden der wässrigen Phase in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt. Vom whey protein wurden 7,5Gew.%, vom gelatine 5Gew.% und vom gellan gum 0,4Gew.% verwendet. Eine wichtige Charakteristik, in der sich die Biopolymere signifikant unterscheiden, ist ihr Vermögen als oberflächenaktive Substanz zu wirken. Während das whey protein stark oberflächenaktiv ist, ist das gelatine nur leicht und das gellan gum gar nicht oberflächenaktiv.

Tabelle 5 gibt einen Überblick aller probenspezifischen Daten und Bezeichnungen der verwendeten W/O-Emulsionen.

Probenserie	Emulsion	Zustand	Biopolymer	Konzentration
1	A	nicht flokkuliert	gelatine	40%
	B	flokkuliert	gelatine	40%
	D	nicht flokkuliert	gellan gum	40%
	E	flokkuliert	gellan gum	40%
	C	nicht flokkuliert	whey protein	40%
	F	flokkuliert	whey protein	40%
2	G	nicht flokkuliert	gelatine	40%
	H	flokkuliert	gelatine	40%
	I	nicht flokkuliert	gellan gum	40%
	J	flokkuliert	gellan gum	40%
	K	nicht flokkuliert	whey protein	40%
	L	flokkuliert	whey protein	40%
3	M	nicht flokkuliert	gelatine	20%
	N	flokkuliert	gelatine	20%
	O	nicht flokkuliert	gellan gum	20%
	P	flokkuliert	gellan gum	20%
	R	nicht flokkuliert	whey protein	20%
	S	flokkuliert	whey protein	20%

Tab.5: Auflistung aller untersuchten Wasser-in-Öl-Emulsionen.

Die verschiedenen untersuchten Probenserien der W/O-Emulsionen variieren somit in folgenden Punkten

- nicht flokkuliert oder flokkuliert
- Wasserkonzentration
- Biopolymer in der wässrigen Phase

Es ist noch anzumerken, dass die 20%tige Probenserie 3 nicht neu angesetzt wurde, sondern aus einer Verdünnung der 40%tigen Probenserie 2 hergestellt wurde.
Bis auf zwei Ausnahmen wurden alle W/O-Emulsionen mit Hilfe eines Trichters in die 10mm NMR-Röhrchen gefüllt. Bei den Emulsionen F und L musste ein Spatel zur Befüllung verwendet werden. Auch hier wurden die Röhrchen immer auf eine Höhe von ca. 1cm gefüllt.

3.2 Verwendete Geräte

3.2.1 Das DSX NMR-Spektrometer

Alle Protonen-PFG-Diffusionsmessungen, sowie die T_1-Relaxationsmessungen wurden an einem 300MHz DSX NMR-Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt. Der verwendete Diff25-Probenkopf ist mit einer 10mm Protonen-Spule ausgestattet und die Gradienteneinheit kann eine maximale Gradientenstärke von 1000G/cm erzeugen.
Die voreingestellte Kalibration des Gradienten durch den Gerätehersteller wurde anhand einer Messreihe überprüft. An einer Wasserprobe wurden Diffusionsmessungen bei steigender Gradientenstärke durchgeführt und der Diffusionskoeffizient berechnet. Es ergab sich im Mittel von acht Messungen bei verschiedenen Diffusionszeiten für den Diffusionskoeffizienten von Wasser bei 298K ein Wert von $D = 2{,}3*10^{-9}$ +/- $0{,}04*10^{-9} m^2/s$. Der Literaturwert liegt bei $D^{298K} = 2{,}3*10^{-9} m^2/s$[69] .
Die Preemphasis wurde, mit Hilfe des modifizierten Bruker-Pulsprogramms Imprampbp für „ramped“ bipolare Gradienten (s. Kap.8.3), so eingestellt, dass ein nach einer Wartezeit von 400µs aufgenommenes Echo keinerlei Beeinflussung durch magnetische Wirbelströme zeigte.
Für die durchgeführten Tieftemperaturmessungen wurde ein Zusatzgerät, ein sog. cold finger, verwendet, der einen stetigen Stickstoffstrom zur Kühlung der Proben im Probenkopf

produziert. Die gewünschte Messtemperatur von 278K wurde anhand von Methanolmessungen genau eingestellt. Die Differenzfrequenz der beiden Protonenpeaks (-C**H**$_3$ und -O**H**) im Spektrum des Methanols ist temperaturabhängig, wobei eine Differenz von 526Hz bei einer Protonenfrequenz von 300MHz einer Probentemperatur von 278K entspricht[70].

3.2.2 Das Minispec NMR-Spektrometer

Die T_2-Relaxationsmessungen wurden mit einem 20MHz Minispec, dem MQ20, der Firma Bruker durchgeführt. Dieses „Labortisch"-Spektrometer wird in der Hauptsache zur Qualitäts- und Prozesskontrolle eingesetzt und führt Standardmessungen nach Programmanwahl vollautomatisch durch.

3.3 Messungen und Auswertung

3.3.1 T_2- und T_1-Relaxationsmessungen

Für die T_2-Relaxationsmessungen von Wasser in den Monoglycerid-Gelen, sowie von reinem Wasser, wurde eine Carr-Purcell-Meiboom-Gill[71,72]-Pulssequenz verwendet (Abb.33).

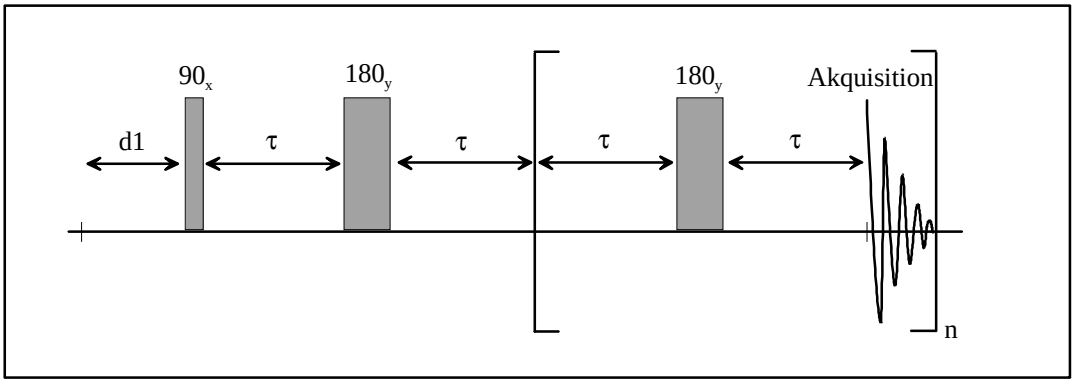

Abb.33: Schematische Darstellung der Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Pulssequenz zur Bestimmung von T_2-Relaxationszeiten.

Bei allen vermessenen Proben betrug die Wartezeit τ 0,1ms, das recycle delay 15s und die Anzahl der Scans 32. Weitere relevante Parameter wurden vom MQ20-Spektrometer für jede Messung automatisch optimiert. Es wurde jeweils bei einer Temperatur von 298K gemessen. Die erhaltenen Werte für die Echointensität in Abhängigkeit von der Zeit wurden über ein Programm ausgewertet, das einen CONTIN Algorithmus nach Provencher[73] verwendet. Der Kurvenverlauf des jeweiligen eingelesenen Datensatzes wird hier, innerhalb eines festgelegten T_2-Intervalls, multiexponentiell gefittet. Für alle Auswertungen wurde eine Anzahl von 80 Punkten in einem Zeitintervall von 0,033 bis 33333,33ms gewählt. Man erhält als Ergebnis 80 Werte für relative Intensitäten aufgetragen gegen eine logarithmischen Skala von T_2-Relaxationszeiten, also eine Verteilung von T_2-Relaxationszeiten. Die entsprechenden T_2-Verteilungen aller vermessenen Proben sind im Anhang (Kap.8.1.1) aufgeführt.

Die T_1-Relaxationsmessungen von Öl in den W/O-Emulsionen wurden mit einer Inversion-Recovery-Pulssequenz[74,75] bei 298 und 278K durchgeführt (Abb.34). Für alle Messungen betrug das recycle delay 5s, die Anzahl der Scans 16 und die variable Wartezeit vd durchlief jeweils 16 Werte (Tab.6). Weitere Parameter wurden für jede Probe individuell eingestellt.

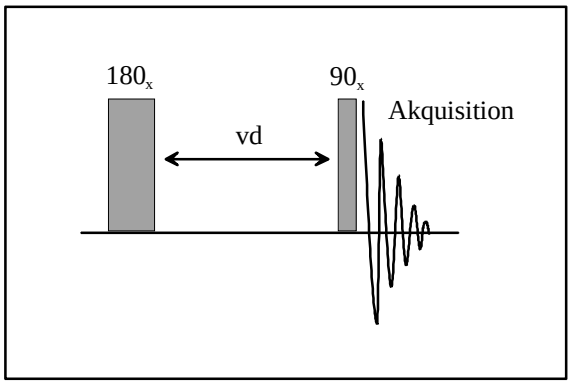

Abb.34: Schematische Darstellung einer Inversion-Recovery-Pulsfolge zur Bestimmung von T_2-Zeiten.

vd [s]	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,8	1,0	1,3	1,6	3,2	6,4	10

Tab.6: Wartezeiten (vd) für das Inversion-Recovery-Experiment.

Die erhaltenen Intensitätskurven wurden mit dem Brukerprogramm XWIN-NMR ausgewertet und somit die T_1-Relaxationszeiten für das Öl bestimmt. Die T_1- Zeiten sowie die über $\ln 2 * T_1$ berechneten T_0-Zeiten sind für alle W/O-Emulsionen tabellarisch im Anhang (Kap.8.1.2) aufgelistet.

3.3.2 PFG-Diffusionsmessungen

Die Diffusionsmessungen an den Monoglycerid-Gelen wurden mit einer erweiterten PFGSTE-Pulssequenz, die schon in Kapitel 2.3.1 (Abb.13) beschrieben wurde, bei 298K durchgeführt. Für alle Messungen betrugen das recycle delay 5s, das eddy current delay 55ms, die Länge des Gradientenpulses δ 0,7ms und die Länge der Wartezeiten δ_1 und δ_2 jeweils 0,15ms. Es wurden 32 Gradientenschritte gewählt, wobei der erste Gradientenpuls immer einen Wert von null hatte, während die maximale Gradientenstärke in Abhängigkeit von der Diffusionszeit Δ wie folgt gesetzt wurde:

Diffusionszeit Δ	4 – 10 ms	25 – 100 ms	200 – 1000 ms
max. Gradientenstärke	200 G/cm	100 G/cm	30 G/cm (C14) 50 G/cm (C16/18)

Tab.7: Maximale Gradientenstärke in Abhängigkeit von der Diffusionszeit.

Ein Spoiler-Gradient mit einer Stärke von 100G/cm und einer Dauer von 0,7ms wurde nur im Δ-Bereich von 4 bis 10ms verwendet. Alle weiteren relevanten Parameter wurden für jede Probe individuell eingestellt.

Die im Experiment gemessenen FIDs wurden mit XWIN-NMR ausgewertet und die so ermittelten Echointensitäten in Abhängigkeit von der Gradientenstärke mit den Programmen MS-Excel 97 und Microcal Origin 6.0 weiter ausgewertet. Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten des Wassers diente die folgende Fitgleichung[76,77]:

$$\ln\left(\frac{E(\mathbf{g})}{E(0)}\right) = -4\gamma^2\delta^2\mathbf{g}^2 D\left(\Delta - \frac{T}{2} - \frac{\delta}{6}\right). \qquad (96)$$

Sie basiert auf der im theoretischen Teil bereits angesprochenen Auswertegleichung für PFG-Experimente (Gl.58), wobei die Modifizierung im Δ-Term (runde Klammer) in der Verwendung von bipolaren Gradientenpulsen begründet ist.

Für die Diffusionsmessungen der W/O-Emulsionen wurde eine modifizierten PFGSTE-Pulsfolge mit zusätzlichem T_1-Filter, beschrieben in Kapitel 2.3.1 (Abb.14), verwendet. Das recycle delay hatte eine Länge von 3 bzw. 5s, die Gradientenpulslänge δ betrug 2ms und die Wartezeit δ_1 0,3ms. Der Spoiler-Gradient besaß eine Stärke von 10G/cm und eine Länge von

2ms. Die Messungen an den Probenserien 2 und 3 wurden bei einer Temperatur von 278K durchgeführt, während Serie 1 sowohl bei 278 als auch bei 298K vermessen wurde. Die Anzahl der Gradientenschritte betrug 64 bzw. 32, wobei der erste Gradient immer den Wert null hatte. Die maximale Gradientenstärke wurde für die verschiedenen Serien variiert. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die verwendeten Parameter:

Probenserie	**1**	**2**	**3**
recycle delay	5 s	3 s	3 s
Gradientenstärke	500 G/cm	500 G/cm	300 G/cm
Gradientenschritte	64	32	32

Tab.8: Parameter der Messungen an W/O-Emulsionen.

Die Länge T_0 des T_1-Filters, sowie alle weiteren relevanten Messparameter wurden für jede Probe individuell optimiert.

Die aufgenommenen FIDs wurden mit Hilfe des Programms XWIN-NMR von Bruker bearbeitet und die resultieren Intensitätskurven unter Verwendung von MS-Excel 97, Microcal Origin 6.0, Mathworks Matlab 6.1, Wolfram Research Mathematica 4 und einem bei Unilever entwickelten Fitprogramm weiter ausgewertet.