Universität Ulm

Institut für Analytische und Bioanalytische Chemie

und

Arbeitsgruppe Laseranwendungen in der Chemie

Cavity-Ring-Down-Spektroskopie als nachweisstarke Detektionsmethode in analytischen Fließsystemen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät für Naturwissenschaften

der Universität Ulm

vorgelegt von

Markus Vogelsang

aus Riedlingen

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Axel Groß

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Welsch

2. Gutachter: Prof. Dr. Harold Jones

Tag der Promotion: 28.07.2011

„Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns."

Richard P. Feynman

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **i**

1 Einleitung und Motivation ..... **- 1 -**

2 Die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie ..... **- 4 -**

2.1 Entwicklung der Spektroskopie ..... **- 4 -**

2.2 Die Absorptionsspektroskopie ..... **- 6 -**

2.3 Die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie ..... **- 7 -**

2.3.1 Entwicklung der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie ..... - 8 -

2.3.2 Aufbau eines Cavity-Ring-Down-Systems ..... - 9 -

2.3.2.1 Das Lasersystem ..... - 11 -

2.3.2.2 Der optische Resonator ..... - 12 -

2.3.2.3 Die hochreflektierenden Spiegel ..... - 15 -

2.3.3 Signalverhalten bei der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie ..... - 17 -

2.3.4 Analytische Informationen ..... - 21 -

3 Cavity-Ring-Down-Spektroskopie als Detektionsmethode in analytischen Fließsystemen ..... **- 24 -**

3.1 Detektionsmethoden in analytischen Fließsystemen ..... **- 24 -**

3.2 Cavity-Ring-Down-Spektroskopie in der flüssigen Phase ..... **- 25 -**

3.3 Experimenteller Aufbau ..... **- 29 -**

3.3.1 Allgemeiner Aufbau ..... - 29 -

3.3.2 Entwicklung eines frei fließenden Tensidfilms ..... - 30 -

3.3.3 Kombination mit analytischen Trennsystemen ..... - 35 -

3.4 Detektion und Bestimmung von Nitroaromaten ..... - 35 -

3.4.1 Das Trennsystem ..... - 36 -

3.4.2 Die verwendeten Analyten ..... - 37 -

3.4.3 Bestimmung der Schichtdicke des Tensidfilms ..... - 37 -

3.4.4 Trennung eines Nitroaromatengemischs ..... - 38 -

3.4.5 Quantifizierung am Beispiel von Pikrinsäure ..... - 40 -

3.5 Diskussion und Ausblick ..... - 41 -

4 Evanescent-Wave-CRDS zur Untersuchung von Oberflächenprozessen ... - 44 -

4.1 Evanescent-Wave-Cavity-Ring-Down-Spektroskopie ..... - 44 -

4.1.1 Prinzip der Evanescent-Wave-CRDS ..... - 44 -

4.1.2 Effektive Schichtdicke und Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes ..... - 46 -

4.1.3 Anwendungen der Evanescent-Wave-CRDS ..... - 49 -

4.2 Experimenteller Aufbau ..... - 53 -

4.3 Untersuchung von Antikörper-Antigen-Reaktionen durch Evanescent-Wave-CRDS ..... - 55 -

4.3.1 Antikörper-Funktionalisierung der TIR-Grenzfläche ..... - 55 -

4.3.2 Labeln des Antigens mit DY-631-NHS ..... - 61 -

4.3.3 Untersuchung der Reaktion von DY-631-NHS mit Aminogruppen ..... - 62 -

4.3.4 Untersuchung von Antikörper-Antigen-Reaktionen in einer statischen Meßzelle ..... - 65 -

4.3.5 Untersuchung von Antikörper-Antigen-Reaktionen in einer Durchflußzelle ..... - 70 -

4.3.6 Diskussion und Ausblick ..... - 74 -

4.4 Verbesserung der Nachweisgrenze in Fließsystemen durch Anreicherung im Bereich des evaneszenten Feldes ..... - 77 -

4.4.1 Funktionalisierung der TIR-Grenzfläche mit Polysiloxanen ..... - 77 -

4.4.2 Anreicherung im Bereich des evaneszenten Feldes am Beispiel von Brillantgrün..... - 79 -

4.4.3 Diskussion und Ausblick ..... - 84 -

5 Zusammenfassung..... - 86 -

6 Summary..... - 90 -

7 Literaturverzeichnis..... - 93 -

Danksagung..... - 108 -

Anhang ..... - 110 -

Abbildungsverzeichnis ..... - 110 -

Tabellen- und Schemataverzeichnis..... - 113 -

Abkürzungsverzeichnis ..... - 114 -

Publikationen..... - 116 -

Lebenslauf..... - 117 -

Erklärung..... - 119 -

1 Einleitung und Motivation

Für die Analyse von Stoffgemischen in der flüssigen Phase stellt die analytische Chemie heutzutage eine Vielzahl an Trennmethoden zur Verfügung. Am verbreitetsten sind dabei die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) [1] und die Kapillarelektrophorese (CE, Capillary Electrophoresis) [2]. Neben dem Trennsystem ist dabei das Detektionssystem der wichtigste Bestandteil jedes Trennverfahrens. Als Detektoren in der flüssigen Phase kommen hauptsächlich Brechungsindex-, Fluoreszenz-, Leitfähigkeits-, Verdampfungs-Lichtstreu- und UV/Vis-Detektoren zum Einsatz. Vor allem die UV/Vis-Detektion ist durch ihre universelle Einsetzbarkeit, ihre Robustheit und ihren geringen Preis weit verbreitet.

Die elektrophoretischen Trennmethoden sowie die Miniaturisierung in der HPLC in Form von Mikro- und Nano-HPLC [3] begründeten gleichzeitig die Notwendigkeit von nachweisstarken, für Detektionsvolumina im Mikro- bzw. Nanoliterbereich geeigneten Detektionsmethoden. Zum Einsatz kommen hier unter anderem elektrochemische Detektoren, die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) sowie die Massenspektrometrie (MS), die jedoch alle mit gewissen Nachteilen verbunden sind. Die Massenspektrometrie ist apparativ sehr aufwendig sowie kostenintensiv in der Anschaffung, die elektrochemische Detektion verlangt bestimmte Anforderungen an die Zusammensetzung und die Reinheit der mobilen Phase und die LIF setzt ein Labeling der Analyten mit einem Fluoreszenzfarbstoff voraus.

Bei den am häufigsten eingesetzten UV/Vis-Detektoren hängt die Nachweisstärke sehr stark davon ab, wie gut die von der verwendeten Lichtquelle eingestrahlte Intensität I_0 sowie die Intensität I nach dem Durchgang durch die Probe und somit das Verhältnis $\Delta I/I$ bestimmt werden können. Dieses Verhältnis liegt aktuell im Bereich von $5 \cdot 10^{-5}$. Zusätzlich ist die Nachweisstärke von der optischen Weglänge durch die absorbierende Schicht abhängig. Die optische Weglänge läßt sich jedoch ohne Erhöhung des Durchmessers der Detektionszelle nicht beliebig verlängern. Die Lichtbrechung an den Wänden der Detektionszelle würde

ansonsten zu einem verringerten Lichtdurchsatz führen, wodurch sich wiederum das Signal/Rausch-Verhältnis verschlechtert. Eine Erhöhung des Durchmessers der Detektionszelle ist jedoch mit einem größeren Detektions- und somit Totvolumen verbunden und aufgrund der dadurch auftretenden Bandenverbreiterungen nicht akzeptabel. Bei einem herkömmlichen UV/Vis-Detektor steigt das Signal/Rausch-Verhältnis außerdem mit der Quadratwurzel der eingestrahlten Lichtintensität, wodurch sehr intensive Lichtquellen wie z. B. Laser hier einen Vorteil bieten würden. Dieser Vorteil wird bei Lasern aber gleichzeitig wieder durch die auftretenden starken Intensitätsschwankungen reduziert. Bei kommerziellen UV/Vis-Detektoren kommen deshalb meist intensitätsstabile Deuterium-, Xenon- oder Wolfram-Lampen zum Einsatz.

Die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie (CRDS) als relativ neue Methode im Bereich der Absorptionsspektroskopie bietet dagegen zum einen den Vorteil, unabhängig von der eingestrahlten Lichtintensität zu sein. Hier wird, anstatt des Verhältnisses von eingestrahlter Intensität und der Intensität nach dem Durchgang durch die Probe, das zeitliche Verhalten der eingestrahlten Intensität in einem optischen Resonator bestimmt. Zusätzlich werden bei dieser Methode durch den im Resonator reflektierten Lichtstrahl und den damit verbundenen wiederholten Durchgang durch die Probe, optische Weglängen erreicht, die um ein Vielfaches höher sind, als bei einem konventionellen UV/Vis-Detektor. Die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie bietet sich deshalb in analytischen Fließsystemen als Detektionsmethode bei geringen Detektionsvolumina sowie zum Nachweis geringer Analytkonzentrationen bzw. von Analyten mit geringen Extinktionskoeffizienten an.

Weiterhin lassen sich durch die Kombination der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie mit der Totalreflektion an der Grenzfläche zweier Phasen spezifisch Prozesse an oder im Bereich weniger hundert Nanometer über Oberflächen untersuchen. Häufig wird diese Methode zur Verfolgung von Adsorptionsprozessen an Oberflächen eingesetzt. Durch die vielfältigen Optionen zur Funktionalisierung von Quarzoberflächen ergeben sich dadurch aber auch interessante Einsatzmöglichkeiten zur Detektion in Fließsystemen oder im Bereich der bioanalytischen Sensorik.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie neue Detektionsmethoden für analytische Trennsysteme wie die HPLC sowie für Oberflächen- bzw. oberflächennahe Prozesse zu entwickeln. Das folgende Kapitel 2 gibt dazu einen Überblick über die theoretischen Grundlagen der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie. Anschließend folgen in Kapitel 3 für analytische Trennsysteme sowie in Kapitel 4 für Oberflächenprozesse der experimentelle Aufbau, die praktischen Anwendungen der entwickelten Detektionsmethoden sowie eine Diskussion der Ergebnisse. In Kapitel 5 werden die entwickelten Detektionsmethoden sowie die erhaltenen Ergebnisse dann nochmals zusammengefaßt.

2 Die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie

2.1 Entwicklung der Spektroskopie

Seit jeher konnten die Menschen beim Betrachten eines Regenbogens die Aufspaltung von sichtbarem Licht in seine farbigen Bestandteile beobachten. Doch eine Erklärung für dieses Phänomen gab es lange Zeit nicht. Anfang des 17. Jahrhunderts wurde dann bei den ersten Teleskopen ein ähnlicher Effekt beobachtet. Die unterschiedliche Brechung des sichtbaren Lichts an den verwendeten Linsen führte dazu, daß die beobachteten Objekte farbige Säume aufwiesen, die einem Regenbogen ähnelten. Dies brachte Isaac Newton dazu, sich mit der grundlegenden Natur des Lichts zu beschäftigen. Im Jahr 1666 führte er Sonnenlicht, das durch ein kleines Loch in einem Fensterladen fiel, durch ein Glasprisma und beobachtete dabei eine Aufspaltung des Lichts in verschiedene Farben. Führte er den aufgespaltenen Lichtstrahl danach durch ein zweites Prisma in umgekehrter Position, so vereinigten sich die Farben wieder zu weißem Licht. Aus diesen ersten spektroskopischen Experimenten schloß Newton, daß sich weißes Licht aus verschiedenen Farben zusammensetzt, die beim Durchgang durch ein Prisma unterschiedlich gebrochen werden [4].

Verbessert wurde Newtons Methode im Jahr 1802 durch William Wollaston, der durch die Verwendung eines schmalen Spalts anstatt eines Lochs eine Folge von farbigen Linien erhielt, die alle die Form des Spalts hatten [5]. Er entdeckte außerdem, daß dieses Spektrum des Sonnenlichts nicht kontinuierlich, sondern von etlichen dunklen Linien unterbrochen war, die er für die Grenzen der Grundfarben hielt. Intensiv untersucht wurden die dunklen Linien dann von Joseph Fraunhofer einige Jahre später [6]. Durch Verwendung eines Teleskops war er in der Lage, mehr als fünfhundert dieser Linien zu beobachten, wobei er den stärkeren davon die Buchstaben A bis H zuordnete. Er erkannte unter anderem, daß die von ihm als D-Linie bezeichnete dunkle Linie mit der intensiven gelben Linie einer Kerzenflamme zusammenfiel sowie, daß die beobachteten Muster der dunklen Linien bei hellen Sternen sich von denen des Sonnenlichts unterschieden.

Neben dem Studium des Sonnenlichts und von Licht weiter entfernter Sterne waren auch die Emissionen von Flammen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Beim Versuch, monochromatisches Licht für mikroskopische Anwendungen durch Verwendung farbiger Gläser zu erzeugen, bemerkten David Brewster [7] und John Herschel [8] unabhängig voneinander, daß durch die verwendeten farbigen Gläser große Teile der Spektren der verwendeten Lichtquellen absorbiert wurden. Nachdem diese Versuche nicht zum gewünschten Ergebnis geführt hatten, untersuchten beide daraufhin bei ihrer Suche nach einer monochromatischen Lichtquelle die Emissionsspektren verschiedener farbiger Flammen.

Es dauerte dann noch weitere 3 Jahrzehnte, bis man sich die dunklen Linien im Sonnenspektrum erklären konnte. Gustav Kirchhoff veröffentlichte 1860, daß jede Substanz, die in der Lage ist, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren, ebenfalls Licht dieser Wellenlänge absorbieren kann [9]. Die dunklen, inzwischen nach Fraunhofer benannten Linien entsprachen somit denjenigen Wellenlängen des kontinuierlichen Sonnenspektrums, die von den Gasen in den kälteren äußeren Schichten der Sonne absorbiert wurden. Die Erkenntnis, daß jedes Molekül bzw. jedes Atom ein charakteristisches Linienspektrum emittiert, führte zur Aufzeichnung vieler charakteristischer Spektren durch Kirchhoff und Bunsen [10], wodurch die optische Spektroskopie als Analysemethode geboren war.

Die theoretischen Grundlagen zur Erklärung der beobachteten Spektren folgten innerhalb der nächsten Jahrzehnte. Johann Jakob Balmer veröffentlichte 1885 eine empirische Formel, mit der sich die Wellenlängen bestimmter Linien des Wasserstoffatoms erstmals mathematisch beschreiben ließen [11]. Eine allgemeine Formel zur Beschreibung der Spektrallinien des Wasserstoffatoms folgte dann einige Jahre später durch Johannes Rydberg [12]. Ein Atommodell, das erstmals von diskreten Energieniveaus ausging, wurde 1913 von Niels Bohr vorgestellt [13-15]. Da jedoch immer häufiger Eigenschaften von Atomen, Molekülen und subatomaren Teilchen beobachtet wurden, die mit der klassischen Mechanik nicht mehr zufriedenstellend erklärt werden konnten, kam es schließlich in der Mitte der zwanziger Jahre des letzten Jahrhunderts zur Entwicklung der Quantenmechanik durch Werner Heisenberg [16], Erwin Schrödinger [17-20], Max Born [21, 22] und Paul

Dirac [23]. Diese stellt bis heute die Grundlage zur Beschreibung der Wechselwirkung von Licht mit Materie dar.

2.2 Die Absorptionsspektroskopie

Durchquert elektromagnetische Strahlung ein absorbierendes Medium, so wird die Intensität des Lichtstrahls geschwächt. Nach Bouguer [24] und Lambert [25] ist die Schwächung dabei proportional zur Schichtdicke d und kann durch die folgende Exponentialfunktion beschrieben werden:

$$I = I_0 e^{-\alpha \cdot d} \tag{2.1}$$

I_0 ist dabei die Intensität des eingestrahlten Lichts, I die Intensität nach Durchstrahlen der absorbierenden Schicht und α der Absorptionskoeffizient des absorbierenden Mediums. Durch Überführung des natürlichen in den dekadischen Logarithmus und die Kombination mit der von Beer entdeckten Proportionalität zwischen der Schwächung der Intensität und der Konzentration der absorbierenden Spezies [26], erhält man schließlich mit der Extinktion A das Lambert-Beersche Gesetz in seiner am häufigsten verwendeten Form:

$$A = -\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg(e) \cdot \alpha \cdot d = \varepsilon_\lambda \cdot C \cdot d \tag{2.2}$$

Dabei sind T die Transmission, ε_λ der molare Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit von der Wellenlänge und C die Konzentration der absorbierenden Spezies. Der lineare Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration in Gleichung (2.2) gilt jedoch nur, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- Das eingestrahlte Licht muß monochromatisch und kollimiert sein,
- das absorbierende Medium muß homogen verteilt sein,
- es darf keinerlei Streuung auftreten und
- es darf zu keinen Wechselwirkungen zwischen den absorbierenden Spezies kommen. Die letzte Bedingung wird im allgemeinen bei Konzentrationen bis 0,01 mol/L erfüllt.

Aus Gleichung (2.2) läßt sich außerdem erkennen, daß eine quantitative Absorptionsmessung – um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen – bei einem hohen molaren Extinktionskoeffizienten ε_λ, also am oder in der Nähe des Absorptionsmaximums stattfinden sollte. Des weiteren sollte die Schichtdicke d möglichst groß gewählt werden, um hohe optische Weglängen zu ermöglichen. In der klassischen Laserabsorptionsspektroskopie werden dazu bei der quantitativen Bestimmung von Gaskonzentrationen im unteren ppb-Bereich unter anderem White- oder Herriot-Zellen genutzt, bei denen der Lichtstrahl durch Spiegel an den Enden der Meßzelle mehrmals hin- und herreflektiert wird [27-30].

Die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie bietet hier den Vorteil, aufgrund des im Resonator reflektierten Lichtstrahls und des damit verbundenen wiederholten Durchgangs des Laserstrahls durch die absorbierende Schicht, optische Weglängen zu erreichen, die um ein vielfaches länger sind als bei der konventionellen UV/Vis-Spektroskopie. Zusätzlich ist sie unabhängig von der eingestrahlten Lichtintensität, da das Abklingverhalten der eingestrahlten Intensität in einem optischen Resonator und keine Intensitätsdifferenz gemessen wird. Dies macht die CRDS zu einer hochempfindlichen und nachweisstarken Methode für direkte Absorptionsmessungen.

2.3 Die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie (CRDS) als Detektionsmethode verwendet. Bei dieser zur Gruppe der Laserabsorptions-spektroskopien zählenden Methode ist es möglich, die Extinktion und daraus die Konzentration eines Analyten in einer untersuchten Probe anhand der Abkling-zeiten eines Laserstrahls in einem optischen Resonator, der sogenannten Ring-Down-Cavity, zu bestimmen. Das folgende Kapitel soll deshalb einen Überblick über die Grundlagen der CRDS geben.

2.3.1 Entwicklung der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie

Die Anfänge der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie (CRDS) reichen zurück bis in die 80er Jahre des letzten Jahrhunderts. Unter anderem in der Luft- und Raumfahrtindustrie war man damals daran interessiert, den Reflexionsgrad bzw. die Transmission von Oberflächen präzise bestimmen zu können. Durch die Entwicklung neuer Herstellungsmethoden wie dem Ionenstrahlsputtern war es seit Ende der 1970er Jahre möglich, dielektrische Spiegel mit immer höherem Reflexionsvermögen herzustellen. Je hochreflektierender jedoch die Oberflächen wurden, desto geringer wurde die Intensitätsdifferenz vor und nach der Reflektion und desto komplizierter wurde es somit, den Reflexionsgrad zu bestimmen [31]. Eine Transmissionsmessung war relativ einfach durchzuführen, da es jedoch zu nicht vernachlässigbaren zusätzlichen Verlusten durch Absorption und Streuung am Spiegelmaterial kam, konnte man daraus nicht auf den Reflexionsgrad schließen. Herbelin et al. entwickelten deshalb 1980 mit der Cavity-Attenuated-Phase-Shift-Spektroskopie (CAPS) eine einfache Methode, um durch Intensitätsmodulation eines CW-Lasers (Continuous-Wave- bzw. Dauerstrichlaser) und der Messung der dadurch in einem optischen Resonator hervorgerufenen Phasenverschiebung, den Reflexionsgrad bei Spiegeln mit hochreflektierenden Beschichtungen zu bestimmen [32-34]. Eine Weiterentwicklung dieser Methode wurde dann 1984 von Anderson et al. vorgestellt [35]. Durch abruptes Abschalten des verwendeten CW-Lasers und der anschließenden Messung des Abklingverhaltens der Intensität im Resonator, war es möglich, den Reflexionsgrad noch präziser zu bestimmen.

Bei beiden Methoden traten jedoch Probleme durch unberechenbare Modenanpassungen zwischen CW-Laser und optischem Resonator auf. O'Keefe et al. lösten dieses Problem schließlich 1988 durch Verwendung eines gepulsten Lasers [36]. Dieser hatte außerdem den Vorteil, daß auf zusätzliche Elektronik verzichtet werden konnte, mit der bisher die Intensität im Resonator gemessen oder der Laser abgeschaltet wurde, damit das Abklingverhalten beobachtet werden konnte. Sie demonstrierten die Empfindlichkeit dieser Methode durch die Messung mehrerer Banden des schwachen verbotenen $b\,^1\Sigma_g^+ - X\,^3\Sigma_g^-$-Übergangs in gasförmigem molekularen Sauerstoff.

Die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie, seltener auch unter dem Namen CRLAS (Cavity Ring-Down Laser Absorption Spectroscopy) in der Literatur erwähnt, wurde seither für eine Vielzahl von spektroskopischen Anwendungen verwendet. Dazu gehören unter anderem die Untersuchung von Clustern [37-39], die Messung der optischen Verstärkung in chemisch gepumpten Lasersystemen [40-42], Studien zur Kinetik von Radikalreaktionen [43-47], Spektroskopie an Obertönen [48-51], Detektion von Spurengasen [52-55], Untersuchung von Verbrennungsprozessen [56-58] sowie CRDS mit Lichtleitfasern [59-63].

Eine Erweiterung der bis dahin hauptsächlich für die Gasphase genutzten Technik wurde dann 1997 von Pipino et al. mit der Evanescent-Wave-CRDS (EW-CRDS) vorgestellt [64, 65]. Bei dieser in einem Teil der vorliegenden Arbeit verwendeten Technik konnten durch die Kombination von CRDS und Evanescent-Wave-Spektroskopie – unter Ausnutzung der bei der Totalreflexion an einer Grenzfläche entstehenden evaneszenten Wellen – Oberflächenprozesse sowie dünne Filme im Bereich weniger hundert Nanometer über der Oberfläche untersucht werden. Die theoretischen Grundlagen dazu folgen in Kapitel 4.

Die ersten Anwendungen der CRDS in der flüssigen Phase wurden schließlich im Jahr 2002 von Xu et al. [66] und Hallock et al. [67] vorgestellt. Durch die Verwendung verschiedener Geometrien für das Einbringen von Flüssigkeiten in den optischen Resonator konnten somit erstmals direkte Absorptionsmessungen in der flüssigen Phase durchgeführt werden. Eine ausführlichere Beschreibung dieser ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendeten Technik folgt in Kapitel 3.

2.3.2 Aufbau eines Cavity-Ring-Down-Systems

Als Laserquellen können bei der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie sowohl gepulste als auch Continuous-Wave-Laser genutzt werden. CW-Laser haben dabei den Vorteil, daß hier sehr hohe spektrale Auflösungen von bis zu 1 MHz erreichbar sind. Die spektrale Auflösung hängt hier von der spektralen Breite der Resonatormode und nicht von der Linienbreite des Lasers ab, da durch den schmalbandigen CW-Laser nur eine einzige Resonatormode angeregt wird. Durch die geringe Linienbreite des CW-Lasers ist es außerdem möglich, fast dessen

gesamte spektrale Breite und somit fast die gesamte Laserintensität in den Resonator einzukoppeln. Durch die geringe Transmission der Spiegel kommt es zusätzlich zu einer Speicherung der Energie im Resonator, diese sogenannte Resonanzüberhöhung ermöglicht bei der CW-CRDS den Einsatz von weniger leistungsstarken Lasern, wie z. B. Diodenlasern. Die CRDS mit gepulsten Lasern hat dagegen bei Experimenten, bei denen eine hohe spektrale Auflösung nicht das entscheidende Kriterium darstellt, den Vorteil, daß sie apparativ einfacher zu realisieren ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Absorptionsmessungen im UV/Vis-Bereich die gepulste CRDS verwendet. In diesem Wellenlängenbereich besitzen viele Moleküle charakteristische Absorptionsbanden, die eine ausreichend große spektrale Breite aufweisen. Dazu standen in der *Arbeitsgruppe Laseranwendungen in der Chemie* der Universität Ulm leistungsstarke gepulste Farbstofflaser zur Verfügung. Der typische Aufbau eines CRDS-Experiments mit gepulsten Lasern ist in Abbildung 2.1 zu sehen.

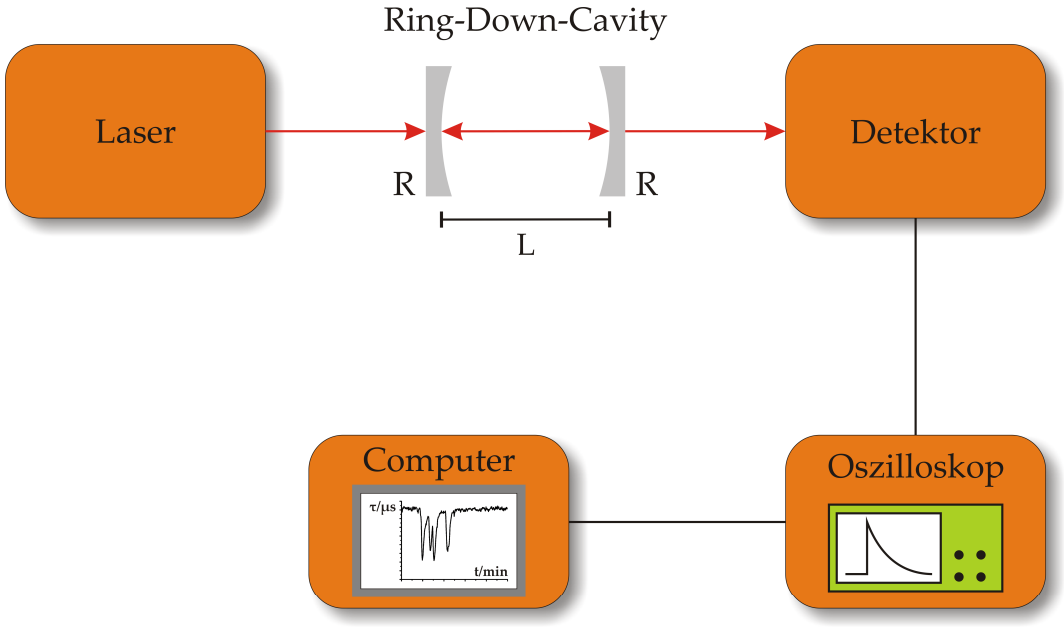


Abbildung 2.1: Schema der gepulsten Cavity-Ring-Down-Spektroskopie.

Das Herzstück des Meßaufbaus stellt ein optischer Resonator mit der Länge L dar, der von zwei hochreflektierenden dielektrischen Spiegeln gebildet wird, die

sogenannte Ring-Down-Cavity. Ein Laserpuls wird durch Transmission an einem der beiden Spiegel in diesen Resonator eingekoppelt. Aufgrund des hohen Reflexionsgrades R der beiden Spiegel wird der eingekoppelte Teil des Laserlichts zwischen den beiden Spiegeln bis zu mehreren tausend Mal hin- und herreflektiert, woraus optische Weglängen von mehreren Kilometern resultieren können. Die Intensität des Laserpulses verringert sich dabei bei jedem Umlauf auf Grund von Transmissionsverlusten an den Spiegeln sowie Verlusten durch Absorption bzw. Streuung im Resonator.

Eine Meßgröße für die Lichtintensität im Resonator in Abhängigkeit von der Zeit stellt das nach jedem vollständigen Umlauf im Resonator über den zweiten Spiegel transmittierte Licht dar und kann mit einem lichtempfindlichen Detektor, wie z. B. einem Photomultiplier oder einer Photodiode, aufgezeichnet werden. Mit einem Speicheroszilloskop läßt sich daraus das exponentielle Abklingverhalten des eingekoppelten Laserlichts im Resonator, die sogenannte Ring-Down-Kurve, darstellen. Aus dieser kann dann mit Hilfe eines geeigneten Computerprogramms die charakteristische Resonatorabklingzeit τ berechnet werden. Diese gibt die Zeitdauer an, in der die eingekoppelte Intensität I_0 im Resonator auf den Wert $1/e \cdot I_0$ abgefallen ist und stellt die Grundlage zur Berechnung weiterer Parameter wie der Extinktion und somit der Konzentration der absorbierenden Spezies im Resonator dar.

Die wichtigsten Komponenten eines CRDS-Systems sollen im folgenden kurz erklärt werden.

2.3.2.1 Das Lasersystem

Als Laserquelle für die gepulste CRDS wurden zu Beginn der Entwicklung hauptsächlich durchstimmbare Farbstofflaser verwendet, als Pumplaser dienten dabei unter anderem Stickstoff-, Excimer- oder frequenzverdoppelte Nd:YAG-Laser. Mit der Entwicklung weiterer durchstimmbarer Laser wurden die Farbstofflaser allerdings immer häufiger durch Titan:Saphir-Laser, optisch parametrische Oszillatoren (OPO) sowie Diodenlaser ersetzt.

Für die Pulsdauer des verwendeten Lasers bei der CRDS gilt, daß sie wesentlich kürzer als die Resonatorabklingzeit τ sein sollte, jedoch größer als die Umlaufzeit $t = 2L/c$ des Resonators. Hierbei ist c die Lichtgeschwindigkeit. Liegt die Pulsdauer in der Größenordnung der Resonatorabklingzeit, so wird nur ein einzelner Puls detektiert, es ist jedoch kein Abklingen der Intensität im Resonator zu sehen. Ist die Pulsdauer kleiner als die Umlaufzeit, wird am Detektor statt einer Abklingkurve nur eine Serie von Pulsen mit abnehmender Intensität beobachtet, deren Abstand der Umlaufzeit im Resonator entspricht. Nur wenn die Pulsdauer dagegen größer als die Umlaufzeit, jedoch wesentlich kleiner als die Abklingzeit ist, so überlagern sich die Intensitäten der einzelnen Pulsfragmente im Resonator, wodurch am Detektor keine einzelnen Pulse mehr detektiert werden, sondern deren Einhüllende, die exponentiell abfallende sogenannte Ring-Down-Kurve [68].

Im UV/Vis-Bereich bewegen sich die Pulsfrequenzen der verwendeten Laser meist im Bereich von 10 Hz bis 20 Hz und die Pulsdauer im Bereich von 1 ns bis 20 ns. Die Pulsenergien liegen dabei im Bereich von 1 mJ.

2.3.2.2 Der optische Resonator

Die Voraussetzung für die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie ist das Vorhandensein eines optisch stabilen Resonators der Länge L – die sogenannte Ring-Down-Cavity – der von zwei auf der optischen Achse des Resonators liegenden hochreflektierenden Spiegeln mit den Krümmungsradien r_1 und r_2 gebildet wird. Ein solcher Resonator ist optisch stabil, wenn ein achsnaher Lichtstrahl auch nach beliebig vielen Reflektionen den Resonator nicht verläßt. Dies ist dann der Fall, wenn das folgende Stabilitätskriterium erfüllt ist [69]:

$$0 \leq g_1 \cdot g_2 \leq 1 \tag{2.3}$$

wobei die sogenannten Resonatorparameter g_i durch $g_i = 1 - L/r_i$ gegeben sind. Ein Resonator wie die Ring-Down-Cavity mit zwei identischen sphärischen Spiegeln ist daher optisch stabil, wenn die Bedingung $0 < L < r$ oder $r < L < 2r$ erfüllt ist.

Wird ein elektromagnetischer Puls, dessen Dauer größer als seine Umlaufzeit ist, in diesen Resonator eingekoppelt, so kommt es durch Interferenzen der einzelnen Pulsfragmente im Resonator zur Ausbildung stehender Wellen, die bestimmten räumlichen Verteilungen der elektrischen Feldstärke entsprechen und als Moden bezeichnet werden. Bei einer gegebenen Resonatorlänge L können sich die stehenden Wellen nur ausbilden, wenn L ein ganzzahliges Vielfaches der halben Wellenlänge λ beträgt, womit die Resonanzbedingung des Resonators

$$L = q \cdot \frac{\lambda}{2} \qquad \text{mit } q \in \mathbb{N} \tag{2.4}$$

lautet [70]. Durch jeden ganzzahligen Wert q ist damit eine sogenannte axiale bzw. longitudinale Resonatormode gegeben, deren Resonanzfrequenz

$$\nu_q = q \cdot \frac{c}{2L} \tag{2.5}$$

ein ganzzahliges Vielfaches der Resonatorgrundfrequenz $\nu_1 = c/2L$ beträgt. Der Frequenzabstand zwischen zwei benachbarten longitudinalen Moden wird als freier Spektralbereich (FSB) bezeichnet und ist gegeben durch

$$\Delta\nu_{FSB} = \nu_{q+1} - \nu_q = \frac{c}{2L} \tag{2.6}$$

Zusätzlich kommt es bei der Verwendung sphärischer Spiegel zur Ausbildung bestimmter Intensitätsverteilungen vertikal zur Ausbreitungsrichtung, den sogenannten transversalen Moden. Eine Klassifikation dieser Moden erfolgt durch die Bezeichnung TEM sowie bei Resonatoren mit kreisförmigen Spiegeln durch die Indizes l und p bzw. bei Resonatoren mit rechteckigen Spiegeln durch die Indizes m und n. TEM steht dabei für transversale elektromagnetische Moden. Bei den TEM_{lp}-Moden geben die Indizes l und p die Nullstellen bzw. Knotenlinien in radialer und azimutaler Richtung an, bei den TEM_{mn}-Moden stehen die Indizes m und n für die Nullstellen bzw. Knotenlinien in vertikaler und horizontaler Richtung. Abbildung 2.2 gibt einen Überblick über die Modenformen verschiedener transversaler Resonatormoden.

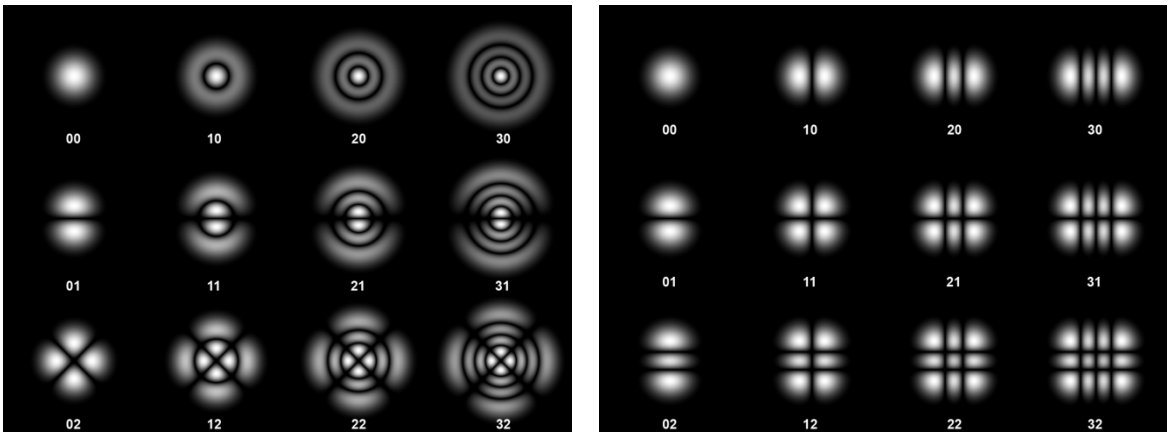


Abbildung 2.2: Modenformen verschiedener transversaler Resonatormoden. Das linke Bild zeigt die TEM_{lp}-Moden bei Resonatoren mit kreisförmigen Spiegeln, das rechte Bild die TEM_{mn}-Moden bei Resonatoren mit rechteckigen Spiegeln.

Komplett bezeichnet wird eine Resonatormode durch TEM_{lpq} bzw. TEM_{mnq}. Die zugehörigen Resonanzfrequenzen sind dann bei den TEM_{lpq}-Moden durch

$$\nu_{lpq} = \frac{c}{2L}\left[q + \frac{l + 2p + 1}{\pi}\arccos\left(\sqrt{g_1 \cdot g_2}\right)\right] \tag{2.7}$$

und bei den TEM_{mnq}-Moden durch

$$\nu_{mnq} = \frac{c}{2L}\left[q + \frac{m + n + 1}{\pi}\arccos\left(\sqrt{g_1 \cdot g_2}\right)\right] \tag{2.8}$$

gegeben [71]. Da man in der Praxis allerdings meist nicht auf eine spezielle longitudinale Mode angewiesen ist, wird der Index q häufig weggelassen.

Bei der CRDS wird versucht, im Resonator hauptsächlich die sogenannte Grundmode TEM_{00} anzuregen, da diese aufgrund der geringsten Divergenz, dem kleinsten Strahlradius sowie der geringsten Beugungsverluste von allen Moden die höchste Strahlqualität aufweist. Werden dabei allerdings mehrere longitudinale Moden angeregt, so kann es zu Schwebungen kommen, die von Puls zu Puls variieren und sich mit dem exponentiellen Abklingsignal überlagern. Durch Mittelung des Signals über mehre Pulse lassen sich diese Schwebungen aber wieder herausmitteln.

2.3.2.3 Die hochreflektierenden Spiegel

Die hochreflektierenden dielektrischen Spiegel, die den optischen Resonator abschließen, bestehen aus einem Quarzsubstrat, auf dem alternierend Schichten der Dicke $d = \lambda/4$ mit hohem und niedrigem Brechungsindex aufgedampft sind.

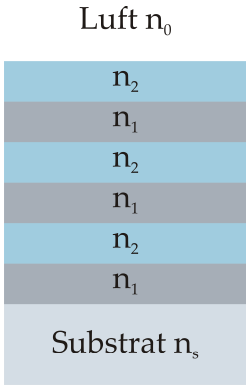


Abbildung 2.3: Aufbau hochreflektierender dielektrischer Spiegel. Auf einem Quarzsubstrat sind alternierend Schichten mit hohem und niedrigem Brechungsindex aufgedampft.

Dabei sind n_s der Brechungsindex des Substrats, n_0 der Brechungsindex von Luft, n_1 der Brechungsindex der zuerst auf dem Substrat aufgedampften Schicht und n_2 der Brechungsindex der darauf folgenden Schicht, wobei dieser gegenüber der ersten Schicht einen höheren oder niedrigeren Brechungsindex aufweisen muß. Das Reflexionsvermögen für ein solches Mehrschichtsystem ergibt sich dann bei einer geraden Anzahl von Schichten zu [72]

$$R_{2S} = \left(\frac{n_s \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^{2S} - n_0}{n_s \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^{2S} + n_0} \right)^2 \tag{2.9}$$

sowie bei einer ungeraden Anzahl von Schichten zu

$$R_{2S+1} = \left(\frac{n_1^2 \left(\frac{n_1}{n_2} \right)^{2S} - n_0 n_s}{n_1^2 \left(\frac{n_1}{n_2} \right)^{2S} + n_0 n_s} \right)^2 \tag{2.10}$$

S stellt dabei die Anzahl der Spiegelpaarungen dar. Je höher die Anzahl der aufgedampften Schichten ist, desto mehr nähert sich die Reflektivität R in Gleichung (2.9) bzw. (2.10) an eins an.

Häufig verwendete Materialien zur Spiegelbeschichtung sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt [73, 74].

Schichtmaterial	Brechungsindex n
MgF_2	1,39
SiO_2	1,55
Al_2O_3	1,67
LaF_3	1,7
Ta_2O_5	2,13
ZnS	2,35
CeO_2	2,40
TiO_2	2,48

Tabelle 2.1: Materialien zur Beschichtung von hochreflektierenden dielektrischen Spiegeln.

Kommerziell sind Spiegel für die CRDS heutzutage mit einen Reflexionsgrad R bei ihrer zentralen Wellenlänge von bis zu 99,99 % im UV-Bereich sowie von bis zu 99,999 % im sichtbaren und im IR-Bereich erhältlich [75-77]. Im visuellen Bereich beträgt dabei die Bandbreite des Spiegels, d. h. der Wellenlängenbereich, in dem sich der Wert $(1-R)$ innerhalb des doppelten $(1-R)$-Werts der zentralen Wellenlänge befindet, je nach Wellenlänge zwischen 30 und 60 nm.

2.3.3 Signalverhalten bei der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie

Um die mathematische Beschreibung des Signalverhaltens im Resonator zu vereinfachen, wird im folgenden Unterkapitel angenommen, daß die Dauer des in den Resonator eingekoppelten Laserpulses t_p kürzer als die Umlaufdauer im Resonator t_r ist. Dadurch können Effekte vernachlässigt werden, die durch die Überlagerungen von einzelnen Pulsfragmenten im Resonator entstehen. Vom Detektor wird dann eine Folge von Pulsen mit abnehmender Intensität registriert, deren zeitlicher Abstand der Umlaufzeit im Resonator $t_r = 2L/c$ entspricht. Abbildung 3 zeigt das grundlegende Prinzip der gepulsten CRDS.

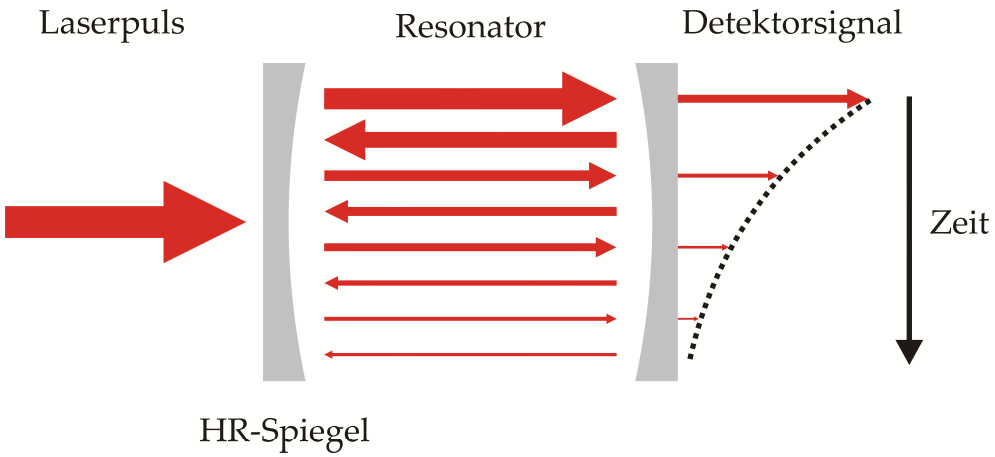


Abbildung 2.4: Schematische Beschreibung des Prinzips der gepulsten CRDS.

Wird ein Laserpuls in den Resonator eingekoppelt, so wird bei jedem Umlauf der größte Teil der Intensität an den beiden hochreflektierenden Spiegeln reflektiert. Ein geringer Teil der Intensität wird jedoch transmittiert und kann mit einem Photodetektor hinter dem zweiten Spiegel gemessen werden. Unter der Annahme von optimalen Spiegeln, bei denen es zu keinerlei Verlusten durch Absorption oder Streuung kommt, wird das zeitliche Abklingen der Intensität im Resonator also nur von der Transmission an der Spiegeln verursacht. Nach dem ersten Durchgang ist die am Photomultiplier gemessene Intensität I_0 dann durch

$$I_0 = I_{Laser} \cdot T^2 \tag{2.11}$$

gegeben, wobei I_{Laser} der Intensität des Pulses vor dem Einkoppeln in den Resonator und T der Transmission der Spiegel entsprechen [78]. Bei jedem weiteren vollständigen Umlauf nimmt die Intensität dann um den Faktor R^2 ab, wobei R der mittlere Reflexionsgrad der beiden Spiegel $\sqrt{R_1 \cdot R_2}$ ist. Somit beträgt die vom Detektor registrierte Intensität nach n Umläufen

$$I_n = I_0 \cdot R^{2n} = I_0 \cdot e^{\ln R \cdot 2n} \tag{2.12}$$

Betrachtet man nun anstatt der diskreten Anzahl der Umläufe n die Zeit t als kontinuierliche Größe, so erhält man mit

$$t = n \cdot \frac{2L}{c} \tag{2.13}$$

für die am Detektor gemessene Intensität

$$I(t) = I_0 \cdot e^{\frac{c \cdot \ln R}{L} \cdot t} \tag{2.14}$$

Aufgrund des hohen Reflexionsgrads der CRDS-Spiegel kann $\ln R$ näherungsweise durch $R-1$ ersetzt werden und man erhält dadurch

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{c \cdot (1-R)}{L} \cdot t} \tag{2.15}$$

Gleichung (2.15) zeigt, daß die Intensität im Resonator mit der Zeit exponentiell abnimmt.

Ein Maß, wie lange sich der Laserpuls im Resonator aufhält, stellt die Resonator-abklingzeit bzw. Ring-Down-Zeit τ dar. Damit wird die Zeit bezeichnet, nach der die transmittierte Intensität auf den Wert $1/e \cdot I_0$ abgefallen ist. In einem leeren Resonator ergibt sich die Ring-Down-Zeit τ_0 somit aufgrund (2.15) zu

$$\tau_0 = \frac{L}{c \cdot (1-R)} \tag{2.16}$$

Die Ring-Down-Zeit ist somit unabhängig von absoluten Intensitätswerten und in einem leeren Resonator mit gegebener Länge L nur abhängig vom Reflexionsgrad der CRDS-Spiegel. Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die erreichbaren Ring-Down-Zeiten τ und die dabei zurückgelegten optischen Weglängen W in einem leeren Resonator mit der Länge L = 30 cm in Abhängigkeit des Reflexionsgrads.

Reflexionsgrad R /%	Ring-Down-Zeit τ_0 /µs	Optische Weglänge W /m
99	0,1	30
99,9	1	300
99,99	10	3000
99,995	20	6000
99,999	100	30000

Tabelle 2.2: Optische Weglänge des Resonators in Abhängigkeit des Reflexionsgrads der Spiegel. Erreichbare Ring-Down-Zeiten τ_0 und die dabei zurückgelegten optischen Weglängen W in Abhängigkeit des Reflexionsgrads R der hochreflektierenden Spiegel am Beispiel eines Resonators mit der Länge L = 30 cm.

Befindet sich nun zusätzlich ein absorbierendes Medium mit dem Absorptionskoeffizienten α und der Dicke d im Resonator, so treten dadurch bei jedem Durchgang zusätzliche Verluste auf. Die nach dem ersten Durchgang am Detektor gemessene Intensität ergibt sich dann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz zu

$$I_0 = I_{Laser} \cdot T^2 \cdot e^{-\alpha d} \tag{2.17}$$

Bei jedem weiteren vollständigen Umlauf nimmt die Intensität aufgrund der zusätzlichen Verluste durch die absorbierende Spezies um den Faktor $R^2 \cdot e^{2\alpha d}$ ab, d. h., die vom Detektor registrierte Intensität beträgt nach n Umläufen

$$I_n = I_0 \cdot R^{2n} \cdot e^{-2n\alpha d} = I_0 \cdot e^{2n(\ln R - \alpha d)} \tag{2.18}$$

Ersetzt man die Zahl der Umläufe n wieder durch die Zeit t und $\ln R$ näherungsweise durch $R-1$, so folgt für die Intensität

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{c}{L}(1-R+\alpha d)t} \tag{2.19}$$

Man erkennt, daß die absorbierende Spezies zu einem schnelleren exponentiellen Abklingen der Intensität im Resonator führt. Die Ring-Down-Zeit τ ergibt sich in diesem Fall zu

$$\tau = \frac{L}{c(1-R+\alpha d)} \tag{2.20}$$

Einen Vergleich der Abklingkurven eines Resonators mit und ohne absorbierende Spezies und der dabei jeweils erhaltenen Ring-Down-Zeiten zeigt Abbildung 2.5.

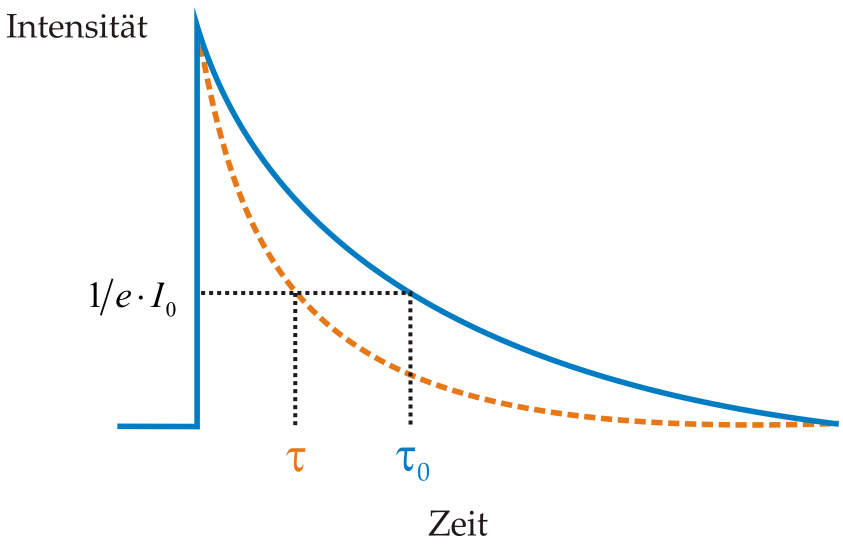


Abbildung 2.5: Abklingkurven eines optischen Resonators. Vergleich des Verlaufs sowie der zugehörigen Ring-Down-Zeiten eines leeren Resonators (blaue Kurve) sowie eines Resonators mit absorbierendem Medium (orange Kurve).

2.3.4 Analytische Informationen

Kennt man die Ring-Down-Zeiten des leeren Resonators und des Resonators, der ein absorbierendes Medium mit der Dicke d enthält, so läßt sich daraus direkt der Absorptionskoeffizient α der absorbierenden Spezies berechnen:

$$\alpha = \frac{L}{d \cdot c}\left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0}\right) \tag{2.21}$$

Ist die Resonatorlänge identisch mit der Dicke des absorbierenden Mediums, was z. B. bei Gasphasenmessungen häufig der Fall ist, vereinfacht sich Gleichung (2.21) zu

$$\alpha = \frac{1}{c}\left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0}\right) \tag{2.22}$$

Dies bedeutet, daß der Absorptionskoeffizient in diesem Fall ohne Kenntnis der Schichtdicke des absorbierenden Mediums bestimmt werden kann.

Möchte man die Extinktion oder die Konzentration der absorbierenden Spezies bestimmen, so lassen sich diese aus den Ring-Down-Zeiten über das Lambert-Beersche Gesetz in der Form

$$A = \lg(e) \cdot \alpha \cdot d = \frac{\lg(e) \cdot L}{c}\left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot C \cdot d \tag{2.23}$$

berechnen.

Um ein Absorptionsspektrum mit der CRDS aufzunehmen, benötigt man also einen durchstimmbaren Laser, mit dem im gewünschten Wellenlängenbereich jeweils die Ring-Down-Zeiten des Resonators mit und ohne absorbierende Spezies gemessen werden. Die Auftragung der daraus mit Gleichung (2.23) berechneten Extinktionen gegen die Wellenlänge liefert dann das Absorptionsspektrum der untersuchten Substanz.

Eine weitere interessierende Größe ist die Nachweisgrenze, die in der CRDS als derjenige Wert des Absorptionskoeffizienten α bestimmt werden kann, bei dem

die Ring-Down-Zeiten des Resonators mit und ohne absorbierende Spezies im Rahmen der Meßgenauigkeit gerade noch voneinander unterscheidbar sind. In der Literatur zur CRDS ist die minimale Differenz zwischen τ und τ_0 dabei im allgemeinen durch die doppelte Standardabweichung $\Delta\tau_0$ der Ring-Down-Zeit bei leerem Resonator gegeben [79]:

$$\tau = \tau_0 - 2\Delta\tau_0 \tag{2.24}$$

Davon abweichend wurde in der vorliegenden Arbeit, wie im allgemeinen bei analytischen Messungen üblich, anstatt der doppelten die dreifache Standardabweichung verwendet:

$$\tau = \tau_0 - 3\Delta\tau_0 \tag{2.25}$$

In Kombination mit Gleichung (2.21) folgt damit für den kleinsten nachweisbaren Absorptionskoeffizienten α_{min}:

$$\alpha_{min} = \frac{L}{dc} \cdot \frac{3\Delta\tau_0}{\tau_0^2 - 3\tau_0\Delta\tau_0} \tag{2.26}$$

Da $3\tau_0\Delta\tau_0$ gegenüber τ_0^2 vernachlässigbar ist, folgt daraus

$$\alpha_{min} = \frac{3L}{dc} \cdot \frac{1}{\tau_0} \cdot \frac{\Delta\tau_0}{\tau_0} = \frac{3(1-R)}{d} \cdot \frac{\Delta\tau_0}{\tau_0} \tag{2.27}$$

sowie von Gleichung (2.27) abgeleitet für die Konzentration

$$C_{min} = \frac{3\lg(e) \cdot (1-R)}{\varepsilon_\lambda \cdot d} \cdot \frac{\Delta\tau_0}{\tau_0} \tag{2.28}$$

bzw. für die Extinktion

$$A_{min} = 3\lg(e) \cdot (1-R) \cdot \frac{\Delta\tau_0}{\tau_0} \tag{2.29}$$

Ausgehend von Gleichung (2.27) erkennt man mehrere Möglichkeiten, um die Nachweisgrenze bei der CRDS zu verringern. Sie kann einerseits durch den Einsatz von Spiegeln mit einem höheren Reflexionsgrad sowie einer größeren Schichtdicke des absorbierende Mediums verringert werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, den Faktor $\Delta\tau_0/\tau_0$ zu minimieren. Je genauer die Ring-Down-Zeit bestimmt werden kann, desto geringer wird die minimal nachweisbare Konzentration. Unter optimalen Bedingungen ist die grundlegende Grenze dabei nur durch das sogenannte Schrotrauschen des Detektors gegeben, im allgemeinen bewegen sich die Werte von $\Delta\tau_0/\tau_0$ allerdings zwischen 0,1 und 0,001. Eine Verlängerung des Resonators führt dagegen nur indirekt über eine Erhöhung von τ_0 zu einer geringeren Nachweisgrenze.

3 Cavity-Ring-Down-Spektroskopie als Detektionsmethode in analytischen Fließsystemen

3.1 Detektionsmethoden in analytischen Fließsystemen

Moderne analytische Trennmethoden in der flüssigen Phase wie z. B. die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), die Kapillarelektrophorese (CE), die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC) oder die Elektrochromatographie können mit verschiedenen Methoden zur Detektion der jeweiligen Analyten kombiniert werden. Zum Einsatz kommen unter anderem Brechungsindex-, Fluoreszenz-, Leitfähigkeits-, Verdampfungs-Lichtstreu-, elektrochemische und massenspektrometrische Detektoren, am häufigsten wird jedoch die klassische UV/Vis-Detektion genutzt.

Die Nachweisgrenze läßt sich bei der UV/Vis-Detektion, ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz (siehe Gleichung (2.2)), durch eine Erhöhung der optischen Weglänge verringern. Ohne eine Erhöhung des Durchmessers der Detektionszelle kann diese jedoch bei UV/Vis-Detektoren nicht beliebig verlängert werden. Die Lichtbrechung an den Wänden der Detektionszelle würde ansonsten zu einem verringerten Lichtdurchsatz führen, wodurch sich wiederum das Signal/Rausch-Verhältnis verschlechtern würde. Eine Erhöhung des Durchmessers der Detektionszelle bedeutet jedoch ein größeres Detektions- und damit Totvolumen und stellt somit eine Ursache für Bandenverbreiterungen dar. Bei den oben genannten Trennmethoden in der flüssigen Phase bewegen sich die Injektions-volumina meist im Bereich von Nanolitern bis wenigen Mikrolitern. Somit mußten hierfür miniaturisierte Detektionszellen mit geringen Volumina aber gleichzeitig hohen optischen Weglängen entwickelt werden. Die in der Laserspektroskopie zur Spurenanalytik von Gasen eingesetzten White- und Herriott-Zellen [27-30] konnten sich dabei zur Detektion in Fließsystemen, unter anderem aufgrund ihres zu großen Volumens, nicht durchsetzen.

Standardmäßig sind kommerziell erhältliche Detektoren heutzutage mit Z- oder U-förmigen Flußzellen ausgestattet, die die optische Weglänge auf einige Millimeter erhöhen. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von schmalen, mit der Trennapparatur gekoppelten Hohlwellenleitern als Detektionszelle. Der Kern der Faser ist dabei mit der flüssigen Phase gefüllt, die einen höheren Brechungsindex besitzt als der Leitermantel. Durch die dadurch erhaltene Totalreflexion in der Faser können optische Weglängen von bis zu 1 m erreicht werden [80].

Andere hochempfindliche absorptionsspektroskopische Methoden, wie z. B. die Thermal-Lens-Spektroskopie [81] oder die photoakustische Spektroskopie [82], die ebenfalls als Detektionsmethoden in Fließsystemen eingesetzt werden können, besitzen den gravierenden Nachteil, daß sie sich in Systemen mit Gradientenelution nicht nutzen lassen.

Diese Einschränkung entfällt dagegen bei der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie. Die durch die hochreflektierenden dielektrischen Spiegel erreichten optischen Weglängen von bis zu mehreren Kilometern und die durch die Messung der Resonatorabklingzeit vorhandene Unabhängigkeit von der eingestrahlten Intensität machen diese ursprünglich für die Gasphase entwickelte Methode zu einer hochempfindlichen und nachweisstarken Detektionsmethode für Fließsysteme in der analytischen Chemie.

3.2 Cavity-Ring-Down-Spektroskopie in der flüssigen Phase

Um flüssige Phasen mit der CRDS untersuchen zu können, ist es nötig, diese in den optischen Resonator einzubringen. Eine Möglichkeit ist dabei die Verwendung von konventionellen Quarzküvetten, hier kommt es allerdings an den Phasengrenzen Luft/Quarz und Quarz/Flüssigkeit zu zusätzlichen Reflexions- oder Streuungsverlusten im Resonator. Um diese zu minimieren, gibt es verschiedene Möglichkeiten der geometrischen Anordnung der Küvetten im Resonator. Zum einen kann die gesamte Küvette im sogenannten Polarisations- oder Brewsterwinkel

$$\theta_B = \arctan\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \tag{3.1}$$

plaziert werden [66]. Dabei ist n_1 der Brechungsindex der Phase, aus der der Laserstrahl auf die Grenzfläche trifft und n_2 der Brechungsindex der Phase, in die der Laserstrahl transmittiert wird. Wird dabei parallel zur Einfallsebene polarisiertes Laserlicht verwendet, so kommt es zur vollständigen Brechung an der Phasengrenze und es findet keinerlei Reflexion statt. Bei Standardküvetten ist es aufgrund der parallelen Seitenwände jedoch nur möglich, eine der vier auftretenden Grenzflächen im Brewsterwinkel anzuordnen. Zur weiteren Minimierung der Reflexionsverluste wurden deshalb spezielle Brewsterwinkel-Flußzellen entwickelt, bei denen alle vier Grenzflächen im Brewsterwinkel angeordnet sind [83]. Zum anderen kann eine Standardküvette senkrecht zur Ebene des im Resonator eingekoppelten Lichts angeordnet werden. Dies führt dazu, daß das an den Grenzflächen reflektierte Licht wiederum in den Resonator eingekoppelt wird, wodurch ebenfalls die Reflexionsverluste verringert werden [84]. Zudem ist es möglich, gänzlich auf Küvetten im Resonator zu verzichten und die hochreflektierenden dielektrischen Spiegel als Begrenzung der Meßzelle zu nutzen [67]. Da die Spiegel dabei allerdings in direktem Kontakt mit der flüssigen Phase stehen, muß sichergestellt sein, daß es während der Messung nicht zu einer Verringerung des Reflexionsgrades durch Absorption auf der Spiegeloberfläche oder Reaktionen mit Materialien der dielektrischen Schichten kommt. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Geometrien.

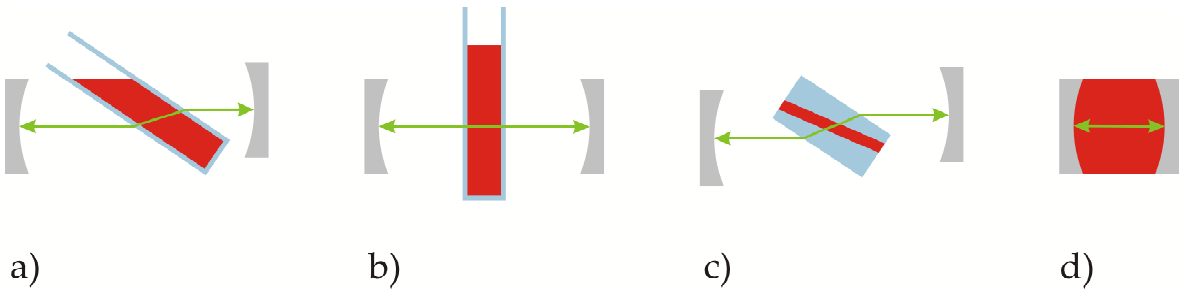


Abbildung 3.1: Geometrien zum Einbringen einer flüssigen Phase in der Resonator. a) Standardküvette in Bresterwinkelanordung b) Standardküvette senkrecht zur Einfallsebene des Lichts c) Brewsterwinkel-Flußzelle d) Flüssige Phase in direktem Kontakt zu den Spiegelwänden.

Die Nutzung der CRDS als Detektionsmethode in der flüssigen Phase wurde erstmalig im Jahre 2002 beschrieben. Xu et. al. untersuchten das 5. Obertonspektrum der C-H-Streckschwingung von Benzol im Wellenlängenbereich von 590-615 nm, indem sie eine bzw. zwei Standardküvetten im Brewsterwinkel in die Ring-Down-Cavity einbrachten [66]. Alexander nutzte 2004 eine ähnliche Konfiguration zur Untersuchung der Kinetik von photoinduzierten Reaktionen am Beispiel der Reaktion von Nitratradikalen mit Terpenen in Acetonitril [47]. Ebenfalls im Jahr 2002 veröffentlichten Hallock et al. den ersten Meßaufbau, bei dem der Resonator komplett durch die flüssige Phase ausgefüllt wurde [67]. Bei der Untersuchung verschiedener Farbstofflösungen lagen die erreichbaren Nachweisgrenzen dabei bei $\alpha = 10^{-6}$ cm^{-1}. Weiterhin wurde mit diesem Aufbau die Reaktionskinetik der Reduktion von Methylenblau durch einen Überschuß an Ascorbinsäure untersucht [85, 86]. Die Konzentration der verwendeten Methylenblaulösungen betrug dabei 3 nmol/L. Aufgrund der Resonatorlänge von 21 cm und des damit zusammenhängenden Detektionsvolumens von mehreren Millilitern war dieser Aufbau allerdings nicht zur Detektion in analytischen Trennsystemen geeignet.

Als Detektionsmethode in der Flüssigkeitschromatographie wurde die CRDS zum ersten Mal im Jahr 2003 von Snyder et al. genutzt [83]. Als Detektionszelle diente dabei eine Brewsterwinkel-Flußzelle mit einem Volumen von 10 µL und einer optischen Weglänge von ca. 300 µm. Die HPLC-Trennung wurde mit fünf verschiedenen Anthrachinonen durchgeführt, die Nachweisgrenze bei 470 nm lag dabei für Quinalizarin bei 0,5 µmol/L. Durch Verwendung eines CW- anstatt eines gepulsten Lasers und ansonsten gleichem Aufbau ließ sich diese bei späteren Messungen auf 30 nmol/L verbessern [87].

Bahnev et al. stellten dann im Jahr 2005 eine Flußzelle vor, bei der die dielektrischen Spiegel in direktem Kontakt mit der flüssigen Phase sind [88]. Bei einem Zellvolumen von 12 µL und einer optischen Weglänge von 2 mm lag die Nachweisgrenze für Kristallviolett bei 532 nm bei 2,5 nmol/L. In weiteren Studien wurde mit derselben Detektionszelle eine HPLC-Trennung verschiedener Azofarbstoffe durchgeführt. Dabei wurden bei 532 nm Nachweisgrenzen von 15-20 nmol/L erreicht [89]. Weiterhin wurde versucht, die Meßwellenlänge weiter

in den UV-Bereich zu verschieben, da dieser für analytische Anwendungen von größerem Interesse ist. Bei 457 nm wurden dazu Farbstoffe sowie bei 355 nm nitrierte PAKs (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) mittels HPLC getrennt. Die Nachweisgrenzen betrugen dabei 17 nmol/L für Kongo-Korinth G und 75 nmol/L für 2-Nitrofluoren [90].

Aufgrund der dabei auftretenden kurzen optischen Weglängen und der Notwendigkeit, die Spiegel regelmäßig zu reinigen, wurde von van der Sneppen et al. die Verwendung einer Standard-Flußküvette mit 80 µL Detektionsvolumen in einer senkrechten Anordnung zur Einfallsebene des Lichts untersucht [84]. Für 2-Nitrofluoren konnte die Nachweisgrenze bei 355 nm aufgrund der längeren optischen Weglänge damit auf 40 nmol/L verbessert werden, bei 273 nm betrug die Nachweisgrenze 0,5 µmol/L.

Eine weitere Möglichkeit, Reflexions- und Absorptionsverluste von in den Resonator eingebrachten Zellen zu vermeiden, wurde 2006 von Alexander et al. vorgestellt [91]. Er nutzte eine von Klebniczki et al. 1994 für Farbstofflaser entwickelte Methode, um einen flachen Flüssigkeitsstrahl aus Ethylenglycol zu generieren [92]. Dieser Strahl mit einer optischen Weglänge von 23 µm wurde dann im Brewsterwinkel in die Ring-Down-Cavity eingebracht. Als Analyt wurde der Farbstoff Malachitgrün im Ethylenglycol gelöst, die Nachweisgrenze betrug dabei 71 nmol/L. Durch die konstruktionsbedingt sehr hohe Fließgeschwindigkeit von 4,3 m/s ist allerdings eine Kombination dieser Methode mit analytischen Trennmethoden wie der HPLC nicht möglich.

Um die Nachteile der oben beschriebenen Methoden wie Reflexions- und Absorptionsverluste von in den Resonator eingebrachten Zellen oder Verringerung des Reflexionsgrades der Spiegel bei direktem Kontakt mit der flüssigen Phase zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit ein frei fließender Flüssigkeitsfilm als Detektionsmedium entwickelt, dessen geringe Fließgeschwindigkeit eine Kombination mit analytischen Trennmethoden wie der HPLC erlaubt.

3.3 Experimenteller Aufbau

3.3.1 Allgemeiner Aufbau

Das folgende Kapitel stellt den CRDS-Meßaufbau sowie den in der vorliegenden Arbeit zur Detektion in analytischen Trennsystemen entwickelten frei fließenden Tensidfilm vor. Abbildung 3.2 gibt einen schematischen Überblick über die verwendeten Komponenten.

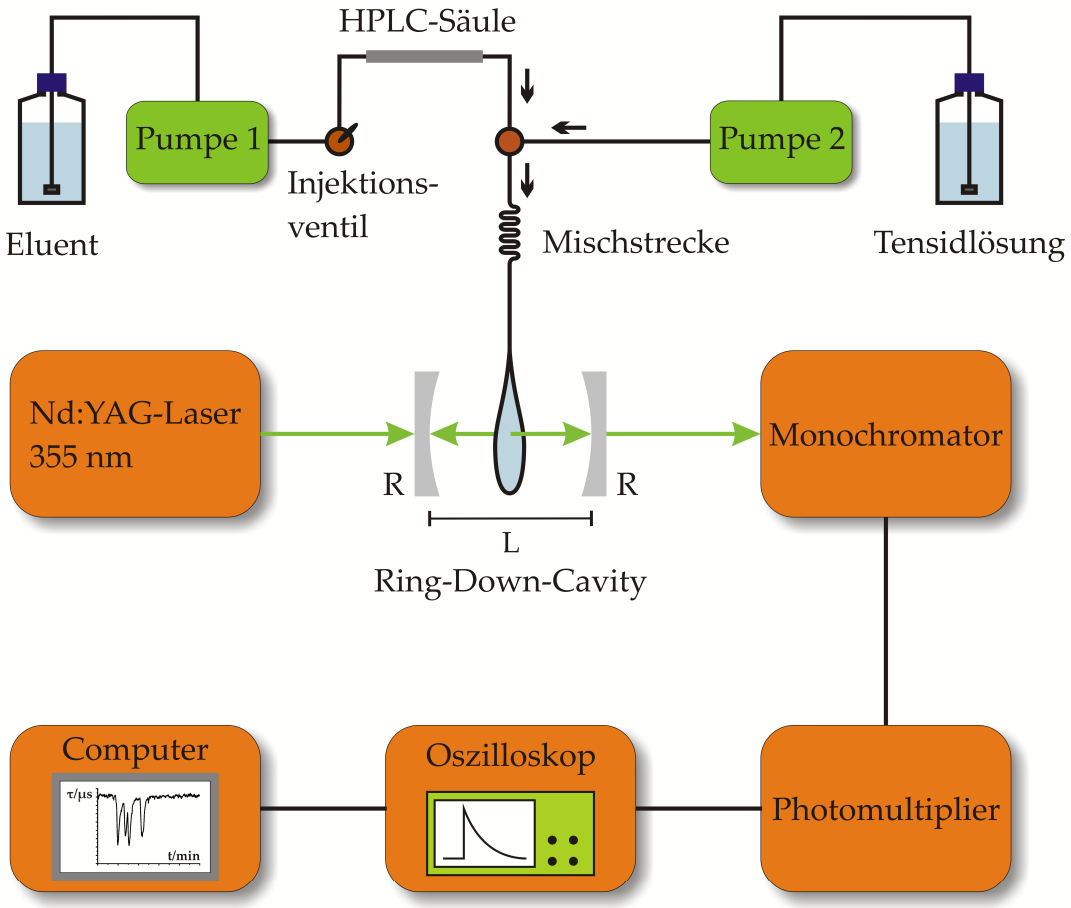


Abbildung 3.2: CRDS-Meßaufbau zur Detektion in analytischen Trennsystemen.

Als Lasersystem wurde ein gepulster, frequenzverdreifachter Nd:YAG-Laser (HY1200, Lumonics Ltd, Rugby, GB) bei einer Wellenlänge von 355 nm genutzt. Die Pulsfrequenz des Lasers betrug 20 Hz, die Pulsdauer 8 ns und die verwendeten Pulsenergien lagen im Bereich von 1 mJ. Mehrere Irisblenden zwischen dem Laser und dem optischem Resonator dienten zur Justierung des

Laserstrahls sowie der Selektion der gewünschten TEM_{00}-Mode. Die lineare Ring-Down-Cavity wurde durch zwei hochreflektierende dielektrische Spiegel (Part No. 103368, Layertec GmbH, Mellingen, D [93]) mit einem garantierten Reflexionsgrad > 99,9 % im Bereich von 340-360 nm und einem Reflexionsmaximum bei 355 nm gebildet. Montiert waren beide auf Standardspiegelhalterungen in einem Abstand von 30 cm. Das erhaltene Ring-Down-Signal wurde mit einem Photomultiplier detektiert (R955, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, D) und anschließend mit einem digitalen Speicheroszilloskop aufgenommen (TDS 320, Tektronix Deutschland GmbH, Schwalbach, D, vertikale Auflösung 8 bit, Abtastrate 500 MS/s, Bandbreite 100 MHz). Nach einer Mittelung über 2-4 Pulse wurden die Meßsignale mit Hilfe eines GPIB-Controllers (GPIB-USB-HS, National Instruments Germany GmbH, München, D) an den Meßrechner übertragen. Hier erfolgte dann die Bestimmung der Ring-Down-Zeit durch ein an der Universität Ulm in der graphischen Programmierumgebung LabVIEW entworfenes Auswerteprogramm [94]. Dazu wurde ein exponentieller Fit an die Ring-Down-Kurve angepaßt und daraus die Ring-Down-Zeit bestimmt. Aufgrund der Zeit, die für die Übertragung der Daten vom Oszilloskop auf den Meßrechner und den anschließenden Fit benötigt wurde, konnte pro Sekunde ein Meßwert aufgezeichnet werden.

3.3.2 Entwicklung eines frei fließenden Tensidfilms

Um einen frei fließenden Flüssigkeitsfilm als Detektionsmedium in der CRDS verwenden zu können, muß dieser eine für CRDS-Messungen ausreichende optische Qualität aufweisen, d. h. er darf nur eine geringe Eigenabsorption besitzen und es darf zu keinen Streueffekten an der Filmoberfläche kommen. Zusätzlich muß er bei den durch die analytische Trennung gegebenen Fließgeschwindigkeiten stabil sein. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu ein frei fließender Tensidfilm genutzt, als Tensid kam dabei Natriumdodecylsulfat (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) zum Einsatz. Dieses zeigt in wäßriger Lösung bei der verwendeten Laserwellenlänge von 355 nm nur eine geringe Absorption.

In der Literatur gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die sich mit den Eigenschaften und dem Verhalten von Tensidfilmen beschäftigen [95-100]. Die

Stabilität und die Lebensdauer solcher Tensidfilme sind dabei abhängig von einer Reihe von Kriterien [101]. Dazu gehören die Menge des über die Oberfläche des Films verdampfenden Wassers, die Luftfeuchtigkeit der Umgebung, Luftströmungen, Erschütterungen und Vibrationen sowie der CO_2-Gehalt der Umgebungsluft. Bekannt ist, daß sich die Stabilität und die Lebendauer sehr stark steigern lassen durch die Zugabe von Substanzen, die das Verdampfen von Wasser über die Oberfläche reduzieren. Am häufigsten wird zu diesem Zweck Glyzerin eingesetzt [102, 103]. Die Lebensdauer ließ sich dabei von wenigen Sekunden bei reinen Tensidfilmen über Minuten bei 5 % Glyzerinzugabe auf mehrere Stunden bei einem Glyzerinanteil von 50 % steigern.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zusätze untersucht, um sowohl eine hohe Lebensdauer und Stabilität als auch eine hohe optische Qualität des verwendeten SDS-Films bei einer Fließgeschwindigkeit im Bereich von 1 mL/min zu gewährleisten. Einen Überblick über die Zusammensetzung der untersuchten Tensidlösungen geben die Tabellen 3.1 und 3.2.

Erste Untersuchungen wurden mit SDS einer Reinheit von 99 % bezogen auf den Gesamtalkylsulfatgehalt (Merck KGaA, Darmstadt, D) durchgeführt.

Konzentration SDS/(mmol/L)	Zusatz, Volumenanteil	Stabilität und optische Qualität
100	Glycerin, 0–10 %	kein stabiler Film möglich
200	-	Abriß des Films nach ca. 20 s
200	Glycerin, 5 %	Abriß des Films nach ca. 30 s
200	Glycerin, 10 %	stabiler Film τ_0 sinkt durch Film von 2,5 auf 1,6 µs
200	Glycerin, 25 %	Abriß des Films nach ca. 1 min
300	Glycerin, 0-10%	kein stabiler Film möglich

Tabelle 3.1: Stabilität und optische Qualität des Tensidfilms bei Verwendung von SDS mit einer Reinheit von 99 % bezogen auf den Gesamtalkylsulfatgehalt.

Stabile Filme bei Fließgeschwindigkeiten von 1 mL/min konnten bei einer SDS-Konzentration von c = 200 mmol/L und einem Volumenanteil von 10 % Glycerin (Merck KGaA, Darmstadt, D) erreicht werden. Die optische Qualität des Tensidfilms war jedoch für CRDS-Messungen nicht optimal, die Ring-Down-Zeit sank dadurch von τ_0 = 2,5 µs ohne Tensidfilm auf τ_0 = 1,6 µs.

Weitere Untersuchungen fanden mit SDS einer Reinheit von 95 % bezogen auf den Gesamtalkylsulfatgehalt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) statt. Für die Erzeugung eines stabilen Tensidfilms war dabei eine SDS-Konzentration von c = 20 mmol/L ausreichend. NMR-Untersuchungen zeigten hier Anwesenheit von längerkettigen Alkylsulfaten.

Konzentration SDS/(mmol/L)	Zusatz, Volumenanteil	Stabilität und optische Qualität
20	Glycerin, 0-25 %	stabiler Film keine ausreichende optische Qualität
20	Ethanol, 0-10 %	kein stabiler Film möglich
20	2-Propanol, 0-10 %	kein stabiler Film möglich
20	1-Butanol, 1-3 %	stabiler Film keine ausreichende optische Qualität
20	1-Butanol, 3,5 %	stabiler Film gute optische Qualität
20	1-Butanol, 4 %	stabiler Film gute optische Qualität
20	1-Butanol, 5 %	stabiler Film gute optische Qualität
20	1-Butanol, 10 %	Abriß nach ca. 30 s

Tabelle 3.2: Stabilität und optische Qualität des Tensidfilms bei Verwendung von SDS mit einer Reinheit von 95 % bezogen auf den Gesamtalkylsulfatgehalt.

Eine ausreichende optische Qualität des Tensidfilms konnte hier jedoch weder bei einer reinen SDS-Lösung, noch bei Volumenanteilen von 1-25 % Glycerin erreicht

werden. Noch höhere Anteile an Glycerin führten zu instabilen Filmen. Als weitere Zusätze wurden deshalb Ethanol, 2-Propanol und 1-Butanol (alle Merck KGaA, Darmstadt, D) untersucht. Durch Zugabe von Ethanol sowie 2-Propanol ließen sich keine stabilen Tensidfilme generieren. Volumenanteile von 1-5 % 1-Butanol lieferten stabile Tensidfilme, die jedoch im Bereich von 1-3 % 1-Butanol keine ausreichende optische Qualität aufwiesen. Auf der Oberfläche konnten dabei Wellenbewegungen beobachtet werden, die ein starkes Absinken der Ring-Down-Zeit zur Folge hatten. Ein Optimum wurde schließlich bei einer Tensidlösung mit einer SDS-Konzentration von 20 mmol/L und einer Volumenkonzentration von 3,5 % 1-Butanol erhalten. Bei dieser Zusammensetzung kam es durch den im Resonator installierten Film nicht mehr zu einer Abnahme der Ring-Down-Zeit im Vergleich zum leeren Resonator.

Als Begrenzung für frei fließende Tensidfilme kommen in der Literatur häufig Metall- oder Kunststoffdrähte zum Einsatz. Die durch die Drähte gebildete Form des Tensidfilms hat dabei ebenfalls einen Einfluß auf dessen Stabilität. Eine Übersicht verschiedener Konstruktionsmöglichkeiten bei Fließgeschwindigkeiten zwischen 0,5 und 4 m/s findet sich bei Rutgers et al. [104].

Um den Tensidfilm im optischen Resonator aufzuspannen, wurden die Enden eines Chrom-Nickel-Drahts mit einer Länge von 100 mm und einem Durchmesser von 0,3 mm durch die 1 mm große Öffnung einer Plastikspitze für Mikroliterpipetten geführt. Dadurch wurde eine ovale Drahtschleife von ungefähr 10 mm auf 40 mm aufgespannt (Abbildung 3.3).

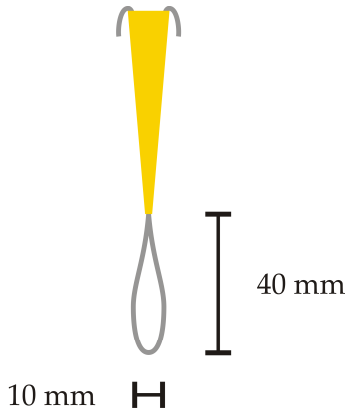


Abbildung 3.3: Drahtschleife zum Aufspannen des Tensidfilms in der Ring-Down-Cavity.

Die Tensidlösung wurde mit einer HPLC-Pumpe (880-PU, Jasco GmbH, Groß-Umstadt, D) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,2 mL/min über die schmale Öffnung der Pipettenspitze in die Drahtschleife gepumpt. Der Aufbau des SDS-Films in der Schleife erfolgte mechanisch einmalig zu Beginn der Messung. Zur Reduzierung von Reflexionsverlusten wurde der SDS-Film anschließend im Brewsterwinkel im Resonator justiert. Dazu wurde die Pipettenspitze, die als Halterung für die Drahtschleife fungiert, in einem Drehmeßtisch montiert, der mit einer Mikrometerschraube um 360 Grad gedreht werden konnte. Zusätzlich wurde im unteren Bereich der Drahtschleife ein dünner Streifen Filterpapier als Ablauf installiert, um Erschütterungen des Films durch abfallende Tropfen der Tensidlösung zu vermeiden. Die Maße des Streifens wurden dabei so gewählt, daß die Ablaufmenge der Menge der zuströmenden Tensidlösung entspricht. Abbildung 3.4 zeigt den gesamten Aufbau zur Generierung des Tensidfilms in der Ring-Down-Cavity.

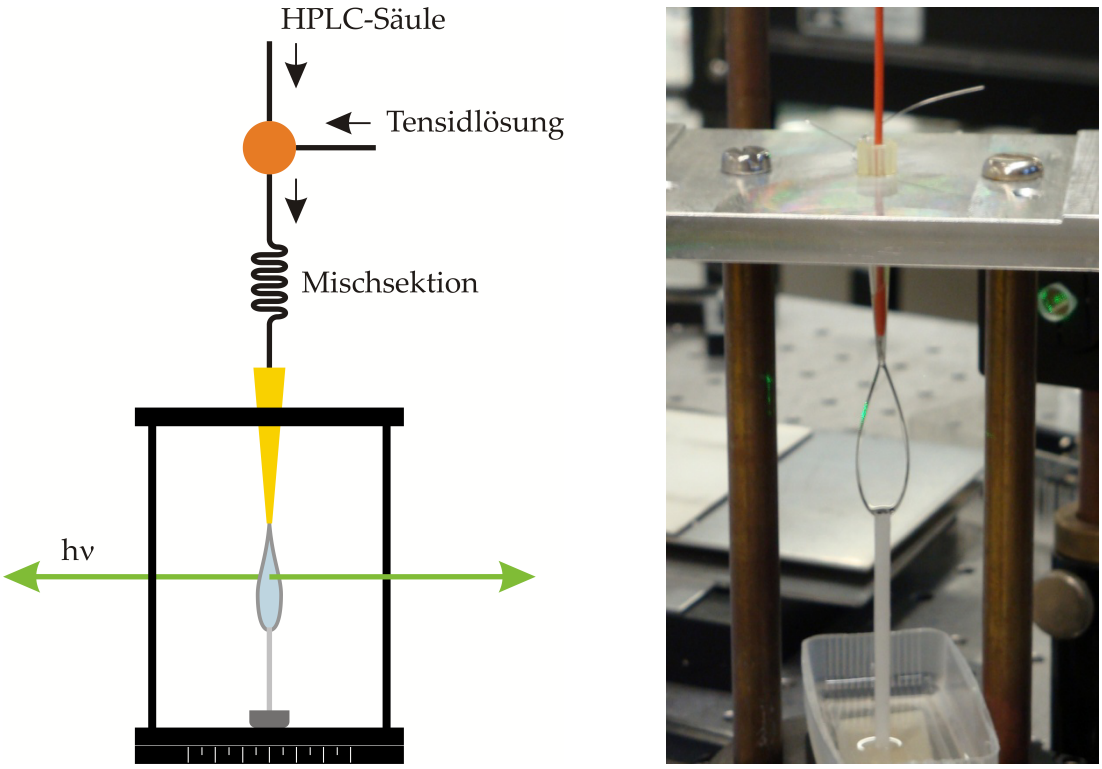


Abbildung 3.4: Meßaufbau zur Generierung eines frei fließenden Tensidfilms innerhalb des optischen Resonators.

3.3.3 Kombination mit analytischen Trennsystemen

Zur Nutzung des frei fließenden Tensidfilms als Detektionsmedium für die HPLC wurde der Eluent direkt nach der chromatographischen Trennsäule über ein T-Stück mit der Tensidlösung vereinigt. Die Fließgeschwindigkeit der Tensidlösung lag dabei bei 1,2 mL/min, die in der vorliegenden Arbeit genutzte Trennsäule wurde mit 0,05 mL/min betrieben. Um eine hohe optische Qualität und Stabilität des Tensidfilms sicherzustellen, mußte bei Erreichen der Drahtschleife eine homogene Mischung aus Tensidlösung und Eluent gewährleistet sein. Ansonsten konnte es durch den Eluenten, vor allem bei einem hohen Anteil an organischen Lösungsmitteln, zur Ausbildung eines zwei bis drei Millimeter breiten Streifens in der Mitte des Tensidfilms kommen, wodurch die optische Qualität sowie die Stabilität des Films stark verringert wurden.

Um bei der Mischung von Tensidlösung und Eluent die Vergrößerung des Außensäulenvolumens möglichst gering zu halten, wurde dazu keine kommerzielle Mischkammer genutzt. Statt dessen wurde zwischen T-Stück und Drahtschleife eine eng in achtförmigen Schleifen gewundene Mischkapillare aus Edelstahl mit einer Länge von 93 cm und einem Innendurchmesser von 0,2 mm eingefügt. Die aufgrund der Windungen auftretenden Zentrifugalkräfte führen in der Kapillare zu turbulenten Strömungen [105], wodurch eine homogene Mischung von Tensidlösung und Eluent erreicht wird.

3.4 Detektion und Bestimmung von Nitroaromaten

In den in der Literatur beschriebenen Methoden zur Kombination von CRDS und HPLC wurden zu Demonstrationszwecken häufig Farbstoffe mit einem hohen Extinktionskoeffizienten bei der jeweiligen Meßwellenlänge als Analyten verwendet. Zusätzlich wurden die Messungen aufgrund der dort qualitativ besseren Spiegel meist im sichtbaren Bereich durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung des entwickelten Tensidfilms als Detektionsmedium für die HPLC an einem realen Trenn- und Bestimmungsproblem aus dem Bereich der Umweltanalytik geprüft.

Dazu wurden vier Analyten aus der Gruppe der nitroaromatischen Verbindungen getrennt, deren Absorptionsmaxima in der Nähe der genutzten Laserwellenlänge von $\lambda = 355\,\text{nm}$ liegen. Diese Stoffgruppe spielt bei der Untersuchung von Altlasten in der Rüstungsproduktion eine große Rolle. In den betroffenen Gebieten kam es sowohl durch die Sprengstoffproduktion als auch durch eine oftmals unsachgemäß durchgeführte Vernichtung zu einer starken Kontamination von Böden und Grundwasser. Zusätzlich sind dort Transformationsprodukte aus mikrobiellen, chemischen und photochemischen Prozessen zu finden. Eine Übersicht über die auftretenden Spezies findet sich in zahlreichen Arbeiten zur Untersuchung von Rüstungsaltlasten [106-110]. Die meisten dieser nitro-aromatischen Verbindungen wirken toxisch, viele sind zudem erbgutverändernd und/oder krebserzeugend [111], wobei die Transformations-produkte in der Regel ein höheres toxisches bzw. erbgutveränderndes/krebserzeugendes Potential besitzen.

3.4.1 Das Trennsystem

Aus den vorhergehenden Untersuchungen zur Stabilität des Tensidfilms war bekannt, daß der Film mit steigendem Anteil an organischen Lösungsmitteln instabiler wird. Um den Eintrag an organischen Komponenten in den Tensidfilm durch den Eluenten der Trennsäule möglichst gering zu halten, wurde deshalb ein Säuleninnendurchmesser von 1 mm gewählt.

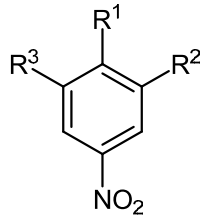
Das Trennsystem setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Trennsäule:	Allure® C18, Restek GmbH, Bad Homburg, D Länge: 150 mm, Innendurchmesser: 1 mm Partikelgröße: 5 µm, Porengröße: 60 Å
Vorsäulenfilter:	KrudKatcher™ Classic, Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg, D
Injektionsventil:	Rheodyne Europe GmbH, Bensheim, D Injektionsvolumen: 0,5 µL
HPLC-Pumpe:	PU-980, Jasco GmbH, Groß-Umstadt, D

Eluent: Acetonitril/H_2O (σ (Acetonitril) = 70 %)
Acetonitril: gradient grade LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, D
H_2O: > 15 MΩ·cm, Reinstwasseranlage Option-R 15, ELGA LabWater, Celle, D

3.4.2 Die verwendeten Analyten

Getrennt wurde eine wäßrige Lösung der Nitroaromaten 4-Nitroanilin (99 %), 2,4-Dinitrophenol (15 % H_2O), 2,4-Dinitro-6-methylphenol (10 % H_2O) und Pikrinsäure (35 % H_2O). Die Konzentrationen betrugen jeweils 500 µmol/L. Bezogen wurden die Nitroaromaten von der Promochem GmbH, Wesel, D.



Analyt	R^1	R^2	R^3
4-Nitroanilin	NH_2	H	NO_2
2,4-Dinitrophenol	OH	NO_2	H
2,4-Dinitro-6-Methylphenol	OH	NO_2	CH_3
Pikrinsäure	OH	NO_2	NO_2

Tabelle 3.3: Strukturen der als Beispielanalyten verwendeten Nitroaromaten.

3.4.3 Bestimmung der Schichtdicke des Tensidfilms

Im leeren optischen Resonator ohne Tensidfilm wurden Ring-Down-Zeiten im Bereich von $\tau_0 = 2{,}8$ µs erhalten. Bei einer Resonatorlänge von 30 cm folgt daraus anhand von Gleichung (2.16) ein Reflexionsgrad von $R = 99{,}96$ % für die verwendeten dielektrischen Spiegel. Nach Aufspannen des Tensidfilms durch die homogene Mischung aus SDS-Lösung und Eluent bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,2 mL/min sank die Ring-Down-Zeit auf $\tau_0 = 2{,}59$ µs.

Zur Bestimmung der Schichtdicke des frei fließenden Tensidfilms wurden Tensidlösungen mit Pikrinsäurekonzentrationen von 2 µmol/L, 20 µmol/L und 100 µmol/L hergestellt. Anschließend wurden mit aufgespanntem Tensidfilm bei jeder Konzentration die Ring-Down-Zeiten im Resonator bestimmt.

c /(µmol/L)	τ /µs	d /µm
2	2,38	9,3
20	1,37	9,4
100	0,46	9,8

Tabelle 3.4: Bestimmung der Schichtdicke d des aufgespannten Tensidfilms.

Aus den erhaltenen Ring-Down-Zeiten wurde für die Filmdicke mit Hilfe von Gleichung (2.23) ein Mittelwert von d = 9,5 µm berechnet.

3.4.4 Trennung eines Nitroaromatengemischs

Die HPLC-Trennung des Nitroaromatengemisches wurde auf einer C18-Phase mit einem Acetonitril/H_2O-Gemisch (σ (Acetonitril) = 70 %) als mobiler Phase bei einer Fließgeschwindigkeit von 50 µL/min durchgeführt.

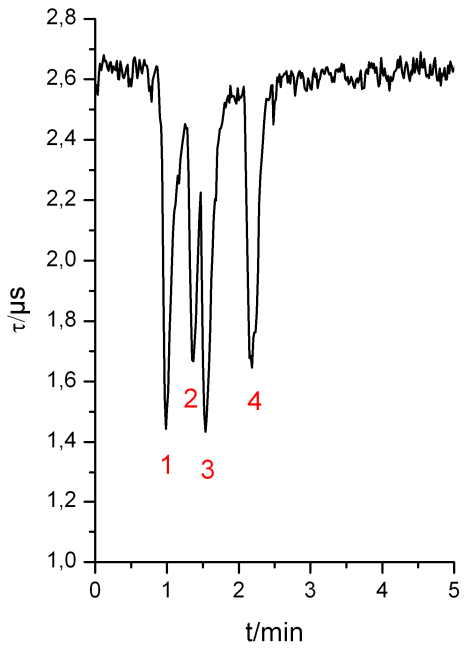


Abbildung 3.5: Trennung eines Nitroaromatengemischs, Auftragung der Ring-Down-Zeit gegen die Zeit. (1) Pikrinsäure (2) 4-Nitroanilin, (3) 2,4-Dinitrophenol (4) 2,4-Dinitro-6-methyl-phenol, Konzentration jeweils 500 µmol/L, Detektion durch CRDS in einem frei fließenden Tensidfilm als Detektionsmedium.

Abbildung 3.5 zeigt die Auftragung der bei der CRDS-Detektion bei einer Meßwellenlänge von 355 nm mit einem frei fließenden Tensidfilms als Detektionsmedium erhaltenen Ring-Down-Zeiten gegen die Zeit. Um aus diesen Rohdaten ein Chromatogramm zu erhalten, wurde für jeden Datenpunkt anhand der Ring-Down-Zeit τ mit Gleichung (2.23) die Extinktion A bestimmt. Das aus den Daten von Abbildung 3.5 erhaltene Chromatogramm zeigt die folgende Abbildung 3.6.

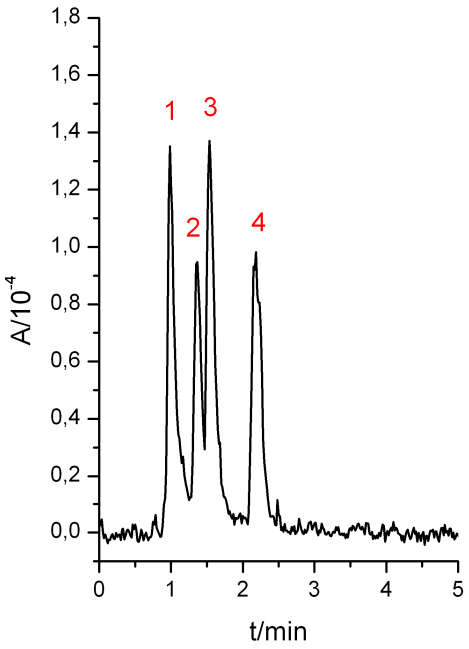


Abbildung 3.6: Trennung eines Nitroaromatengemischs, Auftragung der aus den Ring-Down-Zeiten erhaltenen Extinktion gegen die Zeit. (1) Pikrinsäure (2) 4-Nitroanilin, (3) 2,4-Dinitrophenol und (4) 2,4-Dinitro-6-methylphenol, Konzentration jeweils 500 µmol/L, Detektion durch CRDS in einem frei fließenden Tensidfilm als Detektionsmedium.

Das erhaltene Chromatogramm zeigt, daß der generierte frei fließende Tensidfilm als Detektionsmedium für die CRDS-Detektion in der HPLC, bzw. allgemein in analytischen Fließsystemen, geeignet ist. Die mit der Mischung des Flusses aus dem Trennsystem mit der Tensidlösung einhergehende Verdünnung um den Faktor 25 sowie die installierte Mischkapillare führten dabei nur zu einer geringfügigen Bandenverbreiterung.

3.4.5 Quantifizierung am Beispiel von Pikrinsäure

Eine Quantifizierung wurde am Beispiel von Pikrinsäure durchgeführt. Dazu wurde eine Kalibrierkurve im Konzentrationsbereich von 200-670 µmol/L aufgenommen. Aus den bei den jeweiligen Konzentrationen erhaltenen Chromatogrammen wurden mit Hilfe des Datenanalyseprogramms Origin 8.1 durch Integration die Peakflächen ermittelt. Die Mittelwerte aus sechs Wiederholungsmessungen wurden anschließend gegen die Konzentration aufgetragen. Abbildung (3.7) zeigt die erhaltene Kalibrierkurve.

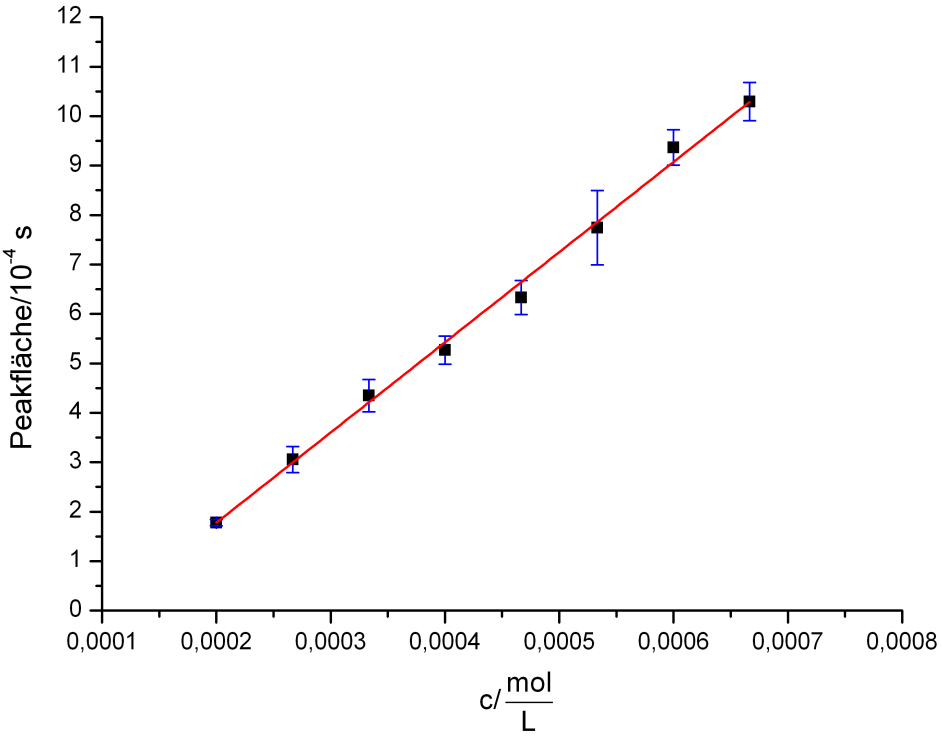


Abbildung 3.7: Kalibrierkurve für Pikrinsäure im Bereich von 200-670 µmol/L. Das Bestimmtheitsmaß der Kurve beträgt $R^2 = 0{,}998$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von jeweils 6 Wiederholungsmessungen.

Die Kalibrierkurve zeigt im gemessenen Konzentrationsbereich einen guten linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0{,}998$. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von jeweils sechs Wiederholungsmessungen pro gemessener Konzentration an.

Die Nachweisgrenze läßt sich für den Fall eines direkt in der Tensidlösung gelösten Analyten nach Gleichung (2.27) ermitteln. Ausgehend von einer Ring-Down-Zeit im leeren Resonator von $\tau_0 = 2{,}59\ \mu s$ und einer Standardabweichung von $\Delta\tau_0 = 0{,}03\ \mu s$ folgt daraus ein minimaler Absorptionskoeffizient von $\alpha_{min} = 0{,}014\ cm^{-1}$, welcher äquivalent zu einer Extinktion von $A = 5{,}6 \cdot 10^{-6}$ ist. Für Pikrinsäure mit einem Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 7943\ L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ bei 355 nm folgt daraus eine Konzentration von $7{,}5 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Legt man dabei das vom Laserstrahl illuminierte Detektionsvolumen von ungefähr 30 nL zugrunde, so entspricht dies einer detektierbaren Absolutmenge von $2{,}3 \cdot 10^{-14}$ mol an Pikrinsäure.

Im Falle einer bei chromatographischen Trennungen üblichen Quantifizierung über die Peakflächen läßt sich die Nachweisgrenze über die in der DIN-Norm 32645 beschriebene Kalibriergeradenmethode bestimmen [112]. Hierbei liegt die Nachweisgrenze für Pikrinsäure bei einer Konzentration von $2{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

3.5 Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein frei fließender Tensidfilm entwickelt, der sich als Detektionsmedium innerhalb eines CRDS-Resonators eignet. Die genutzte SDS-Lösung lieferte einen stabilen Tensidfilm mit einer für CRDS-Messungen ausreichenden optischen Qualität. Die Nachweisgrenze für direkt in der Tensidlösung gelöste Analyten von $\alpha_{min} = 0{,}014\ cm^{-1}$ liegt dabei in der Größenordnung ähnlicher CRDS-Meßsysteme für Absorptionsmessungen in der flüssigen Phase [91].

Die Eignung als Detektionsmethode für analytische Trennsysteme wurde am Beispiel einer HPLC-Trennung eines Nitroaromatengemisches gezeigt. Die Kombination des aus der Trennsäule kommenden Flusses mit der Tensidlösung führte dabei trotz der unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten und der benötigten Mischkapillare nur zu einer geringfügigen Bandenverbreiterung. Eine Quantifizierung wurde am Beispiel von Pikrinsäure durchgeführt. Die mittels der Kalibriergeradenmethode aus den Peakflächen erhaltene Nachweisgrenze liegt hier bei $3{,}1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Verschiedene in der Literatur beschriebene CRDS-Systeme

für die HPLC-Detektion weisen Nachweisgrenzen auf, die im Bereich von 10^{-7} mol/L [83] bzw. 10^{-8} mol/L [89, 90] liegen. Die dabei verwendeten Meßzellen wiesen jedoch optische Weglängen auf, die um den Faktor 10^2 bzw. 10^3 größer sind als beim hier entwickelten Tensidfilm. Zusätzlich besitzen die erhältlichen dielektrischen Spiegel im sichtbaren Wellenlängenbereich einen höheren Reflexionsgrad als im UV-Bereich.

Die schlechtere Nachweisgrenze bei HPLC-Trennungen im Vergleich zu Untersuchungen, bei denen der Analyt direkt in der Tensidlösung gelöst ist, liegt einerseits an der stattfindenden Verdünnung bei der Kombination des Flusses aus der Trennsäule mit der Tensidlösung. Andererseits führt die Form des Tensidfilms dazu, daß sich nur ein Teil der injizierten Analytmoleküle im Bereich des Laserstrahls befindet und somit erfaßt werden kann. Sowohl die Analyten in der Tensidlösung, die an den zum Aufspannen des Films benötigten Drähten nach unten läuft als auch in der Lösung zwischen den Drähten und dem vom Laserstrahl erfaßten Bereich, kann hier nicht detektiert werden.

Um die Nachweisgrenze zu verringern, könnten zum einen dielektrische Spiegel mit einem höheren Reflexionsgrad verwendet werden. Zum anderen könnte die Fläche des aufgespannten Tensidfilms verkleinert werden. Dies würde bei gleichbleibender Fließgeschwindigkeit zu einer Erhöhung der Schichtdicke des Tensidfilms führen. Zusätzlich würde sich dadurch das nicht für die Detektion nutzbare Filmvolumen zwischen den Drähten und dem vom Laserstrahl erfaßten Bereich reduzieren. Dies würde vor allem bei analytischen Trennungen zu einer besseren Nachweisgrenze führen. Beachtet werden müßte dabei allerdings, daß eine Erhöhung der Schichtdicke auch mit einer Erhöhung der Verluste durch die Tensidlösung im Resonator verbunden wäre und somit zu einer Verringerung von τ_0 führen würde.

In der Praxis erwies sich der Tensidfilm als komplexes System, dessen mechanische Stabilität sowohl von der Form und der Größe der aufgespannten Fläche, der Zusammensetzung der Tensidlösung, der Umgebungstemperatur sowie der Fließgeschwindigkeit abhängt. Verschiedene Versuche, die Fläche des aufgespannten SDS-Films zu verkleinern, um die Filmdicke zu erhöhen sowie das Volumen zwischen den Drähten und dem vom Laserstrahl erfaßten Bereich zu

verkleinern, führten zu einem instabilen, nach kurzer Zeit abreißenden Film. Weder durch eine Änderung der Zusammensetzung der Tensidlösung noch durch eine Änderung der Fließgeschwindigkeit konnte anschließend eine ausreichende Stabilisierung des Films erreicht werden. Zur Lösung dieses Problems bedarf es weiterer Untersuchungen.

4 Evanescent-Wave-CRDS zur Untersuchung von Oberflächenprozessen

4.1 Evanescent-Wave-Cavity-Ring-Down-Spektroskopie

Die Evanescent-Wave-Cavity-Ring-Down-Spektroskopie (EW-CRDS) wurde zum ersten Mal 1997 von Pipino et al. vorgestellt [64] und kombiniert die Nachweisstärke der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie mit der Oberflächenspezifität von Evanescent-Wave-Methoden. Aufgrund der bei der Totalreflektion an einer Phasengrenze auftretenden evaneszenten Welle lassen sich damit Analyten detektieren, die entweder an der Grenzfläche adsorbiert sind oder sich im Bereich von wenigen hundert Nanometern über der Grenzfläche befinden.

4.1.1 Prinzip der Evanescent-Wave-CRDS

Trifft eine elektromagnetische Welle von einem optisch dichteren auf ein optisch dünneres Medium, so wird ein Teil des Lichtstrahls an der Grenzfläche reflektiert. Der Rest wird gemäß des Snelliusschen Brechungsgesetzes

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} \tag{4.1}$$

gebrochen und läuft im optisch dünneren Medium weiter. Dabei sind n_i der Brechungsindex des jeweiligen Mediums sowie θ_i der Winkel zwischen der Ausbreitungsrichtung des Lichtstrahl und der Oberflächennormalen im jeweiligen Medium (i = 1: optisch dichteres Medium, i = 2: optisch dünneres Medium).

Bei Winkeln, die größer sind als der sogenannte Grenzwinkel θ_c, ist jedoch der Übergang des Lichtstrahls in das optisch dünnere Medium nicht mehr möglich und es kommt zur sogenannten Totalreflexion (TIR, Total Internal Reflection) an der Grenzfläche. Der Grenzwinkel der Totalreflexion θ_c, auch kritischer Winkel genannt, ergibt sich aus dem Snelliusschen Brechungsgesetz zu [113]

$$\theta_c = \arcsin\frac{n_2}{n_1} \tag{4.2}$$

Dabei entsteht eine sogenannte evaneszente Welle, die in das optisch dünnere Medium eindringt. Diese breitet sich dort in z-Richtung (senkrecht zur Grenzfläche) aus, wobei ihre Intensität exponentiell mit der Eindringtiefe abnimmt. Die Eindringtiefe d_p ist dabei als der Abstand von der Grenzfläche definiert, bei dem die Amplitude des elektrischen Feldes auf den $1/e$-fachen Wert des Wertes an der Grenzfläche abgefallen ist und kann über

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2\theta - n_2^2}} \tag{4.3}$$

berechnet werden [114]. Dies ist jedoch nur ein willkürlich festgelegter Wert und entspricht nicht der wirklichen Eindringtiefe in das optisch dünnere Medium. Diese ist größer als d_p und wird von Mirabella mit ungefähr dem dreifachen Wert von d_p angegeben [115].

Der Energietransport der evaneszenten Welle ist bei der Totalreflexion auf Richtungen parallel zur Grenzfläche beschränkt. Somit findet in der z-Richtung kein Energietransport über die Grenzfläche in das optisch dünnere Medium statt. Ermöglicht wird dieser jedoch, sobald sich ein absorbierendes Medium im Bereich der evaneszenten Welle befindet. Der Energietransport in das optisch dünnere Medium äußert sich dabei in einer Schwächung des reflektierten Lichtstrahls. Die sogenannte abgeschwächte Totalreflexion ermöglicht somit die Beobachtung von Oberflächenprozessen sowie spektroskopische Untersuchungen nahe der Grenzfläche. Für spektroskopische Messungen wurde diese Methode zum ersten mal Anfang der 1960er Jahre von Harrick und Fahrenfort eingesetzt [116-118].

Bei der EW-CRDS befinden sich nun eine oder mehrere Grenzflächen in der Ring-Down-Cavity, an denen eine Totalreflexion stattfindet. Dadurch lassen sich an der Grenzfläche adsorbierte oder sich in deren Nähe befindliche Analyten mit Hilfe der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie untersuchen. Die grundlegenden Prinzipien der EW-CRDS stellten Pipino et al. im Jahr 1997 vor [64]. Anfänglich wurden zur Realisierung von TIR-Grenzflächen in der Ring-Down-Cavity Pellin-Broca-

Prismen [65], TIR-Ringresonatoren [119] sowie monolithische, gefaltete Resonatoren [120] eingesetzt. Diese waren jedoch Sonderanfertigungen und dementsprechend teuer. Im Laufe der weiteren Entwicklung der Methode kamen dann auch serienmäßig produzierte Dove-Prismen [121], gleichschenklige Prismen [122] und rechtwinklige Prismen [123] zum Einsatz. Das Einbringen von Prismen in die Ring-Down-Cavity verursacht jedoch Reflexions- und Brechungsverluste an den zusätzlichen Oberflächen. Diese Verluste lassen sich durch hochwertige Antireflexbeschichtungen [121] sowie Verwendung von Brewsterwinkeln [124] an den Ein- und Austrittsflächen der Prismen verringern.

4.1.2 Effektive Schichtdicke und Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes

Bei der Totalreflexionsspektroskopie (IRS, Internal Reflection Spectroscopy) kann die Wechselwirkung des evaneszenten Feldes mit einem absorbierenden Medium, ausgedrückt durch die Intensitätsabnahme pro Reflexion, exakt durch die Fresnelschen Formeln bei komplexem Brechungsindex oder durch die Maxwellschen Formeln berechnet werden. Diese Berechnungen werden jedoch bei Anwesenheit eines absorbierenden Mediums sehr kompliziert und liefern keinerlei physikalisches Verständnis der bei der IRS stattfindenden Absorptionsprozesse. Harrick et al. führten deshalb die sogenannte effektive Schichtdicke d_e ein, die ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung der evaneszenten Welle mit dem absorbierenden Medium darstellt und die im Fall von schwachen Absorptionen durch einfache Formeln ausgedrückt werden kann [125, 126].

In der konventionellen Absorptionsspektroskopie ist die Extinktion eine Funktion des Absorptionskoeffizienten α sowie der Schichtdicke d des absorbierenden Mediums. Bei Vernachlässigung von Reflexionsverlusten folgt aus dem Lambert-Beerschen Gesetz für die Transmission T:

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\alpha d} \tag{4.4}$$

I_0 und I entsprechen dabei den Intensitäten vor und nach dem Durchgang durch das absorbierende Medium. Im Falle einer geringen Absorption, d. h. $\alpha d < 0{,}1$, kann für die Transmission T die Näherung

$$T = \frac{I}{I_0} \approx 1 - \alpha d \tag{4.5}$$

genutzt werden.

In gleicher Weise kann bei der Totalreflexion im Fall einer geringen Absorption die Reflexion R durch

$$R = 1 - \alpha d_e \tag{4.6}$$

ausgedrückt werden, wobei d_e als effektive Schichtdicke bei einer einmaligen Reflexion definiert ist. Bei mehrfachen Reflexionen ist der reflektierte Anteil durch

$$R^N = \left(1 - \alpha d_e\right)^N \tag{4.7}$$

gegeben, wobei N die Anzahl der Reflexionen darstellt. Für $\alpha d_e \ll 1$ vereinfacht sich der reflektierte Anteil näherungsweise zu

$$R^N = 1 - N\alpha d_e \tag{4.8}$$

Aus dem Vergleich von Gleichung (4.5) und Gleichung (4.6) folgt, daß die effektive Schichtdicke d_e derjenigen Schichtdicke in einem konventionellen Transmissionsexperiment entspricht, die benötigt würde, um dieselbe Absorption wie im Totalreflexionsexperiment zu erhalten. Für analytische Messungen folgt daraus, daß die Nachweisgrenze bei Totalreflexionsexperimenten mit steigender effektiver Schichtdicke sinkt.

Bei der Berechnung der effektiven Schichtdicke sind zwei Fälle zu unterscheiden. Ist die Dicke des absorbierenden Mediums viel größer als die Eindringtiefe der evaneszenten Welle d_p, so kann die effektive Schichtdicke d_e bei senkrecht zur Einfallsebene polarisiertem Licht durch

$$d_{e\perp} = \frac{\lambda_1 n_{21} \cos\theta}{\pi\left(1-n_{21}^2\right)\sqrt{\sin^2\theta - n_{21}^2}} \tag{4.9}$$

und bei parallel zur Einfallsebene polarisiertem Licht durch

$$d_{e\parallel} = \frac{\lambda_1 n_{21} \cos\theta\left(2\sin^2\theta - n_{21}^2\right)}{\pi\left(1-n_{21}^2\right)\left[\left(1+n_{21}^2\right)\sin^2\theta - n_{21}^2\right]\sqrt{\sin^2\theta - n_{21}^2}} \tag{4.10}$$

ausgedrückt werden [127]. Dabei sind θ der Einfallswinkel des Lichts, $\lambda_1 = \lambda/n_1$ die Wellenlänge des Lichts im optisch dichteren Medium und $n_{21} = n_2/n_1$ das Verhältnis der Brechungsindizes zwischen dem optisch dünnerem und dem optisch dichteren Medium.

Die effektive Schichtdicke ist in diesem Fall von der Polarisationsrichtung, dem Einfallswinkel und der Wellenlänge des Lichtstrahls sowie dem Verhältnis der Brechungsindizes des TIR-Elements und dem sich über der TIR-Grenzfläche befindenden Medium abhängig. Für parallel polarisiertes Licht ist die effektive Schichtdicke dabei immer größer als für senkrecht polarisiertes. Sie steigt außerdem mit sinkendem Einfallswinkel θ, mit steigender Wellenlänge λ sowie mit steigendem Verhältnis von n_2 zu n_1. Praktisch bedeutet dies, daß bei gegebener Wellenlänge λ der Einfallswinkel θ möglichst nahe am kritischen Winkel θ_c und das Verhältnis n_2/n_1 möglichst nahe bei eins liegen sollten.

Für den Fall eines dünnen absorbierenden Films, dessen Dicke d viel kleiner als die Eindringtiefe der evaneszenten Welle d_p ist, läßt sich die effektive Schichtdicke d_e bei senkrecht zur Einfallsebene polarisiertem Licht durch

$$d_{e\perp} = \frac{4 n_{21} d \cos\theta}{1-n_{31}^2} \tag{4.11}$$

und bei parallel zur Einfallsebene polarisiertem Licht durch

$$d_{e\parallel} = \frac{4 n_{21} d \cos\theta\left[\left(1+n_{32}^4\right)\sin^2\theta - n_{31}^2\right]}{\left(1-n_{31}^2\right)\left[\left(1+n_{31}^2\right)\sin^2\theta - n_{31}^2\right]} \tag{4.12}$$

berechnen. Dabei sind θ der Einfallswinkel des Lichts, d die Dicke des absorbierenden Films $n_{21} = n_2/n_1$ das Verhältnis der Brechungsindizes zwischen dem absorbierenden Film und dem TIR-Element, $n_{31} = n_3/n_1$ das Verhältnis der Brechungsindizes zwischen dem an den Film angrenzenden optisch dünneren Medium und dem TIR-Element sowie $n_{32} = n_3/n_2$ das Verhältnis der Brechungsindizes zwischen dem optisch dünneren Medium und dem absorbierenden Film.

Die effektive Schichtdicke ist in diesem Fall von der Polarisationsrichtung, dem Einfallswinkel des Lichtstrahls, der Dicke des absorbierenden Films sowie den Verhältnissen der Brechungsindizes n_{21}, n_{31} sowie n_{32} abhängig. Graphische Darstellungen der effektiven Schichtdicke in Abhängigkeit der verschiedenen Faktoren finden sich bei Harrick [128]. Grundsätzlich gilt, daß der kritische Winkel für Untersuchungen von dünnen Filmen durch n_{31}, nicht durch n_{21} bestimmt wird und somit auch Filme untersucht werden können, die einen höheren Brechungsindex aufweisen als das TIR-Element. Die effektive Schichtdicke kann dabei sowohl viel größer als auch viel kleiner als die Dicke des absorbierenden Films sein. Ob sie bei paralleler oder senkrechter Polarisation des Lichts größer ist, hängt dabei vom Verhältnis n_{32}^4/n_{31}^2 ab.

Bei unpolarisiertem Licht läßt sich die effektive Schichtdicke berechnen durch

$$d_e = \frac{d_{e\perp} + d_{e\parallel}}{2} \tag{4.13}$$

Die Gleichungen (4.9) bis (4.12) gelten jedoch nur, wenn $\alpha d_e \ll 1$ ist. In diesem Bereich gehorchen die gemessenen Extinktionen somit dem Lambert-Beerschen Gesetz. Bei größeren Werten von αd_e gehorchen TIR-Messungen dagegen nicht mehr dem Lambert-Beerschen Gesetz und es sollte kein linearer Zusammenhang zur Konzentration erwartet werden.

4.1.3 Anwendungen der Evanescent-Wave-CRDS

Die ersten EW-CRDS-Methoden wurden zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens an einer Quarz-Gasphasen-Grenzfläche entwickelt. Pipino et al.

installierten 1997 ein Pellin-Broca-Prisma in einer Ring-Down-Cavity und untersuchten damit das Adsorptionsverhalten von I_2-Dampf an einer der Oberflächen des Prismas. Dabei konnte eine minimale I_2-Bedeckung von 0,04 Monolagen detektiert werden [65]. Daraufhin entwickelte Pipino einen TIR-Ringresonator und untersuchte damit die polarisationsabhängige Adsorption von I_2 auf einer der Quarzflächen des Ringresonators. Die minimal detektierbare I_2-Bedeckung konnte dadurch auf 0,00006 Monolagen verbessert und zusätzlich die Orientierung der I_2-Moleküle auf der Oberfläche bestimmt werden [119]. Pipino und Michalski nutzten den TIR-Ringresonator für die Obertonspektroskopie und untersuchten damit die ersten beiden Obertöne der OH-Streckschwingung von auf Quarz adsorbierten HNO_3-Molekülen [129]. Die Untersuchung der polarisationsabhängigen Adsorption sowie der Orientierung von I_2 auf Quarz wiederholte Pipino mit einem monolithischen, gefalteten Resonator, dessen Ein- und Austrittsflächen mit einer hochreflektierenden Beschichtung versehen waren. Damit lag die minimal detektierbare I_2-Bedeckung bei 0,00004 Monolagen und somit in der Größenordnung des mit dem TIR-Ringresonator erreichbaren Werts [120]. Weiterhin konnte Pipino mit dem monolithischen, gefalteten Resonator den Bedeckungsgrad und die Orientierung von adsorbiertem 1,1-Dichlorethen, 1,2-Dichlorethen und Trichlorethen durch Messung von Schwingungsobertönen bestimmen [130]. Mit demselben Aufbau untersuchten Aarts et al. die Struktur einer adsorbierten H_2O-Monolage auf hydroxyliertem amorphem SiO_2 beim Übergang von einer wasserfreien in eine Stickstoffatmosphäre mit 10 % Wasseranteil [131] sowie in situ die Entstehung freier Bindungen beim Wachstum von hydriertem amorphem Silizium [132].

Sowohl der TIR-Ringresonator als auch der monolithische, gefaltete Resonator wurden jedoch ausschließlich für Untersuchungen in der Gasphase eingesetzt. Die erste Anwendung der EW-CRDS zur Messung in kondensierter Materie wurde 2003 von Shaw et al. vorgestellt. Mit einem antireflexbeschichteten Dove-Prisma in einer linearen Ring-Down-Cavity wurde die Adsorption von Kristallviolett an einer geladenen Quarz/Wasser-Grenzfläche in Abhängigkeit des pH-Werts sowie der Gesamtionenstärke untersucht [121]. In einer nachfolgenden Studie postulierten Fisk et al. aus den aufgenommenen Adsorptionsisothermen bei pH 5 und pH 9 ein kooperatives Bindungsmodell für die Adsorption von Kristallviolett

an einer Quarzoberfläche [133]. Weitere Studien zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens verschiedener Moleküle an einer Quarzoberfläche wurden in den folgenden Jahren veröffentlicht. Li et al. nutzten ein speziell entworfenes gleichschenkliges Prisma, bei dem das Laserlicht senkrecht auf die Ein- und Austrittsflächen traf, für polarisationsabhängige Studien sowie zur Bestimmung der durchschnittlichen Orientierung von adsorbierten Methylenblaumolekülen [134]. Fan et al. bestimmten die thermodynamischen Eigenschaften von zwei verschieden stark an einer Quarz/Acetonitril-Grenzfläche adsorbierenden Farbstoffen mit Hilfe eines rechtwinkligen Prismas, bei dem das Laserlicht im Brewsterwinkel auf die Ein- und Austrittsflächen traf [124]. Weiterhin bestätigten Fan et. al durch die polarisationsabhängige Adsorption von Kristallviolett an einer Quarz/Acetonitril-Grenzfläche das Vorhandensein zweier verschiedener Typen von isolierten Silanolgruppen auf der Quarzoberfläche [135]. Chen et al. verglichen die Adsorption von Rhodamin B an einer Quarz/Wasser-Grenzfläche mit der Adsorption an einer Quarz/Methanol-Grenzfläche sowie an einer mit Chlortrimethylsilan funktionalisierten Quarz/Methanol-Grenzfläche [136]. Die Bestimmung des pH-Werts einer Quarz/Wasser-Grenzfläche durch Untersuchung der pH-Wert-abhängigen Adsorption eines Nilblau-Derivats wurde von O'Reilly et al. veröffentlicht. Bei einer pH-Wert-Änderung der Lösung ließ sich durch den Vergleich der dabei erfolgenden Extinktionsänderung der Farbstofflösung mit der Extinktionsänderung des an der Grenzfläche adsorbierten Farbstoffs auf den pH-Wert der Grenzfläche schließen [137].

Neben der Adsorption einzelner Moleküle wurde mit der EW-CRDS auch die Adsorption von Nanopartikeln an Grenzflächen untersucht. Fisk und Shaw studierten damit das Adsorptionsverhalten von als Kolloid synthetisierten Goldnanopartikeln an der Quarz/Wasser-Grenzfläche eines Dove-Prismas [138]. Rooth und Shaw untersuchten die Adsorptionskinetik selbstorganisierender Monoschichten von α-Liponsäure an Goldnanopartikeln durch die bei der Adsorption auftretende Veränderung der Extinktion der Nanopartikel auf der Quarzoberfläche [139]. Mazurenka et al. studierten in situ die Adsorptionskinetik von Goldkolloiden auf einer mit Poly-L-Lysin funktionalisierten Quarzoberfläche durch die Kombination von EW-CRDS und Rasterkraftmikroskopie [140]. Schnippering et al. nutzten die mit Poly-L-Lysin funktionalisierte Quarzoberfläche

zum einen in situ für das Studium der Adsorptionskinetik von Silbernanopartikeln sowie deren Ablösungskinetik bei Anwesenheit von $IrCl_6^{2-}$ [141] und zum anderen in situ zur Verfolgung der Bildung von Polyanilinnanopartikeln bei der Reaktion von Anilinhydrochlorid mit Natriumpersulfat [142].

Die erste Kombination von EW-CRDS und Elektrochemie wurde von Mazurenka et al. veröffentlicht. Mit einer Elektrode nahe der TIR-Grenzfläche eines rechtwinkligen Prismas wurde das schwach absorbierende $Fe(CN)_6^{4-}$ zu stark absorbierendem $Fe(CN)_6^{3-}$ oxidiert und nach der Diffusion zur Grenzfläche detektiert [123]. Powell et al. studierten das Adsorptionsverhalten eines Tris-(2,2′-bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexes an einer nichtfunktionalisierten sowie an einer mit Polyelektrolytfilmen funktionalisierten Quarzoberfläche in Abhängigkeit des pH-Werts. Die pH-Wert-Änderung erfolgte dabei über eine chronoamperometrische Oxidation von Wasser [143]. Powell et al. untersuchten außerdem die Reduktion von auf der Quarzoberfläche immobilisiertem Cytochrom *c* durch einen elektrochemisch generierten Eisen(II)/EDTA-Komplex [144].

Die Diffusionsraten verschiedener Lösemittel in einen Polydimethylsiloxanfilm, der sich auf der TIR-Grenzfläche eines gleichschenkligen Prismas befand, wurden von Hannon et al. bestimmt [122]. Van der Sneppen et al. untersuchten die Eignung der EW-CRDS für die Detektion in analytischen Fließsystemen wie z. B. der Fließinjektionsanalyse. Mit Hilfe einer Flußzelle, die auf der TIR-Grenzfläche eines Dove-Prisma installiert war, wurden Absorptionsmessungen an verschiedenen Farbstofflösungen durchgeführt [145].

Verschiedene Studien beschäftigten sich mit den Adsorptionseigenschaften von Biomolekülen an der Quarzoberfläche. Martin et al. untersuchten das Adsorptionsverhalten von Hämoglobin aus Urinproben an einer Quarzoberfläche, um die Methode auf ihre Eignung zur Diagnose von Hämoglobinurie zu testen [146]. Everest et al. bestimmten das Adsorptionsverhalten und die durchschnittliche Orientierung von Hämoglobin an einer Quarzoberfläche. Dabei bestätigten sie einen Zwei-Stufen-Mechanismus für die Adsorption, bei dem Hämoglobin reversibel oder irreversibel aus einer Schicht nahe der Oberfläche adsorbiert [147]. Van der Sneppen et al. untersuchten das Adsorptionsverhalten

von Cytochrom *c* an unbeschichteten, negativ geladenen sowie an mit C_{18}- und C_3NH_2-Gruppen beschichteten Quarzoberflächen [148]. Haselberg et al. demonstrierten die Möglichkeit, störende Proteinadsorptionen auf Quarzoberflächen durch die Beschichtung mit einem positiv geladenen Polymer zu reduzieren [149] und Zhang et al. studierten in situ die Adsorptionskinetik eines Porphyrinderivats an einer Quarz/Wasser-Grenzfläche sowie dessen DNA-unterstützte Desorption [150].

4.2 Experimenteller Aufbau

Das folgende Kapitel stellt den für die EW-CRDS-Messungen verwendeten Meßaufbau vor. Einen schematischen Überblick über die verwendeten Komponenten gibt die Abbildung 4.1.

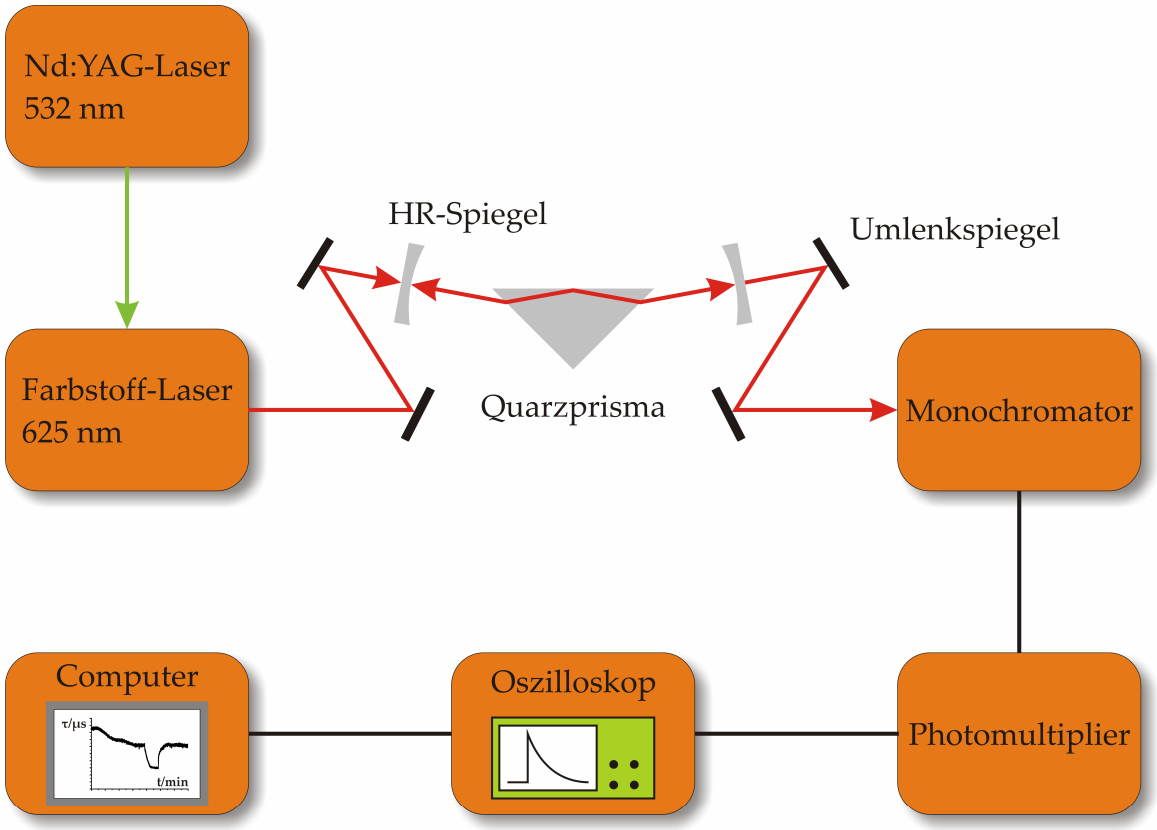


Abbildung 4.1: Allgemeiner Meßaufbau für Evanescent-Wave-CRDS-Messungen.

Als Laserquelle kam ein Farbstofflaser (LDL 205, LAS Laser Analytical Systems, Stahnsdorf, D) mit einer Wellenlänge von 625 nm zum Einsatz, der mit einem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (HY1200, Lumonics Ltd, Rugby, GB) gepumpt wurde. Als Laserfarbstoff wurde dabei Sulforhodamin B (Radiant Dyes Laser & Accessories GmbH, Wermelskirchen, D) verwendet. Aufgrund des als Pumplaser genutzten Nd:YAG-Laser betrugen die Pulsfrequenz des Lasers 20 Hz und die Pulsdauer 8 ns, die verwendeten Pulsenergien lagen im Bereich von 1 mJ. Mehrere Irisblenden zwischen dem Farbstofflaser und der Ring-Down-Cavity dienten zur Justierung des Laserstrahls sowie der Selektion der gewünschten TEM_{00}-Mode.

Der EW-Aufbau wurde mit einem rechtwinkligen Quarzprisma (LRP1601 right angle prism, Laser Components GmbH, Olching, D) realisiert, dessen TIR-Grenzfläche innerhalb der Ring-Down-Cavity horizontal angeordnet war. Die Montage des Prismas erfolgte dazu auf einem optischen Drehteller, der durch Mikrometerschrauben zusätzlich die Feinjustierung der vertikalen Lage sowie der Neigung der TIR-Grenzfläche erlaubte. Die Ring-Down-Cavity wurde durch zwei hochreflektierende dielektrische Spiegel (Part No. 102315, Layertec GmbH, Mellingen, D [151]) mit einem garantierten Reflexionsgrad > 99,98 % im Bereich von 610–655 nm gebildet. Um Reflexionsverluste an den beiden Luft/Quarz-Grenzflächen innerhalb der Cavity zu vermeiden, wurden die beiden dielektrischen Spiegel mit Hilfe von justierbaren Standardspiegelhalterungen so angeordnet, daß der Einfallswinkel des in der Cavity reflektierten Laserstrahls an jeder Grenzfläche dem Brewsterwinkel entsprach. Mit den Brechungsindizes von $n = 1$ für Luft sowie $n = 1{,}46$ für Quarzglas betragen die Brewsterwinkel nach Gleichung (3.1) $\theta_{B(1)} = 55{,}6°$ an der Grenzfläche Luft/Quarz sowie $\theta_{B(2)} = 34{,}4°$ an der Grenzfläche Quarz/Luft. Der Reflexionswinkel an der TIR-Grenzfläche des Prismas beträgt dadurch $\theta = 79{,}4°$. Die durch den hohen Reflexionswinkel bedingte geringere effektive Schichtdicke d_e wurde aufgrund der höheren Ring-Down-Zeit τ_0 bei der Brewsterwinkel-Anordnung in Kauf genommen. Abbildung 4.2 zeigt den Strahlengang im Resonator im Detail.

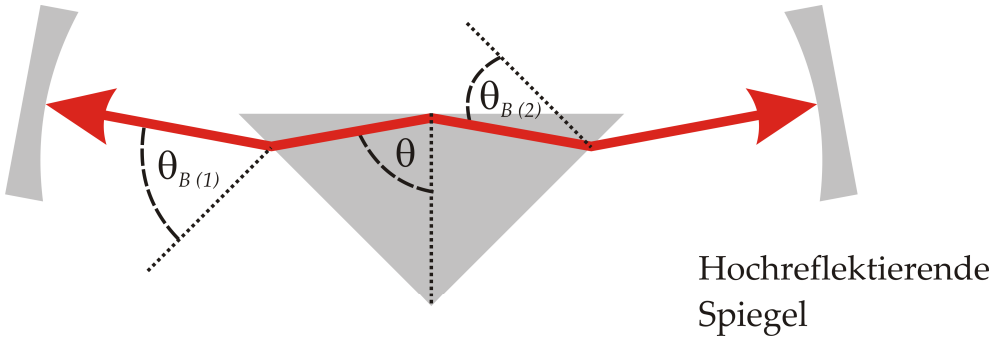


Abbildung 4.2: Strahlengang innerhalb der Ring-Down-Cavity. Die Brewsterwinkel sind $\theta_{B(1)} = 55{,}6°$ an der Grenzfläche Luft/Quarz sowie $\theta_{B(2)} = 34{,}4°$ an der Grenzfläche Quarz/Luft. Der Reflexionswinkel an der TIR-Grenzfläche beträgt $\theta = 79{,}4°$.

Das erhaltene Ring-Down-Signal wurde mit einem Photomultiplier detektiert (R955, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, D) und anschließend mit einem digitalen Speicheroszilloskop aufgenommen (TDS 320, Tektronix Deutschland GmbH, Schwalbach, D, vertikale Auflösung 8 bit, Abtastrate 500 MS/s, Bandbreite 100 MHz). Nach einer Mittelung über 2-4 Pulse wurden die Meßsignale mit Hilfe eines GPIB-Controllers (GPIB-USB-HS, National Instruments Germany GmbH, München, D) an den Meßrechner übertragen. Die Bestimmung der Ring-Down-Zeit erfolgte durch ein an der Universität Ulm in der graphischen Programmierumgebung LabVIEW entworfenes Auswerteprogramm [94]. Dazu wurde ein exponentieller Fit an die Ring-Down-Kurve angepaßt und daraus die Ring-Down-Zeit bestimmt. Aufgrund der Zeit, die für die Übertragung der Daten vom Oszilloskop auf den Meßrechner und den anschließenden Fit benötigt wurde, konnte pro Sekunde ein Meßwert aufgezeichnet werden.

4.3 Untersuchung von Antikörper-Antigen-Reaktionen durch Evanescent-Wave-CRDS

4.3.1 Antikörper-Funktionalisierung der TIR-Grenzfläche

Zur Untersuchung von Antikörper-Antigen-Reaktionen wurde auf der TIR-Grenzfläche der verwendeten Quarzprismen in einer mehrstufigen Reaktion ein

Antikörper gegen menschliches Fibronektin immobilisiert. Die kovalente Bindung des Antikörpers an der TIR-Grenzfläche führte dabei nur zu einer geringfügigen Verringerung der Ring-Down-Zeit.

Im ersten Reaktionsschritt wurde die Quarzoberfläche mit 3-(Trimethoxysilyl)-propylamin (Merck KGaA, Darmstadt, D) funktionalisiert. Vor der Reaktion wurde das Prisma für 24 Stunden in Caroscher Säure (H_2SO_4 konz.: Merck KGaA, Darmstadt, D; H_2O_2 30 %: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) gereinigt. Zusätzlich wurde dadurch die Oberfläche aktiviert. Anschließend wurde in der Mitte der TIR-Grenzfläche des Prismas eine kreisförmige Fläche mit einem Durchmesser von 20 mm durch einen 5 mm hohen Glasring abgetrennt, wodurch eine nach oben offene Reaktions- bzw. Meßzelle mit einem Volumen von ca. 1,5 mL entstand. Abbildung 4.3 zeigt ein Photo des Meßaufbaus.

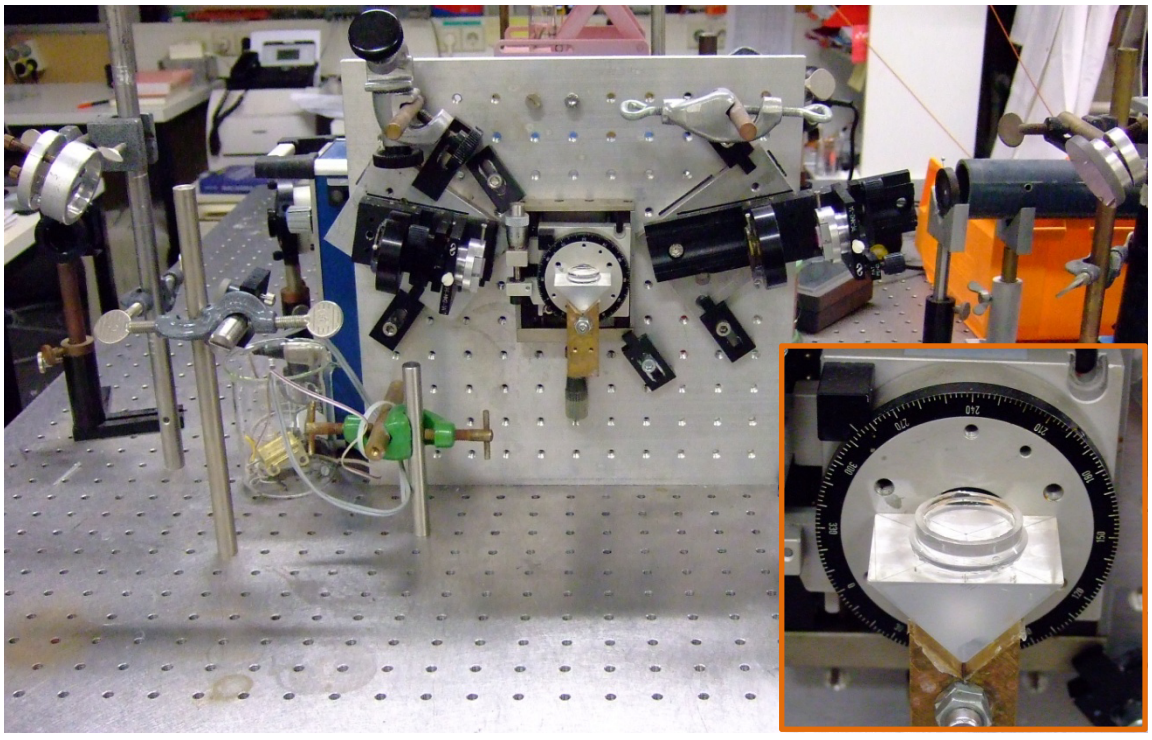
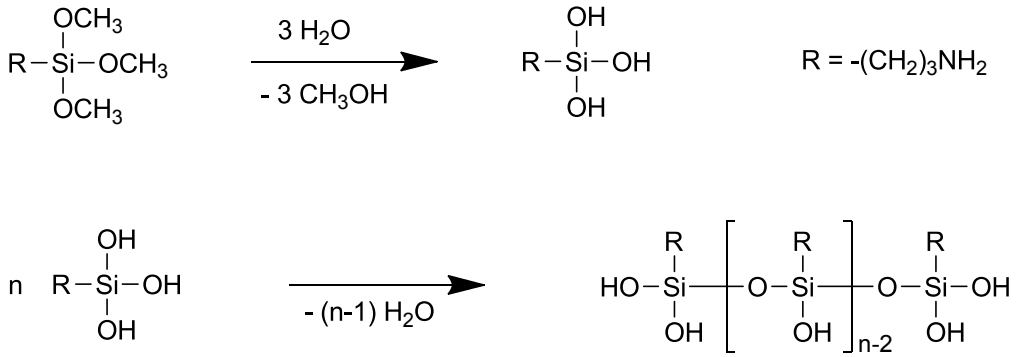


Abbildung 4.3: Meßaufbau mit statischer Meßzelle. Das kleine Bild zeigt den auf der TIR-Grenzfläche befestigten Glasring. Dadurch wurde eine Meßzelle mit einem Volumen von ca. 1,5 mL erhalten.

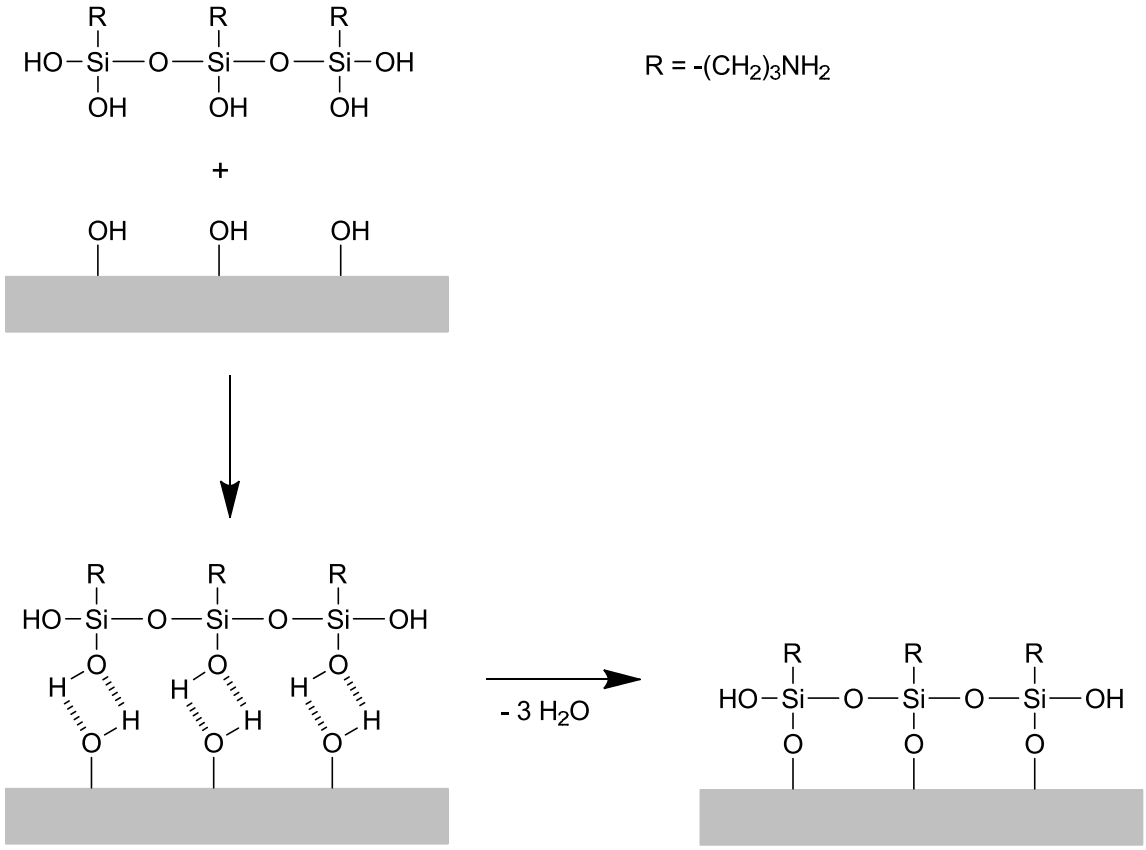
Als Lösemittel für die Silanisierungsreaktion wurde ein Ethanol/Wasser-Gemisch mit einer Volumenkonzentration von 97,5 % Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, D) verwendet. Für die Reaktion wurden in einem Becherglas 75 µL 3-(Trimethoxysilyl)propylamin (Merck KGaA, Darmstadt, D) in 10 mL des Ethanol/Wasser-Gemischs gelöst. Die dabei stattfindende Hydrolyse der Aminosilanmoleküle und die Kondensation der entstehenden Aminosilanole zu Oligo- bzw. Polysilanolen [152] zeigt Schema 4.1.



Schema 4.1: Hydrolyse von 3-(Trimethoxysilyl)propylamin und anschließende Kondensation zu Oligo- und Polysilanolen.

Nach fünf Minuten Reaktionszeit wurden 1,5 mL der Reaktionslösung in die durch den Glasring gebildete Reaktionszelle auf der Prismaoberfläche pipettiert. Dort reagierten die Oligo- und Polysilanole unter Abspaltung von Wasser mit den auf der Quarzoberfläche vorhandenen Silanolgruppen. Ein vereinfachtes Reaktionsschema zeigt Schema 4.2. Die Reaktionszeit betrug ebenfalls fünf Minuten.

Durch die sowohl in vertikaler als auch horizontaler Richtung stattfindende Polymerisation kommt es auf der Oberfläche zur Ausbildung eines unregelmäßigen, dreidimensionalen Netzwerks. Die Schichtdicke ist dabei abhängig vom Wassergehalt des Lösemittels. In der Literatur werden für Aminosilane Schichtdicken von 5-15 nm bei einem Wassergehalt von 1-5 % beschrieben. Die maximale Schichtdicke wird dabei bereits in der ersten Minute der Reaktion erreicht [153].



Schema 4.2: Reaktion der Oligo- und Polysilanole mit der Prismaoberfläche (vereinfacht) .

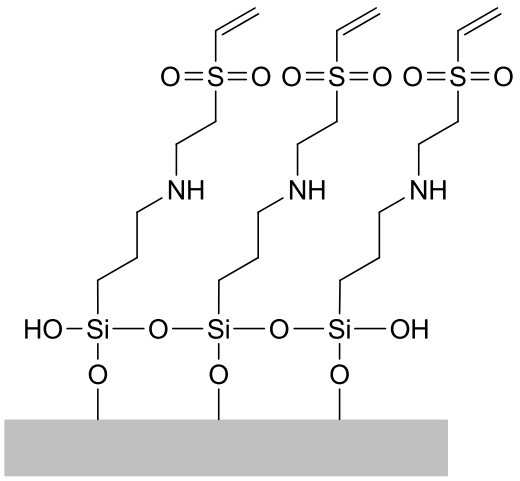
Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden durch Silanisierung von Deckgläsern mit einer Größe von 24 x 24 mm und einer Dicke von 0,13-0,16 mm (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, D) bestimmt. Diese wurden ebenfalls in Caroscher Säure gereinigt und oberflächenaktiviert. Anschließend wurden die Deckgläser silanisiert, wobei die Reaktionsdauer t sowie die Volumenkonzentration des Wassers σ (H_2O) und die Volumenkonzentration des Aminosilans σ (AS) in der Reaktionslösung variiert wurden. Anschließend wurden die Deckgläser im Brewsterwinkel in einer linearen Ring-Down-Cavity installiert und die Ring-Down-Zeit τ bestimmt. Tabelle 4.1 zeigt die erhaltenen Meßwerte [154].

σ (H_2O)/%	σ (AS)/%	t /min	τ /µs
ohne Beschichtung			1,8-2,1
2,5	0,25	2; 5	< 1,0
2,5	0,5	2; 5; 10; 30	1,7-2,1
2,5	1	2; 5	< 1,0
2,5	2	2; 5	< 0,8
5	0,25	2; 5	< 0,6
5	0,5	2; 5; 10; 20	1,5-2,0
5	1	2; 5; 10	< 1,2
5	2	2; 5; 10	< 0,8

Tabelle 4.1: Ring-Down-Zeiten der Deckgläser nach der Funktionalisierung mit Aminopropylgruppen. Variiert wurden die Reaktionsdauer t sowie die Volumenkonzentration des Wassers σ (H_2O) und die Volumenkonzentration des Aminosilans σ(AS) in der Reaktionslösung.

Die Messungen zeigen, daß die optische Qualität der Aminopropylbeschichtung vor allem von der Konzentration des Aminosilans in der Reaktionslösung abhängig ist. Das Optimum liegt bei einer Volumenkonzentration von 0,5 % 3-(Trimethoxysilyl)propylamin. Die gemessenen Ring-Down-Zeiten lagen hier im Bereich derjenigen der unbeschichteten Deckgläser. Höhere sowie niedrigere Aminosilankonzentrationen in der Reaktionslösung führten zu einer für optische Zwecke qualitativ schlechteren Beschichtung, die sich in kürzeren Ring-Down-Zeiten äußerte. Höhere Aminosilankonzentrationen verursachten ungleichmäßige, schon mit bloßem Auge erkennbare Schichten auf den Deckgläsern, wodurch es zu erhöhten Absorptions- bzw. Streuungsverlusten im Resonator kam. Der Rückgang der Ring-Down-Zeit bei niedrigeren Aminosilankonzentrationen könnte dagegen durch eine nicht vollständige Bedeckung der Oberfläche mit der Aminosilanschicht und die dadurch verstärkt auftretenden Streuungsverluste verursacht worden sein. Die Messungen zeigen ebenfalls, daß der Wassergehalt der Reaktionslösung sowie die Reaktionsdauer nur einen untergeordneten Einfluß auf die optische Qualität der Beschichtung haben.

Nach der Reaktion der Oligo- und Polysilanole mit der Prismaoberfläche, wurde die Reaktionslösung entfernt und die Oberfläche mehrmals mit Ethanol gewaschen. Im zweiten Reaktionsschritt erfolgte anschließend die Anbindung von Divinylsulfon als Spacermolekül an die nun auf der Oberfläche vorhandenen Aminopropylketten. Dadurch sollte später eine sterische Hinderung der Antikörper vermindert werden. Durch Lösen von Divinylsulfon (DVS, Merck KGaA, Darmstadt, D) in Acetonitril (Merck KGaA, Darmstadt, D) wurde dazu eine DVS-Lösung mit einer Volumenkonzentration von 10 % hergestellt. Davon wurden 1,5 mL in die Reaktionszelle auf der Oberfläche pipettiert. Anschließend wurde diese mit einem Glasplättchen abgedeckt und das Prisma während der Reaktionszeit von 24 Stunden in einer Argon-Schutzatmosphäre aufbewahrt.



Schema 4.3: Anbindung von Divinylsulfon als Spacermolekül an die auf der Oberfläche vorhandenen Aminopropylgruppen.

Danach wurde die DVS-Lösung aus der Reaktionszelle entfernt und diese drei Mal mit Acetonitril gewaschen. Im dritten Reaktionsschritt wurde dann der verwendete Antikörper kovalent an die Prismaoberfläche gebunden. Dazu wurden 1,5 mL einer wäßrigen Lösung eines polyklonalen Kaninchenantikörpers gegen menschliches Fibronektin (Polyclonal Rabbit Anti-Human Fibronectin, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D) mit einer Massenkonzentration von β = 98 µg/mL in die Reaktionszelle auf der Oberfläche pipettiert. Diese wurde

anschließend wieder mit einem Glasplättchen abgedeckt und während der Reaktionszeit von 24 Stunden in einer Argon-Schutzatmosphäre aufbewahrt.

Nach Ablauf der 24 Stunden wurde die Antikörperlösung von der Oberfläche entfernt und diese 5 Mal mit 1x PBS (Phosphate Buffer Saline), einer phosphatgepufferten Salzlösung, gewaschen. Anschließend wurden 1,5 mL einer wäßrigen BSA-Lösung (Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin) mit einer Massenkonzentration von 0,5 % in die Reaktionszelle pipettiert, diese wiederum mit einem Glasplättchen abgedeckt und während der Reaktionszeit von 24 Stunden in einer Argon-Schutzatmosphäre aufbewahrt. Das BSA dient hierbei als Blockierungsreagenz der noch an der Oberfläche vorhandenen Vinylgruppen und verhindert während der Messungen unspezifische Bindungen des Antigens an der Prismenoberfläche. Abbildung 4.4 zeigt schematisch einen Ausschnitt der Prismaoberfläche mit kovalent gebundenen Antikörpern.

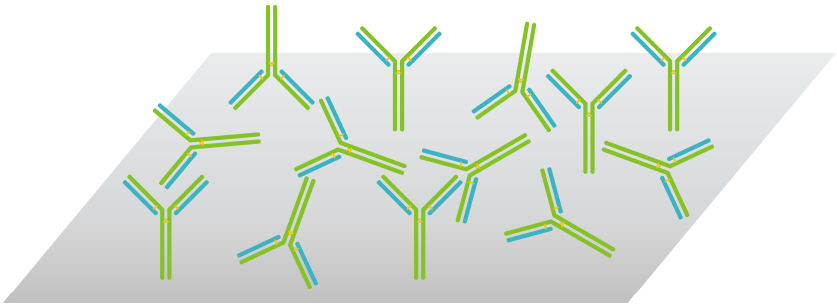
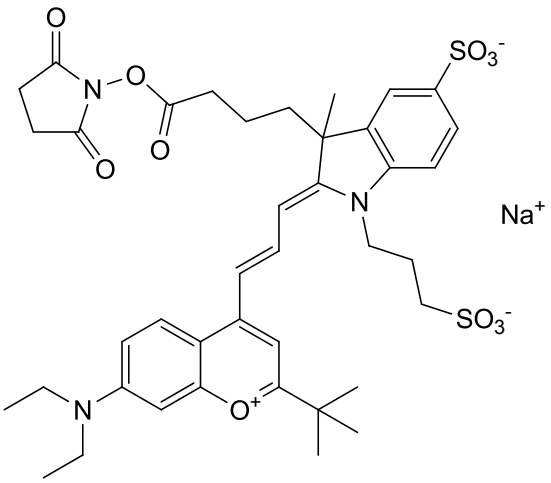


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der auf der Prismaoberfläche immobilisierten polyklonalen Antikörper gegen Fibronektin.

4.3.2 Labeln des Antigens mit DY-631-NHS

Das als Antigen verwendete Fibronektin [155] (Bovine Plasma Fibronectin, Invitrogen GmbH, Darmstadt, D) wurde für die EW-CRDS-Messungen mit DY-631, einem Fluoreszenzfarbstoff, gelabelt. Aufgrund der spezifischen Reaktion mit primären Aminogruppen und der milden Reaktionsbedingungen wurde für das Labeling, der *N*-Hydroxysuccinimidester des Farbstoffs, DY-631-NHS (MoBiTec GmbH, Göttingen, D), genutzt. Die Strukturformel zeigt Schema 4.4.



Schema 4.4: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs DY-631-NHS.

Dazu wurden 1 mg Fibronektin in 1 mL Natriumboratpuffer der Konzentration 0,1 mol/L (pH-Wert: 8,55, Merck KGaA, Darmstadt, D) und 1 mg DY-631-NHS in 200 µL Dimethylsulfoxid (Merck KGaA, Darmstadt, D) gelöst. Anschließend wurden 450 µL der Fibronektinlösung mit 50 µL der Farbstofflösung gemischt und das Gemisch während der folgenden Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß gelagert.

Anschließend fand eine Abtrennung der nicht umgesetzten DY-631-NHS-Moleküle sowie des als Lösungsmittel verwendeten Dimethylsulfoxids mittels Größenausschlußchromatographie über eine NAP™-5-Säule (Säulenmaterial: Sephadex™ G25 Medium, GE Healthcare Bio-Sciences GmbH, München, D) statt.

4.3.3 Untersuchung der Reaktion von DY-631-NHS mit Aminogruppen

Einführende Untersuchungen befaßten sich mit der Reaktion des Fluoreszenzfarbstoffs DY-631-NHS mit Aminogruppen. Dazu wurde bei einem mit Aminopropylgruppen funktionalisierten Quarzprisma die Abnahme der Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Massenkonzentration der sich über der Primaoberfläche befindenden DY-631-NHS-Lösung verfolgt [154].

Als Referenz diente ein unbeschichtetes Prisma, das in einer 1:1-Mischung aus konz. H_2SO_4 und H_2O_2 gereinigt wurde. Nach Installation in der Ring-Down-

Cavity wurde 1 mL Reinstwasser (18,2 MΩ·cm) in die durch den Glasring gebildete Meßzelle auf der Prismaoberfläche pipettiert. Die Ring-Down-Zeit betrug mit Reinstwasser $\tau_0 = 1{,}97\ \mu s$ bei einer Standardabweichung von $\Delta\tau_0 = 0{,}03\ \mu s$. Daraus folgt nach Gleichung (2.29) eine Nachweisgrenze von $A = \lg(e) \cdot \alpha \cdot d_e = 3{,}4 \cdot 10^{-6}$. Die theoretische Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die wäßrige Phase beträgt nach Gleichung (4.3) $d_p = 185\ nm$.

Anschließend wurden mit einer Eppendorf-Pipette verschiedene Volumina einer DY-631-NHS-Lösung mit einer Massenkonzentration von $\beta = 50\ \mu g/mL$ (DY-631-A) zugegeben. Abbildung 4.5 zeigt die dabei erhaltene Meßkurve.

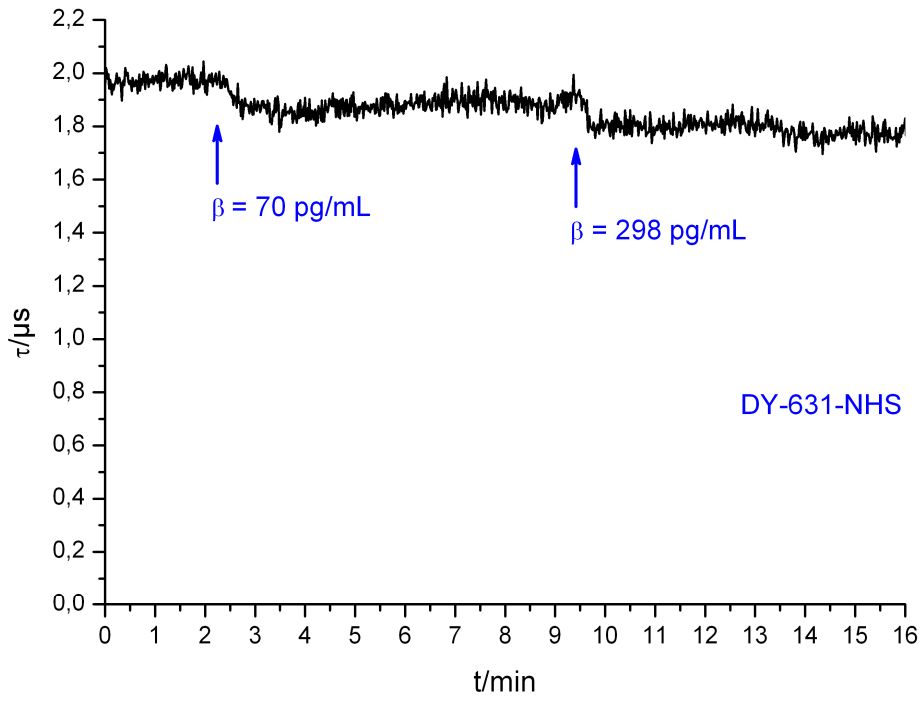


Abbildung 4.5: Prisma ohne Beschichtung, Änderung der Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der DY-631-NHS-Massenkonzentration in der statischen Meßzelle.

Die erste Zugabe von 1 µL DY-631-A, entsprechend einer Massenkonzentration von $\beta = 50\ pg/mL$ in der Meßzelle, führte zu einer geringen Abnahme der Ring-Down-Zeit auf $\tau_1 = 1{,}88\ \mu s$. Eine weitere Zugabe von 5 µL DY-631-A, entsprechend einer Massenkonzentration von $\beta = 298\ pg/mL$, ließ die Ring-Down-Zeit auf $\tau_2 = 1{,}81\ \mu s$ sinken.

Nach der Reinigung des Prismas wurde dieses wie unter 4.3.1 beschrieben mit 3-(Trimethoxysilyl)propylamin funktionalisiert. Die Ring-Down-Zeit mit 1 mL Reinstwasser in der Meßzelle betrug anschließend $\tau_0 = 1{,}72$ µs. Danach wurden mit einer Eppendorf-Pipette verschiedene Volumina der Lösungen DY-631-A ($\beta = 50$ µg/mL) sowie DY-631-B ($\beta = 5$ µg/mL) zugegeben. Abbildung 4.6 zeigt die dabei erhaltene Meßkurve. Die Zugabe von 3 µL DY-631-B, entsprechend einer Massenkonzentration von $\beta = 15$ pg/mL in der Meßzelle, führte zu einer Abnahme der Ring-Down-Zeit auf $\tau_1 = 1{,}38$ µs. Nach 20 min erfolgte eine weitere Zugabe von 1 µL DY-631-B. Bei einer Massenkonzentration von $\beta = 20$ pg/mL sank die Ring-Down-Zeit auf $\tau_2 = 1{,}24$ µs. Weitere 15 Minuten später erfolgte die Zugabe von 1 µL DY-631-A. Die Massenkonzentration von $\beta = 70$ pg/mL führte zu einer Abnahme der Ring-Down-Zeit auf $\tau_3 = 0{,}60$ µs.

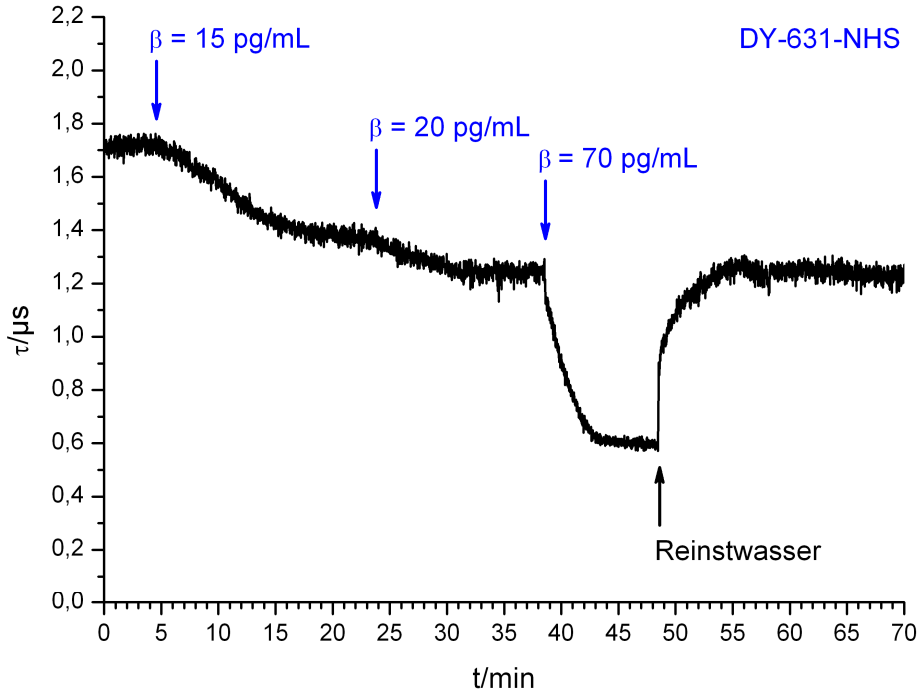


Abbildung 4.6: Prismaoberfläche funktionalisiert mit Aminopropylketten, Änderung der Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der DY-631-NHS-Konzentration in der statischen Meßzelle.

Nach weiteren 10 Minuten wurde die Lösung aus der Meßzelle entfernt und durch Reinstwasser ersetzt. Dadurch stieg die Ring-Down-Zeit wieder auf einen

Wert von $\tau_4 = 1{,}24$ µs an. Weitere Spülvorgänge führten danach zu keinem weiteren Anstieg der Ring-Down-Zeit.

Vergleicht man die beiden Messungen, so erkennt man eine starke Erhöhung der Extinktion durch die Reaktion des Farbstoffs mit den auf der Prismaoberfläche vorhandenen Aminogruppen und dessen damit verbundene Anreicherung im Bereich der evaneszenten Welle. Beim unbeschichteten Referenzprisma führte eine Massenkonzentration von $\beta = 298$ pg/mL nach Gleichung 3.23 zu einer Extinktion von $A = 9{,}4 \cdot 10^{-6}$, entsprechend einer Abnahme der Ring-Down-Zeit von $\tau_0 = 1{,}97$ µs auf $\tau_2 = 1{,}81$ µs. Nach Funktionalisierung der TIR-Grenzfläche des Prismas mit Aminopropylgruppen führte eine um den Faktor 20 geringere Massenkonzentration von $\beta = 15$ pg/mL zu einer Extinktion von $A = 3{,}0 \cdot 10^{-5}$, entsprechend einer Abnahme der Ring-Down-Zeit von $\tau_0 = 1{,}72$ µs auf $\tau_1 = 1{,}38$ µs.

Bei einer Massenkonzentration von $\beta = 70$ pg/mL erfolgte eine Abnahme von $\tau_2 = 1{,}24$ µs auf $\tau_3 = 0{,}60$ µs, entsprechend einer Extinktion von $A = 2{,}3 \cdot 10^{-4}$. Der nach dem Entfernen der DY-631-NHS-Lösung und Ersetzen durch Reinstwasser erfolgte Wiederanstieg der Ring-Down-Zeit auf $\tau_4 = 1{,}24$ läßt darauf schließen, daß zu diesem Zeitpunkt keine Aminogruppen mehr auf der TIR-Oberfläche für die Reaktion mit DY-631-NHS-Molekülen aus der Lösung zur Verfügung standen. Die Ring-Down-Zeit ließ sich auch durch mehrere daran anschließende Waschvorgänge mit Reinstwasser nicht auf einen Wert größer als 1,24 µs erhöhen. Dies deutet darauf hin, daß die Aminogruppen auf der Prismaoberfläche nach den ersten beiden Zugaben jeweils mit DY-631-NHS-Molekülen aus der Lösung reagierten und der Farbstoff dabei auf der Oberfläche kovalent gebunden wurde.

4.3.4 Untersuchung von Antikörper-Antigen-Reaktionen in einer statischen Meßzelle

Für die Untersuchung wurde die Prismaoberfläche in einer Vier-Stufen-Reaktion, wie unter Abschnitt 4.3.1 beschrieben, mit Antikörpern gegen menschliches Fibronektin funktionalisiert. Nach Installation des Prismas in der Ring-Down-Cavity wurde in die durch den Glasring gebildete Meßzelle auf der

Prismaoberfläche 1 mL 1x PBS pipettiert. Die Ring-Down-Zeit betrug anschließend $\tau_0 = 1{,}86$ µs bei einer Standardabweichung von $\Delta\tau_0 = 0{,}04$ µs. Damit läßt sich nach Gleichung (2.29) eine Nachweisgrenze von $A = \lg(e) \cdot \alpha \cdot d_e = 4{,}9 \cdot 10^{-6}$ erreichen.

Aus der Stammlösung des mit DY-631 gelabelten Fibronektins mit einer Massenkonzentration von $\beta = 0{,}5$ mg/mL wurde durch Verdünnung mit 1x PBS eine Lösung mit einer Massenkonzentration von $\beta = 25$ µg/mL hergestellt. Davon wurden anschließend mit einer Eppendorf-Pipette im Abstand von 20-30 min jeweils 10 µL zur 1x-PBS-Pufferlösung in der Meßzelle zugetropft. Abbildung 4.7 zeigt eine dabei erhaltene Meßkurve.

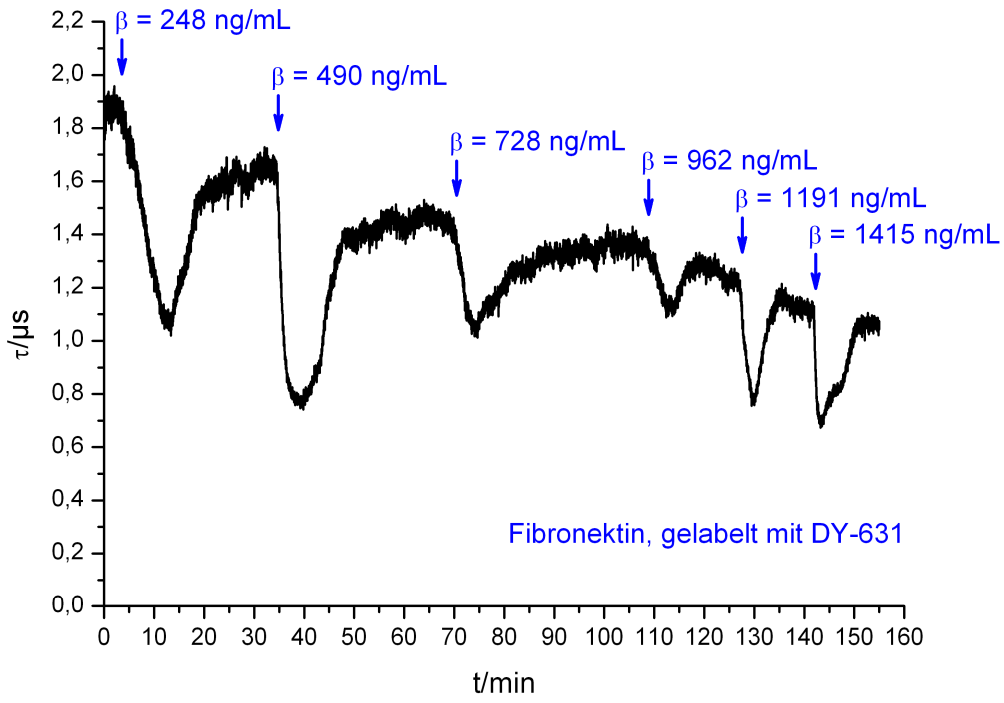


Abbildung 4.7: Prismaoberfläche funktionalisiert mit Antikörpern gegen Fibronektin, Änderung der Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration des mit DY-631 gelabelten Fibronektins in der statischen Meßzelle.

Nach jeder Zugabe kommt es zuerst zu einer starken Abnahme der Ring-Down-Zeit. Anschließend steigt diese wieder an und erreicht nach 10-20 min einen konstanten Wert. Die Dauer von der Zugabe bis zum Erreichen einer konstanten Ring-Down-Zeit, der Meßwert des auftretenden Minimums der Ring-Down-Zeit sowie die Form des auftretenden Peaks hängen dabei stark vom Ort des Zutropfens in die Meßzelle ab.

Antikörper-Antigen-Reaktionen können als bimolekulare Reaktionen beschrieben werden, die im allgemeinen sehr schnell und spezifisch ablaufen. Vereinfacht gilt für Antikörper AB und Antigen AG die folgende Reaktionsgleichung [156, 157]:

$$AB + AG \left[\underset{k_{-i}}{\overset{k_i}{\rightleftharpoons}} (AB{\cdot}AG)_i \right]_{i = [0;n-1]} \underset{k_{-n}}{\overset{k_n}{\rightleftharpoons}} ABAG$$

Dabei sind k_i und k_{-i} die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Hin- und Rückreaktionen, ABAG ist der abschließend gebildete Antikörper-Antigen-Komplex und $(AB{\cdot}AG)_i$ stellen die n verschiedenen Übergangskomplexe dar. Da es sich hier jedoch um sehr schnelle makromolekulare Reaktionen handelt, bei denen zudem der Antikörper auf der Prismaoberfläche immobilisiert ist, muß eine mögliche Diffusionskontrolle der Reaktion berücksichtigt werden. Damit die Reaktion stattfinden kann, muß sich der erste Übergangskomplex $(AB{\cdot}AG)_0$, der sogenannte Begegnungskomplex, ausbilden. Dazu müssen die Reaktionspartner zuerst durch translatorische sowie rotatorische Diffusion in eine geeignete Reaktionsposition gelangen. Die Geschwindigkeitskonstanten k_0 und k_{-0} entsprechen somit den Diffusionsgeschwindigkeitskonstanten für die Bildung bzw. Dissoziation des Begegnungskomplexes. Im allgemeinen wird die Reaktionsgeschwindigkeit der Gesamtreaktion allerdings sowohl bei der Hin- als auch bei der Rückreaktion durch eine einzelne Geschwindigkeitskonstante begrenzt. Das Reaktionsschema kann dadurch zu

$$AB + AG \underset{k_{rück}}{\overset{k_{hin}}{\rightleftharpoons}} ABAG$$

vereinfacht werden, wobei k_{hin} die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion und $k_{rück}$ die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion darstellen. Werden die Zwischenzustände als quasistationär angesehen, so erhält man für praktische Anwendungen vereinfachte Ausdrücke für die Geschwindigkeitskonstanten der Gesamtreaktion.

Das Zutropfen des gelabelten Fibronektins mit einer Eppendorf-Pipette ohne mechanische Durchmischung der Lösung führt direkt nach der Zugabe zu einer hohen Konzentration des Antigens an der TIR-Grenzfläche und somit im Bereich der immobilisierten Antikörper. Dadurch tritt eine Verschiebung des Gleichgewichts der Reaktion in Richtung des Antikörper-Antigen-Komplexes auf, welche als starker Abfall der Ring-Down-Zeit sichtbar ist. Die anschließende Durchmischung der Lösung durch Diffusion der Fibronektinmoleküle läßt die Ring-Down-Zeit aufgrund der dadurch stattfindenden Dissoziation von Antikörper-Antigen-Komplexen wieder ansteigen. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes pendelt sich die Ring-Down-Zeit bei einem konstanten Wert $\tau < \tau_0$ ein.

Trägt man die nach Erreichen der jeweiligen Gleichgewichtszustände mittels Gleichung (2.23) aus den Ring-Down-Zeiten erhaltenen Extinktionen gegen die Massenkonzentrationen des gelabelten Fibronektins im Bereich von $\beta = 248\text{-}1415$ ng/mL auf, so erhält man den in Abbildung 4.8 dargestellten Zusammenhang. Die Regressionsgerade zeigt in diesem Konzentrationsbereich einen sehr guten linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0{,}998$. Die Fehlerbalken geben dabei die Standardabweichung der Extinktionswerte bei den jeweiligen Konzentrationen an.

Die Nachweisgrenze läßt sich aus der Regressionsgerade über die in der DIN-Norm 32645 beschriebene Kalibriergeradenmethode bestimmen [112]. Diese liegt für das gelabelte Fibronektin bei einer Massenkonzentration von $\beta = 56$ ng/mL, entsprechend einer Konzentration von $c = 1{,}3 \cdot 10^{-10}$ mol/L, ausgehend von einer molaren Masse von $M = 440000$ g/mol.

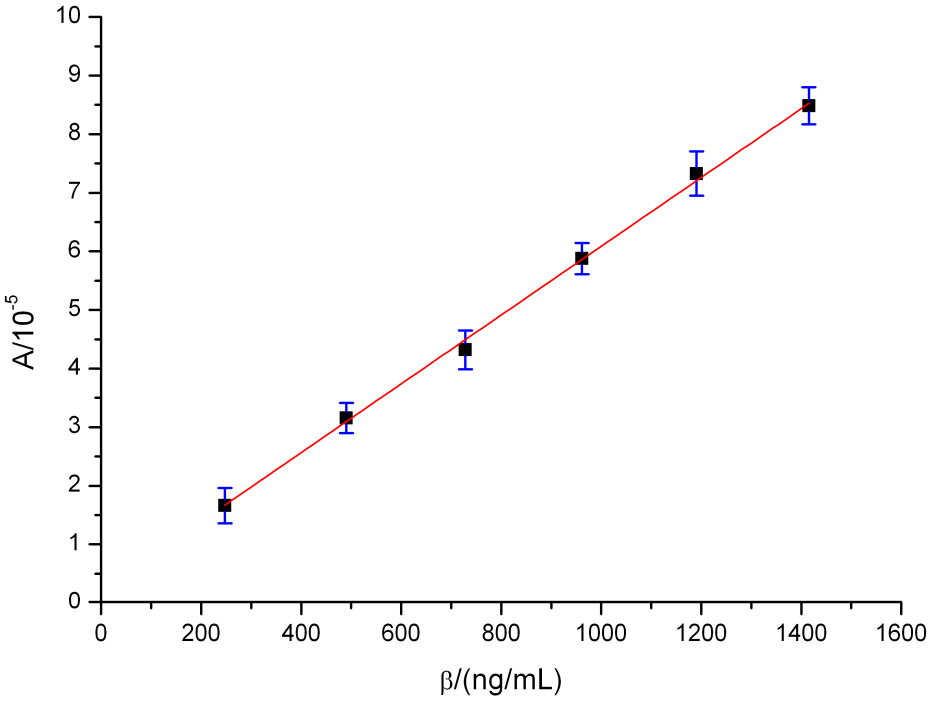


Abbildung 4.8: Extinktion in Abhängigkeit der Massenkonzentration des gelabelten Fibronektins im Bereich von β = 248-1415 ng/mL in einer, auf der mit Antikörpern gegen Fibronektin gelabelten Grenzfläche installierten, statischen Meßzelle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Extinktion im jeweiligen Konzentrationsbereich an. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade liegt bei R^2 = 0,998.

Um eine unspezifische Adsorption des gelabelten Fibronektins auf der Prismaoberfläche auszuschließen, wurde bei Referenzprismen während des Funktionalisierungsprozesses in Reaktionsschritt 3 Reinstwasser anstatt der Antikörperlösung verwendet. Nach Installation des Prismas in der Ring-Down-Cavity wurde 1 mL 1x PBS in die durch den Glasring gebildete Meßzelle auf der Prismaoberfläche pipettiert. Anschließend wurden im Abstand von ca. 10 min mit einer Eppendorf-Pipette jeweils 10 µL einer Lösung des gelabelten Fibronektins mit einer Massenkonzentration von β = 50 µg/mL zur 1x-PBS-Pufferlösung in der Meßzelle zugetropft. Abbildung 4.9 zeigt eine dabei erhaltene Meßkurve.

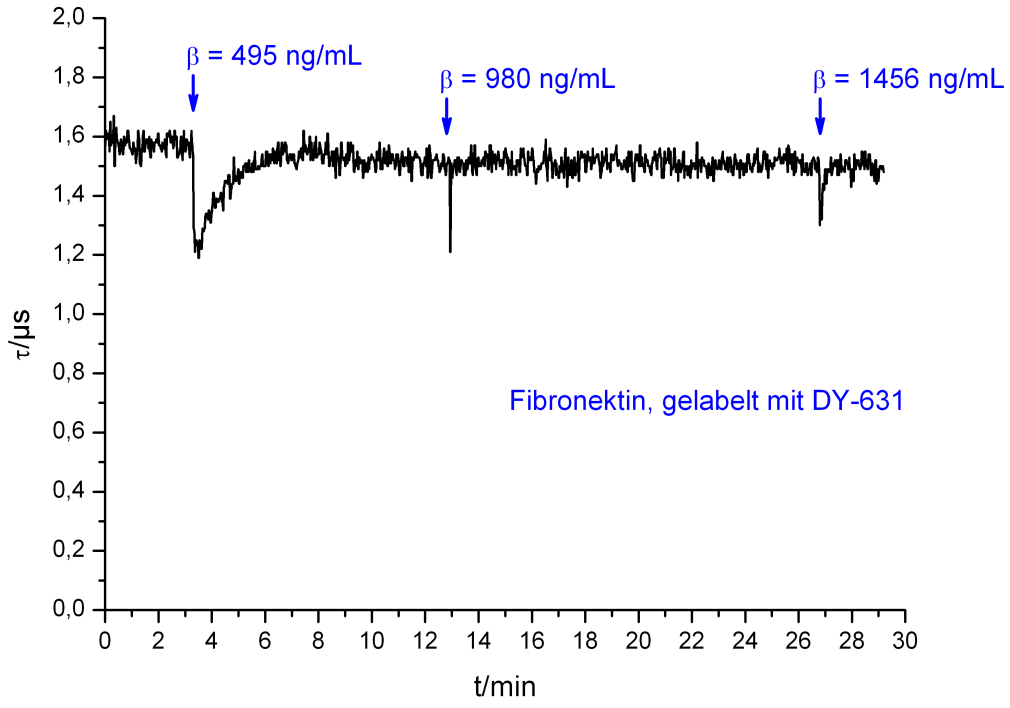


Abbildung 4.9: Prismaoberfläche ohne Antikörper, Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration des mit DY-631 gelabelten Fibronektins in der statischen Meßzelle.

Die durchgeführten Messungen an Prismen, die nicht mit Antikörpern gegen Fibronektin auf der Quarzoberfläche funktionalisiert wurden, zeigen somit, daß bei der Untersuchung der Antikörper-Antigen-Reaktion eine unspezifische Adsorption des gelabelten Fibronektins an der TIR-Grenzfläche ausgeschlossen werden kann.

4.3.5 Untersuchung von Antikörper-Antigen-Reaktionen in einer Durchflußzelle

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, führt die Zugabe des Antigens über eine Eppendorf-Pipette in Verbindung mit der Verwendung einer statischen Meßzelle zu einer starken Abnahme der Ring-Down-Zeit direkt nach der Zugabe, gefolgt von einem Wiederanstieg bis zum Erreichen eines Gleichgewichts zwischen dem an der TIR-Grenzfläche gebundenen Antikörper-Fibronektin-Komplex und freiem Fibronektin in der Lösung. Die Dauer von der Zugabe bis zum Erreichen einer konstanten Ring-Down-Zeit, die Höhe des dabei auftretenden

Minimums der Ring-Down-Zeit sowie die Form der Spitzen sind dabei nicht reproduzierbar und hängen stark vom Ort und der Art der Zugabe in die Meßzelle ab.

Da es mit diesem Aufbau außerdem nicht möglich ist, Messungen in Fließsystemen durchzuführen, wurde eine Durchflußzelle für EW-CRDS-Messungen entwickelt. Dazu wurde in eine Seite eines quaderförmigen Teflonblocks eine ovale Vertiefung mit einer Breite von 15 mm, einer Höhe von 5 mm und einer Tiefe von 1 mm gefräst. Als Zu- und Ableitung zur Meßzelle dienten Bohrungen an beiden Enden der Ausfräsung. Der Teflonblock wurde anschließend mit der Ausfräsung nach unten auf der TIR-Grenzfläche des Prismas befestigt, wodurch eine Durchflußzelle mit einem Volumen von ca. 70 µL entstand. Abbildung 4.10 zeigt ein Photo der Meßaufbaus. Das kleine Bild rechts unten zeigt das Prisma mit der Durchflußzelle im Detail. Der eingefügte zweite Teflonblock veranschaulicht die Ausfräsung auf der Unterseite des Blocks.

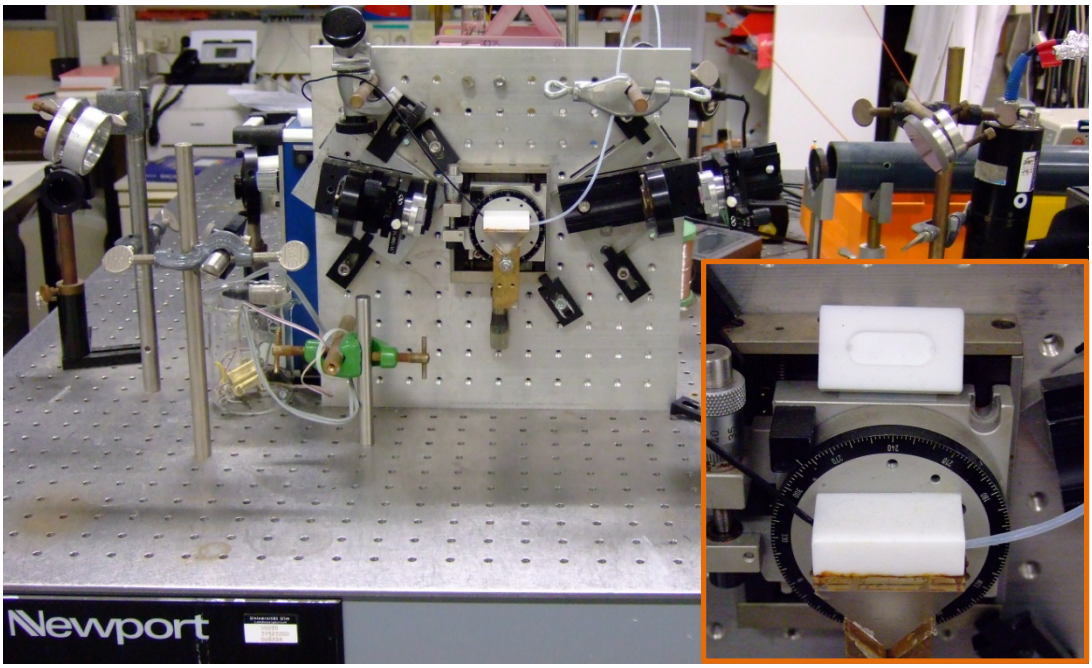


Abbildung 4.10: Meßaufbau mit installierter Durchflußzelle. Die im kleinen Bild gezeigte Ausfräsung auf der Unterseite des Teflonblocks bildet nach dessen Befestigung auf der TIR-Grenzfläche des Prismas eine Flußzelle mit einem Volumen von ca. 70 µL.

Nach Befestigung der Durchflußzelle auf der TIR-Grenzfläche und Installation des Primas in der Ring-Down-Cavity wurde die Zelle mit 1x PBS gespült und justiert. Die Ring-Down-Zeit nach dem Injizieren von 1x PBS betrug $\tau_0 = 2{,}04$ µs bei einer Standardabweichung von $\Delta\tau_0 = 0{,}02$ µs. Daraus läßt sich nach Gleichung (2.29) für die Extinktion eine Nachweisgrenze von $A = \lg(e) \cdot \alpha \cdot d_e = 2{,}6 \cdot 10^{-6}$ errechnen. Anschließend wurden Lösungen des gelabelten Fibronektins in 1x PBS mit Massenkonzentrationen von 195-1114 ng/mL hergestellt. Davon wurden jeweils 2 mL mit einer Spritze in die Durchflußzelle injiziert. Vor Injektion der nächsthöheren Konzentration wurde solange abgewartet, bis die Ring-Down-Zeit wieder einen konstanten Wert aufwies. Abbildung 4.11 zeigt eine dabei erhaltene Meßkurve.

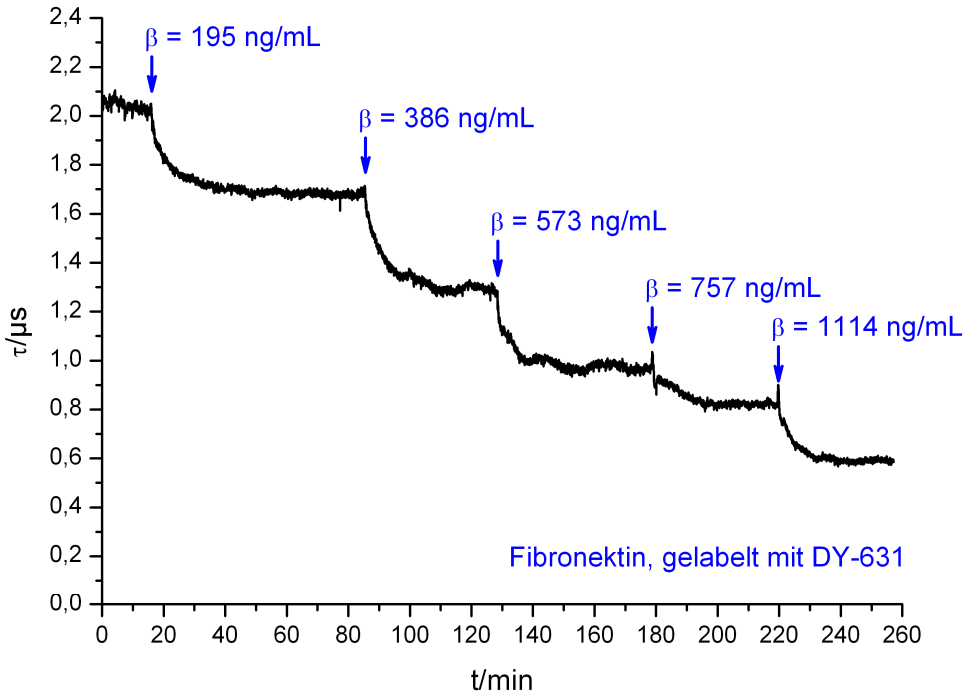


Abbildung 4.11: Prismaoberfläche funktionalisiert mit Antikörpern gegen Fibronektin. Änderung der Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration des mit DY-631 gelabelten Fibronektins in der Durchflußzelle.

Nach der Injektion der jeweiligen Lösungen des gelabelten Fibronektins zeigt sich das Erreichen des Gleichgewichtszustands zwischen freiem Fibronektin in der 1x-PBS-Lösung und dem auf der TIR-Grenzfläche gebundenen Antikörper-

Fibronektin-Komplex durch das Erreichen einer konstanten Ring-Down-Zeit $\tau < \tau_0$. Die Zeitspanne von der Injektion bis zum Erreichen dieses konstanten Werts betrug bei der vorliegenden Reaktion ca. 20 min.

Bei der Auftragung der nach dem Erreichen der jeweiligen Gleichgewichtszustände mittels Gleichung (2.23) aus den Ring-Down-Zeiten erhaltenen Extinktionen gegen die Massenkonzentrationen des gelabelten Fibronektins im Bereich von β = 194-1114 ng/mL ergibt sich der in Abbildung 4.12 dargestellte Zusammenhang.

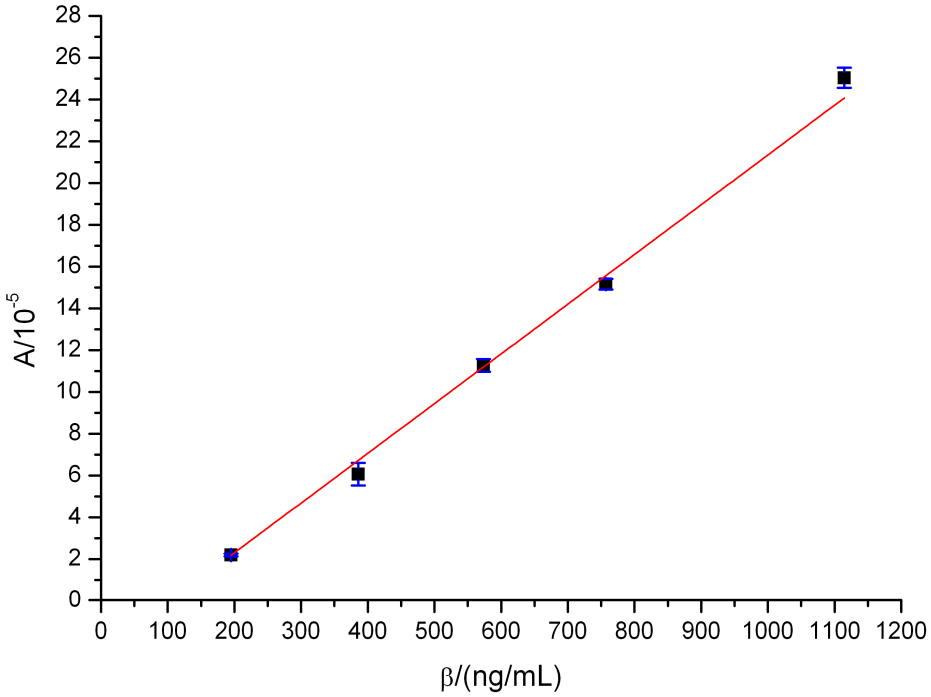


Abbildung 4.12: Extinktion in Abhängigkeit der Massenkonzentration des mit DY-631 gelabelten Fibronektins im Bereich von β = 194-1114 ng/mL in einer, auf der mit Antikörpern gegen Fibronektin gelabelten Prismaoberfläche, installierten Durchflußzelle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Extinktionswerte im jeweiligen Konzentrationsbereich an. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade liegt bei R^2 = 0,998.

Die Regressionsgerade zeigt im Konzentrationsbereich von β = 194-1114 ng/mL einen sehr guten linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von

$R^2 = 0{,}998$. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung der Extinktionswerte bei den jeweiligen Konzentrationen.

Die Nachweisgrenze läßt sich aus der Regressionsgerade über die in der DIN-Norm 32645 beschriebene Kalibriergeradenmethode bestimmen [112]. Bei der vorigen Messung liegt diese für das gelabelte Fibronektin bei einer Massenkonzentration von $\beta = 72$ ng/mL, entsprechend einer Konzentration von $c = 1{,}6 \cdot 10^{-10}$ mol/L, ausgehend von einer molaren Masse von $M = 440000$ g/mol.

4.3.6 Diskussion und Ausblick

In diesem Teil der Arbeit wurde eine Methode zur Untersuchung von Antikörper-Antigen-Reaktionen mit Hilfe der Evanescent-Wave-Cavity-Ring-Down-Spektroskopie entwickelt. Die Oberfläche eines als TIR-Element innerhalb der Ring-Down-Cavity installierten Quarzprismas wurde dazu in einer mehrstufigen Reaktion mit Antikörpern gegen Fibronektin funktionalisiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die kovalent auf der TIR-Grenzfläche gebundenen Antikörper nur zu geringfügigen zusätzlichen Absorptions- bzw. Streuungsverlusten im Resonator führen. Die Abklingzeit im Resonator sank dadurch um ca. 0,1 µs, dies entspricht etwa 95 % der Ring-Down-Zeit des nicht funktionalisierten Prismas.

Um die Antikörper-Antigen-Reaktion zwischen Fibronektin und den auf der TIR-Oberfläche gebundenen Antikörpermolekülen bei der für die EW-CRDS genutzten Laserwellenlänge von 625 nm verfolgen zu können, wurden die Fibronektinmoleküle mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-631 gelabelt. Dessen Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 637 nm. Bei Verwendung einer statischen Meßzelle betrug die Nachweisgrenze für Fibronektin mit dieser Methode 56 ng/mL. Nach Installation einer Durchflußzelle auf der TIR-Grenzfläche der Prismas konnte eine Nachweisgrenze von 72 ng/mL erreicht werden. Standardmäßig werden zur Bestimmung von Fibronektin nachweisstarke immunologische Verfahren wie z. B. Enzymimmunoassays (EIA bzw. ELISA) [158, 159] und Fluoreszenzimmunoassays [160, 161] eingesetzt. Ein Vergleich der erreichten Nachweisgrenzen zeigt, daß die immunologischen Verfahren hier noch um den Faktor 10-100 nachweisstärker sind.

Eine Erniedrigung der Nachweisgrenze der EW-CRDS-Methode ließe sich durch mehrere Möglichkeiten realisieren. Allgemein könnten durch die Wahl höherwertiger optischer Komponenten, wie z. B. der hochreflektierenden Spiegel oder des TIR-Elements, Absorptions- und Streuungsverluste innerhalb des Resonators minimiert werden. Eine weitere Möglichkeit würde sich durch die Anordnung der kovalent an die TIR-Grenzfläche gebundenen Antikörper bieten. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Immobilisierungsmethode führt zu einer willkürlichen Anordnung der Antikörper auf der Grenzfläche. Damit verbunden ist eine stark verminderte Antikörperbindungskapazität, unter anderem durch eine Immobilisierung von Antikörpern an der Antigen-bindungsstelle oder eine sterische Hinderung der Antigenbindungsstelle durch das Substrat [162, 163]. Somit sollte sich die Nachweisgrenze durch eine gerichtete Immobilisierung und die damit verbundene höhere Antikörperbindungs-kapazität verbessern lassen. Bei einer kovalenten Anbindung ist dazu jedoch meist eine vorhergehende chemische Umsetzung der Antikörper nötig. Andere Methoden wie z. B. durch antikörperbindende Proteine haben den Nachteil, daß sie zu weniger stabilen Immobilisierungen führen. Zusätzlich muß beachtet werden, daß die Immobilisierungsmethode möglichst zu keinen zusätzlichen Absorptions- und Streuungsverlusten im Resonator führt. Ein aktueller Überblick über verschiedene Immobilisierungsmethoden findet sich dazu bei Jung et al. [164].

Ein Ziel zukünftiger Forschungen wäre die Weiterentwicklung des vorgestellten Verfahrens in Richtung der Bestimmung ungelabelter Antigene. Hierzu stünden mehrere immunologische Verfahren zur Verfügung, die sich auf diese Methode übertragen ließen. Zu erwähnen wäre hier zum einen der kompetitive Nachweis, bei dem das zu bestimmende ungelabelte Antigen mit gelabeltem Antigen um die Bindungsstellen des Antikörpers konkurriert. Die gemessene Extinktion ist hierbei indirekt proportional zur Antikörperkonzentration. Zum anderen könnten sogenannte Sandwich-Techniken eingesetzt werden. Dabei bindet das zu bestimmende ungelabelte Antigen an den auf der Oberfläche gebundenen Antikörper. Die Detektion erfolgt hier über die Zugabe eines zweiten, gelabelten Antikörpers, der an eine weitere Stelle des Antigens bindet. Weiterhin könnte

diese Methode natürlich auch zur Bestimmung von Antikörpern genutzt werden, indem das TIR-Element mit Antigenen funktionalisiert wird.

Die vielfältigen Möglichkeiten, die Quarzoberfläche des TIR-Elements zu funktionalisieren, liefern, zusammen mit der Möglichkeit, die an der Oberfläche stattfindenden Prozesse, im Gegensatz zu den meisten immunologischen Verfahren, in Echtzeit beobachten zu können, einen interessanten Ansatz für die zukünftige Entwicklung nachweisstarker Biosensoren. Mit der entwickelten Durchflußzelle ließe sich das Detektionssystem auch auf einfache Art und Weise mit flüssigchromatografischen Trennsystemen oder der Fließinjektionsanalyse koppeln.

4.4 Verbesserung der Nachweisgrenze in Fließsystemen durch Anreicherung im Bereich des evaneszenten Feldes

Die Evanescent-Wave-CRDS besitzt ihre Stärken bei der Untersuchung von Prozessen, die direkt auf der TIR-Grenzfläche oder im Bereich von einigen hundert Nanometern darüber stattfinden wie z. B. die Beobachtung von Adsorptionsvorgängen an Quarzoberflächen oder die Untersuchung von dünnen Filmen und nanostrukturierten Materialien. Die starke Spezifität dieser Methode auf Prozesse im Bereich des evaneszenten Feldes ist jedoch ein Nachteil, wenn die Konzentration eines Analyten in einer flüssigen oder gasförmigen Phase über der TIR-Grenzfläche bestimmt werden soll. Deren Höhe ist meist um ein vielfaches größer als die maximale Eindringtiefe der evaneszenten Welle. Im folgenden Teil der Arbeit wurde deshalb eine Methode entwickelt, die Nachweisgrenze für Analyten in der flüssigen Phase durch Anreicherung in einem dünnen Polysiloxanfilm auf der Grenzfläche zu senken.

4.4.1 Funktionalisierung der TIR-Grenzfläche mit Polysiloxanen

Zur Anreicherung der Analyten wurde auf die TIR-Grenzfläche eine dünne Schicht eines Polysiloxans aufgebracht, das normalerweise als stationäre Phase in der Gaschromatographie Verwendung findet [165, 166]. Um einen dünnen und möglichst gleichmäßigen Film aufzubringen, wurde SE-54, ein Polysiloxan mit ca. 94 % Methylgruppen, 5 % Phenylgruppen und 1 % Vinylgruppen in Toluol (Uvasol®, Merck KGaA, Darmstadt, D) gelöst. Anschließend wurden 50 µL der SE-54-Lösung auf die TIR-Grenzfläche eines Quarzprismas pipettiert. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels bei Raumtemperatur verblieb dann eine dünne SE-54-Schicht auf der Grenzfläche zurück. Weitere Modifizierungen wie z. B. eine Quervernetzung des Polysiloxans wurden nicht durchgeführt. Abbildung 4.13 zeigt einen typischen Verlauf der Ring-Down-Zeit während des Beschichtungsprozesses.

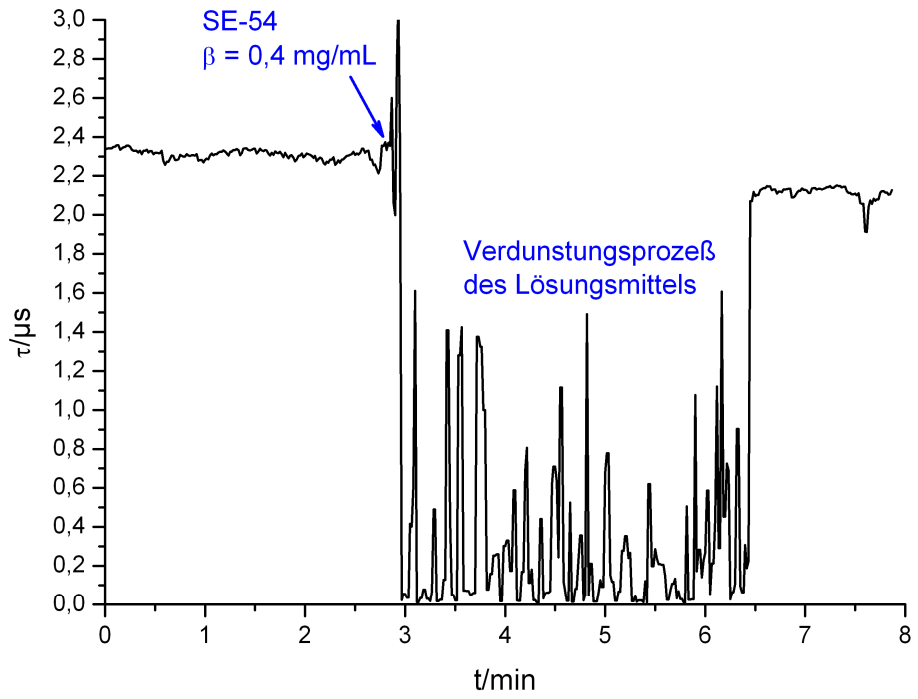


Abbildung 4.13: Verlauf der Ring-Down-Zeit während der Beschichtung der TIR-Grenzfläche mit einer SE-54-Polysiloxanschicht.

Durch das Aufbringen der SE-54-Lösung fand an der Grenzfläche aufgrund des im Vergleich zu Quarz höheren Brechungsindex von Toluol keine Totalreflektion mehr statt, somit konnte während des ungefähr vier Minuten dauernden Verdunstungsprozesses auch keine Resonatorabklingzeit bestimmt werden. Die in Abbildung 4.13 während dieser Zeit dargestellten Meßwerte entstehen durch Anlegen eines exponentiellen Fits durch das Auswerteprogramm an die vom Speicheroszilloskop gelieferten Daten, die jedoch in diesem Fall keiner Abklingkurve des Resonators entsprachen.

Die Differenz der Ring-Down-Zeiten vor und nach der Verdampfungsphase des Lösungsmittels kann als Indikator für die Eignung des Films für EW-CRDS-Messungen herangezogen werden. Je niedriger die Differenz ausfällt, desto geringer sind die durch den Film verursachten zusätzlichen Absorptions- und Streuungsverluste. Eine ausreichende optische Qualität des Films konnte bei Massenkonzentrationen von $\beta < 5$ mg/mL der SE-54-Lösungen beobachtet werden.

Probleme traten jedoch bei der Reproduzierbarkeit einer für CRDS-Messungen geeigneten Polysiloxanbeschichtung auf. Durch das Pipettieren der Polysiloxanlösung auf die Oberfläche in Form eines Tropfens, fand die Verdampfung des Lösungsmittels vom Rand des ursprünglichen Tropfens nach innen statt. Dabei kam es jedoch zu einer Aufkonzentrierung des Polysiloxans während des Verdampfungsprozesses welche zu einer Erhöhung der Schichtdicke in der Mitte des ursprünglich aufgebrachten Tropfens führte. Zum Teil wurde dadurch an der Stelle, an der das Lösemittel als letztes verdampfte, die Polysiloxanschicht für das bloße Auge erkennbar. Lag dieser Punkt im vom Laserstrahl illuminierten Bereich, so führte dies zu Absorptions- und Streuungsverlusten im Resonator und dementsprechend zu einem starken Absinken der Ring-Down-Zeit.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurde zum einen versucht, die Polysiloxanlösung mit einem feinen Pinsel auf die Grenzfläche aufzubringen. Dadurch konnte allerdings ebenfalls keine gleichmäßige Beschichtung erreicht werden. Zum anderen wurde die zu beschichtende Fläche mit Teflonband begrenzt. Dadurch war es möglich, die Polysiloxanlösung nicht als Tropfen sondern als dünne Schicht zwischen den Teflonbändern aufzubringen, wodurch eine gleichmäßige und reproduzierbare Verdampfung des Lösungsmittels über die komplette Fläche ermöglicht wurde.

4.4.2 Anreicherung im Bereich des evaneszenten Feldes am Beispiel von Brillantgrün

Um eine für die Anreicherung im Bereich des evaneszenten Feldes optimale Schichtdicke zu erreichen, wurden verschiedene SE-54-Massenkonzentrationen untersucht. Als Modellanalyt wurde dazu Brillantgrün (BG), ein Triphenylmethanfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 624\,\text{nm}$ in wäßriger Lösung [167], eingesetzt. Da in der Literatur erwähnt wird, daß Brillantgrün in wäßriger Lösung abhängig von der Konzentration zur Dimerisierung neigt, die mit einer Abnahme des Extinktionskoeffizienten verbunden ist [168], wurden die jeweiligen Lösungen vor jeder Messung frisch hergestellt.

Um die Meßergebnisse der beschichteten Prismen damit vergleichen zu können, wurde zuerst untersucht, ab welcher Konzentration sich Brillantgrün auf der

TIR-Grenzfläche eines unbeschichteten Prisma nachweisen läßt. Dazu wurden Brillantgrünlösungen mit Konzentrationen von $c = 10^{-9}$ mol/L, $c = 10^{-8}$ mol/L, $c = 10^{-7}$ mol/L, $c = 10^{-6}$ mol/L und $c = 10^{-5}$ mol/L hergestellt und davon jeweils 2 mL mit einer Spritze in die auf der TIR-Grenzfläche installierte Durchflußzelle injiziert. Eine dabei erhaltene Meßkurve zeigt Abbildung 4.14.

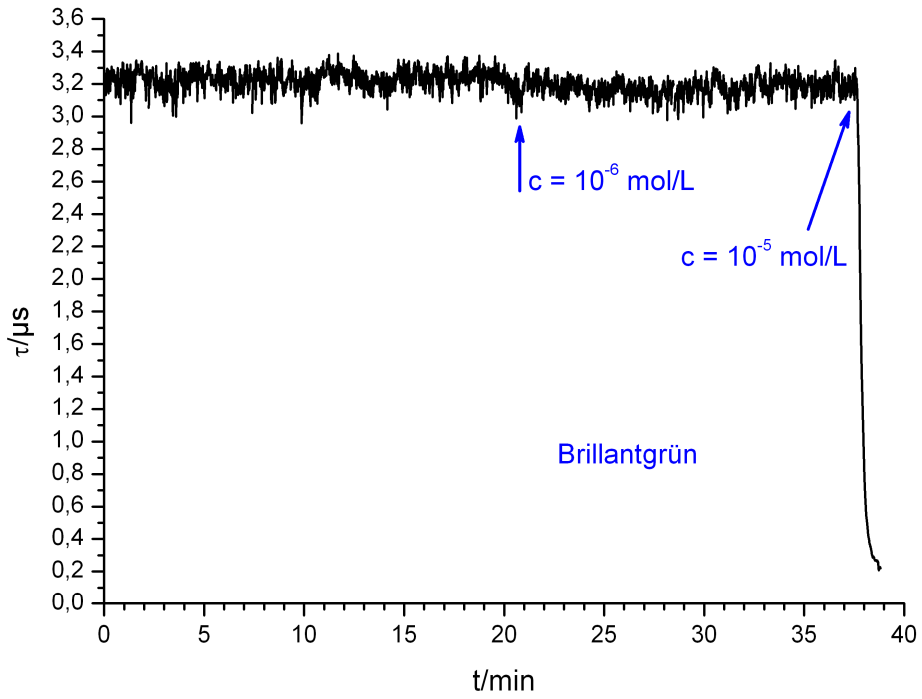


Abbildung 4.14: Prismaoberfläche ohne Polysiloxanschicht, Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration der Brillantgrün-Lösung in der Durchflußzelle.

Bei Konzentrationen von $c = 10^{-9}$ mol/L, $c = 10^{-8}$ mol/L, $c = 10^{-7}$ mol/L konnte keine Veränderung der Ring-Down-Zeit festgestellt werden. Bei einer Konzentration von $c = 10^{-6}$ mol/L erfolgte eine schwache Abnahme der Ring-Down-Zeit um $\Delta\tau = 0{,}02$ µs und eine Konzentration von $c = 10^{-5}$ mol/L erzeugte eine starke Abnahme der Abklingzeit auf $\tau < 0{,}1$ µs.

Anschließend wurde untersucht, wie sich die Nachweisgrenze bei verschiedenen Massenkonzentrationen der zur Beschichtung verwendeten SE-54-Lösung verändert. Die Konzentrationen der Brillantgrünlösungen betrugen dabei $c = 10^{-10}$ mol/L, $c = 10^{-9}$ mol/L, $c = 10^{-8}$ mol/L, $c = 10^{-7}$ mol/L und $c = 10^{-6}$ mol/L. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die nachweisbaren Brillantgrünkonzen-

trationen in Abhängigkeit der Massenkonzentration der zur Beschichtung verwendeten SE-54-Lösung.

β (SE-54)/(mg/mL)	c (BG)/(mol/L)
unbeschichtet	10^{-6}
5	10^{-8}
0,5	10^{-9}
0,1	10^{-9}
0,05	10^{-9}

Tabelle 4.2: Nachweisbare Brillantgrünkonzentration in Abhängigkeit der Massenkonzentration der bei der Beschichtung verwendeten SE-54-Lösung.

Es zeigte sich, daß eine Brillantgrünkonzentration von $c = 10^{-10}$ mol/L mit keiner der aufgebrachten Beschichtungen detektiert werden konnte. Bei einer SE-54-Lösung mit einer Massenkonzentration von $\beta = 5$ mg/mL konnte mit dem entstandenen Film eine minimale Brillantgrünkonzentration von $c = 10^{-8}$ mol/L detektiert werden. Eine Brillantgrünkonzentration von $c = 10^{-9}$ mol/L konnte dagegen mit untersuchten Filmen detektiert werden, die aus SE-54-Lösungen mit Massenkonzentrationen von $\beta = 500$ µg/mL und darunter entstanden. Dies entspricht einer Erniedrigung der Nachweisgrenze durch die Anreicherung um den Faktor 1000.

Die folgende Abbildung 4.15 zeigt die erhaltene Meßkurve bei der Untersuchung eines SE-54-Films, der mit einer Massenkonzentration der SE-54-Lösung von $\beta = 400$ µg/mL erhalten wurde. Eine BG-Konzentration von $c = 10^{-9}$ mol/L führte zu einer Abnahme der Ring-Down-Zeit von $\tau_0 = 2{,}13$ µs auf $\tau = 2{,}07$ µs, bei einer Konzentration von $c = 10^{-8}$ mol/L erfolgte eine Abnahme der Ring-Down-Zeit auf $\tau = 1{,}73$ µs und eine Konzentration von $c = 10^{-7}$ mol/L ließ die Ring-Down-Zeit auf einen Wert von $\tau = 0{,}76$ µs sinken. Anschließend wurde die Durchflußzelle mit 2 mL Ethanol gespült. Dadurch wurden die Brillantgrünmoleküle wieder aus dem SE-54-Film eluiert, verbunden mit einem Wiederanstieg der Ring-Down-Zeit.

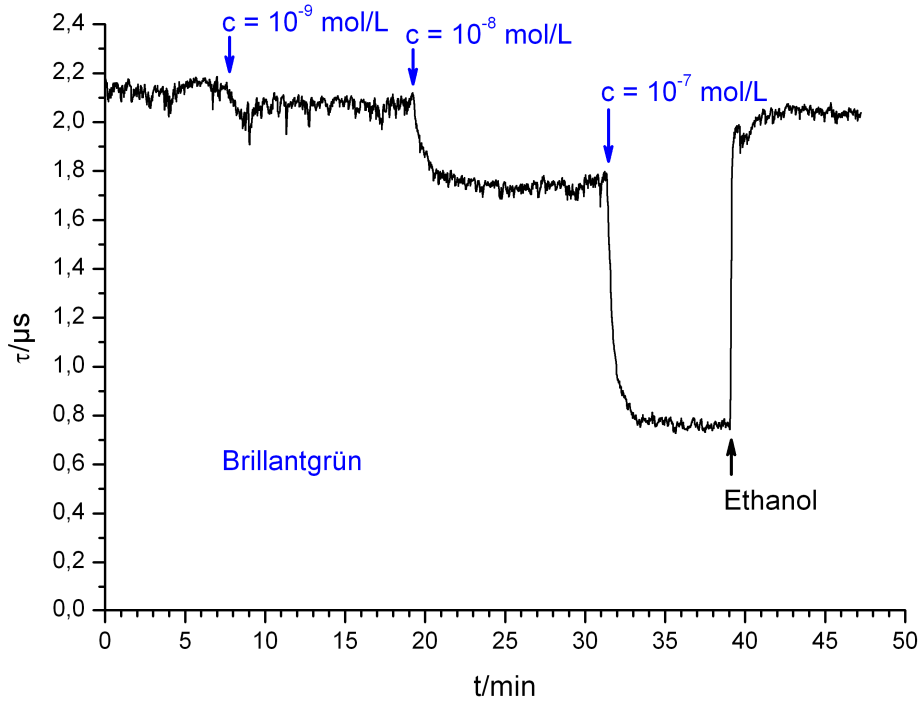


Abbildung 4.15: Prismaoberfläche mit SE-54-Film, Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration der Brillantgrünlösung in der Durchflußzelle.

Trägt man die aus den Ring-Down-Zeiten in Abbildung 4.15 berechneten Extinktionen gegen die Brillantgrünkonzentration im untersuchten Bereich von $c = 10^{-9}$ mol/L bis $c = 10^{-7}$ mol/L auf, so zeigt sich der in Abbildung 4.16 dargestellte lineare Zusammenhang. Das Bestimmtheitsmaß der erhaltenen Regressionsgerade liegt bei $R^2 = 0{,}992$. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Extinktionswerte im jeweiligen Konzentrationsbereich an.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die Anreicherung von Brillantgrün in einem dünnen SE-54-Film eine Quantifizierung mittels Evanescent-Wave-CRDS in einem Konzentrationsbereich gestattet, der um den Faktor 1000 niedriger liegt als bei Verwendung eines unbeschichteten Quarzprismas.

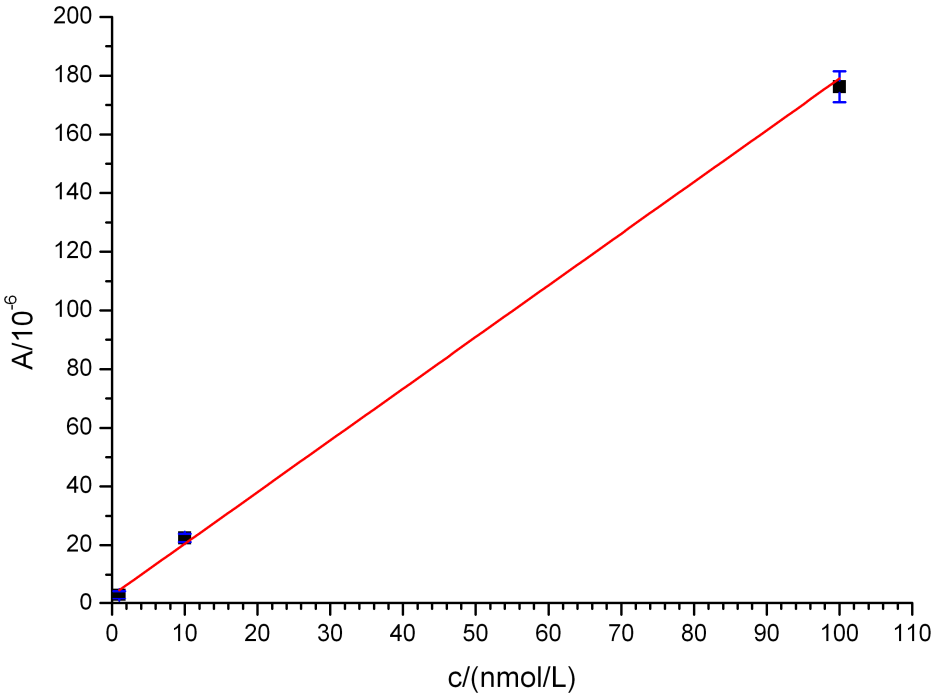


Abbildung 4.16: Extinktion in Abhängigkeit der Brillantgrünkonzentrationen $c = 10^{-9}$ mol/L, $c = 10^{-8}$ mol/L und $c = 10^{-7}$ mol/L in einer, auf der mit SE-54 beschichteten Prismaoberfläche installierten, Durchflußzelle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Extinktionswerte im jeweiligen Konzentrationsbereich an. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade liegt bei $R^2 = 0{,}992$.

Zusätzlich zeigte sich, daß der aufgebrachte dünne Polysiloxanfilm sehr stabil gegenüber den zur Elution eingesetzten Lösungsmitteln ist. Wiederholte Spülgänge mit Ethanol und probeweise mit Acetonitril führten bei daran anschließenden Messungen zu keiner erkennbaren Verschlechterung der nachweisbaren Brillantgrünkonzentration.

Bei dem Versuch, den Polysiloxanfilm nach den Messungen durch Lösen in Toluol wieder von der Prismaoberfläche zu entfernen, konnte außerdem beobachtet werden, daß mit dem Prisma danach weiterhin Brillantgrünkonzentrationen im Bereich von $c = 10^{-9}$ mol/L detektiert werden konnten. Wurde das Prisma dagegen mechanisch poliert, so sank die Nachweisgrenze wieder auf den ursprünglichen Wert bei Verwendung des unbeschichteten Prismas. Dies deutet darauf hin, daß es während der durchgeführten Messungen zu einer Quervernetzung innerhalb des Polysiloxanfilms kam, der sich dadurch nicht mehr in Toluol lösen ließ. Die

Quervernetzung könnte dabei durch die sauer reagierenden wäßrigen Brillantgrünlösungen ausgelöst worden sein.

Diese Beobachtung könnte ein interessanter Ansatz sein, um zukünftig Polysiloxanfilme für EW-CRDS-Messungen zu entwickeln, die eine große Zahl an Messungen ohne eine Erneuerung der Beschichtung erlauben und die gegenüber einer Vielzahl an Lösungsmittel inert sind.

4.4.3 Diskussion und Ausblick

Die Beschichtung der TIR-Grenzfläche eines für Evanescent-Wave-CRDS-Messungen genutzten Quarzprismas mit einem dünnen SE-54-Polysiloxanfilm ermöglichte die Anreicherung von Analyten im Bereich des evaneszenten Feldes. Bei der Verwendung eines unbeschichteten Quarzprismas betrug die mit der EW-CRDS nachweisbare Brillantgrünkonzentration $c = 10^{-6}$ mol/L. Dies ist vergleichbar mit den nachweisbaren Farbstoffkonzentrationen, die bei ähnlichen EW-CRDS-Messungen in der Literatur beschrieben wurden [145]. Durch die Anreicherung der Analyten in einem dünnen SE-54-Film auf der TIR-Grenzfläche des Quarzprismas konnte die nachweisbare Brillantgrünkonzentration auf $c = 10^{-9}$ mol/L verringert werden. Der weiterhin gegebene lineare Zusammenhang zwischen Extinktion und Brillantgrünkonzentration erlaubt damit eine Quantifizierung in einem, im Vergleich zu einem unbeschichteten Quarzprisma, um den Faktor 1000 niedrigeren Konzentrationsbereich.

Problematisch war bei dieser Methode die reproduzierbare Generierung des SE-54-Films. Das Pipettieren eines Tropfens der SE-54-Lösung auf die Oberfläche führte beim anschließenden Verdampfungsprozeß des Lösemittels zu einer Aufkonzentrierung in der Mitte des ursprünglichen Tropfens und somit zu einer ungleichmäßigen, schlecht reproduzierbaren Filmdicke im vom Laserstrahl illuminierten Bereich der TIR-Grenzfläche. Ein Versuch, den Film durch Auftragen der SE-54-Lösung mit einem Pinsel zu generieren, brachte hier keine Besserung im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit. Eine Verbesserung konnte jedoch durch die Begrenzung der zu beschichtenden Fläche mit Teflonbändern erreicht werden. Durch die Aufbringung der Polysiloxanlösung als dünne Schicht zwischen den Teflonbändern und nicht als Tropfen, fand eine gleichmäßige und reproduzier-

bare Verdampfung des Lösungsmittels über die komplette Fläche statt. Für zukünftige Anwendungen dieser Methode könnte es sinnvoll sein, weitere Beschichtungsmethoden zur Generierung dünner und gleichmäßiger Filme wie z. B. die Rotationsbeschichtung [169] zu untersuchen.

Durch die Anreicherung im Bereich des evaneszenten Feldes und die dadurch mögliche Detektion geringer Analytkonzentrationen in der flüssigen Phase ergeben sich vielfältige Einsatzmöglichkeiten im Bereich der analytischen Chemie. Die EW-CRDS-Detektion könnte mit analytischen Methoden wie der Fließ-injektionsanalyse oder Trenntechniken wie der HPLC und der Elektrophorese gekoppelt werden. Durch die Verfügbarkeit verschiedenster Beschichtungs-materialien wäre es außerdem möglich, den zur Anreicherung genutzten Film gezielt für bestimmte Analytgruppen oder einen bestimmten Analyten zu optimieren.

5 Zusammenfassung

Zahlreiche Entwicklungen im Bereich der klassischen analytischen Trennmethoden sowie im Bereich der Bioanalytik und Biosensorik führten in den vergangenen Jahrzehnten zu Detektionsvolumina im Mikro- bzw. Nanoliterbereich. Dies begründete die Notwendigkeit von nachweisstarken, für diese geringen Volumina geeigneten Detektionsmethoden. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Detektionsmethoden unter Nutzung der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie sowohl für die klassischen analytischen Trennmethoden als auch für die Bioanalytik entwickelt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein frei fließender Tensidfilm als Detektionsmedium innerhalb der Ring-Down-Cavity entwickelt. Ein Tensidfilm bietet, im Gegensatz zu aus der Literatur bekannten CRDS-Detektionszellen für die flüssige Phase, den Vorteil, Streuungs- und Absorptionsverluste innerhalb des Resonators zu verringern. Ein stabiler Tensidfilm, der als Detektionsmedium geeignet ist, konnte durch eine Tensidlösung mit einer SDS-Konzentration von 20 mmol/L und einer Volumenkonzentration von 3,5 % 1-Butanol generiert werden. Direkt nach der Trennsäule wurde der Fluß aus dem Trennsystem über ein T-Stück mit der Tensidlösung vereinigt und der Tensidfilm anschließend in einer ovalen Drahtschleife aufgespannt, die in der Ring-Down-Cavity installiert war. Die Fließgeschwindigkeit der Tensidlösung lag dabei bei 1,2 mL/min, die in der vorliegenden Arbeit genutzte Trennsäule wurde mit 50 µL/min betrieben. Eine hohe optische Qualität und Stabilität des Tensidfilms wurde durch eine eng in achtförmigen Schleifen gewundene Mischkapillare aus Edelstahl mit einer Länge von 93 cm und einen Innendurchmesser von 0,2 mm zwischen T-Stück und Drahtschleife sichergestellt. Die Eignung des entwickelten Tensidfilms als Detektionsmedium für analytische Fließsysteme wurde durch die HPLC-Trennung eines Nitroaromatengemisches gezeigt. Die vier im Gemisch vorhandenen Nitroaromaten 4-Nitroanilin, 2,4-Dinitrophenol, 2,4-Dinitro-6-methylphenol und Pikrinsäure konnten nach der Trennung auf einer C18-RP-Säule mit Hilfe der Cavity-Ring-Down-Spektroskopie nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung wurde anschließend am Beispiel der Pikrinsäure durchgeführt.

Die aus den Peakflächen erhaltene Kalibrierkurve zeigte im gemessenen Konzentrationsbereich von c = 200-670 µmol/L einen sehr guten linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von R^2 = 0,998. Die Nachweisgrenze wurde über die Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 bestimmt und liegt mit der beschriebenen Detektionsmethode für Pikrinsäure bei einer Konzentration von $c = 2{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Insgesamt wurde deutlich, daß sich der entwickelte Tensidfilm für die CRDS-Detektion in analytischen Fließsystemen eignet. Die bei der Kombination des Flusses aus dem Trennsystem mit der Tensidlösung stattfindende Verdünnung und die Tatsache, daß durch die Form des Tensidfilms nur ein Teil der injizierten Analytmoleküle durch den vom Laserstrahl durchstrahlten Bereich fließt und somit erfaßt werden kann, führen jedoch zu einer relativ hohen Nachweisgrenze. Hier sind weitere Forschungen notwendig, um diese Effekte durch eine effektivere Kopplung sowie eine verbesserte Form des Tensidfilms zu verringern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Evanescent-Wave-Cavity-Ring-Down-Spektroskopie dazu verwendet, um mit Hilfe der bei der Totalreflektion entstehenden evaneszenten Welle spezifisch Prozesse an oder in der Nähe der Grenzfläche zwischen einem Quarzprisma und einer flüssigen Phase zu untersuchen.

Im Bereich der Bioanalytik bzw. der Biosensorik wurde damit die Möglichkeit untersucht, Antikörper-Antigen-Reaktionen zu verfolgen. Dazu wurde die TIR-Grenzfläche eines in der Ring-Down-Cavity installierten Quarzprismas in einer mehrstufigen Reaktion kovalent mit Antikörpern gegen menschliches Fibronektin funktionalisiert. Die Fibronektinmoleküle wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-631 gelabelt. Anschließend wurde die Antikörper-Antigen-Reaktion bei einer Laserwellenlänge von λ = 625 nm sowohl mit einer statischen Meßzelle als auch mit einer Durchflußzelle untersucht. Bei beiden Meßzellen zeigte sich im Konzentrationsbereich von $c = 10^{-10}$-10^{-9} mol/L ein sehr guter linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration des gelabelten Fibronektins. Die nach DIN 32645 berechnete Nachweisgrenze lag bei Verwendung der statischen Meßzelle bei einer Massenkonzentration von β = 56 ng/mL, entsprechend einer Konzentration von $c = 1{,}3 \cdot 10^{-10}$ mol/L sowie bei Verwendung der Durchflußzelle

bei einer Massenkonzentration von $\beta = 72$ ng/mL, entsprechend einer Konzentration von $c = 1{,}6 \cdot 10^{-10}$ mol/L. Abgeschlossen wurde dieses Kapitel mit einer Diskussion verschiedener Möglichkeiten zur Verbesserung der Nachweisgrenze und einem Ausblick in Richtung der Weiterentwicklung der Methode zur Bestimmung ungelabelter Antigene sowie als Biosensor.

Im Bereich der analytischen Fließsysteme wurde mit Hilfe der Evanescent-Wave-Cavity-Ring-Down-Spektroskopie ein Verfahren entwickelt, um Analyten auf der TIR-Grenzfläche im Bereich des evaneszenten Feldes anzureichern. Aufgrund ihrer Spezifität für Prozesse an oder in der Nähe der TIR-Grenzfläche, ist die EW-CRDS nicht besonders gut für Konzentrationsbestimmungen in flüssigen Phasen geeignet. Mit Brillantgrün als Modellanalyt waren bei Einsatz eines konventionellen Quarzprismas Konzentrationen von $c = 10^{-6}$ mol/L nachweisbar. Durch Aufbringen eines dünnen Polysiloxanfilms auf der TIR-Grenzfläche und die dadurch erreichte Anreicherung des Analyten im Bereich des evaneszenten Feldes konnten dagegen Brillantgrünkonzentrationen von $c = 10^{-9}$ mol/L nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Verringerung der nachweisbaren Konzentration um den Faktor 1000. Problemtisch war hierbei jedoch die Reproduzierbarkeit einer für CRDS-Messungen geeigneten Polysiloxanbeschichtung auf der TIR-Grenzfläche. Es zeigte sich, daß das Aufbringen des Films über das Pipettieren eines Tropfens der Polysiloxanlösung auf die Grenzfläche und das anschließende Verdampfen des Lösemittels zu ungleichmäßigen und unterschiedlich dicken Filmen im durch den Laserstrahl illuminierten Bereich führte. Eine Verbesserung konnte hier durch die Begrenzung der zu beschichtenden Fläche mit Teflonbändern erreicht werden. Durch die dadurch mögliche Aufbringung der Polysiloxanlösung als dünne Schicht zwischen den Teflonbändern fand eine gleichmäßige und reproduzierbare Verdampfung des Lösungsmittels über die komplette Fläche statt.

Aufgrund der hohen Stabilität des Polysiloxanfilms gegenüber den zur Elution eingesetzten Lösungsmitteln sowie der großen Anzahl an theoretisch realisierbaren Beschichtungen und der daraus resultierenden Möglichkeiten, gezielt bestimmte Analyten bzw. Analytgruppen im Bereich des evaneszenten Feldes anreichern zu können, bietet die EW-CRDS einen sehr interessanten Ansatz

zur Detektion in analytischen Fließsystemen. Vor allem der Beschichtungsprozeß bietet hier vielfältige Möglichkeiten für weitere Untersuchungen.

6 Summary

Over the last decades, numerous developments in the field of standard separation sciences as well as in bioanalytics and biosensor technology have resulted in micro and nanoliter detection volumes. This has motivated the development of suitable and sensitive detection methods for these small volumes. In the present dissertation, detection methods based on cavity ring-down spectroscopy for standard separation methods and bioanalytical techniques were developed.

In the first part, a free flowing soap film was developed to be used as a detection medium inside the ring-down cavity. In contrast to CRDS detection cells for liquid phase measurements so far reported, a soap film has the advantage of reducing losses due to scattering and absorption inside the resonator. A stable soap film with sufficiently high-quality optical properties was produced using a soap solution with a concentration of 20 mmol/L sodium dodecyl sulfate (SDS) and a volume concentration of 3.5 % 1-butanol. The flow from a separation column was combined with the soap solution over a standard T-piece and the resulting mixture was pumped into an oval-shaped wire loop, thus forming a free flowing soap film. The flow rate of the soap solution was 1.2 mL/min while the separation column was operated at a flow rate of 50 µL/min. In order to obtain the high levels of optical quality and stability of the soap film required, the solutions were thoughly mixed in a steel capillary (0.2 mm i.d., 93 cm long) wound in a figure-of-eight shape and placed between the T-section and the wire loop. The suitability of the soap film as a detection medium for analytical flow systems was demonstrated by carrying out HPLC separation of a mixture of nitroarenes. The nitroarenes 4-nitroaniline, 2,4-dinitrophenol, 2,4-dinitro-6-methylphenol and picric acid were separated on a C18 reversed phase column and detected by cavity ring-down spectroscopy. The quantification was subsequently demonstrated using the example of picric acid. The calibration curve based on the peak areas showed a good linearity in the observed concentration range of c = 200-670 µmol/L with a coefficient of determination of R^2 = 0.998. The limit of detection was determined by the calibration curve method according to DIN 32645 and correlates with a

concentration of $c = 2{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol/L for picric acid. It was shown that the soap film system developed was suitable for CRDS detection in analytical flow systems. However, the dilution produced by the combination of the flow from the separation system with the soap solution and the fact that, due to the design of the soap film, only a small part of the injected analyte molecules flowed through the illuminated area and consequently could be detected, leads to a relatively high limit of detection. Further research is required to reduce these effects by a more efficient coupling and an optimised design of the soap film.

In the second part of the thesis, evanescent wave cavity ring-down spectroscopy was used to investigate specifically processes at or near the interface between a quartz prism and a liquid phase.

In bioanalytics and biosensor technology the feasibility of studying antibody antigen reactions was investigated. For this purpose the TIR surface of a quartz prism installed in the ring-down cavity was covalently functionalised with antibodies for human fibronectin. Fibronectin molecules were then labelled with fluorescence dye DY-631. Subsequently, using a laser wavelength of $\lambda = 625$ nm, the antibody antigen reaction was determined both in a static measuring cell and a flow cell. With both cells a good linear correlation between absorbance and concentration of the labelled fibronectin was shown in the concentration range of $c = 10^{-10}$-10^{-9} mol/L. The limit of detection calculated according to DIN 32645 corresponds to a mass concentration of $\beta = 56$ ng/mL which is equal to a concentration of $c = 1{,}3 \cdot 10^{-10}$ mol/L with the static cell. Using the flow cell, a mass concentration of $\beta = 72$ ng/mL corresponding to a concentration of $c = 1{,}6 \cdot 10^{-10}$ mol/L was determined This chapter was concluded by a discussion of different possibilities to improve the limit of detection and an outlook to further development of this method relating to the determination of unlabelled antigens as well as the usage as a biosensor.

In the field of analytical flow systems, an evanescent wave CRDS technique for the enrichment of analytes in the region of the evanescent field was developed. Evanescent wave CRDS is not well suitable for quantification in liquid phases since the evanescent wave penetrates only a very short distance beyond the TIR surface.

To demonstrate this, brilliant green was used as a model analyte. With a standard quartz prism, a brilliant green concentration of only $c = 10^{-6}$ mol/L could be detected. After applying a thin polysiloxane coating on the TIR surface, an enrichment of the analytes in the region of the evanescent field was obtained and thereby a brilliant green concentration of $c = 10^{-9}$ mol/L could be detected. This corresponded to a 1000 times reduction in the detectable brilliant green concentration. However, it proved problematic to produce a reproducible polysiloxane coating on the TIR surface which was suitable for CRDS measurements. The application of the coating by pipetting a droplet of the polysiloxane solution onto the surface and the following evaporation of the solvent led to non-uniform films with variable thickness in the illuminated area. An improvement could be seen by limiting the coating area by Teflon band. This leads to a thin layer of polysiloxan solution between the Teflon bands resulting in a uniform and reproducible evaporation of the solvent over the entire area.

Due to the high stability of the polysiloxane coating to the solvents used for elution as well as the large number of theoretically realisable coatings, which offers the possibility, to enrich certain analytes or analyte groups in the region of the evanescent field, EW-CRDS offers an interesting approach for detection in analytical flow systems. Improvements of the coating process offers a large number of possibilities for additional investigation.

7 Literaturverzeichnis

[1] D. Corradini, Editor; *Handbook of HPLC, Second Edition*, Chromatographic Science Series, Vol. 101, CRC Press, Boca Raton, 2011.

[2] J. P. Landers, Editor; *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques, Third Edition*, CRC Press, Boca Raton, 2008.

[3] Y. Saito, K. Jinno, T. Greibrokk; Capillary columns in liquid chromatography: between conventional columns and microchips, *Journal of Separation Science* **2004**, *27*, 1379-1390.

[4] I. Newton; A Letter of Mr. Isaac Newton, Professor of the Mathematicks in the University of Cambridge; Containing his New Theory about Light and Colors: sent by the Author to the Publisher from Cambridge, Febr. 6. 1671/72; in order to be communicated to the R. Society, *Philosophical Transactions* **1671**, *6*, 3075-3087.

[5] W. H. Wollaston; A Method of examining refractive and dispersive Powers, by prismatic Reflection, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1802**, *92*, 365-380.

[6] J. Fraunhofer; Bestimmung des Brechungs- und des Farbenzerstreungs-Vermögens verschiedener Glasarten, in Bezug auf die Vervollkommnung achromatischer Fernröhre, *Annalen der Physik* **1817**, *56*, 264-313.

[7] D. Brewster; Description of a Monochromatic Lamp for Microscopical purposes, &c. with Remarks on the Absorption of the Prismatic Rays by coloured Media, *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* **1822**, *9*, 433-444.

[8] J. F. W. Herschel; On the Absorption of Light by Coloured Media, and on the Colours of the Prismatic Spectrum exhibited by certain Flames; with an Account of a ready Mode of determining the absolute dispersive Power of any Medium, by direct experiment, *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* **1822**, *9*, 445-460.

[9] G. Kirchhoff; Ueber das Verhältniß zwischen dem Emissionsvermögen und dem Absorptionsvermögen der Körper für Wärme und Licht, *Annalen der Physik* **1860**, *185*, 275-301.

[10] G. Kirchhoff, R. Bunsen; Chemische Analyse durch Spectralbeobachtungen, *Annalen der Physik* **1860**, *186*, 161-189.

[11] J. J. Balmer; Notiz über die Spectrallinien des Wasserstoffs, *Annalen der Physik* **1885**, *261*, 80-87.

[12] J. R. Rydberg; Recherches sur la constitution des spectres d'émission des éléments chimiques, *Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar* **1889**, *23*, Nr. 11.

[13] N. Bohr; On the Constitution of Atoms and Molecules, *Philosophical Magazine Series 6* **1913**, *26*, 1 - 25.

[14] N. Bohr; On the Constitution of Atoms and Molecules, Part II.–Systems containing only a Single Nucleus, *Philosophical Magazine Series 6* **1913**, *26*, 476-502.

[15] N. Bohr; On the Constitution of Atoms and Molecules, Part III.–Systems containing Several Nuclei, *Philosophical Magazine Series 6* **1913**, *26*, 857-875.

[16] W. Heisenberg; Über quantentheoretische Umdeutung kinematischer und mechanischer Beziehungen, *Zeitschrift für Physik* **1925**, *33*, 879-893.

[17] E. Schrödinger; Quantisierung als Eigenwertproblem (Erste Mitteilung), *Annalen der Physik* **1926**, *384*, 361-376.

[18] E. Schrödinger; Quantisierung als Eigenwertproblem (Zweite Mitteilung), *Annalen der Physik* **1926**, *384*, 489-527.

[19] E. Schrödinger; Quantisierung als Eigenwertproblem (Dritte Mitteilung: Störungstheorie, mit Anwendung auf den Starkeffekt der Balmerlinien), *Annalen der Physik* **1926**, *385*, 437-490.

[20] E. Schrödinger; Quantisierung als Eigenwertproblem (Vierte Mitteilung), *Annalen der Physik* **1926**, *386*, 109-139.

[21] M. Born, P. Jordan; Zur Quantenmechanik, *Zeitschrift für Physik* **1925**, *34*, 858-888.

[22] M. Born, W. Heisenberg, P. Jordan; Zur Quantenmechanik. II, *Zeitschrift für Physik* **1926**, *35*, 557-615.

[23] P. A. M. Dirac; The Quantum Theory of the Emission and Absorption of Radiation, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **1927**, *114*, 243-265.

[24] P. Bouguer; *Essai d'optique, Sur la gradation de la lumière*, Claude Jombert, Paris, 1729.

[25] J. H. Lambert; *Photometria, Sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*, Sumptibus Viduae Eberhardi Klett, Augustae Vindelicorum, 1760.

[26] A. Beer; Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten, *Annalen der Physik* **1852**, *162*, 78-88.

[27] J. U. White; Long Optical Paths of Large Aperture, *Journal of the Optical Society of America* **1942**, *32*, 285-285.

[28] J. U. White; Very long optical paths in air, *Journal of the Optical Society of America* **1976**, *66*, 411-416.

[29] D. Herriott, H. Kogelnik, R. Kompfner; Off-Axis Paths in Spherical Mirror Interferometers, *Applied Optics* **1964**, *3*, 523-526.

[30] D. R. Herriott, H. J. Schulte; Folded Optical Delay Lines, *Applied Optics* **1965**, *4*, 883-889.

[31] V. Sanders; High-precision reflectivity measurement technique for low-loss laser mirrors, *Applied Optics* **1977**, *16*, 19-20.

[32] J. M. Herbelin, J. A. McKay, M. A. Kwok, R. H. Ueunten, D. S. Urevig, D. J. Spencer, D. J. Benard; Sensitive measurement of photon lifetime and true reflectances in an optical cavity by a phase-shift method, *Applied Optics* **1980**, *19*, 144-147.

[33] J. M. Herbelin, J. A. McKay; Development of laser mirrors of very high reflectivity using the cavity-attenuated phase-shift method, *Applied Optics* **1981**, *20*, 3341-3344.

[34] M. A. Kwok, J. M. Herbelin, R. H. Ueunten; Cavity phase shift method for high reflectance measurements at mid-infrared wavelengths, *Optical Engineering* **1982**, *21*, 979-982.

[35] D. Z. Anderson, J. C. Frisch, C. S. Masser; Mirror reflectometer based on optical cavity decay time, *Applied Optics* **1984**, *23*, 1238-1245.

[36] A. O'Keefe, D. A. G. Deacon; Cavity ring-down optical spectrometer for absorption measurements using pulsed laser sources, *Review of Scientific Instruments* **1988**, *59*, 2544-2551.

[37] A. O'Keefe, J. J. Scherer, A. L. Cooksy, R. Sheeks, J. Heath, R. J. Saykally; Cavity ring down dye laser spectroscopy of jet-cooled metal clusters: Cu_2 and Cu_3, *Chemical Physics Letters* **1990**, *172*, 214-218.

[38] R. A. Provencal, J. B. Paul, K. Roth, C. Chapo, R. N. Casaes, R. J. Saykally, G. S. Tschumper, H. F. Schaefer III; Infrared cavity ringdown spectroscopy of methanol clusters: Single donor hydrogen bonding, *Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 4258-4267.

[39] Y. Matsumoto, K. Honma; NH stretching vibrations of pyrrole clusters studied by infrared cavity ringdown spectroscopy, *The Journal of Chemical Physics* **2007**, *127*, 184310.

[40] D. J. Benard, B. K. Winker; Chemical generation of optical gain at 471 nm, *Journal of Applied Physics* **1991**, *69*, 2805-2809.

[41] D. J. Benard; Threshold oscillation of an NF($a^1\Delta$)/BiF visible wavelength chemical laser, *Journal of Applied Physics* **1993**, *74*, 2900-2907.

[42] D. J. Benard, E. Boehmer; Chemically pumped visible-wavelength laser with high optical gain, *Applied Physics Letters* **1994**, *65*, 1340-1342.

[43] T. Yu, M. C. Lin; Kinetics of Phenyl Radical Reactions Studied by the "Cavity-Ring-Down" Method, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 4371-4372.

[44] E. W. Diau, T. Yu, M. A. G. Wagner, M. C. Lin; Kinetics of the NH_2 + NO Reaction: Effects of Temperature on the Total Rate Constant and the OH/H_2O Branching Ratio, *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 4034-4042.

[45] L. Zhu, G. Johnston; Kinetics and Products of the Reaction of the Vinoxy Radical with O_2, *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 15114-15119.

[46] M. D. Wheeler, S. M. Newman, T. Ishiwata, M. Kawasaki, A. J. Orr-Ewing; Cavity ring-down spectroscopy of the A $^2\Pi_{3/2}$–X $^2\Pi_{3/2}$ transition of BrO, *Chemical Physics Letters* **1998**, *285*, 346-351.

[47] A. J. Alexander; Reaction kinetics of nitrate radicals with terpenes in solution studied by cavity ring-down spectroscopy, *Chemical Physics Letters* **2004**, *393*, 138-142.

[48] D. Romanini, K. K. Lehmann; Ring-down cavity absorption spectroscopy of the very weak hydrogen cyanide overtone bands with six, seven, and eight stretching quanta, *Journal of Chemical Physics* **1993**, *99*, 6287-6301.

[49] J. J. Scherer, D. Voelkel, D. J. Rakestraw, J. B. Paul, C. P. Collier, R. J. Saykally, A. O'Keefe; Infrared cavity ringdown laser absorption spectroscopy (IR-CRLAS), *Chemical Physics Letters* **1995**, *245*, 273-280.

[50] J. Xie, B. A. Paldus, E. H. Wahl, J. Martin, T. G. Owano, C. H. Kruger, J. S. Harris, R. N. Zare; Near-infrared cavity ringdown spectroscopy of water vapor in an atmospheric flame, *Chemical Physics Letters* **1998**, *284*, 387-395.

[51] D. Kleine, S. Stry, J. Lauterbach, K. Kleinermanns, P. Hering; Measurement of the absolute intensity of the fifth CH stretching overtone of benzene using cavity ring-down spectroscopy, *Chemical Physics Letters* **1999**, *312*, 185-190.

[52] R. T. Jongma, M. G. H. Boogaarts, I. Holleman, G. Meijer; Trace gas detection with cavity ring down spectroscopy, *Review of Scientific Instruments* **1995**, *66*, 2821-2828.

[53] M. Mürtz, B. Frech, W. Urban; High-resolution cavity leak-out absorption spectroscopy in the 10-μm region, *Applied Physics B: Lasers and Optics* **1999**, *68*, 243-249.

[54] A. A. Kosterev, A. L. Malinovsky, F. K. Tittel, C. Gmachl, F. Capasso, D. L. Sivco, J. N. Baillargeon, A. L. Hutchinson, A. Y. Cho; Cavity ringdown spectroscopic detection of nitric oxide with a continuous-wave quantum-cascade laser, *Applied Optics* **2001**, *40*, 5522-5529.

[55] S. Welzel, G. Lombardi, P. B. Davies, R. Engeln, D. C. Schram, J. Röpcke; Trace gas measurements using optically resonant cavities and quantum cascade lasers operating at room temperature, *Journal of Applied Physics* **2008**, *104*, 093115.

[56] J. J. Scherer, D. Voelkel, D. J. Rakestraw; Infrared cavity ringdown laser absorption spectroscopy (IR-CRLAS) in low pressure flames, *Applied Physics B: Lasers and Optics* **1997**, *64*, 699-705.

[57] I. Derzy, V. A. Lozovsky, N. Ditzian, I. Rahinov, S. Cheskis; Absorption spectroscopy measurements of NH and NH_2 absolute concentrations in methane/air flames doped with N_2O, *Proceedings of the Combustion Institute* **2000**, *28*, 1741-1748.

[58] Z. W. Liu, X. F. Yang, A. M. Zhu, G. L. Zhao, Y. Xu; Determination of the OH radical in atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasmas using near infrared cavity ring-down spectroscopy, *The European Physical Journal D - Atomic, Molecular, Optical and Plasma Physics* **2008**, *48*, 365-373.

[59] T. von Lerber, M. W. Sigrist; Cavity-ring-down principle for fiber-optic resonators: experimental realization of bending loss and evanescent-field sensing, *Applied Optics* **2002**, *41*, 3567-3575.

[60] M. Gupta, H. Jiao, A. O'Keefe; Cavity-enhanced spectroscopy in optical fibers, *Optics Letters* **2002**, *27*, 1878-1880.

[61] P. B. Tarsa, A. D. Wist, P. Rabinowitz, K. K. Lehmann; Single-cell detection by cavity ring-down spectroscopy, *Applied Physics Letters* **2004**, *85*, 4523-4525.

[62] R. Li, H.-P. Loock, R. D. Oleschuk; Capillary Electrophoresis Absorption Detection Using Fiber-Loop Ring-Down Spectroscopy, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 5685-5692.

[63] M. Jiang, W. Zhang, Q. Zhang, Y. Liu, B. Liu; Investigation on an evanescent wave fiber-optic absorption sensor based on fiber loop cavity ring-down spectroscopy, *Optics Communications* **2010**, *283*, 249-253.

[64] A. C. R. Pipino, J. W. Hudgens, R. E. Huie; Evanescent wave cavity ring-down spectroscopy with a total-internal-reflection minicavity, *Review of Scientific Instruments* **1997**, *68*, 2978-2989.

[65] A. C. R. Pipino, J. W. Hudgens, R. E. Huie; Evanescent wave cavity ring-down spectroscopy for probing surface processes, *Chemical Physics Letters* **1997**, *280*, 104-112.

[66] S. Xu, G. Sha, J. Xie; Cavity ring-down spectroscopy in the liquid phase, *Review of Scientific Instruments* **2002**, *73*, 255-258.

[67] A. J. Hallock, E. S. F. Berman, R. N. Zare; Direct Monitoring of Absorption in Solution by Cavity Ring-Down Spectroscopy, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 1741-1743.

[68] J. Y. Lee, H.-W. Lee, J. W. Hahn; Time Domain Study on Cavity Ring-Down Signals from a Fabry-Pérot Cavity under Pulsed Laser Excitations, *Japanese Journal of Applied Physics* **1999**, *38*, 6287-6297.

[69] F. K. Kneubühl, M. W. Sigrist; *Laser*, 7. Auflage, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 2008.

[70] G. Litfin; *Technische Optik in der Praxis*, 3. Auflage, Springer-Verlag GmbH, Berlin, 2005.

[71] H. Kogelnik, T. Li; Laser Beams and Resonators, *Applied Optics* **1966**, *5*, 1550-1567.

[72] M. Born, E. Wolf; *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*, 7. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge, 2000.

[73] H. Sankur, R. Hall; Thin-film deposition by laser-assisted evaporation, *Applied Optics* **1985**, *24*, 3343-3347.

[74] P. J. Martin; Ion-assisted thin film deposition and applications, *Vacuum* **1986**, *36*, 585-590.

[75] CRD Optics, Inc., San Jose, CA, USA, *UV Mirrors*, http://www.crd-optics.com/crd-mirrors-uv.html, 30.05.2011.

[76] CRD Optics, Inc., San Jose, CA, USA, *Visible Mirrors*, http://www.crd-optics.com/crd-mirrors-vis.html, 30.05.2011.

[77] CRD Optics, Inc., San Jose, CA, USA, *Near-Infrared Mirrors*, http://www.crd-optics.com/crd-mirrors-near-ir.html, 30.05.2011.

[78] P. Zalicki, R. N. Zare; Cavity ring-down spectroscopy for quantitative absorption measurements, *Journal of Chemical Physics* **1995**, *102*, 2708-2717.

[79] G. Berden, R. Engeln, Editoren; *Cavity Ring-Down Spectroscopy: Techniques and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2009.

[80] T. Dallas, P. K. Dasgupta; Light at the end of the tunnel: recent analytical applications of liquid-core waveguides, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2004**, *23*, 385-392.

[81] M. J. Navas, A. M. Jimenez; Thermal Lens Spectrometry as Analytical Tool, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2003**, *33*, 77-88.

[82] J. Wu, T. Odake, T. Kitamori, T. Sawada; Ultrasensitive Detection for Capillary Zone Electrophoresis Using Laser-Induced Capillary Vibration, *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 2216-2218.

[83] K. L. Snyder, R. N. Zare; Cavity Ring-Down Spectroscopy as a Detector for Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3086-3091.

[84] L. van der Sneppen, F. Ariese, C. Gooijer, W. Ubachs; Cavity ring-down spectroscopy for detection in liquid chromatography at UV wavelengths using standard cuvettes in a normal incidence geometry, *Journal of Chromatography A* **2007**, *1148*, 184-188.

[85] A. J. Hallock, E. S. F. Berman, R. N. Zare; Ultratrace Kinetic Measurements of the Reduction of Methylene Blue, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 1158-1159.

[86] A. J. Hallock, E. S. F. Berman, R. N. Zare; Use of Broadband, Continuous-Wave Diode Lasers in Cavity Ring-Down Spectroscopy for Liquid Samples, *Applied Spectroscopy* **2003**, *57*, 571-573.

[87] K. L. Bechtel, R. N. Zare, A. A. Kachanov, S. S. Sanders, B. A. Paldus; Moving beyond Traditional UV-Visible Absorption Detection: Cavity Ring-Down Spectroscopy for HPLC, *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 1177-1182.

[88] B. Bahnev, L. Van der Sneppen, A. E. Wiskerke, F. Ariese, C. Gooijer, W. Ubachs; Miniaturized Cavity Ring-Down Detection in a Liquid Flow Cell, *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 1188-1191.

[89] L. van der Sneppen, A. Wiskerke, F. Ariese, C. Gooijer, W. Ubachs; Improving the sensitivity of HPLC absorption detection by cavity ring-down spectroscopy in a liquid-only cavity, *Analytica Chimica Acta* **2006**, *558*, 2-6.

[90] L. van der Sneppen, A. E. Wiskerke, F. Ariese, C. Gooijer, W. Ubachs; Cavity Ring-Down Spectroscopy for Detection in Liquid Chromatography: Extension to Tunable Sources and Ultraviolet Wavelengths, *Applied Spectroscopy* **2006**, *60*, 931-935.

[91] A. J. Alexander; Flowing Liquid-Sheet Jet for Cavity Ring-Down Absorption Measurements, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 5597-5600.

[92] J. Klebniczki, J. Hebling, B. Hopp, G. Hajós, Z. Bor; Fluid jet with variable thickness in the range 5-20 μm, *Measurement Science and Technology* **1994**, *5*, 601-603.

[93] LAYERTEC GmbH, Mellingen, Deutschland, *Datasheet Part No. 103368, Laser Mirror - Low Loss (HR(0°,340-360±3nm)>99.9%, T(at 355nm)~0.01-0.015%)*, http://www.layertec.de/de/shop/datasheet/103368, 30.05.2011.

[94] J.-M. Antonietti, M. Michalski; *Programm zur Bestimmung der Resonator-abklingzeit bei cavity-ring-down-spektroskopischen Messungen in der grafischen Programmierumgebung LabVIEW*, Universität Ulm, 2004.

[95] Y. Couder, J. M. Chomaz, M. Rabaud; On the hydrodynamics of soap films, *Physica D* **1989**, *37*, 384-405.

[96] R. Bruinsma; Theory of hydrodynamic convection in soap films, *Physica A* **1995**, *216*, 59-76.

[97] L. De Luca, C. Meola; Surfactant effects on the dynamics of a thin liquid sheet, *Journal of Fluid Mechanics* **1995**, *300*, 71-85.

[98] S. S. Patel, K. Kumar, D. O. Shah, J. J. Delfino; Effect of Surfactant Concentration and Film Area on the Stability of Films of Surfactant Solutions, *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, *183*, 603-606.

[99] M. Rivera, P. Vorobieff, R. E. Ecke; Turbulence in Flowing Soap Films: Velocity, Vorticity, and Thickness Fields, *Physical Review Letters* **1998**, *81*, 1417-1420.

[100] P. Vorobieff, M. Rivera, R. E. Ecke; Soap film flows: Statistics of two-dimensional turbulence, *Physics of Fluids* **1999**, *11*, 2167-2177.

[101] C. Isenberg; *The Science of Soap Films and Soap Bubbles*, Dover Publications, New York, 1992.

[102] G. A. Cook; Tough Soap Films and Bubbles, *Journal of Chemical Education* **1938**, *15*, 161-166.

[103] A. L. Kuehner; New Tough Films and Bubbles, *Journal of Chemical Education* **1948**, *25*, 211-212.

[104] M. A. Rutgers, X. L. Wu, W. B. Daniel; Conducting fluid dynamics experiments with vertically falling soap films, *Review of Scientific Instruments* **2001**, *72*, 3025-3037.

[105] G. Lechner; Untersuchung der Turbulenz beim Durchströmen von Wasser und Quecksilber durch spiralförmig gewundene Kapillaren, *Annalen der Physik* **1913**, *347*, 614-642.

[106] N. G. McCormick, F. E. Feeherry, H. S. Levinson; Microbial Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene and Other Nitroaromatic Compounds, *Applied and Environmental Microbiology* **1976**, *31*, 949-958.

[107] R. J. Spanggord, B. W. Gibson, R. G. Keck, D. W. Thomas, J. J. Barkley; Effluent Analysis of Wastewater Generated in the Manufacture of 2,4,6-Trinitrotoluene. 1. Characterization Study, *Environmental Science & Technology* **1982**, *16*, 229-232.

[108] R. Haas; Rüstungsaltlasten - Einschätzung des Gefährdungspotentials auf dem Wasserpfad, *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **1992**, *4*, 352-354.

[109] F. Karg, G. Koss; Rüstungsaltlasten - Untersuchungen zur Umweltchemie, Kontaminationserkundung und -bewertung, *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **1993**, *5*, 182-189.

[110] U. Dornberger, T. Welsch; Explosivstoffe in Altlasten der Rüstungsproduktion, *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **1995**, *7*, 302-316.

[111] K. Schneider, M. Hassauer, F. Kalberlah; Toxikologische Bewertung von Rüstungsaltlasten, II: Bewertung der toxischen Potenz nitroaromatischer Schadstoffe - Berücksichtigung von Kombinationswirkungen, *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **1994**, *6*, 333-340.

[112] DIN Deutsches Institut für Normung e. V.; *DIN 32645; Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung*, Beuth Verlag GmbH, Berlin, 2008.

[113] E. Hecht; *Optik*, 5. Auflage, Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, München, 2009.

[114] F. M. Mirabella, Jr.; Internal Reflection Spectroscopy, *Applied Spectroscopy Reviews* **1985**, *21*, 45-178.

[115] F. M. Mirabella, Jr.; Strength of Interaction and Penetration of Infrared Radiation for Polymer Films in Internal Reflection Spectroscopy, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **1983**, *21*, 2403-2417.

[116] N. J. Harrick; Study of physics and chemistry of surfaces from frustrated total internal reflections, *Physical Review Letters* **1960**, *4*, 224-226.

[117] N. J. Harrick; Surface chemistry from spectral analysis of totally internally reflected radiation, *The Journal of Physical Chemistry* **1960**, *64*, 1110-1114.

[118] J. Fahrenfort; Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds, *Spectrochimica Acta* **1961**, *17*, 698-709.

[119] A. C. R. Pipino; Ultrasensitive Surface Spectroscopy with a Miniature Optical Resonator, *Physical Review Letters* **1999**, *83*, 3093-3096.

[120] A. C. R. Pipino; Monolithic folded resonator for evanescent wave cavity ringdown spectroscopy, *Applied Optics* **2000**, *39*, 1449-1453.

[121] A. M. Shaw, T. E. Hannon, F. Li, R. N. Zare; Adsorption of Crystal Violet to the Silica–Water Interface Monitored by Evanescent Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 7070-7075.

[122] T. E. Hannon, S. Chah, R. N. Zare; Evanescent-Wave Cavity Ring-Down Investigation of Polymer/Solvent Interactions, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 7435-7442.

[123] M. Mazurenka, L. Wilkins, J. V. Macpherson, P. R. Unwin, S. R. Mackenzie; Evanescent Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy in a Thin-Layer Electrochemical Cell, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 6833-6839.

[124] H.-F. Fan, C.-Y. Hung, K.-C. Lin; Molecular Adsorption at Silica/CH_3CN Interface Probed by Using Evanescent Wave Cavity Ring-Down Absorption Spectroscopy: Determination of Thermodynamic Properties, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 3583-3590.

[125] N. J. Harrick; Electric Field Strengths at Totally Reflecting Interfaces, *Journal of the Optical Society of America* **1965**, *55*, 851-856.

[126] N. J. Harrick, F. K. du Pré; Effective Thickness of Bulk Materials and of Thin Films for Internal Reflection Spectroscopy, *Applied Optics* **1966**, *5*, 1739-1743.

[127] N. J. Harrick, A. I. Carlson; Internal Reflection Spectroscopy: Validity of Effective Thickness Equations, *Applied Optics* **1971**, *10*, 19-23.

[128] N. J. Harrick; *Internal Reflection Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1967.

[129] A. C. R. Pipino, M. Michalski; Climbing the Vibrational Ladder To Probe the OH Stretch of HNO_3 on Silica, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 9442-9447.

[130] A. C. R. Pipino, J. P. M. Hoefnagels, N. Watanabe; Absolute surface coverage measurement using a vibrational overtone, *Journal of Chemical Physics* **2004**, *120*, 2879-2888.

[131] I. M. P. Aarts, A. C. R. Pipino, J. P. M. Hoefnagels, W. M. M. Kessels, M. C. M. van de Sanden; Quasi-Ice Monolayer on Atomically Smooth Amorphous SiO_2 at Room Temperature Observed with a High-Finesse Optical Resonator, *Physical Review Letters* **2005**, *95*, 166104.

[132] I. M. P. Aarts, A. C. R. Pipino, M. C. M. van de Sanden, W. M. M. Kessels; Absolute *in situ* measurement of surface dangling bonds during *a*-Si:H growth, *Applied Physics Letters* **2007**, *90*, 161918, 161911-161913.

[133] J. D. Fisk, R. Batten, G. Jones, J. P. O'Reilly, A. M. Shaw; pH Dependence of the Crystal Violet Adsorption Isotherm at the Silica–Water Interface, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 14475-14480.

[134] F. Li, R. N. Zare; Molecular Orientation Study of Methylene Blue at an Air/Fused-Silica Interface Using Evanescent-Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 3330-3333.

[135] H.-F. Fan, F. Li, R. N. Zare, K.-C. Lin; Characterization of Two Types of Silanol Groups on Fused-Silica Surfaces Using Evanescent-Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy, *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 3654-3661.

[136] M.-S. Chen, H.-F. Fan, K.-C. Lin; Kinetic and Thermodynamic Investigation of Rhodamine B Adsorption at Solid/Solvent Interfaces by Use of Evanescent-Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 868-877.

[137] J. P. O'Reilly, C. P. Butts, I. A. I'Anson, A. M. Shaw; Interfacial pH at an Isolated Silica−Water Surface, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 1632-1633.

[138] J. D. Fisk, M. Rooth, A. M. Shaw; Gold Nanoparticle Adsorption and Aggregation Kinetics at the Silica−Water Interface, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 2588-2594.

[139] M. Rooth, A. M. Shaw; pH-Controlled Formation Kinetics of Self-Assembled Layers of Thioctic Acid on Gold Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 15363-15369.

[140] M. Mazurenka, S. M. Hamilton, P. R. Unwin, S. R. Mackenzie; In-Situ Measurement of Colloidal Gold Adsorption on Functionalized Silica Surfaces, *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 6462-6468.

[141] M. Schnippering, H. V. Powell, M. Zhang, J. V. Macpherson, P. R. Unwin, M. Mazurenka, S. R. Mackenzie; Surface Assembly and Redox Dissolution of Silver Nanoparticles Monitored by Evanescent Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 15274-15280.

[142] M. Schnippering, H. V. Powell, S. R. MacKenzie, P. R. Unwin; Real-Time Monitoring of Polyaniline Nanoparticle Formation on Surfaces, *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 20221-20227.

[143] H. V. Powell, M. Schnippering, M. Mazurenka, J. V. Macpherson, S. R. Mackenzie, P. R. Unwin; Evanescent Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy as a Probe of Interfacial Adsorption: Interaction of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) with Silica Surfaces and Polyelectrolyte Films, *Langmuir* **2009**, *25*, 248-255.

[144] H. V. Powell, M. Schnippering, M. Cheung, J. V. Macpherson, S. R. Mackenzie, V. G. Stavros, P. R. Unwin; Probing Redox Reactions of Immobilized Cytochrome *c* Using Evanescent Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy in a Thin-Layer Electrochemical Cell, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2985-2991.

[145] L. van der Sneppen, J. B. Buijs, C. Gooijer, W. Ubachs, F. Ariese; Evanescent-Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy for Enhanced Detection of Surface Binding Under Flow Injection Analysis Conditions, *Applied Spectroscopy* **2008**, *62*, 649-654.

[146] W. B. Martin, S. Mirov, D. Martyshkin, R. Venugopalan, A. M. Shaw; Hemoglobin adsorption isotherm at the silica-water interface with evanescent wave cavity ring-down spectroscopy, *Journal of Biomedical Optics* **2005**, *10*, 024025.

[147] M. A. Everest, V. M. Black, A. S. Haehlen, G. A. Haveman, C. J. Kliewer, H. A. Neill; Hemoglobin Adsorption to Silica Monitored with Polarization-Dependent Evanescent-Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 19461-19468.

[148] L. van der Sneppen, C. Gooijer, W. Ubachs, F. Ariese; Evanescent-wave cavity ring-down detection of cytochrome c on surface-modified prisms, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *139*, 505-510.

[149] R. Haselberg, L. van der Sneppen, F. Ariese, W. Ubachs, C. Gooijer, G. J. de Jong, G. W. Somsen; Effectiveness of Charged Noncovalent Polymer Coatings against Protein Adsorption to Silica Surfaces Studied by Evanescent-Wave Cavity Ring-Down Spectroscopy and Capillary Electrophoresis, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 10172-10178.

[150] M. Zhang, H. V. Powell, S. R. Mackenzie, P. R. Unwin; Kinetics of Porphyrin Adsorption and DNA-Assisted Desorption at the Silica−Water Interface, *Langmuir* **2010**, *26*, 4004-4012.

[151] LAYERTEC GmbH, Mellingen, Deutschland, *Datasheet Part No. 102315, Laser Mirror - Low Loss (HR(0°,610-655±5nm)>99.98%, T(measurement) ~0.002%)*, http://www.layertec.de/de/shop/datasheet/102315, 30.05.2011.

[152] E. F. Vansant, P. Van Der Voort, K. C. Vrancken; *Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface*, Studies in Surface Science and Catalysis, Vol. 93, Elsevier B. V., Amsterdam, 1995.

[153] D. J. Tutas, R. Stromberg, E. Passagila; Studies of the Thicknesses of Adsorbed Glass Finishes by Ellipsometry, *SPE Transactions* **1964**, *4*, 256-262.

[154] X. Wang, *A New Biosensor with Femtomol Sensitivity*, Masterarbeit, Universität Ulm, Ulm, 2007.

[155] E. Klar, D. L. Heene; Fibronectin, *Klinische Wochenschrift* **1984**, *62*, 963-974.

[156] M. Stenberg, H. Nygren; Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces, *Journal of Immunological Methods* **1988**, *113*, 3-15.

[157] H. Nygren, M. Stenberg; Immunochemistry at interfaces, *Immunology* **1989**, *66*, 321-327.

[158] E.-M. Salonen, T. Vartio, V. Miggiano, C. Stähli, B. Tacács, G. Virgallita, G. De Petro, S. Barlati, A. Vaheri; A Rapid and Highly Sensitive Solid-Phase Enzyme Immunoassay Specific for Human Fibronectin Using a Characterized Monoclonal Antibody, *Journal of Immunological Methods* **1984**, *72*, 145-156.

[159] M. J. Gómez-Lechón, J. V. Castell; Measurement of Fibronectin in Human Body Fluids, *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **1986**, *24*, 333-340.

[160] J. Kropf, E. Quitte, A. M. Gressner; Time-Resolved Immunofluorometric Assays with Measurement of a Europium Chelate in Solution: Application for Sensitive Determination of Fibronectin, *Analytical Biochemistry* **1991**, *197*, 258-265.

[161] T. Körner, J. Kropf, R. Hackler, A. Brenzel, A. M. Gressner; Fibronectin in Human Bile Fluid for Diagnosis of Malignant Biliary Diseases, *Hepatology* **1996**, *23*, 423-428.

[162] R. L. Wimalasena, G. S. Wilson; Factors affecting the specific activity of immobilized antibodies and their biologically active fragments, *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **1991**, *572*, 85-102.

[163] C. L. Orthner, F. A. Highsmith, J. Tharakan, R. D. Madurawe, T. Morcol, W. H. Velander; Comparison of the performance of immunosorbents prepared by site-directed or random coupling of monoclonal antibodies, *Journal of Chromatography* **1991**, *558*, 55-70.

[164] Y. Jung, J. Y. Jeong, B. H. Chung; Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports, *Analyst* **2008**, *133*, 697-701.

[165] M. Riedmann; Flüssige Siliconphasen für die Gas-Chromatographie, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* **1972**, *260*, 341-344.

[166] T. Welsch, K. Welsch, G. Vigh, W. Engewald; Kapillar-Gaschromatographie mit immobilisierten Silikonphasen, *Wissenschaftliche Zeitschrift der Karl-Marx-Universität Leipzig, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Reihe* **1986**, *35*, 50-61.

[167] K. K. Karukstis, A. V. Gulledge; Analysis of the Solvatochromic Behavior of the Disubstituted Triphenylmethane Dye Brilliant Green, *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 4212-4217.

[168] A. G. Fogg, A. Willcox, D. T. Burns; Changes in Absorbance Values of Solutions of Brilliant Green After Initial Dissolution of the Solid: Precaution to be Taken in its Use as a Colorimetric Reagent, *Analyst* **1976**, *101*, 67-69.

[169] K. Norrman, A. Ghanbari-Siahkali, N. B. Larsen; Studies of spin-coated polymer films, *Annual Reports on the Progress of Chemistry, Section C: Physical Chemistry* **2005**, *101*, 174-201.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Welsch und meinem Co-Betreuer Prof. Dr. Harold Jones für die Möglichkeit, an einem äußerst vielseitigen und interessanten Thema an der Schnittstelle von Laserspektroskopie, Biosensorik sowie den klassischen analytischen Trenntechniken zu forschen. Mit ihrer hervorragenden Betreuung und Unterstützung, ihrem großen fachlichen Wissen und ihrer Diskussionsbereitschaft haben sie sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin danke ich Prof. Welsch für die Gelegenheit, auf den Tagungen in Münster und Dresden sowie der GDCh-Sommerschule in Berlin, mit anderen Wissenschaftlern ins Gespräch zu kommen und dabei über das eigene Fachgebiet hinauszuschauen und Neues zu entdecken.

Bei Dr. Elisabeth Santos und Prof. Dr. Wolfgang Schmickler bedanke ich mich für die Bereitschaft, mir nach der Pensionierung von Prof. Jones weiterhin das Laserlabor und das benötigte Equipment für meine Forschungen zur Verfügung zu stellen sowie für das Ermöglichen eines Forschungsaufenthalts an der Universität Manchester. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Robert Dryfe für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und seine Betreuung sowie bei Jeffrey Martin, Huong Ho, Matej Velicky und Daniela Plana für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung und, nicht zu vergessen, einen großartigen Pub Crawl bedanken.

Den Mitgliedern des Instituts für Analytische und Bioanalytische Chemie sei Dank gesagt für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen schönen Erlebnisse während der gemeinsamen Zeit. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Ulrich Reuter für die vielen fesselnden Gespräche, bei Dipl.-Ing. Michael Elsner für die von ihm durchgeführten Reparaturen an Geräten, die jeder andere schon längst aufgegeben hätte, bei Dr. Melanie Haugg für die gemeinsamen Joggingstunden als Ausgleich zum Unialltag, bei Dr. Christoph Schmidtkunz für das Korrekturlesen diverser Abstracts und Anträge, bei Prof. Dr. Boris Mizaikoff und Dr. Christine Kranz für ihre Unterstützung und natürlich bei Sandra Gienger als guter Seele des Instituts, bedanken.

Meinem Laborkollegen Xiaofeng Wang möchte ich danke sagen für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die Unterstützung durch zahlreiche Diskussionen über Meßaufbauten und -ergebnisse sowie die gewährten Einblicke in die chinesische Kultur und Mentalität.

Dr. Michael Hinz und PD Dr. Dieter Kaufmann danke ich für ihre Unterstützung bei der Funktionalisierung von Oberflächen mit Biomolekülen sowie beim Labeling von Proteinen.

Ein Dank gehört auch meinen Projektarbeitern Vladimir Valter, Joachim Mall, Charlotte Steinbach, Florian Rauh, Andreas Hartmann, Sylvia Flaig, Andrea Feinle, Stefan Eppler, Christian Müller, Johannes Ruf, Steffen Schlüter, Xin Qi und Tanmay Pradhan für ihre im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Christina Nell möchte ich danke sagen für die graphische Darstellung der Modenformen verschiedener transversaler Resonatormoden.

Den Mitarbeitern der Wissenschaftlichen Werkstatt Feinwerktechnik der Universität Ulm, insbesondere Wolfgang Rapp, Martin Feierabend, Konstantin Kraft und Katharina Seibel danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihren Rat beim Erstellen verschiedenster Meßzellen und Apparaturen sowie ihre Geduld bei oft vielen Änderungswünschen, die am besten schon gestern umgesetzt sein sollten.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium und diese Arbeit ermöglicht haben.

Und natürlich Cornelia Weber. Danke für deine Geduld, deine Unterstützung und deine Lebensfreude. Danke, daß du mich jeden Tag daran erinnerst, was wirklich wichtig ist im Leben.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schema der gepulsten Cavity-Ring-Down-Spektroskopie…… 11

Abbildung 2.2: Modenformen verschiedener transversaler Resonatormoden…….. 14

Abbildung 2.3: Aufbau hochreflektierender dielektrischer Spiegel…… 15

Abbildung 2.4: Schematische Beschreibung des Prinzips der gepulsten CRDS…… 17

Abbildung 2.5: Abklingkurven eines optischen Resonators……. 20

Abbildung 3.1: Geometrien zum Einbringen einer flüssigen Phase in der Resonator…….. 26

Abbildung 3.2: CRDS-Meßaufbau zur Detektion in analytischen Trennsystemen……... 29

Abbildung 3.3: Drahtschleife zum Aufspannen des Tensidfilms in der Ring-Down-Cavity.. 33

Abbildung 3.4: Meßaufbau zur Generierung eines frei fließenden Tensidfilms innerhalb des optischen Resonators…… 34

Abbildung 3.5: Trennung eines Nitroaromatengemischs, Auftragung der Ring-Down-Zeit gegen die Zeit…… 38

Abbildung 3.6: Trennung eines Nitroaromatengemischs, Auftragung der aus den Ring-Down-Zeiten erhaltenen Extinktion gegen die Zeit…… 39

Abbildung 3.7: Kalibrierkurve für Pikrinsäure im Bereich von 200-670 µmol/L…… 40

Abbildung 4.1: Allgemeiner Meßaufbau für Evanescent-Wave-CRDS-Messungen……. 53

Abbildung 4.2: Strahlengang innerhalb der Ring-Down-Cavity……. 55

Abbildung 4.3: Meßaufbau mit statischer Meßzelle……... 56

Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der auf der Prismenoberfläche immobilisierten polyklonalen Antikörper gegen Fibronektin……... 61

Abbildung 4.5: Prisma ohne Beschichtung, Änderung der Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der DY-631-NHS-Massenkonzentration in der statischen Meßzelle……. 63

Abbildung 4.6: Prismaoberfläche funktionalisiert mit Aminopropylketten, Änderung der Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der DY-631-NHS-Konzentration in der statischen Meßzelle…….. 64

Abbildung 4.7: Prismaoberfläche funktionalisiert mit Antikörpern gegen Fibronektin, Änderung der Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration des mit DY-631 gelabelten Fibronektins in der statischen Meßzelle…….. 66

Abbildung 4.8: Extinktion in Abhängigkeit der Massenkonzentration des gelabelten Fibronektins im Bereich von β = 248-1415 ng/mL in einer, auf der mit Antikörpern gegen Fibronektin gelabelten Grenzfläche installierten, statischen Meßzelle…….. 69

Abbildung 4.9: Prismaoberfläche ohne Antikörper, Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration des mit DY-631 gelabelten Fibronektins in der statischen Meßzelle……. 70

Abbildung 4.10: Meßaufbau mit installierter Durchflußzelle……. 71

Abbildung 4.11: Prismaoberfläche funktionalisiert mit Antikörpern gegen Fibronektin. Änderung der Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration des mit DY-631 gelabelten Fibronektins in der Durchflußzelle…….. 72

Abbildung 4.12: Extinktion in Abhängigkeit der Massenkonzentration des mit DY-631 gelabelten Fibronektins im Bereich von β = 194-1114 ng/mL in einer, auf der mit Antikörpern gegen Fibronektin gelabelten Prismaoberfläche installierten, Durchflußzelle…… 73

Abbildung 4.13: Verlauf der Ring-Down-Zeit während der Beschichtung der TIR-Grenzfläche mit einer SE-54-Polysiloxanschicht……. 78

Abbildung 4.14: Prismaoberfläche ohne Polysiloxanschicht, Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration der Brillantgrün-Lösung in der Durchflußzelle…….. 80

Abbildung 4.15: Prismaoberfläche mit SE-54-Film, Ring-Down-Zeit in Abhängigkeit der Konzentration der Brillantgrün-Lösung in der Durchflußzelle…… 82

Abbildung 4.16: Extinktion in Abhängigkeit der Brillantgrünkonzentrationen $c = 10^{-9}$ mol/L, $c = 10^{-8}$ mol/L und $c = 10^{-7}$ mol/L in einer, auf der mit SE-54 beschichteten Prismaoberfläche installierten, Durchflußzelle……. 83

Tabellen- und Schemataverzeichnis

Tabelle 2.1: Materialien zur Beschichtung von hochreflektierenden dielektrischen Spiegeln……... 16

Tabelle 2.2: Optische Weglänge des Resonators in Abhängigkeit des Reflexionsgrads der Spiegel…….. 19

Tabelle 3.1: Stabilität und optische Qualität des Tensidfilms bei Verwendung von SDS mit einer Reinheit von 99 % bezogen auf den Gesamtalkylsulfatgehalt…….. 31

Tabelle 3.2: Stabilität und optische Qualität des Tensidfilms bei Verwendung von SDS mit einer Reinheit von 95 % bezogen auf den Gesamtalkylsulfatgehalt…….. 32

Tabelle 3.3: Strukturen der mit Hilfe der HPLC getrennten Nitroaromaten……. 37

Tabelle 3.4: Bestimmung der Schichtdicke d des aufgespannten Tensidfilms……. 38

Tabelle 4.1: Ring-Down-Zeiten der Deckgläser nach der Funktionalisierung mit Aminopropylgruppen……... 59

Tabelle 4.2: Nachweisbare Brillantgrünkonzentration in Abhängigkeit der Massenkonzentration der bei der Beschichtung verwendeten SE-54-Lösung….. 81

Schema 4.1: Hydrolyse von 3-(Trimethoxysilyl)propylamin und anschließende Kondensation zu Oligo- und Polysilanolen……... 57

Schema 4.2: Reaktion der Oligo- und Polysilanole mit der Prismaoberfläche (vereinfacht).. 58

Schema 4.3: Anbindung von Divinylsulfon als Spacermolekül an die auf der Oberfläche vorhandenen Aminopropylgruppen…….. 60

Schema 4.4: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs DY-631-NHS……. 62

Abkürzungsverzeichnis

AB	antibody (Antikörper)
AG	Antigen
BG	Brillantgrün
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CAPS	Cavity-Attenuated-Phase-Shift-Spektroskopie
CE	capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CRDS	Cavity-Ring-Down-Spektroskopie
CRLAS	cavity ring-down laser absorption spectroscopy (Cavity-Ring-Down-Laserabsorptionsspektroskopie)
CW	continuous wave (Dauerstrich-)
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DVS	Divinylsulfon
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EW	evanescent wave (evaneszente Welle)
FSB	freier Spektralbereich
GPIB	General Purpose Interface Bus

HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HR	hochreflektierend
IRS	internal reflection spectroscopy (Totalreflexionsspektroskopie)
LIF	laserinduzierte Fluoreszenz
MEKC	mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie
MS	Massenspektrometrie
Nd:YAG	neodymdotierter Yttrium-Aluminium-Granat
OPO	optisch parametrischer Oszillator
PAK	polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PBS	phosphate buffer saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
ppb	parts per billion (Teile pro Milliarde)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
TEM	transversale elektromagnetische Mode
TIR	total internal reflection (Totalreflexion)
UV	ultraviolett
UV/Vis	ultraviolet/visible (ultraviolett/sichtbar)

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht.

Artikel in Fachzeitschriften

M. Vogelsang, T. Welsch, H. Jones; A Free-Flowing Soap Film Combined with Cavity Ring-down Spectroscopy as a Detection System for Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 3316-3320.

X. Wang, M. Hinz, M. Vogelsang, T. Welsch, D. Kaufmann, H. Jones; A new approach to detecting biologically active substances with evanescent-wave cavity ring-down spectroscopy, *Chemical Physics Letters* **2008**, *467*, 9-13.

Konferenzbeiträge

M. Vogelsang, H. Jones, T. Welsch; A Free Flowing Soap Film for Cavity Ring-Down Detection in Liquid Chromatography, Poster, *34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Dresden, Deutschland, 28. Juni-02. Juli 2009.

M. Vogelsang, H. Jones, T. Welsch; Cavity ring-down detection in a free flowing soap film: a new approach to liquid chromatography, Poster, *27th International Symposium on Chromatography*, Münster, Deutschland, 21.-25. September 2008.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ulm, den 07. Juni 2011

_____

Markus Vogelsang