
Aufbau eines Oberflächenplasmonenresonanz- Biosensors

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades
eines Diplomphysikers

vorgelegt von:

Sebastian Horstmeier,
geboren in Bünde

Fakultät für Physik

Universität  Bielefeld

31. März 2008

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt zu haben.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Bielefeld, 31. März 2008

Unterschrift

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Günther Reiss

Abgabedatum der Arbeit: 31. März 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Theoretische Grundlagen	10
2.1	Evaneszente Felder	10
2.2	Oberflächenplasmonpolaritonen	14
2.2.1	Dispersionsrelation von Oberflächenplasmonpolaritonen	15
2.2.2	Anregung von Oberflächenplasmonpolaritonen, Oberflächenplasmonenresonanz	18
2.2.3	Dämpfung und Eindringtiefen der Oberflächenplasmonen	24
2.2.4	Reflexionsgrad einer Schichtfolge	26
2.2.5	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	29
2.3	Adsorptionskinetik	33
2.3.1	Kinetik pseudo-erster Ordnung	37
2.3.2	Weitere Kinetik-Modelle	39
2.3.3	Thermodynamische Betrachtung der Reaktionsraten	45
2.3.4	Einfluss von Massentransport-Effekten	47
2.4	Analyt-Transport in Flusszellen	48
3	Messaufbau	52
3.1	Messprinzip	53
3.2	Komponenten des Messaufbaus	58
3.2.1	Laser	58
3.2.2	Aufweitung und Fokussierung	60
3.2.3	ATR-Koppler	62
3.2.4	Detektor	64
3.2.5	Goldschichten	65
3.2.6	Flusszelle	70
4	Messergebnisse und Diskussion	73

5 Zusammenfassung und Ausblick	77
A Literaturverzeichnis	79
B Abbildungsverzeichnis	86
C Danksagung	88

1 Einleitung

R.W. Wood dokumentierte in seiner Arbeit [Woo02] von 1902 die Beobachtung dunkler Linien im Spektrum des von einem metallischen Beugungsgitter reflektierten, polychromatischen Lichts. Ohne es zu wissen, beschrieb er als erster das Phänomen der Oberflächenplasmonen. Er selbst führte die Beobachtungen auf Anomalien zurück.

Im Jahre 1909 entwickelten Philip Lenard und Arnold Sommerfeld in ihrer Arbeit [LS09] das Modell der elektromagnetischen Oberflächenwellen, die Lösungen der Maxwell'schen Gleichungen darstellen.

U. Fano erklärte 1941 theoretisch die Beobachtungen von Wood und stellte den Zusammenhang zu der Anregung von elektromagnetischen Oberflächenwellen her [Fan41].

Dieses Prinzip der Oberflächenwellen verwendete Rufus H. Ritchie 1957 in seiner Arbeit [Rit57], um den Energieverlust von schnellen Elektronen zu erklären, die durch eine Metallfolie geschossen werden.

Nochmal drei Jahre dauerte es, bis E. A. Stern und R. A. Ferrell 1960 die Resonanzbedingungen für Oberflächenwellen herleiteten [SF60] und ihnen die Bezeichnung „Oberflächenplasmonen“ gaben.

Auf Andreas Otto geht die erste experimentelle Realisierung der Anregung von Oberflächenplasmonen im Jahre 1968 zurück [Ott68]. Im gleichen Jahr stellten auch Heinz Raether und Erwin Kretschmann ihre Methode vor, Oberflächenplasmonen zu erzeugen [KR68].

Basierend auf der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie¹ lassen sich Sensoren bauen, die Stoffe schon bei sehr geringen Konzentrationen detektieren können, wie z. B. ein empfindlicher Sensor zum Nachweis von Gasen. Aufgrund der sehr guten Wasserstoffaufnahme-fähigkeit von Palladium und der damit verbundenen Änderung der dielektrischen Eigenschaften lässt sich mit einer Palladiumschicht ein Wasserstoffsensoren bauen [Mor01].

Auch in anderen Bereichen kann die SPRS eingesetzt werden, um empfindliche Sensoren zu konstruieren. Unter Ausnutzung der Änderung des Brechungsindex von dünnen, porösen Filmen oder Polymeren bei Änderung der Feuchtigkeit kann ein Feuchtigkeitssensoren

¹im Folgenden mit SPRS abgekürzt, SPRS = *engl.* Surface Plasmon Resonance Spectroscopy

sensor konstruiert werden [WSG96].

Mit Hilfe des temperaturabhängigen thermooptischen Effekts von hydrogenisierten, amorphen Silizium lässt sich ein Temperatur-Sensor realisieren [HYG99].

Seit den frühen 1980er Jahren entwickelte sich durch die richtungsweisenden Arbeiten von Nylander et al. und Liedberg et al. [LNL83] [LMR⁺91] [LLS93] die SPRS zu einer Technik, die hervorragend geeignet ist, biomolekulare Reaktionen zu untersuchen. Biomolekulare Reaktionen können in Echtzeit untersucht werden, ohne dabei die Reaktionspartner in irgendeiner Weise (z. B. durch Farbstoff-Moleküle oder radioaktive Elemente) zu markieren.

Konformationsänderungen von Proteinen sind durch SPRS ebenfalls detektierbar [SyHI98]. Im Jahre 1994 wurde von Lundström et al. [Lun94] die erste Arbeit publiziert, in der SPRS als Basis für die Echtzeitanalysemethode von biospezifischen Wechselwirkungen dient. Seitdem wird diese Methode häufig genutzt und stetig weiterentwickelt, um kinetische und thermodynamische Konstanten biomolekularer Reaktionen zu bestimmen [HYG99].

Frühere Arbeiten beschäftigten sich hauptsächlich mit Antigen/Antikörper-Wechselwirkungen, der Streptavidin/Biotin-Reaktion oder Untersuchungen von Glykoproteinen, wie z. B. Immunglobulin G, das von den B-Lymphozyten nach Kontakt mit einem Antigen produziert wird und als Teil der Immunantwort eines Lebewesens gilt [HYG99].

Dubs et al. untersuchten die Wechselwirkung von Viren und monoklonalen Antikörpern mit SPRS und konnten so Aussagen über konformationelle Zustände der Viren machen [DAvR91]. Ein weiteres Beispiel für eine Anwendung ist die Untersuchung von sequenzabhängigen Bindungen von rekombinanten Onkoproteinen an DNA, die Fischer et al. in ihrer Arbeit [FFCFea94] durchführten.

Durch die Möglichkeiten, Protein/Protein- bzw. Protein/DNA - Wechselwirkungen zu untersuchen, ist die SPRS eine wichtige Methode in der Erforschung und Bekämpfung von Krankheiten geworden.

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau eines nicht kommerziellen, hochauflösenden SPR-Biosensors, der Weiterentwicklungen und Anpassungen auf bestimmte Problemstellungen ermöglicht und somit die biomolekularen Untersuchungsmethoden erweitert.

Diese Arbeit ist in sechs Kapitel eingeteilt. Nach der Einleitung folgt der theoretische Hintergrund der Arbeit. Ausgehend von der Theorie evaneszenter Felder wird die theoretische Beschreibung der Oberflächenplasmonen erläutert. Im Anschluss daran wird die Theorie der Adsorptionskinetik sowie der Einfluss von Transporteffekten in einer Flusszelle beschrieben. Kapitel Drei befasst sich mit dem experimentellen Aufbau. Zunächst wird das Messprinzip erklärt. Daraufhin werden die Komponenten sowie der Aufbau dargestellt. In Kapitel Vier werden die Ergebnisse der Experimente vorgestellt

und diskutiert. Kapitel Fünf enthält eine Zusammenfassung der Arbeit. Ein Ausblick auf zukünftige Entwicklungsmöglichkeiten wird gegeben.

In dieser Arbeit sind vektorielle Größen durch fettgedruckte Buchstaben (z. B. ***E*** oder ***H***) gekennzeichnet. Desweiteren wird in dieser Arbeit durchgehend das SI-Einheitensystem benutzt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Evaneszente Felder

Oberflächenplasmonpolaritonen sind Elektronendichteoszillationen, die mit evaneszenten, elektromagnetischen Feldern gekoppelt sind und durch solche Felder resonant erzeugt werden können. Daher wird zunächst auf die Theorie der evaneszenten Felder eingegangen.

Im Jahre 1864 veröffentlichte James Clerk Maxwell seine Arbeiten über die Dynamik elektromagnetischer Felder, die unter anderem die nach ihm benannten Gleichungen enthielten. Aus diesen ging hervor, dass elektromagnetische Wellen existieren, die sich mit einer Geschwindigkeit, die sehr nahe der an der damals angenommenen Lichtgeschwindigkeit lag, ausbreiten. Diese Tatsache ließ Maxwell vermuten, dass Licht ein elektromagnetisches Wellenphänomen sei. Vierundzwanzig Jahre später (1888) publizierte Heinrich Hertz die experimentelle Entdeckung der elektromagnetischen Wellen, die sich mit der Lichtgeschwindigkeit ausbreiten und bestätigte somit die Maxwellsche Theorie experimentell. [Jac06]

Nach der Erklärung des Photoeffektes durch Albert Einstein im Jahre 1905 (Nobelpreis für diese Arbeit im Jahre 1921) und der damit einhergehenden Theorie der Lichtteilchen (Photonen), wird Licht sowohl Wellen- als auch Teilchencharakter zugeschrieben.

Im Folgenden soll Licht als elektromagnetische Welle angesehen werden.[BR05]

Es sei

$$\mathbf{E}_i(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_{i0} \cdot e^{i(\mathbf{k}_i \cdot \mathbf{r} - \omega \cdot t)} \quad (2.1)$$

$$= \mathbf{E}_{i0} \cdot e^{i \mathbf{k}_{i\parallel} \cdot \mathbf{r}_{\parallel}} \cdot e^{i(k_{iz} \cdot z - \omega \cdot t)} \quad (2.2)$$

der elektrische Anteil einer ebenen, elektromagnetischen Welle, die von einem optischen Medium 1 in ein optisches Medium 2 fällt. Die Flächennormale der Grenzfläche zwischen den beiden Medien sei parallel zur z -Achse des Koordinatensystems, die Grenzfläche liegt somit in der xy -Ebene.

Mit \mathbf{k} sei der Wellenvektor der ebenen Welle gemeint. Des Weiteren sei \mathbf{k}_{\parallel} der zweidimensionale Wellenvektor mit k_x und k_y als Komponenten. Mit \mathbf{r} ist der dreidimensionale Ortsvektor gemeint, \mathbf{r}_{\parallel} sei der zweidimensionale Ortsvektor mit x und y als Komponenten. Der Index \parallel beschreibt die Parallelität der Vektoren zur xy -Achse. ω ist die Kreisfrequenz des Lichts.

Im Folgenden soll angenommen werden, dass die Medien nicht magnetisch seien und ihre magnetischen Permeabilitäten μ eins sind.[BR05]

Die beiden homogenen und isotropen Medien werden dann nur durch ihre Dielektrizitätszahlen ε_1 und ε_2 charakterisiert, die im Allgemeinen keine Konstanten, sondern komplexwertige Funktionen der Lichtwellenlänge sind. Sie hängen mit dem Brechungsindex der Medien in folgender Weise zusammen:

$$n_i^2 = \varepsilon_i, \quad i = 1, 2 \quad (2.3)$$

Die einfallende Lichtwelle wird gemäß Abbildung (2.1) in zwei Anteile aufgespalten. Der eine Anteil wird an der Grenzfläche reflektiert. Der andere Anteil passiert die Grenzfläche und wird an ihr gebrochen. Aufgrund der Homogenität entlang der Grenzfläche ändern sich die parallel zur Grenzfläche gerichteten Komponenten der Wellenvektoren aller Anteile nicht. Es gilt somit

$$\mathbf{k}_{i\parallel} = \mathbf{k}_{r\parallel} = \mathbf{k}_{t\parallel} . \quad (2.4)$$

Dabei sind i, r und t die Indizes, die die einfallenden, reflektierten und transmittierten Wellenanteile beschreiben (vgl. Abbildung (2.1)).

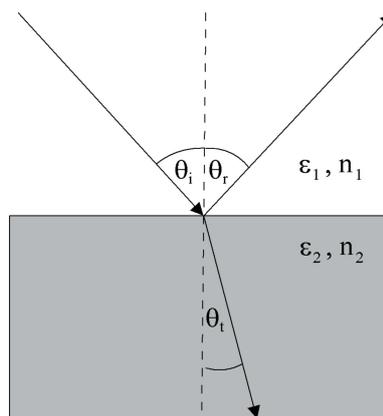


Abbildung 2.1: *Reflexion und Brechung an der Grenzfläche zweier Medien, in diesem Fall ist $n_1 < n_2$*

Die Beträge der Wellenvektoren in den Medien 1 und 2 sind

$$k_i = k_r = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_1} = \frac{\omega}{c} n_1 \quad (2.5)$$

und

$$k_t = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_2} = \frac{\omega}{c} n_2 \quad (2.6)$$

mit der Lichtgeschwindigkeit c und den Brechungsindizes n_1 und n_2 der optischen Medien 1 und 2.

Die zur Grenzfläche parallel gerichteten Komponenten des Wellenvektors berechnen sich gemäß

$$k_{i\parallel} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_1} \sin \theta_i = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_1} \sin \theta_r = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_2} \sin \theta_t . \quad (2.7)$$

Die z -Komponenten berechnen sich gemäß

$$k_{rz} = -k_{iz} = -\frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_1} \cos \theta_i \quad (2.8)$$

und

$$k_{tz} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_2 - \varepsilon_1 \sin^2 \theta_i} . \quad (2.9)$$

Aus den Beziehungen (2.4) bis (2.9) folgen die Gesetze von Snellius für die Reflexion und Brechung:

$$\theta_i = \theta_r \quad (2.10)$$

und

$$\frac{\sin \theta_t}{\sin \theta_i} = \sqrt{\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2}} = \frac{n_1}{n_2} . \quad (2.11)$$

Für den Fall, dass das Licht aus einem optisch dichteren Medium in ein optisch dünneres Medium fällt und somit $n_1 > n_2$ ist, folgt aus Gleichung (2.11), dass Brechung nur bis zu einem bestimmten Einfallswinkel möglich ist. Bei diesem Einfallswinkel ist der Brechungswinkel $\theta_t = 90^\circ$. Dieser Einfallswinkel wird kritischer Winkel genannt und soll im Folgenden mit θ_c benannt werden.

Bei Einfallswinkeln größer als der kritische Winkel θ_c findet keine Brechung mehr statt. Alle Lichtwellen werden an der Grenzfläche reflektiert. Dieses Phänomen wird Totalre-

flexion¹ genannt .

Der kritische Winkel θ_c berechnet sich aus dem Brechungsgesetz von Snellius (Gleichung (2.11)) für $\theta_t = 90^\circ$ zu

$$\theta_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1} . \quad (2.12)$$

Ist der Einfallswinkel θ_i größer als der kritische Winkel θ_c , so wird die z -Komponente des Wellenvektors der gebrochenen Lichtwelle k_{tz} gemäß Gleichung (2.9) imaginär. Der durch die Grenzfläche transmittierte Anteil wird mit diesem imaginären Wellenvektor in z -Richtung durch folgenden Ausdruck beschrieben:

$$\mathbf{E}_t(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_{t0} \cdot e^{-\kappa z} \cdot e^{i\mathbf{k}_{\parallel} \cdot \mathbf{r}_{\parallel}} \cdot e^{-i\omega t} . \quad (2.13)$$

Dabei ist

$$\kappa = \Im k_{tz} = \frac{\omega}{c} \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_i - n_2^2} \quad (2.14)$$

der imaginäre Anteil der z -Komponente des Wellenvektors der transmittierten Welle. Gleichung (2.13) beschreibt eine Welle, die entlang der Grenzfläche propagiert und deren Amplitude in z -Richtung mit zunehmenden Abstand von der Grenzfläche exponentiell proportional zu $e^{-\kappa z}$ abnimmt. Dieses exponentielle Abklingen stellt jedoch keine Wellenbewegung dar. Mit ihr ist kein Energietransport verbunden. Die gesamte Energie, die mit der einfallenden Welle einstrahlt, wird an der Grenzfläche reflektiert.

Die Eindringtiefe δ dieser Lichtwelle in das Medium 2, bei der die Amplitude der Welle auf $\frac{1}{e}$ abgefallen ist, berechnet sich nach

$$\delta = \frac{1}{\kappa} = \frac{\lambda}{2\pi} \cdot \frac{1}{\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_i - n_2^2}} . \quad (2.15)$$

Die Größenordnung der Eindringtiefe δ liegt im Bereich der Wellenlänge λ . Die Welle dringt also nur auf eine sehr kurze Distanz in Medium 2 ein und „verschwindet“ sehr schnell. Wellen mit einer solchen Charakteristik werden *evaneszente Wellen*² genannt [BR05].

Der magnetische Anteil der elektromagnetischen Welle ergibt sich aus der Maxwellschen Gleichung

$$-\mu_0 \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t} = \nabla \times \mathbf{E} . \quad (2.16)$$

¹ engl. Total Internal Reflection, TIR

²evaneszent = dahinschwindend

Daraus lässt sich der Poynting-Vektor $\mathbf{S} = \mathbf{E} \times \mathbf{H}$ berechnen, der die Energieflussdichte einer elektromagnetischen Welle beschreibt und in die Richtung des Energieflusses zeigt. Aus ihm ist zu erkennen, dass die Komponente parallel zu Grenzfläche immer in die positive x -Richtung zeigt. In positive x -Richtung ist also ein Energiefluss zu beobachten. Die Komponente des Poyntingvektors senkrecht zur Grenzfläche ändert periodisch das Vorzeichen. Im Mittel ist der Energiefluss also Null.[Som64]

2.2 Oberflächenplasmonpolaritonen

Oszillationen der Elektronendichte von Elektronengasen in Metallen, die sich longitudinal in Grenzflächen von Metallen und Dielektrika mit einer Frequenz im spektralen bzw. nahen infraroten Bereich ausbreiten (siehe Abbildung (2.2)), werden Oberflächenplasmawellen genannt. [Ott68],[KR68],[Rae88],[ZSM05],[AM82] [AD07]

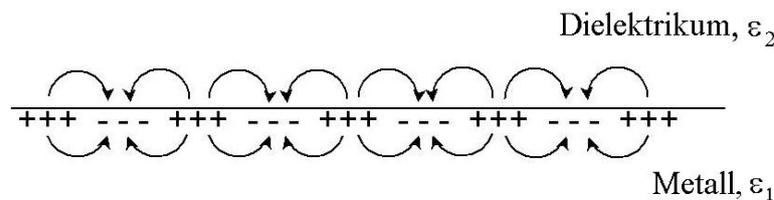


Abbildung 2.2: *Oberflächenplasmawelle und resultierendes elektrisches Feld an einer Metall/Dielektrikum Grenzfläche*

Solche Oberflächenplasmawellen werden außerhalb des Metalls von evaneszenten, elektromagnetischen Feldern begleitet, die mit der Frequenz der Elektronendichteoszillation oszillieren und in der Oberfläche ihre maximale Amplitude besitzen. Mit zunehmenden Abstand zur Oberfläche fällt diese, dem evaneszenten Charakter entsprechend, exponentiell ab.

Die Kopplung der Oberflächenplasmawelle und des elektromagnetischen Feldes wird durch Quasiteilchen, die sogenannten Oberflächenplasmonpolaritonen³ beschrieben. Diese können „als hybride Zustände von Elektronenoszillationen im Metall (dort als hochfrequenter elektrischer Strom) und elektromagnetischen Feldern außerhalb des Metalls (mit der Frequenz von Licht) verstanden werden“ [AD07].

Sei $\mathbf{k} = (k_x, k_y, k_z)$ der Wellenvektor der SPPen. Die Grenzfläche zwischen dem Metall und einem Dielektrikum liegt in der xy -Ebene eines kartesischen Koordinatensystems. In dieser Grenzfläche sollen sich die SPPen bewegen. Die y -Komponente des Wellenvektors sei ohne Beschränkung der Allgemeinheit und aus Gründen der Einfachheit Null. In

³ engl. Surface Plasmon Polariton, SPP

z -Richtung zeigen sie den für eine evaneszente Welle charakteristischen, exponentiellen Abfall der Amplitude. Dies wird durch die imaginäre z -Komponente des Wellenvektors mathematisch beschrieben. Die Beträge der elektrischen Komponente des elektromagnetischen Feldes in den einzelnen Bereichen seien durch folgende Ausdrücke gegeben:

$$E_D = E_0^D \cdot e^{ik_z z} \quad \text{für } z > 0 \quad (2.17)$$

$$E_G = E_0^G \cdot e^{i(k_x x - \omega t)} \quad \text{für } z = 0 \quad (2.18)$$

$$E_M = E_0^M \cdot e^{-ik_z z} \quad \text{für } z < 0. \quad (2.19)$$

Dabei sind E_D das elektrische Feld im Dielektrikum, E_G das elektrische Feld in der Grenzfläche und E_M das elektrische Feld im Metall. E_0^i mit $i = D, G, M$ sind die Amplituden der elektrischen Felder. k_x und k_z sind die x - bzw. die z -Komponente des Wellenvektors, wobei die z -Komponente eine imaginäre Größe ist (siehe Kap. 2.2.1). Dies bewirkt den exponentiellen Abfall der Amplitude mit zunehmender Entfernung von der Grenzfläche, sowohl in positive als auch in negative z -Richtung.

Die x -Komponente k_x ist eine komplexe Größe (siehe Kap. 2.2.2) und besteht somit aus einem Real- und einem Imaginärteil. Daher beschreibt Ausdruck (2.18) eine propagierende Welle, die sich in der Grenzfläche mit einer Kreisfrequenz ω ausbreitet. Diese Bewegung ist jedoch gedämpft, was sich mathematisch durch den Imaginärteil von k_x bemerkbar macht. Diese Dämpfung wird innere Dämpfung genannt. Sie resultiert aus der Tatsache, dass das elektromagnetische Feld der SPPen Elektron-Loch-Paare am Fermi-Niveau anregt. Die darauf folgende Abregung generiert Phononen, deren Energie dann in Wärme umgewandelt wird. Ist diese Energie größer als die Austrittsarbeit des Metalls, so kann die Emission von Photoelektronen beobachtet werden. [Rae88]

Der Wellenvektor der SPPen lässt sich schreiben als $\mathbf{k} = (k_x, 0, k_z)$. Der Betrag von \mathbf{k} ist abhängig von der Wellenlänge der Plasmawelle λ_P :

$$|\mathbf{k}| = \frac{2\pi}{\lambda_P}. \quad (2.20)$$

2.2.1 Dispersionsrelation von Oberflächenplasmonpolaritonen

Der Zusammenhang zwischen dem Wellenvektor \mathbf{k} und der Kreisfrequenz ω der SPPen wird durch ihre Dispersionsrelation beschrieben. Sie stellt bestimmte Bedingungen für die Erzeugung von SPPen.

Sie lässt sich nach [Rae88] für eine Grenzfläche zweier semi-unendlicher Medien, wobei

ein Medium ein Metall ist, folgendermaßen herleiten:

Seien

$$\mathbf{H}_D = (0, H_y^D, 0) \cdot e^{i(k_x^D x - \omega t)} \cdot e^{ik_z^D z} \quad (2.21)$$

und

$$\mathbf{E}_D = (E_x^D, 0, E_z^D) \cdot e^{i(k_x^D x - \omega t)} \cdot e^{ik_z^D z} \quad (2.22)$$

die magnetische bzw. die elektrische Feldstärke im Dielektrikum sowie

$$\mathbf{H}_M = (0, H_y^M, 0) \cdot e^{i(k_x^M x - \omega t)} \cdot e^{ik_z^M z} \quad (2.23)$$

und

$$\mathbf{E}_M = (E_x^M, 0, E_z^M) \cdot e^{i(k_x^M x - \omega t)} \cdot e^{ik_z^M z} \quad (2.24)$$

die magnetische und elektrische Feldstärke im Metall. Diese Gleichungen beschreiben den Zustand der TM- bzw. p-Polarisation

Diese Ausdrücke müssen sowohl die Maxwellschen Gleichungen

$$\nabla \times \mathbf{H}_i = \varepsilon_i \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{E}_i \quad (2.25)$$

$$\nabla \times \mathbf{E}_i = -\frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{H}_i \quad (2.26)$$

$$\nabla \varepsilon_i \mathbf{E}_i = 0 \quad (2.27)$$

$$\nabla \mathbf{H}_i = 0 \quad (2.28)$$

mit $i = M, D$, als auch die Stetigkeitsbedingungen

$$E_x^M = E_x^D \quad (2.29)$$

$$H_y^M = H_y^D \quad (2.30)$$

$$\varepsilon_M E_z^M = \varepsilon_D E_z^D \quad (2.31)$$

erfüllen.

Aus den Ausdrücken (2.29) und (2.30) folgt

$$k_x^M = k_x^D = k_x. \quad (2.32)$$

Aus Ausdruck (2.25) folgt

$$\frac{\partial H_y^i}{\partial z} = -\varepsilon_i E_x^i \frac{\omega}{c}. \quad (2.33)$$

In Komponenten ausgeschrieben wird aus (2.33)

$$k_z^M H_y^M = \frac{\omega}{c} \varepsilon_M E_x^M \quad (2.34)$$

und

$$k_z^D H_y^D = \frac{\omega}{c} \varepsilon_D E_x^D. \quad (2.35)$$

Ausdrücke (2.34) und (2.35) in Kombination mit den Ausdrücken (2.29) und (2.30) führen zu dem Gleichungssystem

$$H_y^M - H_y^D = 0 \quad (2.36)$$

$$\frac{k_z^M}{\varepsilon_M} H_y^M + \frac{k_z^D}{\varepsilon_D} H_y^D = 0. \quad (2.37)$$

Das Gleichungssystem besitzt nach [For06] eine Lösung, wenn seine Systemdeterminante Null ist. Dies führt zu dem Ausdruck

$$D_0 = \frac{k_z^M}{\varepsilon_M} + \frac{k_z^D}{\varepsilon_D} = 0, \quad (2.38)$$

wobei D_0 für die Systemdeterminante steht.

Gleichungen (2.25), (2.26) und (2.33) führen zu

$$k_x^2 + k_z^i{}^2 = \varepsilon_i \left(\frac{\omega}{c} \right)^2, \quad (2.39)$$

womit Ausdruck (2.38) zu

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_M \varepsilon_D}{\varepsilon_M + \varepsilon_D}} \quad (2.40)$$

wird. Ausdruck (2.40) ist die Dispersionsrelation für SPPen in der Grenzfläche zwischen zwei semi-unendlichen Medien.

2.2.2 Anregung von Oberflächenplasmonpolaritonen, Oberflächenplasmonenresonanz

SPPen lassen sich mit verschiedenen Methoden anregen. Neben der Anregung durch Elektronen, die durch eine dünne Metallschicht transmittieren, ist auch Licht unter bestimmten Bedingungen in der Lage, durch Resonanz SPPen zu erzeugen:

- die Kreisfrequenz ω und der Wellenvektor \mathbf{k} von SPPen und Licht sind gleich.
- die Vektoren \mathbf{E} und \mathbf{H} des Lichtes schwingen in den gleichen Ebenen wie die der SPPen. Dies bedeutet, dass das Licht p-polarisiert sein muss.

Da Metalle ein freies Elektronengas besitzen, ist ihr Dielektrizitätskoeffizient ε_M eine komplexe Größe $\varepsilon_M(\omega) = \varepsilon'_M(\omega) + i\varepsilon''_M(\omega)$, die abhängig von der Kreisfrequenz der elektromagnetischen Strahlung ω ist. Daher wird von der dielektrischen Funktion eines Elektronengases bzw. Metalls gesprochen. Der Imaginärteil $\varepsilon''_M(\omega)$ repräsentiert mathematisch die Eigenschaft des Elektronengases, elektromagnetische Strahlung zu absorbieren. [Mai07].

Nach [Kit06] berechnet sich die dielektrische Funktion für ein Elektronengas nach der sogenannten Drude-Formel zu

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{ne^2}{\varepsilon_0 m^* \omega^2} = 1 - \frac{\omega_P^2}{\omega^2}. \quad (2.41)$$

Dabei ist n die Elektronenkonzentration des Elektronengases, e die Elementarladung und m^* die effektive Masse eines Elektrons. ε_0 ist die Dielektrizitätskonstante des Vakuums. Die Größe ω_P wird Plasmafrequenz des Elektronengases genannt. Die Plasmafrequenz von Metallen berechnet sich gemäß

$$\omega_P = \sqrt{\frac{ne^2}{\varepsilon_0 m^*}}. \quad (2.42)$$

Mit der Elektronenkonzentration von Gold $n_{\text{Gold}} = 5,9 \cdot 10^{28} \frac{1}{\text{m}^3}$ ergibt sich $\omega_P = 1,37 \cdot 10^{16} \frac{\text{rad}}{\text{s}}$.

Das Drude-Modell stellt eine vereinfachte Situation dar. Die Dämpfung des Elektronengases und damit die imaginäre Komponente der dielektrischen Funktion wird hier vernachlässigt. Die verbleibende reelle Komponente lässt sich unter dieser Annahme nach Gleichung (2.41) berechnen.

Unter Berücksichtigung von Gleichung (2.41) lässt sich die Dispersionsrelation herleiten, wenn Ausdruck (2.41) in Ausdruck (2.50) für ε_M eingesetzt wird:

$$k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_D \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}\right)}{\varepsilon_D + 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}}}. \quad (2.43)$$

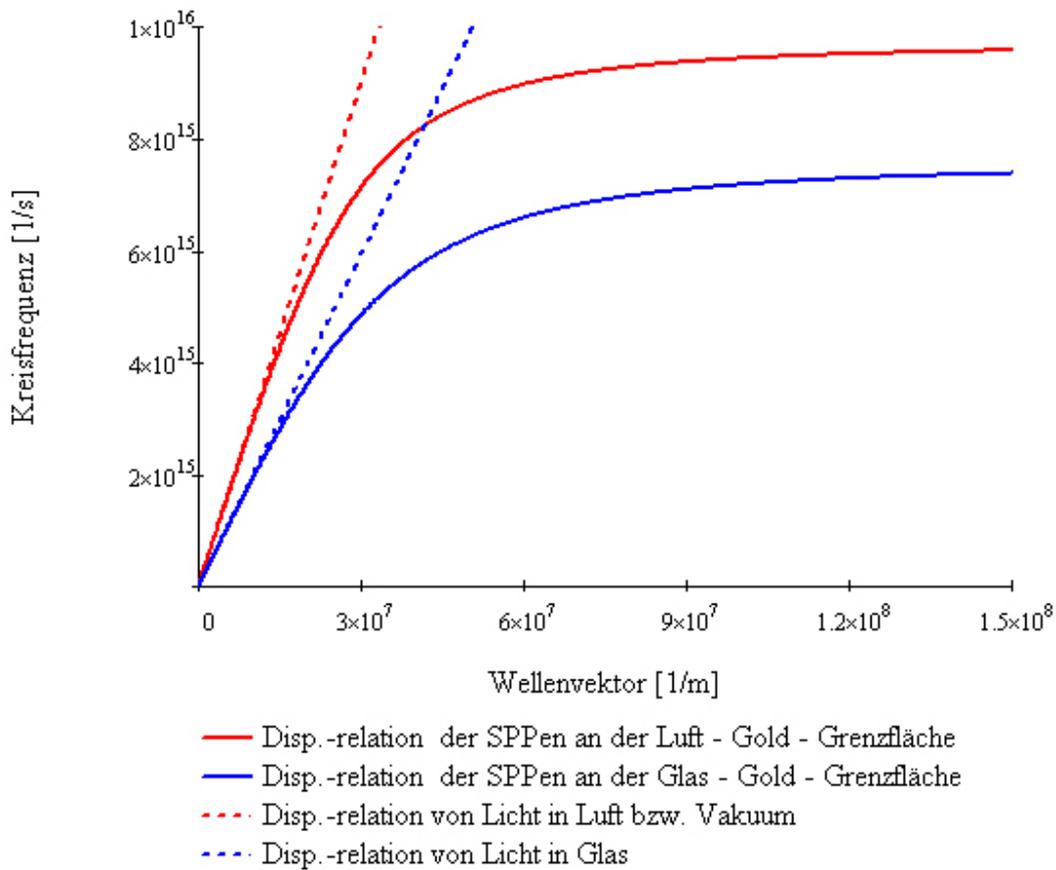


Abbildung 2.3: *Dispersionsrelationen von Licht und SPPen in den jeweiligen Medien bzw. Grenzflächen*

In Abbildung (2.3) sind Dispersionsrelationen von Licht in Luft ($\varepsilon_D = 1$) und in BK7-Glas ($\varepsilon_D = 1,51509^2$ [Sch07]) sowie die Dispersionsrelationen von SPPen in einer Luft/Gold-Grenzfläche und einer BK7-Glas/Gold-Grenzfläche dargestellt.

Abbildung (2.3) zeigt, dass die SPPen für große Wellenvektoren gegen eine bestimmte Frequenz konvergieren, die sogenannte Oberflächenplasmonenfrequenz. Diese berechnet sich nach

$$\omega_{\text{SP}} = \frac{\omega_{\text{P}}}{\sqrt{1 + \epsilon_D}} . \quad (2.44)$$

Dieser Grenzfall liegt vor, wenn die Dämpfung des Elektronengases vernachlässigbar ist, also $\epsilon''_M = 0$ ist. In diesem Fall geht der Wellenvektor der SPPen gegen unendlich und die Gruppengeschwindigkeit beträgt Null. Diese mit ω_{SP} schwingende Mode besitzt elektrostatischen Charakter und wird *Oberflächenplasmon*⁴ genannt. Oberflächenplasmonen sind also SPPen im Grenzfall $k_x \rightarrow \infty$. [Mai07].

In der Literatur werden die Begriffe „Oberflächenplasmonpolariton“ und „Oberflächenplasmon“ häufig synonym verwendet.

Die Dispersionsrelationen von Licht in Abbildung (2.3) berechnen sich nach

$$\omega = k \frac{c}{\sqrt{\epsilon_D}} . \quad (2.45)$$

Abbildung (2.3) zeigt, dass die Wellenvektoren des Lichts für alle Frequenzen kleiner als die Wellenvektoren der SPPen sind. Demzufolge besitzen die Dispersionsrelationen keinen Schnittpunkt.

Das Gleiche gilt für die Grenzfläche Gold/BK7-Glas. BK7-Glas besitzt für die Wellenlänge $\lambda = 632,8\text{nm}$ einen Brechungsindex von $n = 1.51509$ [Sch07]. Auch hier ist kein Schnittpunkt vorhanden und für alle Lichtfrequenzen sind die Lichtwellenvektoren kleiner als die Wellenvektoren der SPPen.

Licht kann demzufolge nicht *direkt* SPPen anregen, unabhängig von der Zusammensetzung der Grenzfläche.

[Ott68],[KR68],[Rae88],[ZSM05], [Mor01], [Zac02]

⁴engl. Surface Plasmon, SP

Erzeugung von SPPen durch Prismenkopplung

Die Kretschmann-Raether-Konfiguration In ihrer Arbeit [KR68] stellten Erwin Kretschmann und Heinz Raether 1968 eine Methode vor, mit der SPPen durch Licht erzeugt werden können.

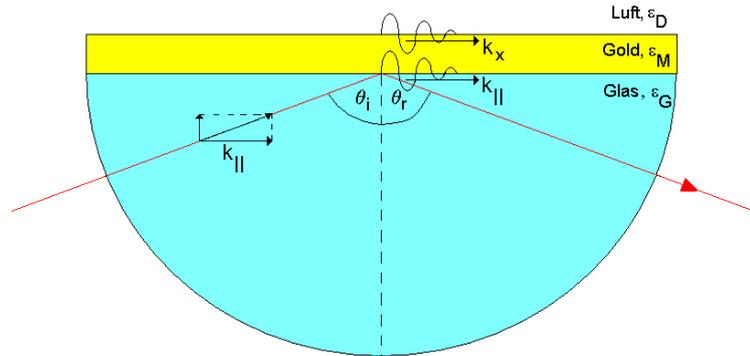


Abbildung 2.4: *Prinzip der Kretschmann-Raether-Konfiguration*

Kernstück dieser Methode ist ein Glasprisma oder ein gläserner Halbzylinder, auf dessen Unterseite ein dünner Metallfilm (in Abbildung (2.4) bestehend aus Gold) aufgebracht wird. Durch diesen Halbzylinder wird der Metallfilm mit monochromatischem, p-polarisiertem Licht bestrahlt (siehe Abbildung (2.4)).

Für Einfallswinkel größer als der kritische Winkel tritt Totalreflexion auf, da der Betrag des realen Anteils des Brechungsindex von Metall, in diesem Fall Gold, kleiner ist als der des Glases. Das evaneszente Feld, das bei der Totalreflexion entsteht, dringt in den Goldfilm ein.

Der Betrag der x -Komponente des Wellenvektors des evaneszenten Feldes, der gleich dem Betrag der parallelen Komponente des Wellenvektors $k_{||}$ des einfallenden Lichts ist, ist gegeben durch

$$k_{||} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_G} \sin \theta_i = \frac{\omega}{c} n_G \sin \theta_i . \quad (2.46)$$

Ist dieser Wellenvektor gleich dem Wellenvektor der SPPen k_x an der Metall/Luft-Grenzfläche, so werden an der dem Halbzylinder gegenüberliegenden Seite des Goldfilms SPPen durch dieses evaneszente Feld erzeugt. Dafür muss die Dicke des Goldfilms kleiner als die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes sein.

Durch die Verwendung des Glashalbzylinders werden die Wellenvektoren des Lichts gemäß Ausdruck (2.46) proportional zum Brechungsindex vergrößert. Dies bedingt die kleinere Steigung der Lichtdispersionsrelation in Glas in Abbildung (2.3). Es existiert

ein Schnittpunkt der Dispersionsrelationen der SPPen in der Gold/Luft-Grenzfläche und des Lichts in Glas. Bei Lichtfrequenzen bis zu diesem Schnittpunkt sind die Wellenvektoren der SPPen kleiner als die des Lichts. Durch Einstellen des Einfallswinkels des Lichts kann die Komponente des Lichtwellenvektors parallel zur Grenzfläche auf den Betrag des Wellenvektors der SPPen eingestellt und somit SPPen resonant erzeugt werden.

Da k_x gemäß Gleichung (2.46) vom Einfallswinkel θ_i abhängt, tritt Resonanz bei einem bestimmten Einfallswinkel, dem sogenannten Resonanzwinkel θ_R , auf. Dieser berechnet sich aus den Gleichungen (2.40) und (2.46) zu

$$\theta_R = \arcsin \sqrt{\frac{1}{\varepsilon_G} \cdot \frac{\varepsilon_D \varepsilon_M}{\varepsilon_D + \varepsilon_M}} \quad (2.47)$$

Im Falle der Resonanz wird die Energie des Lichts in Oberflächenplasmonenenergie umgewandelt. Dadurch wird die Intensität des reflektierten Lichts stark abgeschwächt. Daher wird in diesem Fall von abgeschwächter Totalreflexion⁵ gesprochen. Der Halbzylinder aus Glas wird auch ATR-Koppler genannt.

Es sei erwähnt, dass die Dispersionsrelation (2.40) für den bei der Kretschmann-Raether-Konfiguration vorliegenden Fall eines Systems, bei dem die Metallschicht eine endliche Dicke besitzt, nur noch eine Näherung darstellt. Die SPPen, die evaneszent in die Goldschicht und in den daran angrenzenden ATR-Koppler strahlen, transformieren sich in dem ATR-Koppler zu ebenen Wellen mit einer reellen z -Komponente des Wellenvektors gemäß Gleichung (2.39) mit $k_x \leq \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_G}$, also zu Licht, das abgestrahlt wird. Dieses Licht besitzt Energie, die den SPPen entzogen wird. Dadurch werden diese gedämpft. Diese Dämpfung wird Strahlungsdämpfung genannt und ist von der Dicke d des Metallfilms abhängig. Für $d \rightarrow \infty$ ist die Strahlungsdämpfung Null und Gleichung (2.40) ist gültig. [Rae88]

Die Tatsache, dass evaneszente Felder keine Energie transportieren, in diesem Fall jedoch Energie durch die Goldfläche transferiert wird, ist klassisch nicht zu erklären und wird analog zur Quantenmechanik „optischer Tunneleffekt“ genannt. [BR05]

Die Strahlungsdämpfung bewirkt eine Abweichung des Resonanzwinkels [Kre71] [Rae88]. Da diese Abweichung jedoch sehr gering ist, ist (2.40) auch für die Kretschmann-Raether-Konfiguration eine gute Näherung [Zac02]. Daher wird (2.40) für weitere Berechnungen verwendet.

Das Licht, das durch den optischen Tunneleffekt im ATR-Koppler entsteht, trägt zur Intensität des reflektierten Lichts bei. Somit wird die Intensität des reflektierten Lichts am Resonanzwinkel abhängig von der Metallschichtdicke erhöht. Ist der Metallfilm zu

⁵ engl. Attenuated Total Reflection = ATR

dick, sinkt der Effekt der resonanten Erzeugung von SPPen.

In [Kre71] und [Rae88] wird gezeigt, dass die optimale Dicke der Goldschicht, bei der die Intensität des reflektierten Lichts am Resonanzwinkel Null ist, berechnet werden kann. Die optimale Dicke ist die, bei der die innere Dämpfung gleich der Strahlungsdämpfung ist. Aus dieser Bedingung ergibt sich der Ausdruck

$$d = \frac{\sqrt{|\varepsilon'_M| - 1}}{4\pi |\varepsilon'_M|} \cdot \ln \left(\frac{4\varepsilon_M'^2}{\varepsilon_M'' \cdot (|\varepsilon'_M| + 1)} \cdot \frac{2 \cdot \varepsilon_G \cdot \sqrt{|\varepsilon'_M| \cdot (\varepsilon_G - 1) - \varepsilon_G}}{\varepsilon_G^2 + |\varepsilon'_M| \cdot (\varepsilon_G - 1) - \varepsilon_G} \right) \cdot \lambda. \quad (2.48)$$

Für eine Goldschicht mit $\varepsilon_M = -11.524 + 1.292i$ [MHS⁺77] und $\varepsilon_D = 1, 51509^2$ ergibt sich somit für eine Wellenlänge von $\lambda = 632.8$ nm eine optimale Dicke von $d = 48,2$ nm.

Die Otto-Konfiguration Eine weitere Methode, SPPen durch Licht anzuregen, geht auf Andreas Otto zurück. Diese Methode stellte er 1968 in seiner Arbeit [Ott68] vor. Ähnlich wie bei der Kretschmann-Raether-Methode wird ein Glasprisma als ATR-Koppler verwendet. Die Metallschicht wird jedoch nicht direkt auf das Glasprisma aufgebracht. Zwischen dem Metallfilm und dem Glasprisma bleibt eine dünne Luftschicht (vgl. Abbildung (2.5)). Dies hat zur Folge, dass SPPen auf der dem Prisma zugewandten Seite angeregt werden. Aufgrund der geringen Eindringtiefe des evaneszenten Feldes muss die Luftschicht sehr dünn ($< 1 \mu\text{m}$) sein.

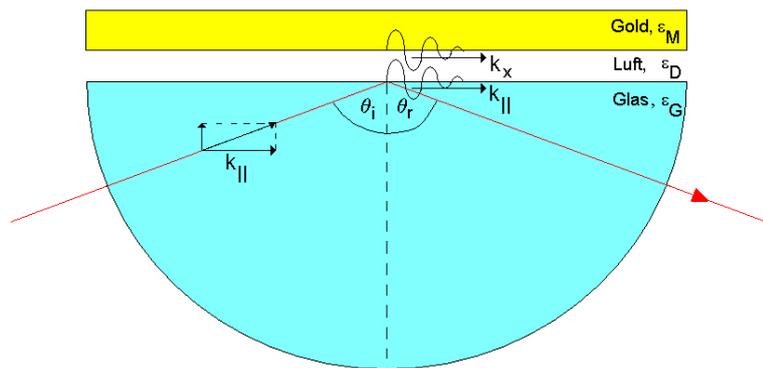


Abbildung 2.5: Prinzip der Otto-Konfiguration

Die Vorteile der Otto-Konfiguration liegen in der Unabhängigkeit der Metallschichtdicke und der schärfen Intensitätsminima des reflektierten Lichts.

Da die technische Realisierung eines so dünnen Luftspaltes jedoch komplizierter ist als

die Herstellung eines dünnen Metallfilms, ist die Kretschmann-Raether-Konfiguration die häufiger verwendete Methode. [Zac02]

Erzeugung von SPPen durch Gitterkopplung

Eine weitere Möglichkeit, SPPen zu erzeugen, ist die Brechung von Licht an einem metallenen Beugungsgitter. Trifft Licht mit einem Wellenvektor \mathbf{k} auf ein metallenes Beugungsgitter (oder eine Oberfläche mit periodischem Oberflächenprofil) mit einer Gitterkonstante Λ und reziproken Gittervektor $\mathbf{G} = \frac{2\pi}{\Lambda} \cdot \mathbf{n}$ (\mathbf{n} =Richtungseinheitsvektor), so wird dieses Licht gebrochen. Die Wellenvektoren \mathbf{k}_m der gebeugten Lichtstrahlen berechnen sich nach

$$\mathbf{k}_m = \mathbf{k} + m \cdot \mathbf{G}, \quad m \in \mathbb{N}. \quad (2.49)$$

Da die reziproken Gittervektoren in der Gitterebene liegen, werden nur die Komponenten des Wellenvektors des einfallenden Lichts, die parallel zur Gitterebene liegen, durch die Beugung gemäß Gleichung (2.49) verändert. Die zur Gitterebene orthogonale Komponente bleibt unverändert.

Das gebeugte Licht mit den Wellenvektoren aus Gleichung (2.49) ist in der Lage, SPPen anzuregen. Der fehlende Betrag der Wellenvektoren des einfallenden Lichts zur Erzeugung der SPPen wird dann aufgrund der Beugung am Gitter aufgebracht.[Hom06]

Andererseits kann der umgekehrte Effekt eintreten. SPPen, die auf der Oberfläche eines Metalls propagieren, können an einer Gitterstruktur zu strahlendem Licht ausgekoppelt werden. Diese Gitterstruktur muss dafür nicht zwangsläufig metallischen Charakter besitzen [Mai07].

2.2.3 Dämpfung und Eindringtiefen der Oberflächenplasmononen

Die Dielektrizitätskonstante eines Dielektrikums sowie die Kreisfrequenz ω sind reelle Größen. Metalle jedoch haben komplexwertige Dielektrizitätskoeffizienten $\varepsilon_M = \varepsilon'_M + i\varepsilon''_M$ mit $\varepsilon''_M < |\varepsilon'_M|$, die wellenlängenabhängig sind. Daraus resultiert nach Gleichung (2.40) ein komplexwertiges $k_x = k'_x + ik''_x$ mit Realteil

$$k'_x = \Re k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon'_M \varepsilon_D}{\varepsilon'_M + \varepsilon_D}} \quad (2.50)$$

und Imaginärteil

$$k_x'' = \Im k_x = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_M' \varepsilon_D}{\varepsilon_M' + \varepsilon_D} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{\varepsilon_M''}{2\varepsilon_M'^2}. \quad (2.51)$$

Ein reelles k_x' ergibt sich nach Gleichung (2.50), wenn $\varepsilon_M' < 0$ ist und $|\varepsilon_M'| > \varepsilon_D$ ist. Dann ist der Term unter der Wurzel positiv und das Ergebnis reell. Diese Bedingungen werden von Metallen wie z. B. Gold oder Silber erfüllt [Rae88].

Der Imaginärteil k_x'' ist ein Maß für die innere Dämpfung der SPPen in Richtung ihrer Bewegung entlang der Grenzfläche. Die Intensität der SPPen nimmt mit zunehmender Entfernung von ihrer Erregungsstelle exponentiell proportional zu $e^{-2k_x''x}$ ab.

Die Länge L , nach der die Intensität der SPPen auf $\frac{1}{e}$ abgefallen ist, berechnet sich gemäß

$$L = \frac{1}{2\Im k_x} \quad (2.52)$$

Für eine Gold/Luft-Grenzfläche mit $\varepsilon_D = 1$ und $\varepsilon_M = -11.524 + 1.292i$ [MHS⁺77] ergibt sich bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 632,8$ nm eine Distanz von $L = 8.6$ μm .

Wie schon erwähnt ist die z -Komponente des Wellenvektors imaginär, wodurch die Amplitude der SPPen analog zu einer evaneszenten Welle exponentiell abfällt. Die Eindringtiefen z_i in die beiden Medien (Metall und Dielektrikum), bei der die Amplitude auf $\frac{1}{e}$ abfällt, berechnet sich gemäß

$$z_i = \frac{1}{|k_z^i|}, \quad (2.53)$$

wobei i für D bzw. M steht. k_z^i berechnet sich nach Gleichung (2.39).

Daraus ergibt sich für die Eindringtiefe in das Dielektrikum

$$z_D = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{|\varepsilon_M' + \varepsilon_D|}{\varepsilon_D^2}} \quad (2.54)$$

und für die Eindringtiefe in das Metall

$$z_M = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{|\varepsilon_M' + \varepsilon_D|}{\varepsilon_M'^2}}. \quad (2.55)$$

Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 632,8$ nm und einer Gold/Luft-Grenzfläche mit $\varepsilon_D = 1$ und $\varepsilon_M = -11.524 + 1.292i$ [MHS⁺77] ergibt sich für die Eindringtiefe in Gold eine Distanz von $z_M = 27,0$ nm und für die Eindringtiefe in Luft eine Distanz

von $z_D = 312,55$ nm. [Rae88]

2.2.4 Reflexionsgrad einer Schichtfolge

Die Intensität des an einer Schichtfolge reflektierten Lichts in Abhängigkeit des Einfallwinkels des Lichts kann durch die Anwendung des Fresnel-Formalismus berechnet werden [Zac02].

Werden bei einem Schichtsystem wie z. B. der Kretschmann-Raether-Konfiguration die korrekten, komplexen Werte für die Brechungsindizes von Metallschichten eingesetzt, so wird der Rückgang der Intensität während der Oberflächenplasmonenresonanz mathematisch beschrieben. Eine Methode, diesen Zusammenhang mathematisch zu beschreiben, ist die 2×2 -Matrix-Methode, die auch Jones-Methode genannt wird. Mit dieser Methode lässt sich der Reflexionsgrad an einer Folge von im Allgemeinen beliebig vielen Schichten mit verschiedenen Dielektrizitätsfunktionen für s-polarisiertes oder p-polarisiertes Licht berechnen.

Die z -Komponente des elektrischen Anteils des auf die Schichtfolge einfallenden Lichts kann durch den Ausdruck

$$E_1(z) = F_1 e^{-ik_z z} + B_1 e^{ik_z z} \equiv F_1(z) + B_1(z) \quad (2.56)$$

beschrieben werden. Dabei steht F_1 für die Amplitude des in positive z -Richtung propagierenden, einfallenden Lichts und B_1 für die Amplitude des in negative z -Richtung propagierenden Anteils des reflektierten Lichts. Analoge Ausdrücke können für die anderen Schichten der Schichtfolge aufgestellt werden.

Die Intensität des Lichts ist gleich dem Quadrat seiner Amplitude, also F^2 bzw. B^2 . Der Reflexionsgrad R ist definiert als Quotient aus der Intensität des reflektierten Lichts und der Intensität des einfallenden Lichts, $R = \frac{B^2}{F^2}$.

Die Wirkung einer Grenzfläche auf das eintreffende Licht wird im Jones-Formalismus durch eine 2×2 -Matrix:

$$D_{ij} = \frac{1}{t_{ij}} \begin{pmatrix} r_{ij} & 1 \\ 1 & r_{ij} \end{pmatrix} \quad (2.57)$$

beschrieben. Dabei sind

$$r_{ij} = \frac{\varepsilon_j k_z^i - \varepsilon_i k_z^j}{\varepsilon_j k_z^i + \varepsilon_i k_z^j} \quad (2.58)$$

die Fresnel-Reflexionskoeffizienten

und

$$t_{ij} = \frac{2\varepsilon_j k_z^i}{\varepsilon_j k_z^i + \varepsilon_i k_z^j} \quad (2.59)$$

die Fresnel-Transmissionskoeffizienten für p-polarisiertes Licht. Die Indizes i und j nummerieren die Schichten des Systems. Für s-polarisiertes Licht funktioniert der Formalismus analog mit dem Unterschied, dass die Fresnel-Koeffizienten eine andere Form annehmen.

Einer Schicht i der Dicke d aus der Schichtfolge wird im Jones-Formalismus durch die 2×2 -Matrix

$$P_i = \begin{pmatrix} e^{-ik_z^i d} & 0 \\ 0 & e^{ik_z^i d} \end{pmatrix} \quad (2.60)$$

ihr Effekt auf das Licht zugeordnet. Es handelt sich dabei um die Veränderung der Phase durch die Schicht.

Der Zusammenhang zwischen den Amplituden B, F in der ersten und letzten Schicht ergibt sich dann zu

$$\begin{pmatrix} F_1 \\ B_1 \end{pmatrix} = D_{12} \cdot P_2 \cdot D_{23} \cdot P_3 \dots P_{N-1} \cdot D_{N-1,N} \cdot \begin{pmatrix} F_N \\ B_N \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} F_N \\ B_N \end{pmatrix}. \quad (2.61)$$

Da sich das Licht in der letzten Schicht nur in eine Richtung bewegt, da es dort nicht mehr reflektiert wird, ist B_N Null. Der Reflexionsgrad des Gesamtsystems berechnet sich demnach zu

$$R = \left(\frac{B_1}{F_1} \right)^2 = \left| \frac{M_{21}}{M_{11}} \right|^2. \quad (2.62)$$

Für das Dreischichtsystem der Kretschmann-Raether-Konfiguration ergeben sich für die Glas/Metall-Grenzschicht und die Metall/Dielektrikum-Grenzschicht die dazugehörigen Matrizen D_{12} und D_{23} . Die Metallschicht selber wird durch die Matrix P_2 beschrieben. Nach einigen Vereinfachungen ergibt sich für den Reflexionsgrad der Kretschmann-Raether-Konfiguration

$$R(\theta) = \left| \frac{r_{12} + r_{23} \cdot e^{2ik_{2z}d}}{1 + r_{12} \cdot r_{23} \cdot e^{2ik_{2z}d}} \right|^2. \quad (2.63)$$

Die Abhängigkeit des Reflexionsgrads von θ ergibt sich aus der θ -Abhängigkeit der z -Komponente der Wellenvektoren des Lichts k_z^i , die in den Fresnel-Koeffizienten stehen. Die k_z^i berechnen sich nach Gleichung (2.39).

Die Nullstelle des Nenners aus Gleichung (2.63) enthält implizit die exakte Dispersionsrelation des Schichtsystems der Kretschmann-Raether-Konfiguration. Sie unterscheidet sich um einen additiven Term von Gleichung (2.40). Für den Grenzfall $d \rightarrow \infty$ reduziert sich die implizit enthaltene Dispersionsrelation zu (2.40) [Kre71] [Rae88].

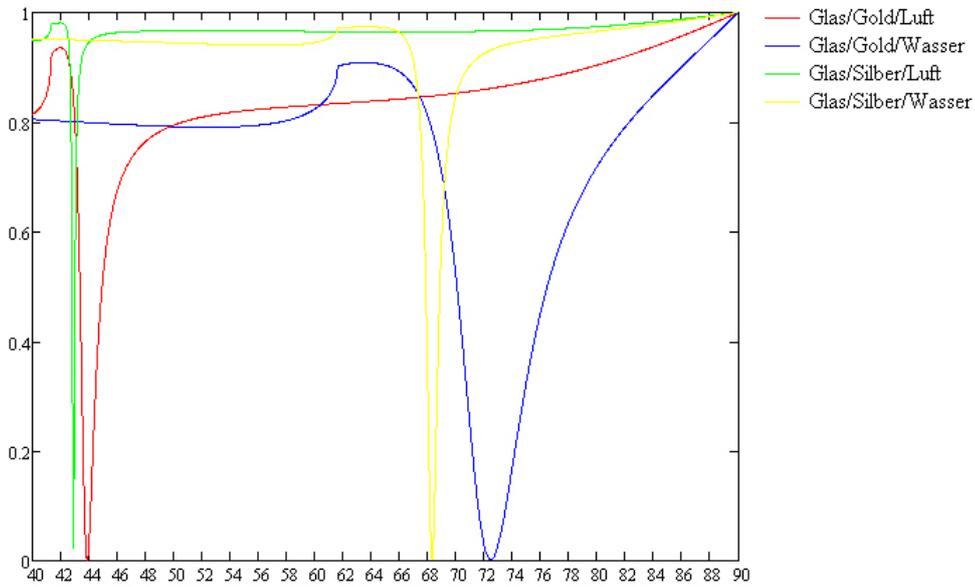


Abbildung 2.6: Nach Gleichung (2.63) berechnete Reflexionsgrade an dem Dreischichtsystem

Abbildung (2.6) zeigt die Abhängigkeiten der Reflexionsgrade von dem Einfallswinkel θ für die Lichtwellenlänge $\lambda = 632.8$ nm in der Kretschmann-Raether-Konfiguration, berechnet nach Gleichung (2.63). Sowohl eine Silber- als auch eine Goldschicht mit Luft bzw. Wasser als dritte Schicht, die durch ein Glasprisma bestrahlt wird, liegt den Berechnungen zugrunde. Dabei wurde für Glas $\varepsilon_G = 1.51509^2$ [Sch07], für Gold $\varepsilon_M = -11,524 + i1,292$ [MHS⁺77], für Silber $\varepsilon_M = -17,236 + i0,498$ [EN95], für Luft $\varepsilon_D = 1$ und für Wasser $\varepsilon_D = 1.333^2$ angenommen. Die optimalen Schichtdicken der Metallfilme ergeben sich nach Gleichung (2.48) zu $d = 48,2$ nm für Gold und $d = 54,9$ nm für Silber.

Der auf die Oberflächenplasmonenresonanz zurückzuführende Rückgang der Intensitäten des reflektierten Lichts ist jeweils klar zu erkennen. Desweiteren ist aus Abbildung (2.6) ersichtlich, dass mit steigender Dielektrizitätskonstante des Mediums, das an den

Metallfilm angrenzt, die Intensitätsminima breiter werden und die Resonanz bei größeren Winkeln auftreten.

Da Silber ein besserer elektrischer Leiter ist als Gold, ist sein Realteil der Dielektrizitätskonstante vom Betrage her größer und der Imaginärteil, der die innere Dämpfung beschreibt, kleiner. Dies äußert sich in den schmalen Resonanz-Dips und der allgemein größeren Reflektivität, die einen schärferen Kontrast des Minimums bewirkt.

2.2.5 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Aufbauend auf dem Fresnel-Formalismus und der daraus resultierenden Formel für den Reflexionsgrad der Kretschmann-Raether-Konfiguration (2.63) kann die Abhängigkeit des Resonanzwinkels θ_R von der Dielektrizitätskonstanten bzw. vom Brechungsindex des Mediums auf der Goldschicht theoretisch bestimmt werden.

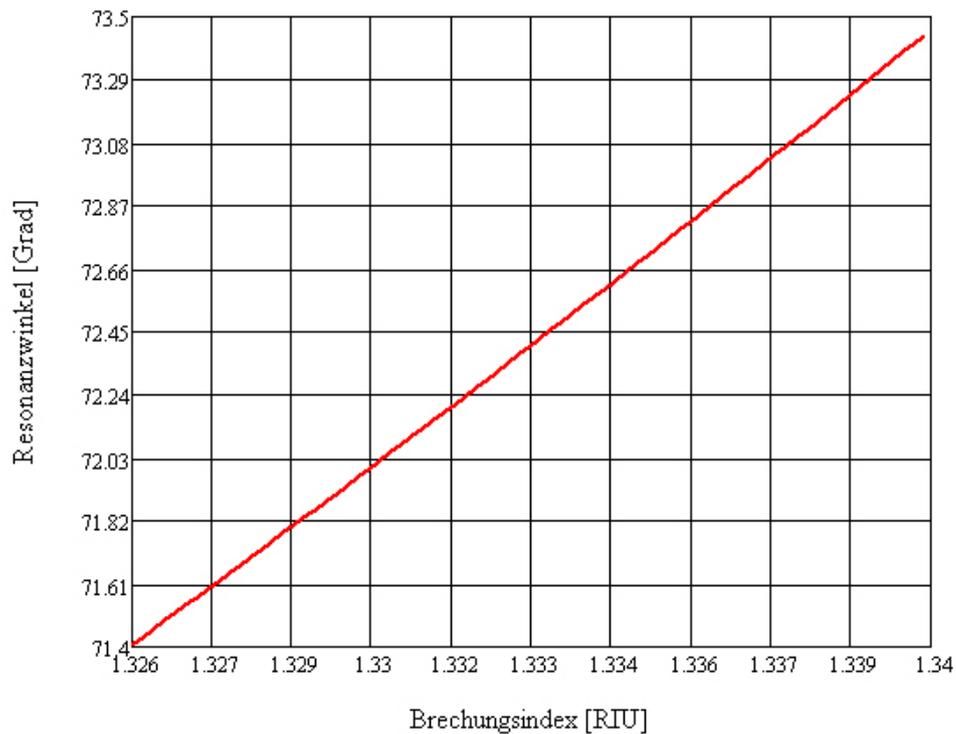


Abbildung 2.7: Abhängigkeit des Resonanzwinkels vom Brechungsindex. Die Berechnung bezieht sich auf die Kretschmann-Raether-Konfiguration mit $\varepsilon_G = 1,51509^2$, $\varepsilon_M = -11,524 + 1,292i$ [MHS⁺ 77], $\varepsilon_D = 1.333^2$, $\lambda = 632,8$ nm und einer Goldschichtdicke $d = 48$ nm

Abbildung (2.7) zeigt die Abhängigkeit $\theta_R(n)$. Sie wurde mit Hilfe eines selbst erstellten, auf dem Fresnel-Formalismus basierenden Computerprogramms numerisch ermittelt, da aufgrund der Komplexität des mathematischen Rahmens eine analytische Lösung zu umfangreich ist.

In Abbildung (2.7) ist zu sehen, dass θ_R linear proportional zu n ist. Die Steigung der Geraden beträgt $146,83 \frac{\text{Grad}}{\text{RIU}}$. Diese Abhängigkeit der Resonanzbedingungen von der dielektrischen Konstante bzw. vom Brechungsindex des Mediums auf der Goldschicht bildet die Grundlage der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.

Es existieren verschiedene Methoden, diese Abhängigkeit auszunutzen:

- Mit der Änderung der dielektrischen Konstante des Mediums auf der Goldschicht ändert sich der Betrag des Wellenvektors des Lichts, welches SPPen resonant erzeugen kann. Diese Änderung kann erreicht werden, in dem die Wellenlänge des Lichts geändert wird. Dies ist die Grundlage der wellenlängenmodulierten Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.
- Durch die Wechselwirkung des einfallenden Lichts mit den SPPen ändern sich Phase und Polarisation des reflektierten Lichts. Diese Änderungen können gemessen werden und ermöglichen die phasen- bzw. polarisationsmodulierte Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.
- Eine weitere Methode stellt die Messung der Intensität des reflektierten Lichts bei fester Wellenlänge und Einfallswinkel dar. Diese ändert sich, da der Resonanzdip wandert. (\rightarrow Abbildung (2.6))
- Der Wellenvektor des Lichts, welches die Oberflächenplasmonenresonanz erzeugt, kann auch durch Variation des Einfallswinkels moduliert werden. Darauf basiert die winkelmodulierte Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. Dabei wird die Intensität des an der Grenzschicht Metall/Glas reflektierten Lichts in Abhängigkeit des Einfallswinkels aufgenommen [HP06].

Um dies zu realisieren, gibt es verschiedene Methoden.

Zum einen die Methode, bei der ein Lichtstrahl, dessen Einfallswinkel zu variieren ist, in der Kretschmann-Raether-Konfiguration auf den Metallfilm gerichtet wird. Die Intensität des reflektierten Strahls wird mit einem Photodetektor gemessen. Wird der Einfallswinkel des Lichts geändert, ändert sich auch der Reflexionswinkel um den gleichen Betrag. Lichtquelle und Detektor müssen dementsprechend während des Scan-Vorgangs gleichzeitig bewegt werden. Dieser Mechanismus lässt sich durch ein Goniometer realisieren. Dabei handelt es sich um zwei aufeinander abgestimmte Drehtische. Kretschmann und Raether benutzten diese Technik für ihre Arbeit [KR68].

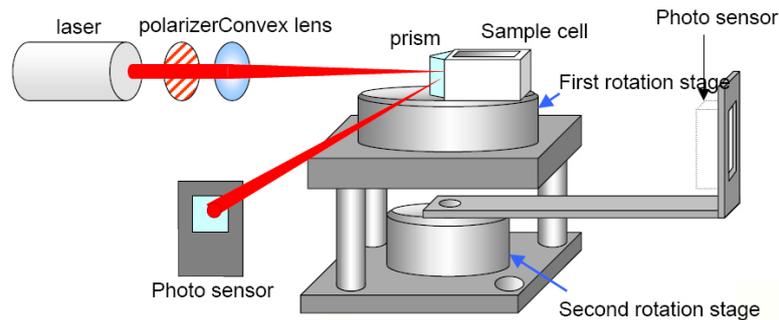


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau einer $\theta/2\theta$ -Methode, Quelle: [Sch]

Eine weitere Methode besteht darin, den Einfallswinkel des Lichts durch Rotation des Prismas zu verändern. Abbildung (2.8) zeigt schematisch einen solchen Aufbau. Wird der Drehtisch, auf dem sich das Prisma befindet, um einen Winkel θ gedreht, muss der Drehtisch mit dem Photodetektor um den Winkel 2θ gedreht werden, da sich sowohl Einfallswinkel als auch der Reflexionswinkel ändern. Daher wird diese Methode $\theta/2\theta$ -Methode genannt.

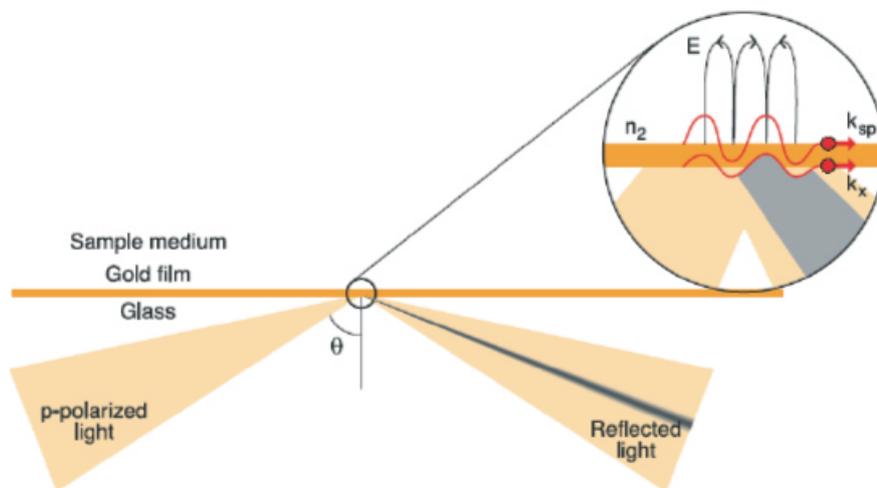


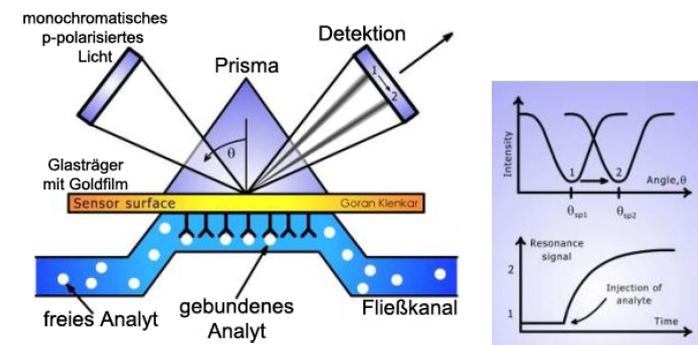
Abbildung 2.9: Prinzip der Methode, die auf die Fokussierung eines kollimierten Laserstrahls basiert, Quelle: [San]

Bei einer dritten Methode werden weder Prisma noch Detektor noch Lichtquelle bewegt. Ein Laser-Strahl wird mit einem Linsensystem kollimiert und dann mittels konvexer Linse auf einen Punkt auf der Metallschicht fokussiert. Dadurch treffen instantan Lichtstrahlen mit verschiedenen Einfallswinkeln auf die Goldschicht. Das Winkelspektrum ist durch den Öffnungswinkel des Lichtkegels begrenzt, der durch die Fokussierung entsteht. Liegt der Resonanzwinkel in diesem Winkelbereich, so ist in dem reflektierten

Lichtkegel unter dem Resonanzwinkel eine dunkle Linie zu beobachten, der sogenannte Resonanz-Dip (siehe Abbildung (2.9)).

Gemäß der Dispersionsrelation für SPPen (Gleichung (2.40)) ist der Wellenvektor der SPPen abhängig von der Dielektrizitätskonstanten des an den Metallfilm angrenzenden Mediums. Ändert sich dieses Medium, so ändert sich die Dielektrizitätskonstante. Dies wiederum bewirkt eine Änderung des Wellenvektors der SPPen und damit des Resonanzwinkels. Der Resonanz-Dip ändert seine Position im Kegel des reflektierten Lichts. Diese Wanderung des Dips kann mit Hilfe eines optischen Detektors aufgenommen werden.

Im Allgemeinen läuft die Untersuchung einer biochemischen Reaktion so ab, dass ein Reaktionspartner auf der Goldoberfläche immobilisiert wird. Der zweite Reaktionspartner, der Analyt, wird dann, gelöst in einem Lösungsmittel, auf die funktionalisierte Goldoberfläche aufgebracht (z. B. durch eine Flusszelle). Daraufhin diffundiert der Analyt durch die Lösung zur Goldoberfläche und reagiert dort mit den immobilisierten Molekülen. Diese Reaktion ändert die Eigenschaften der Oberfläche und damit die Resonanzbedingungen, was einen geänderten Resonanzwinkel zur Folge hat. Da die Eindringtiefe der SPPen in das Medium in der Größenordnung der Wellenlänge liegt, ist auch nur die Änderung in dem Bereich des Mediums in unmittelbarer Nähe zur Goldschicht von ausschlaggebender Bedeutung.



(a) Schematischer Aufbau eines Oberflächenplasmonenresonanz-Sensors, der die Reaktion zwischen Antikörpern und Antigenen untersucht. (b) Zeitliche Entwicklung des Resonanzwinkels

Abbildung 2.10: *Aufbau und Sensorgramm eines Oberflächenplasmonenresonanz-Sensors*, Quelle: [Kle]

Als Beispiel sei die Bindung von Antigenen an Antikörpern, die auf einer Goldoberfläche immobilisiert sind, genannt (siehe Abbildung (2.10)).

Durch eine Flusszelle, die auf die Goldschicht aufgesetzt ist, wird eine Lösung mit Anti-

genen (in der Abbildung mit Analyt beschrieben) über die Goldschicht geleitet, auf der Antikörper immobilisiert sind. Durch die Anbindung der Antigene an die Antikörper ändert sich der Resonanzwinkel. Der Resonanz-Dip wandert auf dem Photodetektor von 1 nach 2. Die Geschwindigkeit dieser Winkeländerung ist ein Maß für die Dynamik dieser Reaktion. Mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie lassen sich dementsprechend Reaktionsdynamiken untersuchen.

Die Änderung der dielektrischen Konstante bzw. des Brechungsindex des Mediums durch eine Reaktion lässt sich gemäß [HP06] berechnen nach

$$\Delta n_b = \left(\frac{dn}{dc} \right)_{\text{Vol}} \Delta c_b . \quad (2.64)$$

Dabei handelt es sich bei Δn_b um die Änderung des Brechungsindex, die durch die Bindung des Analyten an die auf der Goldoberfläche immobilisierten Reaktionspartner hervorgerufen wird. Der Ausdruck $\left(\frac{dn}{dc} \right)_{\text{Vol}}$ ist die Änderung des Brechungsindex der Analytlösung bezogen auf das Volumen in Abhängigkeit von der Konzentration c der Analytmoleküle in der Lösung. Der Wert dieser Größe ist abhängig von der Struktur der Moleküle und variiert zwischen 0,1 bis 0,3 $\frac{\text{ml}}{\text{g}}$ [HP06]. Bei Δc_b handelt es sich um die Änderung der Konzentration der gebundenen Analytmoleküle mit der Dimension Masse pro Volumen. Wenn die Reaktionen nur in der dünnen Schicht ablaufen, die aus den immobilisierten Molekülen besteht, so kann Ausdruck (2.64) als

$$\Delta n_b = \left(\frac{dn}{dc} \right)_{\text{Vol}} \frac{\Delta \Gamma}{h} \quad (2.65)$$

geschrieben werden.

Hierbei ist Γ die Oberflächenkonzentration der Analytmoleküle mit der Dimension Masse pro Fläche. Die Größe h stellt die Dicke der Schicht dar. [HP06]

2.3 Adsorptionskinetik

Die Bestimmung der Kinetik von Bindungen erlaubt Aussagen über die Wechselwirkung zwischen Molekülen. Auf diese Weise können wichtige Informationen über die Wechselwirkung gesammelt werden. SPR-Biosensoren ermöglichen diese Art von Untersuchungen.

Im Folgenden soll das mathematische Modell, das dem Antwortverhalten eines SPR-Biosensors auf chemische Reaktionen zu Grunde liegt, vorgestellt werden [SVP06].

Ein SPR-Biosensor misst effektiv die relative Massenänderung auf der Sensoroberfläche (in diesem Fall die Goldoberfläche), die durch die Anbindung von Analytmolekülen an

die auf der Goldoberfläche immobilisierten Rezeptormoleküle zu Stande kommt. Diese relative Massenänderung ist verantwortlich für die Änderung des Brechungsindex. Das Messsignal ξ ist direkt proportional zu der Änderung der Konzentration gebundener Analytmoleküle auf der Sensoroberfläche. Ist zwischen Rezeptor und Analyt nur eine Art von Bindungsreaktion möglich und beträgt das Bindungsverhältnis von Rezeptor und Analyt 1:1, so ist ξ proportional zu der Konzentration von entstandenen Komplexen (Reaktionsprodukte aus Analyt und Rezeptor). Es gilt

$$\xi = \text{const} \cdot M_A \cdot \gamma , \quad (2.66)$$

wobei M_A die Masse eines Analytmoleküls und γ die Oberflächenkonzentration des Komplexes ist. Für sehr hohe Analyt-Konzentrationen tritt der Fall ein, dass das Messsignal einen Maximalwert annimmt. In dieser Situation haben alle Rezeptoren auf der Sensoroberfläche mit einem Analytmolekül reagiert. Bei weiterer Erhöhung der Analyt-Konzentration würde das Messsignal nicht mehr ansteigen. Es gilt dann

$$\xi_S = \text{const} \cdot M_A \cdot \beta \quad (2.67)$$

wobei ξ_S der Maximalwert des Messsignals und β die Oberflächenkonzentration der Rezeptoren auf der Sensoroberfläche ist.

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, das Messsignal normiert auf diesen Maximalwert anzugeben:

$$\frac{\xi}{\xi_S} = \frac{\gamma}{\beta} . \quad (2.68)$$

Die Bindungskinetik zweier Moleküle kann zunächst mit Hilfe des Modells für Reaktionen zweiter Ordnung beschrieben werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass auf der Sensoroberfläche

1. Analyt A an Rezeptor Z bindet und somit einen auf der Sensoroberfläche immobilisierten Komplex bildet, die sogenannte Assoziationsreaktion, und
2. der Komplex wieder in A und Z zerfällt, die sogenannte Dissoziationsreaktion.

Diese beiden Reaktionen kann man zu einer Gesamtreaktion zusammenfassen:



Damit eine Reaktion zwischen einem Analyt- und einem Rezeptormolekül stattfinden kann, müssen sich die beiden Moleküle bis auf einen bestimmten Abstand annähern, den

sogenannten kritischen Abstand. In diesem Abstand ist die Wahrscheinlichkeit für die Bildung eines Komplexes innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls sehr hoch. Unter gleichen Bedingungen (z. B. Temperatur, Druck) ist diese Wahrscheinlichkeit für alle Rezeptor-Analyt-Paare gleich hoch. Ihre gegenseitige Orientierung, Translations- und Rotationsgeschwindigkeit sollen dabei vernachlässigt werden.

Die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Analytmolekül in dem kritischen Abstand zu einem Rezeptormolekül befindet, ist proportional zu der Analytkonzentration. Die Gesamtzahl der Reaktionen pro Zeitintervall in einem bestimmten Gebiet auf der Sensoroberfläche ist proportional zu der Anzahl der Rezeptormoleküle in diesem Gebiet, da jedes Rezeptormolekül mit der gleichen Wahrscheinlichkeit einen Komplex bilden kann. Aus diesem Zusammenhang folgt die Beziehung zwischen der Anzahl von in einem Zeitintervall entstandenen Komplexen, der momentanen Konzentration freier Analyte α und der Oberflächenkonzentration freier Rezeptoren $\beta - \gamma$:

$$\frac{d\gamma_a}{dt} = k_a \cdot \alpha \cdot (\beta - \gamma) . \quad (2.70)$$

Dabei ist γ_a die Oberflächenkonzentration der Komplexe bezogen auf die Assoziation. Bei k_a handelt es sich um die sogenannte Assoziationskonstante, die unabhängig von der Zeit und der Konzentration beider Reaktanden ist.

Für jeden Komplex existiert eine bestimmte Wahrscheinlichkeit für die Dissoziation in seine Komponenten A und Z innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls. In der Situation sind A und Z weiter als der kritische Abstand entfernt. Unter gleichen Bedingungen ist diese Wahrscheinlichkeit für alle Komplexe gleich. Die Dissoziation führt zur Abnahme der Komplexoberflächenkonzentration. Es gilt

$$\frac{d\gamma_d}{dt} = k_d \cdot \gamma , \quad (2.71)$$

wobei γ_d die Oberflächenkonzentration der Komplexe bezogen auf die Dissoziation ist. Bei k_d handelt es sich um die sogenannte Dissoziationskonstante, die ebenfalls unabhängig von der Zeit und der Konzentration beider Reaktanden ist.

Aus Gleichung (2.70) und Gleichung (2.71) folgt durch Addition die Zeitabhängigkeit für die Gesamtkomplexoberflächenkonzentration

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{d\gamma_a}{dt} + \frac{d\gamma_d}{dt} = k_a \cdot \alpha \cdot (\beta - \gamma) + k_d \cdot \gamma . \quad (2.72)$$

Die Lösung von Gleichung (2.72) hängt stark von α ab. Im Falle einer Sensoroberfläche, über der sich in einem bestimmten Volumen V ein Lösungsmittel befindet, kann die Zugabe einer hoch konzentrierten Analytlösung und anschließend sofortiger, perfekter

Mischung als instantaner Sprung von α auf einen Startwert α_0 angesehen werden. Im Folgenden beginnt die Bindungsreaktion. Dabei bleibt die Summe der Analyte (frei und gebunden) konstant:

$$\alpha \cdot V + \gamma \cdot S = \alpha_0 \cdot V = \text{const} , \quad (2.73)$$

wobei S die Sensoroberfläche ist. Für γ gilt dann

$$\frac{d\gamma}{dt} = k_a \left(\alpha_0 - \frac{S}{V} \gamma \right) \cdot (\beta - \gamma) - k_d \gamma . \quad (2.74)$$

Die Lösung von Gleichung (2.74) konvergiert für $t \rightarrow \infty$. Die Reaktion befindet sich dann in einem Gleichgewichtszustand, in dem dann gilt:

$$\frac{d\gamma}{dt} = 0 , \quad (2.75)$$

woraus folgt:

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{\gamma_{eq}}{\left(\alpha_0 - \gamma_{eq} \frac{S}{V} \right) (\beta - \gamma_{eq})} , \quad (2.76)$$

mit der Komplexoberflächenkonzentration im Gleichgewicht γ_{eq} . Die Größe K wird Gleichgewichtskonstante genannt.

Abbildung (2.11) zeigt ein theoretisches Sensorgramm einer Messung. Bei $t = 0$ beginnt die Analytzufuhr und die freie Analytkonzentration im Volumen springt instantan auf ca. $\alpha = 1,5 \mu M$. Durch die einsetzende Bindungsreaktion fällt diese im zeitlichen Verlauf ab (obere Abbildung), gleichzeitig steigt die Komplexoberflächenkonzentration (mittlere Abbildung) und damit das normierte Messsignal (untere Abbildung). Für $t \rightarrow \infty$ konvergieren alle drei Größen gegen einen Grenzwert. Der Gleichgewichtszustand, der durch die Gleichgewichtskonstante K charakterisiert wird, ist erreicht. In Abbildung (2.11) ist weiterhin noch zu erkennen, dass mit größerer Assoziationskonstante k_a dieses dynamische Gleichgewicht schneller erreicht wird.

[SVP06]

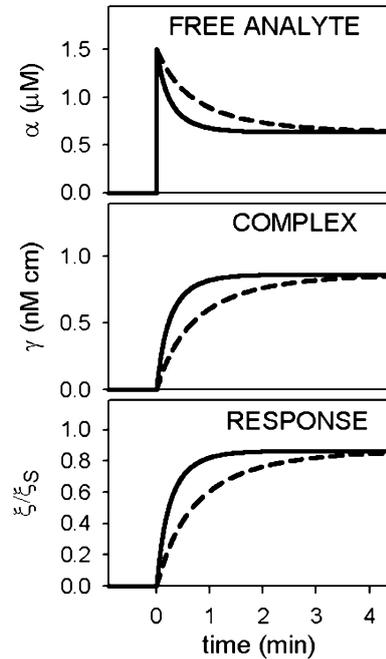


Abbildung 2.11: Sensorgram gemäß Gleichung (2.74). Parameter: $\alpha_0 = 1,5 \mu\text{M}$, $\beta = 10^{-9} \text{Mcm}$, $S = 1 \text{cm}^2$, $V = 1 \mu\text{L}$, $K = 10^7 \text{M}^{-1}$, für die durchgezogene Linie beträgt $k_a = 4,5 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, für die gestrichelte Linie ist $k_a = 1,5 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, Quelle: [SVP06]

2.3.1 Kinetik pseudo-erster Ordnung

Sehr häufig ist die Anzahl Analytmoleküle in dem Volumen V sehr viel größer als die Anzahl der Rezeptormoleküle auf der Goldoberfläche S . In dem Fall kann in Gleichung (2.76) der Term $\gamma \frac{S}{V}$ vernachlässigt werden. Gleichung (2.76) wird zu

$$\frac{d\gamma}{dt} = k_a \alpha_0 (\beta - \gamma) - k_d \gamma. \quad (2.77)$$

Die Gleichgewichtskonstante K wird dann zu

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{\gamma_{eq}}{\alpha_0 (\beta - \gamma_{eq})}. \quad (2.78)$$

Gleichung (2.77) ist formal identisch mit einer Gleichung, die eine Reaktion erster Ordnung beschreibt. Daher wird diese Kinetik Pseudo-erste-Ordnung-Kinetik⁶ genannt. Diese Kinetik ist typisch für Sensoren, bei denen die Analyte mit Hilfe einer Flußzelle kontrolliert werden.

⁶ engl. Pseudo-First-Order Kinetics

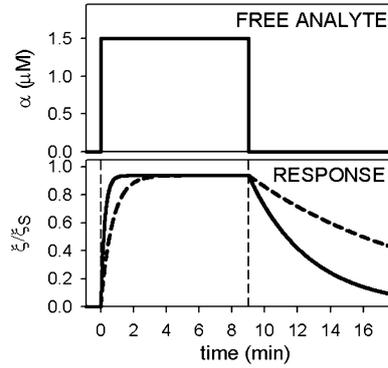


Abbildung 2.12: *Sensorgramm gemäß Pseudo-erste-Ordnung Kinetik. Parameter: $\alpha_0 = 1,5 \mu\text{M}$, $\beta = 10^{-9} \text{Mcm}$, $K = 10^7 \text{M}^{-1}$, für die durchgezogene Linie beträgt $k_a = 4,5 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, für die gestrichelte Linie ist $k_a = 1,5 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Quelle: [SVP06]*

Abbildung (2.12) zeigt ein theoretisches Sensorgramm einer Messung gemäß Gleichung (2.77). Bei $t = 0$ beginnt die Analytzufuhr und die freie Analytkonzentration im Volumen springt instantan auf ca. $\alpha = 1,5 \mu\text{M}$. Aufgrund der großen Anzahl Analytmoleküle in dem Volumen bleibt diese im zeitlichen Verlauf konstant (obere Abbildung) bis sie nach ca. 9 Minuten instantan auf Null abfällt. Dieses Abfallen kann durch einen Spülvorgang erreicht werden, bei dem die Flußzelle mit dem Lösungsmittel ohne gelöste Analyte durchgespült wird.

Nach dem instantanen Anstieg beginnt die Bindungsreaktion und das Messsignal wächst wieder an. Im Vergleich zu Abbildung (2.11) wird das dynamische Gleichgewicht jedoch schneller erreicht. Auch hier ist die größere Geschwindigkeit für das Erreichen des Gleichgewichts bei größerer Assoziationskonstante k_a erkennbar.

Die Gleichgewichtskonstante K einer Bindungsreaktion kann bestimmt werden aus der Abhängigkeit des normierten Messsignal im Gleichgewicht $\frac{\xi_{eq}}{\xi_S}$ und der Analytkonzentration α_0 , die auch Bindungs-Isotherme heisst. Für die Pseudo-erste-Ordnung Kinetik gilt:

$$\frac{\xi_{eq}}{\xi_S} = \frac{K \alpha_0}{1 + K \alpha_0} . \quad (2.79)$$

Abbildung (2.13) zeigt auf der linken Seite Sensorgramme für verschiedene α_0 und die daraus resultierende Bindungs-Isotherme auf der rechten Seite.

Ein großer Vorteil der Gleichgewichts-Analyse ist, dass die Gleichgewichtsphase des Sensorgramms anders als die anderen Phasen unabhängig vom Massentransport (Analytfluss) ist. [SVP06]

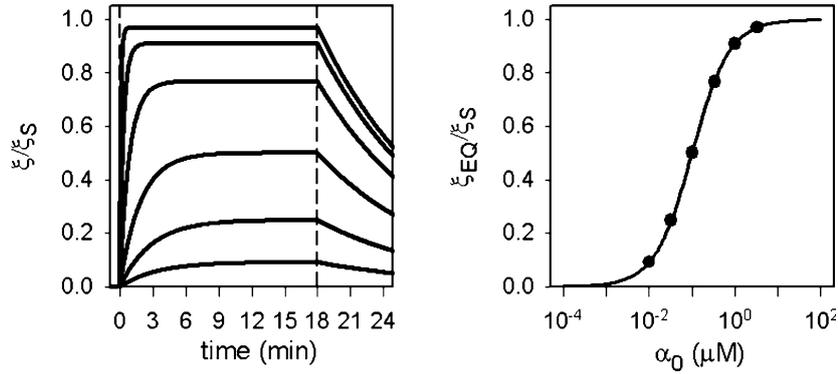


Abbildung 2.13: linke Seite: Sensorgramme für verschiedene α_0 , rechte Seite: Bindungs-Isotherme, Parameter: $\beta = 1 \text{ nMcm}$, $K = 10^7 \text{ M}^{-1}$, $k_a = 4.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Quelle: [SVP06]

2.3.2 Weitere Kinetik-Modelle

Neben der Pseudo-Erste-Ordnung-Kinetik, die die 1:1 Reaktion zwischen einer bestimmten Anzahl Rezeptoren und unbegrenzt vielen Analytmolekülen beschreibt, existieren weitere Kinetik-Modelle für andere Reaktionstypen.

Reaktionen nullter Ordnung sind z. B. Konformationsänderungen von gebildeten Komplexen. Solche Reaktionen können die Reaktionskinetik verlangsamen. Folgende Reaktionsgleichung liegt dieser Reaktion zugrunde:



Mit γ_1 und γ_2 als Oberflächenkonzentrationen der Komplexe in den verschiedenen Konformationen gilt:

$$\frac{\partial \gamma_2}{\partial t} = k_{a2} \gamma_1 - k_{d2} \gamma_2 \quad (2.81)$$

und

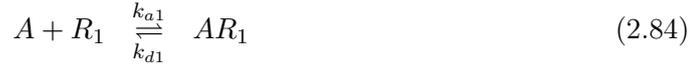
$$\frac{\partial \gamma_1}{\partial t} = k_{a1} \alpha_0 (\beta - \gamma_1 - \gamma_2) - \frac{\partial \gamma_2}{\partial t} . \quad (2.82)$$

Da eine Konformationsänderung die Masse eines Moleküls nicht ändert, gilt für das normierte Messsignal:

$$\frac{\xi_{eq}}{\xi_S} = \frac{\gamma_1 + \gamma_2}{\beta} . \quad (2.83)$$

Ein weiteres Modell ist notwendig, wenn parallel mehrere Reaktionen pseudo-erster-Ordnung ablaufen. Eine solche Situation liegt vor, wenn z. B. mehrere Typen von Rezeptoren oder Analyten an der Reaktion beteiligt sind.

Der erste Fall (mehrere Rezeptortypen) kann durch folgende Reaktionsgleichungen beschrieben werden:



Die Kinetik-Gleichungen lauten dann

$$\frac{\partial \gamma_1}{\partial t} = k_{a1} \alpha_0 (\beta_1 - \gamma_1) - k_{d1} \gamma_1 \quad (2.86)$$

$$\frac{\partial \gamma_2}{\partial t} = k_{a2} \alpha_0 (\beta_2 - \gamma_2) - k_{d2} \gamma_2 \quad (2.87)$$

mit den Konzentrationen

$$\beta_1 = [R_1] = p\beta \quad (2.88)$$

$$\beta_2 = [R_2] = (1 - p)\beta \quad (2.89)$$

$$\gamma_1 = [AR_1] \quad (2.90)$$

$$\gamma_2 = [AR_2] . \quad (2.91)$$

Der Faktor p drückt den auf 1 normierten Anteil von β_1 an β aus. Für das normierte Messsignal ergibt sich dann:

$$\frac{\xi_{eq}}{\xi_S} = \frac{\gamma_1 + \gamma_2}{\beta} . \quad (2.92)$$

Sind zwei verschiedene Konformationen eines Analyten an der Reaktion beteiligt, so gilt:



Mit den Konzentrationen

$$\alpha_1 = [A_1] = p\alpha_0 \quad (2.95)$$

$$\alpha_2 = [A_2] = (1 - p)\alpha_0 \quad (2.96)$$

$$\gamma_1 = [A_1R] \quad (2.97)$$

$$\gamma_2 = [A_2R] . \quad (2.98)$$

ergeben sich folgende Kinetik-Gleichungen:

$$\frac{\partial \gamma_1}{\partial t} = k_{a1}\alpha_1(\beta - \gamma_1 - \gamma_2) - k_{d1}\gamma_1 \quad (2.99)$$

$$\frac{\partial \gamma_2}{\partial t} = k_{a2}\alpha_2(\beta - \gamma_1 - \gamma_2) - k_{d2}\gamma_2 . \quad (2.100)$$

das normierte Messsignal wird zu

$$\frac{\xi_{eq}}{\xi_S} = \frac{\gamma_1 + \gamma_2}{\beta} . \quad (2.101)$$

Diese Gleichungen gelten ebenfalls, wenn es sich statt um zwei verschiedene Konformationen um zwei komplett verschiedene Analyt-Molekülsorten handelt. In diesem Falle muss jedoch noch der Unterschied in der Molekülmasse im Sensorantwortverhalten berücksichtigt werden.

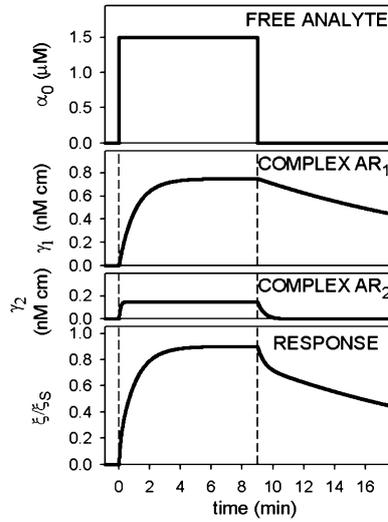
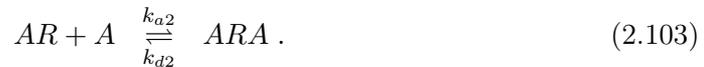


Abbildung 2.14: *Reaktionskinetik zweier parallel ablaufender Reaktionen, Parameter: $\alpha_0 = 1,5\mu M$, $\beta = 1nM\ cm$, $p = 0,8$, $k_{a1} = 10^4 M^{-1}s^{-1}$, $k_{d1} = 0,001s^{-1}$, $k_{a2} = 8 \cdot 10^4 M^{-1}s^{-1}$, $k_{d2} = 0,04s^{-1}$, Quelle: [SVP06]*

Abbildung (2.14) zeigt ein Sensorgramm sowie die dazugehörigen Entwicklungen der Konzentrationen für eine Reaktion, bei der zwei verschiedene Rezeptormolekülararten mit einer Analyt-Sorte im Sinne einer Reaktion pseudo-erster-Ordnung reagieren.

Eine weitere Bindungsreaktionsart ist die multivalente Rezeptor-Bindungsreaktion. Diese liegt vor, wenn ein Rezeptormolekül mehr als nur ein Analytmolekül binden kann. Diese Bindungsart kommt sehr häufig vor. Ein Beispiel ist die Antikörper-Antigen-Reaktion. Solche Reaktionen können durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden:



Mit

$$\gamma_1 = [AR] \quad (2.104)$$

$$\gamma_2 = [ARA] \quad (2.105)$$

gelten für die Kinetikgleichungen:

$$\frac{\partial \gamma_2}{\partial t} = k_{a2} \alpha_0 \gamma_1 - k_{d2} \gamma_2 \quad (2.106)$$

$$\frac{\partial \gamma_1}{\partial t} = k_{a1} \alpha_0 (\beta - \gamma_1 - \gamma_2) - k_{d1} \gamma_1 - \frac{\partial \gamma_2}{\partial t} . \quad (2.107)$$

Für das normierte Messsignal gilt dann:

$$\frac{\xi_{eq}}{\xi_S} = \frac{\gamma_1 + 2\gamma_2}{\beta} . \quad (2.108)$$

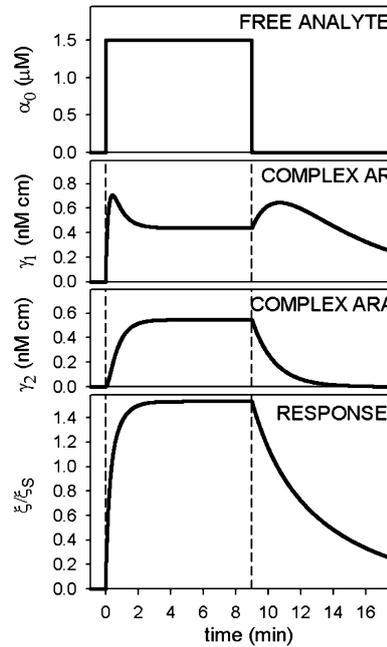


Abbildung 2.15: *Reaktionskinetik einer bivalenten Rezeptor-Reaktion, Parameter:*
 $\alpha_0 = 1,5 \mu M$, $\beta = 1 nM cm$, $k_{a1} = 6 \cdot 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $k_{d1} = 0.003 s^{-1}$,
 $k_{a2} = 10^4 M^{-1} s^{-1}$, $k_{d2} = 0,012 s^{-1}$, *Quelle: [SVP06]*

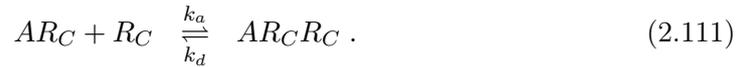
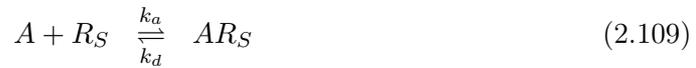
Abbildung (2.15) zeigt ein Sensorgramm sowie die dazugehörigen Entwicklungen der Konzentrationen für eine bivalente Rezeptor-Reaktion.

Das Messsignal ist auf den Zustand normiert, in dem alle Rezeptormoleküle eine 1:1 Bindung mit einem Analyt-Molekül gebildet haben. Die zusätzlichen Bindungen der Analyt-Moleküle an die bereits von einem Analytmolekül besetzten Rezeptormoleküle lassen das normierte Messsignal über eins hinauswachsen, sodass das normierte Messsignal in der unteren Grafik von Abbildung 2.15 gegen ca. 1,5 konvergiert.

Als letzte Bindungsart soll die multivalente Analyt-Reaktion genannt werden. Bei dieser

Bindung bindet ein Analyt-Molekül, das mehrere Bindungsstellen besitzt, an mehreren Rezeptor-Molekülen. Diese Bindungsreaktion hängt stark von der Verteilung der Rezeptormoleküle auf der Oberfläche ab. Damit ein Analyt-Molekül an zwei Rezeptormoleküle binden kann muss der Abstand der beiden Rezeptor-Moleküle kleiner oder gleich dem Abstand der beiden Bindungsstellen des Analyt-Moleküls sein. Bei einer kleinen Oberflächenkonzentration der Rezeptor-Moleküle und den damit im Mittel großen Abständen von zwei Rezeptor-Molekülen ist die Wahrscheinlichkeit für eine Bindung eines Analyt-Moleküls an zwei Rezeptor-Moleküle klein. Mit steigender Oberflächenkonzentration nimmt diese Wahrscheinlichkeit zu. Die das Volumen über Oberfläche kann in kugelförmige Bereiche eingeteilt werden, deren Radien der Abstand der Bindungsstellen eines Analyt-Moleküls sind. Mit der Poisson-Statistik kann der Anteil p der Rezeptoren R_C ermittelt werden, die paarweise in einem solchen Kugelgebiet liegen und damit von einem Analyt-Molekül besetzt werden können. Die restlichen Rezeptor-Moleküle R_S , deren Anteil folglich $(1 - p)$ beträgt, liegen einzeln in solchen Kugelgebieten. Analyt-Moleküle, die an ein solches Rezeptor-Molekül binden, können demzufolge nur an einem Rezeptor-Molekül binden.

Insgesamt geschehen drei Reaktionen:



Hierbei werden die gleichen Bindungsraten für die beiden Analyt-Bindestellen angenommen.

Mit

$$\beta_1 = [R_S] = (1 - p) \beta \quad (2.112)$$

$$\beta_2 = [R_C] = p \beta \quad (2.113)$$

$$\gamma_1 = [AR_S] \quad (2.114)$$

$$\gamma_2 = [AR_C] \quad (2.115)$$

$$\gamma_3 = [AR_C R_C] \quad (2.116)$$

ergeben sich

$$\frac{\partial \gamma_1}{\partial t} = 2k_a \alpha_0 (\beta_1 - \gamma_1) - k_d \gamma_1 \quad (2.117)$$

$$\frac{\partial \gamma_2}{\partial t} = 2k_a \alpha_0 (\beta_2 - \gamma_2 - 2\gamma_3) - k_d \gamma_2 - \frac{\partial \gamma_3}{\partial t} \quad (2.118)$$

$$\frac{\partial \gamma_3}{\partial t} = k_a \gamma_2 \frac{\beta_2 - \gamma_2 - 2\gamma_3}{\beta_2} \frac{1}{V_{sp} N_A} - 2k_d \gamma_3 . \quad (2.119)$$

Der Faktor 2 in den Gleichungen (2.117) und (2.118) repräsentiert die doppelte Wahrscheinlichkeit aufgrund der vorhandenen zwei Bindungsstellen an einem Analytmolekül. Der in Gleichung (2.119) auftretende Faktor $\frac{\beta_2 - \gamma_2 - 2\gamma_3}{\beta_2}$ stellt die Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit eines freien Rezeptor-Moleküls in dem Kugelgebiet, in dem sich der Komplex AR_C befindet, dar. Der Term $\frac{1}{V_{sp} N_A}$, wobei V_{sp} das Volumen eines Kugelgebiets ist und N_A die Avogadro-Konstante ist, stellt die Konzentration der freien Analyte-Moleküle dar, sodass sich nur ein Analyt-Molekül in einem Kugelvolumen befindet. Für das normierte Messergebnis ergibt sich

$$\frac{\xi_{eq}}{\xi_S} = \frac{\gamma_1 + \gamma_2 + 2\gamma_3}{\beta} . \quad (2.120)$$

Anhand der Kinetik-Gleichungen für die verschiedenen Reaktionstypen lassen sich geeignete Fit-Routinen erstellen, mit denen die Messresultate analysiert werden können. Aus diesen Datenfits können dann die gewünschten Parameter bestimmt werden.
[SVP06]

2.3.3 Thermodynamische Betrachtung der Reaktionsraten

Die Gibbs freie Standardenthalpie ΔG° ist direkt abhängig von der Gleichgewichtsassoziationskonstante $K_a = \frac{k_a}{k_d}$ gemäß

$$\Delta G^\circ = -RT \ln (K_a C^0) . \quad (2.121)$$

Dabei sind T die absolute Temperatur in Kelvin, R die allgemeine Gaskonstante und C^0 eine Standardkonzentration, die als $1 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ angenommen werden soll.

Die Temperaturabhängigkeit von ΔG° beschreibt die Gibbs-Helmholtz-Relation

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ , \quad (2.122)$$

wobei ΔH° die Reaktionsenthalpie und ΔS° die Entropieänderung darstellen. Sind ΔH° und ΔS° unabhängig von T , so ergibt der Graph von $\ln (K_a C^0)$ gegen $\frac{1}{T}$ aufge-

tragen eine Gerade, deren Steigung gleich $-\frac{\Delta H^\circ}{R}$ und deren Ordinatenabschnitt gleich $\frac{\Delta S^\circ}{R}$ ist.

Ändert die Bindungsreaktion die spezifische Wärmekapazität C_p , so gilt Gleichung (2.122) in der Form nicht mehr, da dann ΔH° und ΔS° nicht mehr temperaturunabhängig sind. Dann gilt:

$$\Delta G^\circ(T) = \Delta H_{T_0}^\circ - T\Delta S_{T_0}^\circ C_p(T - T_0) + \Delta C_p T \ln\left(\frac{T}{T_0}\right) \quad (2.123)$$

mit der Referenztemperatur T_0 , die für gewöhnlich $T_0 = 25^\circ\text{C}$ ($298,15\text{K}$) gesetzt wird. Um verlässliche Werte für $\Delta H_{T_0}^\circ$, $\Delta S_{T_0}^\circ$ und ΔC_p zu bekommen, müssen Messungen über einen großen Temperaturbereich durchgeführt werden.

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsraten $k_{a,d}$ ist über die Arrhenius-Gleichung mit der Aktivierungsenergie E^{akt} , die ein Maß für die Wärmeenergie ist, die für eine Assoziations- bzw. Dissoziationsreaktion benötigt wird, verknüpft:

$$\ln k = \ln P - \frac{E^{akt}}{RT} . \quad (2.124)$$

Die Größe P ist der Präexponential-Faktor. Da E_a^{akt} und E_d^{akt} als Aktivierungsenthalpien angesehen werden können, gilt

$$\Delta H^\circ = E_a^{akt} - E_d^{akt} . \quad (2.125)$$

Werden die Bindungsraten, die mit einem SPR-Sensor ermittelt werden, mit Reaktionsraten von Bindungsreaktionen, die in freier Lösung stattfinden, verglichen, so stimmen die Ergebnisse nur unter bestimmten Bedingungen überein.

Die Assoziationskonstante für eine Reaktion, deren Reaktanden sich beide in freier Lösung befinden, ist gemäß der Debye-Smoluchowski-Theorie gegeben durch

$$k_a = 4\pi\varphi\varepsilon r \frac{(D_A + D_R) N_A}{1000} . \quad (2.126)$$

Dabei ist φ ein Faktor, der die räumliche Lage der Moleküle zueinander berücksichtigt, ε ist ein Faktor, der elektrostatische Wechselwirkungen berücksichtigt, r ist der Wechselwirkungsradius und D_A und D_R sind die Diffusionskoeffizienten von Analyt- und Rezeptor-Molekül. Der Diffusionskoeffizient beschreibt die Fähigkeit eines Moleküls, seine Position aufgrund der chaotischen Translationsbewegung gerichtet zu verändern.

Für runde Körper in einer Flüssigkeit, mit denen Moleküle idealisiert werden, geht der Diffusionskoeffizient aus dem Stokes'schen Gesetz hervor:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi a \eta}, \quad (2.127)$$

mit der absoluten Temperatur T , der Viskosität η und dem Kugelradius a . Demzufolge sinkt der Diffusionskoeffizient mit steigender Teilchengröße.

Ist, wie bei einem SPR-Sensor, ein Molekül auf einer Oberfläche immobilisiert, so ist dessen Diffusionskonstante nahezu Null und fällt aus dem in Klammern stehenden Term in Gleichung (2.126) raus, sodass nur noch die Diffusion der Analyt-Moleküle eine Rolle spielt. Das Analogon dazu ist die Situation, bei der das Rezeptor-Molekül viel größer ist als das Analyt-Molekül. Auch dann kann die Diffusionskonstante des Rezeptor-Moleküls vernachlässigt werden. SPR-Analysen solcher Reaktionen stimmen dann sehr gut mit Analysen überein, bei denen sich beide Moleküle in freier Lösung befinden. Für Reaktionen, deren Reaktanden in der gleichen Größenordnung liegen, sind die Ergebnisse von SPR-Analysen nicht in guter Übereinstimmung mit anderen Analysemethoden, da in diesem Falle die Diffusion der Rezeptor-Moleküle eine nicht mehr zu vernachlässigende Rolle spielt.

Demzufolge sind SPR-Analysen besser geeignet für vergleichende Studien, die Affinitäten oder andere Reaktionscharakteristiken untersuchen.

Neue, theoretische Modelle, die es ermöglichen, von SPR-Analysen auf freie Reaktionen zu schließen, sind Gegenstand aktueller Forschung [SVP06].

2.3.4 Einfluss von Massentransport-Effekten

Der in den obigen Kapiteln angenommene, instantane Sprung der Analyt-Konzentration auf einen Gleichgewichtswert bei Injektion der Analyt-Moleküle ist nur eine Idealisierung. Die für die Reaktion relevante Analyt-Konzentration an der Oberfläche stellt sich langsamer ein, da die Moleküle erst aus dem Flusszellenvolumen zur Oberfläche gelangen müssen. Der Fluss der Analyt-Lösung bewirkt eine Verzögerung der Bildung der Gleichgewichtsoberflächenkonzentration des Analyten. Mit zunehmender Flussgeschwindigkeit verlangsamt sich die Entwicklung der Gleichgewichtsanalytkonzentration. Durch die verzögerte Analyt-Konzentration verlangsamt sich die Assoziationsreaktion.

Desweiteren verlangsamt sich durch die Verzögerung der Gleichgewichtskonzentration die Dissoziationsreaktion, da die Oberflächenanalytkonzentration Null ebenfalls langsamer erreicht wird.

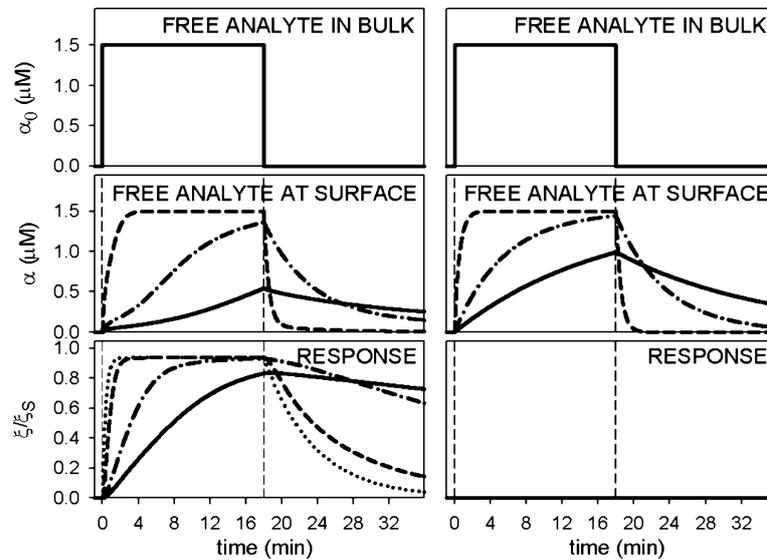


Abbildung 2.16: Einfluss der Geschwindigkeit zur Einstellung eines Gleichgewichts der Oberflächenanalytkonzentration auf eine pseudoerste-Ordnung-Reaktion, Parameter: $\alpha_0 = 1,5\mu\text{M}$, $\beta = 10^{-9}\text{Mcm}$, Links: $k_a = 0,03\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d = 0,003\text{s}^{-1}$, Analyt-Diffusionsflüsse: gestrichelte Kurve: $\frac{k_M}{h_{\text{layer}}} = 3 \cdot 10^{-5}\text{s}^{-1}\text{cm}^{-1}$, gestrichelt-gepunktete Kurve: $\frac{k_M}{h_{\text{layer}}} = 3 \cdot 10^{-6}\text{s}^{-1}\text{cm}^{-1}$, durchgezogene Kurve: $\frac{k_M}{h_{\text{layer}}} = 10^{-6}\text{s}^{-1}\text{cm}^{-1}$, gepunktete Kurve: idealisiert instantane Entwicklung, Rechts: keine Bindungsreaktion, Quelle: [SVP06]

Abbildung (2.16) zeigt den Effekt des Analyt-Transports. Je langsamer der Fluss durch die Zelle ist, desto langsamer ist der Reaktionsverlauf. Durch den Vergleich der linken mit der rechten Seite ist der Einfluss der Reaktion auf die Geschwindigkeit, mit der sich das Analytoberflächenkonzentrationsgleichgewicht einstellt, zu erkennen. Ohne Bindungsreaktion wird das Gleichgewicht erwartungsgemäß schneller erreicht [SVP06].

2.4 Analyt-Transport in Flusszellen

Die Flusszelle besteht aus einem Kanal mit Einlass- und Auslassöffnungen jeweils an den Enden des Kanal. Dieser Kanal leitet die Analytlösung über die Goldschicht.

Für den Kanal der Flusszelle soll im Folgenden ein rechteckiger Querschnitt angenommen werden. Die Breite der Flusszelle sei w , die Höhe sei h und die Länge l . Die Flusscharakteristik wird durch die dimensionslosen Reynoldszahlen beschrieben.

Sie sind folgendermaßen definiert:

$$Re = \frac{\rho\Phi}{\eta h} . \quad (2.128)$$

dabei sind ρ und η die Dichte und dynamische Viskosität der Flüssigkeit, Φ ist der Volumenfluss mit der Einheit $\left[\frac{m^3}{s}\right]$ und h die Kanalhöhe.

Ein laminarer Fluss, d. h. ein Fluss ohne turbulente Strömungen ist gegeben, wenn die Reynoldszahl des Systems kleiner 2100 ist [SVP06].

Für Wasser bei einer Temperatur von $T=20^\circ\text{C}$ berechnet sich die Reynoldszahl nach

$$Re = \frac{\Phi}{h} \cdot 0.998 \frac{\text{mm}^2}{s} . \quad (2.129)$$

Für Flusszellen in üblichen Dimensionen, d. h. mit Kanalhöhen im Bereich 10^{-2} bis 10^{-3} cm und Breiten im Bereich von 1 bis 10^{-2} cm, bleiben die Reynoldzahlen unter 1000, sodass in Flusszellen laminare Strömungen vorherrschen. Daher kann das Geschwindigkeitsprofil des Flusses als konstant über die Sensoroberfläche angesehen werden.

Sei x die Koordinate entlang der Flusszellenlänge, y ist die Dimension entlang der Höhe und z entlang der Breite. Der Betrag der Geschwindigkeit hängt hauptsächlich von der y -Koordinate ab. Die z - Abhängigkeit wird vernachlässigt, da davon ausgegangen wird, dass die Kanalwände in z -Richtung genügend Abstand zu der Sensoroberfläche besitzen.

Das Geschwindigkeitsprofil entlang der y -Koordinate ist parabolisch. Bei $y = 0$ und $y = h$ ist die Geschwindigkeit Null, bei $y = \frac{h}{2}$ ist die Geschwindigkeit maximal. Sie berechnet sich gemäß

$$v_{\max} = \frac{3}{2} \frac{\Phi}{hw} . \quad (2.130)$$

Aufgrund der Vernachlässigbarkeit der z -Komponente reduziert sich das Problem auf zwei Raumdimensionen. Die Analyt-Konzentration α ist nun abhängig von x und y , $\alpha = \alpha(x, y, t)$. Die Zeitabhängigkeit ist gegeben durch die Kontinuitätsgleichung.

Für α gilt, für den Fall, dass nur die laminare Strömung als Transportmechanismus wirkt, folgende Differentialgleichung:

$$\frac{\partial\alpha(x, y, t)}{\partial t} = -v(y) \frac{\partial\alpha(x, y, t)}{\partial x} = -4v_{\max} \frac{y}{h} \left(1 - \frac{y}{h}\right) \frac{\partial\alpha(x, y, t)}{\partial x} . \quad (2.131)$$

Um die Entwicklung der Analyt-Konzentration nach Einlass von Analyt-Molekülen zu berechnen, muss Gleichung (2.131) mit den Randbedingungen

$$\alpha(0, y, t) = \alpha_0 \quad (2.132)$$

$$\alpha(x, y, 0) = 0 \quad (2.133)$$

gelöst werden. α_0 ist die Anfangskonzentration der Analyt-Moleküle.

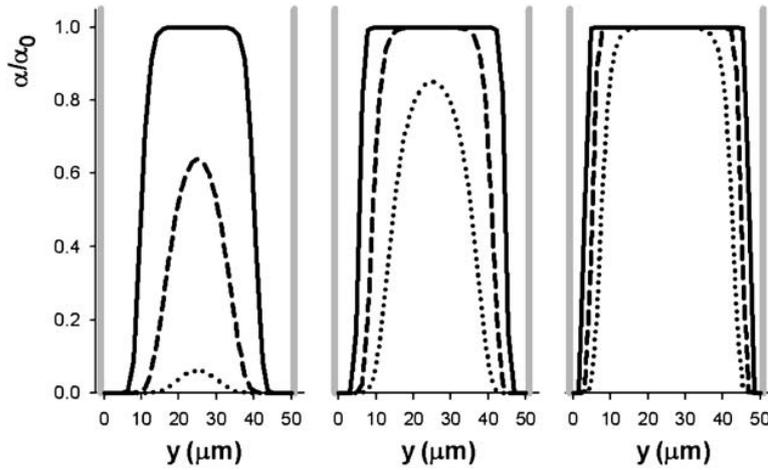


Abbildung 2.17: Analyt-Konzentration in einer Flusszelle mit den Maßen $l = 20\text{mm}$, $w = 2,7\text{mm}$ und $h = 0,05\text{mm}$, 10mm nach der Einlassöffnung. Gepunktete Kurven: 3s nach Einlass, gestrichelte Kurven: 6s nach Einlass, durchgezogene Kurven: 15s nach Einlass. linkes Bild: $\Phi = 10 \frac{\mu\text{L}}{\text{min}}$, mittleres Bild: $\Phi = 30 \frac{\mu\text{L}}{\text{min}}$, rechtes Bild: $\Phi = 90 \frac{\mu\text{L}}{\text{min}}$, Quelle:[SVP06]

Abbildung (2.17) zeigt die Lösungen von Gleichung (2.131). Die Analyt-Konzentration auf der Sensoroberfläche, die sich bei $y = 0$ befindet, wäre demzufolge stets Null. Dies würde bedeuten, dass keine Reaktionen zu beobachten wären. Der laminare Fluss allein ist also ein sehr ineffektiver Transportmechanismus.

Ein weiterer Transportmechanismus ist die Diffusion der Analyt-Moleküle, die durch das erste Ficksche Gesetz beschrieben wird. Dieses beschreibt eine Proportionalität zwischen Diffusionsrate und Konzentrationsgradient. Die Proportionalitätskonstante ist die Diffusionskonstante D , die nach Gleichung (2.127) berechnet wird.

Wird die Diffusion berücksichtigt, so ändert sich Gleichung (2.131) zu

$$\frac{\partial \alpha(x, y, t)}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \alpha(x, y, t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \alpha(x, y, t)}{\partial y^2} \right) - 4v_{\max} \frac{y}{h} \left(1 - \frac{y}{h} \right) \frac{\partial \alpha(x, y, t)}{\partial x}. \quad (2.134)$$

Abbildung (2.18) zeigt die Lösungen von Gleichung (2.134). Als Randbedingungen dienen wieder Gleichungen (2.132) und (2.133).

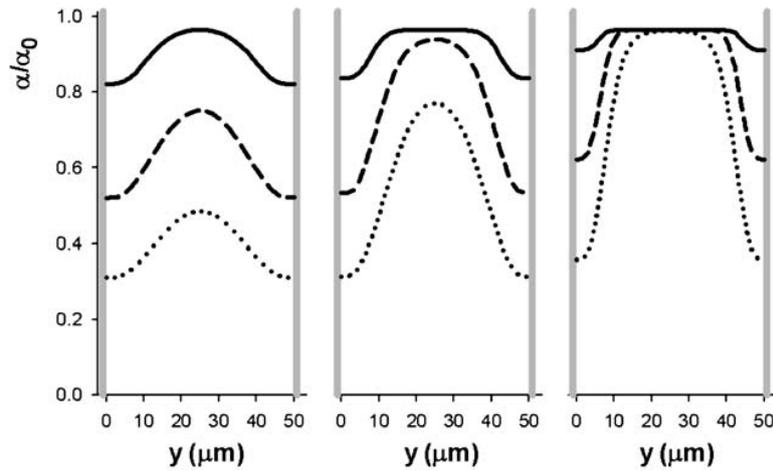


Abbildung 2.18: *Analyt-Konzentrationen in der Flusszelle mit berücksichtigter Diffusion, Parameter siehe Bildunterschrift von Abbildung (2.17), Quelle: [SVP06]*

Zu sehen ist, dass dank der Diffusion Analyt-Moleküle die Sensoroberfläche erreichen. Diese Umstände stellen Anforderungen an das Flusszellendesign. Um die reine Reaktionsdynamik unverfälscht zu untersuchen, darf diese nicht durch die Diffusion der Analyt-Moleküle aus der Lösung zur Sensoroberfläche begrenzt sein. Dies ist zu erreichen, indem die Kanalhöhe so gering wie möglich gehalten wird, sodass die Strecke, die die Moleküle diffundieren müssen, minimiert wird.

Damit der Fluss über der Sensorfläche laminar ist, müssen Einlass und Auslass der Flusszelle genügend weit entfernt von der Sensorfläche sein, da dort Turbulenzen entstehen.

Die Abstände der Sensoroberfläche von den Kanalwänden müssen ebenfalls groß genug sein, damit die z -Abhängigkeit vernachlässigt werden kann. [SVP06]

3 Messaufbau

Um biochemische Reaktionen möglichst genau zu untersuchen, muss die Detektion der Änderung des Resonanzwinkels von hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung sein. Die Auflösung ist die kleinste, detektierbare Signaländerung und ist begrenzt durch das Signal-Rausch-Verhältnis. Das Rauschen setzt sich zusammen aus thermischen und mechanischen Rauschen, Fluktuationen der Laserintensität sowie dem Rauschen der Elektronik.

Bei der $\theta/2\theta$ - Methode, bei der durch Rotation des Prismas und des Detektors das komplette Winkelspektrum erfasst wird, ist die räumliche Auflösung begrenzt durch den Fehler in der Winkelposition. Fehlerquellen dabei sind unter anderem Spiel in den Lagern der Drehvorrichtungen und Fluktuationen in der Lichtintensität. Winkelauflösungen, die mit dieser Methode erreicht werden können, liegen im Bereich von $10^{-2} - 10^{-3}$ Grad.

Die zeitliche Auflösung ist begrenzt durch die Geschwindigkeit, mit der ein Winkelspektrum aufgenommen werden kann. Bei der $\theta/2\theta$ - Methode werden mehrere Sekunden zur Aufnahme eines Spektrums benötigt.

Um verschiedene Detektionstechniken besser vergleichen zu können, werden statt der Winkelauflösung die kleinste, detektierbare Änderung im Brechungsindex in RIU ¹ angegeben. Obige Winkelauflösungen entsprechen etwa $10^{-5} - 10^{-6}$ RIU [TBH⁺99].

Die Anwesenheit des Lösungsmittels ändert zusätzlich die Resonanzbedingungen. Dieser Umstand bewirkt eine Verfälschung der Analyse der Reaktion. Er kann umgangen werden, wenn zusätzlich eine Referenzmessung mit dem Lösungsmittel allein durchgeführt wird und diese Ergebnisse von den Ergebnissen der eigentlichen Messung subtrahiert werden.

Im Folgenden wird eine Technik beschrieben, die Auflösungen von ca. 10^{-8} RIU bzw. 10^{-5} Grad und höher erreichen kann und dabei die Referenzmessung parallel durchführt. Dies hat zusätzlich den Vorteil, dass beide Messungen (eigentliche- und Referenzmessung) unter den gleichen Voraussetzungen und Störeinflüssen geschehen. Fehlerquellen, wie mechanische Spannungen oder Wärmeausdehnungen der Apparatur wirken sich auf

¹ *engl.* Refractive Index Unit

beide Messungen aus. Durch den Vergleich mit der Referenzmessung werden diese Fehler jedoch wieder weitestgehend subtrahiert. Man erhält ein unverfälschtes Ergebnis und die Auflösung hängt hauptsächlich vom elektronischen Rauschen ab. Diese Methode basiert auf den Arbeiten [TBH⁺99] und [ZBT02].

3.1 Messprinzip

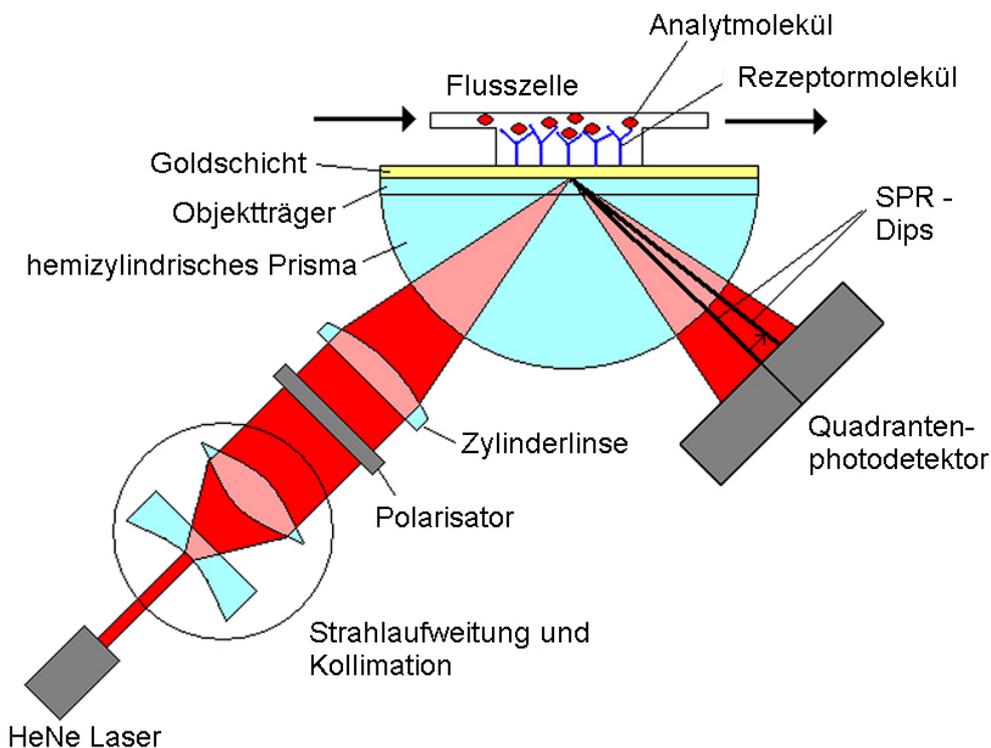


Abbildung 3.1: Skizze des Aufbaus

Ein Laserstrahl wird aufgeweitet, kollimiert, p-polarisiert und durch eine Zylinderlinse auf einen Goldfilm fokussiert. Dieser Goldfilm ist auf einer Seite eines hemizylindrischen Glasprismas aufgebracht und in zwei räumlich voneinander getrennte Bereiche aufgeteilt. Die beiden Bereiche der Goldfläche werden von dem durch die Zylinderlinse entstandenen Linienfokus gleichmäßig beleuchtet. Auf diese Weise fällt Licht instantan auf einem ganzen Winkelspektrum auf die Goldoberfläche. Dieses Winkelspektrum wird begrenzt durch den Öffnungswinkel der Zylinderlinse. Ein Bereich der Goldoberfläche dient als Referenzfläche, auf der keine biochemischen Reaktionen stattfinden. Der andere Bereich dient als Fläche, auf der die zu untersuchenden Reaktionen stattfinden. Sie soll im Folgenden Probenfläche genannt werden.

Treffen Lichtstrahlen aus dem Lichtkegel, der durch die Zylinderlinse entsteht, unter dem Resonanzwinkel auf die Goldoberflächen, so entsteht in dem Lichtkegel des reflektierten Lichts eine schmale, dunkle Linie, der sogenannte Resonanz-Dip (siehe Abbildung 2.9).

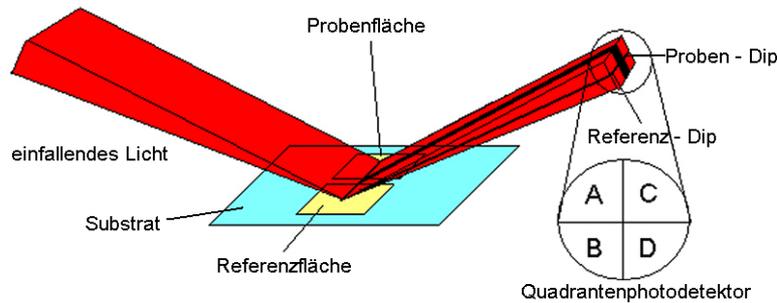


Abbildung 3.2: Messprinzip, Quelle: reproduziert nach [ZBT02]

Werden vor einer Messung die Referenz- bzw. Probenflächen so funktionalisiert, dass nur auf der Probenfläche eine Reaktion stattfinden kann, so kann sich auch nur in dem reflektierten Licht der Probenfläche der Resonanz-Dip aufgrund der Reaktion ändern. Da auf der Referenzfläche durch die entsprechende Funktionalisierung die zu untersuchende Reaktion nicht stattfindet, liefert die Referenzmessung nur die Änderungen der Resonanzbedingungen bedingt durch das Lösungsmittel und anderen Störungen, wie z. B. das thermische und mechanische Rauschen. Wird das Referenzsignal vom Probensignal subtrahiert, so ergibt sich das Signal, das einzig und alleine durch die Reaktion auf der Probenfläche entsteht und die biochemische Reaktion charakterisiert. In [ZBT02] wurde so die Auflösung um einen Faktor Zehn erhöht.

Um die Änderung des Resonanzwinkels aufzunehmen, muss der Versuchsaufbau folgendermaßen aufgebaut und justiert werden:

Der Einfallswinkel des einfallenden Lichts wird so eingestellt, dass sich die Resonanz-Dips von Proben- und Referenzfläche im reflektierten Lichtkegel jeweils in der Mitte befinden. Daraufhin wird ein Quadrantenphotodetektor so positioniert, dass sich die Resonanz-Dips von sowohl Probenfläche als auch Referenzfläche jeweils zwischen zwei Quadranten des Photodetektors *A* und *B* bzw. *C* und *D* befinden. (siehe 3.2). Die Differenzen der Signale $A - B$ und $C - D$ dieser zwei Bereiche müssen jeweils null ergeben. Ändern sich die Oberflächenbeschaffenheiten der beiden Goldschichten, so wandern die Resonanz-Dips auf dem Quadrantenphotodetektor und die Differenzen $A - B$ und $C - D$ ändern sich. Die Änderungen der Differenzen sind linear proportional zu den Änderungen in den Positionen des Resonanzwinkels, die ihrerseits wiederum linear proportional zu den Änderungen der dielektrischen Konstanten der Medien auf den Goldschichten sind. Da der Dip jedoch von der Form her nicht symmetrisch um den Resonanzwinkel

ist (siehe Abbildung 2.6), beschränkt sich die lineare Proportionalität zwischen Dip-Position und Intensitätsdifferenz auf ein kleines Intervall um den Resonanzwinkel, auf dem der Dip als symmetrisch angesehen wird.

Mathematisch kann das Signal eines Quadranten des Detektors als Integral der Funktion 2.63 innerhalb bestimmter Grenzen angesehen werden. Wird der Aufbau wie oben beschrieben justiert, sodass $A - B$ gegen null geht, so gilt für die Signale A, B :

$$A = \int_{\Phi - \frac{\theta_0}{2}}^{\Phi} R(\theta, \varepsilon) d\theta \quad (3.1)$$

und

$$B = \int_{\Phi}^{\Phi + \frac{\theta_0}{2}} R(\theta, \varepsilon) d\theta . \quad (3.2)$$

Dabei ist Φ der Einfallswinkel des Lichts, das genau auf die Mitte des Detektors zwischen die beiden Quadranten fällt. Φ ergibt sich aus der Bedingung $A - B = 0$. Aufgrund des unsymmetrischen Dips weicht dieser Winkel leicht (ca. $0,1^\circ$) von der wahren Position des Resonanzwinkels ab. Die Größe θ_0 ist der Konvergenzwinkel der Fokussierung durch die Linse. Mit Hilfe der Ausdrücke 3.1 und 3.2 lässt sich die Beziehung zwischen der Resonanzwinkeländerung $\Delta\theta$ und der Größe $\frac{A-B}{A+B}$, dem normierten Differenzsignal, berechnen.

Die lineare Proportionalität von $\frac{A-B}{A+B}$ zu $\Delta\theta$ für kleine $\Delta\theta$ lässt sich durch folgende mathematische Betrachtung erklären:

Sei $R(\Delta\theta)$ die Reflektivität in Abhängigkeit der Resonanzwinkeländerung $\Delta\theta$. Für kleine $\Delta\theta$ lässt sich $R(\Delta\theta)$ nach Taylor um Null entwickeln:

$$R(\Delta\theta) = R(0) + \frac{dR(0)}{d\Delta\theta} \cdot (\Delta\theta) + \frac{1}{2} \cdot \frac{d^2R(0)}{d\Delta\theta^2} \cdot (\Delta\theta)^2 + O(\Delta\theta) . \quad (3.3)$$

Dabei steht $O(\Delta\theta)$ für die höheren Ordnungen der Entwicklung.

Da $R(0)$, also die Intensität am Resonanzwinkel, sehr klein ist und die Reflektivität bei θ_R ein Minimum aufweist und somit $\frac{dR(0)}{d\Delta\theta} = 0$ ist, kann $R(\Delta\theta)$ mit dem quadratischen Term der Entwicklung angenähert werden (siehe Abbildung (3.3)).

Mathematisch handelt es sich bei diesem quadratischen Term um eine Parabel. Wird damit der Ausdruck $\frac{A-B}{A+B}$ berechnet, so ergibt sich:

$$\frac{A - B}{A + B} = \frac{6 \cdot \Delta\theta}{\theta_0} , \quad (3.4)$$

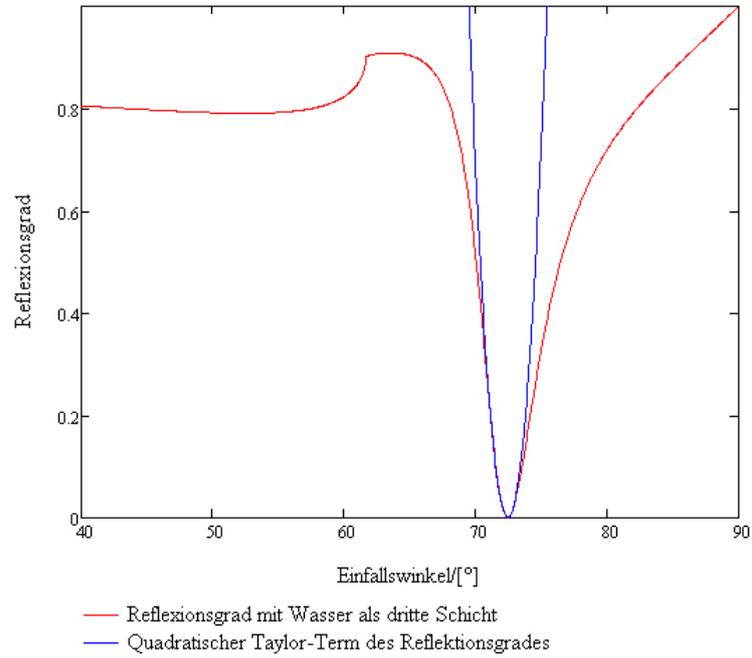


Abbildung 3.3: Der quadratische Taylor-Term als Näherung des Reflexionsgrades am Resonanzwinkel

was die Linearität zwischen $\frac{A-B}{A+B}$ und kleinen $\Delta\theta$ beschreibt [TBH⁺99].

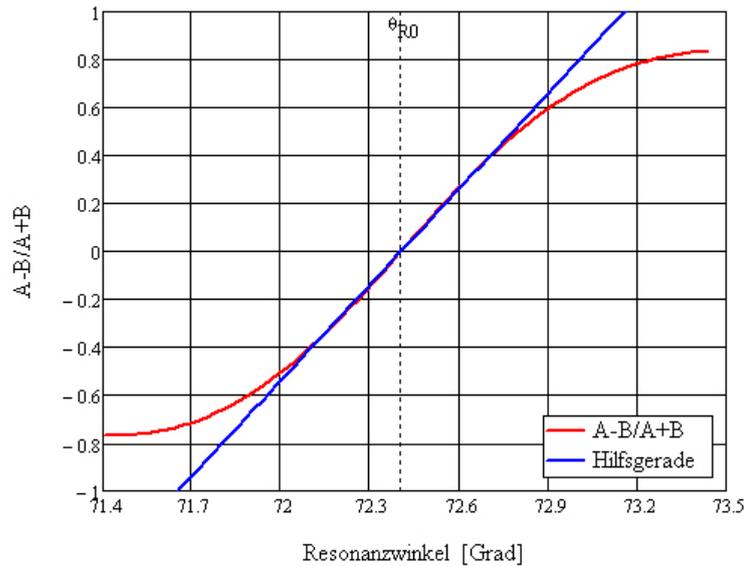


Abbildung 3.4: Beziehung zwischen $(A - B/A + B)$ und dem Resonanzwinkel

Abbildung 3.4 zeigt die Beziehung zwischen dem Resonanzwinkel θ_R und dem $\frac{A-B}{A+B}$ (rote Kurve). Der Winkel θ_{R0} ist der Resonanzwinkel für Wasser, der als Bezugspunkt für die Winkeländerungen dient. Er beträgt $\theta_{R0} = 72,404^\circ$. Die blaue Linie ist eine Hilfsgerade, die die Abweichung von der Linearität verdeutlichen soll. Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen ist, kann in einem Winkelbereich von ca. $0,8^\circ$ von einer linearen Proportionalität gesprochen werden. Dieser lineare Winkelbereich ist für die Untersuchungen biochemischer Reaktionen ausreichend groß. Soll der lineare Bereich dennoch größer sein, so ist dies leicht durch Vergrößerung des Konvergenzwinkels θ_0 zu erreichen [TBH⁺99].

Nach Gleichung 3.4 sollte die Steigung der Geraden in Abbildung 3.4 mit einem Konvergenzwinkel von $\theta_0 = 3,764^\circ$, wie er bei diesem Aufbau zum Einsatz kommt, ca. $1,6 \frac{V}{\text{Grad}}$ betragen. Es ist jedoch in Abbildung 3.4 zu erkennen, dass die Steigung nur etwa $1,33 \frac{V}{\text{Grad}}$ beträgt. Diese Diskrepanz liegt in der Tatsache begründet, dass für die Herleitung von Ausdruck 3.4 nur der quadratische Term der Taylorentwicklung berücksichtigt wurde und alle höheren Ordnungen vernachlässigt worden sind.

Aus Abbildung (2.7) und Abbildung (3.4) lässt sich die Kalibrationskurve des Sensors erstellen.

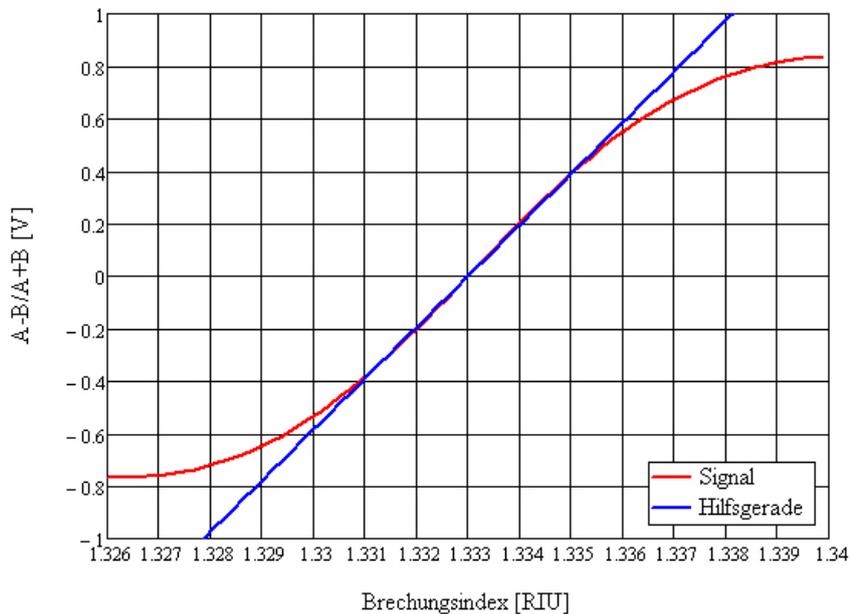


Abbildung 3.5: Kalibrationskurve des Sensors

Abbildung (3.5) zeigt die Kalibrationskurve des Sensors. Auch hier stellt die blaue Gerade eine Hilfslinie dar. Die Steigung der Kalibrationskurve im linearen Bereich, die

definitionsgemäß der Sensitivität des Sensors entspricht [HP06], beträgt $194,74 \frac{V}{RIU}$.

Durch die Verwendung eines Quadrantenphotodetektors anstelle eines Linear Diode Array bzw. eines CCD Chips kann die Auflösung theoretisch von $10^{-5} - 10^{-6}$ RIU auf 10^{-8} RIU und darüber hinaus erhöht werden. Da Daten von nur vier Kanälen (bei einem Linear Diode Array sind es z. B. 1024 Kanäle), erhöht sich zusätzlich die Geschwindigkeit der Datenerfassung, die durch die Elektronik begrenzt ist.

Durch die Normierung der Signale fällt die Fluktuation der Laserintensität als Rauschquelle weg.

3.2 Komponenten des Messaufbaus

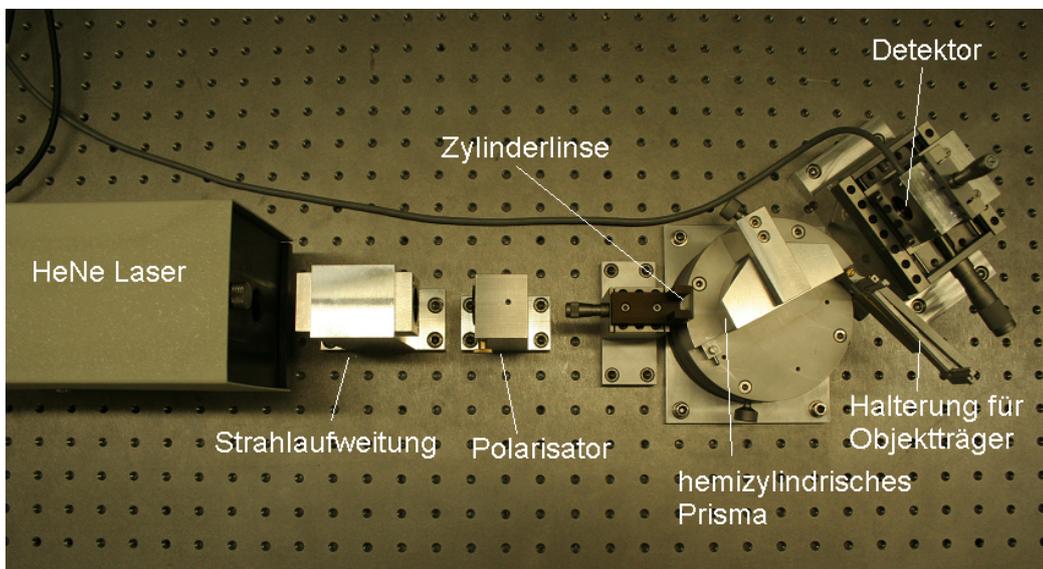


Abbildung 3.6: Foto des Aufbaus

3.2.1 Laser

Als Lichtquelle dient ein Helium-Neon-Laser der Firma SPECTRA PHYSICS, Model 107A. Dieser cw-Laser mit der Wellenlänge von $\lambda = 632.8$ nm wird in der TEM₀₀-Mode betrieben und besitzt eine Leistung von 28 mW.

Um das Strahlprofil zu untersuchen, wurde der Laserstrahl mit einer Digitalkamera (CANON EOS 350D) ohne Objektiv aufgenommen.

Abbildung 3.7(a) zeigt das Strahlprofil des verwendeten Lasers. Um den Strahlradius (die Breite zwischen den Punkten, bei denen die Intensität des gaußschen Profils auf

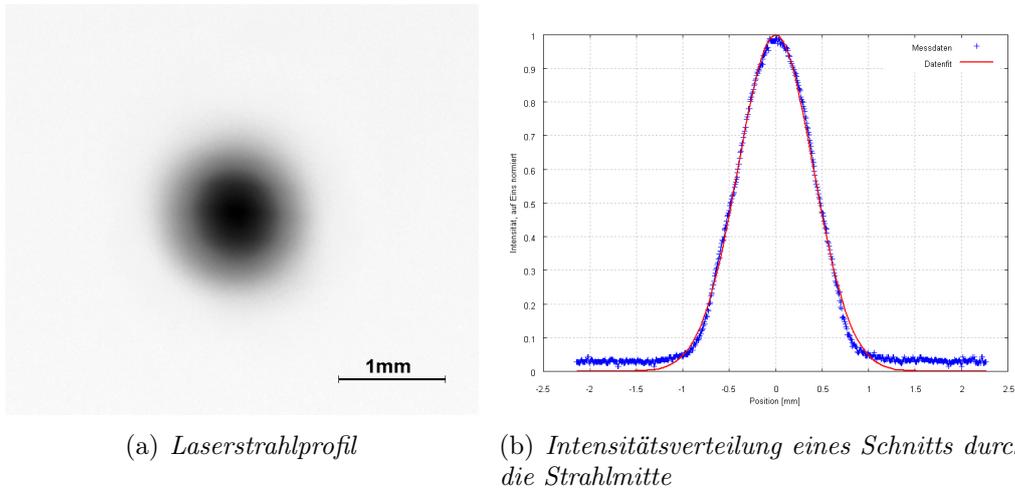


Abbildung 3.7

$\frac{1}{e^2}$ abgefallen ist) zu bestimmen, wird die Intensitätsverteilung eines Schnitts durch die Strahlmitte mit Hilfe des Programms IMAGEJ aufgenommen und die Werte mit dem Programm GNUPLOT auf eine auf Eins normierte Exponentialfunktion vom Typ $f(x) = \exp(-(\frac{x}{a})^2)$ gefittet. Für a ergibt sich $a = 0,571814$, woraus ein Strahlradius von $R = 0,808667$ mm resultiert. Sowohl die Daten als auch der Fit sind in Abbildung 3.7(b) zu sehen.

Ein Laserstrahl in der TEM₀₀ - Mode ist ein Gauß-Strahl. Ein Gauß-Strahl ist eine hybride Mischung aus ebener Welle und einer Kugelwelle. Mathematisch beschrieben wird ein Gauß-Strahl durch eine Kugelwelle mit einem komplexen Mittelpunkt [Mes99].

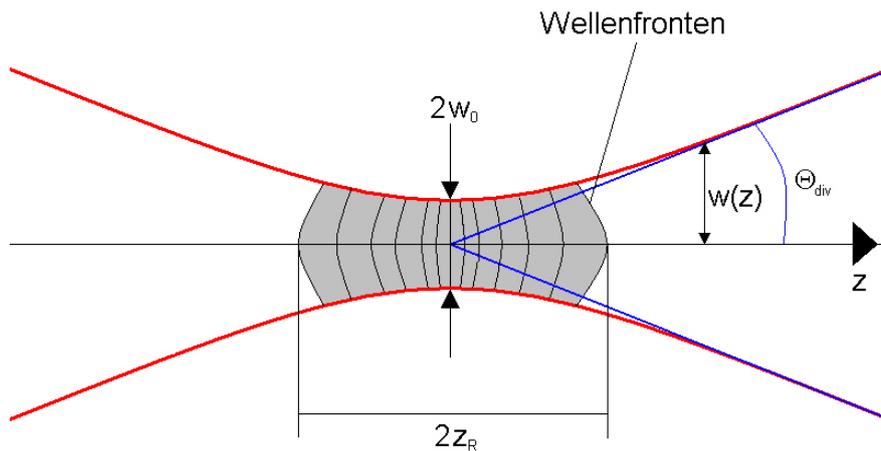


Abbildung 3.8: Prinzip eines Gauß-Strahls

Abbildung 3.8 zeigt schematisch einen Gauß-Strahl. Die charakteristischen Größen

eines Gauß-Strahls sind die Rayleigh-Länge z_R , die die Länge entlang der Ausbreitungsrichtung z angibt, nach der der Strahlradius $w(z)$ auf das $\sqrt{2}$ -fache des Strahlradius in der Strahltaile w_0 angestiegen ist. Der $2z_R$ -lange Bereich um die Strahltaile (in Abbildung 3.8 grau markiert) wird Rayleigh-Zone genannt. Ihre Länge wird auch als konfokaler Parameter bezeichnet. [Mes99]. Nahe der Strahltaile innerhalb der Rayleigh-Zone sind nahezu parallele Wellenfronten zu beobachten, der Strahl verhält sich wie eine ebene Welle. Die Krümmungsradien der Wellenfronten sind sehr groß, in der Strahltaile ist der Radius der dortigen Wellenfront unendlich. Mit zunehmenden Abstand von der Strahltaile nehmen die Beträge der Radien der Wellenfronten stark ab. Am Rand der Rayleigh-Zone ist der kleinste Radius der Wellenfronten zu beobachten. Mit weiter zunehmenden Abstand steigen die Radien wieder an. Der Anstieg verläuft dann linear, analog zu einer Kugelwelle. Das besondere an Laserstrahlen sind die sehr großen Rayleigh-Längen, entlang derer sich der Strahldurchmesser nur schwach ändert. Daher machen Laserstrahlen einen divergenzfreien Eindruck. Der Strahltaillenradius w_0 hängt nach [Mes99] mit der Rayleighlänge z_R folgendermaßen zusammen:

$$w_0^2 = \frac{\lambda \cdot z_R}{\pi n} . \quad (3.5)$$

Dabei ist λ die Lichtwellenlänge und n der Brechungsindex des Mediums, in dem sich der Strahl ausbreitet. Eine weitere charakteristische Größe eines Gauß-Strahls ist sein Divergenzwinkel Θ_{Div} . Er berechnet sich nach

$$\Theta = \frac{w_0}{z_R} = \sqrt{\frac{\lambda}{\pi z_R n}} . \quad (3.6)$$

Für den verwendeten He-Ne-Laser ergibt sich mit dem Strahltaillenradius von $w_0 = 0.808667$ mm eine Rayleighlänge von $z_R = 3,247$ m und ein Divergenzwinkel von $\Theta_{\text{Div}} = 0,014^\circ$.

3.2.2 Aufweitung und Fokussierung

Um den Laserstrahl aufzuweiten, wird ein afokales Linsensystem in den Strahlengang eingebracht. Dieses Linsensystem besteht aus einer konkaven Linse mit einer Brennweite von $f_1 = -40,45$ mm. In einem Abstand von $d = 61,15$ mm folgt eine konvexe Linse mit einer Brennweite von $f_2 = 101,6$ mm. Bei diesem Abstand d fallen die Brennpunkte beider Linsen zusammen. Auf diese Weise verschwindet die Brechkraft des Linsensystem. Der vor dem Eintritt in das Linsensystem parallele Laserstrahl bleibt parallel. Jedoch

ändert sich der Strahlradius R .

Nach [Mes99] berechnet sich der Radius des aufgeweiteten Laserstrahl gemäß

$$R_{\text{aufgeweitet}} = \left| \frac{f_2}{f_1} \right| \cdot R. \quad (3.7)$$

Mit $R = 0,808667$ mm ergibt sich durch die Aufweitung mit dem Faktor 2,51 ein Radius von $R_{\text{aufgeweitet}} = 2,03116$ mm.

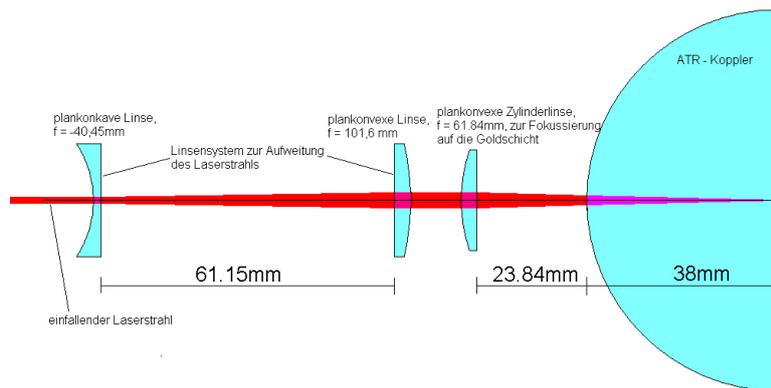


Abbildung 3.9: Skizze des verwendeten optischen Aufbaus

Dieser aufgeweitete Laserstrahl wird durch eine Zylinderlinse mit einer Brennweite von $f = 61,84$ mm durch den ATR-Koppler auf die Goldschicht fokussiert. Da sich die Goldschicht direkt im Konstruktionsmittelpunkt der halbkreisförmigen Grundfläche des ATR-Kopplers befindet, treffen alle Lichtstrahlen durch die Fokussierung senkrecht auf die gekrümmte Mantelfläche des ATR-Kopplers. Dies hat zur Folge, dass die Lichtstrahlen an der Grenzfläche nicht gebrochen werden und ihre Bewegungsrichtung beibehalten. Das gleiche gilt für die an der Goldschicht reflektierten Lichtstrahlen. Beim Austritt aus dem ATR-Koppler treffen sie ebenfalls senkrecht auf die Grenzfläche und werden nicht gebrochen. Dieser Umstand bewirkt die Wahl eines halbkreisförmigen Glasprismas als ATR-Koppler.

Abbildung (3.9) skizziert den Strahlengang vom Laser bis zur Planfläche des ATR-Kopplers, wo sich die Goldschicht befindet.

Wird ein Gauß-Strahl durch eine Linse fokussiert, so entsteht ein neuer Gauß-Strahl mit modifizierten Parametern [Mes99].

Abbildung (3.10) zeigt schematisch die Fokussierung eines Laserstrahls durch eine Linse. Aufgrund der großen Rayleigh-Länge wird der einfallende Laserstrahl mit parallelen Wellenfronten skizziert.

Zwischen der neuen Rayleigh-Länge $z_{R,2}$ nach der Fokussierung und der Rayleigh-Länge $z_{R,1}$ vor der Fokussierung besteht folgender Zusammenhang [Mes99]:

$$\frac{1}{z_{R,2}} = \frac{1}{f} \cdot \frac{1 + \left(\frac{1}{z_{R,1}}\right)^2}{\frac{f}{z_{R,1}}} \quad (3.8)$$

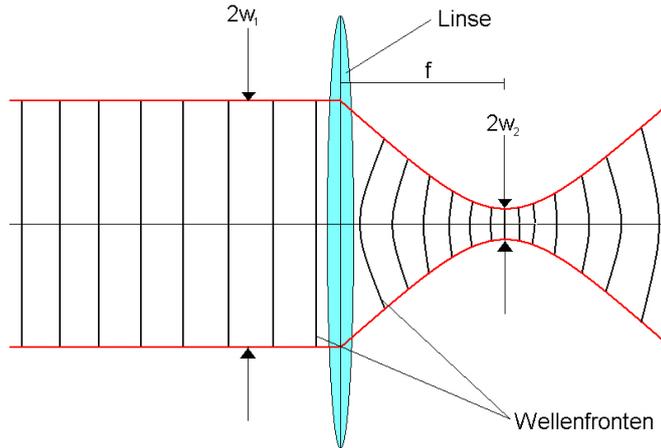


Abbildung 3.10: Fokussierung durch eine Linse

Aus der Beziehung

$$\sqrt{\frac{z_{R,2}}{z_{R,1}}} = \frac{w_2}{w_1} \quad (3.9)$$

ergibt sich der Tailenradius des fokussierten Strahls w_2 zu $w_2 = 6,14 \times 10^{-6}$ m. Aus $z_{R,2}$ und w_2 ergibt sich nach Gleichung (3.6) der Divergenzradius des fokussierten Strahls.

Der Konvergenzwinkel des durch die Zylinderlinse mit $f = 61,84$ mm fokussierten Strahls, der gleich dem doppelten Divergenzwinkel ist, ergibt sich somit nach Beziehung (3.6) zu $\Phi = 3,764^\circ$.

Alle drei Linsen wurden von der LINOS AG bezogen. Die Linsenhalterung wurde durch die hausinterne mechanische Werkstatt hergestellt.

3.2.3 ATR-Koppler

Der ATR-Koppler wird durch einen Glaszylinder mit halbkreisförmiger Grundfläche realisiert. Der Radius des Halbkreises beträgt $R = 38$ mm. Die Höhe des Zylinders beträgt $h = 26$ mm. Die Planfläche wurde um einen Millimeter abgeschliffen, da die Objektträger, auf die die Goldschichten aufgedampft werden, einen Millimeter dick sind. Diese

werden dann auf die Planfläche des Glaszylinders platziert. Eine Immersionsflüssigkeit mit dem gleichen Brechungsindex wie das Glas (ebenfalls BK7 Glas) ermöglicht einen grenzflächenfreien Übergang zwischen Glaszylinder und Objektträger.

Der Halbzylinder ist eine Spezialanfertigung und wurde von der Firma BERNHARD HALLE NACHFL. GMBH, BERLIN angefertigt. Er besteht aus SCHOTT BK7 Glas. Der Brechungsindex für die Wellenlänge $\lambda = 632.8$ nm beträgt für BK7-Glas $n = 1,51509$. Der ATR-Koppler ist liegend auf einer seiner Grundflächen auf einem Rotationstisch der Firma NEWPORT (Modell M-UTR 120) montiert. Dieser Tisch ermöglicht eine Drehung des Glaszylinders, die auf 2,5 Bogensekunden genau durchgeführt werden kann. Die Drehbewegung ermöglicht die Platzierung des Dips in der Mitte des reflektierten Lichtkegels. Damit sich der Glaszylinder im Strahlengang des Lasers befindet, muss auf den Tisch eine Grundplatte mit passender Höhe montiert werden. Diese Grundplatte, an der ebenfalls die Vorrichtung zur Anbringung der Objektträger an den Glaszylinder befestigt ist, wurde von der hausinternen mechanischen Werkstatt hergestellt.

Abbildung (3.11) zeigt den Glaszylinder auf der Grundplatte sowie die Objektträgerhalterung. Über die am Verschlussbügel angebrachte Blattfeder wird der Objektträger durch die Halterung an den Glaszylinder gedrückt. Der Verschlussbügel wird durch den Magneten angezogen.

Eine Fixierung des Glaszylinder auf der Platte wird durch einen Bügel, der den Glaszylinder

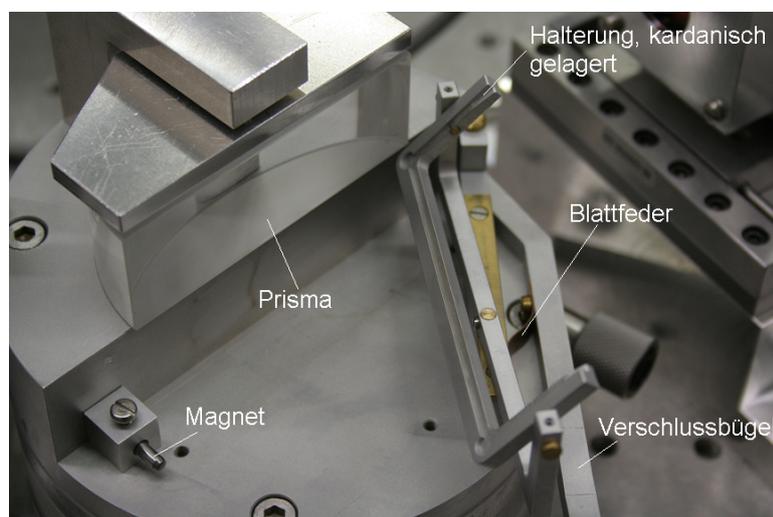


Abbildung 3.11: *Glasprisma auf dem Rotationstisch mit Halterung für die Objektträger*

zwischen sich selbst und der Grundplatte einklemmt, erreicht. Unter dem Bügel befindet sich eine Platte mit den Ausmaßen der Glaszylindergrundfläche, auf der sich an

drei Punkten Hartgumminoppen befinden, die den Druck durch den Bügel gleichmäßig auf den Glaszylinder übertragen. So sollen Spannungen im Glas vermieden werden, die durch einen einzigen Druckpunkt auftreten und den Lichtweg leicht verzerren würden. Bei dem Einbau des ATR-Kopplers ist darauf zu achten, dass sich der Konstruktionsmittelpunkt der halbkreisförmigen Grundfläche genau auf dem Rotationsmittelpunkt des Rotationstisches befindet, da ansonsten der senkrechte Einfall der Lichtstrahlen auf die gekrümmte Mantelfläche nicht mehr gewährleistet ist. Dies würde eine Brechung der Lichtstrahlen und somit eine Abweichung vom gewünschten Lichtweg nach sich ziehen.

3.2.4 Detektor

Als Detektor dient ein ADVANCED PHOTONIX INC. SD 380-23-21-051 Quadrantenphotodetektor.

Bei einer Photodiode sind die Photoströme proportional zur einfallenden Lichtintensität. Diese Photoströme der vier Quadranten A , B , C und D werden durch eine in der hausinternen Elektronikwerkstatt hergestellten Elektronik verstärkt und verarbeitet.

Dabei wandelt ein Transimpedanzverstärker die Photoströme in entsprechende Spannungen um. Anschließend durchlaufen die Signale eine 10kHz Tiefpass-Filtereinheit. Daraus ergibt sich eine zeitliche Auflösung ca. 100 Mikrosekunden.

Seien A und B die Signale der Quadranten, die die Dip-Bewegung der Probenfläche und C und D die Signale der Quadranten, die die Dip-Bewegung der Referenzfläche aufnehmen, so gibt die Elektronik die Signale $A - B$, $A + B$, $C - D$ und $C + D$ aus. Diese Signale werden durch eine 16 Bit Datenerfassungskarte der Firma NATIONAL INSTRUMENTS erfasst und durch ein in LABVIEW 6.1 geschriebenes Programm verarbeitet.

Der Quadrantenphotodetektor ist durch zwei Translationstische sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung positionierbar. Dies ermöglicht die Justage vor jeder Messung, da alle vier Quadranten mit der gleichen Intensität bestrahlt werden müssen. Abbildung (3.12) zeigt die Quadrantenphotodiode in ihrer Halterung. Vor die Quadrantenphotodiode ist ein RG610 Farbfilter gesetzt. Dadurch wird der Teil des Lichtspektrums (z. B. aus dem Tageslicht) unter einer Wellenlänge von 610nm stark abgeschwächt. Dies verbessert die Leistung des Biosensors bei Betrieb im Hellen.

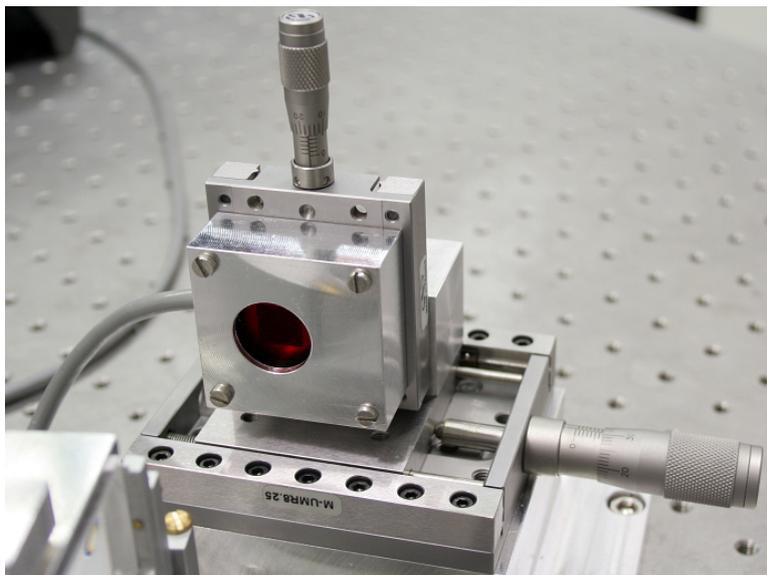


Abbildung 3.12: Die Photodiode in ihrer Halterung.

3.2.5 Goldschichten

Die Qualität der Goldschichten ist bei einem SPR - Sensor von großer Bedeutung, da sie die Sensitivität maßgeblich beeinflusst. Die Sensitivität ist das Verhältnis aus Änderung im Sensorsignal und Änderung der zu messenden Größe, in diesem Fall der Brechungsindex. Sie ist gleich der Steigung der Kalibrationskurve.

Der Grund für die Wahl von Gold als Metallschicht in SPR-Biosensoren liegt in seiner Biokompatibilität und chemischen Inertheit und Stabilität. Silber als bester elektrischer Leiter bewirkt einen schmalen Resonanz-Dip (siehe Abbildung (2.6)) und würde somit für eine bessere Lokalisierbarkeit des Minimums und damit eine bessere Winkelauflösung sorgen. Jedoch ist Silber chemisch nicht so inert wie Gold (Beispiel: Anlaufen von Silber). Eine chemische Reaktion zwischen Metallschicht und Rezeptoren bzw. Analyten würde die Messung verfälschen. Somit ist für Biosensoren Gold die erste Wahl als Material für die Metallschicht.

Die optimale Goldschichtdicke, bei der die Intensität des reflektierten Lichts unter dem Resonanzwinkel gegen Null geht, liegt gemäß Gleichung (2.48) bei ca. $d = 48$ nm. Die Intensität am Minimum hängt empfindlich von der Schichtdicke ab. Eine große Intensität im Minimum erschwert die Lokalisierung des Minimums und verschlechtert demzufolge ebenfalls die Winkelauflösung.

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Leistung eines Biosensors hat, ist die Rauigkeit der Goldoberfläche. Wie in Kapitel (2.2.2) schon erwähnt, können SPs, die entlang einer

Metalloberfläche propagieren, an einer periodischen Struktur zu strahlendem Licht auskoppeln. Oberflächenrauigkeiten der Goldschichten stellen solche periodischen Strukturen dar. Eine raue Goldoberfläche ermöglicht die Auskopplung von SPs, die dem Messprozess entzogen werden und somit die Sensitivität des Sensors herabsetzen.

Für den Biosensor werden die Goldschichten mit einem MED 020 MODULAR HIGH VACUUM COATING SYSTEM der Firma BAL-TEC auf Mikroskopie-Objektträger thermisch gedampft.

Faktoren, die bei thermischen Verdampfungsvorgängen die Schichtqualität bestimmen, sind die Reinheit des zu verdampfenden Materials, der Betriebsdruck, bei dem der Verdampfungsvorgang stattfindet, die Reinheit und Rauigkeit des Substrats sowie die Bedampfungsgeschwindigkeit.

Vor der eigentlichen Goldschicht wird 1 bis 2 nm dünne Chromschicht aufgedampft. Diese dünne Schicht dient als Haftvermittler zwischen dem Glassubstrat und der Goldschicht. Dadurch sitzt der Goldfilm stabiler auf dem Objektträger als ohne diese Haftvermittlungsschicht. Der Einfluss dieser Chromschicht auf die Messung ist vernachlässigbar klein [SKL⁺01]. Jedoch darf dann nur noch ca. 46nm Gold aufgedampft werden, um das Gleichgewicht von Strahlungs- und innerer Dämpfung nicht zu stören (→ Kapitel 2.2.2).

Für die Bedampfung der Goldschichten wird Goldgranulat benutzt, das laut Hersteller einen Reinheitsgrad von 99,99 % aufweist. Dieses Goldgranulat wird in Molybdänschiffchen gelegt, die zwischen zwei Elektroden gespannt werden. Bei einer Spannung von 4 Volt fließt ein sehr hoher Strom, der das Schiffchen und damit das Gold bis über den Schmelzpunkt des Goldes erhitzt und somit verdampft. Aus einer Öffnung in der Unterseite des Schiffchens strömt daraufhin dieser Golddampf heraus und setzt sich anschließend auf dem Substrat ab. Der hohe Schmelzpunkt des Molybdäns verhindert, dass das Schiffchen schmilzt. Durch die Regelung des Stromflusses und damit der Temperatur kann die Bedampfungsgeschwindigkeit geregelt werden.

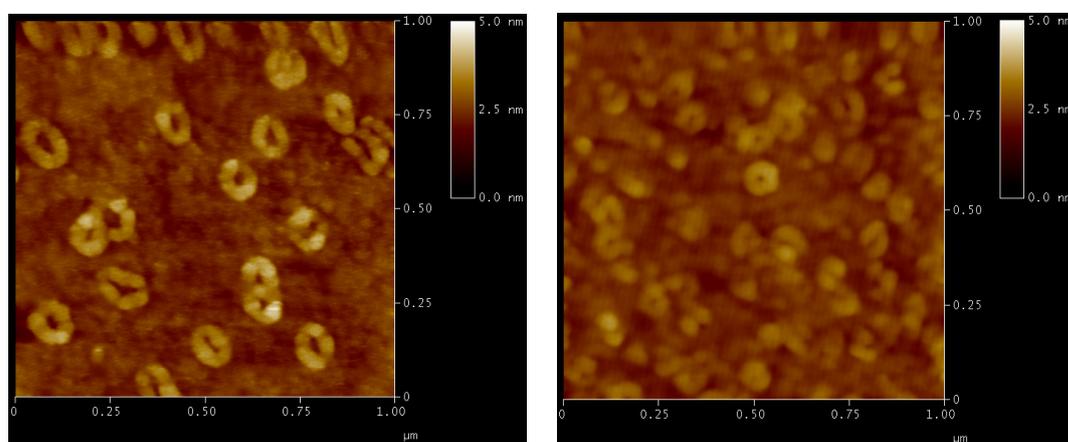
Um die Anzahl von Stößen von verdampften Goldatomen mit Luftmolekülen zu minimieren und damit die freie Weglänge der Goldatome zu maximieren, muss der Verdampfungsvorgang im Vakuum stattfinden. Desweiteren minimiert ein Vakuum die Anzahl von in der Goldschicht eingeschlossenen Fremdatomen. Auf diese Weise wird die Reinheit des Goldfilms erhöht. Während der Bedampfungsvorgänge herrschte in der Bedampfanlage ein Druck im Bereich 5×10^{-6} mbar, der im Bereich Hochvakuum liegt.

Als Substrate dienen $38 \text{ mm} \times 26 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ große Objektträger aus BK 7 Glas. Vor jeder Bedampfung werden diese einer Reinigungsprozedur unterworfen. Die ab Werk vorgereinigten Objektträger werden mit einem Ultraschallbad mit entionisiertem Wasser,

Aceton und Ethanol behandelt und anschließend mit Stickstoff getrocknet. Auf diese Weise werden grobe Verunreinigungen entfernt. Daraufhin wird der Objektträger für dreißig Sekunden einem Sauerstoffplasma ausgesetzt. Dieses, durch eine Teslapule erzeugte, hoch aggressive Sauerstoffplasma reinigt den Objektträger gründlich.

Abbildung (3.13) zeigt Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen eines Objektträgers nach der Vorreinigung durch die Aceton-Ethanol-Wasser-Ultraschallbäder (3.13(a)) und eines Objektträgers nach der zusätzlichen Sauerstoffplasmabehandlung (3.13(b)).

Abbildung (3.13(a)) zeigt eine sehr glatte Oberfläche, auf der sich rundliche Strukturen mit einer Höhe von ca. 3 - 4 nm befinden. Diese Strukturen, die sogenannten etch pits², entstehen bei der vom Hersteller durchgeführten Ätzbehandlung zur Glättung der Objektträger.



(a) Objektträger nach der Vorreinigung

(b) Objektträger nach der Reinigung durch das Sauerstoffplasma

Abbildung 3.13: Objektträger vor und nach der Plasmabehandlung

Abbildung (3.13(b)) zeigt einen plasmabehandelten Objektträger. Auch hier sind diese rundlichen Strukturen zu erkennen. Die Höhe beträgt ca. 2 nm.

Diese Aufnahmen wurden durchgeführt mit einem BIOSCOPE BS-2 AFM³ der Firma DIGITAL INSTRUMENTS, das im tapping mode betrieben wurde. Zur Steuerung und Bildaufnahme diente die Software NANOSCOPE 5.30, ebenfalls von der Firma DIGITAL INSTRUMENTS. In dieser Software sind Analyse-Funktionen integriert, mit denen die Aufnahmen untersucht werden können. Eine Funktion dabei ist die Rauigkeitsanalyse.

² engl. Ätzvertiefung

³AFM = engl. Atomic Force Microscope = Rasterkraftmikroskop

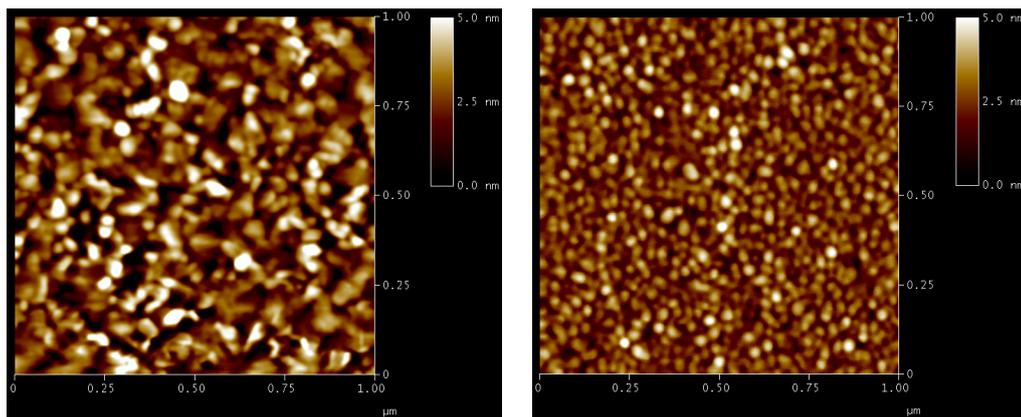
Das Programm berechnet den Mittelwert der Rauigkeit R_a . Dieser ist laut Bedienungsanleitung des Programms definiert als

$$R_a = \frac{1}{L_x L_y} \int_0^{L_x} \int_0^{L_y} |f(x, y)| dy dx \quad (3.10)$$

Dabei sind L_x und L_y die Kantenlängen des aufgenommenen Bildes oder untersuchten Bildausschnitts. Die Funktion $f(x, y)$ repräsentiert die Topographie der Oberfläche relativ zu einer Nullebene. Diese Nullebene ist die Ebene, auf die die Spitze bei der ersten Annäherung an die Oberfläche eingestellt wird.

Für Abbildung (3.13(a)) beträgt die vom Programm berechnete mittlere Rauigkeit $R_a = 0,281$ nm. Für Abbildung (3.13(b)) beträgt die mittlere Rauigkeit $R_a = 0,220$ nm. Demzufolge ist durch die Plasmabehandlung die mittlere Rauigkeit um ca. 20 % verringert worden.

Der plasmabehandelte Objektträger wird mit einer 1 bis 2 nm dünne Chromschicht bedampft. Auf diese wird die ca. 46 nm dicke Goldschicht gedampft. Dabei beträgt die Bedampfungsgeschwindigkeit ca. 2 bis 3 $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$. Laut [Ohr02] ist für Gold die optimale Bedampfungsgeschwindigkeit 3 $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$. Eine zu langsame Bedampfungsgeschwindigkeit bewirkt beim Kondensieren des Goldes auf das Substrat eine geringere Anzahl von Kristallisationskeimen. An diese wenigen Kristallisationskeime lagern sich die Goldatome an. Die Goldschicht besteht dann aus sehr großen Kristallen, was zu einer größeren Rauigkeit führt [Ohr02].

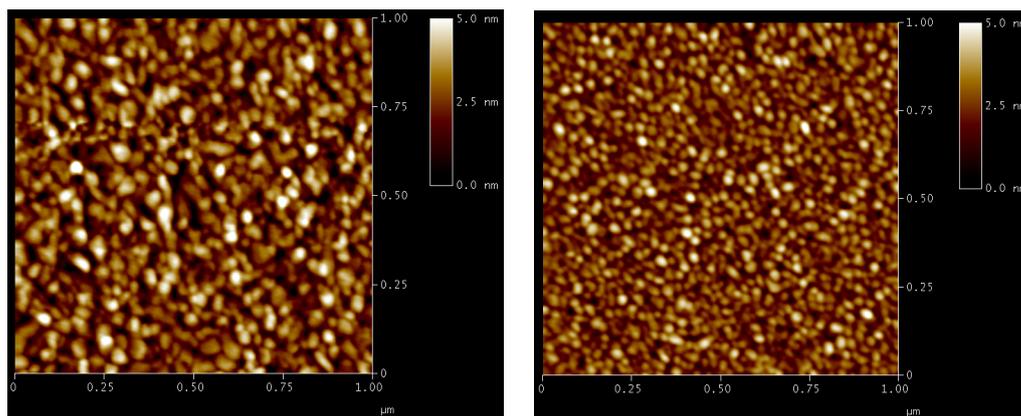


(a) mit ca. $0,1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bedampfte Goldschicht (b) mit ca. $2 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bedampfte Goldschicht

Abbildung 3.14: Unterschied zwischen langsamer und schneller Bedampfung

Abbildung (3.14) zeigt AFM - Aufnahmen, die den Unterschied zwischen einer lang-

samen, mit ca. $0,1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ durchgeführt, und einer schnellen, mit ca. $2 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ durchgeführten, Bedampfung darstellen. Hier wurde zunächst auf die haftvermittelnde Chromschicht verzichtet. Für Abbildung (3.14(a)) ergibt sich eine mittlere Rauigkeit von $R_a = 0,983$ nm, für Abbildung (3.14(b)) beträgt $R_a = 0,599$ nm. Sowohl die Aufnahmen als auch die Rauigkeitsanalysen bestätigen die negative Auswirkung einer zu geringen Bedampfungsgeschwindigkeit auf die Rauigkeit des Goldfilms.



(a) mit ca. $0,1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bedampfte Goldschicht (b) mit ca. $2 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bedampfte Goldschicht mit haftvermittelnder Chromschicht

Abbildung 3.15: Unterschied zwischen langsamer und schneller Bedampfung mit haftvermittelnder Chromschicht

Abbildung (3.15) zeigt AFM - Aufnahmen, die den Unterschied zwischen einer langsamen, mit ca. $0,1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ durchgeführten und einer schnellen, mit ca. $2 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ durchgeführten Goldbedampfung darstellen, bei der zuvor eine ca. 1,6 nm dünne Chromschicht aufgedampft wurde. Für Abbildung (3.15(a)) ergibt sich eine mittlere Rauigkeit von $R_a = 0,781$ nm, für Abbildung (3.15(b)) beträgt $R_a = 0,587$ nm. Auch hier bestätigen sowohl die Aufnahmen als auch die Rauigkeitsanalysen die negative Auswirkung einer zu geringen Bedampfungsgeschwindigkeit auf die Glattheit des Goldfilms. Zudem ist zu beobachten, dass die Chromschicht die mittlere Rauigkeit des Goldfilm ebenfalls leicht vermindert.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass eine ca. 46 nm dünne Goldschicht, die mit einer Bedampfungsgeschwindigkeit von ca. 2 bis $3 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ auf eine zuvor aufgedampfte, haftvermittelnde, ca. 1 bis 2 nm dünne Chromschicht aufgebracht wird, als Sensoroberfläche genutzt wird.

Die Goldschicht muss sich auf dem Objektträger am Ort des Linienfokus befinden. Daher reicht es aus, wenn auch nur dort die Goldschicht aufgedampft wird. Dies kann mit einer Maske erreicht werden. Diese Maske darf jedoch nicht zu dick sein, damit der

Metалldampf bei der Bedampfung nicht abgeschattet wird. Ansonsten ist die Schicht ungleichmäßig dick. Diese Maske wird durch eine 100 μm dünne PDMS - Schicht realisiert. Siehe dazu nächstes Kapitel

3.2.6 Flusszelle

Die Flusszellen für den Biosensor werden nach einer bestimmten Prozedur gefertigt. Diese wird im Folgenden beschrieben.

Auf die mit dem Sauerstoffplasma gereinigten Objektträger wird mit Hilfe des Rotationsbeschichtungsverfahrens⁴ eine ca. 100 μm dünne Schicht aus Polydimethylsiloxan (PDMS) erzeugt.

Bei PDMS handelt es sich um ein siliziumbasiertes Polymer ölicher Form, das durch eine weitere Substanz, dem sogenannten Vernetzer, nach einer mehrstündigen Erhitzungsphase bei ca. 80 bis 90°C in einem Ofen zu einem elastischen, gummiartigen Material wird. Der Vernetzer verbindet unter der Wärmeeinwirkung die Polymerketten untereinander, sodass die gummiartige Konsistenz zustande kommt. Das Mischungsverhältnis zwischen Silikonöl und Vernetzer bestimmt dabei die Härte des Endproduktes. Bei Zugabe von mehr Vernetzer wird das PDMS härter. Für die Flusszellen wird ein Mischungsverhältnis von einem Gewichtsanteil Vernetzer auf zehn Gewichtsanteile Silikonöl verwendet. Bei der Rotationsbeschichtung wird der Objektträger mittels Unterdruck auf einem Drehteller fixiert. In der Mitte des Objektträgers wird ca. 1 ml Silikonöl-Vernetzer-Gemisch gegeben. Daraufhin wird der Rotationstisch in Bewegung gesetzt. Bei einer bestimmten Rotationsgeschwindigkeit und -dauer verteilt sich das Gemisch auf dem Objektträger durch die wirkende Zentrifugalkraft und die gewünschte Schichtdicke wird erreicht.

Die Rotation war in zwei Schritte unterteilt. Während des ersten Schrittes rotiert der Drehteller für fünf Sekunden mit einer Drehzahl von 500 Umdrehungen pro Minute. Dieser Schritt dient zum groben Verteilen des PDMS auf dem Objektträger.

Beim zweiten Schritt rotiert der Drehteller für 40 Sekunden mit einer Geschwindigkeit von 1000 Umdrehungen pro Minute und erzeugt die gewünschte Schichtdicke von 100 μm .

Diese Schichten werden in einem Ofen bei 85°C für 2,5 Stunden ausgehärtet.

Aus dieser ausgehärteten PDMS - Schicht wird der Kanal ausgeschitten. Um gleiche Kanalformen zu erreichen, wird dazu eine rechteckige Schablone benutzt, die eine Fläche von 20 mm \times 7 mm hat.

Der PDMS - Film für die Bedampfungsmaske wurde analog zu dem oben genannten

⁴engl. Spin Coating

Verfahren erstellt. In diesen Film wurde ein Bereich mit der Form der späteren Goldschicht ausgeschnitten.

Zum Erstellen des Goldfilms wird die Maske auf den plasmagereinigten Objektträger an der richtigen Stelle positioniert und anschließend die Schicht aufgedampft.

Im nächsten Schritt wird der Objektträger mit dem Kanal auf den Objektträger mit der Goldschicht aufgebracht. Damit der PDMS-Kanal mit dem Objektträger dicht abschließt, wird sowohl der Objektträger mit dem Goldfilm als auch der PDMS - Kanal für 20 Sekunden dem Sauerstoffplasma ausgesetzt. Dadurch wird die Oberfläche des PDMS so aktiviert, dass sie beim anschließenden Zusammensetzen kovalent mit dem Glas bindet und somit eine wasserdichte Verbindung entsteht. Vor dem Schließen des Kanals werden die Goldschichten funktionalisiert.

Abbildung (3.16) zeigt den schematischen Aufbau der Flusszelle.

Der Objektträger mit aufgesetzter Flusszelle wird durch eine in der hausinternen mechanischen Werkstatt hergestellten kardanischen Halterung an das hemizylindrische Prisma gedrückt (siehe dazu Abbildung (3.11)). Ein grenzflächenfreier Übergang zwischen Prisma und Objektträger wird durch ein Immersionsöl erreicht, das den gleichen Brechungsindex wie das Prisma und der Objektträger besitzt.

Eine kardanische Halterung verteilt den Anpressdruck gleichmäßig auf die gesamte Objektträgeroberfläche. Dadurch werden Spannungen im Objektträger vermieden, die durch eine ungleichmäßige Verteilung des Anpressdrucks resultieren kann [SU91] [WCWZ04].

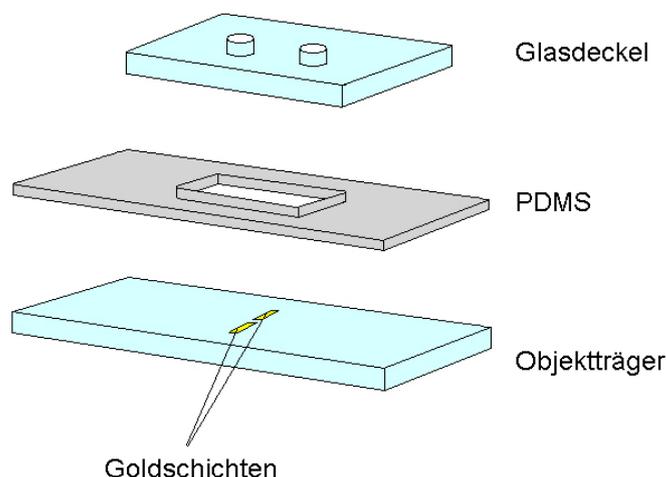


Abbildung 3.16: *Komponenten der Flusszelle*

Abbildung (3.17) zeigt ein Photo einer Flusszelle. Auf den Glasdeckel im Bereich der Einlass- bzw. Auslassöffnungen sind Quader aus Plexiglas geklebt, in die Löcher gebohrt sind, die sich direkt über den Öffnungen befinden. Diese Quader dienen zur Befestigung



Abbildung 3.17: *Foto eines Objektträgers mit aufgesetzter Flusszelle*

der Schläuche. Die PDMS-Schicht ist auf dem Foto nicht zu sehen, da sie nur $100\ \mu\text{m}$ dünn und transparent ist.

4 Messergebnisse und Diskussion

Um das elektronische Rauschen zu ermitteln, das die Auflösung des Sensors bestimmt, wurde das Signal bei einer mit Wasser gefluteten Flusszelle über zehn Millisekunden aufgenommen. Dafür wurden zunächst nur zwei Quadranten der Photodiode (A,B) genutzt. Das Summensignal $A + B$ betrug dabei ca. 5V.

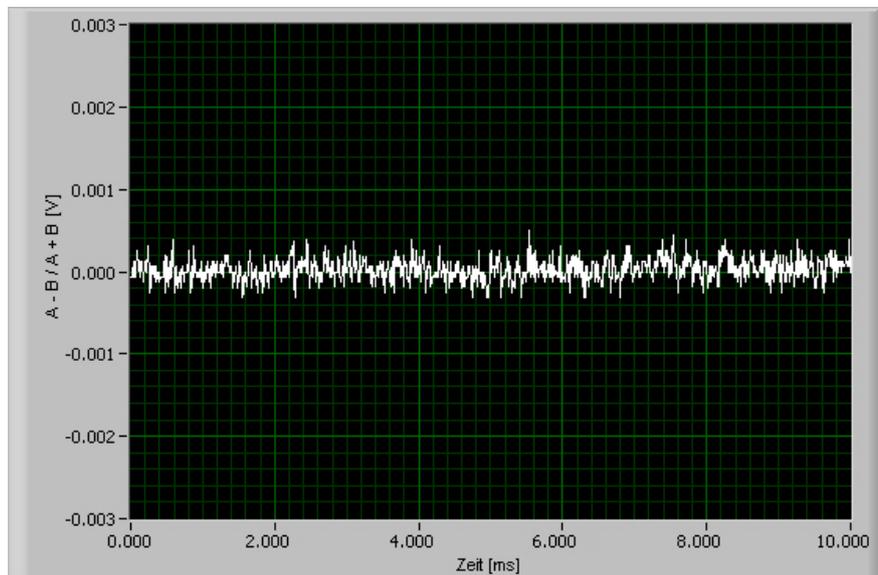


Abbildung 4.1: Signal $\frac{A-B}{A+B}$ einer mit Wasser gefluteten Flusszelle

Abbildung (4.1) zeigt das Ergebnis dieser Messung. Zusätzlich zu dieser Grafik wurden die Messwerte in eine Textdatei ausgegeben und aus ihnen die empirische Varianz bzw. Stichprobenvarianz

$$s^2 = \frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (4.1)$$

der Messung berechnet.

Die empirische Varianz ist ein Maß für die Streubreite von Daten aus einer Stichprobe. Die Quadratwurzel aus der empirischen Varianz ist die empirische Standardabweichung s [Wik]. Sie dient als Maß für das Signal-Rausch-Verhältnis des Biosensors.

Die aus den Messwerten berechnete empirische Standardabweichung beträgt $s = 1,3 \cdot 10^{-4}$ V. Gemäß der Steigung in Abbildung (3.4) von $1,33 \frac{\text{V}}{\text{Grad}}$ ergibt diese Standardabweichung eine Winkelauflösung von $9,9 \cdot 10^{-5}$ Grad. Aus der Sensitivität des Sensors von $194,74 \frac{\text{V}}{\text{RIU}}$ ergibt sich eine Auflösung bezüglich des Brechungsindex von $6,7 \cdot 10^{-7}$ RIU.

Im Folgenden soll die Funktionstüchtigkeit des Biosensors anhand einer Messung überprüft werden. Dazu wurden ein etwa 3,9 und ein 1,7 massenprozentiges¹ Ethanol-Wasser-Gemisch hergestellt. Die Brechungsindizes dieser beiden Gemische sind gerade so groß, dass sie bezüglich der theoretisch bestimmten Sensitivität eine Resonanzwinkeländerung von +0,35 (nahe dem Maximum des linearen Bereiches) bzw. +0,15 Grad und damit Signale von 0,45 bzw. 0,2 Volt erzeugen sollen². Beide Brechungsindizes wurden anhand eines Fits von Daten aus [Lid05] über die Brechungsindizes von verschiedenen Ethanolkonzentrationen in Wasser berechnet. Im Wechsel mit entionisiertem Wasser wurde die Flusszelle mit diesen Gemischen geflutet.

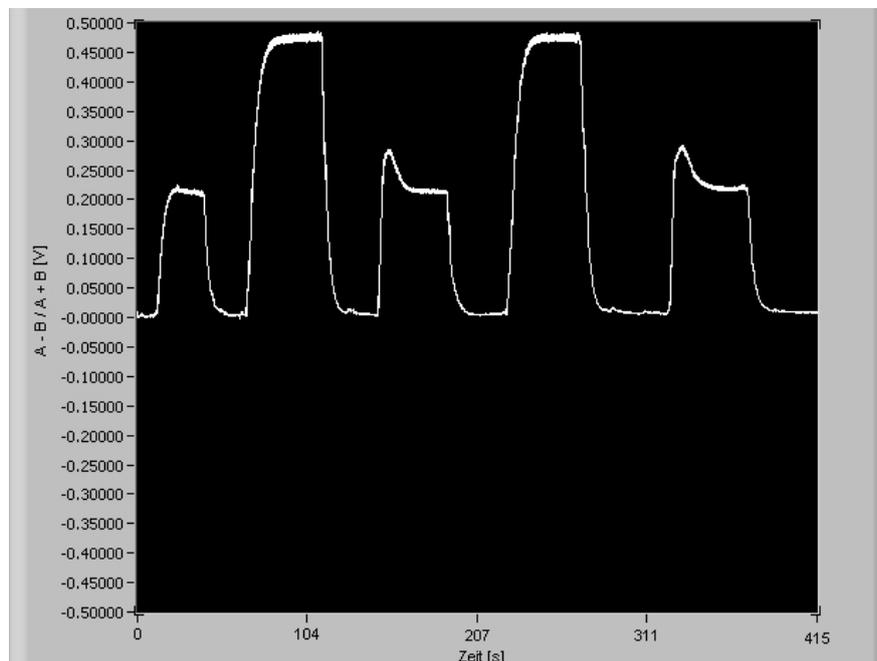


Abbildung 4.2: Messung der Ethanol-Wasser-Gemische

¹entspricht einem 4,9 bzw. 2,1 volumenprozentigem Gemisch

² $n_{3,9m\%} = 1.33537$, $n_{1,7m\%} = 1.33402$

Abbildung (4.2) zeigt das Ergebnis der Messung der verschiedenen Ethanolkonzentrationen. Die Messung erstreckte sich über einen Zeitraum von 415 Sekunden. Anfangs floss entionisiertes Wasser durch die Flusszelle. In dieser Phase wurde das Signal auf Null geeicht.

Daraufhin wurde die Flusszelle mit dem 1,7 massenprozentigen Ethanol-Wasser-Gemisch geflutet. Dies ist in Abbildung (4.2) durch den Anstieg auf ca. 0,2 Volt zu sehen, der sehr gut mit dem theoretisch erwarteten Wert übereinstimmt. Im Anschluss daran wurde die Flusszelle wieder mit entionisiertem Wasser geflutet, welches sich durch das Sinken des Signals auf Null bemerkbar macht.

Daran anschließend strömte das 3,9 massenprozentige Gemisch durch die Flusszelle. Dieses Gemisch ließ das Signal auf etwa 0,46 Volt ansteigen. Dieser Wert stimmt ebenfalls gut mit dem vorher errechneten Wert überein. Im Folgenden wurden abwechselnd die drei verschiedenen Flüssigkeiten eingeleitet. Die gemessenen Signaländerungen entsprechen auch dabei den vorherigen Ergebnissen.

Das Ansteigen des Signal auf zunächst 0,3 Volt bei dem zweiten und dritten Einlass des 1,7 prozentigen Gemisches ist damit zu erklären, dass sich in dem verwendeten Schlauchsystem Reste des höherprozentigen Gemisches befanden, welche das Signal auf 0,3 Volt anwachsen ließen. Dieser Rest wurde nach kurzer Zeit durch die 1,7 prozentige Lösung weggespült und das Signal fiel wieder auf die erwarteten 0,2 Volt. Dies wird dadurch untermauert, dass das Signal bei dem ersten Durchfluss des 1,7 prozentigen Gemisches zu Beginn der Messung nicht diesen Anstieg zeigte.

Diese Messung wurde noch ohne parallele Referenzmessung durchgeführt. Dementsprechend war dem Signal thermisches und mechanisches Rauschen überlagert. Dieses Rauschen wird durch eine Referenzmessung eliminiert wodurch sich die Auflösung deutlich verbessert.

Die am Markt etabliertesten, kommerziellen SPR-Biosensoren der Firma PHARMACIA BIOSENSOR, die sogenannten BIACORE - Geräte, besitzen eine Auflösung von 10^{-4} Grad bzw. 10^{-6} RIU [RB95]. Diese Auflösung ist um einen Faktor 1,5 schlechter als die bisher erreichte Genauigkeit des hier vorgestellten Sensors.

Um eine bessere Vorstellung über das Auflösungsvermögen eines SPR - Biosensors zu bekommen, soll im Folgenden das größte menschliche Protein, das Titin, betrachtet werden. Titin besitzt eine molekulare Größe von 3600 kDa [Wik]. Dies entspricht einer Masse von ca. $6 \cdot 10^{-9}$ pg. Nach [RB95] entspricht die Auflösung der BIACORE - Geräte eine kleinst möglich detektierbare Titin - Oberflächenkonzentrationsänderung von $1 \cdot 10^{-12} \frac{g}{mm^2}$. Damit könnte die Bindung von ca. 167 Millionen einzelnen Titin - Molekülen auf einem Quadratmillimeter aufgelöst werden.

Mit der bisher erreichten Auflösung des hier vorgestellten Biosensors lassen sich etwa

112 Millionen einzelne Titin - Moleküle pro Quadratmillimeter auflösen.

Zur Auflösung eines einzelnen Titin - Moleküls pro Quadratmillimeter müsste dementsprechend die Auflösung etwa $6 \cdot 10^{-15}$ RIU betragen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, einen nicht-kommerziellen Oberflächenplasmonenresonanz-Biosensor mit hoher Auflösung aufzubauen, der Weiterentwicklungen und Anpassungen auf bestimmte Problemstellungen ermöglicht.

Aufbauend auf der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie lassen sich Biosensoren bauen, mit denen die Detektion geringer Stoffmengen und Konzentrationsänderungen sowie markierungsfreie Untersuchungen der Kinetik biomolekularer Reaktionen und Konformationsänderung von Proteinen möglich sind. So können Proteine in ihrer nativen Form untersucht werden.

Oberflächenplasmonen sind Elektronendichteoszillationen an Metall / Dielektrikum -Grenzschichten, die mit evaneszentem Licht gekoppelt sind. Die Resonanzbedingungen hängen stark von dem Brechungsindex des Dielektrikums ab, welches an das Metall angrenzen. Für Biosensoren hat sich die Kretschmann-Raether-Methode als zweckmäßig erwiesen, um die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie zu realisieren. Ein p-polarisierter, auf die Goldschicht fokussierter Laserstrahl trifft durch ein Prisma auf einen nur 48 nm dünnen Goldfilm. Unter einem bestimmten Winkel tritt im reflektierten Licht eine dunkle Linie, der sogenannte Resonanz-Dip, auf, der auf die Oberflächenplasmonenresonanz zurückzuführen ist. Durch Änderung des Brechungsindex des angrenzenden Mediums wandert diese dunkle Linie aufgrund der Änderung des Resonanzwinkels. Beide Änderungen sind proportional zueinander. Dies bildet die Grundlage der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.

Um hohe Auflösungen in der Lokalisierbarkeit des Dips zu erreichen, muss das Rauschen des Signals so gering wie möglich sein. Rauschquellen sind thermisches Rauschen, mechanisches Rauschen, Fluktuationen in der Lichtintensität sowie das Rauschen der Elektronik.

Für den hier vorgestellten Biosensor wird die Dip-Änderung mit Hilfe eines Quadrantenphotodetektors aufgenommen. Um das thermische und mechanische Rauschen zu minimieren, wird eine Referenzmessung parallel unter den gleichen Bedingungen durch-

geführt. Die Messsignale der Referenzmessung, in denen ebenso wie in den Signalen der Probenmessung die Störungen durch thermisches und mechanisches Rauschen enthalten sind, werden von denen der Probenmessung subtrahiert. Somit resultiert ein weitestgehend rauschfreies Signal bezüglich des thermischen und mechanischen Rauschens. Fluktuationen in der Lichtintensität des Lasers werden durch die Normierung der Signale eliminiert. Somit ist die Auflösung des Sensors hauptsächlich vom Rauschen der Elektronik abhängig.

Die Auflösung bedingt durch das elektronische Rauschen liegt bei dem hier vorgestellten Biosensor bei $6.7 \cdot 10^{-7}$ RIU. Die Auflösung ist um einen Faktor 1,5 höher als die von kommerziellen BIACORE - Geräten der schwedischen Firma PHARMACIA BIOSENSORS.

Die Funktionstüchtigkeit des Sensors wurde anhand einer Messung von verschiedenen Alkoholkonzentrationen in Wasser gezeigt. Die ermittelten Messergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den zuvor theoretisch bestimmten Werten.

Für die Zukunft ist die Inbetriebnahme des referenzierenden Messmodus geplant, der dann die Auflösung um einen Faktor von ca. Zehn erhöhen wird. Mit diesem Sensor sind dann hochauflösende Untersuchungen von biomolekularen Reaktionen möglich.

Weitere Möglichkeiten, die Auflösung des Sensors zu erhöhen, liegen in der Zusammensetzung und Beschaffenheit der aktiven Sensoroberflächen. Neben den bisher verwendeten Gold-Monoschichten lassen sich Mehrfachschichten aus verschiedenen Materialien verwenden. Interessante Ansätze liefern dafür die Arbeiten [EN95] und [NTHY01]. In den Arbeiten wurden Doppelschichten aus Silber / Gold ([EN95]) bzw. Doppelschichten aus einem Stoff, der etwa den gleichen Brechungsindex wie das Lösungsmittel der Analytmoleküle besitzt, und Gold [NTHY01] verwendet. Durch die Verwendung solcher Doppelschichten lassen sich schmalere Resonanzminima erzeugen. Dies führt zu weiteren Verbesserungen in der Auflösung von SPR - Biosensoren. In [NTHY01] wird zusätzlich von einer Erhöhung der Sensitivität berichtet.

Um die Detektionsempfindlichkeit des Sensors zu erhöhen, ist eine Optimierung der Form der aktiven Sensoroberfläche erforderlich. Je kleiner die aktive Fläche ist, desto empfindlicher wird der Sensor.

Desweiteren ist für die Zukunft die Entwicklung neuer Mikrofluidik-Plattformen geplant, die es ermöglichen sollen, den Biosensor in der Einzelzellanalyse einzusetzen. Aufgrund der guten Weiterentwicklungsmöglichkeiten, die dieser Aufbau bietet, kann der Sensor auf verschiedene Problemstellungen im Bereich der Bioanalytik angepasst werden und stellt somit eine wertvolle Erweiterung der bioanalytischen Untersuchungsmethoden dar.

A Literaturverzeichnis

- [AD07] AUSSENEGG, FRANZ und HARALD DITLBACHER: *Plasmonen-pädagogisch wertvoll*. Physik Journal, August/September 2007:20–21, 2007.
- [AM82] AGRANOVICH, V.M. und D.L. MILLS (Herausgeber): Band Surface Polaritons - Electromagnetic Waves at Surfaces and Interfaces der Reihe *Modern Problems in Condensed Matter Sciences*. North-Holland Publishing Company, 1982.
- [BPT00] BOUSSAAD, S., J. PEAN und N.J. TAO: *High Resolution Multiwavelength Surface Plasmon Resonance Spectroscopy for Probing Conformational and Electronic Changes in Redox Proteins*. Analytical Chemistry, 72(1):222–226, 2000.
- [BR05] BORDO, VLADIMIR und HORST-GÜNTER RUBAHN: *Optics and Spectroscopy at Surfaces and Interfaces*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.
- [CCS80] CHU, K. C., C. K. CHEN und Y. R. SHEN: *Measurement of Refractive Indices and Study of Isotropic-Nematic Phase Transition by the Surface Plasmon Technique*. Mol. Cryst. Liq. Cryst., 59:97–108, 1980.
- [DAvR91] DUBS, M.-C., D. ALTSCHUH und M.H.V. VAN REGENMORTEL: *Interaction between Viruses and monoclonal antibodies studied by surface plasmon resonance*. Immunol. Lett., 31:59–64, 1991.
- [EE06] EICHLER, JÜRGEN und HANS JOACHIM EICHLER: *Laser - Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*. Springer-Verlag, 2006.
- [EN95] EHLER, TIMOTHY T. und LEWIS J. NOE: *Surface Plasmon Studies of Thin Silver/Gold Bimetallic Films*. Langmuir, 11:4177–4179, 1995.
- [Fan41] FANO, U. J. Opt. Soc. Am., 73:40, 1941.

- [FFCFea94] FISHER, R.J., M. FIVASH, J. CASAS-FINET und ET AL.: *Real-time binding measurements of the ETSI recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between p42 and p51 isoforms*. Protein Sci., 3:257–266, 1994.
- [For06] FORSTER, OTTO: *Analysis 1*. Vieweg, 2006.
- [FWB⁺78] FERGUSON, P., R.F. WALLIS, M. BELAKHOVSKY, J.P. JADOT und J. TOMKINSON: *Surface Plasma Waves in Silver and Gold*. Surface Science, 76:483—498, 1978.
- [GFS⁺00] GREEN, REBECCA J., RICHARD A. FRAZIER, KEVIN M. SHAKESHEFF, MARTYNC. DAVIES, CLIVE J. ROBERTS und SAUL J.B. TENDLER: *Surface Plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials*. Biomaterials, 21:1823–1835, 2000.
- [GS77] GORDON, J. G. und J. D. SWALEN: *The Effect of thin Films on the Surface Plasma Resonance on Gold*. Optics Communication, 22(3):374–376, 1977.
- [GV05] GIULIANI, GABRIELE F. und GIOVANNI VIGNALE: *Quantum Theory of the Electron Liquid*. Cambridge University Press, 2005.
- [Han67] HANSEN, WILFORD N.: *Electric Fields Produced by the Propagation of Plane Coherent Electromagnetic Radiation in a Stratified Medium*. Journal of the Optical Society of America, 58(3):380–390, 1967.
- [Her] HERTEL, PETER: *Schreibwerkstatt - Projekt Diplomarbeit*. Universität Osnabrück.
- [Hom06] HOMOLA, JIRI: *Electromagnetic Theory of Surface Plasmons*. In: HOMOLA, JIRI (Herausgeber): *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Band 4 der Reihe *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*, Seiten 3–44. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [HP06] HOMOLA, JIRI und MAREK PILIARIK: *Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors*. In: HOMOLA, JIRI (Herausgeber): *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Band 4 der Reihe *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*, Seiten 45–67. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [HYG99] HOMOLA, J., SINCLAIR S. YEE und GÜNTER GAUGLITZ: *Surface plasmon resonance sensors: review*. Sensors and Actuators B, 54:3–15, 1999.

- [Jac06] JACKSON, JOHN DAVID: *Klassische Elektrodynamik*. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2006.
- [JC72] JOHNSON, P. B. und R. W. CHRISTY: *Optical Constants of the Noble Metals*. Physical Review B, 6(12):4370–4379, 1972.
- [KF89] KITTEL, CHARLES und C.Y. FONG: *Quantentheorie der Festkörper*. R. Oldenbourg Verlag GmbH, 1989.
- [KHS81] KITJIMA, H., K. HIEDA und Y. SUEMATSU: *Optimum conditions in the attenuated total reflection technique*. Applied Optics, 20(6):1005–1010, 1981.
- [Kit06] KITTEL, CHARLES: *Einführung in die Festkörperphysik*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, 2006.
- [Kle] KLENKAR, GORAN: <http://www.ifm.liu.se/applphys/sensor/>, Stand 22.05.2007.
- [KR68] KRETSCHMANN, E. und H. RAETHER: *Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light*. Zeitschrift für Naturforschung, 23a:2135–2136, 1968.
- [Kre71] KRETSCHMANN, ERWIN: *Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen*. Z.Physik, 241:313–324, 1971.
- [KS99] KNEUBÜHL, FRITZ KURT und MARKUS WERNER SIGRIST: *Laser*. B. G. Teubner, 1999.
- [Lid05] LIDE, DAVID R. (Herausgeber): *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 85 Auflage, 2004 - 2005.
- [LLS93] LIEDBERG, B., I. LUNDSTRÖM und E. STENBERG: *Principles of Biosensing with an extended Coupling Matrix and Surface Plasmon Resonance*. Sensors and Actuators B, 11:63–72, 1993.
- [LMR⁺91] LÖFAS, STEFAN, MAGNUS MALMQVIST, INGER RÖNNBERG, ESA STENBERG, BO LIEDBERG und INGEMAR LUNDSTRÖM: *Bioanalysis with Surface Plasmon Resonance*. Sensors and Actuators B, 5:79–84, 1991.
- [LNL83] LIEDBERG, BO, CLAES NYLANDER und INGEMAR LUNDSTROM: *Surface Plasmon Resonance for Gas Detection and Biosensing*. Sensors and Actuators, 4:299–304, 1983.

- [LS09] LENARD, P. und A. SOMMERFELD: *Über die Ausbreitung der Wellen in der drahtlosen Telegraphie*. Annalen der Physik, 28(4):665–736, 1909.
- [Lun94] LUNDSTRÖM, I.: *Real-time biospecific interaction analysis*. Biosensors Bioelectronics, 9:725–736, 1994.
- [Mai07] MAIER, STEFAN ALEXANDER: *Plasmonics - Fundamentals and Applications*. Springer Science+Business Media LLC, 2007.
- [Mes99] MESCHEDÉ, DIETER: *Optik, Licht und Laser*. B. G. Teubner, 1999.
- [MHS⁺77] McMATH, T. A., R. A. D. HEWKO, O. SINGH, A. E. CURZON und J. C. IRWIN: *Optical Constants of Gold by Transmission Interferometry*. J. Opt. Soc. Am., 67(5):630–634, 1977.
- [MJFK98] MERNAGH, D.R., P. JANSČAK, K. FIRMAN und G.G. KNEALE: *Protein - Protein and Protein - DNA interactions in the Type I restriction endonuclease R.EcoR124I*. Biol. Chem., 379:497–503, 1998.
- [MMQ97] MARGHERI, G., A. MANNONI und F. QUERCIOLI: *High-Resolution Angular and Displacement Sensing based on the Excitation of Surface Plasma Waves*. Applied Optics, 36(19):4521–4525, 1997.
- [Mor01] MORJAN, MARTIN: *Theoretische und experimentelle Entwicklung eines optischen Wasserstoffsensors - Anregung von Oberflächen-Plasmawellen in Palladium*. Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 2001.
- [NTHY01] NENNINGER, G. G., P. TOBISKA, J. HOMOLA und S. S. YEE: *Long-Range Surface Plasmons for high-resolution surface plasmon resonance sensors*. Sensors and Actuators B, 74:145–151, 2001.
- [Ohr02] OHRING, MILTON: *Materials Science of Thin Films - Deposition and Structure*. Academic Press, 2002.
- [Ott68] OTTO, A.: *Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection*. Zeitschrift für Physik, 216:398–410, 1968.
- [Pér96] PÉREZ, JOSÉ-PHILIPPE: *Optik*. Spektrum, Akademischer Verlag, 1996.

- [Rae88] RAETHER, HEINZ: *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, Band 111 der Reihe *Springer Tracts in Modern Physics*. Springer-Verlag, 1988.
- [RB95] RAGHAVAN, MALINI und PAMELA J. BJORKMAN: *BIAcore: a microchip-based system for analyzing the formation of macromolecular complexes*. *Structure*, 3:331–333, 1995.
- [RE62] RITCHIE, R. H. und H. B. ELDRIGE: *Optical Emission from irradiated Foils I*. *Physical Review*, 126(6):1935–1947, 1962.
- [Rit57] RITCHIE, R. H.: *Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films*. *Physical Review*, 106(5):874–881, 1957.
- [San] SANTER, SVETLANA: *Oberflächenanalytik*
<http://www.imtek.de/cpi/images/images/vl-ofa/vl-ofa-lecture9.pdf>, Stand 22.05.2007.
- [Sch] SCHWILLE, PETRA: *Biophysikalische Methoden Teil 10: Biosensoren und DNA Chips*
http://www.biotech.tu-dresden.de/schwille/group/teaching/lectures/lecturenotes/biosensors_dt.pdf, Stand 22.05.2007.
- [Sch07] SCHOTT AG: *Optisches Glas Datenblätter*, 2007.
- [SF60] STERN, E. A. und R. A. FERREL: *Surface Plasma Oscillations of a Degenerate Electron Gas*. *Physical Review*, 120(1):130–136, 1960.
- [SHG06] SUN, ZHANLIANG, YONGHONG HE und JIHUA GUO: *Surface plasmon resonance sensor based on polarization interferometry and angle modulation*. *Applied Optics*, 45(13):3071–3075, 2006.
- [SKL⁺01] SNOPOK, B.A., K. V. KOSTYUKEVICH, S.I. LYSENKO, P.M. LYTVYN, O.S. LYTVYN, S.V. MAMYKIN, S.A. ZYNYO, P.E. SHEPELIAVYI, S.A. SHEPELIAVYI, S.A. KOSTYUKEVICH, YU.M. SHIRSHOV und E.F. VENGER: *Optical biosensors based on the surface plasmon resonance phenomenon: optimization of the metal layer parameters*. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*, 4:56–69, 2001.
- [Som64] SOMMERFELD, ARNOLD (Herausgeber): *Optik*, Band 4 der Reihe *Vorlesungen über Theoretische Physik*. Akademische Verlagsgesellschaft Geest, Portig KG, 1964.

- [SU91] SJÖLANDER, STEFAN und CSABA URBANICZKI: *Integrated Fluid Handling System for Biomolecular Interaction Analysis*. Anal. Chem., 63:2338–2345, 1991.
- [SVP06] STEPÁNEK, JOSEF, HANA VAISOCHEROVÁ und MAREK PILIARIK: *Molecular Interactions in SPR Sensors*. In: HOMOLA, JIRI (Herausgeber): *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Band 4 der Reihe *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*, Seiten 69–91. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [SyHI98] SOTA, H., Y. HASEGAWA und M. IWAKURA: *Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance*. J. Biochem., 70:2019–2024, 1998.
- [TBH⁺99] TAO, N.J., S. BOUSSAAD, W.L. HUANG, R.A. ARECHABAETA und J. D'AGNESE: *High resolution surface plasmon resonance spectroscopy*. Review of Scientific Instruments, 70(12):4656–4660, 1999.
- [WBT01] WANG, S., S. BOUSSAAD und N.J. TAO: *Surface plasmon resonance enhanced optical absorption spectroscopy for studying molecular adsorbates*. Review of Scientific Instruments, 72(7):3055–3060, 2001.
- [WCWZ04] WHEELER, AARON R., SOONWOO CHAH, REBECCA J. WHELAN und RICHARD N. ZARE: *Poly(dimethylsiloxane) microfluidic flow cells for surface plasmon resonance spectroscopy*. Sensor and Actuators B, 98:208–214, 2004.
- [Wik] <http://de.wikipedia.org>, Stand 29.03.2008.
- [Woo02] WOOD, R.W. Philosophical Magazine, 4:396, 1902.
- [WSG96] WEISS, M.N., R. SRIVASTAVA und H. GROGER: *Experimental investigation of a Surface Plasmon-based integrated-optic humidity sensor*. Electronics Letters, 32:842–843, 1996.
- [Zac02] ZACHER, THOMAS: *Utilisation of Evanescent Fields for the Characterisation of Thin Biosensing Layer Systems*. Dissertation, Fakultät für Physik der Technischen Universität München, 2002.
- [ZBT02] ZHANG, H.Q., S. BOUSSAAD und N.J. TAO: *High-Performance differential surface plasmon resonance sensor using quadrant cell photodetector*. Review of Scientific Instruments, 74(1):150–153, 2002.

- [ZSM05] ZAYATS, ANATOLY V., IGOR I. SMOLYANINOV und ALEXEI A. MARADUDIN: *Nano-optics of surface plasmon polaritons*. Physics Reports, 408:131–314, 2005.

B Abbildungsverzeichnis

2.1	Reflexion und Brechung an der Grenzfläche zweier Medien	11
2.2	Oberflächenplasmawelle und resultierendes elektrisches Feld an einer Metall/Dielektrikum Grenzfläche	14
2.3	Dispersionsrelationen von Licht und SPPen in den jeweiligen Medien bzw. Grenzflächen	19
2.4	Prinzip der Kretschmann-Raether-Konfiguration	21
2.5	Prinzip der Otto-Konfiguration	23
2.6	Reflexionsgrade an dem Dreischichtsystem	28
2.7	Abhängigkeit des Resonanzwinkels vom Brechungsindex	29
2.8	Schematischer Aufbau einer $\theta/2\theta$ -Methode, Quelle: [Sch]	31
2.9	Prinzip der Methode basierend auf der Fokussierung eines kollimierten Laserstrahls, Quelle: [San]	31
2.10	Aufbau und Sensorgramm eines Oberflächenplasmonenresonanz-Sensors, Quelle: [Kle]	32
2.11	Sensorgramm gemäß Gleichung (2.74), Quelle: [SVP06]	37
2.12	Sensorgramm gemäß Pseudo-erste-Ordnung Kinetik, Quelle: [SVP06]	38
2.13	Sensorgramme für verschiedene α_0 , rechte Seite: Bindungs-Isotherme, Quelle: [SVP06]	39
2.14	Reaktionskinetik zweier parallel ablaufender Pseudo-erste-Ordnung-Reaktionen, Quelle: [SVP06]	42
2.15	Reaktionskinetik einer bivalenten Rezeptor-Reaktion, Quelle: [SVP06]	43
2.16	Einfluss der Geschwindigkeit zur Einstellung eines Gleichgewichts der Oberflächenanalytkonzentration auf eine pseudo-erste-Ordnung-Reaktion, Quelle: [SVP06]	48
2.17	Analyt-Konzentration in einer Flusszelle, Quelle: [SVP06]	50
2.18	Analyt-Konzentrationen in der Flusszelle mit berücksichtigter Diffusion, Quelle: [SVP06]	51
3.1	Skizze des Aufbaus	53

3.2	Messprinzip, Quelle: reproduziert nach [ZBT02]	54
3.3	Der quadratische Taylor-Term als Näherung des Reflektionsgrades am Resonanzwinkel	56
3.4	Beziehung zwischen $(A - B/A + B)$ und Resonanzwinkeländerung . . .	56
3.5	Kalibrationskurve des Sensors	57
3.6	Foto des Aufbaus, Aufsicht	58
3.7	Laserstrahlprofil und Intensitätsverteilung eines Schnitts durch die Strahl- mitte	59
3.8	Skizze eines Gauß-Strahls	59
3.9	Skizze des verwendeten optischen Aufbaus	61
3.10	Fokussierung eines Gauß-Strahls durch eine Linse	62
3.11	Glasprisma auf dem Rotationstisch	63
3.12	Die Photodiode in ihre Halterung	65
3.13	Objektträger vor und nach der Plasmabehandlung	67
3.14	Unterschied zwischen langsamer und schneller Bedampfung	68
3.15	Unterschied zwischen langsamer und schneller Bedampfung mit haftver- mittelnder Chromschicht	69
3.16	Komponenten der Flusszelle	71
3.17	Foto eines Objektträgers mit aufgesetzter Flusszelle	72
4.1	Signal $\frac{A-B}{A+B}$ einer mit Wasser gefluteten Flusszelle	73
4.2	Messung der Ethanol-Wasser-Gemische	74

C Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich meinen Dank Herrn Prof. Dr. Anselmetti aussprechen, in dessen Arbeitsgruppe ich unter seiner Betreuung die Diplomarbeit verfassen durfte und der für alle Probleme ein offenes Ohr hatte.

Durch Frau Dr. Katja Tönsing habe ich erst von dieser Diplomarbeit erfahren. Somit verdanke ich ihr die Vermittlung der Arbeit. Desweiteren war sie mit ihrer netten, fröhlichen Art immer eine sehr hilfreiche Ansprechperson für fachliche und organisatorische Fragen.

Herrn Prof. Dr. Reiss danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Kokorrektor zu begutachten.

Einen sehr großen Dank richte ich an Herrn Dr. Andy Sischka, der mir während der gesamten Diplomarbeit in allen technischen und fachlichen Belangen tatkräftig unter die Arme gegriffen hat. Außerdem danke ich ihm für das Korrekturlesen.

Bei Herrn Dipl. Ing. Christoph Pelargus bedanke ich mich für zusätzliche technische und fachliche Unterstützung, speziell im IT- und Datenerfassungsbereich sowie im Bereich Optik und optische Komponenten.

Herrn Dipl. Phys. Volker Walhorn danke ich für seine Hilfe, wenn es um das AFM oder die Bedampfungsanlage ging. Auch er hatte auf meine Fragen immer sehr hilfreiche Antworten.

Für viele nützliche Literaturtipps und die Beantwortung sämtlicher Fragen bezüglich der Verarbeitung von PDMS danke ich Herrn Dipl. Biotech. Dominik Greif.

Für die Erledigung bürokratischer und organisatorischer Aufgaben danke ich Frau Gaby Krome.

Auch bei der restlichen Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften“ möchte ich mich für die sehr angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre „auf D1“ bedanken. Speziell Thorsten Bergmann, Sebastian Zünkeler, Maik Tiemann, Norman Schellert und Daniel Pla, die Bürokollegen sind bzw. waren spreche ich meinen Dank aus für die sehr angenehme, fröhliche und freundschaftliche Büroatmosphäre, die so manches Mal über das eine oder andere Motivationstief hinweggeholfen

hat. Thorsten Bergmann danke ich ferner für das Korrekturlesen.

Ich freue mich schon auf die nächsten Jahre „auf D1“ und hoffe, dass die Zeit während meiner Doktorarbeit genauso schön wird.

Olaf Schulz, mittlerweile an der Arizona State University, danke ich ferner für die Hilfestellungen zu Beginn meiner Arbeit in der Arbeitsgruppe sowie die Erklärung von diversen Gerätschaften und Verfahren. Liebe Grüße gehen nach Tempe/Arizona/USA an die A.S.U. .

Ein besonderer Dank geht an meine gesamte Familie, die mir das Studium erst ermöglicht hat. Auf ihre Unterstützung konnte ich mich, nicht nur während meines Studiums, sondern schon immer, verlassen.

Und zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Freundin Anne-Kathrin für alles, was sie in dieser Zeit für mich getan hat.