

Dipl.-Phys. Jork Leiterer

**Die Ultraschallfalle
als analytisches Werkzeug**

Die vorliegende Arbeit entstand an der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

Impressum

**Die Ultraschallfalle
als analytisches Werkzeug**

2009

Herausgeber:

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Unter den Eichen 87

12205 Berlin

Telefon: +49 30 8104-0

Telefax: +49 30 8112029

E-Mail: info@bam.de

Internet: www.bam.de

Copyright © 2009 by

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Layout: BAM-Arbeitsgruppe Z.64

ISSN 1613-4249

ISBN 978-3-9812910-2-5

Die Ultraschallfalle als analytisches Werkzeug

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Phys. Jork Leiterer

geb. am 27.12.1977 in Jena

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Panne
Prof. Dr. Klaus Rademann
Prof. Dr. Wolfgang Tremel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2008

Zusammenfassung

Die Ultraschallfalle bietet eine besondere Möglichkeit zur Handhabung von Proben im Mikrolitermaßstab. Durch die akustische Levitation wird die Probe kontaktfrei in einer gasförmigen Umgebung positioniert und somit dem Einfluss fester Oberflächen entzogen. In dieser Arbeit werden die Möglichkeiten der Ultraschallfalle für den Einsatz in der Analytik experimentell untersucht. Durch die Kopplung mit typischen kontaktlosen Analysemethoden wie der Spektroskopie und der Röntgenstreuung werden die Vorteile dieser Levitationstechnik an verschiedenen Materialien wie anorganischen, organischen, pharmazeutischen Substanzen bis hin zu Proteinen, Nano- und Mikropartikeln demonstriert. Es wird gezeigt, dass die Nutzung der akustischen Levitation zuverlässig eine berührungslose Probenhandhabung für den Einsatz spektroskopischer Methoden (LIF, Raman) sowie erstmalig Methoden der Röntgenstreuung (EDXD, SAXS, WAXS) und Röntgenfluoreszenz (RFA, XANES) ermöglicht. Für alle genannten Methoden erwies sich die wandlose Probenhalterung als vorteilhaft. So sind die Untersuchungsergebnisse vergleichbar mit denen herkömmlicher Probenhalter und übertreffen diese teilweise hinsichtlich der Datenqualität.

Einen besonderen Erfolg stellt die Integration des akustischen Levitators in die experimentellen Aufbauten der Messplätze am Synchrotron dar. Die Anwendung der Ultraschallfalle am BESSY konnte im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden und bildet derzeit die Grundlage intensiver interdisziplinärer Forschung. Außerdem wurde das Potential der Falle zur Aufkonzentration erkannt und zum Studium verdunstungskontrollierter Prozesse angewendet. Die wandfreie und konzentrationsabhängige Untersuchung über einen Volumenbereich von drei Größenordnungen an derselben Probe ist eine einzigartige Möglichkeit. So konnte wesentlich zur Aufklärung von Fragestellungen der unterschiedlichen Forschungsgebiete beigetragen werden. Diese Untersuchungen sind die ersten *in situ* Studien der Agglomeration in einem akustisch levitierten Tropfen, angefangen von kleinen (an)organischen Molekülen über Proteine bis hin zu Nanopartikeln. Zusammenfassend eröffnen die Ergebnisse dieser Arbeit einen breiten Anwendungsbereich zur Benutzung der Ultraschallfalle als analytisches Werkzeug.

Abstract

The ultrasonic trap offers an exceptional possibility for sample handling in the scale of microlitres. Using acoustic levitation the sample is positioned in a containerless gaseous environment and therefore evades the influence of solid surfaces. In this work, the possibilities of the ultrasonic trap are investigated experimentally for its operation in analytics. In combination with typical contactless analytical methods, like spectroscopy and X-ray scattering, the advantages of this levitation technique are demonstrated at several materials, such as inorganic, organic and pharmaceutical substances as far as proteins, nano and micro particles. It is shown that the utilization of acoustic levitation enables reliable a contactless sample handling for the use of spectroscopic methods (LIF, Raman) as well as for the first time of methods of X-ray scattering (EDXD, SAXS, WAXS) und X-ray fluorescence (RFA, XANES). For all these methods the containerless sample handling turns out to be advantageous. The obtained results are comparable with those of conventional sample holders and, moreover, they partly surpass them with regard to the obtained data quality.

A novel experimental approach was the integration of the acoustic levitator in the experimental set-up at the synchrotron. The application of the ultrasonic trap at BESSY was established during this work and actually represents the basis of intensive interdisciplinary research. Additionally the potential of the trap for enrichment was recognized and applied to study evaporation controlled processes. The containerless and concentration dependent analysis over a sample volume region of three orders of magnitude at the same sample is a unique possibility. It allowed essentially contributing to the elucidation of questions of several areas of research. These investigations are the first in situ studies of the agglomeration in an acoustic levitated droplet, starting from small (in)organical molecules over proteins up to nanoparticles. This comprises fields of research like biomineralisation, protein agglomeration, distance dependent effects of nanocrystalline quantum dots and the in situ observation of early crystallization stages. In summary, the results of this work open a broad area of application to use the ultrasonic trap as an analytical tool.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	9
1.1 Aufgabenstellung und Gliederung	10
1.2 Akustische Levitation	10
1.3 Anwendungen	12
1.4 Alternative Techniken zur Probenhalterung	14
2. GRUNDLAGEN	17
2.1 Strömung und Schall.....	17
2.2 Licht und Materie	18
2.3 Röntgenstrahlung.....	23
2.4 Aggregation	26
3. METHODEN UND TECHNIKEN.....	30
3.1 Charakterisierung der Ultraschallfalle	30
3.2 Kombination mehrerer Ultraschallfallen	33
3.3 Synchrotron- und konventionelle Röntgen-Strahlung.....	36
3.4 Energiedispersive Röntgenbeugung.....	39
3.5 Röntgenweitwinkelstreuung	40
3.6 Röntgenkleinwinkelstreuung	41
3.7 Dynamische Lichtstreuung, Zeta-Potential und Dichteschwinger	48
3.8 Laserinduzierte Fluoreszenz	51
3.9 Mikroskopie mit Photonen und Elektronen	52
4. EINSATZ DER ULTRASCHALLFALLE IN DER ANALYTIK.....	54
4.1 Kontaktlose Volumenbestimmung.....	54
4.2 Dynamische Aufkonzentration	59
4.3 Wandfreie Röntgenstreuung an Tropfen.....	61
4.3.1 EDXD der Kristallisation von Natriumchlorid aus wässriger Lösung	63
4.3.2 Bestimmung von Kristallitgrößen	66
4.3.3 WAXS der Kristallisation von Vitamin C, Aspirin, Coffein und CaCO ₃	68
4.3.4 SAXS der Aggregation von Apoferritin und kolloidalem Gold	88
4.3.5 XANES an der Synthese von Goldnanopartikeln	99
4.4 Konzentrationsabhängige Fluoreszenzspektroskopie	102
4.4.1 Optische Spektroskopie am Tropfen	102
4.4.2 Fluoreszenz organischen Farbstoffes in Lösung.....	103
4.4.3 Fluoreszenz nanokristalliner Quantendots in Lösung	106
4.5 Küvettenlose Ramanspektroskopie.....	109
4.6 Intensivierte Polymerisation von Styrol	111
4.7 Beeinflussung durch die Ultraschallfalle	113
4.8 Ausblick und offene Fragestellungen	115
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	117
6. APPENDIX.....	I

1. Einleitung

Charakteristisch für viele aktuelle analytische Fragestellungen sind kleine Probenvolumina, da oft nur geringe Probenmengen verfügbar oder erschwinglich sind (z. B. Proteine). Ein Schritt zur Lösung dieser Fragen ist eine entsprechende Miniaturisierung analytischer Instrumente [1, 2]. Die Handhabung solcher kleiner Mengen ist mit herkömmlichen Probehältern erschwert, da diese während der Anwendung analytischer Verfahren Verschmutzung und andere Einflüsse zeigen. Bei großem Probenvolumen sind derartige Effekte meist vernachlässigbar, aber bei sehr kleinem Volumen oft limitierende Faktoren.

Die akustische Levitation ermöglicht eine kontaktlose Handhabung von Proben ohne störende Wandeffekte (z. B. Küvette, Kapillare). Ein resonantes Ultraschallfeld ermöglicht dabei freies Schweben kleiner Probenvolumina in einer gasförmigen Umgebung. Die Proben sind gefangen in einer sogenannten Ultraschallfalle. Diese erlaubt die chemische Probenvorbereitung wie Anreicherung, Extraktion und Derivatisierung ebenfalls in Kombination mit konventionellen analytischen Techniken. Vakuum erfordernde Methoden sind dabei prinzipiell ausgeschlossen.

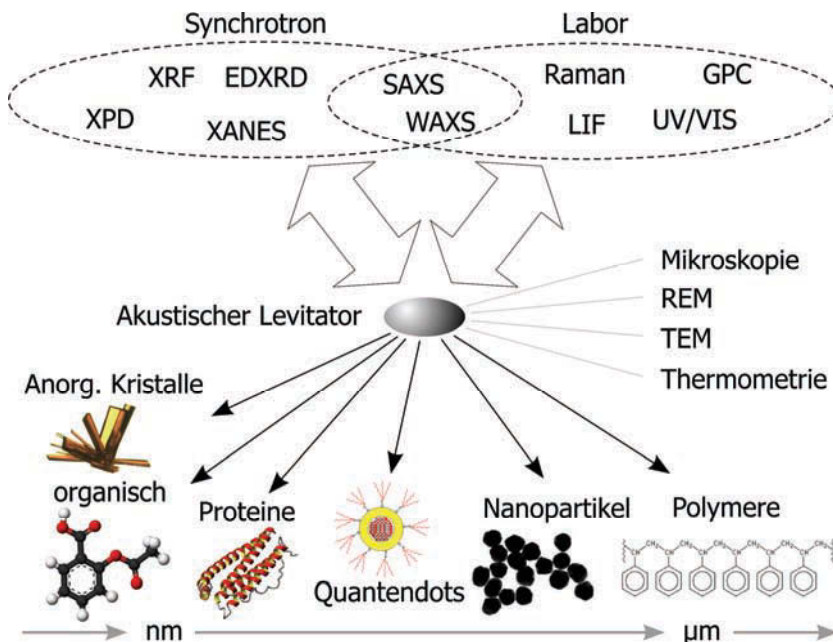


Abb. 1 Analytische Anwendungen akustischer Levitation, von kleinen (links) zu großen (rechts) Abmessungen.

1.1 Aufgabenstellung und Gliederung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung der akustischen Levitation als analytisches Werkzeug. Dementsprechend soll die Ultraschallfalle als Arbeitsmittel eingesetzt und ihre Vorteile gegenüber anderen Probenhaltern untersucht werden. Neben dem vergleichenden Einsatz liegt der Schwerpunkt auf Anwendungen, die nicht nur "auch" in der Falle, sondern ausschließlich in der Falle realisiert werden können. Durch die geeignete Wahl kontaktloser Analysemethoden wie Spektroskopie und Streuung sollen verschiedene Materialien anhand von anorganischen, organischen, pharmazeutischen Beispielen bis hin zu Proteinen, Nano- und Mikropartikeln untersucht werden. Abb. 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Einsatzgebiete der Ultraschallfalle und mögliche analytische Methoden.

Diese Arbeit ist wie folgt gegliedert: Im ersten Kapitel wird in die Thematik eingeführt, die Entwicklung des akustischen Levitators beschrieben, Anwendungen vorgestellt und entsprechende Literatur diskutiert. Kapitel 2 enthält zum Verständnis der Arbeit notwendige Grundlagen und Definitionen. Darauf aufbauend folgt in Kapitel 3 die Beschreibung verwendeter Methoden und Techniken. Die Anwendung der Ultraschallfalle in der Analytik ist Gegenstand von Kapitel 4. Es werden erreichte Ergebnisse präsentiert und ausführlich diskutiert. Am Ende der Arbeit werden eigene Studien zur Realisierung weiterer Anwendungen der Ultraschallfalle und im Ausblick noch offene Fragestellungen thematisiert. Als Abschluss erfolgt in Kapitel 5 eine Zusammenfassung.

1.2 Akustische Levitation

Die Ultraschallfalle wurde im Ergebnis jahrzehntelanger Forschung entwickelt. Über die akustische Levitation und die Falle sind über 200 detaillierte Arbeiten erschienen, die im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Levitation (nlat. *levitatio* zu lat. *levitas*, freies Schweben) bezeichnet die (scheinbare) Aufhebung der Schwerkraft [3] und ist ein alter Traum der Menschheit. Naturwissenschaftlich dokumentiert wurde die technische Umsetzung erstmals 1933 von Bücks und Müller, die das Halten kleiner Alkoholtropfen in Luft mit Hilfe resonanter Ultraschallfelder beschreiben [4]. Dabei wurden akustisch (griech. *akoustikós*, das Gehör betreffend) induzierte Kräfte ausgenutzt, um Flüssigkeiten im Gas ohne einen festen Halter zu platzieren. Die erste Beobachtung der Wirkung des Schalldrucks auf Partikel wurde 1866 dokumentiert, als sich in einem Kundt'schen Rohr Staubteilchen im stehenden Ultraschallfeld als charakteristisches Muster anordneten [5]. Die erste theoretische Beschreibung erfolgte 1934 für feste Partikel [6], 1955 für flüssige Tropfen [7] und 1969 für komprimierbare Partikel [8]. Danach werden Gleichgewichtskräfte durch hochintensive Schallwellen generiert, welche der Gravitation entgegenwirken und die Schwerkraft überwiegen.

Diese nichtlinearen Effekte wurden bis heute hinreichend untersucht und einige Ableitungen brachten zufrieden stellende Beschreibungen durch theoretische Modelle [6, 9-12]. In der Folge wurden einige Arbeiten zur Technik veröffentlicht [13-16]. Ab den 50er Jahren wurde die Technik von den Weltraumorganisationen als Möglichkeit für terrestrische Schwerelosigkeit gefördert und verschiedene Levitatoren entwickelt, z. B. für die NASA [15, 17-20], ESA [21] und NASDA¹ [22]. Die Weiterentwicklung seit den sechziger und siebziger Jahren erfolgte besonders für Experimente unter Mikrogravitation an Flüssigkeiten, vor allem an Schmelzen [13, 15]. 1998 wurde erstmals über die Anreicherung von Gasen in stehenden Ultraschallfeldern berichtet und dieses Phänomen als Kaltgasfalleneffekt (engl. *cold-gas traps*) bezeichnet [23, 24]. Es folgten systematische Untersuchungen und eine erste theoretische Interpretation dieses Dichte-Effekts [25]. Behälterlose Schmelzen und Nukleation eines Flüssigkristalls wurde ebenfalls in einem akustischen Levitator beobachtet [26]. Aufgrund der vielfältigen Anwendung wurden bis 2005 allein 13 Patente gezählt [27]. Der Einfluss von Schallwellen auf Tropfen wurde 2007 theoretisch beschrieben und das Dichteverhältnis durch bedingende Kräfte erklärt. Im Gegensatz zu harten Kugeln wirken auf flüssige Proben Kräfte entlang oder entgegengesetzt zur Ausbreitungsrichtung der akustischen Welle [28]. Auf levitierte Tropfen wurden Oberflächenschichten erzeugt und charakterisiert [29]. Die Kinetik von trocknenden Einzeltropfen lässt sich für Proteinformulierungen nutzen [30, 31] und wurde modelliert [32]. Im akustischen Schallfeld wurde ein Farbstofftropfen erstmalig als optischer Resonator zur Erzeugung von Laserlicht verwendet [33] und als potentieller Container für Intra-Kavität-Absorbanz vorgeschlagen. Es ist möglich, sowohl die Stromaufnahme als auch die Kosten des akustischen Levitators um zwei Größenordnungen bei gleichbleibender Levitationsleistung zu reduzieren und die Abstandsanpassung zu automatisieren [34]. Allein in den letzten Jahren haben sich einige Doktorarbeiten der akustischen Levitation gewidmet [35-39].

¹ *National Space Development Agency* (NASDA), ist eine der drei Vorläuferorganisationen der japanischen Raumfahrtagentur *Japan Aerospace Exploration Agency* (JAXA).

1.3 Anwendungen

Zu den vielfachen Nutzungsmöglichkeiten des Ultraschalls gehören wichtige technische Anwendungen wie die Kommunikation unter Wasser, Echolotung, zerstörungsfreie Materialprüfung, Werkstoffbearbeitung, das Entgasen von Flüssigkeiten oder Schmelzen und die Ultraschallmikroskopie. Im flüssigen Medium dient Ultraschall der Oberflächenreinigung, Reinigung von Trinkwasser sowie zur Aufarbeitung von Abwasser. In der Medizin wird Ultraschall zur Therapie sowie zur Diagnostik (Sonographie) als bildgebendes Untersuchungsverfahren mit hochfrequenten Ultraschallwellen ($f = 1\text{--}10\text{ MHz}$) verwendet [40]. Die Anwendungen von Ultraschall in der Umwelttechnik und -forschung sind vielseitig [41, 42]. Ein ganzes Teilgebiet der Chemie, die Sonochemie, befasst sich mit der chemischen Wirkung des Ultraschalls [43, 44] z. B. auf Synthese und Kristallisation [45, 46]. Infolge Kavitation kann lokal begrenzt, für einige Mikrosekunden, die Temperatur auf $10\ 000\text{ °C}$ und der Druck auf 10^9 Pa steigen. Dadurch lassen sich chemische Bindungen spalten (Sonolyse) und es kann zur Entstehung freier Radikale sowie zur Lichtemission (Sonolumineszenz) kommen [47, 48], an deren Verständnis noch gearbeitet wird [49, 50]. Außerdem können erhöhte Reaktionsgeschwindigkeiten, z. B. bei der Reaktion von metallischem Lithium mit halogenierten Kohlenwasserstoffen zu lithiumorganischen Verbindungen und bei künstlicher Alterung alkoholischer Getränke sowie erhöhte katalytische Aktivität folgen [51]. Die angeblich durch akustische Kavitation erzeugte Kernfusion ist Gegenstand aktueller Forschung [52, 53]. Die wohl am weitesten verbreitete Anwendung ist die Reinigung mittels Ultraschallbad (Labor, Optiker). Im Gegensatz dazu ist die Energieübertragung von einem geeigneten Ultraschallwandler an Gase um einen Faktor $10^4\text{--}10^5$ geringer als an Flüssigkeiten.

Schon 1963 wurde das Zerplatzen von akustisch levitierten Flüssigkeitstropfen durch Schockwellen untersucht und eindrucksvoll photographiert [54]. Die Visualisierung des Schallfeldes gelang 1980 mittels zeitgemittelter Hologramme und erlaubt die direkte Beobachtung des Einflusses gekrümmter Oberflächen von Sonotrode und Reflektor (Krümmungsradius 5 cm) [14]. Der Akustische Levitator wurde ab 1985 zur Bestimmung von physikalischen Eigenschaften wie spezifischer Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung [15] sowie zum Studium der Auswirkungen von Oberflächenschwingungen [55] genutzt. 1989 gelang die erfolgreiche optische Kopplung mit IR-Spektroskopie [56] und 1995 die Untersuchung physikalische Parameter unterkühlter Flüssigkeiten [57]. Bald wurden akustisch levitierte Tropfen zu Aufkonzentrationen verwendet und die maximale Größe von einigen Flüssigkeiten verschiedener Oberflächenspannung bestimmt [58]. Die Methode wurde 1998 erweitert und mit Kapillarelektrophorese gekoppelt [59] und deren Selektivität gesteigert [60]. Als mikroskalierte Probenvorbereitung eignet sich der akustischer Levitator, wenngleich sich die Notwendigkeit eines Autosamplers zur Handhabung von Probenvolumina einiger Mikroliter stellt [61].

Die sekundäre Partikelbildung als Aggregation von diversen Aerosolen beschreibt die akustische Agglomeration [62-65]. Eine technische Anwendung ist die Reinigung von Abgasen [66, 67], dabei fügen sich feinste Partikel ($\varnothing \approx 100$ nm) zu größeren zusammen, welche dann mit Durchmessern einiger Mikrometer mit konventionellen Filtern gesammelt werden können. Die schnelle Koagulation von suspendierten Aerosol Partikeln in einem stehenden Ultraschallfeld wurde erstmals 1927 durchgeführt und 1931 publiziert [68].

Die Tropfenverdampfung ist zur Untersuchung atmosphärischer Prozesse (Bildung von Eisparkeln) und technischer Anwendungen (Einspritzvorgang im Verbrennungsmotor) von Bedeutung. Die Verdampfungseigenschaften von Tropfen diverser Lösungsmittel wurde eingehend charakterisiert [69]. Die freie Einstellung von Temperatur, Druck und relativer Feuchte in der Probenumgebung erlauben die Simulation atmosphärischer Bedingungen [37]. Mittels IR-Thermographie konnten die Temperaturen auf der Oberfläche fester und flüssiger Proben bestimmt werden [70]. Diverse spektroskopische und weiterer Methoden sind kompatibel mit der akustischen Levitation und ermöglichen durch eine Kopplung interessante Analyseansätze [71]. Die Vermeidung heterogener Keimbildung an festen Probenwänden unterdrückt die Unterkühlung von flüssigen Proben [72] und wurde letztlich zur Untersuchung von Unterkühlungseigenschaften wässriger NaCl- und KCl-Lösungen eingesetzt [73]. 2004 wurde ein Ultraschallgenerator mit einer Arbeitsfrequenz von 4 MHz zur Entnahme von Mikropartikeln aus einer gebräuchlichen 96-Loch-Mikrotiterplatte, zur Aufkonzentrierung und anschließender Detektion mit konfokalem Laser Scanning Mikroskop verwendet [74]. Die Technik der akustischen Levitation scheint auch für den Transport von pulverförmigem Material geeignet [75]. Akustische Nahfeldlevitation (NFAL, engl. *near-field acoustic levitation*) wurde schon untersucht [76] und für den Materialtransport eingesetzt [77, 78]. So ließen sich Proben mit einer Masse von 10 kg bewegen [78] und ein Ultraschallmotor realisieren [79].

1.4 Alternative Techniken zur Probenhalterung

Derzeit ist keine Methode bekannt um Gravitation aufzuheben, bzw. die Gravitationskraft abzuschirmen. Allenfalls die hypothetische Erzeugung einer Masse auf der erdabgewandten Probenseite wird diskutiert, welche die Gravitationskraft aufhebt oder ein theoretischer Raum in der Mitte einer großen Masse, z. B. unserer Erde. Sämtliche bekannte Levitationsmethoden erzeugen demnach lediglich Kompensationskräfte zum scheinbar freien Schweben von Proben (Abb. 2). So wird der Satellit im Gleichgewicht zwischen Gravitation und Zentripetalkraft gehalten.

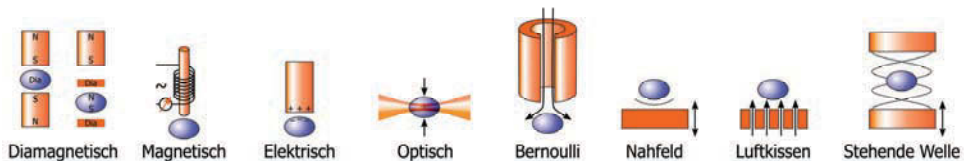


Abb. 2 Einige Prinzipien der Levitation schematisch, angelehnt an [27].

Andere in Frage kommende Kräfte beruhen auf elektromagnetischer Wechselwirkung angesichts ausreichender, aber wesentlich geringerer Reichweite. Statische magnetische bzw. elektrische Felder wirken auf elektrisch geladene bzw. magnetische Proben. Eine stabile Levitation ist generell mit statischen $1/r^2$ -Felder unmöglich, aufgrund des Theorems von Earnshaw [80] von 1842, welches sich auch direkt aus den Maxwell'schen Gleichungen ableiten lässt. Es lassen sich Sattelpotentiale aber keine gewünschten Potentialtöpfe erzeugen.

Durch geschickte aktive Rückkopplung lassen sich dynamische Levitationstechniken realisieren. Das funktioniert sowohl mittels magnetischem (Magnetgreifer) als auch elektrischem Feld (Elektrostatistische Waage, engl. *electrostatic balance*). Ersteres kann man sich als Spule vorstellen, die eine magnetische Probe gegen die Gravitation hebt und ausgeschaltet wird, sobald ein gewisser Mindestabstand unterschritten wird. Durch die Gravitation fällt die Probe wieder nach unten und vergrößert den Abstand zur Spule, welche in der Folge wieder aktiviert wird. Durch schnelle Regelung und Trägheit der Probe scheint diese frei zu schweben, wobei sich recht große Abstände und Massen positionieren lassen, deren Limit von der Stärke des Feldes bestimmt wird [81]. Ein bekanntes Beispiel ist der schwebende Globus. Die zweite Variante wird für eine Ladung im elektrostatischen Feld realisiert, die mittels aktiver Rückkopplung in Elektrostatistischen Levitatoren (ESL, engl. *electrostatic levitator*) gehalten wird [82, 83]. Zu den funktionell beeindruckendsten Vertretern zählt der BESL (engl. *beamline electrostatic levitation*) am *Marshall Space Flight Center* (Huntsville, Alabama) [84], der sich beispielsweise für die Untersuchung von Hochtemperaturmaterialien eignet [85].

Eine dynamische Variante zur Levitation sind zwei gekreuzte Sattelpotentiale die sich schnell ineinander abwechseln (hochfrequente Wechselfelder) und Funktionsprinzip der elektrodynamischen

Falle sind. So können geladene Partikel oder auch einzelne Teilchen (Ionen) mittels zeitlich veränderlicher elektrischer Felder (Paul-Falle) oder durch eine Kombination statischer elektrischer und magnetischer Felder (Penning-Falle) eingefangen werden (Nobelpreis 1989). Dabei ist die Umgebung auf Höchstvakuum (etwa 10^{-9} Pa) beschränkt. Die Probengröße kann auf wenige, auch nur 1 Ion reduziert werden. Das Limit liegt unterhalb eines Probendurchmessers von 100 μm , da sonst die Wechselfrequenz mit akustischer Resonanz interferieren würde. Ladungsdichten auf der Probe beeinflussen die Verdampfungsgeschwindigkeit des Tropfens und können zu Coulombexplosionen führen [86-90]. Dabei kann die Aufladung der Tropfen schon in einer Spritze durch Influenz geschehen [91]. In ähnlichen elektromagnetischen Fallen können auch neutrale Teilchen (z. B. Neutronen oder Atome) eingefangen und durch Verdampfung eines Teils der gespeicherten Atome weiter gekühlt werden [51]. Dazu werden sie auf Temperaturen unter 1 K gekühlt damit sie genügend kleine Geschwindigkeiten haben, um eingefangen zu werden.

Zusammenfassend ist eine stabile Positionierung nur in dynamischen Systemen möglich, welche auf eine oft teure und fehleranfällige Regeltechnik angewiesen sind. Es bleibt die Einschränkung auf leitende Materialien (im allgemeinen Metalle) oder auf Materialien, die zumindest Ladung tragen können. Zur Manipulation nicht leitender Substanzen wie organische Materialien und Keramiken muss auf andere Levitationsmethoden ausgewichen werden.

Mit diamagnetischen Materialien lassen sich eigenstabile Schwebezustände erreichen, das gelingt in einem starken Magnetfeld (einige Tesla) mit diamagnetischen Proben oder magnetischer Probe (Permanentmagnet) zwischen der stabilisierenden Wirkung zweier Diamagneten [92]. Dabei wird die Hubkraft durch einen starken (oft supraleitenden) Magneten erzeugt und schwacher Diamagnetismus (z. B. der Fingerspitzen) verursacht geringe abstoßende Kräfte. So gelang die eindrucksvolle Levitation eines Frosches, in dem eine magnetische Flussdichte von 0,2 mT und ein Strom von 2 A induziert wurde, was aber ungefährlich scheint aufgrund verlustloser Elektron-Orbital-Bewegungen. Die meisten organischen Substanzen haben diamagnetische Eigenschaft, ähnlich der von Wasser. Ohne Supraleiter könnten Tropfen mit einem maximalen Durchmesser von 160 μm levitiert werden. Für die Levitation eines Menschen wären 40 T und Energie von einigen GW erforderlich [92].

Als Nachteil ist anzuführen, dass nicht alle Proben diamagnetisch, magnetisch und immer der Wirkung starker magnetischer Felder ausgesetzt sind. Der Vorteil ist die Kraftwirkung auf jedes Elementarvolumen der Probe, was gut eine Schwerelosigkeit simuliert. Das ist ein entscheidender Unterschied zu Probenhaltern und auf Oberflächen wirkende Methoden sowie akustischer Levitation, welche stets auf die Gesamtheit der Probe wirken. So ist ein Tropfen nicht rund, sondern oblat und wie ein Ei unten durch die Gravitation etwas dicker. Durch die stetige Wirkung der Gravitation können sich suspendierte Partikel unten im Tropfen ablagern.

1. Einleitung

Bei der *Aerodynamischen Levitation* werden divergierende Strömung (Gas- oder Flüssigkeitsstrahl) und Gewichtskraft ausgenutzt, ähnlich dem tanzenden Ball auf einem Springbrunnen. Durch Schwingungen können große Instabilitäten in der Positionierung entstehen, nichtsdestotrotz ist es eine einfache Möglichkeit, um Proben schweben zu lassen. Allerdings ist die Positionierung für kleiner werdende Proben limitiert. Durch Kombination mit anderen Positionierungsmethoden gelang aber schon die Levitation von Proben mit Durchmessern von 4–25 mm, Dichten bis 9 g/cm^3 und bei Temperaturen bis zu 2700 K [93]. Unter Ausnutzung von Gasströmungen gelingt das Schweben auch großer Festkörper, so durch den Druckaufbau bis in den Bereich vieler Meter eines Luftkissenschiffes.

Feste Probenhalter als speziell optimierte Probengefäße, z. B. aus Teflon, können Kontaminationen verringern [94]. Zur weiteren Minimierung von Gefäßwandinflüssen dienen speziellen Oberflächen, auf denen Tropfen sitzen [95], an in einer Drahtschleife (Innendurchmesser bis 3 mm, Tropfenvolumen 10–70 μL) [96] oder am Ende von Kanülen [97-99] hängen. Diese Tropfen wurden mit elektrochemischen und spektrometrischen Methoden [96-100] untersucht. Hängende Tropfen wurden zur Aufkonzentrierung der Probenlösung durch Verdampfen des Lösungsmittels [101] und für Flüssig/Flüssig-Extraktionen [102] verwendet.

Für die *optische Levitation* werden Laserstrahlen hoher Apertur auf einen Tropfen fokussiert. Analog zur Technik der optischen Pinzette durchdringen die Strahlen die Probe und erzeugen Kräfte, welche die Probe auf die Strahlmitte zentrieren. Somit ist die Transparenz der Probe und Kontrast der Brechzahl zum umgebenden Medium gefordert. Erstere Einschränkung lässt sich durch geschicktes Kreisen des Laserstrahls um nichttransparente Proben umgehen. Die Vorteile sind, dass sich mehrere Strahlen beliebig durchdringen können und damit zur Levitation mehrerer Proben dienen und die Positionierbarkeit durch einfache Richtungsmanipulation der Strahlen (z. B. mit Spiegeln) möglich ist. Optische Levitation hat die Einschränkung nur für relativ kleine Probenmengen zu funktionieren und im Allgemeinen optisch transparente Proben zu benötigen, was aber für die Mehrzahl der Proben nicht gegeben ist. Zu beachten ist auch die Wirkung so stark fokussierter elektromagnetischer Wellen auf die Probe.

2. Grundlagen

In diesem Kapitel werden Begriffe eingeführt, geordnet von makro- hin zu mikroskopischen Größen. Aufgrund der thematischen Breite wird für weitere Erklärungen auf passende Literatur verwiesen.

2.1 *Strömung und Schall*

Die gerichtete Bewegung von Materie oder Teilchen lässt sich als Strömung beschreiben. Geschieht der Fluss in Schichten, welche sich untereinander nicht vermischen, spricht man von *laminarer* Strömung und bei starker Durchmischung in Wirbeln von *turbulenter* Strömung. Zur Klassifizierung zwischen Stokes-Reibung ($F \sim v$) und Newton-Reibung ($F \sim v^2$) kann die Reynoldszahl verwendet werden [103]. Zahlreiche weitere Kraft-Geschwindigkeits-Gesetze finden in Spezialfällen Anwendung, beispielsweise für geölte Oberflächen oder bei sehr hohen Geschwindigkeiten [104]. Immer handelt es sich um den Transport von Masse (Konvektion), welche den Kräften eines Potentials unterliegt. Diese Bewegung erfolgt in Richtung von Gradienten, z. B. aufgrund unterschiedlicher Dichte, potentieller Energie oder Stoffkonzentration (Diffusion). Ist die Ursache die Strömungsgeschwindigkeit, lässt sich die Zähigkeit von Flüssigkeiten und Gasen als Viskosität quantifizieren. Diese gibt darüber Auskunft, wie hoch der Widerstand gegen eine freie Bewegung von Teilchen in diesem Medium ist. Der Diffusionskoeffizient quantifiziert einen Teilchenstrom aufgrund eines Konzentrationsgradienten [104]. Dieser lässt sich z. B. mit der dynamischen Lichtstreuung (Kap. 3.7, S. 48) ermitteln und erlaubt die Bestimmung von Partikelgrößenverteilung und hydrodynamischem Radius.

Im Vergleich zu Strömungen (Transport von Materie) erfolgt bei Schallwellen eine Übertragung von Energie. Dabei schwingen Teilchen fester, flüssiger oder gasförmiger Materie längs zur Ausbreitungsrichtung (longitudinale Welle). Beschrieben wird eine Schallwelle durch Amplitude (Schallintensität, Schalldruck, in dB) und Frequenz (in Hz). Zur Charakterisierung dieser elastischen Wellen in Materie eignen sich Kennzahlen der Dämpfung (Absorption) und Ausbreitungsgeschwindigkeit (welche quadratisch dem reziproken Produkt aus Kompressibilität und Dichte entspricht). *Ultraschall* besitzt Frequenzen größer 20 kHz und ist vom menschlichen Ohr nicht wahrnehmbar. Als obere Grenze gilt 10 GHz, wo die Wellenlänge ($\lambda \approx 255$ nm in Stahl) den Größenbereich sichtbarer Strahlung überstreicht und Beugungserscheinungen an Bedeutung verlieren. Höhere Frequenzen werden aufgrund wesentlicher atomarer Absorptionsfrequenzen deutlich stärker in Materie absorbiert. Der Bereich der elastischen Schwingung im Festkörper endet im Hyperschall bei 10 THz, da die Wellenlänge nicht kürzer als der doppelte Atomabstand ($\lambda \approx 172$ pm = 1,72 Å in Luft) werden kann.

2.2 Licht und Materie

Licht beschreibt den Teil des elektromagnetischen Spektrums, der vom menschlichen Auge ohne Hilfsmittel wahrgenommen werden kann [105]. Im Allgemeinen wird der Begriff ebenso für angrenzende Spektralbereiche verwendet, auch wenn hier der Begriff „Strahlung“ verwendet werden sollte. Laserstrahlung als spezielle elektromagnetische Strahlung zeichnet sich durch hohe Kohärenz, kleine Divergenz und hohe Monochromasie aus, wodurch sich günstige Eigenschaften, wie gute Fokussierbarkeit, hohe Intensität und hohe Reichweite ergeben. Abb. 3 zeigt schematisch die Wirkung von Materie auf Strahlung, wobei Wechselwirkungen vernachlässigt werden.

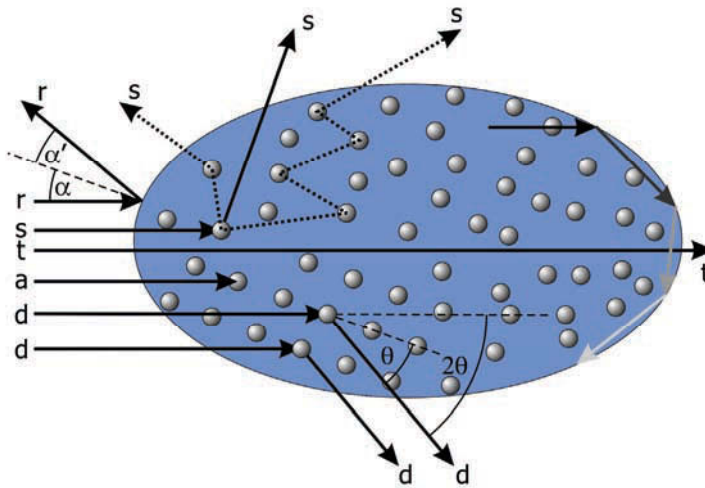


Abb. 3 Strahlung trifft auf Materie (Ellipse), schematisch im Modellbild der geometrischen Optik.

Am Beispiel eines Laserstrahls als Vertreter elektromagnetischer Strahlung werden die folgenden Begriffe mit Photonen als Träger elektromagnetischer Wechselwirkung definiert. Die *Intensität* beschreibt die Anzahl der Photonen (Lichtquanten) und die *Energie* ihre Frequenz (bzw. Wellenlänge). *Transmission* bezeichnet den Quotienten aus der Strahlungsintensität I hinter einer Probe zur einfallenden Intensität I_0 und kann einen Wert zwischen Null und Eins annehmen; für $T = 1$ gibt es keine Dämpfung. In der Praxis wird die Transmission oft in Prozent angegeben ($T[\%] = 100\% \times I/I_0$). Da menschliche Sinne nach dem Weber-Fechner-Gesetz logarithmisch arbeiten [106] und Zahlenwerte handhabbar sein sollen, die mehrere Größenordnungen überstreichen, kann man den Logarithmus der Transmission bzw. ihres reziproken Wertes verwenden. Dazu eignet sich besonders der dekadische Logarithmus. Der Wert für die Extinktion (Absorbanz, ND) als Funktion der Wellenlänge ist wie folgt definiert:

$$ND = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

$$I = I_0 \cdot 10^{-ND} = I_0 \cdot T$$

Der Extinktionskoeffizient $\alpha(\lambda)$, konsequenterweise Absorptionskoeffizient, gilt als Maß, wie viel elektromagnetische Strahlung fester Wellenlänge eine Substanz in molarer Konzentration bei einer Weglänge $l = 1$ cm absorbiert. Seinen Wert erhält man abgeleitet aus dem Lambert-Beerschen Gesetz mit Absorption (A oder OD , engl. *optical density*), Konzentration (*conc*, mol/m³ oder mol/l) der Lösung in der Messküvette und der Schichtdicke l der Messküvette:

$$I = I_0 \times e^{-\alpha(\lambda) \times \text{conc} \times l} . \quad (2)$$

Mit dem molaren Extinktionskoeffizient (ε , auch dekadischer Extinktionskoeffizient) folgt:

$$\log \frac{I}{I_0} = A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \times \text{conc} \times l . \quad (3)$$

Die Absorption verhält sich also im Gegensatz zur Transmission proportional zur Konzentration. Die optische Dichte bezieht sich auf den natürlichen Logarithmus, wodurch noch der Faktor $e \approx 2,3$ zur Umrechnung eingefügt werden muss:

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha \times \text{conc} \times l} = I_0 \times e \times 10^{-\alpha \times \text{conc} \times l} . \quad (4)$$

Der Extinktionskoeffizient kann z. B. auch vom pH-Wert abhängen und hat die Einheit m³mol⁻¹cm⁻¹ oder mol/cm. Als Voraussetzung muss die Strahlung monochromatisch und kollimiert (paralleler Strahlengang) sein. Absorbierendes Material ist homogen verteilt und es finden weder Streuung noch Wechselwirkungen untereinander statt. Ebenso sind Reflexion und Streuung an der Oberfläche auszuschließen. Die gesamte Abschwächung von Strahlung als Extinktion umfasst neben der Absorption sämtliche Strahlungsverluste wie Streuung und Reflexion. Als Lösung gilt eine molekulardisperse Mischung, in der Moleküle mehrerer Stoffe fein durchmischt sind und Teilchen unterschiedlicher Art nicht oder vergleichbar wie Teilchen gleicher Art wechselwirken [104]. Das Lambert-Beersche-Gesetz gilt selbst nur als Grenzfall für verdünnte Lösungen und ist in der Dispersionstheorie verfeinert [107]. Die wellenlängenabhängige Absorption und Brechzahl werden in der weiterführenden Theorie zum komplexen Brechungsindex zusammengefasst. *Polarisation* spielt oft eine Rolle, z. B. sobald Strahlung nicht senkrecht auf Grenzflächen fällt.

Bei der elastischen *Streuung* elektromagnetischer Strahlung in einem Medium wird nach dem Verhältnis zwischen Wellenlänge der Strahlung und Durchmesser der Streuer unterschieden. Sind die Teilchengrößen kleiner gleich der Wellenlänge, lassen sich die Intensitätsanteile von Reflexion, Beugung und Brechung nicht mehr unterscheiden und werden als Rayleigh-Streuung behandelt. Sind die Streuer wesentlich größer als die Wellenlänge, so können Interferenzerscheinungen auftreten, welche quantitativ in der Mie-Theorie (Lösung der Maxwell'schen Differenzialgleichungen für

2. Grundlagen

kugelförmige Teilchen) [108] oder nach Kubelka-Munk (Vereinfachte Theorie für optisch dichte Medien, ursprünglich für Farbanstriche entwickelt) [109] behandelt werden. Soweit für diese Arbeit wichtig, wird im jeweiligen Abschnitt auf elastische Streuung (Kap. 3.6, S. 41) und dynamische Streuung (Kap. 3.7, S. 48) ausführlicher eingegangen.

Ein Spezialfall ist die gerichtete Streuung, die als *Refraktion* bezeichnet wird, wofür in isotropen Medien das Snellius-Gesetz für eine Grenzfläche gilt. Zu beachten ist, dass durch *Mehrfachreflexion* (z. B. an einer planparallelen Schicht) oft erhebliche Beiträge zur gesamten Refraktion (R_{total}) geliefert werden (Gl. 5).

$$R_{total} = \frac{2R}{1 + R} \quad (5)$$

Beim Übergang von einem optisch dichteren (n_1) zu einem optisch dünneren Medium (Brechungsindex $n_2 < n_1$) wird das Licht vom Lot weggebrochen. Für größer werdende Winkel α ergibt sich somit ein Grenzwinkel, bei dem das gebrochene Licht parallel zur Grenzfläche verläuft. Es gilt nach dem Gesetz von Snellius:

$$\sin \alpha_{grenz} = \frac{n_2}{n_1} \sin 90^\circ = \frac{n_2}{n_1} \quad (6)$$

Für größere Winkel wird die Strahlung nahezu ohne Intensitätsverlust reflektiert. Totalreflexion ist nach Gl. 6 ein empfindliches Mass für die Brechzahl und kann mit einem Totalrefraktometer bestimmt werden. Bei bekannten Brechzahlen ist der Grenzwinkel leicht berechnet (z. B. $\alpha_{grenz} = 41^\circ$ für Kronglas mit $n = 1,51$ oder $\alpha_{grenz} = 49^\circ$ für Wasser mit $n = 1,33$ gegen Luft). So sind ein bzw. zwei Totalreflexionen im Inneren von Regentropfen verantwortlich für den sichtbaren Haupt- bzw. Nebenregenbogen. In dieser Arbeit wird der Einfluss von Totalreflexionen deutlich, wenn ein wässriger Tropfen im Laserstrahl levitiert wird.

Im Gegensatz zur elastischen Streuung zählt der *Raman-Effekt* zur unelastischen Streuung. Als Resultat ist die Wellenlänge der gestreuten Strahlung größer (Stokes) bzw. kleiner (Anti-Stokes) als die Wellenlänge der Primärstrahlung. Angeregt werden Molekülschwingungen (Rotations- und Streckerschwingungen). Eine Verkleinerung der Wellenlänge (und damit Vergrößerung der Energie) kann erfolgen, wenn das streuende Molekül schon vor der Wechselwirkung in einem angeregten Schwingungszustand ist. Die Wahrscheinlichkeit p dafür folgt der Boltzmann-Verteilung nach

$$p = e^{-\frac{h\nu}{kT}} \quad (7)$$

und ist für Raumtemperatur sehr gering, wodurch Stokes-Streuung ca. 10^3 -fach intensiver als Anti-Stokes-Streuung ist. Rayleigh-Streuung ist wiederum 10^3 -fach intensiver als Stokes-Ramanstreuung [107]. In Abb. 4 sind diese Prozesse im Energiediagramm schematisch dargestellt, wobei der Raman-Effekt die energetisch kleinen und oft schwer beobachtbaren oder nicht IR-

aktiven Übergänge zwischen elektronischen Niveaus (N_x) auf größere Energiebereiche der Molekülschwingungen abbildet. Erfolgt die Anregung des Grundzustandes (S_0) tritt keine Anti-Stokes-Streuung auf.

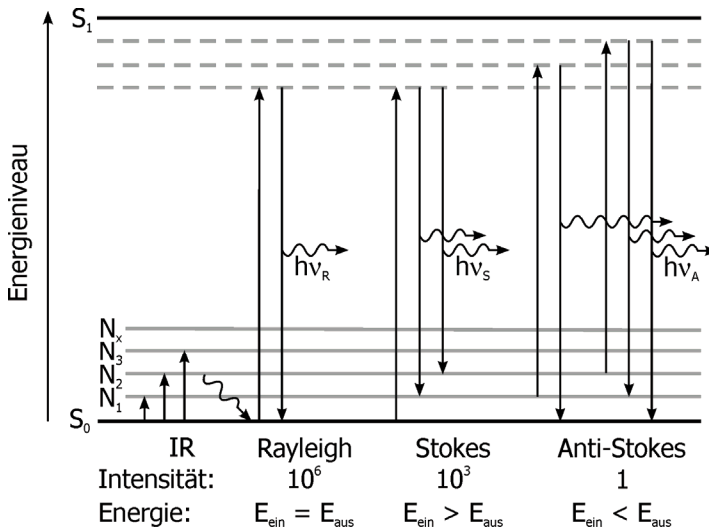


Abb. 4 Schematisch Rayleigh- und Raman-Streuung im Energiediagramm.

Die Strahlungsemission von Material nach der Bestrahlung mit Licht heißt *Lumineszenz*. Dabei wird unterschieden zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz. *Phosphoreszenz* bezeichnet den Übergang geringerer Wahrscheinlichkeit vom Triplett- in den Singulettgrundzustand unter Aussendung eines Photons. Zur theoretischen Beschreibung dieser so genannten spinverbotenen Übergänge ist es notwendig, die nichtrelativistische Näherung zu verlassen und eine Wechselwirkung zwischen Bahndrehimpuls und Elektronenspin (Spin-Bahn-Kopplung) zuzulassen. Zu den spinverbotenen Übergängen gehören auch strahlungslose Prozesse, die als Intersystem-Crossing (ISC) bezeichnet werden. Aufgrund der geringen Übergangswahrscheinlichkeit lässt sich Phosphoreszenz im Allgemeinen relativ lange (ms) nach dem Ende der Bestrahlung nachweisen. Dagegen verlischt *Fluoreszenz* (Singulett-Singulett-Übergang) für den Beobachter im Allgemeinen zeitgleich mit dem Bestrahlungsende (ns- μ s). Das Abklingverhalten kann allerdings genauer untersucht werden und liefert die Fluoreszenzabklingzeit. Diese hängt, wie auch die Fluoreszenz-Quantenausbeute eines Farbstoffes, von der Umgebung des Fluorophors ab (z. B. Lösungsmittel, Temperatur). Demzufolge können Änderungen in der Fluoreszenzabklingzeit Auskünfte über Änderungen der lokalen Umgebung liefern. Nur aufgrund dieser Nachleuchtdauer lassen sich die Übergangsprozesse also nicht exakt klassifizieren. Abb. 5 stellt diese Prozesse zusammen mit Förster-resonanter-Energietransfer (FRET) zwischen Donor-Akzeptor schematisch im Jablonski-Diagramm dar.

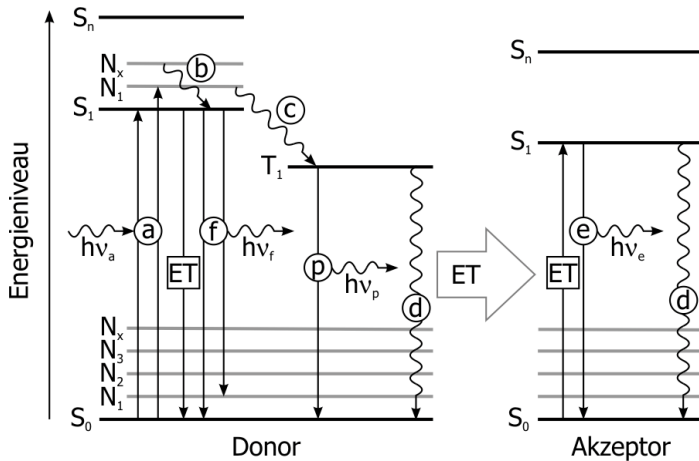


Abb. 5 Prinzip FRET im Energiediagramm vom Donor (links) zum Akzeptor (rechts).

FRET ist ein physikalischer Prozess der strahlungsfreien Energieübertragung eines angeregten Donors auf ein Akzeptormolekül über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen [110]. Dabei wechselt der Donor durch Absorption (a) eines Photons ν_a vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_n . Durch thermische Umverteilung (interne Konversion unter Energieerhalt) und Schwingungsrelaxation (b) wird Überschussenergie als thermische Energie abgegeben bis zum Erreichen des ersten angeregten Singulettzustands (S_1) als elektronischem Grundzustand. Dieser kann mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Fluoreszenz (f) unter Abgabe eines Photons (ν_f) oder strahlungsfrei durch ISC (c) in den Triplettzustand (p) verlassen werden. Nach der Kasha-Regel erfolgt die Emission vom angeregten Zustand geringster Energie [111]. Durch Phosphoreszenz (p) erfolgt die Rückkehr unter Abgabe eines Photons (ν_p) in den elektronischen Grundzustand. Alle Energieniveaus können zusammenfassend durch strahlungslose Desaktivierung (d) verlassen werden. Bei FRET erfolgt der Übergang vom angeregten Singulett- in den Grundzustand mit Energieübertrag auf einen Akzeptor strahlungsfrei (ET). Dieser kann wiederum vom angeregten Singulettzustand fluoreszieren (e). FRET kann somit sowohl über die Abnahme der Donor-Fluoreszenz (ν_f) als auch die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz (ν_e) detektiert werden.

Da die Intensität der Übertragung mit der sechsten Potenz des Abstandes d abnimmt, treten Abstände von wenigen Nanometern (< 10 nm) auf. Die Effizienz des Energietransfers η_F ist vom Förster-Radius r_F abhängig, der als Abstand zwischen beiden Fluorophoren definiert ist und bei dem die Energieübertragung zu 50 % vom Donor auf den Akzeptor erfolgt.

$$\eta_F = \frac{r_F^6}{r_F^6 + d^6} \quad (8)$$

FRET dient zur Bestimmung von molekularen Distanzen, wie Bindungsabständen und lässt sich zur Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. real-time-quantitative-PCR) in der Molekularbiologie [112, 113] bis hin zur Agrar- und Lebensmittelchemie [114] nutzen.

2.3 Röntgenstrahlung

Interatomare Abstände im Bereich 0,1–3 nm sind mit auf Licht basierenden Untersuchungen (VIS, $\lambda = 370\text{--}700\text{ nm}$) nur eingeschränkt zugänglich. Röntgenstrahlung ($\lambda = 50\text{--}230\text{ pm}$) wechselwirkt jedoch mit den Elektronen eines Atoms. Je energiereicher (härter) Röntgenstrahlung ist, desto kernnaher sind absorbierende Elektronen, wodurch die ohnehin geringe Absorption in Materie weiter abnimmt. Neben der Möglichkeit von Absorptionsuntersuchungen sind Röntgenstrukturanalyse und Röntgenspektroskopie verbreitete Anwendungen.

Klein- und Weitwinkelröntgenstreuung (Kap. 3.5 und 3.6) sind Methoden der elastischen Streuung. Die Streuung an einer periodisch dreidimensional geordneten Struktur (Kristall) ergibt, durch Interferenz, zahlreiche in verschiedene Raumrichtungen beobachtbare Reflexe und heißt Röntgenbeugung. Streuwinkel θ werden nicht (wie in der Optik) gegen die Oberflächennormale, sondern gegen die Oberfläche (Kristallgitterebene) gemessen. Die Methode, aus der Vermessung dieser Reflexe des Streubildes, ihrer räumlichen Anordnung und Intensität sowohl auf die Geometrie als auch die Anordnung der Atome zu schließen, heißt Röntgenstrukturanalyse [115]. Wird ein Kristall untersucht, entstehen Reflexe nach der grundlegenden Bragg-Gleichung, wobei d der Abstand zwischen benachbarten Gitterebenen ist:

$$n\lambda = 2d \sin \theta . \quad (9)$$

Im Gegensatz zu den durch Interferenzen der Röntgenstrahlung auftretenden Punktmustern (Laue-Diagramm) folgen für die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Kristalle radial um die Strahlachse verteilte Intensitäten (konzentrische Debye-Scherrer-Ringe [116]). Die Verteilung auf diesen Ringen ist besonders gleichmäßig, wenn viele, zueinander ungeordnete, Kristalle vorliegen (örtliche Mittelung, Pulverdiffraktometrie) und die Probe gedreht wird (zeitliche Mittelung). Werden die Intensitäten für jeweils festen Abstand zum Mittelpunkt azimuthal integriert, lässt sich im Diffraktogramm die Intensität als Funktion des Streuwinkels auftragen.

2. Grundlagen

Tabelle 1 Wellenlänge gebräuchlicher Röntgenröhren [115] und der μ Spot Beamline am BESSY im Vergleich.

	Mo	Cu	Fe	Bessy μ Spot		
$K_{\alpha 1}[\text{\AA}]$	0,70926	1,54051	1,93597			
$K_{\alpha 2}[\text{\AA}]$	0,713543	1,54433	1,93991			
$K_{\alpha}[\text{\AA}]$	0,710688	1,54178	1,93728	0,821	1,034	1,377
E [keV]	17,45	8,04	6,40	15,10	11,99	9,004
Fluss [Photonen/s]				ca. 1×10^9		

Die Bragg-Gleichung gilt für eine definierte Wellenlänge und Tabelle 1 führt ausgewählte, in dieser Arbeit wichtige, Größen auf. Wird keine monochromatische Strahlung verwendet, so spricht man von kontinuierlicher oder „weißer“ Röntgenstrahlung und die gestreute Strahlung muss wellenlängenselektiv (bzw. energiedispersiv) detektiert werden (Kap. 3.4). Die Intensitätsverteilung über die verschiedenen Energien können aufgrund der bekannten Geometrie des Strahlengangs in Diffraktogramme umgerechnet werden.

Elastische Streuung an kleinen Partikeln nach Rayleigh bedeutet quadratische Abnahme der Streuintensität mit der Entfernung und mit der vierten Potenz der Wellenlänge. Intensitäten werden addiert und steigen mit der sechsten Potenz des Teilchenradius ($I \sim r^6$). Streuung an größeren Partikeln bedeutet addieren der Amplituden. Die Rayleigh-Gans-Debye-Näherung ergibt neben dem Molekulargewicht auch Informationen zur Molekülgröße und Form. Die Fernfeldnäherung ($d > 2r^2/\lambda$) ergibt den Formfaktor, mit dem Rayleighstreuung eines unendlich kleinen Moleküls mit gleichem Molekulargewicht zu korrigieren ist. Dies ergibt sich aus der Doppelsumme über die Anzahl der Streuzentren und nach Abbruch der unendlichen Reihe lässt sich für die meisten Moleküle ein ausreichend genauer Formfaktor ermitteln. Die Molekülgröße, als das Trägheitsmoment des streuenden Teilchens, wird mit dem Gyrationradius abgeschätzt. Neben dem Gyrationradius lassen sich auch der zweite Viralkoeffizient und das Molekulargewicht elegant aus Extrapolation der Konzentration und des Streuwinkels gegen Null abschätzen (Zimm-Plot). Durch Interferenzeffekte dominiert die Vorwärtsstreuung. Die Intensität folgt grob lediglich der zweiten Potenz der Teilchengröße.

In der optischen Spektroskopie sind die bindenden Elektronen eines Moleküls im Energiebereich bis zu einigen Elektronenvolt entscheidend („Leuchtelektronen“). Innere Elektronen besitzen wesentlich höhere Bindungsenergien und können daher nur mit energiereicher Strahlung oder auch energiereichen Teilchen angeregt oder gar abgespalten (Ionisation) werden. Es können kurzwellige Strahlung analog zur Fluoreszenz, mit einer bestimmten Energieverteilung [117] (Röntgenspektrum, bestehend aus kontinuierlicher Bremsstrahlung [118] und charakteristischer Strahlung

aufgrund diskreter elektronischer Übergänge des bestrahlten Atoms) oder energiereiche Elektronen (Elektronen-Emissions-Spektroskopie) emittiert werden.

Die *Röntgenspektroskopie* beruht auf dem Auffüllen einer Elektronenlücke durch Schalen-sprünge der Elektronen von weiter außen liegenden Schalen. Wird das Loch durch Teilchenbestrahlung (z. B. Protonen mit Energien einiger MeV) erzeugt, spricht man von PIXE (engl. *particle induced X-ray emission*). Für Elemente mit Ordnungszahlen größer als 12 erhöht sich der Wirkungsquerschnitt für die Entfernung innerer Elektronen, so dass Element-Konzentrationen unter 10^{-9} g/L und Stoffmengen unter 10^{-18} g nachweisbar sind [119]. Wird das Loch durch elektromagnetische Strahlung erzeugt, wird von Röntgenfluoreszenz (RFA, Röntgenfluoreszenzanalyse oder XRF, engl. *X-ray fluorescence*) gesprochen. Bei den erforderlichen Elektronensprüngen erfolgt der Energieverlust der Elektronen durch Abgabe von Röntgenquanten (ähnlich Fluoreszenz im sichtbaren) mit mehr oder weniger scharfen Röntgenlinien. Die Linien werden durch die Hauptquantenzahl definiert und durch weitere Quantenzahlen modifiziert (Aufspaltung in Feinstruktur). So entsteht je nach Gesamtdrehimpulsquantenzahl $K_{\alpha 1}$ bzw. $K_{\alpha 2}$. Die Wellenlänge dieser K-Linien, genauer die Wurzel der Frequenz steigt im Allgemeinen linear mit der Ordnungszahl (Kernladung entscheidend, Moseley-Gesetz [120]). Bei der Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS, engl. *X-ray absorption spectroscopy*) ist der Anteil absorbierter und gestreuter Quanten proportional zur einfallenden Strahlung. So lässt sich analog zum Lambert-Beer-Gesetz eine Absorption definieren. Die Absorption für Energiebereiche außerhalb der Linien (Kanten) steigt mit der dritten Potenz der Wellenlänge. Mit XAS wurden erfolgreich Kristallisationsvorgänge beobachtet (z. B. von NiO-Nanopartikeln [121]) und durch Synchrotronstrahlung hochauflösende Kantenspektren ermöglicht (EXAFS, engl. *extended X-ray absorption fine structure*). Ein weiteres Teilgebiet ist die Auswertung elementspezifischer Feinstrukturen der Absorptionsbande in der Nähe der Absorptionskante (NEXAFS bzw. XANES).

2.4 Aggregation

Die Ansammlung von Partikeln (Atome, Moleküle, Kristalle) zu größeren Systemen kann unter dem Begriff Aggregation zusammengefasst werden und lässt sich nach der Art der Partikel und gebildeten Aggregate klassifizieren: Koagulation bezeichnet die unter Flockung eintretende Umwandlung eines Sols (z. B. Blut, Milch, Eiklar) in ein Gel [122]. Agglomeration beschreibt die allgemeine Anhäufung von Partikeln ohne spezielle Ordnung.

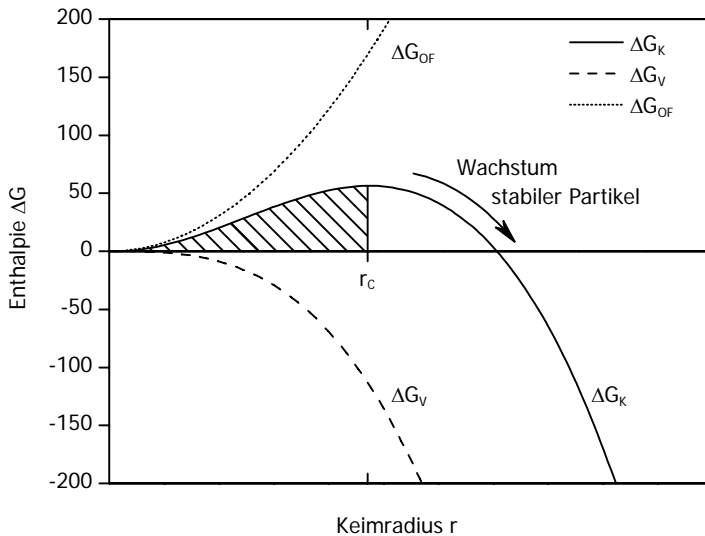


Abb. 6 Prozesse der Nukleation im Energiediagramm. Keimwachstum bis r_c vergrößert die Enthalpie (schraffierter Bereich); erst für größere Keimradien gelingt das Wachstum stabiler Partikel.

Kristallisation beschreibt den Vorgang der Kristallbildung, wobei eine periodisch dreidimensionale Ordnung aus Atomen aufgebaut wird. Die Bildung von Kristallen aus Lösung kann im Labor durch Methoden der Fällungskristallisation und Umkristallisation erfolgen, wobei sich der Vorgang der Kristallisation prinzipiell in die fünf Abschnitte: Übersättigung, Keimbildung, Kristallwachstum, Reifung und Rekristallisation einteilen lässt. Übersättigung des Ausgangsstoffes gilt als Voraussetzung und lässt sich durch Verdunstung des Lösungsmittels erreichen. So bilden sich Keime, wobei nach der klassischen Keimbildungstheorie [123] der aktuelle Übersättigungsgrad die Keimbildungsrate beeinflusst. Keime können sich bei Konzentrationen oberhalb der Sättigungskonzentration (homogen) oder darunter (heterogen) bilden. Heterogene Keimbildung geschieht an schon vorhandenen Grenzflächen der metastabilen Phase in Lösung, z. B. Gefäßwände, Verunreinigungen, schon vorhandene Kristalle oder Nukleierungsmittel [124]. Zur Induktion des Kristallisationsprozesses können geringste Mengen von als Kristallisationskeime wirkenden Stoffen (z. B. Impfkristalle) in unterkühlte bzw. übersättigte Lösungen oder Schmelzen eingebracht werden (Impfen) [122]. Gradienten von Temperatur, pH-Wert oder Druck können zur Bildung

kleinster Aggregate (auch subkritische Keime oder Clustern) führen [125], die strukturelle Eigenschaften eines Festkörpers haben. Diese Vorstufen wachsen durch Überschreiten einer kritischen Größe zu stabilen Keimen (Abb. 6). Wird der kritische Wert nicht erreicht, lösen sie sich wieder auf [124].

Stabile Keime haben aufgrund ihrer Größe eine aktive Grenzfläche, an der sich weitere Keime bilden können. Der kritische Keimradius r_c lässt sich durch das Maximum der freien Keimbildungsenthalpie bestimmen und berechnet sich mit der Oberflächenspannung σ_{OF} auf

$$r_c = \frac{2\sigma}{\Delta G_K}. \quad (10)$$

Die freie Keimbildungsenthalpie ΔG_K ist die Summe zweier gegenläufiger Terme, die beide Funktionen der Keimgröße sind. Der Oberflächenterm $\Delta G_{OF} \sim r^2$ ist positiv und der Volumenterm $\Delta G_V \sim r^3$ in übersättigten Systemen negativ, da die Übersättigung durch die Keimbildung verringert wird. Die Zahl der gebildeten Keime pro Zeit- und Volumeneinheit wird als Keimbildungsrate im Gleichgewichtsansatz nach Arrhenius beschrieben [4]. Oft besteht Interesse an möglichst großen Kristallen (Einkristallstrukturanalyse) oder an möglichst engen Kristallgrößenverteilungen (Medikamentenherstellung). Somit ist die Kontrolle von spontaner Keimbildung kontra Keimwachstum bedeutend (Abb. 7). Der Kurvenverlauf ist stark systemabhängig und kann sowohl linear [126] als auch mit abnehmender Steigung verlaufen [127].

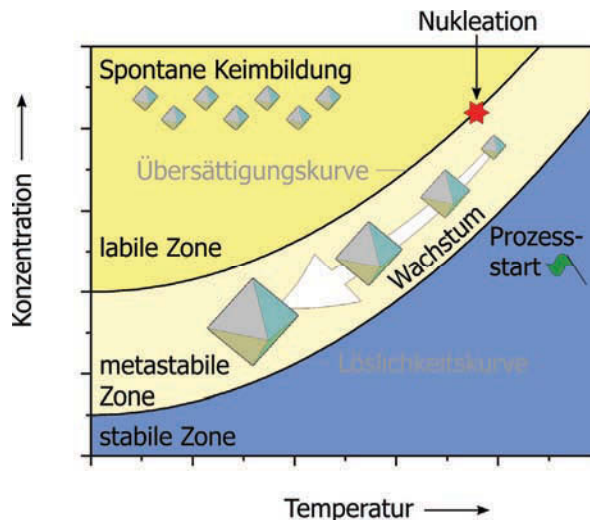


Abb. 7 Schematisch Nukleation versus Kristallwachstum in der metastabilen Zone zwischen Löslichkeits- und Übersättigungskurve. Verlauf der Konzentration als Funktion der Temperatur.

Mischbedingungen spielen eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der Nukleation und dem Kristallwachstum. Die direkte Beeinflussung der Kristallqualität (Größe, Trübung) ist sehr

2. Grundlagen

empfindlich auf Mengenskalisierung und macht die Kristallisation oft zu einem sehr schwierigen in die Produktion zu übertragenden Prozess (ausführliche Diskussion siehe [127]).

Reifung ist das Wachsen größerer kolloider oder kristalliner Teilchen auf Kosten kleinerer, die schließlich aufgezehrt werden (Ostwald-Reifung) [128]. Nach der Ostwald-Stufenregel geht ein in verschiedenen Energiezuständen vorkommendes chemisches System beim Energieentzug (z. B. Abkühlen) nicht direkt, sondern über Zwischenstufen in den energieärmsten (stabilsten) Zustand über. Dabei entsteht gewöhnlich zunächst die weniger dichte (und weniger stabile) Modifikation (Ostwald-Volmer-Regel) [129]. Rekristallisation bezeichnet die Bildung neuer oder größerer Kristalle auf Kosten der älteren oder aus polykristalliner Materie unter Einwirkung von Temperatur oder Verformungskräften. Umkristallisation ist die Reinigung kristalliner Verbindungen durch Lösen in geeigneten Lösungsmitteln und anschließendem Auskristallisieren, wobei Verunreinigungen in der Mutterlauge gelöst verbleiben [122]. Polymorphismus bezeichnet kristalline Strukturen verschiedener Form und ist durch die Neigung einer Substanz charakterisiert, in mehr als einer Struktur zu kristallisieren [130].

Bei der *Polymerisation* entsteht, unter anderem durch die Aufspaltung von Kohlenstoff-Doppelbindungen, aus einzelnen Molekülen (Monomeren) ein größeres Makromolekül (Polymer). Die resultierenden Polymere bestehen aus Monomer-Wiederholeinheiten, die meist lange Ketten bilden. Darüber hinaus können durch die Wahl geeigneter Kettenmoleküle mit mehreren Verknüpfungspunkten vernetzte Moleküle entstehen (Harze, Kautschuk, u. a.). Polymerisationen können in ionische (anionisch, kationische) sowie in radikalische Polymerisationen unterteilt werden. Für die *radikalische Polymerisation* wird ein Initiator (Aktivator, Startsubstanz) benötigt. Dieser zerfällt in einer Startreaktion ausgelöst durch verschiedene äußere Einflüsse (Wärme, UV- oder andere Strahlung) in Radikale, die aufgrund ungepaarter Elektronen sehr reaktionsfreudig sind. In der folgenden Wachstumsreaktion reagiert ein Radikal mit einem Monomermolekül unter Aufspaltung der Doppelbindung des Monomers und bildet ein neues, größeres Radikal, das mit weiteren Monomeren noch größere Radikale bilden kann. Diese Kettenreaktion dauert so lange an, bis entweder keine Radikale oder keine Monomere mehr verfügbar oder aufgrund erhöhter Viskosität nicht mehr beweglich genug sind, um in die Nähe eines weiteren Radikals zu gelangen. In der Abbruchreaktion werden die Kettenradikale durch Rekombination zweier Radikale bzw. Disproportionierung terminiert. Diese Terminierung lässt sich gezielt durch Zugabe von z. B. Lösungsmittel steuern.

In der *Polykondensation* verbinden sich zwei Moleküle unter Abspaltung eines kleineren Moleküls (zumeist Wasser) zu einem Makromolekül. Durch Überschuss eines "Mittlers" kann die Polykondensation zu einem dreidimensionalen Polymeren (sog. Polykondensat) fortschreiten. Die *Polyaddition* ist eine weitere Form von Polymerbildung, nach dem Mechanismus der nucleophilen

Addition von Monomeren zu Polyaddukten (z. B. Polyurethan). Dabei werden verschiedenartige Moleküle mit mindestens zwei funktionellen Gruppen unter Protonenübertrag miteinander verknüpft. Voraussetzung ist wieder, dass die funktionellen Gruppen einer Molekülsorte Doppelbindungen enthalten. Der Verlauf ähnelt der Polykondensation, jedoch ohne die Bildung niedermolekularer Nebenprodukte. Die Art der Polymerisation beeinflusst maßgeblich Molmasse und Polydispersität (Breite der Molmassenverteilung) von Polymeren.

3. Methoden und Techniken

In diesem Kapitel werden verwendete Methoden eingeführt und grundlegende Techniken erläutert. Zu Beginn werden, nach der Charakterisierung des akustischen Levitators, neue Möglichkeiten aus der Kombination mehrerer Levitatoren vorgestellt.

3.1 Charakterisierung der Ultraschallfalle

In der Ultraschallfalle (Tec5, Oberursel) wandelt ein Piezokristall Wechselspannung in mechanische Schwingungen um und überträgt diese über die Sonotrode S auf das Arbeitsmedium (meist Luft). Die entstehende Schallwelle breitet sich longitudinal aus und wird vom konzentrisch installierten Reflektor R zurückgeworfen. Beträgt der Abstand zwischen Sonotrode und Reflektor ein Vielfaches der halben Wellenlänge, bildet sich dazwischen eine stehende Welle aus; es kommt zur Resonanz.

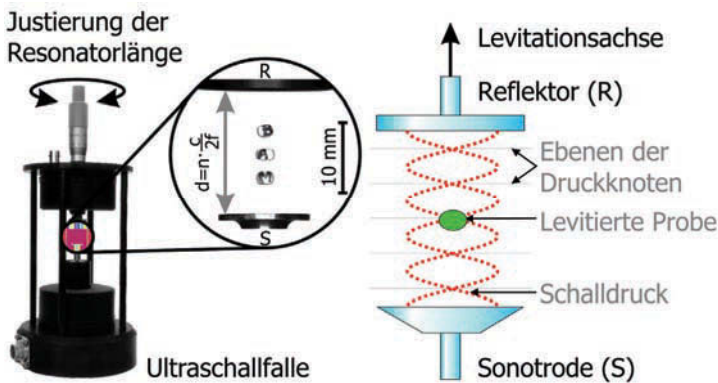


Abb. 8 Prinzip der Ultraschallfalle als akustischer Levitator. Schallpegel um 160 dB überwiegen die Gravitation. In jeden Druckknoten können Proben levitiert werden, wie in den drei mittleren Schallknoten durch die Levitation von drei Styroporbällen dargestellt.

Die stehende Welle mit einem Schallpegel von ca. 160 dB erzeugt lokale Dichteunterschiede mit äquidistanten Druckknoten, in denen sich feste, flüssige und einige gasförmige Proben positionieren lassen (Abb. 8). Es treten durch den Bernoullieffekt, und verstärkt durch den konkaven Reflektor, neben den axialen, auch ein Fünftel kleinere radiale Kräfte auf. Diese zentrieren die Proben in dem sie umgebenden Gas. Durch den Einbau der Falle in eine *Glovebox*² ist es leicht möglich in kontrollierten Umgebungen, wie z. B. unter einer Stickstoffatmosphäre, deren Reinheit in hoher Qualität sichergestellt werden kann, zu arbeiten. Da die Schallgeschwindigkeit eine Eigenschaft des Gases ist, muss auch der Resonanzabstand des akustischen Levitators angepasst werden. Im Prinzip kann akustische Levitation bis zu hohen (2700 K [93]) und sehr niedrigen

(218 K [131]) Temperaturen eingesetzt werden, beispielsweise zur containerlosen Präparation von Schmelzen [132].

Die Vorteile der akustischen Levitation sind vielfältig: Feste, flüssige und ausgewählte gasförmige Proben können ohne Vorbereitung direkt in einen Schallknoten platziert werden. Dazu sind einfache Mittel wie Pinzette für feste bzw. Pipette für flüssige Proben vollkommen ausreichend, wie in der Photoserie der Injektion eines Wassertropfens in Abb. 9 erkennbar ist. Es eignen sich Hamilton-Pipetten mit Edelstahlspitze ebenso wie Eppendorf-Pipetten (beispielsweise der Größe 0,5–10 μL) mit Kunststoffspitze, wobei für einige Proben die Ablösung von der Pipettenspitze durch die Verwendung oberflächenoptimierter Pipettenspitzen (low retention tip, nerbe plus GmbH) erleichtert wird.

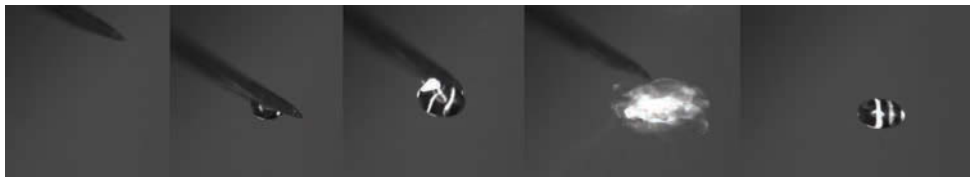


Abb. 9 Injektion eines Wassertropfens mittels μL -Pipette in den akustischen Levitator.

Im Gegensatz zu anderen Levitationstechniken ist keine Probenmodifikation erforderlich, wie z. B. das Anbringen elektrischer Ladung für die elektrodynamische Levitation. Der Probezugriff ist jederzeit möglich und die Probe kann ganz oder teilweise aus dem Ultraschallfeld entnommen werden. Zur Aufnahme flüssiger Proben werden Tropfen einfach durch Abschaltung des Levitators in flüssigen Stickstoff fallen gelassen und sind somit für weitere Untersuchungen, z. B. als Querschnitt durch Mikrotome, verfügbar. Akustische Levitation eignet sich zur Untersuchung einzelner Partikel in der Gasphase unter Ausschluss von Wandeffekten, wobei die vorhandene Grenzfläche zum Studium von Stoffaustauschprozessen mit der umgebenden Gasphase genutzt wird. So ist die Phasenumwandlung einzelner Partikel wandfrei möglich, was die Untersuchung physikochemischer Prozesse erlaubt. Durch Erhöhung des Schallpegels lässt sich die Tropfenform von kugelförmig über die Form eines Rotationsellipsoids bis hin zu einer flachen Scheibe einstellen. In Abb. 10 reflektiert eine Ringbeleuchtung auf der wässrigen Tropfenoberfläche und verdeutlicht die Tropfenform.

² Glovebox (dt. Handschuhbox)



Abb. 10 *Suspendierte Siliciumcarbid-Partikel verschiedener Tropfenformen durch variierten Schallpegel.*

Zu den Grenzen der akustischen Levitation zählt der eingeschränkte Größenbereich für feste (Durchmesser 0,1–6 mm) und flüssige Proben (Volumen 1 nL–20 μ L). Für die verwendete Arbeitsfrequenz von $f = 58$ kHz sind Proben mit einem Durchmesser von 0,2–2 mm bzw. einem Volumen von 5 nL–5 μ L typisch. Der maximale Tropfendurchmesser bestimmt sich letztendlich aus Oberflächenspannung und spezifischer Dichte der Flüssigkeit, als Verhältnis von hydrostatischem zu kapillarem Druck. Für Verhältnisse (Bond Nummer) größer 1,5 zerteilt sich der Tropfen (Desintegration) [58]. Für Wasser ist beispielsweise das obere Limit der Tropfengröße 155 μ L und für die meisten organischen Lösungsmittel ungefähr 40 μ L [16]. Akustisch levitierbare Dichten reichen bis zu der des schwersten Festkörpers (Iridium, $\rho = 22,6$ g/cm³) und der schwersten Flüssigkeit (Quecksilber $\rho = 13,6$ g/cm³) [133]. Wird die Versuchsdauer nicht durch die Verdunstung der Probe limitiert, kann diese mehrere Tage stabil levitiert werden, wobei die Lage des Scherpunktes nur um wenige Mikrometer um die Levitationsachse schwankt.

Die Tropfengröße ist eine Funktion der Wellenlänge, wobei unter atmosphärischen Bedingungen der maximale Tropfendurchmesser ungefähr der halben Wellenlänge entspricht [16]. Levitatoren einer Frequenz von 20–100 kHz erzeugen Wellenlängen von 17–3,4 mm, das kugelförmigen Tropfen mit einem Volumen von 2,6 mL–21 μ L entspricht. Größere Proben sind mit kleiner werdender Schallfrequenz möglich, welche dann nicht nur für den Menschen hörbar sind (160 dB), sondern auch mehr und mehr in den Bereich aerodynamischer Levitation driften (Tischtennisball schwebt über einem Basslautsprecher). Für kleinere Tropfengrößen nimmt die Positioniergenauigkeit ab, wobei Proben bis zu einem minimalen Volumen von 1 nL beobachtet wurden. Noch kleinere Proben können nicht mehr stabil levitiert werden. Die Grenze sollte mit höheren Schallfrequenzen, Abschirmung externer Luftströmungen und mehr-achsiger Levitatoren noch weiter sinken.

Als Nachteil ist anzuführen, dass immer ein Medium zur Schallübertragung vorhanden sein muss. Die akustische Levitation funktioniert also nicht im Vakuum, wurde aber schon erfolgreich unter verschiedenen Schutzgasen verwendet. Alternative Methoden zur Probenlevitation werden ausführlich in Kapitel 1.4 beschrieben.

3.2 Kombination mehrerer Ultraschallfallen

Arbeiten zur Charakterisierung einer Falle finden sich hinreichend in der Literatur, z. B. [16]. Ein mehr-achsiger Levitator, mit sich überlagernden Schallfeldern ist aus der Literatur bekannt, wurde allerdings bisher ausschließlich zur Stabilisierung von nur einer levitierten Probe verwendet, z. B. um eine aerodynamische Levitation zu stabilisieren [93]. Die Levitation eines Probenensembles als zweidimensionales Tropfenfeld wurde durch statische Aufladung der einzelnen Tropfen gezeigt, wodurch sich diese nicht zu einem großen vereinigen sondern abstoßen [134]. Durch Kopplung zweier Fallen hingegen, lassen sich ganz neue, erweiterte Möglichkeiten, ganz ohne Probenmanipulation (wie Aufladung), nutzen. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit erprobt und sind im Folgenden dargestellt.



Abb. 11 Aufbau zweier gekreuzter Levitatoren. Horizontale① und vertikale② Falle sind ineinander verschiebbar③, so dass sich die Schallfelder im gekoppelten Zustand senkrecht zueinander durchdringen.

Zwei baugleiche Ultraschallfallen wurden so kombiniert, dass ihre Levitationsachsen einen Winkel von 90° bilden und sich die horizontale① in die vertikale② Falle schieben lässt (Abb. 11). Interessant ist eine Visualisierung der Schallfelder mit einem Mikroskop③ um ihre Ausbreitung bzw. Anordnung in stationären Feldern zu charakterisieren. Diese ließen sich unter Verwendung von Trockeneis sichtbar machen. Gase, die schwerer als das umgebende Trägergas sind, können in den Druckknoten eines intensiven stehenden Ultraschallfeldes angereichert werden (z. B. Brom und Eisaerosole, vgl. 1.3). Gase mit geringerer Dichte als das umgebende Trägergas werden hingegen aus der Falle herausgedrängt. Hier gefriert Luftfeuchte durch das kühlende Trockeneis zu feinem Eisnebel, welcher rückstandsfrei sublimiert. Durch senkrechte Beobachtung zur Beleuchtung ergibt sich ein optischer Eindruck der Feldverteilung. Es zeigen sich sehr deutlich fünf „oblate Blasen“ (Abb. 12), welche theoretisch bestimmte toroidale Wirbel wiedergeben. In jedem Blasenzentrum ist

3. Methoden und Techniken

Levitation möglich, was an den hellen Punkten gut sichtbar ist, denn dort agglomerieren erste Eispartikel [24].



Abb. 12 Trockeneisversuche mit einer Ultraschallfalle.



Abb. 13 Trockeneisversuche mit zwei gekreuzten Ultraschallfallen.

Die Visualisierung zweier gekreuzter Ultraschallfelder ergibt offenbar eine komplizierte Überlagerung (Abb. 13). Nach exakter Abstimmung der Schallfelder sowohl im Resonatorabstand^④, als auch Lage^⑤ und Schallamplitude^⑥, wird die Ausbildung einer gitterförmigen Verteilung mit ähnlichen Blasen wie im einachsigen Levitator sichtbar. Die Levitation mehrerer Proben parallel in verschiedenen Druckknoten scheint zumindest nahe der Überlagerung beider Fallenachsen möglich. Tatsächlich lassen sich durch die Kreuzung der Schallfelder zweier Levitatoren 2-dimensional verteilte Levitationsmöglichkeiten erreichen. Im Folgenden wird die Methode anhand der Darstellung von Würfelzahlen (a–f) demonstriert. Es lässt sich mit Wassertropfen (Abb. 14) oder Styroporkugeln (Abb. 15) „würfeln“, das die zeitgleiche Positionierbarkeit mehrerer Proben, sowohl fest als auch flüssig, im Raum beweist. Die dreidimensionale Probenanordnung im Raster durch Levitation scheint möglich.

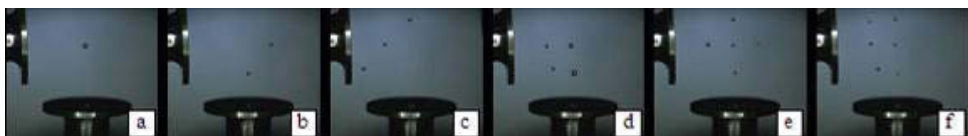


Abb. 14 Würfelspiel mit Tröpfchen.

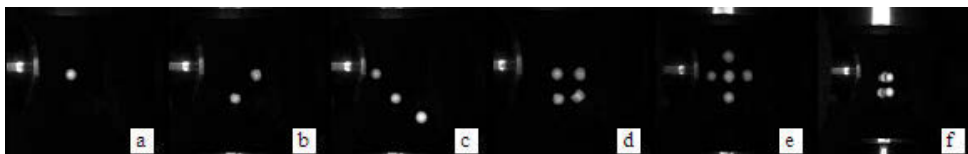


Abb. 15 Würfelspiel mit Styroporkugeln.

Eine annähernd rotationssymmetrische Probe rotiert normalerweise um ihre Hauptrotationsachse in einer vertikalen Falle, da es keinerlei ausgezeichnete Kraft gibt, die eine Rotation verhindert. Durch Änderung des Schallpegelverhältnisses zweier Fallen lässt sich eine Drehung dieser Rotationsachse erreichen. Oblates Styropor rotiert um die horizontale Achse (Abb. 16a), welche sich immer mehr

in eine Vertikale (d) drehen lässt. Selbst eine Drehung um die Achse senkrecht zum Papier (e) ist möglich, was gut sichtbar an den roten Kreisen ist, welche durch einen Punkt auf der rotierenden Oberfläche erzeugt werden!



Abb. 16 Drehung der Rotationsachse eines rotationsellipsoidalen Styroporbällchens.

Neben der kontaktlosen Positionierung mehrerer Proben im Raum und der Richtungsmanipulation ihrer Rotationsachse, ist eine Kombination zweier Proben interessant. Eine Vereinigung ist am Beispiel der zwei Substanzen, flüssiger Wassertropfen und fester Styroporkugel, gezeigt. Dazu kann das horizontale Schallfeld zweier gekreuzter Ultraschallfallen verringert werden (Tropfen-Tropfen in Abb. 17 und Tropfen-Kugel in Abb. 18) oder zwei getrennte Fallen ineinander geschoben werden bis sich deren Levitationsachsen kreuzen (Tropfen-Kugel Abb. 19). Letztere Technik ermöglicht die Überbrückung beliebig großer Distanzen.

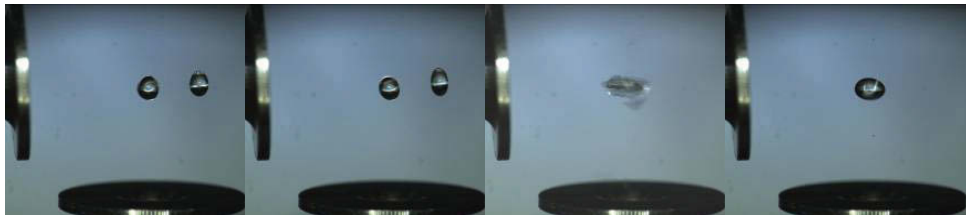


Abb. 17 Vereinigung zweier Wassertropfen in gekreuzten Ultraschallfallen durch Änderung der Schallfelder.



Abb. 18 Vereinigung von Styroporkugel mit Wassertropfen in gekreuzten Ultraschallfeldern.

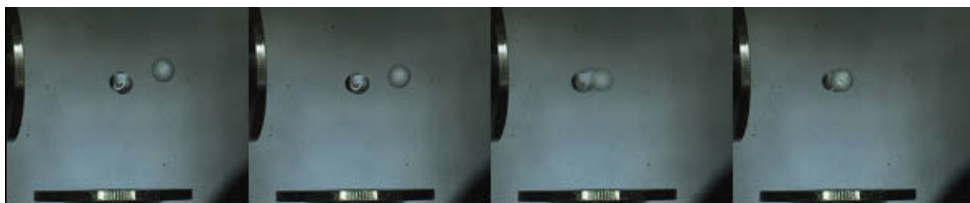


Abb. 19 Vereinigung von Styroporkugel mit Wassertropfen durch Positionieren zweier Ultraschallfallen.

Durch die schnelle Vereinigung zweier Substanzen und sofortige, durch innere Strömungen im Tropfen unterstützte Vermischung lassen sich z. B. chemische Reaktionen wandfrei verfolgen und

untersuchen. Ebenso scheint diese Methode geeignet, schnell Kristallisations- und Polymerisationsprozesse zu starten. Im Unterschied zu „stop-flow-Experimenten“ in denen sich zwei Tropfenstrahlen vereinigen und die Analyse, auf die Tropfenfrequenz getriggert, zeitlich je nach Abstand zur Vereinigung stattfindet, ermöglicht der Kreuzlevitator ein und dieselbe Probe zeitlich sequenziell zu analysieren. Das ist ein wesentlicher Vorteil für instabiles Probenmaterial und wenn nur geringste Mengen vorhanden sind.

3.3 Synchrotron- und konventionelle Röntgen-Strahlung

Röntgenstrahlung ist in analytischen Methoden vielseitig einsetzbar (Kap. 2.3). Einige dieser Methoden werden erst möglich bzw. praktisch realisierbar durch Verwendung intensiver Strahlung (Strahlung hoher Intensität). Für die Wellenlängenbereiche der Mikrowellen (Maser [135]) über das Infrarote (IR), Sichtbare (VIS) bis hinunter ins Vakuum Ultraviolett (VUV) existieren für viele Anwendungen geeignete Strahlungsquellen (Laser) aufgrund der Entwicklung strahlungsemitterender Resonatoren (Kap. 2.2). Der Erzeugung intensiver Röntgenstrahlung in konventionellen Röntgenröhren (Anodenspannungen ≤ 100 kV) ist durch den erreichbaren Wirkungsgrad (0,1–1 %) eine Grenze gesetzt. Dieser ist definiert als Quotient aus Strahlungsleistung und Anodenleistung ($P_A = i_A \times U_A$) und ergibt für moderate Leistungen näherungsweise $\eta = 10^{-9} \text{ V}^{-1} \times Z \times U_A$. Die elektrische Leistung liegt im handhabbaren Bereich von einigen kW (z. B. Generator $230 \text{ V} \times 10 \text{ A} = 2,3 \text{ kW}$, Röntgenröhre $40 \text{ kV} \times 40 \text{ mA} = 1,6 \text{ kW}$), aber der Schmelzpunkt des Anodenmaterials (meist Cu) wird bei höheren Betriebsparametern erreicht. Die parasitäre Wärme kann nicht schneller abgeführt werden und begrenzt letztendlich die Intensität der Röntgenquelle. Eine rotierende Anode (Drehanode) ermöglicht höhere Intensitäten ($\times 10$) bei einer elektrischen Leistung der Röntgenröhre von ca. 30 kW, was einer Strahlungsleistung von 30 W entspricht.

Sowohl bei konventioneller Röhre, als auch bei Drehanoden ist die Intensität I erzeugter Photonen der Energie E proportional zur Ordnungszahl Z des genutzten Anodenmaterials:

$$I \sim Z(E_{max} - E), \quad (11)$$

wobei E_{max} die maximale Photonenenergie darstellt und der Energie der erzeugenden Elektronen entspricht [136, S. 53]. Für kleine E ist I maximal und fällt linear bis auf Null für $E = E_{max}$. Niederenergetische Photonen werden sowohl im Target als auch Fenster der Röntgenröhre absorbiert, so dass die nutzbare Intensität für kleine Energien gegen Null geht. Nach der Art der Entstehung werden die von Elektronen, infolge ihrer Beschleunigung im elektrischen Feld von Atomkernen, emittierte Bremsstrahlung (kontinuierliches Spektrum) und charakteristische Röntgenstrahlung (Röntgenfluoreszenz) der Atome unterschieden. Die charakteristische Strahlung ist monochromatisch (diskrete Spektrallinien) und enthält je nach Filterung nur Bruchteile bis einige Prozent der Gesamtintensität [136]. Für Streuexperimente wird die Strahlung mittels

Röntgenspiegel fokussiert und Blenden kollimiert. Bei Streuexperimenten ist ein Ansatz für höhere Intensität im Gegensatz zum Punktfokus ein spaltartiges Strahlprofil, z. B. in einer Kratky-Kamera, was allerdings die Rückrechnung des verschmierten Streubildes bedingt.

Synchrotronstrahlung ist seit ihrer Vorhersage 1949 [137] und Nachweis 1956 [138] eine relativ aufwendige Quelle intensiver Strahlung kleiner Divergenz über einen weiten Energiebereich, vom Infraroten bis hin zu harter Röntgenstrahlung [139]. Typischerweise werden von einer Glühkathode Elektronen ausgelöst, durch die Anodenspannung (ca. 100 keV) und im Magnetfeld eines Mikrotrons auf Bahnen mit immer größer werdendem Umfang beschleunigt bis eine Energie von ca. 50 MeV erreicht ist. Im folgenden Synchrotron werden die Elektronen durch starke Magnete auf einer Bahn durch ein ringförmigen Vakuumrohr gehalten und erneut durch Wechselfelder eines Hohlraumresonators auf die Endenergie (bis einige GeV) beschleunigt. Damit die Elektronen auf ihrer Bahn bleiben, wird die Feldstärke des Magnetfeldes synchron zu ihrer kinetischen Energie erhöht. Die erreichbare Energie wird von der magnetischen Flussdichte B_{max} der Ablenkmagneten, vom Ringradius r und der Elementarladung des Teilchens q_E bestimmt. Es gilt $E_{max} = r \times q_E \times B_{max} \times c$. Die Elektronen werden anschließend in einen größeren Speicherring eingeschleust (Injektion).

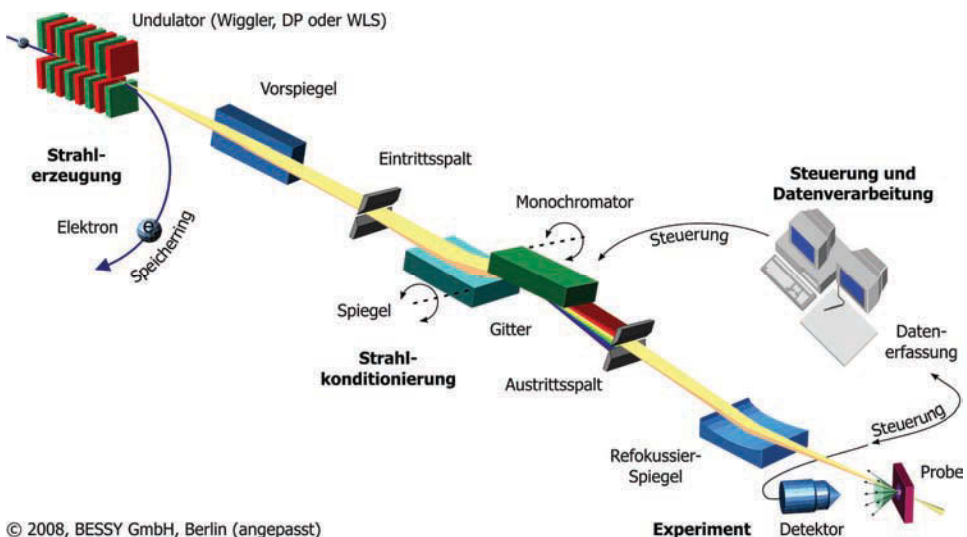
In diesem Speicherring erfolgt die Abgabe elektromagnetischer Strahlung durch Ablenkung der Ladungen in Magnetfeldern. Das entspricht einer starken Radialbeschleunigung, die durch den sogenannten Ablenkradius charakterisiert ist. Durch die hohe Geschwindigkeit der Teilchen (nahezu Lichtgeschwindigkeit) wird die Strahlung mit geringer Divergenz tangential zur Bewegung in Vorwärtsrichtung abgestrahlt. Die entstehende Synchrotronstrahlung ist eine Hertzsche Dipolstrahlung, deren Strahlungscharakteristik aber durch relativistische Effekte stark zu einer Strahlungskeule deformiert ist. Wiggler und Undulatoren können das nutzbare Strahlungsbündel weiter intensivieren. Synchrotronstrahlung ist in der Ringebene linear polarisiert (der elektrische Feldvektor schwingt in dieser Ebene). Außerhalb dieser Ebene ist die Strahlung elliptisch polarisiert [140]. Für ideal polarisierte Strahlung können Intensitäten gestreuter Strahlung korrigiert werden [141]. Der Energieverlust durch Strahlungsabgabe wird bei jedem Elektronenumlauf im Speicherring durch Beschleuniger (Hohlraumresonatoren, engl. *cavities*) ausgeglichen. Allerdings wird die Anzahl der Elektronen z. B. durch Streu- und Absorptionsprozesse und damit der durch sie erzeugte Ringstrom und die Intensität der Synchrotronstrahlung vermindert. Die Auffüllung der Elektronenanzahl erfolgt in zyklischen Injektionen.

Eine vielversprechende Strahlungsquelle für intensive Röntgenstrahlung ist der Freielektronen-Laser (FEL). Zur Erzeugung sehr kurzer Pulse (fs) sind mehrere Projekte in Entwicklung. Neben dem EUV-Bereich im FLASH (DESY, Hamburg) sind zukünftig weiche Röntgen-

3. Methoden und Techniken

strahlung im FEL (24 eV–1 keV BESSY, Berlin, 2010) und harte Röntgenstrahlung im XFEL (10 eV–17 GeV, Hamburg, 2012) geplant. Bis zur Entwicklung anderer, völlig neuer und kontinuierlich arbeitender Strahlungsquellen mit hohen Intensitäten ist das Synchrotron die Strahlungsquelle der Wahl für zeitaufgelöste Experimente. Der eigentliche Vorteil für diese Arbeit sind kurze Messintervalle im Sekundenbereich, was die Untersuchung zeitabhängiger Experimente im Minuten- bis Stundenbereich ermöglicht. In einem Laboraufbau dauert die Datenaufnahme vergleichbarer Streuexperimente relativ lange (viele Minuten bis Stunden).

Das Synchrotron der Strahlquelle BESSY II besitzt einen Radius von 15,3 m und Elektronen kreisen im Speicherring (Umfang 240 m, Radius 38,2 m) mit nahezu Lichtgeschwindigkeit etwa $10^6/s$ mehrere Stunden lang. Sie erzeugen eine Stromstärke bis zu 0,4 A (2×10^{12} Elektronen). In Ablenkmagneten (DP, Dipole), sowie in gerade Sektionen eingebauten Geräten (ID, engl. *insertion devices*), entsteht Synchrotronstrahlung. Letztere wurden für den langwelligeren Spektralbereich (Wiggler und Undulatoren) und zur Gewinnung extrem kurzwelliger Strahlung (Wellenlängenschieber, WLS) optimiert. Erzeugte Strahlung verlässt den Speicherring durch bis zu 40 m lange Strahlrohre und gelangt über Spiegel und Monochromatoren zu den Experimentierstationen. Monochromatoren (Multilayer oder Doppelkristalle) ermöglichen das Wellenlängenband zu selektieren und es kontrolliert zu variieren. Die Fokussierung der Synchrotronstrahlung kann durch konkave Spiegel (eingeschliffen oder gebogen) erreicht werden (Abb. 20). Bevor der Strahl auf die Probe trifft, passiert er eine Ionisationskammer und erzeugt ein Signal proportional zur Strahlintensität. Dessen zeitliche Auswertung kann besonders bei langen Experimenten wichtig sein. Unmittelbar nach jeder Injektion beträgt der Ringstrom ca. 300 mA und fällt innerhalb von 8 h auf ungefähr 200 mA ab.



© 2008, BESSY GmbH, Berlin (angepasst)

Abb. 20 Schematisch Erzeugung, Konditionierung und Nutzung von Synchrotronstrahlung.

3.4 *Energiedispersive Röntgenbeugung*

Bei der energiedispersiven Röntgenbeugung (EDXD, engl. *energy dispersive X-ray diffraction*) wird eine Probe in einen weißen Röntgenstrahl gebracht. Kristalline Bereiche beugen, wenn die Bragg-Bedingung erfüllt ist (Gleichung 9 S.23). Die gestreute Strahlung wird unter einem festen Winkel mit einem Detektor für verschiedene Energien aufgenommen. Dort werden einfallende Photonen gezählt (Intensität) und in verschiedene Energiebereiche (Kanäle) sortiert, deren Breite somit die spektrale Auflösung bestimmt. Pro Energiekanal verhält sich die Messzeit reziprok zur Anzahl der Kanäle. Der Streuvektor q ist definiert als

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta = 1,01355E \sin \theta, \quad (12)$$

wenn q in \AA^{-1} , λ in \AA , E in keV und der halbe Streuwinkel θ im Bogenmaß eingesetzt werden. Somit lassen sich für eine beliebige, aber konstante, Wellenlänge gemessene Intensitäten pro Energiebereich als Funktion des Streuvektors oder Streuwinkels in Streukurven, analog einem winkeldispersiv gemessenen Diffraktogramm, umrechnen. Zuweilen wird der Streuvektor auch als $s = 2\pi \times q$ definiert, was eine Fouriertransformation symmetrisch macht [141].

Röntgenstrahlung lässt sich gut über einen weiten Spektralbereich herstellen und liefert eine wesentlich höhere Intensität als derzeitige monochromatische Röntgenquellen. Breitbandige Nutzung fördert so eine schnelle Datenaufnahme, was das Studium zeitaufgelöster Prozesse ermöglicht. Im Vergleich zur sequenziellen Änderung der Beugungswinkel hat die Methode den Vorteil, das gesamte Diffraktogramm quasi zur gleichen Zeit aufzunehmen. Gelegentlich wird die Zeitauflösung nur von der Messelektronik bestimmt, kann aber deutlich erhöht werden, wenn lediglich ausgewählte Bereiche im Diffraktogramm interessieren [139]. Schon 1985 konnte die effektive Messzeit auf 20 ms reduziert werden [142]. Da unter einem fixen, in gewissen Grenzen wählbaren, Streuwinkel gemessen wird, ist diese Technik gut geeignet für Experimente unter eingeschränkten Probenumgebungen. Da nur gebeugte Photonen eines begrenzten Bereichs des Debye-Scherrer-Rings auf den Detektor treffen, geht ein Teil der Streuintensität am Detektor vorbei. Es gibt die Möglichkeit diesen Verlust unter Verwendung energiedispersiver Flächendetektoren zu kompensieren. Diese erfordern aber einen entsprechend größeren Winkelbereich zur Beobachtung und erschweren noch mehr kurze Auslesezeiten. Ein technisches Ziel ist, möglichst unter allen Streuwinkeln alle Energien zu detektieren. Aufgrund der relativ begrenzten Energieauflösung verwendeter Detektoren liefert EDXD generell ein deutlich schlechter aufgelöstes Diffraktogramm im Vergleich zu winkeldispersiven Techniken, welche im Folgenden beschrieben werden.

3.5 Röntgenweitwinkelstreuung

Für Streuwinkel größer $q = 1 \text{ nm}^{-1}$ finden sich Informationen über Struktur, Phase und Kristallitgröße. Röntgenweitwinkelstreuung (WAXS, engl. *wide-angle X-ray scattering*) und Röntgendiffraktometrie (XRD, engl. *X-ray diffraction*) sind analytische Methoden und letztere lässt sich in die Pulverdiffraktometrie (XPD, engl. *X-ray powder diffraction*) und Einkristall-Röntgenstrukturanalyse (SCD, engl. *single crystal diffraction* oder SCA, engl. *single crystal analysis*) zur Untersuchung kristalliner Proben gliedern. Wie anfangs erwähnt, ist Streuung an Elektronenhüllen einer periodisch geordneten Struktur die Grundlage. Diese muss aus einigen Atomen bestehen um Beugung von Röntgenstrahlung generell zu ermöglichen, woraus sich bei idealen Voraussetzungen (schwere Elemente mit vielen Elektronen, hoher Kontrast und Symmetrie) das erforderliche Probenvolumen auf einige Kubiknanometer abschätzen lässt.

Über den Interferenzgrad, also die räumliche Breite von Beugungsreflexen lässt sich die mittlere Kristallitgröße abschätzen. Gemessene Bragg-Reflexe sind nicht beliebig scharf, sondern weisen eine endliche Breite auf. Quantitativ beschreibbar ist das durch eine Breite $D_{(hkl)}$, welche eine Funktion des Streuwinkels ist und außerdem von apparativen Faktoren, wie z. B. der Brillanz/Monochromasie der benutzten Röntgenstrahlung abhängt. Bei Verwendung von charakteristischer Röntgenstrahlung, ohne Einsatz eines hochauflösenden Monochromators, bestimmt sich die spektrale Breite der emittierten Primärstrahlung aus der Lebensdauer der involvierten Elektronenzustände. Außerdem haben geometrische Faktoren des Messaufbaus wie Aperturwinkel (bestimmt durch die Größe und Position der Blenden), die Abweichungen von der präzisen Bragg-Brentano Geometrie (tangente Anordnung zum Fokussierungskreis durch Probenschicht) und die Dicke der Probenschicht einen Einfluss. Der apparative Beitrag zur Auflösung und Reflexbreite ist bestimmbar durch eine Probe mit sehr einheitlichem Gitterparameter sowie hoher Kristallitgröße und ist ebenfalls eine Funktion des Streuwinkels. Kristallitdimensionen lassen sich mit Hilfe der von Scherrer aufgestellten Gleichung 13 abschätzen, in der λ_R als Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung, θ für die Winkellage des betrachteten Bragg-Reflexes und ω_R (im Bogenmaß) als seine Breite auf der 2θ -Skala mit der Kristallitgröße $D_{(hkl)}$ korreliert wird [143].

$$D_{(hkl)} = \frac{k_s \lambda_R}{\omega_R \cos \theta} \quad (13)$$

Der Faktor k_s ist kleiner oder gleich eins und hängt sowohl von der Reflexform als auch der Art des Kristalls ab. Er wird bei Gebrauch der Halbwertsbreite bei halber Maximalintensität (FWHM) gleich 0,89 und bei Verwendung der integralen Halbwertsbreite eins gesetzt und kann zudem noch von der Kristallitform abhängen. Wegen $D_{(hkl)} \sim 1/\cos \theta$ ist die Reflexverbreiterung am auffälligsten für große Streuwinkel. Ein gemessenes Diffraktogramm entsteht aufgrund der Faltung des

theoretischen Diffraktogramms einer unendlich großen Korngröße. Somit setzt sich die gemessene Verbreiterung nicht additiv aus der Verbreiterung aufgrund der endlichen Korngröße und der apparativen Auflösungsbreite zusammen.

Als Renninger-Effekt werden Reflexe aufgrund von Umweganregung bezeichnet. Im Vergleich zur direkten Reflexion an einer Netzebene erfolgt die Reflexion im Anschluss an einer Primärebene nochmals an einer Sekundären oder Weiteren. Aufgrund dieser Doppel- oder Mehrfachreflexion haben die Reflexe geringere Halbwertsbreiten als direkte Bragg-Reflexe. Durch eine Ψ -Rotation des Kristalls um wenige Grad oder Messung unter verschiedenen Winkeln lassen sich solche oft zusätzlichen und unerwünschten Reflexe leicht identifizieren [115].

Die Thermisch-Diffuse-Streuung (TDS) kann die Intensität bei großen Beugungswinkeln um bis zu 25 % erhöhen. Dieser Effekt verfälscht nicht die Lage der Reflexe, sondern beeinflusst etwas die Auslenkungsfaktoren und wird daher fast immer vernachlässigt. TDS ist allerdings wichtig bei der Ermittlung von Deformationsdichten (ausführlich in [144]).

3.6 Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, engl. *small-angle X-ray scattering*) gibt Aussagen zur Partikelgröße, Größenverteilung, Form- und Strukturfaktor. Informationen über Strukturen im Bereich einiger Nanometer befinden sich im Winkelbereich $\theta < 3^\circ$. Die Messung solch kleiner Winkel ist experimentell aufgrund der Nähe zum Primärstrahl, der ein Vielfaches der Signalintensität verursacht, problematisch. Praktisch werden Winkel bis $1/1000^\circ$ erreicht, die Messungen an Strukturen von 1 nm bis 1 μm erlauben. Charakteristische Merkmale solch großer Probenabmessungen sind fundamental verschieden von denen atomischen Maßstabs. Während Kristalle ein hoher Grad an Ordnung und uniforme Bausteine charakterisieren, sind auf der Nanometerskala die Bausteine eher ungleichförmig sowie komplex und selten gut geordnet. Daraus ergeben sich, im Vergleich zu den scharfen Beugungsreflexen für XRD, unscheinbare diffuse Streubilder der Kleinwinkelröntgenstreuung. SAXS eignet sich zur Beschreibung von Strukturen mit Größen im typischen Bereich von 1–100 nm.

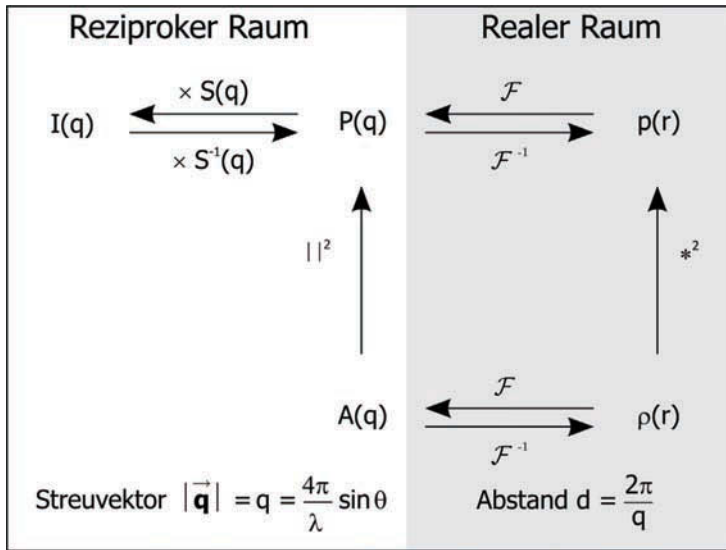


Abb. 21 Das magische Quadrat der Streuung kombiniert Funktionen im realen Raum (Abstände d) und Funktionen im reziproken Raum (Streuvektor q).

In der mathematischen Beschreibung ist typischerweise die Streuamplitude $A(q)$ die Fouriertransformierte \mathcal{F} der Elektronendichteverteilung $\rho(r)$. Experimentell zugänglich ist jedoch das Betragsquadrat von $A(q)$ als Intensitätsverteilung $I(q)$, so dass bei der Messung die Phaseninformation verloren geht (so genanntes *Phasenproblem*). Die Fouriertransformation ist eine eindeutige Transformation und erlaubt die Rekonstruktion der Elektronendichteverteilung bei Kenntnis der Streuamplitude. Die Zusammenhänge sind in Abb. 21 im so genannten Magischen Quadrat aus $P(q)$, $p(r)$, $\rho(r)$ und $A(q)$ dargestellt. Aus $I(q)$ kann über $P(q)$ die $p(r)$, die Paarabstandsverteilungsfunktion (PDDF, engl. *pair distance distribution function*) wieder eindeutig über eine inverse Fouriertransformation (IFT) bestimmt werden. Aus dieser kann mit dem Programm DECON [145] versucht werden, die $\rho(r)$ zu ermitteln. Auch der Berechnungsweg über $A(q)$ ist möglich [146]. Eine Alternative bietet das Erraten der $p(r)$, aus deren Modellierung mit geeigneten Computerprogrammen sich dann alle weiteren Funktionen geschlossen ergeben, zumindest aber numerisch berechnen lassen (SINGLEBODY [147], MULTIBODY [148]).

Für Röntgenstrahlung wird die Streulänge eines einzelnen Elektrons auf einen Wert von $b_e = 0,28 \times 10^{-12} \text{ cm} = 2,8 \times 10^{-6} \text{ nm}$ angegeben, woraus sich die Streulänge für jedes Atom als Vielfaches ergibt. Die Streulängendichte (SLD, engl. *scattering length density*) ist definiert als Quotient aus der Streulängensumme der einzelnen Atome und dem ausgefülltem Volumen:

$$\text{SLD} = \frac{\sum b_i}{V}; \quad [\text{SLD}] = \frac{\text{cm}}{\text{cm}^3} = \text{cm}^{-2}. \quad (14)$$

Die mittlere Elektronendichte

$$\rho_e = Z_m \rho_m = N_A \frac{Z_e}{M_r} \rho_m \quad (15)$$

beschreibt die Anzahl der Elektronen pro nm^3 und berechnet sich aus der entsprechenden mittleren Massendichte ρ_m multipliziert mit der Anzahl der Elektronen pro Gramm, Z_m . Diese ist gegeben durch die Avogadrozahl N_A , die Anzahl der Elektronen pro Molekül Z_e und dem Molekulargewicht M_r . Multipliziert mit der Streulänge eines Elektrons folgt die SLD, tabellarisch für verwendete Materialien in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2 Streulängen und Elektronendichten benutzter Materialien im Vergleich.

Name	ρ_m [g/cm ³]	M_r [g/mol]	Z_e	ρ_e [e ⁻ /nm ³]	SLD [nm ⁻²]	SLD [Å ⁻²]	Formel
Wasser	0,997	18,015	10	333,55	$0,9339 \times 10^{-3}$	$9,339 \times 10^{-6}$	H ₂ O
Gold	19,32	196,97	79	4666,3	$13,07 \times 10^{-3}$	$130,7 \times 10^{-6}$	Au
Ethanol	0,785	46,067	26	266,61	$0,7471 \times 10^{-3}$	$7,471 \times 10^{-6}$	C ₂ H ₅ OH
Stearinsäure	0,847	284,48	94	167,13	$0,4719 \times 10^{-3}$	$4,719 \times 10^{-6}$	C ₁₇ H ₃₅ COOH
Citronensäure	1,542	192,12	100	483,34	$1,353 \times 10^{-3}$	$13,53 \times 10^{-6}$	C ₆ H ₈ O ₇
Calciumcarbonat	2,715	100,09	50	816,75	$2,2869 \times 10^{-3}$	$22,87 \times 10^{-6}$	CaCO ₃

Die Verwendung der Elektronendichte ist also gleichbedeutend mit der SLD. Durch Messung relativer Intensitäten lassen sich Größe, Form und Struktur von Nanopartikeln bestimmen. Durch Absolutmessungen kann zusätzlich das Molekulargewicht und die Anzahl von Nanopartikeln ermittelt werden.

Nach dem Babinet'schen-Theorem ist der Kontrast der Elektronendichte $\Delta\rho_e$ für die Intensität der Kleinwinkelstreuung entscheidend, man kann nur durch weitere Grundannahmen zwischen Suspension und porösem Festkörper („Käsebatzen“/„Käse mit Löchern“) unterscheiden. Für SAXS sind im Allgemeinen Messungen bis zu einem Elektronendichtekontrast von 100 Elektronen pro Kubiknanometer gut möglich, für Werte kleiner als $20 \text{ e}^-/\text{nm}^3$ wird es schwierig bis problematisch.

Im Vergleich zur Beugung erfolgt Streuung auch an nur einem Streuzentrum (Atom) und die Überlagerung mehrerer Streuzentren erfolgt konstruktiv. Werden nur unabhängige Partikel (z. B. verdünnte Lösung) untersucht, entspricht die Streuintensität $I(q)$ dem Formfaktor $P(q)$. Wechselwirken die Partikel miteinander (z. B. konzentrierte Lösung), setzt sich $I(q)$ aus dem Produkt von Formfaktor $P(q)$ und Strukturfaktor $S(q)$ zusammen. Dieser Faktor $S(q)$ wird in der Kristallographie als Begriff Gitterfaktor verwendet, da er Informationen über die Positionen der Teilchen in Bezug zueinander enthält. Für steigende q -Werte sinkt der Grad der Interferenzen zwischen den Partikeln und der Strukturfaktor strebt im Mittel gegen eins:

$$S \xrightarrow{q \rightarrow \infty} 1. \quad (16)$$

3. Methoden und Techniken

Für eine Probe mit N Partikeln des Volumens V und der Elektronendichte ρ_e verhält sich die gesamte Streuintensität auf einem Detektor nach Gleichung 17:

$$\int I(q) \sim d_{PD}^{-2} \sigma_e T N \Delta \rho_e^2 V^2 P(q), \quad (17)$$

wobei der Abstand zum Detektor d_{PD} , die Transmission der Probe T , der konstante Streuquerschnitt eines Elektrons $\sigma_e = 7,9406 \times 10^{-26} \text{ cm}^2$, der Elektronendichtekontrast $\Delta \rho_e$ und der Formfaktor $P(q)$ eingehen [149]. Für eine möglichst hohe Qualität der Streudaten ergeben sich aus dem Absorptionsvermögen, der Materialdichte und verwendeter Strahlungsenergie optimale Probendicken im Bereich von einigen Mikrometern bis zu einigen Millimetern. Bei der Verwendung von Synchrotronstrahlung sind im Allgemeinen Flussdichte (Strahlintensität pro Querschnittsfläche) und Elektronendichtekontrast zur Abschätzung des detektierbaren Probenvolumens limitierende Faktoren. Ist die Intensität zu hoch, können empfindliche Proben, z. B. Proteine, durch Strahlschäden zerstört werden. Eine externe Kühlung mindert den Effekt, wird aber meist zur Qualitätsverbesserung von Beugungsreflexen eingesetzt.

Durch eine Guinier-Annäherung kann der Streumassen-, bzw. der *Gyrationsradius* (definiert wie der Trägheitsradius in der Mechanik, R_G) direkt aus den Streukurven ermittelt werden. Der Streumassenradius R_G eines Teilchens ist eine modellfreie Größenangabe, ohne auf die Geometrie des Teilchens Rücksicht zu nehmen. Denn jeder Körper besitzt einen Trägheitsradius. Dieser steckt in der Krümmung der Streukurve bei $q \rightarrow 0$. Entsprechend dem Momenten-Theorem der Fouriertransformation, ist das Trägheitsmoment (zweite Moment) der Funktion proportional der negativen Krümmung (zweite Ableitung) der Fouriertransformierten. Der Gyrationsradius ist im Allgemeinen aus der Dichteverteilung $\rho(r)$ definiert [150]:

$$R_g^2 = \frac{\int_v r^2 \rho(r) dv}{\int_v \rho(r) dv}. \quad (18)$$

Im einfachen Fall für kugelförmige Streuer mit Radius r_0 lässt sich R_G geschlossen darstellen:

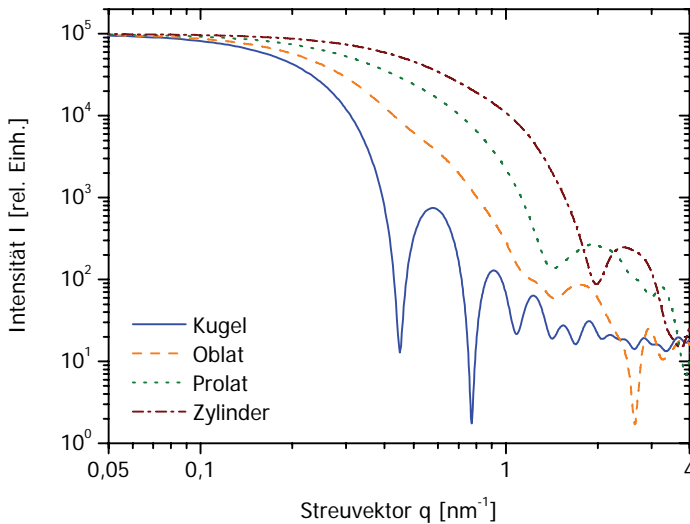
$$R_g^2 = \frac{\int_0^{r_0} r^4 \rho(r) dr}{\int_0^{r_0} r^2 dr} = \frac{\frac{1}{5} r^5 \Big|_0^{r_0}}{\frac{1}{3} r^3 \Big|_0^{r_0}} = \frac{3}{5} r_0^2 \text{ somit } R_g = \sqrt{\frac{3}{5}} r_0. \quad (19)$$

In der Näherung nach Guinier wird eine Streukurve durch eine Gauß'sche Glockenkurve approximiert. Für einfache geometrische Figuren ergeben sich geschlossene Ausdrücke [151], welche in Tabelle 3 dargestellt sind.

Tabelle 3 Formeln für Gyrationradius R_G , hydrodynamischen Radius R_H und Volumen V .

Modell	Formel	R_G	R_H	V
Kugel (Radius r)	$x^2 + y^2 + z^2 = r^2$	$\sqrt{\frac{3}{5}}r$	r	$\frac{4}{3}\pi r^3$
Oblates Ellipsoid (2 große Halbachsen a und kleine Halbachse b)	$\frac{x^2 + y^2}{a^2} + \frac{z^2}{b^2} = 1$	$\sqrt{\frac{2a^2 + b^2}{5}}$	$\frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{\arctan(\sqrt{a^2 - b^2}/b)}$	$\frac{4}{3}\pi a^2 b$
Prolates Ellipsoid (große Halbachse a und 2 kleine Halbachsen b)	$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2 + z^2}{b^2} = 1$	$\sqrt{\frac{a^2 + 2b^2}{5}}$	$\frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{\ln\left[\frac{a + \sqrt{a^2 - b^2}}{b}\right]}$	$\frac{4}{3}\pi a b^2$
Gerader Kreiszyylinder (Zylinder, Länge l und Radius r)	$x^2 + y^2 = r^2$ für $0 \leq z \leq l$	$\sqrt{\frac{l^2}{12} + \frac{r^2}{2}}$	$l / \begin{bmatrix} 2\ln(l/r) - 0,19 \\ -8,24/\ln(l/r) \\ +12/\ln(l/r)^2 \end{bmatrix}$	$\pi l r^2$

Unter Verwendung dieser Formeln können mit der Software SINGLEBODY [147] Streukurven als Funktion $p(r)$ und PDDFs als Funktion $P(q)$ für beliebige mathematische Körper mit konkreten Werte nach der Monte-Carlo-Methode simuliert werden (Abb. 22). Dabei erfolgt die Berechnung für zufällig ausgewählte Punkte im Volumen.



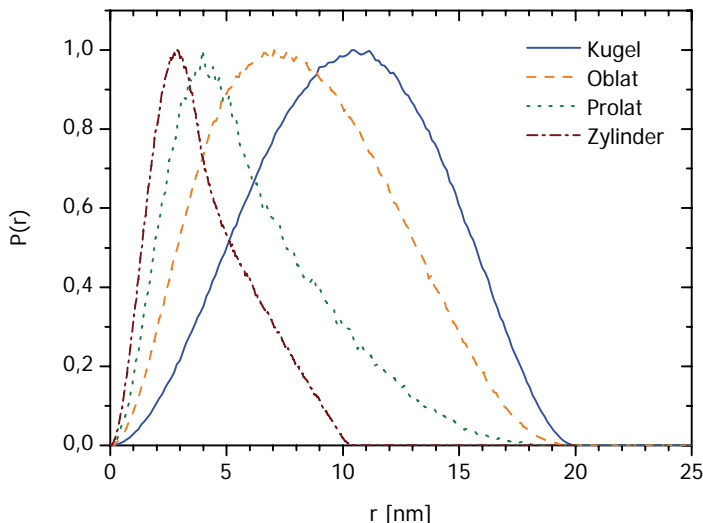
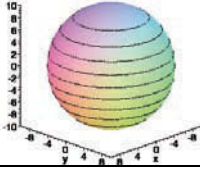
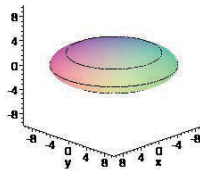
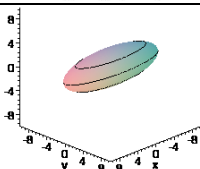
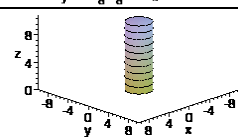


Abb. 22 Streukurve und PDDF einfacher geometrischer Körper wie Kugel, Oblat, Prolat und Zylinder.

Die Kurven $I(q)$ wurden für kleinste Streuvektoren $q = 0,05 \text{ nm}^{-1}$ auf die Intensität 10^5 normiert, wo sie einen horizontalen Verlauf zeigen. Deutliche Unterschiede sind für größere Streuvektoren sichtbar. Die Minima fallen dabei theoretisch, für einen konkreten q -Wert, auf Null ab und haben in einer praktischen Messung zumindest den gleichen Wert. Die gezeigten Kurven ergeben sich aufgrund der logarithmischen Skalierung und Berechnung der Streuintensität für diskrete Streuvektoren. Dabei unterscheiden sich die Streukurven nicht nur im q -Wert ihres Abfalls, sondern auch in der Form ihres weiteren Verlaufs. Somit sind anhand markanter Streukurven einfache Körper gut zu unterscheiden, was noch deutlicher beim Vergleich der zugehörigen $p(r)$ wird (Abb. 22, unten).

Außerdem lassen sich für alle einfachen Modellkörper aus Tabelle 3 konkrete Werte berechnen, welche in Tabelle 4 zusammen mit der schematischen Form dargestellt sind.

Tabelle 4 Beispiele für Gyrationradius R_G , den hydrodynamischen Radius R_H und das Volumen V für diverse Formen mit Singlebody (S) oder mit theoretisch abgeleiteten Formeln aus Tabelle 3 berechnet (T).

Modell	Form	R_G [nm]	R_H [nm]	V [nm ³]
Kugel $r = 10$ nm		S: $7,745 \pm 3 \times 10^{-3}$ T: 7,746	T: 10	S: 4209 ± 263 T: 4189
Oblates Ellipsoid $a = 10$ nm $b = 3$ nm		S: $6,467 \pm 4 \times 10^{-3}$ T: 6,465	T: 7,5	S: 1244 ± 24 T: 1257
Prolates Ellipsoid $a = 10$ nm $b = 3$ nm		S: $4,851 \pm 1,2 \times 10^{-2}$ T: 4,857	T: 3,7	S: 370 ± 83 T: 377
Gerader Kreiszyylinder $r = 3$ nm $l = 10$ nm		S: $3,214 \pm 1,8 \times 10^{-3}$ T: 3,214	T: 25,4	S: 135 ± 12 T: 503

3.7 Dynamische Lichtstreuung, Zeta-Potential und Dichteschwinger

Die Streuung elektromagnetischer Strahlung an Proben ganz analog zu SAXS kann mit Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich erfolgen und wird als statische Lichtstreuung (SLS) bezeichnet. Im Gegensatz dazu ermittelt die dynamische Lichtstreuung (DLS) nicht den statistischen zeitlichen Mittelwert gestreuter Strahlung, sondern die zeitliche Fluktuation der Streuintensität bzw. Wellenlängenverbreiterung (quasielastische Lichtstreuung). Daraus lassen sich Informationen zur Dynamik und Partikelgrößenverteilungen gewinnen. Inkohärente Streuung (unabhängige Teilchen, verdünnte Lösung) und eine hohe Kohärenzlänge der Strahlung (Laser) werden vorausgesetzt.

Die Streuintensität folgt einer spektralen Lorentzverteilung und die Halbwertsbreite ist im Vergleich zur einfallenden Laserstrahlung mit f_0 ungefähr um einen Faktor von $\Delta f = 10^3$ verbreitert (Dopplerverbreiterung). Daraus lässt sich bei bekannter Geometrie und bekanntem Wellenvektor die Diffusionskonstante D direkt berechnen ($D = 2\pi\Delta f/q^2$). Da die direkte Messung bei einer geforderten Auflösung von $f_0/f \approx 10^{13}$ technisch nicht möglich ist, wird zur Bestimmung erst der Offset der gestreuten Strahlung eliminiert (*self beating spectroscopy*) [107]. Der andere Zugang moderner Geräte ist die statistische Auswertung der Intensitätsfluktuationen mittels Autokorrelation (auch PCS, engl. *photon correlation spectroscopy*). Entsprechend der Brownschen Molekularbewegung haben kleinere Partikel eine höhere Geschwindigkeit als größere und gestreutes Licht fluktuiert schneller. Dabei ergibt sich eine Exponentialfunktion $g(t)$ als Faltung ($I * I$) mit der Korrelationszeit t :

$$g(t) = 1 + \zeta e^{-2Dq^2 t}, \quad (20)$$

wobei $0 < \zeta < 1$ ein Geräteparameter und q der bekannte Streuvektor ist. Dabei muss im Gegensatz zur Röntgenstreuung ein Faktor für die Brechzahl $n \neq 1$ berücksichtigt werden. Die mittlere Relaxationsrate (Abklingrate, Dq^2) ergibt die Diffusionskonstante, woraus sich nach Stokes-Einstein der hydrodynamische Teilchenradius zu:

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (21)$$

bestimmt, wobei η die Viskosität des Dispergiermediums ist. Mit DLS werden im Allgemeinen Diffusionskoeffizienten im Bereich 10^{-9} – 10^{-6} $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ bestimmt, welche Teilchengrößen von 5 nm–5 μm entsprechen. Diese können, je nach Form, in Gyrationenradien (Kap. 3.6) umgerechnet werden, woraus sich geometrische Abmessungen bestimmen lassen (Tabelle 3).

Das verwendete Instrument (ZetaSizer Nano ZS, Malvern) funktioniert nach dem Autokorrelationsprinzip. Ein roter Laserstrahl (He-Ne, $\lambda = 633$ nm, $P = 4$ mW) bestrahlt die Probe in einer temperierbaren Küvette. Gestreute Intensitäten werden unter einem Streuwinkel von 173° in Rückstreuung aufgenommen (NIBS, engl. *non-invasive back-scatter*, 7° zwischen ein- und

ausfallendem Strahl). Dadurch wird der Einfluss von Mehrfachstreuungen vermieden und es ist zusammen mit einer einstellbaren Fokusslage möglich, auch stark absorbierende Proben über einen großen Konzentrationsbereich zu vermessen (Abb. 23).

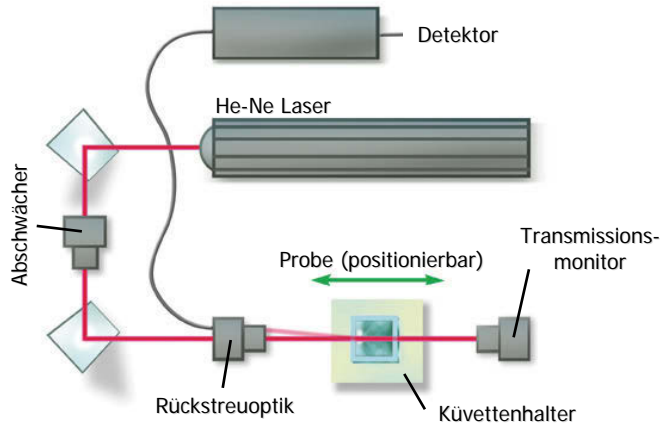


Abb. 23 Optisches Schema und prinzipieller Aufbau des Zetasizers mit Blick von oben auf eine offene Standardkuvette (angelehnt an Malvern Instruments, UK).

Es werden Intensitäten gemessen und die Intensitätsautokorrelationsfunktion berechnet:

$$g_1(r) = \frac{\langle I(t) \times I(t + \tau) \rangle}{I(t)}. \quad (22)$$

Nach der Umrechnung in die Feldkorrelationsfunktion $g_2(r) = 1 + g_1(r)^2$ können daran Funktionen nach CONTIN [152] oder NNLS [153] angenähert werden [154]. In der Kumulantenanalyse nach Koppel [155] wird unter Annahme logarithmischer Normalverteilung ein Polynom mindestens zweiten Grades angepasst:

$$\ln g_2(\tau) = c_1 + c_2\tau + c_3\tau^2 (+ \dots). \quad (23)$$

Der Parameter c_2 entspricht der Abklingrate. Entsprechend Formel 20 und 21 ergibt sich der mittlere intensitätsgewichtete Partikelradius, der häufig auch als so genannter z-Average bezeichnet wird und durch die Mittelung über die Streulichtintensitäten gewichtet ist. Er entspricht dem Durchmesser einer Kugel gleichen Diffusionskoeffizienten, die sich so mit der gleichen Geschwindigkeit wie das gemessene Partikel bewegt. Dieser hydrodynamische Radius R_H ist oft größer als der geometrische Radius, da meist noch eine Hülle aus Lösungsmittel mitbewegt wird. Der Polydispersitätsindex (PDI, $100\% \text{ PDI} = 100 \text{ PDI}^{1/2}$) berechnet sich als Quotient des quadratischen Terms (c_3) und des linearen Terms (c_2) auf $2c_3/c_2^2$. Er beschreibt mathematisch den Unterschied der gemessenen Autokorrelationsfunktion zur angepassten Korrelationsfunktion und ist ein Maß für die Breite der Verteilung (Kumulantenanalyse, ISO 13321 [156]). Zum Vergleich

3. Methoden und Techniken

mit anderen Messmethoden, kann der intensitätsgewichtete z-Average in volumengewichtete oder anzahlgewichtete Mittelwerte umgerechnet werden. Mittels Mie-Theorie gelingt das für Teilchen mit einem Durchmesser kleiner als 100 nm problemlos und für größere durch Kenntnis des komplexen Brechungsindex der Teilchen ebenso [157]. Zehnfacher Teilchenradius bedeutet bei gleicher Teilchenanzahl 10^3 -faches Volumen und 10^6 -fache Intensität.

Außerdem kann parallel das Zeta-Potential als das Coulomb-Potential an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in Suspension bestimmt werden. Es indiziert, ob einzelne Partikel koagulieren (ausflocken) oder sich noch getrennt voneinander bewegen. So kann leicht z. B. die Qualität der Stabilisierung von Gold Nanopartikeln überprüft werden. Die Methode basiert letztlich auf der Nettoladung der Partikeloberfläche aufgrund gegebener Ionenverteilung. So wird durch Elektrophorese an der Partikelsuspension die elektrophoretische Mobilität ermittelt (Henry-Funktion), die Geschwindigkeit der Partikel mittels Laserdopplergeschwindigkeitsmessung (LDV, engl. *Laser Doppler Velocimetry*) bestimmt und die Leitfähigkeit in Siemens festgestellt. Zur Vermeidung von Agglomeration ist ein möglichst hohes Zeta-Potential erwünscht, beispielsweise für langzeit-stabile Dispersionen.

Zur Bestimmung ergänzender Probeneigenschaften lassen sich Dichte, relative Dichte und Konzentration mit dem Dichteschwinger DMA 5000 (Anton Paar) ermitteln. Dafür wird ein U-förmiges Glasrohr mit der flüssigen Probe ($V \approx 1$ mL) befüllt und elektronisch über Piezoelemente zur Schwingung bei seiner Eigenfrequenz f_{eigen} angeregt. Optische Messwertaufnehmer messen die Schwingungsperiode $P_{eigen} = 1/f_{eigen}$, die sich nach Formel 24 zur Probendichte ρ proportional verhält, wobei A und B Geräteparameter sind.

$$\rho = A \cdot P_{eigen}^2 - B \quad (24)$$

Die Justierung erfolgt durch Bestimmung der Gerätekonstanten mit Luft und Wasser. Aus der Probendichte lassen sich weitere dichtebezogene Größen, wie die Konzentration, berechnen. Viskositätsbezogene Fehler, die ansonsten allen Arten von Biegeschwinger-Dichtemessgeräten anhaften, werden automatisch eliminiert. So werden eine Unsicherheit von 5×10^{-6} g/cm³ und eine Wiederholgenauigkeit von 1×10^{-6} g/cm³ erreicht.

3.8 Laserinduzierte Fluoreszenz

Ein Fluorophor wird mit einer geeigneten Strahlungsquelle beleuchtet und emittierte Strahlung als Fluoreszenzspektrum beobachtet (Kap. 2.2 S.18). Im Vergleich zur Lampe ist die Bestrahlung mit einem Laser (laserinduzierten Fluoreszenz, LIF) monochromatisch und ermöglicht aufgrund des hochkollimierten Strahls auch bei großem Abstand der Quelle zur Probe eine einfache Strahlhandhabung. Oft ist elastisch gestreute Anregungsstrahlung deutlich intensiver als die Fluoreszenz und behindert die Datenaufnahme. Bei Verwendung von Laserstrahlung lässt sich die Streuung elegant mit einem *Notchfilter*³ um einen Faktor von 10^6 unterdrücken.

Eine Fluoreszenzverminderung (Fluoreszenzlöschung, engl. *quenching*) kann durch Zugabe von Fremdstoffen (Fremdlöschung) oder durch hohe Konzentrationen des fluoreszierenden Stoffes (Selbstlöschung) auftreten. Überlagern sich Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des Fluorophors, kann einmal emittierte Strahlung gleich wieder absorbiert werden. Diese Reabsorption als Teil des Innerfiltereffekts (engl. *inner filter effect*) verfälscht das aufgenommene Spektrum und ist eine Funktion der Fluorophorkonzentration. Die eintretende Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu größeren Wellenlängen heißt bathochrom (rot-shift), zu kurzwelliger Strahlung dagegen hypsochrom (blau-shift). Ein weiterer Innerfiltereffekt beruht auf der Abschwächung der Anregungsstrahlung durch absorbierende Fluorophore. Dabei erreicht nur geringere Intensität im Strahlengang nachfolgende Fluorophore, wodurch die Intensität vermindert wird, sich der Verlauf des Fluoreszenzspektrums aber nicht ändert. Die Änderung emittierter Strahlung muss für Fluoreszenzanalysen beachtet werden [158, 159]. Fluoreszenzintensität und Absorption fluoreszierender Substanzen steigen unterhalb einer optischen Dichte von $A = 0,05$ linear mit der Konzentration an [107]. Entsprechende maximale Konzentrationen (c_{max}) eines Farbstoffs bestimmt das Lambert-Beer-Gesetz nach Formel 25. Durch nichtlineare Kalibrationskurven gelingt auch die Messung von Fluorophoren mit einer höheren optischen Dichte. Dennoch bestimmt die Reabsorption auch hier wieder eine obere Grenze.

$$c_{max} = \frac{A}{2.303l\epsilon(\lambda)} \quad (25)$$

Auch Raman-Banden (siehe Kapitel 2.2) können Emissionsspektren beeinflussen. Als Test darf sich bei variierender Anregungswellenlänge nur die Intensität des Emissionsspektrums, nicht aber seine Form ändern. Einige optische Komponenten zeigen eine eigene Fluoreszenz; hier hilft die Untergrundbestimmung an einem leeren Probenhalter (Küvette) oder der komplette Ausschluss durch containerlose Probenhalterung.

³ Spez. Kerbfilter (engl. *notch filter*), Sperrfilter zur Dämpfung sehr schmalbandiger Frequenzen

3.9 Mikroskopie mit Photonen und Elektronen

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops ist durch die Wellenlänge der abbildenden Strahlen begrenzt. So lassen sich in einem Lichtmikroskop nur Objekte mit Abständen größer als 400 nm, im Ultravioletten (UV) ab 200 nm trennen. Strahlung im Bereich des Vakuum-Ultravioletts (VUV) und Röntgen lassen sich nur eingeschränkt verwenden, da es keine transparenten Materialien zur Herstellung von geeigneten Linsen gibt. Eine Alternative bilden hier Spiegeloptiken im Röntgenbereich, deren Schwierigkeit in den hohen Reflexionsverlusten liegen. Nach de Broglie kann einem bewegten Elektron eine Materiewelle zugeordnet werden, deren Wellenlänge von der kinetischen Energie des Teilchens abhängt und für eine Beschleunigungsspannung von 100 kV ungefähr 4 pm ergibt. Trotz der Schwierigkeit geeignete Elektronenlinsen mit vertretbaren Abbildungsfehlern herzustellen, wird mit einem Elektronenmikroskop eine Auflösungsgrenze von ca. 0,1 nm erreicht, was ausreicht, einzelne Atome im Kristall zu erkennen. Durch elektronenholographische Methoden kann die Auflösung bis in den (Sub-)Ångströmbereich ($< 10^{-10}$ m) verbessert werden.

Im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) durchstrahlt ein Bündel beschleunigter Elektronen die Probenschicht und gestreute Elektronen werden analog zum Lichtmikroskop abgebildet. Verglichen mit Röntgenstrahlen haben Elektronen nur eine geringe Eindringtiefe, so dass nur dünne ($< 1 \mu\text{m}$) und trockene Präparatschnitte verwendet werden. Als Probenträger dienen 20–50 nm dicke Kunststofffolien, eventuell mit einer Kohleaufdampfschicht verstärkt, die über Trägernetze mit 100–200 μm Maschenweite gespannt sind. Bei der Abbildung kristalliner Proben durch Elektronenbeugung (ED) verursachte Kontrasterscheinungen lassen sich zur Analyse der Elemente und Kristallstruktur nutzen. Zur Herstellung dünner Probenschichten sind Dünnschnitttechnik (Fixation, Polymerisierung und Zerschneiden im Ultramikrotom in 20–200 nm dicke Scheiben) oder Gefrierätztechnik (Einfrieren, Spalten unter Hochvakuum, Verdampfen des Eises zur Freilegung eines Oberflächenreliefs und Herstellung eines Oberflächenabdrucks) typisch.

In der Rastermikroskopie wird die Probe mit einer Sonde abgetastet, wobei deren Durchmesser das laterale Auflösungsvermögen begrenzt und vom vertikalen Auflösungsvermögen übertroffen werden kann. Die Art der bildgebenden Sonde unterscheidet das Laserscanning-Mikroskop mit einem fokussierten Laserstrahl, das (optische) Nahfeldmikroskop mit einer metallisierten Glasfaser, das Rasterelektronenmikroskop (REM, engl. SEM *scanning electron microscope*) mit einem Elektronenstrahl als Sonde, das Ultraschallmikroskop, das Rastertunnelmikroskop (STM, engl. *scanning tunnel microscope*) mit einer feinen Metallspitze als Tunnelkontakt, das Rasterkraftmikroskop (AFM, engl. *atomic force microscope*) mit einem Kraftmessbalken (Kantilever) als Kraftaufnehmer und das Reibungsmikroskop. Im REM entsteht ein Bild des Reflexionsvermögens für Elektronen, durch erzeugte Sekundärelektronen ein Bild des Sekundäremissionsvermögens und durch den Elektronenstrahl angeregte charakteristische Röntgenstrahlung ein Bild der Verteilung

der chemischen Elemente an der Probenoberfläche. Die Untersuchung einer gefrorenen, an der Bruchstelle beobachteten, Probe heißt, analog zu kryo-TEM, kryo-REM. Das STM gibt Aufschlüsse über die Elektronendichteverteilung in der Probe. AFM und Reibungsmikroskop liefern Aussagen über Kräfte zwischen Probenoberfläche und Kantilever und damit über die an der Oberfläche wirkenden elektromagnetischen Felder.

In der Arbeit wurden die Methoden TEM (Phillips EM 420 bei 120 kV, ausgerüstet mit einer 1024×1024 Pixel ORCA-ER Kamera und AMT *Image Capture Engine* v5.42.540a), REM (Zeiss DSM 940 bei 10 kV) und kryo-REM (FEI Nova 600 Nanolab bei 2–10 kV) verwendet. Für verbesserte Leitfähigkeit wurden die Proben mit einer Goldschicht weniger Nanometer besputtert (Baltec MED020). Als AFM diente ein *Nanosurf Mobile S* (Nanoscience Instruments, Inc.). Um Artefakte auszuschließen, wird das System batteriebetrieben und auf einem schwingungs isolierten Tisch verwendet (Halcyonics, Inc.). Der dynamische Kraft-Modus (engl. *tapping mode*) erlaubt die zerstörungsfreie Untersuchung empfindlicher Nanostrukturen.

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Wand-Effekte haben oft einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Probe (z. B. Keimbildung und damit auf die Entstehung von Kristallen) als auch auf die Messung (z. B. Streuuntergrund der Küvette). Als behälterfreien Probenhalter bietet sich die Verwendung einer Ultraschallfalle an. Sie wird in diesem Abschnitt für analytische Fragestellungen getestet. Es werden Einsatzfelder der Ultraschallfalle gezeigt, die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse aufgeführt und direkt zur Methode diskutiert. Erste Experimente zeigten neben dem Vorteil der wandlosen Probenhaltung einen weiteren Vorzug der Ultraschallfalle: Levitierte Flüssigkeiten eignen sich aufgrund ihres hohen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses zum Studium verdunstungskontrollierter Prozesse. Verdampft lediglich Lösungsmittel lässt sich die Analytkonzentration zeitabhängig ändern bzw. durch geeignete gasförmige Umgebungen mit entsprechendem Dampfdruck einstellen. Eine Änderung im handhabbaren Volumen über mehrere Größenordnungen lässt sich nur durch die Verkleinerung in allen drei Raumdimensionen erreichen. Diese herausragende Möglichkeit der Ultraschallfalle zur verlustlosen Aufkonzentrierung erlaubt somit die Untersuchung sowohl von Kristallisation, Aggregation (Atome und Moleküle) als auch Agglomeration (Nanopartikeln).

Zuerst allerdings noch einige grundlegende Arbeiten, die zur erfolgreichen Durchführung analytischer Anwendungen notwendig waren.

4.1 *Kontaktlose Volumenbestimmung*

Zur Anwendung analytischer Methoden, genauer für eine Konzentrationsbestimmung, ist die hinreichend genaue Kenntnis des Probenvolumens erforderlich. In der Literatur werden einige Techniken zur kontaktlosen Volumenbestimmung von Ellipsoiden beschrieben. Hier wird ein robustes Verfahren vorgestellt, das für beliebig geformte Rotationskörper ohne spezielle Probeneigenschaften gilt und ein genaueres Volumen ($\sigma \approx 1\%$) liefert. Die Voraussetzung der Rotationssymmetrie ist für Flüssigkeiten und ausgewählte Festkörper (z. B. Kugeln) erfüllt. Zur quantitativen Bestimmung des Volumens der zu untersuchenden Probe bietet sich im wandlosen Zustand der Levitation die kontaktfreie Bestimmung mit optischen Methoden an.

Unter Annahme der Symmetrie um die Levitationsachse folgt das Volumen V eines Rotationskörpers aus der Querschnittsfläche A . Diese Fläche kann als Schattenwurf durch telezentrische IR-Beleuchtung (TZB51, Vision & Control GmbH, Suhl) auf eine Kamera abgebildet und aufgenommen werden (Abb. 24).

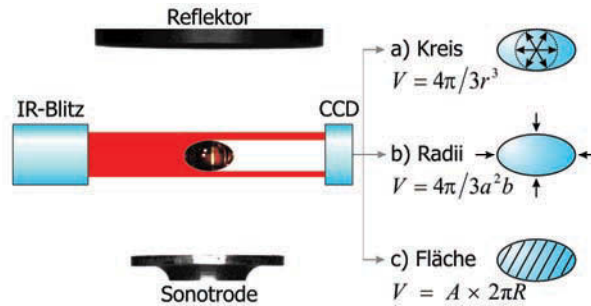


Abb. 24 Bestimmung des Tropfenvolumens aus dessen Schattenfläche mittels drei unterschiedlicher Methoden.

Durch eine Blitzdauer von $80 \mu\text{s}$ werden scharfe Bilder, auch bewegter Tropfen ($v < 0,1 \text{ m/s}$), realisiert. Diese Geschwindigkeitsgrenze liegt zwar unterhalb der Höchstgeschwindigkeit von 2 m/s für fallende Tropfen mit einem Durchmesser von 1 mm , ist aber deutlich größer, als mit dem Auge zu beobachtende Probenoszillationen um eine Distanz von 2 mm , woraus sich eine Geschwindigkeit von maximale $0,05 \text{ m/s}$ abschätzen lässt. Die Schattenfläche entsteht durch Absorption des Infrarotlichtes ($\lambda = 880 \text{ nm}$) im Tropfen und ist proportional zur Fläche des Querschnitts. Die Bildverarbeitung dieser Fläche (Bilinearisierung) geschieht direkt in der programmierbaren CCD Kamera (PICTOR VC2068/E; Fiber Vision GmbH, Würselen). Dazu wurde spezielle Software geschrieben, die auf den folgenden Methoden basiert:

- Anpassung eines Kreises mit mehreren Radialstrahlen und Berechnung des Volumens über die Kugelformel $V = \frac{4\pi}{3}r^3$.
- Bestimmung des Konturdurchmessers in vertikaler und horizontaler Richtung in Höhe des Konturschwerpunktes und Volumen eines Rotationsellipsoids $V = \frac{4\pi}{3}a^2b$.
- Berechnung des Volumens für Rotationskörper aus der Schattenfläche A_F und der Lage ihres Schwerpunktes nach der Guldinschen Regel mit $V = A_F \cdot 2\pi r_F$, wobei der Radius r_F der Abstand des Schwerpunktes zur Rotationsachse ist.

Die Qualität der Methoden wurde durch zeitgleiche Messungen untersucht. Für einen symmetrischen Körper sollten sich alle Methoden gleich gut eignen. Dazu wurde 300-mal das Volumen einer Styroporkugel (Durchmesser 2 mm) bestimmt und in Abb. 26 aufgetragen.

Die Ergebnisse (Abb. 25) zeigen deutlich, dass sowohl die Ergebnisse der Kreisantastung (Methode A) als auch die der Ellipsoidmethode (Methode B) stark variieren (Abb. 26). Die Messung der Kugel mit der Kreismethode variiert weniger, da sie auf einer Antastung von acht Radiusstrahlen beruht, welche vermutlich auf ein ganzes Pixel in der Kamera gerundet werden.

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Aufgrund dieser Rundung zeigt das Volumen sehr diskrete Werte (nämlich nur fünf). Auf der anderen Seite besteht die Messung für die Ellipsenmethode lediglich aus zwei, auf ganze Pixel gerundeten Werten (jeweils in horizontaler und vertikaler Richtung, also große und kleine Halbachse). Es gibt weniger Werte, welche somit größere Schwankungen in den Ergebnissen verursachen. Bei der Ermittlung des Volumens nach der Guldinschen Regel (Methode C) spielt die Quantelung der Fläche aufgrund ihrer relativen Größe eine vergleichsweise geringe Rolle. Somit erklärt sich für diese Methode der geringste Schwankungsbereich und es ergibt prinzipiell ein im Rahmen der Messauflösung kontinuierliches Volumen. Genau genommen fließt aber auch noch der Abstand des Flächenschwerpunktes von der Rotationsachse ins Volumen ein, der wiederum als Länge in Pixel sehr wohl diskret und die größte Fehlerquelle der Methode ist.

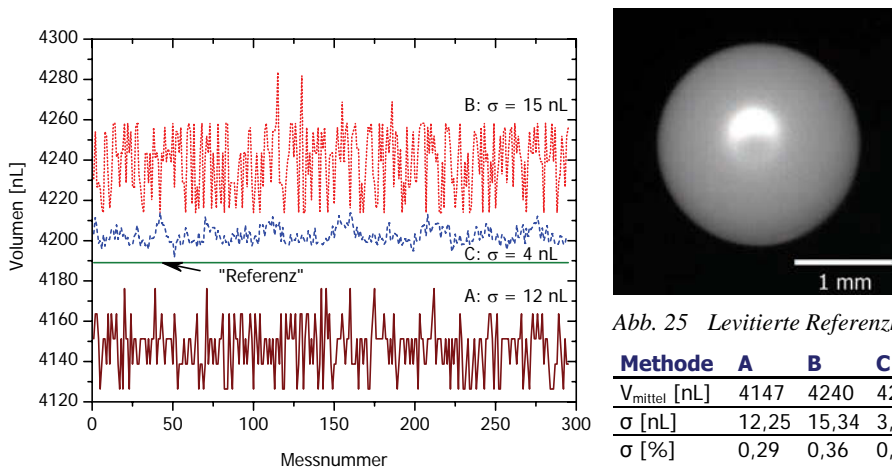


Abb. 26 Methodenvergleich zur Volumenbestimmung und deren Standardabweichungen.

Das berechnete Volumen einer Kugel mit dem Durchmesser 2 mm entspricht 4189 nL. Die Ergebnisse von Methode A sind systematisch kleiner und die der Methode B größer, was sich leicht durch die Richtung der Tropfenanpassung erklärt (Kreis von innen, Ellipse von außen). Ob Methode C absolut genau misst, bleibt fraglich, denn ihr Wert ergibt einen um 1 μm größeren Kugelradius und so genau konnte der Durchmesser der Kugel leider nicht alternativ vermessen werden. Die Präzision lässt sich aber auf Volumen < 0,3 % abschätzen.

Durch Kenntnis des Volumens kann die Konzentration zu jedem Zeitpunkt bestimmt werden. Unter der Annahme, dass während der Levitation von Lösungen oder Suspensionen nur Lösungsmittel verdunstet, ergibt sich bei bekannter Anfangskonzentration die Konzentration zu beliebigen Zeiten als Verhältnis des Anfangsvolumens zum aktuellen Volumen. Das ermöglicht für akustisch levitierte Proben die Beobachtung chemischer und physikalischer Prozesse als Funktion der Konzentration, wie Aggregationsphänomene, in dynamischer und kontinuierlicher Art und

Weise. Phasen-Doppler-Anemometrie (PDA) ist neben der gravimetrischen Volumenbestimmung eine leistungsfähige Alternative für kleine Tropfen. So wurden Tropfen mit einem Durchmesser von ca. $75\ \mu\text{m}$ mit einer Standardabweichung kleiner $1,5\ \mu\text{m}$ und einer zeitlichen Auflösung von $0,1\ \text{s}$ bestimmt [160]. Allerdings scheint die Methode nicht für längere Messungen an verdunstenden Tropfen geeignet und ist nur auf kugelförmige Tropfen anwendbar. Unter Verwendung von Methode B wurden Fehler bis 2 % in der Literatur beschrieben [35]. Für Methode C wird die Unsicherheit auf 1 % abgeschätzt. Am Beispiel eines verdunstenden Wassertropfens wurde für levitierte Flüssigkeit das Volumen mit allen drei Methoden gleichzeitig aufgenommen (Abb. 27). Auch hier ergibt sich für Methode C im Vergleich zu den anderen beiden Methoden ein kontinuierlicherer Kurvenverlauf.

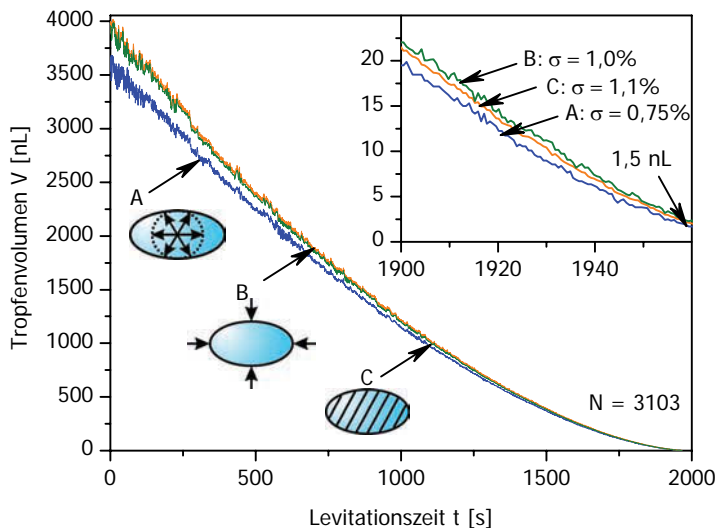


Abb. 27 Verlauf des Volumens eines verdunstenden Wassertropfens, bestimmt mit den Methoden A (Kreis), B (Ellipse) und C (Fläche).

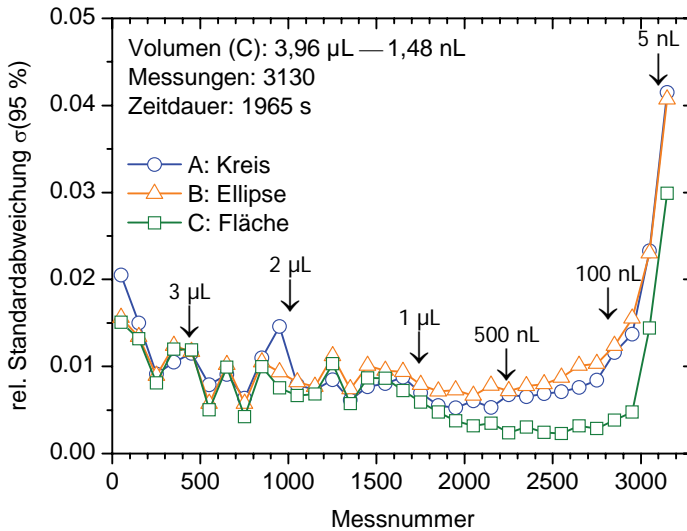


Abb. 28 Standardabweichung der Volumenbestimmung als Funktion der Messnummer und damit Tropfengröße.

Der abfallende Kurvenverlauf lässt sich mit einem Polynom approximieren. Die Differenz, auf den Funktionswert des Polynoms normiert erlaubt die Berechnung der Standardabweichung. Wird diese mit einem Vertrauensintervall für den Mittelwert von 95 % für Abschnitte von jeweils 100 Messpunkten berechnet, ergibt sich folgende Abhängigkeit über das Probenvolumen (Abb. 28). Die Messung größter Tropfenvolumen ergibt Standardabweichung von 2 %, welche bis unter 1 % fällt. Sie ist durch abnehmende Oszillationen der Tropfenoberfläche zu erklären. Immer zeigt Methode C die kleinsten Standardabweichungen. Nicht unerwartet steigt die Standardabweichung für kleinste Tropfenvolumen wieder stark an (bis auf $\sigma = 4\%$), was leicht durch den größeren Einfluss der Kamerapixel nachvollziehbar ist. Hier überdeckt der Tropfen (Radius 71 μm) nur wenige Pixel auf der Kamera (Abbildung 7 μm pro Pixel).

Um Aussagen zum absoluten Fehler (Genauigkeit) machen zu können, muss der schwebende Tropfen über den gesamten Größenbereich kalibriert werden. Das erlaubt, nicht nur sicher feststellen zu können: „es wurden 4 μL injiziert“, sondern sicher zu wissen, bei welcher Konzentration Effekte wie Agglomeration oder Kristallisation einsetzen. Messvorschläge für diese Fragestellung werden in Kapitel 4.8 diskutiert.

4.2 Dynamische Aufkonzentration

In diesem Abschnitt wird das „Eindampfen“ einer Probe als Methode der Anreicherung beschrieben. Sobald eine Flüssigkeit an ein Gas grenzt, erfolgt durch Verdampfung und Kondensation ein Stoffaustausch bis sich deren Beträge gleichen und somit der Netto-Betrag verschwindet. In diesem Gleichgewicht der flüssigen mit ihrer gasförmigen Phase, stellt sich der stoff- und temperaturabhängige Dampfdruck ein. Ist für eine Dispersion der Dampfdruck eines Lösemittels wesentlich geringer als der des dispergierten Materials, kann die gezielte Aufkonzentration als ein gebräuchliches Verfahren in der Analytik verwendet werden. Das Ziel ist dabei, die Analytkonzentration auf einen Wert innerhalb eines quantifizierbaren Bereichs zu erhöhen. Diese Technik ist umso effektiver, je mehr sich die Konzentration steigern lässt. Da sich diese reziprok mit dem Volumen verhält, ist die Konzentrationserhöhung durch Anfangs- und Endvolumen definiert. Im Idealfall wird also das Lösungsmittel eines Probenvolumens verdunsten und die Menge des Analyten konstant bleiben. Dem Ziel kann mit einem schwebenden Tropfen sehr nah gekommen werden, dessen Reduzierung im Durchmesser auf 10 % (3D) des Anfangswertes eine Konzentrationserhöhung um drei Größenordnungen ermöglicht. Dabei sind Anfangs- und Endvolumen in gut handhabbaren Bereichen (Abb. 29).

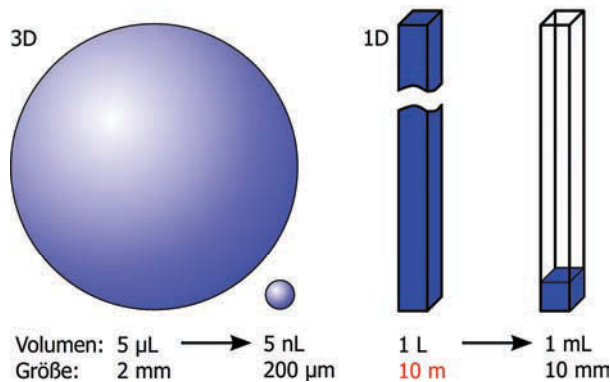


Abb. 29 Verhältnisse bei der Aufkonzentration in Kugelform und in einer Standardküvette.

Verglichen mit der Probe in einer Standardküvette, deren Volumen nur durch Verringerung in eine Raumrichtung (1D) abnehmen kann, zeigen sich klare Vorteile: Bei gleicher Konzentrationserhöhung müsste die Küvette 10 m gefüllt sein. Unabhängig von der erschwerten Handhabung und enormen Verdunstungszeit kann nicht sichergestellt werden, dass kein Analyt an den Küvettenwänden adsorbiert und somit der aufkonzentrierten Dispersion verloren geht.

Die Verdunstung von akustisch levitierten Mehrkomponententropfen ist gut untersucht [161]. Aus der Literatur [69] bekannte Experimente zum Verdunsten levitierter Flüssigkeiten wurden wiederholt, bestätigt und die Volumenbestimmung um eine Größenordnung verbessert (sowohl der

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

messbare Bereich 5–1,5 nL als auch erreichte Unsicherheit kleiner 1 %, (siehe Kapitel 4.1). Die Bestimmung der Oberfläche OF des levitierten Tropfens erfolgt nach der zweiten Guldinschen Regel $OF = u_K \times 2\pi r_K$, wobei u_K als Umfang der Rotationsfläche und der Kurvenschwerpunkt als Abstand zur Rotationsachse r_K eingeht. Der Fehler wird aufgrund der komplexen Bildverarbeitung auf 5 % abgeschätzt. Die Konzentration wurde für eine hypothetische Anfangskonzentration des Analyten von 10^{-6} mol/L berechnet. Die Ergebnisse sind am Beispiel eines Tropfens aus destilliertem Wasser in Abb. 30 dargestellt (siehe auch Abb. 27).

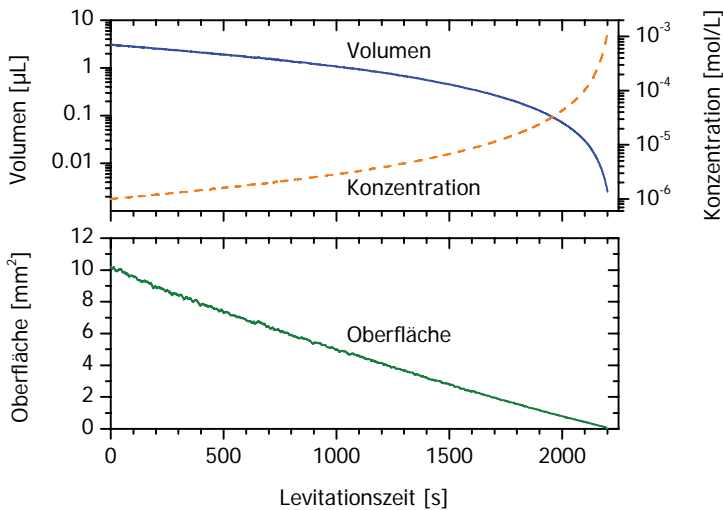


Abb. 30 Volumen, Konzentration und Oberfläche eines verdunstenden Wassertropfens als Funktion der Zeit.

Der Messbereich im Vergleich zur Arbeit von Tuckermann und Rohling (1,95 μL – 71,4 nL) konnte um eine Größenordnung erhöht werden und der zeitliche Verlauf entspricht den Literaturangaben [162]. Arbeiten zur Modellbildung der Verdunstung von ein und mehrphasigen Flüssigkeiten finden sich hinreichend in der Literatur. Der Einfluss des Schallfeldes auf den Tropfen wird in Kapitel 4.7 (S. 113) diskutiert und beeinflusst natürlich den zeitlichen Verlauf der Verdunstung. Am deutlichsten wirkt die Umgebungstemperatur, während die Temperaturerhöhung durch Energieeintrag des Ultraschallfeldes im Allgemeinen vernachlässigt werden kann.

Durch das Austrocknen gelöster Substanzen im akustischen Levitator können Festkörper diverser Formen entstehen. Dabei resultieren amorphe Phasen (Abb. 31) bis hin zu polykristallinen Phasen und gut detektierbaren Einkristallen (Abb. 32). Die nichtessenzielle Aminosäure L-Glutamin als eine der 20 proteinogenen α -Aminosäuren wurde aufgrund ihrer Bedeutung für den menschlichen Stoffwechsel und geeigneten Wasserlöslichkeit ausgewählt und ist hier insbesondere aufgrund der komplexen Struktur beim Eintrocknen vorgestellt.

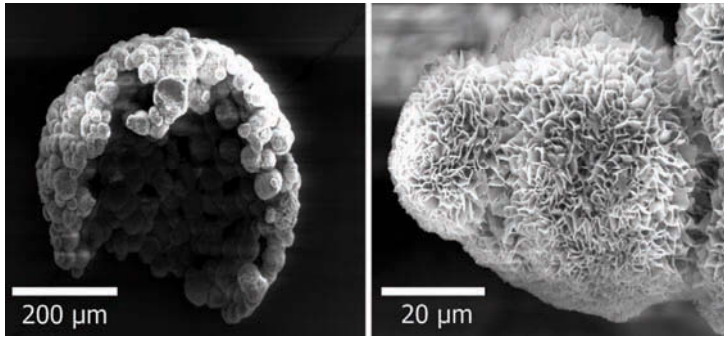


Abb. 31 Eintrocknete Lösung aus L-Glutamin in Wasser im (REM).

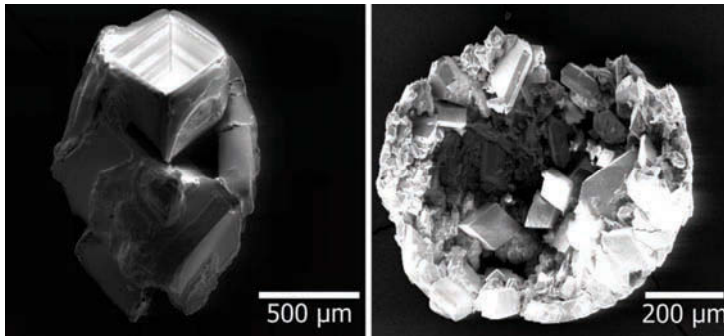


Abb. 32 Eintrocknete Lösung aus NaCl (links) bzw. Calciumcarbonat (rechts) in Wasser (REM).

Diese Vorgänge basieren auf ebenso vielfältigen wie komplexen Grundlagen und eröffnen diverse Fragestellungen. Die Verfolgung der Prozesse *in situ* ist durch die Implementierung etablierter Methoden an die akustische Falle möglich und ist Thema der nächsten Kapitel.

4.3 Wandfreie Röntgenstreuung an Tropfen

Schon 1897 wurde auf die analytische Bedeutung der Kristallisation übersättigter Lösungen hingewiesen, wobei es Ostwald nahelag die Methode des hängenden Tropfens zu verwenden, doch musste er davon absehen, da die Zugänglichkeit der Probe zu sehr beeinträchtigt worden wäre [163]. Sicher wäre ein frei schwebender Tropfen eine Alternative gewesen. Wand-Effekte haben nicht nur einen direkten Einfluss auf die Entstehung von Kristallen, sondern können an sich Beiträge zum Messsignal liefern. So ist das Untergrundsignal von Küvetten bei diversen Methoden der Röntgenstreuung oft der limitierende Faktor. Experimente in levitierten Lösungen umgehen diesen Einfluss und wurden schon erfolgreich angewendet. Tropfen mit einem Radius von etwa 30 µm wurden mit einer elektrodynamischen Falle in einer Klimakammer als Modell für Gefrierprozess in polaren stratosphärischen Wolken untersucht [164].

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Röntgenstreuung ist eine besonders geeignete Methode zum Studium levitierter Tropfen und wurde schon erfolgreich mit anderen Levitationsarten kombiniert [165]. Im Jahr 2000 wurde über den Einsatz einer elektrostatischen Waage zur Untersuchung von Pharmazeutika in Einzel-Partikel-Levitation berichtet, es konnte aber weder Kristallisation noch Hygroskopie beobachtet werden [166]. Der Einfluss starker Magnetfelder (einige Tesla) kann nicht nur Proben levitieren, sondern sich auch positiv auf die Bildung von Proteinkristallen auswirken [167, 168]. Im akustisch levitierten Tropfen erhöht sich kontinuierlich die Analytkonzentration aufgrund Verdunstung des Lösungsmittels [30, 31, 169]. Das fördert die Kristallisation und ist eine schnelle Hilfe auf der Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen [170]. 2003 wurden für ausgewählte Proben aus einem akustischen Levitator Bragg-Reflexe neben diffuser Streuung veröffentlicht [171], allerdings relativ schlecht aufgelöst und nur in einem kleinen Winkelbereich ($14^\circ < 2\theta < 16^\circ$).

Hier wird erstmals die zeitaufgelöste Beobachtung von Agglomerationsprozessen in einer Ultraschallfalle beschrieben. Die elastische Röntgenstreuung im schwebenden Tropfen erfolgt mit Wechselwirkungsgeschwindigkeiten im Bereich einiger fs. Somit sind sämtliche Bewegungen der Probe (Rotation und Schwingung im Bereich einiger Hz) zu vernachlässigen und keine störenden Effekte (wie z. B. Dopplereffekt) zu erwarten. Durch Bestrahlungszeiten von mehreren Sekunden ergeben sich darüber hinaus geeignete statistische Mittelwerte.

Synchrotron-Röntgenstrahlung eignet sich sehr gut zur Untersuchung kleiner Proben. Die Strahlung besitzt eine geringe Divergenz und lässt sich auf wenige Mikrometer Strahldurchmesser fokussieren. Im Vergleich zu spektroskopischen Methoden im UV-, VIS- or IR-Bereich ist die Brechzahl fast eins (z. B. 0,999999 verglichen mit 1,3 für sichtbares Licht in Wasser). Somit lassen sich Einflüsse von Grenzflächen wie der Probenoberfläche vernachlässigen, da sich die Ausbreitungsrichtung einfallender und gebeugter Strahlung an den Grenzflächen nicht wesentlich ändert. Verluste durch Absorption im Röntgenbereich lassen sich durch das kleine Probenvolumen, und damit kurzen Strahlweg, minimieren. Dennoch ist die Absorption im Vergleich zu UV, VIS und IR-Strahlung sehr gering und vorteilhaft zur Bestimmung gemittelter Eigenschaften des Probenvolumens. Ein hoher Interferenzgrad kommt nur zustande, wenn die Probe gut lokalisiert ist und die räumliche Ausdehnung des Streuvolumens klein gegenüber dem Abstand zum Detektor ist.

4.3.1 EDXD der Kristallisation von Natriumchlorid aus wässriger Lösung

Natriumchlorid (NaCl, Kochsalz) ist ein gut beschriebenes Modellsystem mit relativ kleinen Gitterabmessungen. Es zeichnet sich durch hohe Wasserlöslichkeit ($L = 330 \text{ mg/mL}$) und Kristallisationsaffinität aus. Um Beugung an Kristallen, möglichst während deren Entstehung, verfolgen zu können, wurde die Ultraschallfalle in die EDR-Beamline⁴ am Synchrotron von BESSY implementiert (Abb. 33). Die Beamline ist beschrieben von Pietsch *et al.* [172].

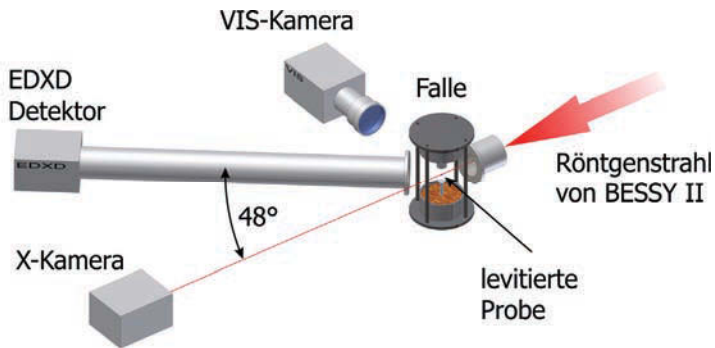


Abb. 33 Schematischer Aufbau des Experiments an der Beamline mit integriertem akustischem Levitator (Falle).

Eine gesättigte, wässrige Lösung wurde als Tropfen mit einem Volumen von $4(1) \mu\text{L}$ direkt mit einer Pipette in einen Knoten der stehenden Ultraschallwelle injiziert. Die so präparierte Probe wurde in einen weißen Röntgenstrahl (Querschnitt ca. $1 \times 1 \text{ mm}$) positioniert. Dabei sinkt die Intensität der Strahlenergie $E = 5\text{--}25 \text{ keV}$ exponentiell mit größerer Wellenlänge. Der verfügbare Energiebereich ist einerseits limitiert durch starke Absorption niederenergetischer Photonen auf dem ca. 70 cm langen Weg nach dem letzten Vakuumfenster und andererseits durch die niedrige Emissionsrate bei höheren Energien. Bei einer Umgebungstemperatur von $298(1) \text{ K}$ verblieb die Probe, auch nach der kompletten Verdunstung des Lösungsmittels, an einer definierten Position. Die energieaufgelöste Datenaufnahme erfolgte mit einem durch ein Peltierelement auf $263(1) \text{ K}$ gekühltem Halbleiterdetektor (Roentec) unter einem Streuwinkel $2\theta = 48^\circ$ kontinuierlich während einer Experimentdauer von 30 min .

Um störende Untergrundstreuung, größtenteils an Luft, zu vermeiden, wurde der Strahlweg zwischen Probe und Detektor mittels einer Röhre weitestgehend evakuiert. Eine weitere Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses gelang durch geeignete Wahl von Blenden zwischen dieser Röhre und der Probe. Über den gesamten Spektralbereich wurden Signale mit ungefähr $9 \times 10^3 \text{ counts/s}$ (9 kcps) aufgenommen. Ein Lumineszenzschirm transformiert den

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

transmittierten Strahlungsanteil in sichtbares Licht. So ließ sich mit einer dahinter liegenden CCD-Kamera (X-Kamera) ein Absorptionsbild aufnehmen und die Größe des Strahls mit Blenden der Probe anpassen. Mit der Hilfe des Absorptionsbildes und dem Bild einer weiteren optischen Kamera (VIS-Kamera), ungefähr senkrecht zum einfallenden Strahl angeordnet, wurde die Stabilität der levitierten Probe bzgl. der Lage kontinuierlich kontrolliert.

Nach der Tropfeninjektion wurden alle 30 s Röntgenbeugung einer levitierten wässrigen Kochsalzlösung aufgenommen. Nach Gleichung 12 konnten diese mit $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, (Cu- K_{α} Strahlung) in Diffraktogramme (Intensität als Funktion des Streuwinkels $2\theta = 17\text{--}122^\circ$) umgerechnet werden. Abschließend wurden die Daten mit einer lokalen polynomialen Regression (Savitzky-Golay 41 Punkt, [173]) geglättet. Abb. 34 zeigt die Diffraktogramme während der Tropfen innerhalb 15 min verdunstet. An dem verbleibenden festen Rückstand wurde 5 min nach der Verdunstung ein Diffraktogramm aufgenommen.

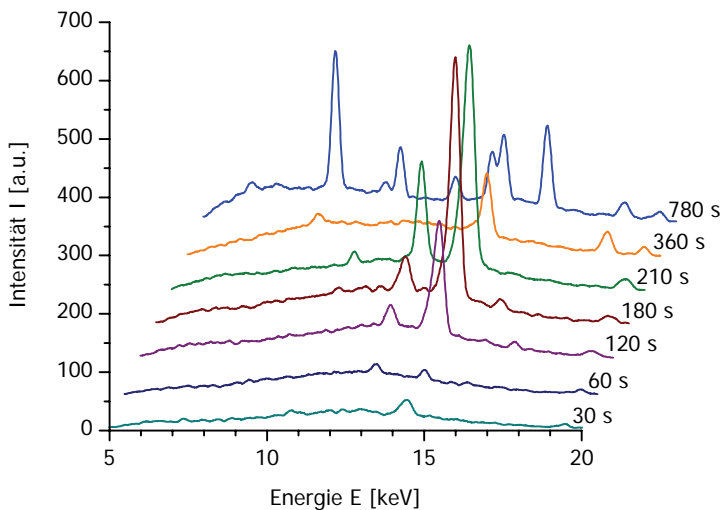
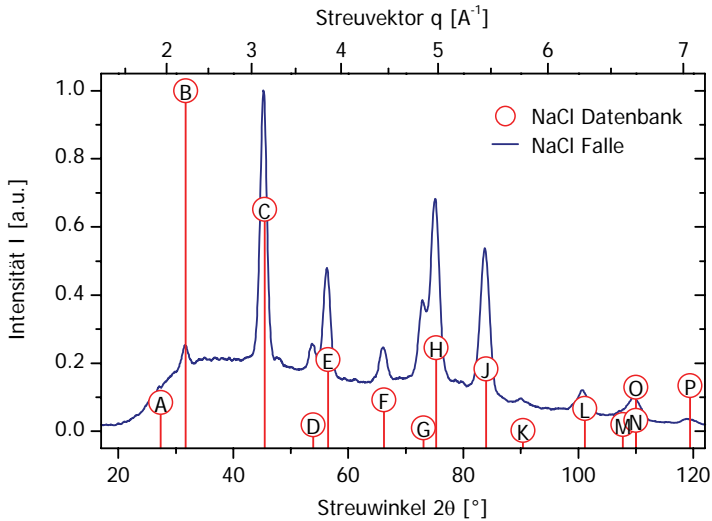


Abb. 34 Diffraktogramme eines levitierten Tropfens wässriger Kochsalzlösung, beschriftet mit den Zeiten nach der jeweiligen Datenakkumulation.

Zu Beginn ist diffuse Streuung sichtbar, welche der flüssigen Phase zugeordnet wird. Die Kristallisation von NaCl beginnt durch das kontinuierliche Verdunsten des Wassers. Das führt anschließend zu einer Intensitätserhöhung der Beugungsreflexe, welche schließlich das diffuse Streusignal der flüssigen Probe überlappen. Während der Kristallisation führt der Tropfen zufällige Bewegungen um den Druckknoten mit einer Amplitude von ungefähr $100 \mu\text{m}$ aus und rotiert um die vertikale Levitationsachse mit einer Frequenz $f < 20 \text{ Hz}$. 3–15 min nach den ersten Reflexen

⁴ energiedispersives Reflektometer (EDR) der Uni Potsdam bei BESSY II

bildete sich ein fester, nahezu kubisch geformter Mosaikkristall. Nach weiteren 3 min Röntgenbestrahlung verfärbte sich dieser von vorher transparent zu leicht bräunlich, was durch die Entstehung von Farbzentren zu interpretieren ist. Farbänderungen von Kristallen aufgrund hoher Dosen intensiver Röntgenstrahlung ist gut bekannt [174]. Der zeitliche Verlauf des Untergrundes erhöht sich langsam während des Kristallisationsprozesses und wird wahrscheinlich durch den amorphen Teil der Probe erzeugt und spiegelt die Intensitätsverteilung des Energiespektrums der verwendeten Primärstrahlung wieder. Ein Diffraktogramm theoretischer Daten, basierend auf einem Datenbankeintrag (ICSD) [175] wurde extrahiert und zur Indizierung der Beugungsreflexe über einen weiten Streuwinkelbereich verwendet (Tabelle und Abb. 35).



2θ	27,36	31,69	45,43	53,85	56,45	66,2	73,04	75,26	83,96	90,38	90,38	101,13	107,75	110,01	110,01	119,42
I	0,085	1	0,652	0,019	0,21	0,092	0,01	0,246	0,183	0,009	0,003	0,067	0,02	0,032	0,129	0,134
h	1	0	0	1	2	0	1	0	2	1	3	0	1	0	2	0
k	1	0	2	1	2	0	3	2	2	1	3	4	3	0	4	2
l	1	2	2	3	2	4	3	4	4	5	3	4	5	6	4	6
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	K	L	M	N	O	P

Abb. 35 Gemessene EDXD-Daten (kompakte Linie) und Reflexe von Natriumchlorid (ICSD, beschriftete Kreise). Die Intensität wurde bei den intensivsten Reflexen auf eins normiert.

Der Vergleich des Ergebnisses der Kristallisation (kompakte Kurve) mit entsprechenden Literaturwerten (beschriftete Kreise A-P) aus der Datenbank zeigt eine gute Übereinstimmung. Aufgrund der relativ großen Korngröße gewachsener NaCl-Kristalle ist kein perfektes Pulverdiffraktogramm zu erwarten, wie es für eine komplett zufällige Verteilte von Kristalliten entsteht. Ebenso ist kein Einkristalldiffraktogramm anzunehmen. Es bleibt die korrekte Lage des Streuvektors q , wobei die Intensitäten der einzelnen Reflexe teilweise beträchtlich abweichen, was sich aber durch die Statistik der rotierenden Probe leicht erklären lässt und keinen wesentlichen Nachteil bei der Strukturbestimmung darstellt.

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Zusammenfassend wurde die zeitaufgelöste Kristallisation von gelöstem NaCl zum polykristallinen Zustand beobachtet. Verdunstungsinduzierte Kristallisationen wurden simultan optisch und durch röntgeninduzierte Fluoreszenz *in situ* verfolgt. Offensichtlich scheint die akustische Levitation als wandfreier Probenhalter geeignet, wobei der Einfluss des akustischen Schallfeldes nicht ausgeschlossen werden kann. Ein Vorteil der Verfolgung des Kristallwachstums in akustisch levitierten Tropfen mittels EDXD ist die zeitgleiche Aufnahme des Röntgenabsorptionsbildes in Transmission [176]. Ein größeres Strahlprofil erhöht die Luftstreuung und führt zu einem größeren Streuuntergrund. Zur Erhöhung der Zeitauflösung ist eine Fokussierung des Strahls zur Steigerung der Intensität um einige Größenordnungen möglich. Die Untersuchung zur Keim- und Kristallbildung an NaCl ist Gegenstand aktueller Forschungen [177-179] wobei Simulationen auf der Skala der ersten Pikosekunden möglich sind [180].

4.3.2 Bestimmung von Kristallitgrößen

Wie gezeigt, kann es bei der Untersuchung von levitierten Proben zur Kristallisation des Analyten kommen. Dieser Prozess lässt sich beispielsweise durch Verdampfung des Lösungsmittels, mit einhergehender Konzentrationserhöhung des Analyten, induzieren. Neben der Anzahl der Kristalle und der Wachstumsgeschwindigkeit ist die Kristallgröße ein wesentlicher Parameter. Mikroskopische Untersuchungen (REM, TEM, AFM) können exakte Kantenlängen einzelner Kristalle und durch Ausmessen eines Ensembles auch eine Größenverteilung liefern. Allerdings erfordert die Probenpräparation einen gewissen Aufwand und Einflüsse auf die Probe (Vakuum für Elektronenmikroskopie) sind nicht auszuschließen. Außerdem sind *in situ* Messungen im akustischen Levitator, aufgrund der Tropfenbewegung (Rotation), zwingender Gas-Umgebung und gewünschten zeitlichen Auflösung im Sekundenbereich kaum möglich. Eine alternative, kontaktlose Methode zur Abschätzung der mittleren Kristallitgröße (D_{hkl}) ist nach Scherrer [143] mit Auswertung von Röntgenbeugungsreflexen in Gleichung 13 gegeben [144, 181]. Ein Kristallit ist der kleinste Teil einer Probe mit gleich geordneter kristalliner Struktur. Die Korrelation zur q -Skala ist gegeben durch die Ableitung des Streuvektors nach θ .

$$\begin{aligned} \frac{dq}{d\theta} &= \frac{d}{d\theta} \left(\frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \right) = \frac{4\pi}{\lambda} \cos \theta \\ \frac{\lambda}{2d\theta \cos \theta} &= \frac{2\pi}{dq} \\ \frac{k_s \lambda}{w \cos \theta} &= \frac{2\pi}{B_{mt}} = D_{hkl} \end{aligned} \quad (26)$$

Dabei wird die q -Skala in nm^{-1} , die 2θ -Skala in Grad angegeben und zur Berechnung das Bogenmaß verwendet. Die Reflexbreite dq lässt sich durch die integrale Breite B_{mt} definieren als

$$dq = B_{int} = \frac{\int_0^{\infty} I(q)}{I(q_{max})}. \quad (27)$$

Praktisch lässt sich der Wert des Integrals leicht numerisch aus der Fläche unter der Streukurve mit gängigen PC-Programmen zur Datenauswertung (z. B. ORIGIN [182]) bestimmen und ergibt, durch die Höhe (Basislinie subtrahiert vom Maximum) des Reflexes dividiert, die integrale Breite B_{int} . Wichtig ist, dass durch die Verwendung von B_{int} die Berechnung der Kristallitgröße unabhängig von der Form der Reflexe erfolgt. Unter Beachtung, dass die Verbreiterung der Beugungsreflexe auch durch Gitterfehler und apparative Verbreiterungen erfolgt, ist die Benutzung der integralen Breite eine einfache Möglichkeit um die Größe von Nanokristallen mit der geringsten Anzahl gemachter Voraussetzungen abzuschätzen. Nach Formel 26 lässt sich die mittlere Kristallitgröße aus der probenbedingten Reflexverbreiterung berechnen. Dieser Wert kann durch die Berücksichtigung der Apparate-Verbreiterung nur größer werden! Die mittlere Kristallitgröße gibt allerdings keine Auskunft über die Größenverteilung der Kristallite. Ohne weitere Korrekturen kann nur der minimale Wert für eine mittlere Kristallitgröße angegeben werden.

Eine Möglichkeit, um den Einfluss der apparativen Verbreiterung auf die gemessene Reflexbreite zu bestimmen, ist die Verwendung eines Standards für Beugungsexperimente. Dieser sollte möglichst isomorph sein, aus großen Kristallen (μm) bestehen und scharfe Reflexe im Pulverdiffraktogramm verursachen (z. B. Korund). Die resultierende Breite dieser Reflexe B_{app} entspricht dann der gesamten Verbreiterung des Instruments. Durch das Anpassen einer Gauss- bzw. Lorentzkurve an einen Reflex ergeben sich Informationen über eine additive (Gleichung 28) bzw. quadratische additive (Gleichung 29) Zusammensetzung der Apparate und Kristallitbreite B_L zur integralen Reflexbreite. Der Beweis lässt sich elegant durch Anwendung analytischer Eigenschaften charakteristischer Funktionen führen [183].

$$B_{int}^2 = B_L^2 + B_{App}^2 \Rightarrow D_{hkl} = \frac{2\pi}{B_L} = \frac{2\pi}{\sqrt{B_{int}^2 - B_{App}^2}} \quad (28)$$

$$B_{int} = B_L + B_{App} \Rightarrow D_{hkl} = \frac{2\pi}{B_L} = \frac{2\pi}{B_{int} - B_{App}} \quad (29)$$

Die Bestimmung von Kristallitgrößen durch die Auswertung von Beugungsreflexen liefert prinzipiell einen gemittelten Wert über das gesamte bestrahlte Probenvolumen. Das ist ein Vorteil im Vergleich zu mikroskopischen Methoden, die meist Oberflächen betrachten. Zur Bestimmung der Verteilung von Kristallitgrößen in einer größeren Probe (mm) eignet sich das Abrastern mit einem Mikrofokus (μSpot Beamline BESSY) um das bestrahlte Probenvolumen einzustellen. Um die Probe auch innerhalb des Volumens entlang der Achse des Röntgenstrahls unterscheiden zu können, muss theoretisch nur der Öffnungswinkel des Detektors entsprechend verkleinert werden.

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Das ist durch Blenden an einem konventionellen Detektor gut möglich, aber für einen Flächendetektor in der geforderten Auflösung nur schwer zu realisieren. Alternativ bleiben beispielsweise die *ex situ* Methoden der Kryo-Elektronenmikroskopie.

4.3.3 WAXS der Kristallisation von Vitamin C, Aspirin, Coffein und CaCO_3

In levitierten Proben kann der Analyt kristallisieren, beispielsweise induziert durch Verdampfung des Lösungsmittels und einhergehende Aufkonzentration des Analyten. Von 5 μL eingebrachter Lösung ist die Abnahme der Tropfendimension im Durchmesser von 2 mm auf 20–100 μm typisch. Die μSpot -Beamline [184] erlaubt die Nutzung eines fokussierten Röntgenstrahles mit Durchmesser bis zu minimal 10 μm bei einem Photonenfluss von $1 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ und Ringstrom von 100 mA. Durch die hohe Intensität im Vergleich zum Labor werden Beugungsexperimente in schneller Abfolge möglich. Dazu wurde der akustische Levitator in die Beamline integriert, wie in Abb. 36 schematisch dargestellt. Das komplette Experiment befindet sich aufgrund des Strahlenschutzes in einer geschlossenen Hütte und der Versuchsaufbau ist über einen Kommandozeileninterpreter am Computer fernbedienbar (Spec). So lässt sich die Probe auf Mikrometer genau im Röntgenstrahl platzieren und mittels eines auf der Strahlachse liegenden Mikroskops beobachten. Zum Vergleich wurde der experimentelle Aufbau sowohl für containerlose Experimente als auch für konventionelle Glaskapillaren verwendet.

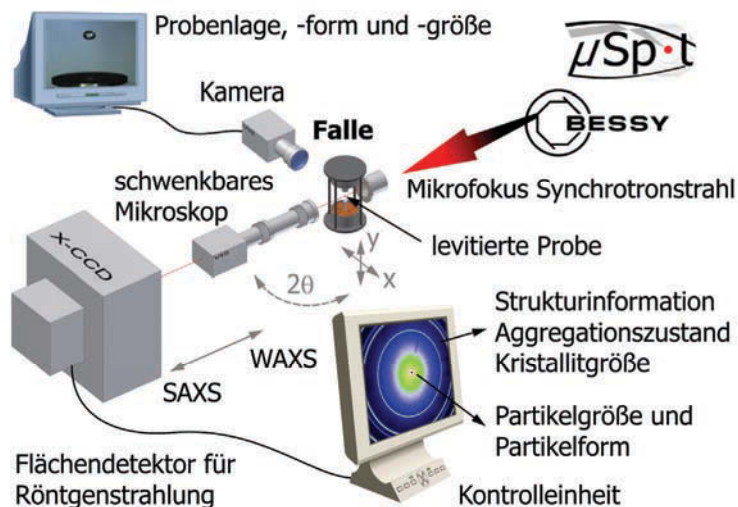


Abb. 36 Skizze des experimentellen Aufbaus für Röntgenstreuexperimente (SAXS und WAXS) mit dem akustischen Levitator (Falle) als containerloser Probenhalter im Zentrum.

Die Fokussierung der Beamline ist auf Strahldivergenzen kleiner 1 mrad (horizontal und vertikal) ausgelegt. Alle Experimente wurden mit monochromatischer Röntgenstrahlung eines Doppelkris-

talls und alternativ mit einem Multilayer ($9 \text{ keV} < E < 15 \text{ keV}$, Bandbreite $10^{-4} < \Delta E/E < 10^{-2}$) durchgeführt. Das Mikroskop und optische Kameras liefern Informationen über exakte Lage, Form und Größe der Probe, wobei ein geeigneter Fluoreszenzkristall die Röntgenstrahlung sichtbar macht. An der Probe gestreute Intensitäten des Röntgenstrahls lassen sich mit einem zweidimensionalen Röntgendetektor (MarMosaic, CCD 3072×3072 Pixel) mit einer Breite der Punktantwortfunktion (engl. *point spread function*) von ungefähr $100 \mu\text{m}$ sammeln.

Der Abstand der Probe zum Detektor kann von $200\text{--}850 \text{ mm}$ variiert werden und ermöglicht die Aufnahme von WAXS bzw. SAXS (siehe Abb. 36). Die Interferenz gestreuter Strahlung führt zu Beugungsringen um die Strahlachse (vgl. Abschnitt 2.3). Diese wurden von der Hintergrundstreuung korrigiert und mit Algorithmen von FIT2D [185] in Diffraktogramme umgewandelt. Zur Kalibrierung der Beugungsexperimente diente Korund (Aluminiumoxid, $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) mit einer Korngröße kleiner $10 \mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich, München). Aufgrund des akustischen Feldes induzieren Luftströmungen eine gute Durchmischung der flüssigen Probe, was zu einer homogenen Materialverteilung führt. Das verhindert Temperaturgradienten innerhalb des Tropfens, wenn das verdunstende Lösungsmittel an der Oberfläche Wärme entzieht. Die Wahrscheinlichkeit, Beugung zufällig orientierter Gitterebenen aufzunehmen, steigt durch die Rotation des Tropfens. Solch eine Rotation kann durch die Luftströmungen um den levitierten Tropfen induziert werden.

Alle Experimente wurden mit deionisiertem Wasser durchgeführt um eine kristalline Salzbildung zu vermeiden. Acetylsalicylsäure (Aspirin, pure, ABTEI Pharma, Marienmünster) und Ascorbinsäure (Vitamin C, pure, Euro OTC Pharma, Bönen) wurden in H_2O gelöst. Sie wurden als kleine und gut bekannte Modellsysteme ausgewählt, wobei der Polymorphismus von Aspirin derzeit intensiv diskutiert wird [186]. Vitamin C als kleines organisches Molekül ist nicht nur ein essenzieller Nährstoff für Menschen, weil seine Anwesenheit für eine Reihe von Stoffwechselreaktionen nötig ist [187], sondern auch besonders gut in Wasser löslich (330 g/L). Die Streukurven eines levitierten Tropfens Aspirinlösung während der kontinuierlichen Verdunstung von Wasser zeigt Abb. 37. Die Aufnahme der Streudaten erfolgte als Funktion der Levitationszeit alle 30 s mit einer Bestrahlungszeit von 10 s . Das Experiment wurde nach 31 min gestoppt, als das Wasser vollständig verdunstet war und nur noch statistische Änderungen der Streukurven beobachtet wurden.

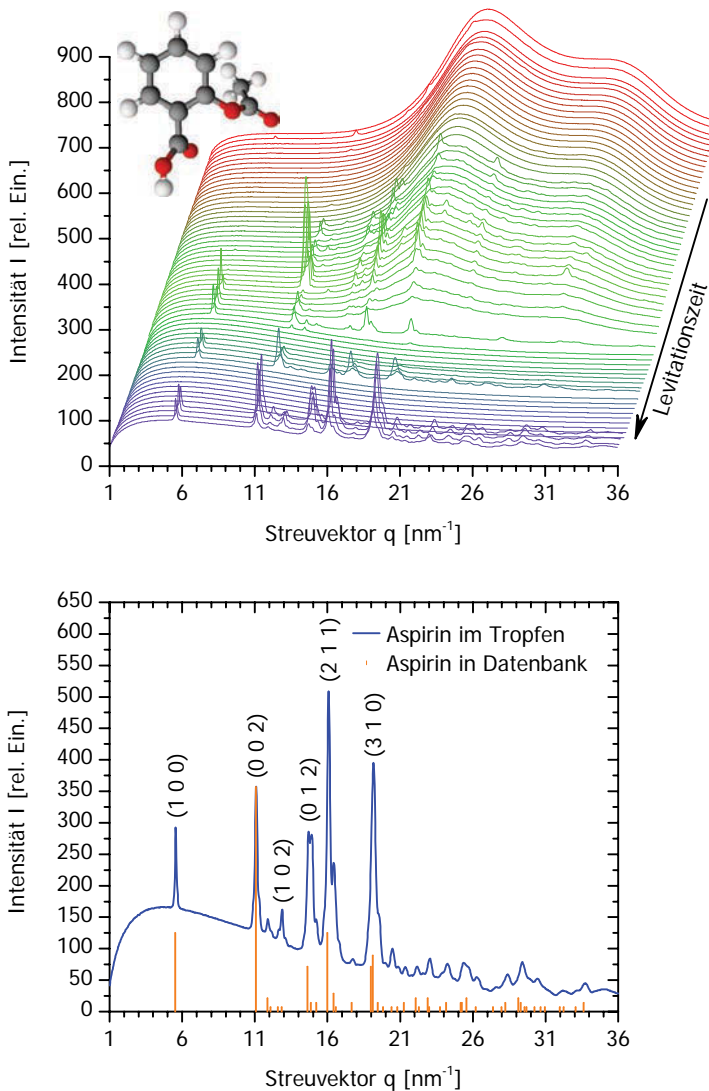


Abb. 37 Serie von Streukurven an Aspirin im wässrigen Tropfen als Funktion der Levitationszeit (31 min, oben) und Vergleich am Experimentende (kompakte Linie, unten) mit kristallographischer Datenbank (Deltafunktion).

Die Kristallisation von Aspirin wurde dynamisch verfolgt, beginnend mit der verdünnten Lösung einer Konzentration von 10 g/L (obere Kurve), über den dehydrierten Zustand (mittlere Kurven) bis zum letztendlich festen Zustand der kristallisierten Probe (untere Kurve). Zu Beginn zeigt sich ein deutliches Streusignal anhand der Streukurve mit einem breiten Maximum bei $q = 20 \text{ nm}^{-1}$ und einer Schulter bei $q = 30 \text{ nm}^{-1}$, das der Streuung von Wasser zugeordnet werden kann. Wie erwartet, sinkt dessen Intensität kontinuierlich während der Levitation aufgrund der Verdunstung des Wassers. Zusätzlich tauchen zeitweise Gruppen von Reflexen auf, welche ersten Kristalliten

zuzuordnen sind, die sich durch den Röntgenstrahl bewegen. Dieser hat einen Durchmesser von 100 μm , was klein ist gegenüber dem anfänglichen Tropfendurchmesser von 2 mm. Solange wenige und kleine Kristalle vorhanden sind, entspricht das den Erwartungen der Mischungseigenschaften im akustisch levitierten Tropfen. Anisotrope Streubilder mit „stark gefleckten“ Debye-Scherrer-Ringen unterstützen zusätzlich diese Erklärung.

Das Diffraktogramm des letztlich resultierenden festen Aspirins zeigt deutliche Bragg-Reflexe und kann mit zugehörigen Reflexen aus der kristallographischen Datenbank (PDF-Eintrag 120850 [188]) verglichen werden (Abb. 37, unten). Das berechnete Pulverdiffraktogramm ist auf den intensivsten Reflex normiert und markante Reflexe sind indiziert. Die aufgenommenen Reflexpositionen sind der kristallinen Phase von Aspirin in der monoklinen Raumgruppe $P2_1/c$ zuzuordnen (JCPDS-ICCD, Joint Committee on Powder Diffraction International Centre for Diffraction Data). Ein Pulverdiffraktogramm mit korrekten Intensitätsverhältnissen, wie für eine vollständig zufällige Verteilung von Kristalliten, wurde nicht beobachtet. Gleichfalls war auch kein für einen Einkristall typisches Diffraktogramm zu erwarten. Zusammenfassend sind für das *in situ* Kristallisationsexperiment korrekte Reflexpositionen wie in der Datenbank dokumentiert und abweichende Intensitätsverhältnisse festzustellen. Vermutlich ist dieses Phänomen eine typische und generelle Eigenschaft des gewählten Versuchsaufbaus und bedarf weiterer Untersuchungen. Abb. 38 zeigt eine Sequenz der aufgenommenen Diffraktogramme von Vitamin C in wässriger Lösung während der Verdunstung von Wasser. Wieder erfolgte die Aufnahme aller 30 s mit einer Beleuchtungszeit von 10 s. Das Experiment wurde nach 16 min beendet, als das meiste Wasser verdunstet war.

Beugungsreflexe sind ab der kleinsten Konzentration von 350 g/L sichtbar und wachsen kontinuierlich in der Intensität mit fortschreitender Levitationszeit. Das Ergebnis zeigt die Anwesenheit von Vitamin C. Die Verbindung kristallisiert in der Raumgruppe $P2_1$, in Übereinstimmung mit dem Eintrag der Kristallstruktur aus der Datenbank (JCPDS-ICCD, Abb. 38, unten). Im Vergleich zu Aspirin besitzt Vitamin C mehr Möglichkeiten zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, deren Vielzahl der Grund für die höhere Geschwindigkeit des Kristallwachstums sein kann (Abb. 37, oben).

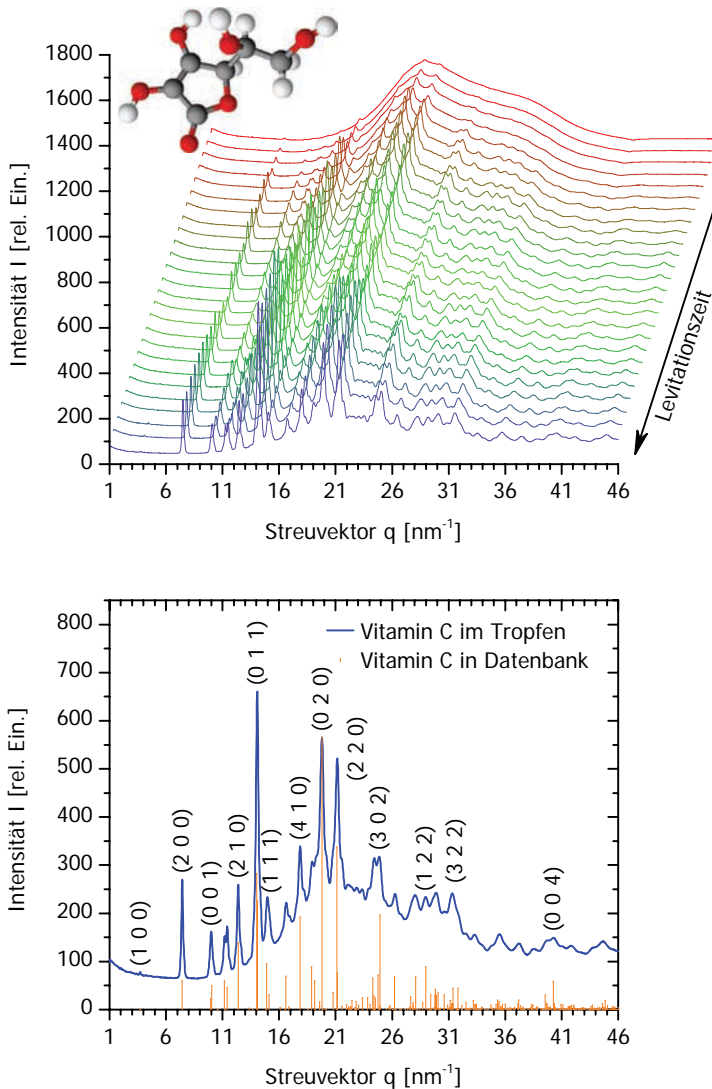


Abb. 38 Streukurven von Vitamin C im Tropfen während der Verdunstung von Wasser (16 min, oben) und Vergleich am Experimentende mit Reflexen aus der Datenbank (Deltafunktionen, unten).

Zum Studium früherer Stufen im Kristallisationsprozess lassen sich offensichtlich, beginnend mit wenigen periodisch angeordneten Molekülen, Bragg-Reflexe levitierter Proben zeitaufgelöst detektieren. Für Calciumcarbonat (CaCO_3) ist die stufenweise Kristallisation gut untersucht und erfolgt nach der Ostwaldschen Stufenregel nacheinander in den bekannten Phasen der Minerale Vaterit, Aragonit und Calcit. Die Bildung von CaCO_3 wird seit mehr als einem Jahrhundert studiert mit über 3000 Veröffentlichungen innerhalb der letzten zehn Jahre. Während die unerwünschte Präzipitation als hartnäckiges, teures und weit verbreitetes Problem auftritt [189-192], ist die

direkte Bildung von CaCO_3 kontrollierter Größe, Form und kristalliner Phase für eine Vielzahl kommerzieller Anwendungen kritisch [193, 194]. Die Kristallisation in natürlicher Umgebung kann unter Biomineralisation zusammengefasst werden [195, 196]. Der Begriff beschreibt Prozesse in denen CaCO_3 unter Anwesenheit großer, organischer Moleküle kristallisiert, das in hierarchisch geordneten Strukturen resultiert. So ist Aragonit Bestandteil der Schalen und Gerüste vieler Tiere. Diese Biomineralisation geschieht durch die Transformation transienter amorpher Vorstufen [197], welche als templatbasierte Kristallisation abläuft. Verschiedene analytische Methoden wie Schnelltrocknung [198], kryo-TEM [199], Röntgenstreuung [200-202] und Röntgenmikroskopie [203] wurden benutzt, um den anfänglichen Präzipitationsschritt zu untersuchen, aber die Ergebnisse werden teilweise kontrovers diskutiert.

Der Nachteil der meist genutzten experimentellen Methoden, um die Bildung und das Wachstum festen Calciumcarbonats zu studieren, liegt in den dürftig definierten Kristallisationsbedingungen. So werden die Lösungen schnell, häufig turbulent, gerührt um eine hohe Übersättigung zu erreichen. Das System könnte an der Grenzschicht vermischter flüssiger Edukte reagieren, da der Zustand homogener Übersättigung nicht erreicht wird [204], was zu Artefakten führen kann. Fremdmaterial und deren Phasengrenzen haben nicht nur einen Einfluss auf die Nukleation und das Kristallwachstum, sondern auch auf die Größenverteilung entstehender Partikel. Zusammengefasst ist es schwierig, homogene Nukleation ohne heterogene Körper, beispielsweise Düsenwände oder Rührgefäß, sicherzustellen. Akustische Levitation ist ein geeignetes Werkzeug um die *kontaktfreie* Kristallisation mit minimaler Störung der flüssigen Proben zu ermöglichen. Die *in situ* Untersuchung der Kristallisation im Levitator vermeidet den Einfluss von Phasengrenzen fester Probencontainerwände, welche den Fällungsprozess durch heterogene Nukleation beeinflussen können. Einzig die Grenze zwischen der Lösung und umgebender Luft ist vorhanden und jeglicher Kontakt zu Fremdmaterial wird vermieden.

Die Kristallisation von Calciumcarbonat geschah homogen nach der Kitano-Methode [205, 206] durch kontinuierliche Verdunstung von Wasser und langsamer Abgabe von Kohlendioxid aus der gesättigten Lösung mit Calciumhydrogencarbonat. CO_2 (Westfalen AG, Münster) wurde durch 20 mL Suspension von CaCO_3 (p. a., Sigma Aldrich) im hochreinem Wasser (Millipore Synergy 185 mit UV Photooxidation, 18,2 M Ω /cm) geleitet. Die gesättigte Lösung ist mit einer Kaskade Spritzenfilter (0,1 μm Millipore Millex VV gefolgt von 20 nm Millipore Anotop) gereinigt und abschließend wieder intensiv mit CO_2 behandelt worden, um noch verbliebene Partikel mit Durchmessern kleiner 20 nm aufzulösen. Ca. 4 μL dieser Lösung wurde als Tropfen unter Raumbedingung (Luftfeuchtigkeit 42 %, Temperatur 300 K) levitiert. Die anschließende Verdunstung konnte unter Nutzung des WAXS-Aufbaus beobachtet werden (vgl. Abb. 36). Der monochromatische ($\lambda = 1,00257 \text{ \AA}$) Synchrotronstrahl wurde mittels Blendensystem auf einen

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Durchmesser von 20 μm eingestellt. Aufgrund der geringen Strahlgröße ist keine „Entschmierung“ (mathematische Entfaltung) der aufgenommenen Intensitätsverteilung nötig. Die Streuung von reinem Lösungsmittel diente als Abschätzung für den Untergrund, wobei keine Streukurven korrigiert wurden, da die Korrelation mit dem abnehmenden Streuvolumen nicht nur schwierig, sondern zur Auswertung auch unnötig ist. Abb. 39 zeigt die Streukurven mit einer Bestrahlungszeit von jeweils 40 s.

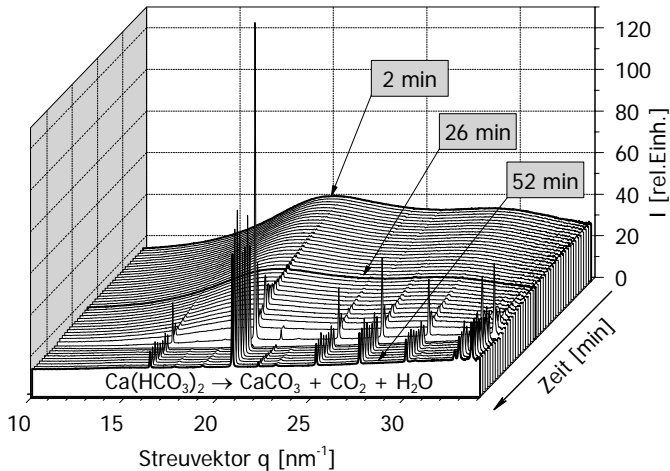


Abb. 39 Reaktionsgleichung und Streukurven während Wasser in einer Stunde verdunstet.

Aufgrund der Wasserverdunstung erhöht sich die Konzentration von Calciumcarbonat kontinuierlich. Zu Beginn zeigt sich nur diffuse Streuung von Wasser, deren Intensität stetig abnimmt. Der erste sichtbare Reflex gehört zur (104) Gruppe der Calcit Gitterebenen, dessen Intensität während des gesamten Experiments steigt. Andere Calcitreflexe (102), (110), (113) und (202) können nach 22 min, der schwache (006) Reflex erst nach 34 min detektiert werden. Kontinuierliche Debye-Scherrer-Ringe im Streubild (Abb. 40, rechts) dokumentieren keine bevorzugte Kristallausrichtung. Die Anwesenheit anderer kristalliner Phasen signifikanter Mengen wird ausgeschlossen, nur Spuren von Vaterit sind in der Endstufe der Verdunstung detektierbar ($< 5\%$ basierend auf den Ergebnissen der Rietveld-Verfeinerung [207]). Als minimaler Wert für die mittlere Kristallitgröße wurde aus der (012)-Reflexform 110 nm bestimmt [208]. Die ersten entstandenen Partikel wurden mit dem Mikroskop beobachtet (Abb. 40, links) und bestehen aus amorphen CaCO_3 aufgrund der Abwesenheit von Bragg-Reflexen im zugehörigen Streubild. Aufgrund von Partikelagglomerationen erscheint die Tropfenoberfläche opaleszent. (Abb. 40, a-d). Das letzte Bild zeigt den finalen trockenen Rückstand (d).

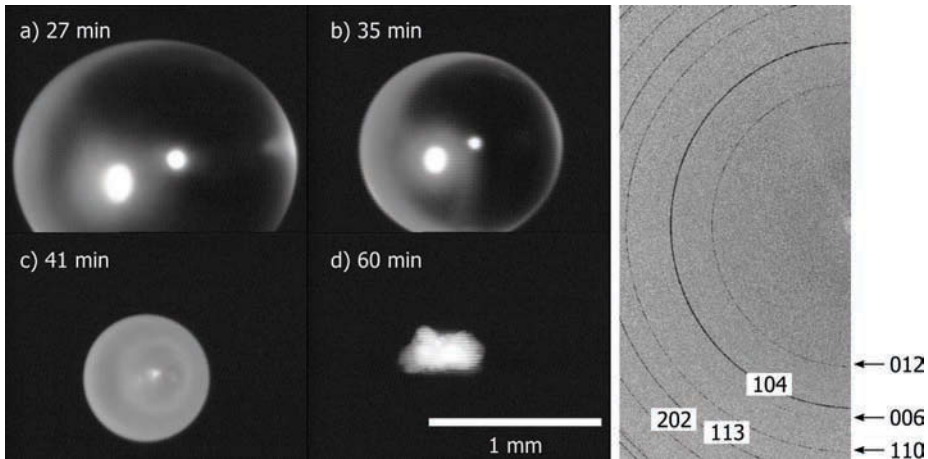


Abb. 40 Mikroskopbilder der verdunstenden Calciumcarbonatlösung im Levitator (links) und repräsentatives Streubild zum Experimentende (rechts).

In frühen Kristallisationsstufen erscheinen alle Bragg-Reflexe geteilt, beispielsweise das (104)-Reflexprofil mit Maxima bei $q = 20,68 \text{ nm}^{-1}$ und $20,79 \text{ nm}^{-1}$. Diese Reflexdopplung ist auf die Probendicke in Strahlrichtung und damit verschiedenen Abständen zum Detektor zurückzuführen. Die daraus berechnete Probendicke von $1,52 \text{ mm}$ entspricht dem Tropfendurchmesser. Offensichtlich findet die Bildung von kristallinem Calcit hauptsächlich an der Tropfenoberfläche statt, was sich klar von anderen (s. o.) Kristallisationen im levitierten Tropfen unterscheidet. Aus der Rietveld-Analyse extrahierte Skalierungsfaktoren charakterisieren in der Avramiform die Kinetik einer Phasenbildung [209, 210] und geben einen Hinweis auf die unabhängige und parallele Entstehung von Calcitpartikeln. Das erklärt den schnellen Ablauf der Fällung, sobald einmal ein kritischer Level nach ungefähr 26 min erreicht wurde.

In parallelen Versuchen wurden die frühen amorphen Reaktionsstufen nach 400 s im TEM visualisiert. Dazu wurden Tropfen aus der Falle entnommen und direkt auf das Probenetz (lacey-coated, Plano) gegeben, mit Wasser gewaschen und abschließend an Luft getrocknet. Abb. 41 zeigt das Primärprodukt bestehend aus Nanopartikeln mit einem emulsionsartigen Erscheinungsbild, ähnlich dem Bild aus Studien mit kryo-TEM [199]. Die schwache Kontrastvariation in den Partikeln zeigt deren flüssige Form, die Durchmesser betragen $100\text{--}300 \text{ nm}$, und der amorphe Zustand ließ sich durch Elektronenbeugung (ED, Einsatz in Abb. 41b) bestätigen. Bemerkenswert ist, dass diese Partikel ohne zusätzliche Maßnahmen bis zu einigen Tagen stabil bleiben und erst nach weiterer Lagerung oder Bestrahlung mit Licht kristallisieren. Vollständig getrocknete Proben zeigen im REM sphärische feste Partikel mit $5 \mu\text{m}$ Durchmesser und einige rhomboedrische Kristalle aus Calcit (Abb. 41c und Abb. 41d). Diese Partikel könnten aus festem und nun trockenem, amorphen Calciumcarbonat bestehen, welches nicht kristallisierte.

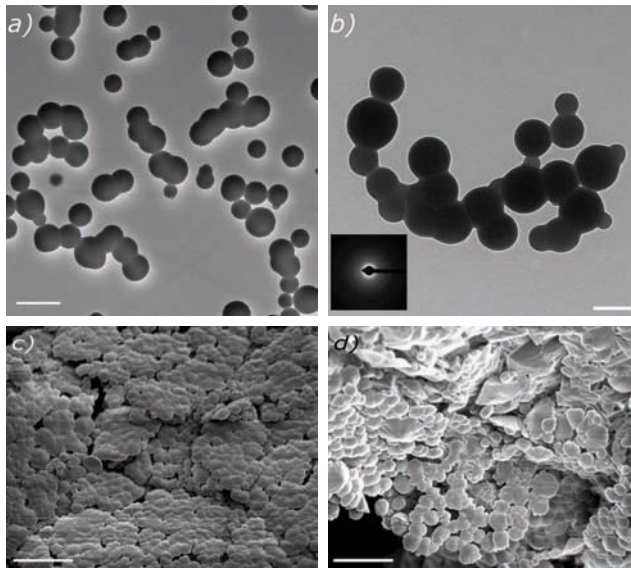


Abb. 41 Partikel aus Calciumcarbonat nach 400 s im TEM (a, b) und nach kompletter Trocknung im REM (c, d). Die Maßstäbe sind a) 500 nm, b) 200 nm, c) 20 μm und d) 10 μm .

Proben für kryo-REM wurden zur Vorbereitung direkt in flüssiges Ethan getaucht und kryogebrochen, nachdem überflüssiges Ethan bei 60°C und 10^{-6} mbar entfernt wurde (Lyophilisierung). Unter diesen Umständen entstehen bei der Gefriertrocknung fasrige Artefakte. Anschließend konnte Wasser durch Sublimation bei -5°C und 10^{-6} mbar langsam und unter *in situ* Beobachtung im kryo-REM entfernt werden. Da sich die ersten Partikel im gesamten Tropfenvolumen bilden, ist von homogenem Ursprung auszugehen (Abb. 42a). Der Durchmesser der Partikel gleicht denen, im TEM bestimmten. Nach einer Levitationszeit von 400 s ist eine ca. 20 μm dicke Schicht an der Tropfenoberfläche sichtbar (Abb. 42b). Sie enthält die gleichen Partikeln, nur in wesentlich höherer Konzentration und etwas mehr aggregiert als in der Tropfenmitte.

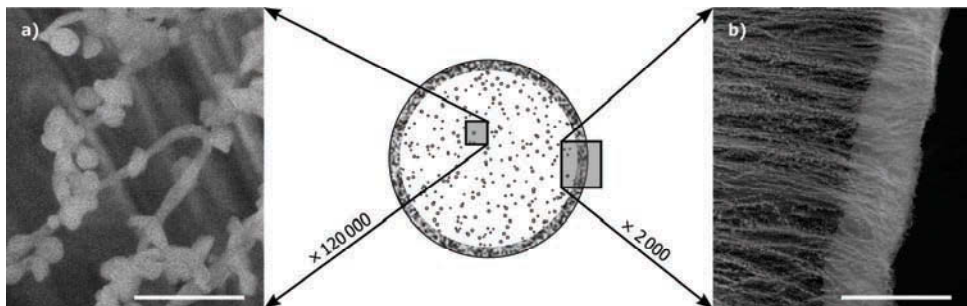
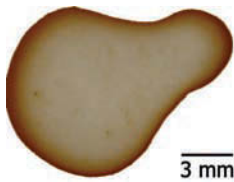


Abb. 42 400 s levitierter Tropfen im Kryo-REM mit Partikeln innen (a) und in einer 20 μm dicken Schicht an der Oberfläche (b). Die fasrigen Strukturen sind in beiden Bildern Artefakte der Probenpräparation bei der Gefriertrocknung, die Maßstäbe a) 500 nm und b) 40 μm .

Zusammenfassend erfolgt die kontaktlose Präzipitation von CaCO_3 im levitierten Tropfen in zwei Schritten. Zuerst bilden sich amorphe Nanopartikel mit einem emulsionsartigen Erscheinungsbild, welche sich im zweiten Schritt direkt in die kristallin stabile Phase Calcit umwandeln. Dabei erscheinen keine anderen Phasen der CaCO_3 -Zwischenprodukte wie Vaterit oder Aragonit oder seltener Phasen wie Ikaït oder Calciumcarbonathexahydrat, das der Ostwaldschen Stufenregel [211] zu widersprechen scheint. Eine Templat basierte Nukleation von Calcit auf der Oberfläche der amorphen Vorstufen liefert eine zwanglose Erklärung [212]. Verschiedene Kristallisationsstufen wurden durch TEM, kryo-REM und REM charakterisiert und indizieren eine spinodale flüssig-flüssig Phasenseparation für den ersten Bildungsschritt. Faatz *et al.* haben eine binodale flüssig-flüssig Phasenseparation vermutet, aber nicht experimentell bewiesen [213]. Dabei ist der Übergang zwischen spinodaler und binodaler Zersetzung fließend und eine scharfe Trennung lediglich Ergebnis stark vereinfachter Theorien [204, 214, 215]. Die erste *in situ* Studie der kontaktfreien und letztlich homogenen Fällung von CaCO_3 im levitiertem Tropfen zeigt die Eignung des akustischen Levitators als wirksames Werkzeug für die Analyse komplexer Nukleation, Kristallwachstum und Partikelbildung. Störungen und Artefakte durch Fremdkörper und Festphasengrenzen sind reduziert und ermöglichen eine zuverlässige Probenumgebung für außergewöhnlich kleine Probenvolumen [216].

Zur Untersuchung des Polymorphismus wurde die Bildung von micro- und nano-skalierten Kristallen am relevanten Modellsystem Coffein als Wirkstoff im Kaffee untersucht.



Wenn Kaffee-Tropfen auf gewöhnlichen Oberflächen trocknen, bilden sich weit bekannte Kaffeeringe (siehe links). Dieser Effekt ist wohl schon seit Jahrtausenden bekannt und sogar Inhalt aktueller Lieder: "...Spuren hinterlasse, jeden Tag, zum Beispiel mit der Kaffeetasse. Kleine Ringe auf dem Tisch..." [217]. Ein flüssiger Tropfen auf einer

Oberfläche ist ein wohl so einfaches physikalisches System, dass man meinen könnte, all sein Verhalten ist gründlich verstanden (R. D. Deegan: "*A fluid droplet on a solid surface is ostensibly so simple a physical system that one might suppose that all its behavior is thoroughly understood.*", 2000). Dennoch gelang die zugrunde liegende physikalische Erklärung erst im letzten Jahrzehnt [218]. Trotz unzähliger Studien seit mindestens 200 Jahren [219] sind Fragen zu Phänomenen an der Kontaktlinie (engl. *contact line*), definiert als die Grenzlinie bis zu der ein Festkörper benetzt, Gegenstand aktueller wissenschaftlicher und technischer Fragestellungen. Gegenwärtige Analysen erforschen beispielsweise das *Pinning* (engl., dt. „Vernadelung“) der Kontaktlinie [220, 221] und den Einfluss von Oberflächeneigenschaften [222]. Die Klärung des Polymorphismus von Coffein erfolgte 2007 [223] und liefert die Grundlage zur Auswertung der folgenden Experimente.

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Coffein, 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione, aus wässriger Lösung bildet auf Oberflächen (Glas, Polystyrol und Polyester) stabile "Kaffee-Ringe" typischerweise mit einem Durchmesser weniger Millimeter nach 20–50 min. Durch den Mikrofokus (BESSY μ Spot-beamline) kann die Feinstruktur entstehender Nadeln unterschieden werden. Überraschenderweise zeigen sich beide kristallinen Modifikation (α - und β -Coffein), aber örtlich separiert. Um Einflüsse aus dem Kristallisationsprozess durch Oberflächenunregelmäßigkeiten zu minimieren, eignet sich die akustische Levitation des Proben tropfens. Dabei verdunstet das Wasser komplett und die resultierende Kristallisation wurde *in situ* mit Synchrotron-WAXS verfolgt. Die resultierenden Diffraktogramme stimmen mit reinem α -Coffein überein und zeigen keine Bildung des Raumtemperatur-Polymorphs β -Coffein.

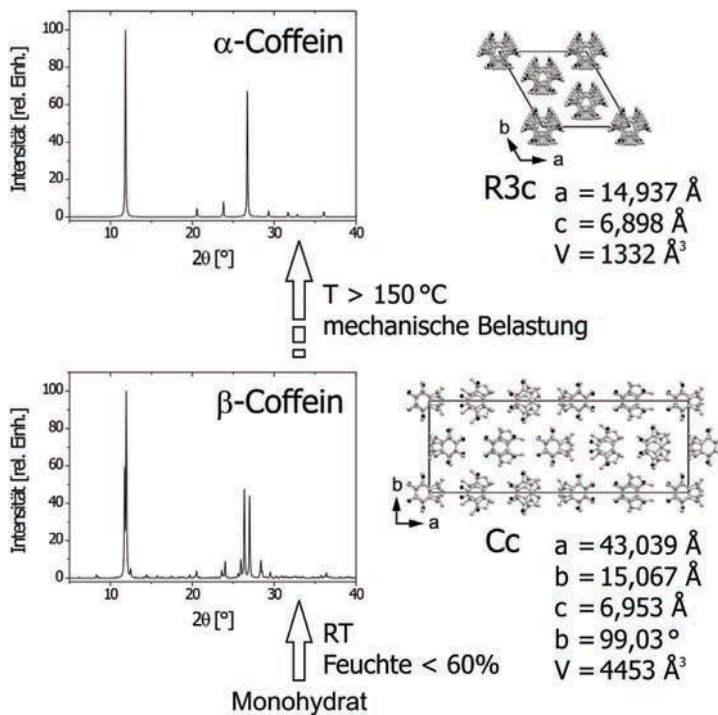


Abb. 43 Polymorphe von Coffein und deren strukturelle Beziehung in perspektivischen Blick (rechts) auf die Elementarzelle in Richtung [001] und zugehörige berechnete Pulverdiffraktogramme (links).

Trotz der Vielzahl in Pharmazie und Medizin verwendeter kristalliner organischer Substanzen [224] sind ausführliche Erforschungen früher Kristallbildung auf der Längenskala von einigen Nanometern bis Mikrometern selten. Zur Untersuchung werden sitzende Tropfen verwendet, die den gelösten Stoff enthalten. Die Verdunstung eines solchen Tropfens an für sich ist schon faszinierend, denn häufig entstehen hierarchisch organisierte Rückstände, wie für große Kolloide in

Suspension gezeigt wurde [225]. Eins der bekanntesten Beispiele ist der berühmte Kaffeeering [226] und vergleichbare Phänomene für große Moleküle wie DNA [227]. Unter Beachtung des geringen Tropfenvolumens 10^{-4} mol/L stellt sich die Frage, inwieweit der Trocknungsprozess eventuell gebildete Kristallite beeinflusst. Das Interesse wird motiviert durch die Beobachtung von Coffein-Kristallen nach Entspannung überkritischer Flüssigkeiten [228] und die erstaunliche Tatsache, dass die Kristallstruktur für die Tief- und Hoch-Temperaturphase erst vor kurzem geklärt werden konnte [223, 229]. Während die physikalischen Aspekte der Ringbildung ziemlich klar erscheinen [226, 230-233], wurde die chemische Beeinflussung und deren kristallographische Folgerung bis jetzt nicht untersucht.

Im System der klassischen Nukleationstheorie (CNT, engl. *classical nucleation theory*) wird die Kristallisation als zweistufiger Prozess betrachtet, bestehend aus der Bildung eines Keims (Nukleation, s. Abschnitt 2.4) und des folgenden Kristallwachstums [234]. Coffein ($C_8H_{10}N_4O_2$, Abb. 46) scheint ein vielversprechender Ausgangspunkt zur Untersuchung des Kristallisationsprozesses, um die Bildung gewünschter Polymorphe zu verstehen. Die dynamisch ungeordnete Hochtemperaturphase α -Coffein (I) kristallisiert in der trigonalen Raumgruppe R3c, wohingegen die Raumtemperaturphase β -Coffein (II) in der monoklinen Raumgruppe Cc mit fünf kristallographisch unabhängigen Molekülen in einer asymmetrischen Elementarzelle und langer a-Achse kristallisiert (Abb. 43). Kristallisiert Coffein aus wässriger Lösung, entsteht ein Monohydrat, dessen Kristallstruktur erstmals von Sutor im Jahr 1958 veröffentlicht wurde [235]. Das Monohydrat neigt dazu Wasser zu verlieren und wandelt sich bei Raumtemperatur quantitativ in die (kristall)wasserfreie β -Modifikation um [236, 237]. Diese Modifikation unterzieht sich bei Temperaturen über 150°C einer Phasenmodifikation und führt zu dem α -Polymorph [229]. Abgekühlt auf Raumtemperatur ist die α -Modifikation metastabil.

Coffein (p. a., Fluka, Buchs, Schweiz) wurde ohne weitere Reinigung benutzt und zeigt in der Röntgenbeugung (Bruker AXS, D5000, Cu- K_α Strahlung) allein das β -Polymorph. 11 mg Coffein wurden in 8 mL deionisiertem H_2O gelöst. Ein Tropfen der Coffein-Lösung mit der Konzentration 7×10^{-3} mol/L und einem Volumen von $4 \mu\text{L}$ wurde bei Raumtemperatur (298 ± 1) K auf ein Substrat platziert oder direkt in den akustischen Levitator injiziert (siehe 3.1). Als zu untersuchende Substrate für Kontaktoberflächen wurden Materialien wie Glas (Th. Geyer, Berlin) und Polyesterfilm (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet. Im Gegensatz zu 2D-Experimenten auf festen Oberflächen, wo Oberflächenrauigkeit und Konzentrationsgradienten relevant sind, sorgt der akustische Levitator für eine gute Durchmischung. Auch nach Verdunstung des Lösungsmittels verblieb die Probe stabil im akustischen Levitator. Die Schwankung des Schwerpunktes um weniger als $20 \mu\text{m}$, erlaubt mehr als eine Stunde Datenaufnahme mit WAXS. Dazu wurde wieder der experimentelle Aufbau am BESSY (Abb. 36) mit der Wellenlänge $1,00257 \text{ \AA}$, dem Strahl-

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

durchmesser 20 μm und einem Photonenfluss von $1 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ pro 100 mA Ringstrom verwendet. Der trockene Rückstand konnte direkt aus der Falle für weitere Analysen (REM) „gefischt“ werden.

Alle Eintrocknungsexperimente auf Oberflächen führten zu ringförmigen Rückständen, welche durch den Kaffeeingeeffekt erklärt werden [226]. Um der Verdunstung visuell zu folgen, wurde eine gefärbte Polystyroloberfläche aufgrund des hohen Kontrastes im Lichtmikroskop gewählt. Hier bilden sich sitzende Tropfen mit einem anfänglichen Kontaktwinkel von $(98 \pm 2)^\circ$ für Wasser und $(88 \pm 1)^\circ$ für die Coffeinelösung. Die Oberfläche kann, aufgrund mehrfacher AFM Messungen einer Fläche von $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ sowie $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$, mit dem quadratischen Mittel für die Rauigkeit $R_{rms} = (3,5 \pm 1,5) \mu\text{m}$ beschrieben werden. Eine typische Verdunstungsserie des Coffeintropfens (Abb. 44) wurde mit einem Lichtmikroskop (DM-143, Motic, Inc.) mit zehnfacher Vergrößerung und Videokamerasystem (PAL, Motic Images Plus 2.0) aufgenommen.

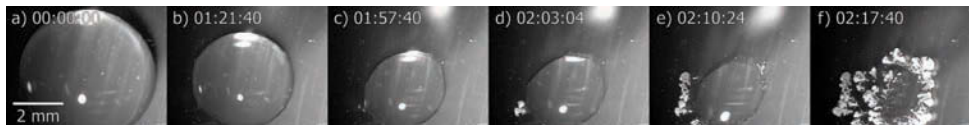


Abb. 44 Sitzender Coffeintropfen auf einer Polystyroloberfläche als Funktion der Zeit.

Beginnend mit der Konzentration von $7 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ dauert die Verdunstung des sitzenden Tropfens ungefähr 2 h unter Raumbedingungen ($T = 300 \text{ K}$, 60 % Luftfeuchtigkeit), wobei die Bildung fester Rückstände in typischerweise 10 min abgeschlossen ist. Durch die Verdunstung des Tropfens verringert sich der Umfang (Kontaktlinie) kontinuierlich. Diese wird für einige Sekunden punktuell fixiert (an einem sog. *Pinning Point*), reist dann aber wieder ab und zieht sich weiter zusammen. Während dieses Prozesses bilden sich Phasengrenzen minimaler Oberfläche aus, sogenannte Minimalflächen [238]. Die hauptsächliche Verdunstung des Lösungsmittels erhöht kontinuierlich die Konzentration von Coffein, bis sich plötzlich Nadeln radial von einem Punkt der Kontaktlinie (Punktlinie in Abb. 45a) nach außen bilden. Ist die Kontaktlinie einmal fixiert (a), lagert sich Material entlang der Grenze an (b) und unabhängige Formen sprießen (c-e) und passieren dabei sogar die anfängliche Kontaktlinie. Dieser Prozess dauert an, bis der Nachschub an Material unterbrochen wird (f) und kristalline Bündel von Nadeln auf der Oberfläche zurückbleiben, die einen Sektor bis zu 90° bedecken.



Abb. 45 Lichtmikroskopische Detail-Aufnahmen mitte links des Bildes in Abb. 44.

Kleine Tropfen hinterlassen winzige Rückstände mit Durchmessern von $(400 \pm 50) \mu\text{m}$ und einer typischen Masse von $145 \times 10^{-9} \text{g}$. Ein einzelner Tropfen auf transparentem Polyesterfilm reduziert seinen Kontaktwinkel für Wasser von $(94 \pm 1)^\circ$ auf $(87 \pm 4)^\circ$ für Coffeinlösung, aufgrund der schwach oberflächenaktiven Wirkung von Coffein (Tensid). Die Oberflächengestalt kann beschrieben werden mit $R_{rms} = 4,6 \mu\text{m}$. Der Polyesterfilm wurde aufgrund seines geringen Streuhintergrundes und geringer Absorption im Röntgenbereich gewählt. Nach der Tropfenverdunstung verbleiben auf der Oberfläche kleine Ablagerungen mit unregelmäßigen Grenzlinien. Die Analyse zeigt deutlich beide Coffein-Modifikationen in räumlich separierten Regionen. Wie in Abb. 46 gezeigt, können die Phasen von Coffein leicht anhand der intensivsten Reflexe bei $q = 8,5 \text{ nm}^{-1}$ und 19 nm^{-1} unterschieden werden. So zeigt das Diffraktogramm der α -Phase (HT) einen scharfen Reflex bei $q = 18,8 \text{ nm}^{-1}$, während die β -Phase (RT) durch zwei Reflexe bei $q = 18,6 \text{ nm}^{-1}$ und $19,0 \text{ nm}^{-1}$ markiert ist (Einsatz in Abb. 46). Deltafunktionen zeigen die theoretischen Reflexe der Datenbank (CSD [239]) zum Vergleich.

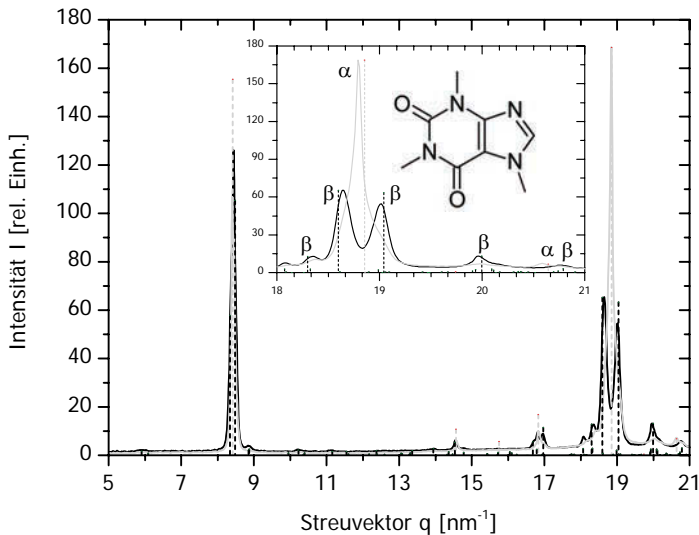


Abb. 46 Schema von Coffein (1,3,7-trimethylpurine-2,6-dione, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$) und Diffraktogramme zweier Regionen sowie theoretische Daten (gestrichelt) der α -Phase (grau) und β -Phase (schwarz).

Unter Berücksichtigung der geringen Enthalpie für den Phasenübergang der Coffein-Polymorphe von $4,1 \text{ kJ/mol}$ bei 420 K [240, 241], können beide Modifikationen im kristallinen Rückstand erwartet werden. Die räumliche Auflösung der Detektion von einigen Mikrometern ist vergleichbar mit der Rauigkeit der verwendeten Oberfläche. Diese Rauigkeit ermöglicht, durch die Bildung abgegrenzter Volumen, die Entstehung beider Phasen, denn jedes Abteil besitzt verschiedene Konditionen, welche letztendlich die Kristallisation einer der beiden Phasen bedingen. Das beschriebene Experiment wurde auf einer Glasoberfläche wiederholt, die eine homogenere und

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

besser definierte Oberflächenrauigkeit von $R_{rms} = 5$ nm besitzt. Der Kontaktwinkel vergrößert sich dabei von $(45 \pm 3)^\circ$ für Wasser auf $(59 \pm 4)^\circ$ für die Coffeinelösung, was im Gegensatz zur Verkleinerung des Kontaktwinkels zur Polyesteroberfläche steht. Vom festen Probenrückstand wurden verschiedene Regionen aufgrund deren Morphologie ausgewählt und in die folgenden vier Kategorien eingeteilt: radial ausgerichtete Nadeln außerhalb des Ringes (A), Ursprung der Nadelbündel auf dem Ring (B), eine einzelne Nadel (C) und eine homogene Fläche (D) im Inneren des Ringes (Abb. 47). Zur Analyse trifft der Röntgenstrahl nach dem Durchstrahlen des Glassubstrates auf die Rückstände.

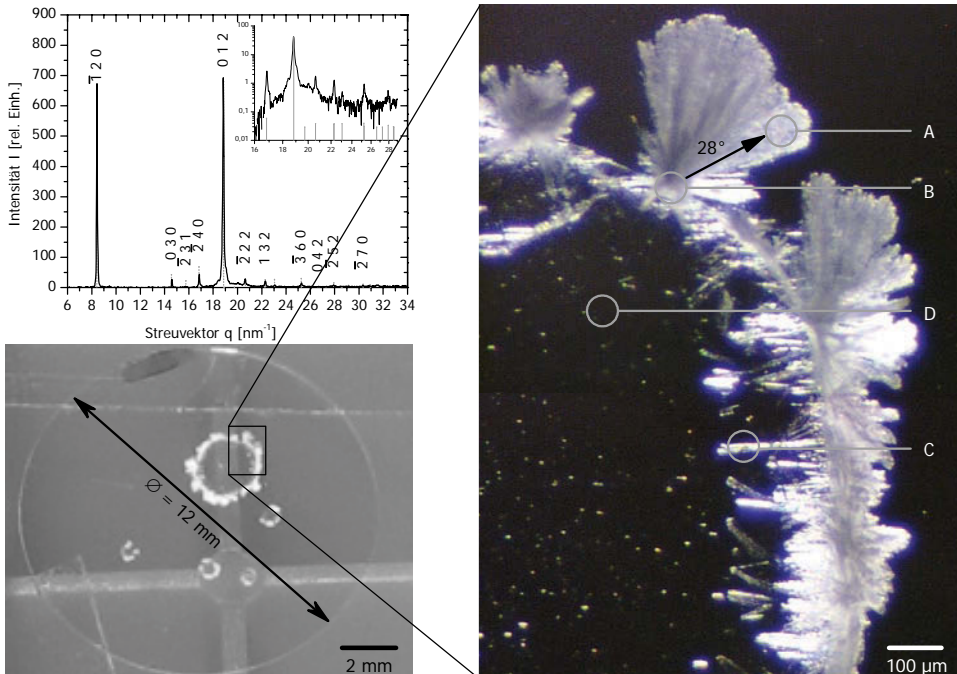


Abb. 47 Coffein auf einem Glasplättchen (links unten) mit ausgewählten Regionen (A-D, rechts) und das indizierte Diffraktogramm der Region C sowie Reflexe der α -Modifikation (extrahiert aus Ref. [229]).

Die Streukurve im Inneren des Ringes D zeigt keine Beugungs-Reflexe und legt eine amorphe Struktur nahe. Die gut definierten Streukurven aller Regionen belegen den kristallinen Charakter der Rückstände und sind für die Regionen A, B und C eindeutig der α -Phase von Coffein zuzuordnen, wie exemplarisch für das Diffraktogramm der Region C in Abb. 47 gezeigt.

Die bevorzugte Orientierung des Kristallwachstums ist aufgrund ausgerichteter Kristallite im Mikroskopbild (Abb. 47) zu vermuten und wird durch die Morphologie im REM (Abb. 49 *vide infra*) gestützt, was feine Nadeln in einem Winkelbereich von ca. 60° zeigt. Das 2D-Streubild zeigt entsprechende Reflexe, welche in zwei senkrecht zueinander liegenden Winkelbereichen

angeordnet sind. Die Verteilung der Bragg-Reflexe auf diese Bereiche erlaubt eine Definition der Lage der, sie verursachenden, Kristallite. So liegen im breiten Sektor von 30° beispielsweise der 012 -Reflex ($q = 18,9 \text{ nm}^{-1}$) und im schmalen Sektor von 16° die Reflexe der $\bar{1}20$, $\bar{2}22$ und Gitterebenen, welche zur Nadelrichtung ausgerichtet sind. Die Nadelachse der Coffeinkristalle ist parallel zur kristallographischen c -Achse und liegt zusammen mit der b -Achse in der Ebene der Glasoberfläche, aufgrund der senkrechten Ausrichtung der $\bar{1}20$ Ebene relativ zur Glasoberfläche. Unter Benutzung der Methode BFDH (Bravais Friedel Donnay Harker [242-244]) lassen sich wahrscheinliche Kristallobertflächen einer Struktur voraussagen. Abb. 48 zeigt das Molekül schematisch in einer ausgerichteten kristallinen Nadel aus Coffein.

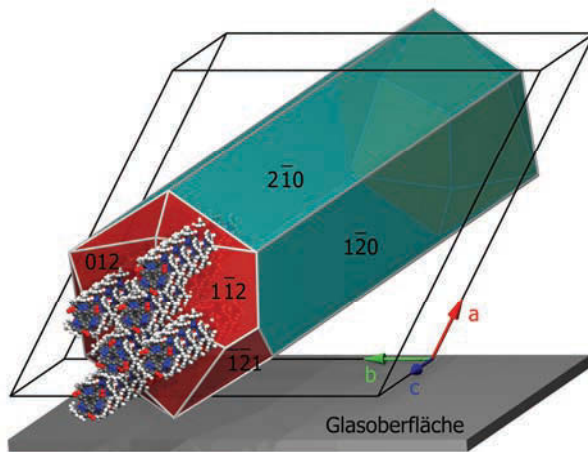


Abb. 48 Schematisch Kristallstruktur, Elementarzelle und BFDH Morphologie von α -Coffein. Die Glasoberfläche liegt in der Ebene, aufgespannt durch die b - und c -Achse.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen geben tiefere Einblicke in die gebildeten Strukturen und liefern Bilder mit einer 100-fachen Auflösung im Vergleich zur Lichtmikroskopie. REM-Bilder markierter Positionen in Abb. 47 werden in Abb. 49 präsentiert.

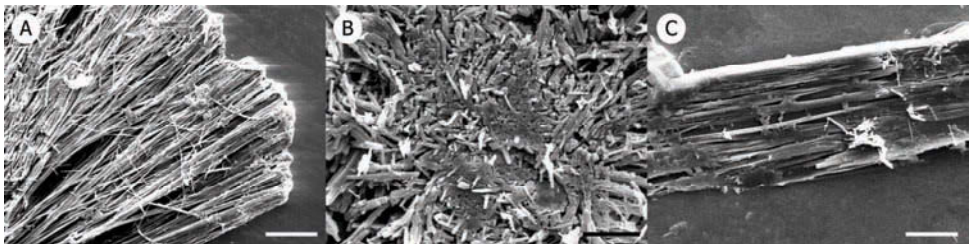


Abb. 49 REM ausgerichteter Coffein-Nadeln in markierten Regionen (A, B und C). Die Vergrößerungen sind 370 (A), 2000 (B) und 1850 (C). Die dargestellten Maßstäbe $50 \mu\text{m}$ (A), $10 \mu\text{m}$ (B) und $10 \mu\text{m}$ (C).

Die vermuteten einzelnen Nadeln bestehen offensichtlich aus einem ganzen Bündel kleinerer Nadeln und verfeinern somit das Bild der Tropfenverdunstung. Die außerhalb des Ringes liegende

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Region (A) wird durch eine Vielzahl ausgerichteter kleiner Nadeln charakterisiert, welche schnell durch den kontinuierlichen Materialtransport aus dem Tropfeninneren gebildet werden. Kürzere, unregelmäßig angeordnete Nadeln füllen die Region auf dem Ring (B). Die Nadel im Ringinneren (C) besteht aus mehreren parallelen Nadeln, die ineinander übergehen und deren Ausrichtung parallel zur Substratoberfläche mit dem angenommenen Modell übereinstimmt (Abb. 48). Die Durchmesser der Nadeln außerhalb des Ringes (A) lassen sich auf $35\ \mu\text{m}$ abschätzen. Die kubischen Stäbchen auf dem Ring (B) sind dagegen wesentlich kleiner und haben Durchmesser von einigen hundert Nanometern bis zu $1\ \mu\text{m}$. Diese Strukturen sind einige Mikrometer lang und nicht aneinander ausgerichtet, wie die Nadeln im Inneren (C), welche parallel geordnet bis zu $300\ \mu\text{m}$ lang sind.

AFM bildet Strukturenoberflächen ab und bestimmt die Durchmesser einzelner Nadeln als Höhenprofil, beispielhaft entlang der markierten Pfeile (Abb. 50). Die Markierungen A, B und C korrelieren wieder mit ausgewählten Regionen für WAXS (Abb. 47) sowie REM (Abb. 49).

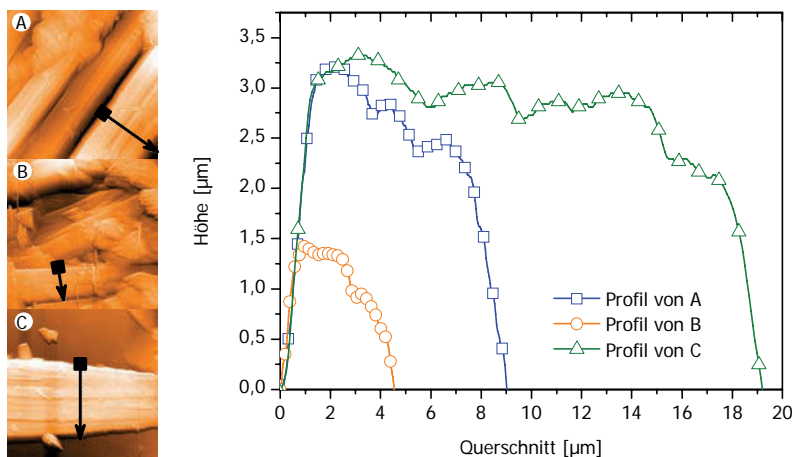


Abb. 50 AFM verschiedener Regionen A ($20 \times 20\ \mu\text{m}^2$), B ($20 \times 20\ \mu\text{m}^2$) und C ($40 \times 40\ \mu\text{m}^2$) und deren Höhenprofil im Diagramm (jeder Zehnte Punkt als Symbol).

Die Relation der aus den AFM-Bildern bestimmten Durchmesser der Region A ($9\ \mu\text{m}$), B ($4,5\ \mu\text{m}$) und C ($19\ \mu\text{m}$) sind in guter Übereinstimmung mit denen aus den REM-Bildern. Zusätzlich kann die Kristallitgröße, gemittelt über das bestrahlte Volumen, aus den Streukurven der Röntgenbeugung bestimmt werden (XRD, s. u.).

Um die offensichtlichen Einflüsse fester Oberflächen (Kontamination, Fixierung der Kontaktlinie und Ionenaustauschprozesse) kategorisch auszuschließen, wurde die Kristallisation von Coffein aus wässriger Lösung *in situ* im akustischen Levitator verfolgt. Dabei vermindert der levitierte Tropfen innerhalb einer Stunde den Durchmesser von $1,7\ \text{mm}$ auf $0,2\ \text{mm}$ durch Verdunstung des Wassers. Der anfangs transparente Tropfen endet in einem kleinen weißen Rückstand mit der

berechneten (7×10^{-4} mol/L) zehnfachen Anfangskonzentration. Während dieser Transformation wurden 45 Streukurven gesammelt, mit einer Belichtungszeit von 40 s. Am Experimentende wurde die Belichtungszeit auf 120 s und 300 s erhöht, um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Zu Beginn der Levitation zeigen die Streukurven ausschließlich breite Streusignale, typisch für Wasser und keine Kristalle können für die ersten zwei Drittel der Diffraktogramme detektiert werden (Abb. 51). Die ersten Reflexe können der Ebene $\bar{1}20$ und 210 der Hochtemperatur- α -Modifikation von Coffein zugeordnet werden. Alle folgenden Streukurven zeigen das komplette Diffraktogramm von α -Coffein.

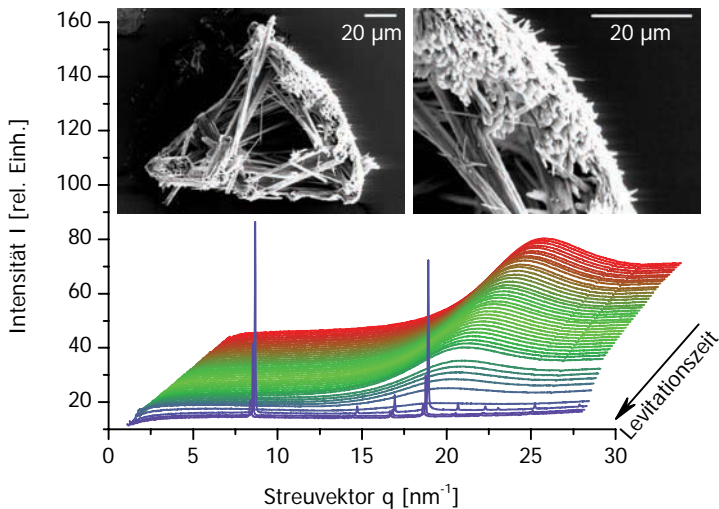


Abb. 51 Streukurven der Kristallisation von Coffein und REM am trockenen Rückstand.

Aufgenommene Debye-Scherrer-Ringe sind im Vergleich zu Messungen an Oberflächen sehr kontinuierlich (Abb. 52), was sich aus der langen zeitlichen Mittelung über die Streusignale erklärt. Während dieser Zeit rotiert und wackelt der Tropfen um seine Gleichgewichtsposition mit einer Unsicherheit von 20 µm. Da so auch wenige Kristalle aus Coffein detektierbar sind, verbessert der akustische Levitator die Qualität der Streubilder hin zu einem höheren Grad an Isotropie. Erstaunlicherweise kann keine andere Phase während des Experiments detektiert werden und der Kristallisationsprozess führt zu einer Monophase. Im Vergleich zu den Messungen an Oberflächen, verhindert offensichtlich die ständige Diffusion und Durchmischung eine kontinuierliche Keimbildung. Somit bilden sich keine Kristalle adäquater Größe für XRD. Der Prozess der Keimbildung wird unterdrückt, bis die Übersättigung im Tropfen einen kritischen Wert überschreitet und die Kristallisation für die komplette Probe schlagartig erfolgt. Ab diesem Punkt wird die Bildung der metastabilen Phase α -Coffein energetisch bevorzugt.

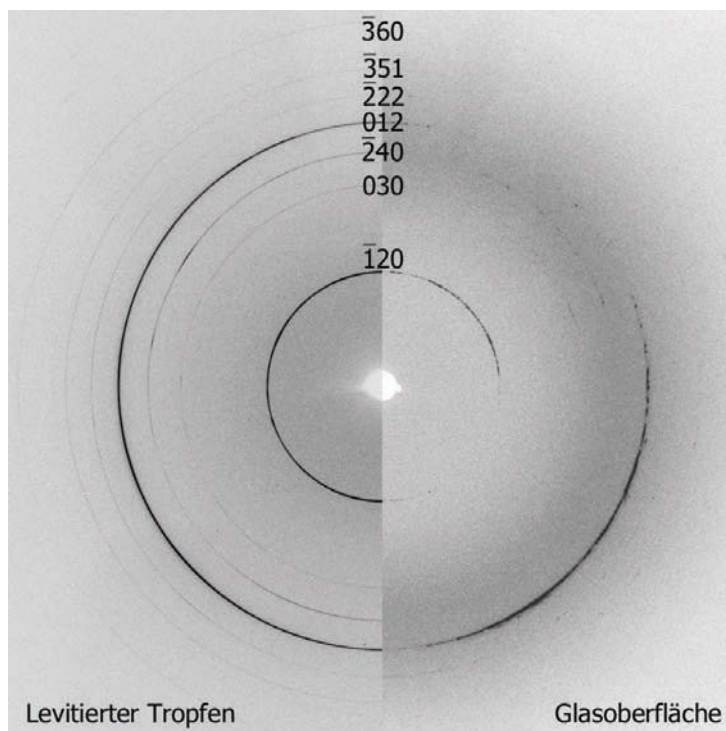


Abb. 52 Streubilder von Coffein in der Falle (links) und auf einer Glasoberfläche (rechts) mit Miller-Indices.

Die Auswertung der Reflexe erfolgte über die integrale Breite als gleichwertige Alternative zur Scherrer-Gleichung (vgl. 4.3.2). Die berechneten mittleren Kristallitgrößen sind $(41,2 \pm 1)$ nm (A), $(28,4 \pm 0,5)$ nm (B), (120 ± 5) nm (C) und $(46,2 \pm 1)$ nm für den akustischen Levitator. Die diversen Kristallitgrößen, bestimmt mit AFM, REM und XRD stimmen sowohl im Verhältnis als auch absolut untereinander überein. Die Kristallitgrößen außerhalb des Ringes (A) sind zwei- bis dreimal kleiner als die der einzelnen Nadel im Inneren (C) aber immer noch deutlich größer als die vom Rand des Ringes (B).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse das vorausgesetzte Modell der Kristallisation bekräftigen. Die Ergebnisse der visuellen Beobachtung werden sowohl durch XRD, AFM als auch REM unterstützt und vervollständigt. Oberflächen können nicht nur die kristalline Phase beeinflussen, sondern auch Vorzugsrichtungen des Kristallwachstums zur Folge haben. Der Übergang von einer anfangs 2D- zu einer 3D-Kristallisationsumgebung hilft die möglichen Einflüsse von Oberflächen klarzustellen. Akustische Levitation erlaubt somit eine geometrisch ungehinderte Kristallisation in alle drei Raumrichtungen. Die Prozesse bei der Aufkonzentration in der Falle sind entropiegesteuert und die Bildung von Solvaten konnte nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist die Ausbildung von Gleichgewichtskräften,

welche zu schnellem Auf- und Abbau verschiedener Modifikation führen, ohne einer Phase das Erreichen einer kritischen Masse zu erlauben, die für eine Detektion mittels Röntgenbeugung ausreicht. Entsprechend diesen Ergebnissen [176, 216, 245] verhindert die akustische Falle nicht nur Effekte fester Oberflächen, sondern dient auch als Werkzeug um den Kristallisationsprozess zu beeinflussen. So konnte in der Literatur der Einfluss der Scherspannung im akustisch levitierten Tropfen sowohl auf die Morphologie als auch die Korngrößenverteilung nach Fällung von CaCO_3 *ex situ* gezeigt werden. Hier wurden ausschließlich monophasische Produkte erzeugt und nur dehydratisierte Modifikationen detektiert.

Diese Untersuchungen sind die ersten *in situ* Studien der Kristallisation kleiner Moleküle in einem akustisch levitierten Tropfen mit Mikrofokus-Röntgenbeugung. Die Winkelauflösung ist dabei wesentlich höher als bei EDXD und erlaubt auch die eindeutige Zuordnung komplizierterer Phasen. So ist die deutliche Unterscheidung der Coffein-Modifikationen möglich. Zur Analyse noch größerer Strukturen, im Bereich einiger Nanometer, kann die Röntgenstreuung bei kleinsten Streuvektoren ausgewertet werden, womit sich der nächste Abschnitt befasst.

4.3.4 SAXS der Aggregation von Apoferritin und kolloidalem Gold

Der experimentelle Aufbau an der μ Spot-Beamline erlaubt den einfachen Wechsel zwischen SAXS und WAXS Messungen an derselben Probenumgebung (Abb. 36). Im Gegensatz zum WAXS, wo die Probengröße scharfe Bragg-Reflexe verbreitern kann, ist ihr Einfluss bei SAXS zu vernachlässigen. Auch kann die Energie spektral breiter verteilt sein, da keine scharfen Streusignale wie Braggreflexe zu erwarten sind. Durch den Multilayer-Monochromator erreicht man höhere Intensitäten, verliert aber die Möglichkeit der gleichzeitigen Aufnahme gut aufgelöster WAXS-Daten. SAXS liefert Informationen über die Größe und Form von Nanopartikeln, welche leicht aus den Streudaten extrahiert werden können, wenn alle Partikel im Streuvolumen die gleiche Größe, Form und Dichte haben (Monodispersität). Sind die Partikel heterogen (polydispers), erschwert sich die Auswertung überlappender Streukurven (beispielsweise [246]). Zur Kalibrierung der Beugungsexperimente wurde AgBeh (Silberbehenat, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOAg}$) als Standard verwendet [247], dass gut bekannte, äquidistante ($q = 1,08 \text{ nm}^{-1}$) Streusignale zeigt, wie Abb. 53 für Energien von 9, 12 und 15 keV zeigt. Nach der Beziehung in Abb. 21 ergeben sich aus den kleinsten Streuvektoren (Pfeile) maximale d -Werte im realen Raum von 52, 33 und 24 nm. Die Kurven sind nicht normiert und zeigen unter Beachtung eines kontinuierlichen Streuhintergrundes für $q < 0,4 \text{ nm}^{-1}$ einen Verlauf mit q^{-4} . Die unterschiedlichen Intensitäten lassen sich durch Parameter der Beamline erklären, wie die Lage der Blenden und Spiegel. Die Bindungsenergien liegen bei den Elementen von AgBeh deutlich unter 9 keV bzw. für die K-Schale von Ag bei 25,5 keV, so dass für Energien von 9–15 keV keine anormale Streuung in der Nähe der Absorptionskante (ASAXS) zu erwarten ist.

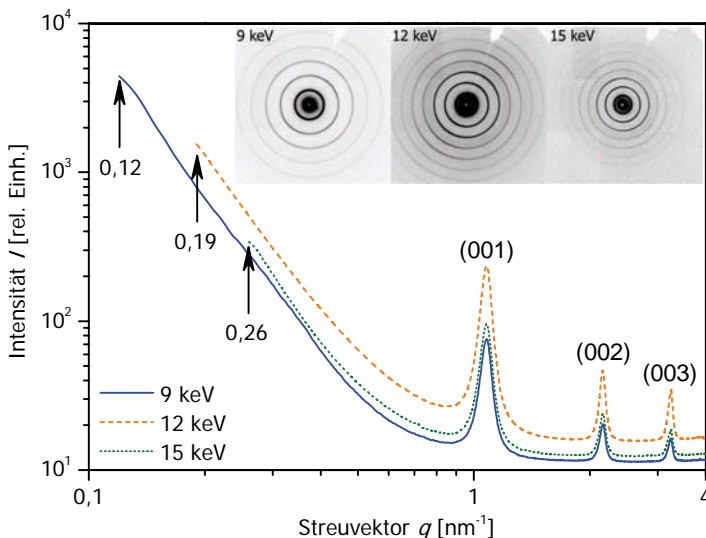


Abb. 53 Streubilder und gewonnene Streukurven von AgBeh bei verschiedenen Energien (9, 12 und 15 keV).

Ergänzend zur Beobachtung der Kristallisation kleiner Moleküle, soll geklärt werden, ob auch die Untersuchung nano-skaliertes Objekte im akustischen Levitator möglich ist. Globuläre Proteine sind für diese Fragestellung aufgrund ihrer natürlichen Monodispersität sehr gut geeignet und SAXS ist eine sensitive Methode zur Analyse von Proteinen in frühen Aggregationsstadien [248]. Apoferritin (Apo- griech. *apó* „entfernt von“, *ferri* aus lat. *ferrum* „dreiwertiges Eisen“) ist ein Protein ($M_W = 450\text{--}475\text{ kg/mol}$) vieler Lebewesen zur Speicherung von Eisen. Es ist aus 24 Peptiduntereinheiten, angeordnet in 432-Symmetrie, zusammengesetzt, welche durch nonkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind und eine Hohlkugel bilden (Innenradius 4 nm, Außenradius 6 nm). Jede Untereinheit besteht aus 174 Aminosäuren in 4-helikalen Bündeln und einer fünften Helix, die im 60° Winkel zur Bündelachse steht. Das hohlförmige Apoferritin kann zur Bildung von Ferritin bis zu 4500 Eisenatome als anorganischen Komplex (Eisen(III)-hydroxid-oxid mit Phosphatgruppen) aufnehmen [249]. Die Mobilisierung des Eisens erfordert seine Reduktion zur zweiwertigen Stufe, Fe(II), beispielsweise durch Vitamin C oder Ferrireduktase. Bei neutralem pH-Wert trägt Apoferritin eine negative Nettoladung, wodurch sich die hervorragende Wasserlöslichkeit erklärt [248]. Apoferritin (APO) der Pferdemiilz (CAS 9013-31-4, Sigma-Aldrich, München) als wässrige Lösung wurde in 0,15 mol/L Natriumchlorid gelöst. Nach der Filterung ($0,2\text{ }\mu\text{m}$) wurde das Salz dialysiert und durch destilliertes Wasser ersetzt.

Ein Tropfen Apoferritinlösung mit der Konzentration von 0,39 g/L und einem Volumen von $4,8\text{ }\mu\text{L}$ wurde direkt in den akustischen Levitator injiziert. Die einsetzende Verdunstung des Lösungsmittels (Wasser) vermindert kontinuierlich das Tropfenvolumen und erhöht somit die Konzentration von APO (Abb. 54). Die Konzentration steigt während der 36 min Levitationszeit von 40 g/L Apoferritin auf 1216 g/L und ergibt einen festen Rückstand (siehe REM in Abb. 54, rechts). Die entsprechend berechnete Dichte von 1216 g/cm^3 ist typisch für Proteine im festen Aggregatzustand [250].

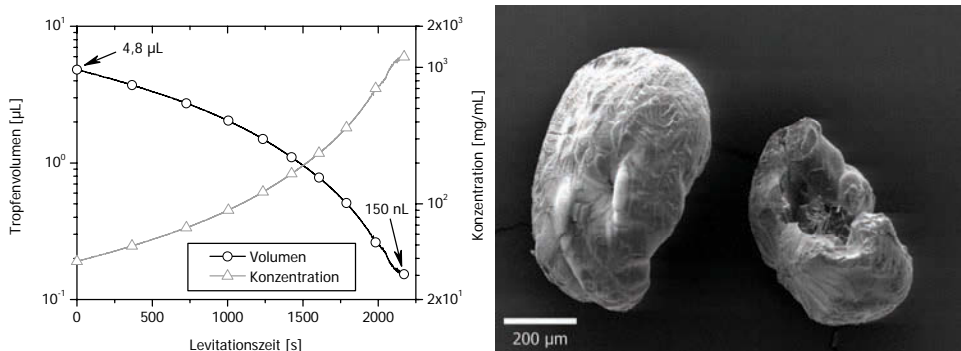


Abb. 54 Tropfenvolumen (Kreis) und entsprechende APO-Konzentration (Dreieck) als Funktion der Levitationszeit. Nur jeder 100ste Punkt ist mit einem Symbol markiert. Rechts: fester Rückstand im REM.

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Parallel zur Volumenmessung wurden Streukurven mit einem Strahldurchmesser von 100 μm , der Strahlenergie von 13,54 keV (Wellenlänge $\lambda = 0,09157 \text{ nm}$) und einer Bestrahlungszeit je Streubild von 60 s aufgenommen. Abb. 55 zeigt ausgewählte Streukurven des kontinuierlich verdunstenden Tropfens im Kleinwinkelbereich ($0,24 \text{ nm}^{-1} < q < 3 \text{ nm}^{-1}$). Das Strukturbild des APO Moleküls wurde auf der Basis des Eintrages 1IER der RCSB Proteindatenbank [251] mit MolMol [252] erstellt.

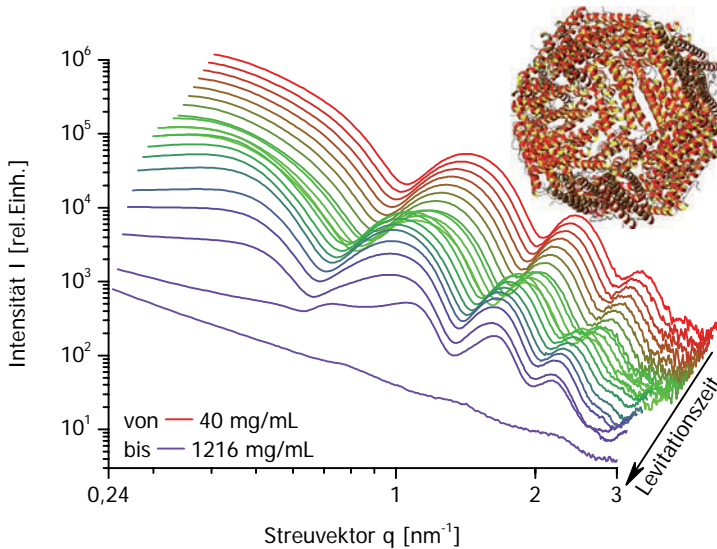


Abb. 55 Serie von SAXS-Kurven der Apoferritinlösung im levitierten Tropfen.

Die aufgenommene Intensität $I(q)$ ist als Produkt aus Formfaktor $P(q)$ und Strukturfaktor $S(q)$ zu verstehen (Formel 30, siehe auch Schema in Abb. 21).

$$I(q) = P(q) \times S(q) \quad (30)$$

Aufgrund der Übereinstimmung der ersten Streukurven (40 und 42 g/L, Abb. 56), ist die Konzentration gering genug, um den Strukturfaktor eins zu setzen. Somit ergibt sich der Formfaktor direkt aus der Streukurve. Dieser experimentell bestimmte Formfaktor stimmt sehr gut mit der simulierten Streukurve, basierend auf dem atomischen Modell aus 1IER, überein (gepunktete Kurve in Abb. 56). Dieser wurde mit MULTIBODY [148] aus mit den jeweiligen Atomkoordinaten des Proteins aus dem Datenbankeintrag berechnet.

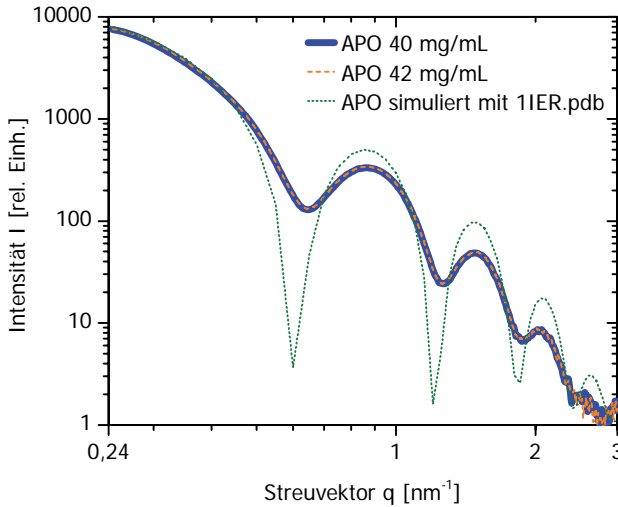


Abb. 56 Formfaktoren der Apoferritinlösung im levitierten Tropfen und der Simulation.

Ergänzend zu dieser Simulation, kann die Streukurve eines einfachen geometrischen Modells für einen Vergleich berechnet werden. Der Formfaktor $P(r)$ einer Hohlkugel ergibt sich in geschlossener Form [253] mit dem Volumen $V = (4\pi/3)r^3$ und der Dichte ρ zu

$$P(r) = \frac{1}{V_{Schale}} \left[\frac{3V_{Wasser}(\rho_{Wasser} - \rho_{Schale})j_1(qr_i)}{qr_i} + \frac{3V_{Schale}(\rho_{Schale} - \rho_{Wasser})j_1(qr_a)}{qr_a} \right]^2 \quad (31)$$

mit $j_1(x) = (\sin x - x \cos x) / x^2$. Die beste Anpassung dieses Kern-Schale-Modells gelingt mit IGOR [254] unter Benutzung der Algorithmen des NIST [255] und ergibt Werte von 3,7 nm und 6,1 nm für den Innen- (r_i) bzw. Außenradius (r_a), dargestellt in Abb. 57 (gepunktete Linie) im Vergleich zum experimentell bestimmten Formfaktor (Kreise für 50 logarithmisch äquidistante Punkte zur besseren Übersicht). Die Annahme einer polydispersen Verteilung (5 %) verfeinert das Modell weiter (kompakte Linie, Parameter in Tabelle 5).

Tabelle 5 Parameter und Fehler der Anpassung mit dem polydispersen Kern-Schale-Model.

Variable	Wert	Standardabweichung
Skalierungsfaktor	1,14	$2750, I_{\max} = 7525 \text{ cm}^{-1}$
Kernradius [nm]	3,78	0,0062
Schalendicke [nm]	2,33	0,0098
Polydispersität [%]	5	0,2
SLD Kern [nm^{-2}]	$1,02 \times 10^{-3}$	0,0657
SLD Schale [nm^{-2}]	$2,32 \times 10^{-3}$	0,0164
SLD Lösungsmittel (Å^{-2})	$9,34 \times 10^{-4}$	0, für Wasser gegeben
Untergrund (cm^{-1})	1	0, da festgelegt

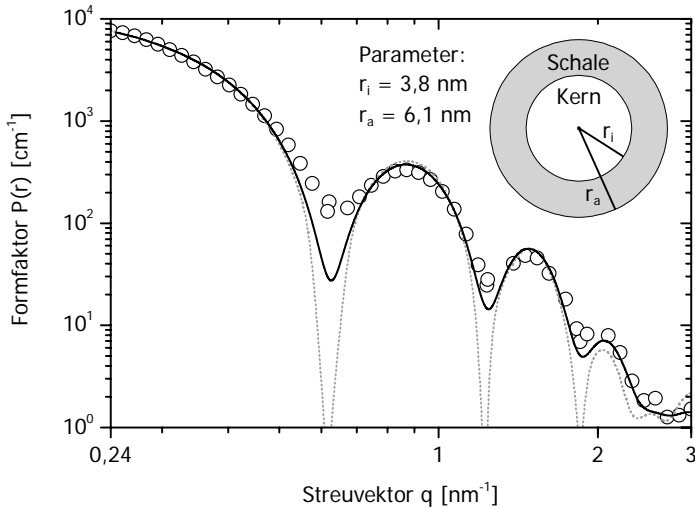


Abb. 57 Experimenteller (Kreise) und berechnete Formfaktoren mit monodisperser (Punkte) und polydisperser (Linie) Kern-Schale-Modell.

Gut sichtbar ist die gleiche Lage und Form aller Maxima. Auch stimmt der Streuvektor der Minima weitestgehend überein. Jedoch ist ideale Monodispersität und perfekte Kugelsymmetrie eine notwendige Voraussetzung für eine Streukurve mit scharfen Minima, welche experimentell nicht beobachtet wurde. Obgleich davon auszugehen ist, dass alle Proteine in der Probe die gleiche Struktur besitzen und monodispers sind, unterscheidet sich die gemessene zur berechneten Streukurve deutlich. Der Unterschied kann durch geringe Abweichungen der Elektronendichteverteilung des Proteins zum Schalenmodell erklärt werden. Diese Annahme erscheint berechtigt, weil APO aus 24 Untereinheiten besteht und keine ideale Hohlkugel bildet. Dem widerspricht allerdings die berechnete Streukurve aus dem atomischen Modell (Abb. 56, gepunktete Linie). Für eine Erklärung müssen „Verschmierungseffekte“ (Faltung) der vernachlässigbaren Apparaturparameter betrachtet werden. So ergeben sich für Streuvektoren $q < 7 \text{ nm}^{-1}$ eine Verbreitung dq der Streukurve aufgrund der Energiebreite ($\Delta E = 0,12 \text{ keV}$) kleiner $0,01 \text{ nm}^{-1}$, der Strahldivergenz ($\Delta 2\theta = 1 \text{ mrad}$) kleiner $0,06 \text{ nm}^{-1}$, der Strahlgröße ($100 \mu\text{m}$) kleiner $0,03 \text{ nm}^{-1}$ und der Probenausdehnung ($< 400 \mu\text{m}$) kleiner $dq < 0,01 \text{ nm}^{-1}$. Die Summe von $0,1 \text{ nm}^{-1}$ erklärt, warum die ersten Minima nicht so tief sind, aber aufgrund der logarithmischen Skala Kurvendetails bei großen Streuvektoren gut aufgelöst werden. Eine Entfaltung mit den q -abhängigen Einflüssen korrigiert die gemessene Streukurve.

Der Strukturfaktor von APO bei jeder Konzentration kann nach Formel 30 berechnet werden, durch die Division der zugehörigen Streukurve mit dem Formfaktor (Abb. 56). Für geringste Konzentration ergibt sich ein Strukturfaktor von eins, denn die räumlichen Abstände zwischen den

einzelnen Proteinen sind groß genug, so dass sich keine Interaktionen auswirken. Für höhere Konzentrationen oszilliert der Strukturfaktor um eins und konvergiert letztlich gegen eins für große Werte des Streuvektors q . Die Wechselwirkung kann nun direkt aus der Anpassung berechneter Strukturfaktoren für verschiedene Potentiale erfolgen.

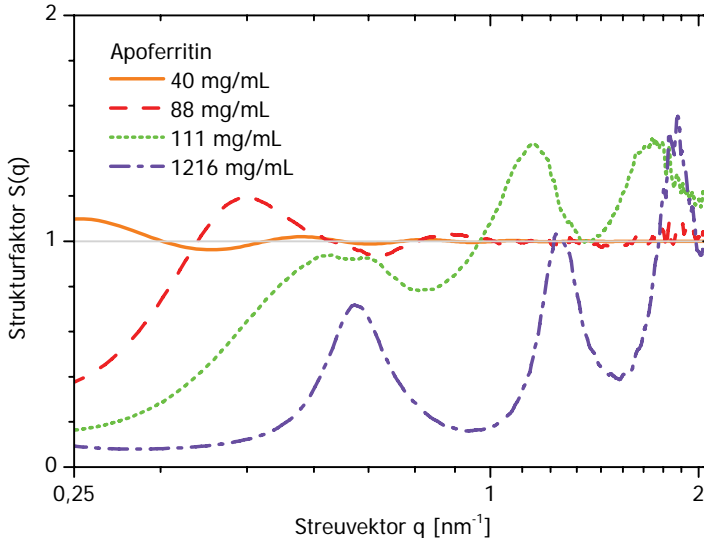


Abb. 58 Die Änderung des Strukturfaktors von APO mit zunehmender Konzentration.

Zusammenfassend wurde während der Aggregation durch Konzentrationserhöhung in situ Formfaktor und konzentrationsabhängige Strukturfaktoren am selben, akustisch levitierten Tropfen bestimmt. Die bestimmten Modellparameter stimmen mit Literaturwerten nicht nur sehr gut überein, sondern zeigen auch kleinere Unsicherheiten und die ermittelten Strukturfaktoren erstrecken sich über einen größeren q -Bereich [248]. Das zeigt sich auch an einem vergleichbarem Modell, dem Tabakmosaikvirus als weiteres Beispiel für eine Hohlkugel.

Zur Ergänzung zu Proteinen wie APO als repräsentative, gut definierte, organische Nanopartikel wurden größere, anorganische Nanopartikel untersucht. Goldpartikel sind mit kleiner Polydispersität in wässriger Lösung dafür geeignet und Gegenstand aktueller Forschung, beispielsweise für den Einsatz als Referenzmaterial in der analytischen Chemie. Goldnanopartikel (NanopartsTM, Salt Lake City) wurden in einer fertig präparierten wässrigen Lösung bezogen, die nach Herstellerangaben $1,2 \times 10^{11}$ Nanopartikeln pro Milliliter enthält. Die Stoffmengenkonzentration (Molarität) der stabilisierten Nanopartikel, berechnet aus der Partikelanzahl pro Liter, dividiert durch die Avogadro-Zahl, ist $0,2 \times 10^{-6}$ mol/L. Die Lösung zeigt ein Maximum im Absorptionsspektrum bei $\lambda = 525$ nm und eine optische Dichte von ungefähr 0,5 für diese Wellenlänge. In Abb. 59 ist die Streukurve und eine Photographie des levitierten Tropfens im akustischen Levitator dargestellt. Die rote Tropfenfarbe ist gut bekannt und entsteht aufgrund von Plasmonresonanz auf

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

der Oberfläche der Goldnanopartikel, deren Wellenlänge nach Formel 32 direkt mit der Lage des Absorptionsmaxima korreliert.

$$E_p = \hbar \sqrt{\frac{ne^2}{m\varepsilon_0}} = \hbar\omega_p = \frac{h}{2\pi} w_p \quad (32)$$

Die experimentelle Streukurve besitzt den typischen abfallenden Verlauf mit deutlichen Oszillationen einer Kugel-Streuung und hat einen weiten Porod-Bereich für große q -Werte. Die gepunktete Gerade in Abb. 59 zeigt die Skalierung der Streuintensität bei großen Streuvektoren entsprechend dem Porod-Gesetz $I(q) \sim q^{-4}$, was den scharfen Dichtekontrast zwischen den Goldnanopartikeln und der sie umgebenden Lösung beweist. An die Messkurve wurden Streufunktionen monodisperser und polydisperser Kugeln angepasst (gestrichelte und kompakte Linie in Abb. 59). Die Anpassung mit dem Modell polydisperser Kugeln (durchgezogene Linie) gelingt ausgezeichnet und bestätigt nahezu perfekt monodisperse Kugeln mit einem mittleren Radius von $(15,9 \pm 0,1)$ nm. Die Polydispersität aufgrund der SAXS-Daten ist kleiner als 5 % und wahrscheinlich noch wesentlich geringer, kann aber aufgrund der Verschmierung durch die Apparatefunktion nicht besser aufgelöst werden. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den Daten der dynamischen Lichtstreuung (DLS) und Transmissions-Elektronen Mikroskopie (TEM). Der mittlere hydrodynamische Radius (DLS) wurde auf $(18,4 \pm 0,3)$ nm mit einem PDI von 0,05 bestimmt. Der mittlere Radius (TEM), angegeben vom Hersteller, beträgt $(15,2 \pm 0,7)$ nm mit einer geringen Polydispersität, ausgedrückt in einer Gaußverteilung mit der Breite $\sigma < 0,23$ nm (1,5 %).

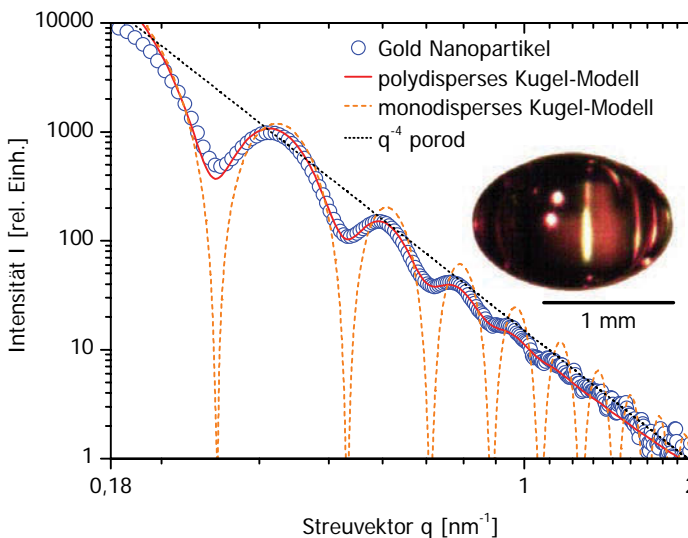


Abb. 59 Streukurve von kolloidalem Gold in wässriger Lösung (Kreise) und Anpassung monodisperser (gestrichelte Linie) bzw. polydisperser (kompakte Linie) Kugeln. Das Photo zeigt deutlich die rote Farbe der kolloidalen Goldlösung im Tropfen.

Das Zetapotential wurde zu $-30,8$ mV, die Mobilität zu $-2,2 \mu\text{m}\times\text{cm}/\text{Vs}$ und die Leitfähigkeit zu $0,98$ mS/cm bestimmt, was auf eine sehr gute Stabilisierung der Nanopartikel hinweist. In der folgenden Abb. 60 sind die Korrelationsfunktion und die Größenverteilung über einer logarithmischen Skala dargestellt.

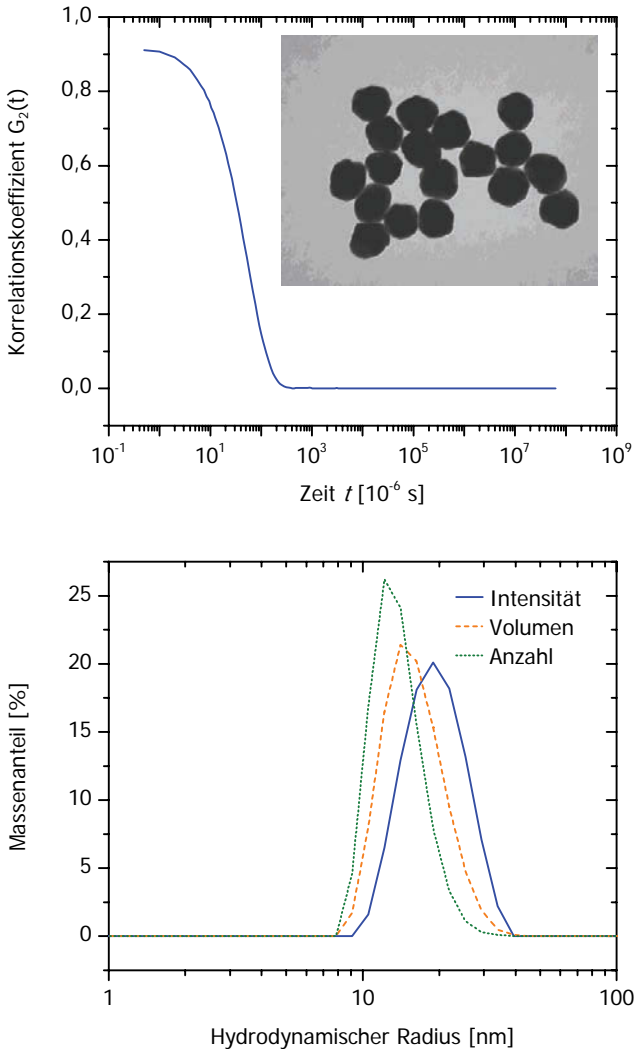


Abb. 60 Typische TEM-Aufnahme sowie Korrelationsfunktion und Größenverteilung der Goldnanopartikel in der DLS.

Der z-Average von $36,7$ nm, als mittlerer hydrodynamischer Durchmesser, gewichtet mit dem Volumen, ist einige Nanometer größer als der mikroskopisch ermittelte Durchmesser im TEM und aus SAXS bestimmte Durchmesser von $31,8$ nm. Das kann durch die verwendete organische Schicht auf den Goldpartikeln erklärt werden, welche keinen signifikanten Kontrast weder im TEM

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

noch SAXS zeigt, wohl aber die Diffusionsgeschwindigkeit reduzieren und somit den hydrodynamischen Radius der stabilisierten Nanopartikel vergrößern. Unter Verwendung des Durchmessers, der bekannten Dichte von Gold (19320 kg/m^3) und einer angenommenen globulären Struktur, kann die Konzentration zu $37,73 \text{ mg Gold pro Liter Lösung}$ berechnet werden. Die Messung der mittleren Lösungsdichte erfolgte mit dem Dichteschwinger DMA 5000 (Anton Paar) mit einer Genauigkeit von $5 \times 10^{-5} \text{ g/L}$ und ergibt einen Wert von $0,998897 \text{ g/L}$. Unter Annahme der Dichte von Wasser bei 20°C zu $0,9982 \text{ g/L}$ verbleibt der Anteil von Gold zu $37,97 \text{ mg/L}$. Die gute Übereinstimmung (99,3 %) der gemessenen mit der berechneten Dichte beweist erneut die globuläre Struktur der Goldnanopartikel.

Diesen Ergebnissen folgend, scheint die Analyse des Interaktionspotentials zwischen den einzelnen Goldnanopartikeln mit dem Percus–Yevick–Modell [256] möglich. Im levitierten Tropfen lässt sich dazu der Partikel-Partikel-Abstand der Goldteilchen aufgrund der Verdunstung des Lösungsmittels (Wasser) kontinuierlich verringern. Die aktuelle Konzentration bestimmt sich *in situ* durch die Messung des Tropfenschattens im IR zur Volumenbestimmung und bekannter Anfangskonzentration (siehe Abschnitt 4.1). Der typische Verlauf des ermittelten Tropfenvolumens und der daraus berechneten Konzentration sind in Abb. 61, Oberfläche und Exzentrizität in Abb. 62 dargestellt.

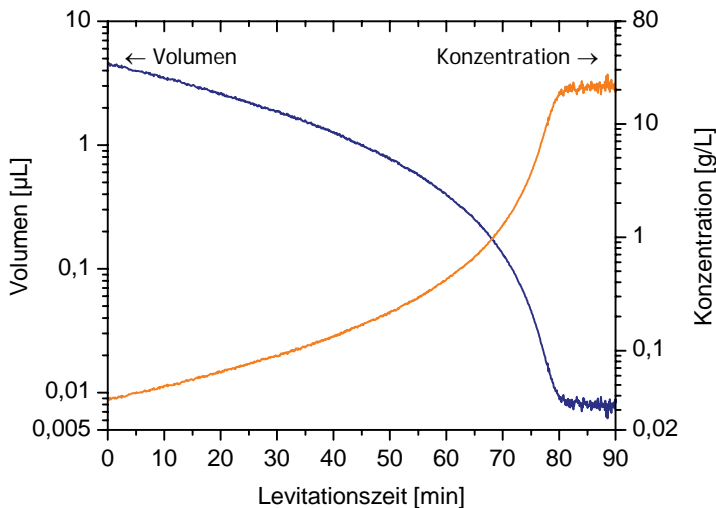


Abb. 61 Verlauf des Tropfenvolumens und der daraus berechneten Konzentration des verdunstenden Tropfens.

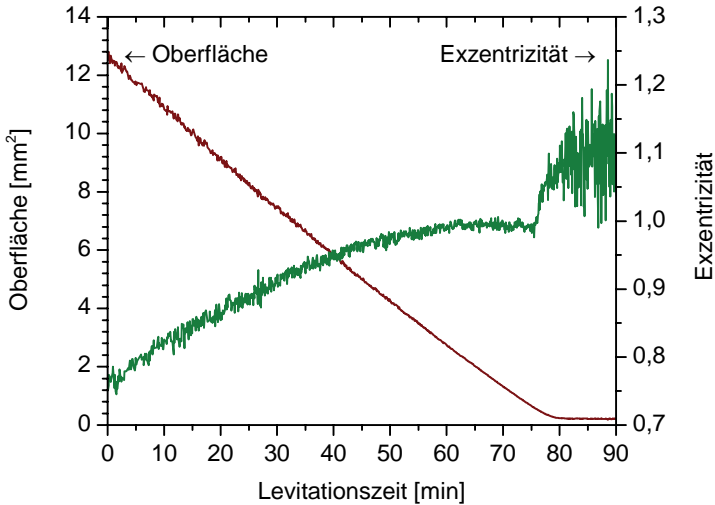


Abb. 62 Verlauf der Oberfläche und Exzentrizität des verdunstenden Tropfens.

Es bleibt zu klären, ob es sich bei dem kolloidalen Gold um Nanopartikel mit amorpher oder kristalliner Struktur handelt. Zur Antwort kann die Größe der kristallinen Bereiche im Vergleich zur Partikelgröße ausgewertet werden. Dazu wurden simultan zur Tropfenverdunstung Streusignale im Weitwinkelbereich aufgenommen (Abb. 63, oben). Diese zeigen zu Beginn das typische Streusignal eines wässrigen Tropfens, welches mit fortschreitender Levitationszeit stetig an Intensität verliert. Nach 20 min tauchen auf der Schulter der Streukurve deutliche, lokale Maxima auf und die Konzentration des Goldtropfens lässt sich zu diesem Zeitpunkt auf 0,2 mg/L bestimmen. Die Datenauswertung der WAXS von $25 \text{ nm}^{-1} < q < 32 \text{ nm}^{-1}$ ergibt typische Beugungssignale, welche Bragg-Reflexen von Gold entsprechen und mit denen anderer Goldproben vergleichbar sind [257]. Diese Reflexe werden im weiteren Verlauf der Verdunstung immer deutlicher und sind zusammen mit den indizierten Gold-Reflexen aus der Datenbank (Abb. 63, unten) dargestellt. Aus der integralen Breite B_{int} der Reflexe kann unter minimalen Annahmen der Wert für die mittlere Kristallitgröße D_{hkl} bestimmt werden zu:

$$D_{hkl} = \frac{2\pi}{B_{int}} = 10,9 \text{ nm} . \quad (33)$$

Unter Beachtung der vernachlässigbaren apparativen Verbreiterung in diesem Bereich und durch Vergleichsmessung wesentlich größerer Kristallite von Korund ergibt sich eine Kristallitgröße definitiv kleiner als der bestimmte Partikeldurchmesser. Somit kann der Goldnanopartikel nicht nur aus einer einzigen kristallinen Domäne bestehen, was durch die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Aufnahmen mit atomarer Auflösung noch gestützt wird [257]. Es handelt sich somit um polykristalline Nanokristalle. Ein Nanopartikel besteht im Mittel aus etwa neun Kristalliten. Diese

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Abschätzung setzt voraus, dass die Packungsordnung der Goldatome im Kristallit nicht wesentlich gestört ist.

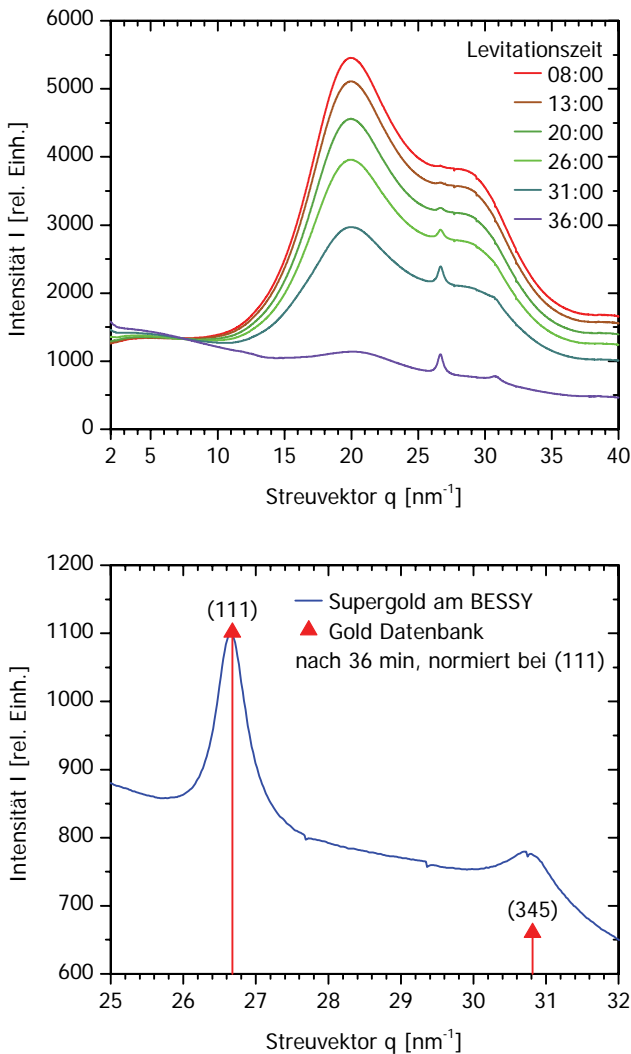


Abb. 63 Änderung der Streukurven als Funktion der Levitationszeit (oben) und Vergleich der Beugungsreflexe mit Datenbankdaten von Gold (unten).

Eine detaillierte Dateninterpretation zu den Interaktionen von Proteinen und Nanopartikeln hoher Konzentrationen ist das Thema zukünftiger Arbeiten. Das wird mit dem Vergleich des einfachen Percus-Yevick-Modells (harte Kugeln) [258] beginnen und durch komplexere Interaktionspotentiale, wie das Yukawa-Potential [259] fortgesetzt werden. Dazu sind effektive Methoden zur Berechnung des Inter-Partikel-Strukturfaktors in einfachen Flüssigkeiten mit dem 2-Yukawa-Potential vorhanden [260]. Zusätzliche Substanzen zur Untersuchung der Agglomeration könnten

sowohl weitere Proteine (Amyloid, Lysozym, Albumin und Fibrinogen) als auch pharmazeutische Mittel (Cyclosporine und all-trans-Retinoesäure) sein. Die Kristallisation von Proteinen, am Beispiel von Lysozym und Thaumatin konnte nach tagelanger Levitation schon 1998 gezeigt werden [261], die zeitaufgelöste Beobachtung bleibt aber ein ehrgeiziges Ziel. Im derzeitigen Stand kann der Vorteil der hohen Datenqualität des Aufbaus festgehalten werden. Das ist an kleinen Signal-Rausch-Verhältnissen über einen weiten Bereich des Streuvektors sichtbar, das eine detailliertere Interpretation der Daten im Vergleich zu konventionellen festen Probenhaltern zulässt [262]. Das Studium der Interpartikelwechselwirkungen erfolgte ebenso kontinuierlich in nur einem Experiment mit minimalem Einsatz an Probenmenge. Die Kombination von *in situ* Synchrotron-SAXS/WAXS mit einem akustischen Levitator wurde erstmals zur Strukturanalyse verwendet [245].

Neben der Analyse bestehender Goldnanopartikel liefert die Charakterisierung der Vorgänge bei ihrer Entstehung interessante Einblicke in den Wachstumsprozess. Zu diesem Zweck eignet sich mit XRF nicht nur eine Elementspezifische Methode, sondern liefert XANES auch Informationen über den Oxidationszustand. Die ersten Ergebnisse zur Kopplung mit dem akustischen Levitator, werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

4.3.5 XANES an der Synthese von Goldnanopartikeln

Die Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (NEXAFS oder XANES) erfasst unbesetzte Elektronen-Zustände. Die Kopplung mit Röntgenstreuung an akustisch levitierten Proben ist eine interessante Herausforderung. Sie soll technisch durch die zeitgleiche Aufnahme von Röntgenfluoreszenz und Streuung sichergestellt werden, ohne dass sich beide Methoden z. B. durch unterschiedliche Bestrahlungsintervalle stören. XANES wurde an der μ Spot Beamline mit einem Kristallmonochromator, für variable Strahlungsenergie, gemessen.

Mit einem Fluoreszenzdetektor (KETEK, Model AXAS) ließ sich in einem Abstand von ca. 30 mm ausreichend Signalintensität aufnehmen (ca. 5×10^3 Impulse im Bereich $E = 9,1\text{--}10,2$ keV). Der Winkel zum einfallenden Strahl wurde auf 90° optimiert, da bei kleineren Winkeln das Streusignal zu groß war und keine Detektion auswertbarer Fluoreszenz erlaubte. Zur Justierung erwies sich die gleiche Höhe des Fluoreszenzdetektors zur levitierten Probe als günstig, um den Detektor auf der Achse zum Tropfen, parallel zum optischen Tisch, zu verschieben. Die Anregungsenergie wurde über die L_{III} -Kante von Gold (11,92 keV) gefahren. Das gelang durch Änderung des Bragg-Winkels um $0,08^\circ$, das Energien von 11,85–11,95 keV entspricht. Zur Auswertung der aufgenommenen Röntgenfluoreszenz wurde über die L_{α_1} -Bande (9,713 keV, 3182 Impulse) und schwächere L_{α_2} -Bande (9,628 keV, 192 Impulse) also Intensitäten für 9–10,37 keV integriert und das Verfahren für 100 verschiedene Energien wiederholt. Während des so genannten

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Energie-Scans über die Kante verringert sich das Fluoreszenzsignal, bis es fast verschwindet. Es ist deutlich sichtbar, dass keine anderen Signale, z. B. vom Platin, das ähnliche Energien zeigt, aufgenommen wurden.

Ein wässriger Tropfen mit kolloidalen Goldnanopartikeln zeigt im akustischen Levitator ein typisches XANES-Spektrum elementaren Goldes und das bekannte SAXS-Signal relativ monodisperser Kugeln (Abb. 65). Das XANES-Spektrum der Goldsalzlösung ($\text{HAuCl}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$) unterscheidet sich deutlich in der Lage der Absorptionskante und einem nah gelegenen Maximum. Die SAXS-Kurve entspricht einer Konstante und beweist, dass keine Agglomerate vorhanden sind. Durch die Zugabe von Vitamin C ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, L(+)-Ascorbinsäure, reinst, Merck H486374 403) und PVA (Polyvinylacetat) zur Goldsalzlösung im Verhältnis 5:2:5 wurde das Gold reduziert und bildet Nanopartikel (Spezifikation [263]). Diese sind sofort in einer typischen Rotfärbung des Tropfens als solche zu erkennen. Die SAXS-Kurve kann am besten durch das Modell polydisperser Kugeln mit einem Radius (7 ± 1) nm angepasst werden (PHS, Abb. 64). Das XANES-Spektrum ist deutlich verschieden zu dem von Goldsalz, stimmt aber weitgehend mit dem elementaren Goldes überein (Abb. 65).

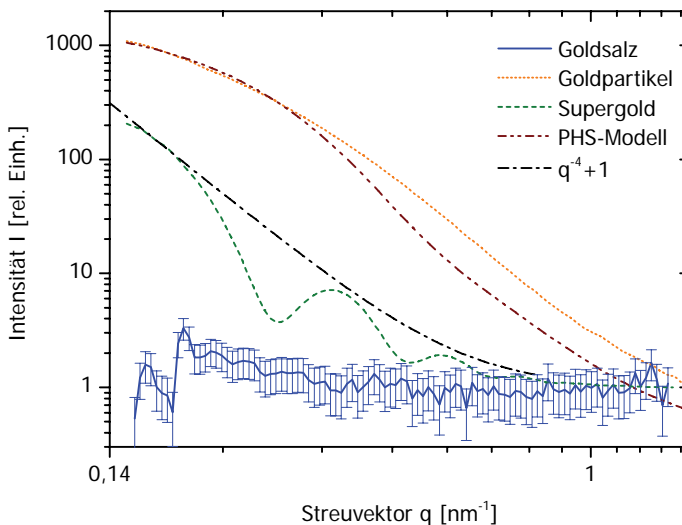


Abb. 64 SAXS Daten der Synthese von Goldnanopartikeln.

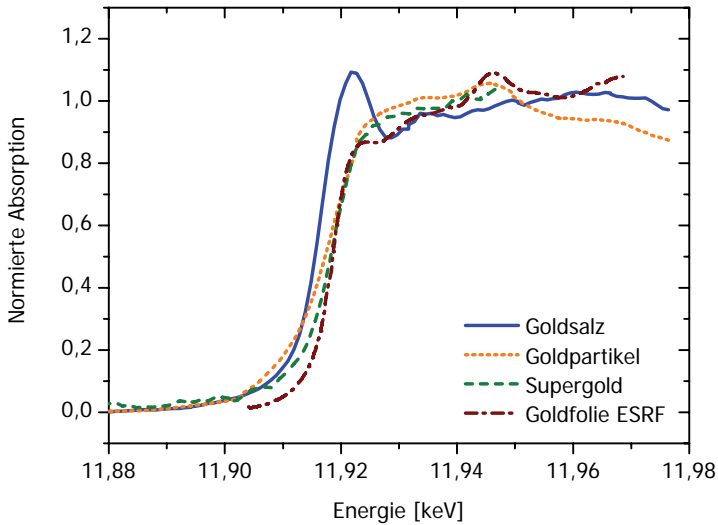


Abb. 65 XANES Daten der Synthese von Goldnanopartikeln einer Goldfolie [264] im Vergleich.

Die Entstehung von Goldnanopartikeln in einem wässrigen Tropfen kann parallel mit XANES und SAXS beobachtet werden. Die Änderung der Energie für XANES während der Aufnahme von Kleinwinkelstreudaten wirkt sich nur minimal auf das Streusignal aus und zeigt keine signifikanten Änderungen in der Streukurve. Durch die Verdunstung des Lösungsmittels erhöhte sich kontinuierlich die Analytkonzentration im Tropfen, was zu einer größeren Fluoreszenzintensität führt. Geringe Integrationszeiten von 2 s pro Scan minimieren Fehler durch Zunahme der Analytkonzentration während des Energiescans. Für eine ausreichende Zählrate wurde so oft wie möglich die Kante abgefahren und die Spektren für die Auswertung summiert. Für eine zeitaufgelöste Verfolgung dieser Synthese von Goldnanopartikeln im Sekundenbereich ist der Aufbau nicht geeignet. Sehr wohl scheint die *in situ* Beobachtung für Experimente mit einer längeren Reaktionsdauer sehr gut möglich. Die Möglichkeit der kontinuierlichen Lösungsmittelzugabe durch Piezospritzen ist vorteilhaft. So kann der Verlust durch Verdunstung ausgeglichen werden, was eine konstante Probenmenge im bestrahlten Volumen erreicht.

4.4 *Konzentrationsabhängige Fluoreszenzspektroskopie*

Analytische Methoden, basierend auf spektroskopischen Techniken, sind ausreichend sensitiv zur Analyse kleinster Probenmengen. Miniaturisierte Systeme (z. B. analytische Mikrochips) zeigen oft optische Interferenz mit den Chipoberflächen und unspezifische Analytadsorption an den Grenzflächen, welche die Zuverlässigkeit des Detektionssignals bestimmen [265]. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, werden durch akustische Levitation solche Nachteile umgangen und unerwünschte Hintergrundsignale, aufgrund gestreuter Anregungsstrahlung oder Autofluoreszenz vom Probencontainer selbst, vermieden.

4.4.1 *Optische Spektroskopie am Tropfen*

Optische Spektroskopie eignet sich zur Kopplung mit der akustischen Falle und zur Untersuchung kleiner levitierter Objekte. Dementsprechend basieren die meisten Studien, die akustische Levitation in der analytischen Chemie verwenden, auf optischer Detektion. Neben UV/VIS Spektralphotometrie [162, 266] und Ramanspektroskopie [170, 266, 267] ist Lumineszenzspektroskopie ein besonders geeignetes Werkzeug. Als fluoreszierende Reportermoleküle dienen sowohl organische Farbstoffe wie Pyren [268], Fluorescein [60] und Rhodamin B [269] als auch anorganische fluoreszierende Komposite [60, 270], wie Seltenerd-Emitter [271, 272] oder nanokristalline Quantenpunkte (Quantendots, engl. *quantum dots*) [273]. Um das Potential der Fluorimetrie mit Detektionslimits im Einzelmolekülbereich vollständig auszunutzen, werden hauptsächlich Techniken der laserinduzierten Fluoreszenz benutzt [274]. Neben außerordentlicher Sensitivität ist die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie auch die Methode der Wahl, um detaillierte Informationen über morphologische und physikalische Parameter (z. B. Temperatur) von levitierten Tropfen flüssiger Proben während der Analyse zu erhalten [271, 272, 275].

Als eine Eigenschaft levitierter flüssiger Proben erhöht die kontinuierliche Lösungsmittelverdunstung die Analytkonzentration im Tropfen (siehe Abschnitt 4.1) und erlaubt das Studium konzentrations- und damit abstandsabhängiger Effekte, wie z. B. Energietransfer und Löschung der Fluoreszenz. Das Interesse dieser Arbeit zur Anwendung von Fluoreszenzspektroskopie an akustisch levitierten Tropfen liegt hauptsächlich im Studium konzentrationsabhängiger Phänomene an Proben, die Fluorophore enthalten. Dazu wurden Änderungen im Fluoreszenzverhalten (Intensität und Bandenform) levitierter Lösungen von Fluorescein und einem Kern-Schale Nanokristall (CdSe-ZnS) untersucht.

Zur homogenen Beleuchtung des Tropfens dient ein durchstimmbarer Argon-Ionen-Laser (35LAP431-230, Melles Griot) mit konstanter Intensität über den Strahldurchmesser von ca. 5 mm. Das Fluoreszenzsignal des deutlich kleineren levitierten Tropfens wird im rechten Winkel zum

Anregungsstrahl detektiert. Das verwendete Spektrometer (QE65000, OceanOptics) ist eine Kombination aus einem hochempfindlichen Flächendetektor (back-thinned, 1024×58 Pixel, je $24 \times 24 \mu\text{m}$) und einer kompakten optischen Bank, was hohe Empfindlichkeit (Quanteneffizienz bis zu 90 %) und gute Auflösung (16 Bit) über einen Wellenlängenbereich von 200–1100 nm bietet. Der gekühlte Detektor (Peltierelement, 30°C unter Umgebungstemperatur) ermöglicht Integrationszeiten ab 7 ms bei einem Signal-Rauschverhältnis von 1200:1. Die USB-Verbindung mit dem Messrechner erlaubt die zeitgesteuerte Aufnahme von Raman- und Fluoreszenzspektren. Die Ankopplung des Spektrometers ans Experiment erfolgt über ein Glasfaserkabel mit spaltförmigem Profil, das in einem runden Querschnitt endet. Auf diesen wird über eine Transmissionsoptik der levitierte Tropfen abgebildet.

Die zunehmende Analytkonzentration im verdunstenden Tropfen wird zu jedem Zeitpunkt im Experiment aus der kontinuierlichen Messung des Tropfenvolumens bestimmt (4.1). Aus der Konzentration kann zur Untersuchung abstandsabhängiger Phänomene der mittlere Interpartikel-Abstand d_m als $d_m = 1/\sqrt[3]{N}$ genähert werden, wobei N die Anzahl der Partikel pro Volumeneinheit ist. Der mathematischen Betrachtung für Punkte bekannter Verteilungsdichte von Hertz aus dem Jahr 1908 folgend [276], ergibt sich ein mittlerer Abstand fast halber Größe:

$$d_m = \frac{5}{9} \frac{1}{\sqrt[3]{N}}. \quad (34)$$

4.4.2 Fluoreszenz organischer Farbstoffe in Lösung

Fluorescein-Derivate gehören aufgrund ihrer hohen molaren Absorptionskoeffizienten und Fluoreszenz-Quantenausbeuten zu den am meist verwendeten traditionellen Fluoreszenzfarbstoffen. Allerdings sind ihr Absorptions- und Fluoreszenzverhalten kritisch vom pH-Wert abhängig [277] und sie sind bekannt an Oberflächen zu adsorbieren, wahrscheinlich der Dimerisierung⁵ unterliegend [278]. Um den Einfluss der Probenhandhabungstechnik auf das konzentrationsabhängige Emissionssignal eines organischen Farbstoffes zu studieren, müssen alle potentiellen Nachteile beachtet werden. Das pH-Problem kann mit kontrollierter basischer Umgebungsbedingung in Natronlauge (z. B. 0,1 mol/L NaOH) umgangen werden, um das Fluorescein im monomeren, dianionischem Zustand zu halten, so dass Selbstaggregation in wässriger Lösung in submillimolaren Konzentrationen vermieden wird. Nachteile aufgrund fester Oberflächen werden durch die Natur der kontaktlosen Probenpositionierung vermieden.

⁵ Bildung von Dimeren, als Vereinigung von zwei gleichen Molekülen zu einer größeren Einheit.

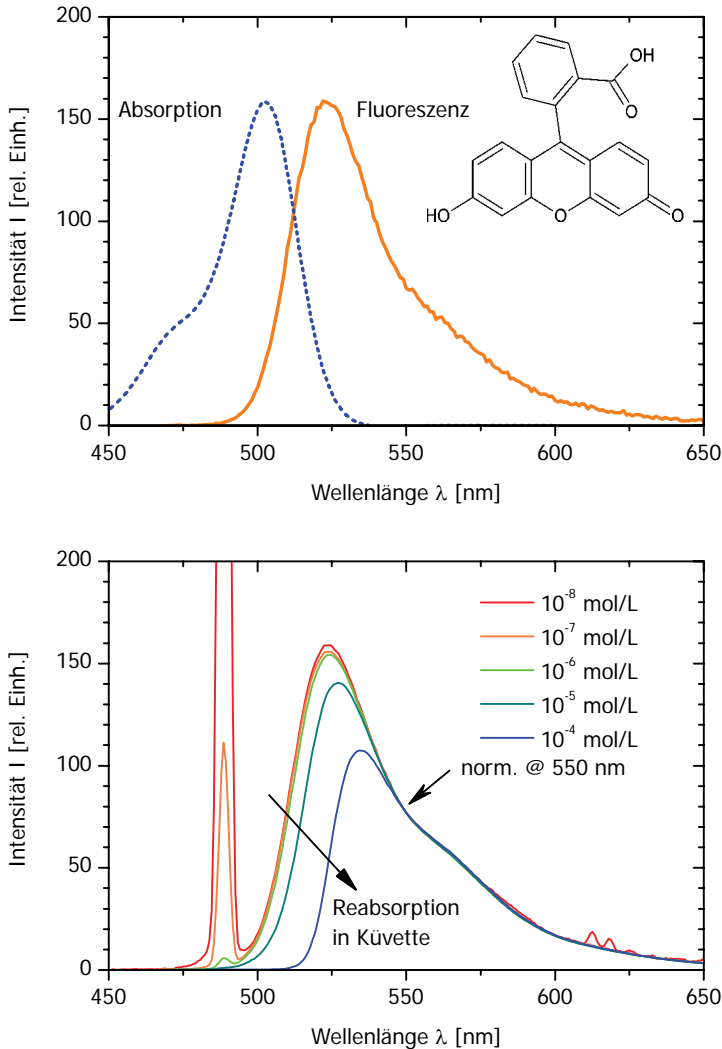


Abb. 66 Normierte Absorption und Fluoreszenz von Fluorescein bei 10^{-6} mol/L (oben) und Fluoreszenzspektren als Funktion der Konzentration (unten).

Abb. 66 zeigt die spektroskopische Charakteristik verdünnter Fluorescein-Lösungen und den dramatischen Effekt der Reabsorption auf das Fluoreszenzspektrum für erhöhte Farbstoffkonzentration in einer konventionellen 10-mm-Küvette. Während der Konzentrationserhöhung von 10^{-9} auf 10^{-4} mol/L ändert sich die Form des Spektrums signifikant, wobei sich das Maximum um 13 nm zu größeren Wellenlängen verschiebt und an Intensität abnimmt. Die Fluoreszenzspektren (Abb. 66, unten) wurden bei 550 nm normiert, wo die Emission nicht von Reabsorption gestört wird, weil Fluorescein bei Wellenlängen größer 540 nm nicht absorbiert (Abb. 66, oben). Die Anregung erfolgte mit einer Wellenlänge von 488 nm.

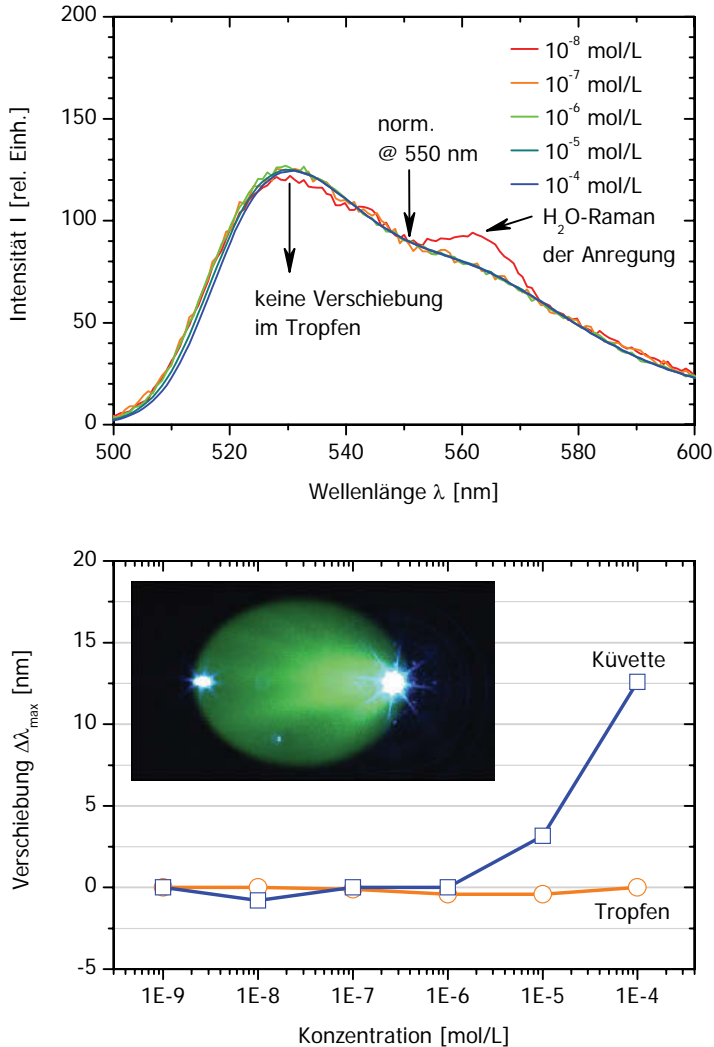


Abb. 67 Fluoreszenzspektren für Fluorescein als Funktion der Konzentration im akustischen Levitator (oben). Lage des Emissionsmaximums als Funktion der Farbstoffkonzentration (unten) in 10 mm-Küvette (Quadrate) und levitiertem Tropfen (Kreise). Einsatz: Tropfen unter Bestrahlung mit blauem Laser.

Abb. 67 vergleicht die Ergebnisse konzentrationsabhängiger Messungen in einer Küvette mit denen im levitierten Tropfen. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei gleicher Wellenlänge wie in der Küvette ($\lambda = 488$ nm), wobei der Primärstrahl hauptsächlich am Äquator nahe der Oberfläche gestreut wird. Während Reabsorptionseffekte (3.8) für Konzentrationen größer 10^{-6} mol/L in Küvette zu einer deutlichen Verschiebung des Emissionsmaximums führen, kann keine Wellenlängenverschiebung im levitierten Tropfen für erhöhte Farbstoffkonzentrationen bis zu 10^{-4} mol/L

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

erkannt werden. Somit sind Messungen solcher hoher Farbstoffkonzentrationen unbeeinflusst vom Inner-Filter Effekt, wenn akustische Levitatoren als Probenhalter benutzt werden.

4.4.3 Fluoreszenz nanokristalliner Quantendots in Lösung

Quantendots gewinnen stark an Bedeutung in bildgebenden Anwendungen, welche für Marker signifikant größer als Moleküle geeignet sind [279]. Halbleiter-Nanokristalle sind nahezu kugelförmig mit einem Durchmesser von 2–10 nm. Sie bestehen typischerweise aus einem lumineszierenden Kern mit kleiner Bandlücke, einer Schutzhülle weniger Moleküllagen mit großer Bandlücke und organischen Liganden auf der Oberfläche, welche die Löslichkeit der Partikel gewährleistet. Generell zeigen Nanokristalle ein breites Absorptionsspektrum und ein schmales, symmetrisches, praktisch Gauss-förmiges Emissionsspektrum. Die spektrale Position der Emission und die kleinste Wellenlänge der Absorptionsbande kann über die (präparationskontrollierte) Partikelgröße eingestellt werden. Für steigende Partikeldurchmesser verschieben sich Fluoreszenz- und Absorptionsbande zu größeren Wellenlängen. Die Breite des Emissionsspektrums ist von der Breite der Teilchengrößenverteilung abhängig (Abb. 69). Die Absorption nimmt von 450–640 nm auf ein Tausendstel des Maximalwertes ab und die schmalbandige Fluoreszenz liegt im Wellenlängenbereich zwischen 550–650 nm, mit dem Maximum bei 590 nm. Detaillierte Beschreibungen von Halbleiter-Nanokristallen finden sich in der Literatur [280-282].

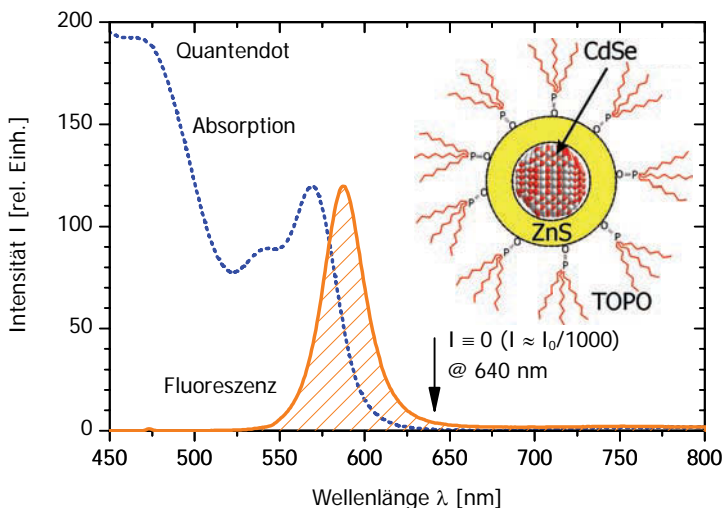


Abb. 68 Normierte Spektren von CdSe/ZnS Nanokristallen in Lösung und schematischer Aufbau stabilisierter Nanokristalle

Konzentrationsabhängige Untersuchungen der Lumineszenz eines Ensembles von Quantendots können Informationen über abstandsabhängige photophysikalische Interaktionen wie Energietransfer liefern, wenn sich Partikel in einem verkleinernden Volumen einander annähern. In einer

Küvette können für Konzentrationen größer 10^{-6} mol/L Reabsorptionseffekte die Ergebnisse beeinflussen, ähnlich wie schon für einen organischen Farbstoff gezeigt wurde. Außerdem kann die Adsorption der Nanopartikel an der Küvettenwand die Messung verkomplizieren. Schichtuntersuchungen an dünnen Filmen vermeiden zwar den Inner-Filtereffekt, beeinflussen die Messungen aber ebenfalls durch Streuung und Interferenz an der Substratoberfläche. Als kontaktloser Probenhalter, scheint der akustische Levitator besser geeignet.

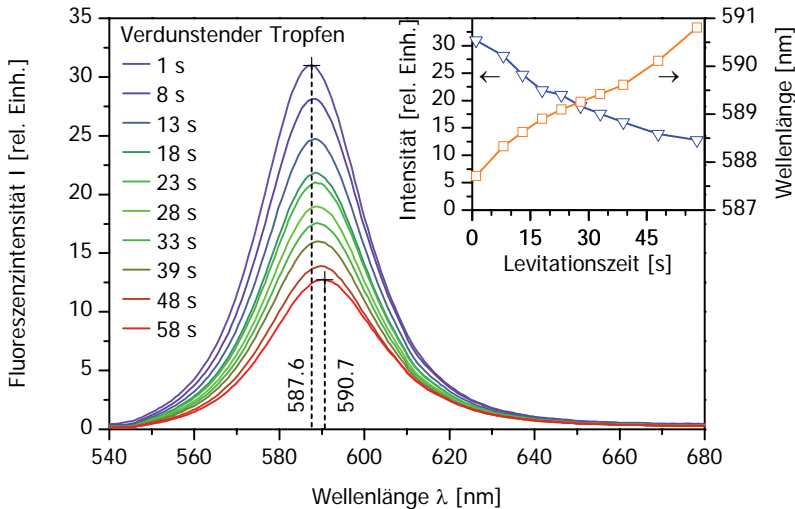


Abb. 69 Fluoreszenzspektren der Quantendots in Chloroform während der Levitation (Anregung mit $\lambda = 436$ nm) sowie Intensität (Dreieck) und Lage (Quadrat) des Emissionsmaximums.

Die untersuchten CdSe–ZnS Nanokristalle sind mit einer Mischung organischer Liganden aus Tri-n-octylphosphinoxid (TOPO), Tri-n-octylphosphin (TOP) und Hexadecylamin (HDA) bedeckt [283]. Abb. 69 zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum in Chloroform (CHCl_3). Die Messungen wurden in einer Umgebungstemperatur von 298 K bei einer mittleren Luftfeuchtigkeit von 50 % durchgeführt und die verwendeten Partikel zeigen eine Fluoreszenz-Quantenausbeute von ungefähr 20 %. Ein 5 μL -Tropfen (Partikelkonzentration von $3,8 \times 10^{-7}$ mol/L) wurde direkt mit einer Mikropipette in einen Schallknoten injiziert. Die Anregung erfolgte während der Levitation bei $\lambda = 436$ nm mit einem Argon-Ionen-Laser. Fluoreszenzspektren wurden kontinuierlich im Abstand von 5–10 s aufgenommen (Abb. 69). Während der Verdunstung verschiebt sich das Maximum zu größeren Wellenlängen, während die Emissionsintensität abnimmt (Abb. 69, Einsatz). Letzteres kann mit einer generellen Selbstlöschung erklärt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus wird durch resonanten Energie Transfer (FRET, engl. Förster o. Fluorescence Resonance Energy Transfer) zwischen Partikeln verschiedener Größe beschrieben. Unter der Voraussetzung eines spektralen Überlappungsbereiches zwischen Emission des Donors und Absorption des Akzeptors können Partikel Anregungsenergie durch FRET über Abstände kleiner ca. 10 nm austauschen [158]. Wie erwähnt besteht ein Ensemble von Partikeln, so dass Energie-

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

transfer hauptsächlich von kleineren, kurzweilig emittierenden Partikeln zu größeren, langwellig absorbierenden Partikeln erfolgt. Diese größeren Partikel strahlen wieder einen Teil der transferierten Anregungsenergie als Fluoreszenz ab, während sich die Emission kleinerer Partikel vermindert. Als Summe resultiert eine Verschiebung der Emission zu längeren Wellenlängen.

Abb. 69 zeigt den spektralen Überlappungsbereich von Absorption und Emission. Das daraus berechnete Überlappungsintegral beträgt $9,3 \times 10^{15} \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$ (Formel siehe [158]) und ist mehr als das Zehnfache des Wertes üblicher organischer Farbstoff-Donor-Akzeptor-Paare. So ist das Überlappungsintegral $4,9 \times 10^{14} \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$ für das häufig verwendete FITC-TRITC-Paar (Fluoresceinisothiocyanat-Tetramethylrhodaminisothiocyanat) [284]. Die Ursache des gewünscht großen Überlappungsintegrals ist der hohe Extinktionskoeffizient der CdSe-Partikel von $5 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ beim ersten excitonischen Maximum ($\lambda = 570 \text{ nm}$) [285]. Es ergibt sich ein Förster-Radius von ca. 6 nm (Formel siehe [158]), was gut mit dem abgeschätztem Interpartikelabstand für hohe Probenkonzentrationen ($< 10 \text{ nm}$) übereinstimmt. Eine ähnliche Verschiebung des Emissionsmaximums zu größeren Wellenlängen aufgrund des Energietransfers wurde von anderen Gruppen für dünne Schichten von Nanokristallen unterschiedlicher Größe gezeigt [286-288].

Zusammenfassend zeigt akustisch levitierte Fluoresceinlösung eine typische Fluoreszenz bis zu einer Konzentration von 10^{-6} mol/L ohne den störenden Einfluss von Reabsorption. Nanokristalline Quantendots zeigen typische Fluoreszenz und können in der Falle konzentrationsabhängig studiert werden. Durch schrumpfenden mittleren Interpartikelabstand ändert sich das Emissionsspektrum, was durch Energietransfer erklärt wird. Im Gegensatz zu ähnlichen Experimenten, welche auf dünnen Probenschichten basieren [289], werden mögliche Einflüsse auf die Messung durch Wechselwirkungen mit dem Probenträger ausgeschlossen und die Konzentration über 5 Größenordnungen kontinuierlich erhöht. Somit eignet sich die Probenlevitation für Fluoreszenzmessungen unter Ausschluss von Adsorptionseffekten und lokaler Konzentrationsüberhöhung an den Küvettenwänden sowie zum Studium konzentrationsabhängiger Prozesse in der Fluoreszenzspektroskopie. Aufgrund des kleinen Probenvolumens sind Fluoreszenzmessungen auch für hohe Farbstoffkonzentrationen ohne die Limitierung durch den Inner-Filtereffekt möglich, der in konventionellen Messungen in Küvetten solche Experimente behindert. Akustische Levitation flüssiger Proben bietet einen experimentell einfachen Weg zum Studium abstandsabhängiger Effekte. CdSe/ZnS-Quantendots sind Gegenstand aktueller Forschung, so widersprechen beispielsweise experimentelle Ergebnisse der kontinuierlichen Verteilung der Emissionszustände der allgemeinen Theorie [290]. Interessant ist der Energietransfer zwischen Nanokristallen unterschiedlicher Größen-Gruppen, die Interaktion zwischen Fluorophoren und metallischen Nanopartikeln sowie die Agglomeration von Fluorophoren in kolloidalen Umgebungen.

4.5 Küvettenlose Ramanspektroskopie

Ramanspektroskopie ist die Untersuchung von Molekülschwingungen durch unelastische Streuung von Licht. In der Literatur wurde mittels Ramanspektroskopie die Kristallisation von Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan und L-Cystein verfolgt [266]. Esen *et al.* konnten ein überhöhtes Ramansignal von 50 % für nicht-sphärische im Vergleich zu sphärischen Tropfen berechnen und messen [291]. Wood *et al.* nahmen Ramanspektren an lebenden Algenzellen im levitierten Tropfen auf, mussten dabei allerdings Wasser hinzugeben um dessen Verdunstung während der Messzeit von 150 s auszugleichen [292]. Diese Einschränkung ließe sich durch die Verwendung nichtflüchtiger Substanzen wie ionische Raumtemperaturflüssigkeiten (engl. *room temperature ionic liquid*, RTIL) umgehen [293]. Puskar *et al.* zeigten erstmals Ramanspektren von tierischen Zellen im levitierten Tropfen mit einer Belichtungsdauer von 30 s [267]. Hier werden Ramanspektren häufig verwendeter flüssiger Proben im akustischen Levitator und alternativ in einer typischen Küvette bestimmt und verglichen.

Den experimentellen Aufbau zeigt Abb. 70. Das Licht eines He-Ne-Lasers^① (25 LHP 928-230, Melles Griot, $\lambda = 633$ nm, Ausgangsleistung 35 mW) wurde mit einer Linse^② auf die schwebende Probe^③ im akustischen Levitator^④ fokussiert ($\varnothing = 50$ μm). Zurück gestreutes Licht wurde über einen Hohlspiegel^⑤ im Verhältnis 1:6 auf den Eintrittspalt^⑥ eines neuartigen Echelle-Spektrometers (Entwicklung ISAS) abgebildet und nach einem Notchfilter spektral mit einer Belichtungszeit von 1 s aufgenommen. Dabei werden Ramanbanden beobachtet, die gegen die des eingestrahlichten Laserlichts verschoben sind (Ramanverschiebung siehe Kapitel 2.2). Sie entsprechen den für das Material charakteristischen Phononenenergien und erlauben Rückschlüsse auf die Probensubstanz.

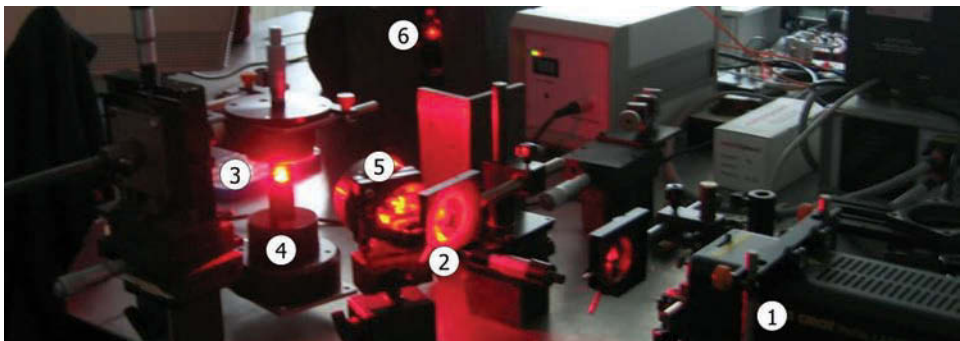


Abb. 70 Levitierte Polysterolkugel^③ (rot) unter Bestrahlung eines He-Ne-Lasers^①.

Erste Spektren levitierter Lösungsmittel (Toluol und Ethylbenzol) wurden am levitierten Tropfen mit einem Volumen von ca. 5 μL aufgenommen und mit Messungen außerhalb der Falle in einer

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Standardküvette verglichen. Toluol (Methylbenzol, $\text{H}_5\text{C}_6\text{-CH}_3$) ist ein wichtiger Kohlenwasserstoff aus der Reihe der aromatischen Verbindungen. Die farblose Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 111°C dient als Lösungsmittel, zur Treibstoffbeimischung sowie zur Herstellung anderer Alkylaromaten. Ethylbenzol ($\text{H}_5\text{C}_6\text{-C}_2\text{H}_5$) ist eine farblose Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 136°C und wird industriell hauptsächlich zur Herstellung von Styrol benutzt. Repräsentative Spektren sind nach Normierung (stärkstes Signal auf 1000) in Abb. 71 für Toluol (oben) und für Ethylbenzol (unten) dargestellt, wobei jeweils der Einsatz die Vergrößerung des Spektrums von $2800\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ zeigt.

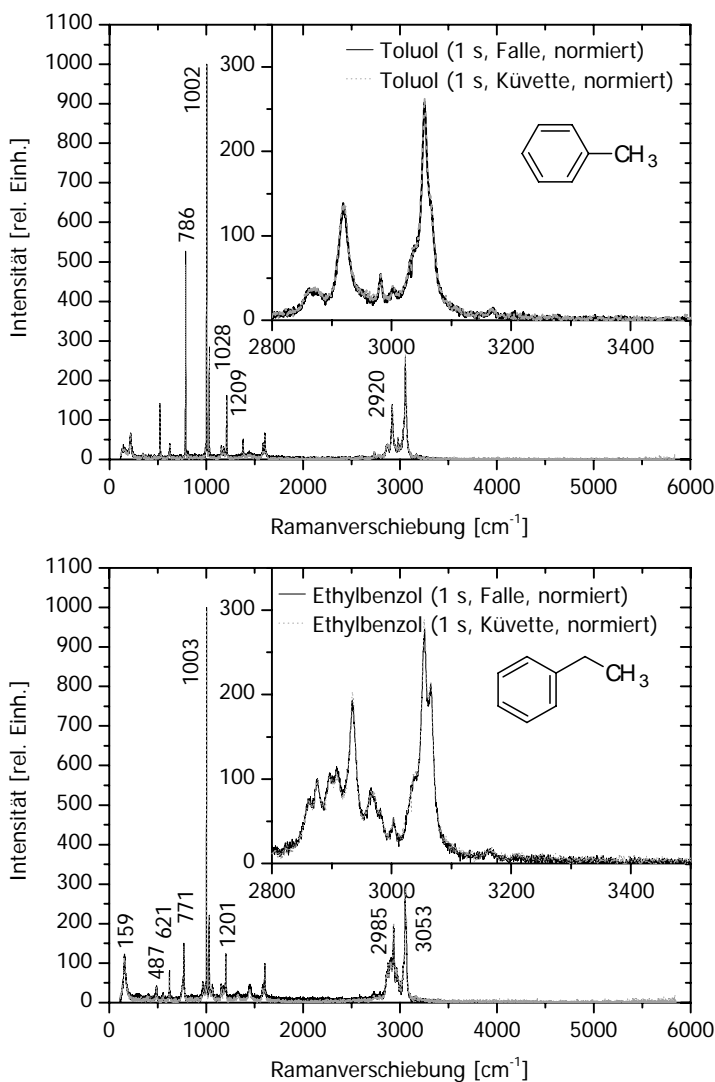


Abb. 71 Ramanspektren, aufgenommen in der Falle (durchgezogen) und in einer Standardküvette (gepunktet) für Toluol (oben) und Ethylbenzol (unten).

Die Spektren zeigen scharfe Banden und unterscheiden sich für die beiden Lösungsmittel sowohl in deren Intensität, als auch spektraler Lage. Qualitative Unterschiede zwischen Messungen im levitiertem Tropfen und einer Standardküvette sind nicht auszumachen. Durch den Vergleich der Spektren mit Literaturwerten wurden markante Banden für Ethylbenzol [294] und Toluol [295, 296] indiziert. Die gute Übereinstimmung belegt die Eignung des Aufbaus für die Untersuchung schwebender Proben mittels Ramanspektroskopie. Trotz stark lichtbrechender Eigenschaft der Proben, zeigen sich keine Probleme für die Datenaufnahme.

Interessant ist die Möglichkeit des experimentellen Aufbaus, aufgrund des weiten Wellenlängenbereichs zeitgleich Stokes- und Anti-Stokes-Raman-Spektren aufzunehmen (z. B. theoretisch zur Temperaturbestimmung). Der Aufbau zeichnet sich durch hohe Auflösung der Intensität, bei gleichzeitig großem Wellenlängenbereich und kleiner Messdauer aus. Zudem ist der Messabstand (ca. 20 cm) ideal zur einfachen Handhabung der Falle (Abb. 70). So ist die Kopplung weiterer Analysemethoden oder Techniken zur Probenpräparation (wie Piezospritzen) über einen weiten Raumwinkelbereich problemlos möglich. Untersuchungen ausgewählter Proben, z. B. zum Quellverhalten von Pollen, sollen folgen.

4.6 Intensivierte Polymerisation von Styrol

Die Verfolgung der Polymerisation von Acrylsäure mittels Ramanspektroskopie wurde 2007 veröffentlicht [304]. Im akustischen Levitator aufgegebene Polymere wurden *in situ* detektiert, aber nicht im akustischen Levitator polymerisiert [305]. Dabei lässt sich die akustische Levitation zur wandfreien, radikalischen Polymerisation unter den speziellen Bedingungen in der Ultraschallfalle nutzen, wie folgendes Beispiel zeigt. Styrol (Styren, $\text{H}_5\text{C}_6\text{-CH=CH}_2$) ist eine farblose Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 145°C und wird industriell hauptsächlich zur Herstellung von Polystyrol (PS) sowie von Synthesekautschuk (SBR) und anderen Copolymerisaten (ABS, SAN) verwendet.

Zur Polymerisation wurde jeweils ein Tropfen mit $4\ \mu\text{L}$ Styrol in der Falle levitiert, TFMS („Supersäure“) in einen Stechheber gezogen und in das Gefäß zurückgeführt. Dabei entsteht aus TFMS bei Kontakt an Luft das stabilere Monohydrat (Hydroniumtrifluormethylsulfonat), welches als weißer dichter Rauch im Stechheber zurückbleibt. Dieser Rauch wurde nun vorsichtig auf den Tropfen geblasen. Eine sofortige weiß-milchige Färbung zeigt die einsetzende Reaktion. Nach einigen Minuten und bei konstantem Volumen, wurde der Tropfen aus der Falle genommen und in THF gelöst, was zum sofortigen Stopp der Polymerisation führte.

Mit der GPC (Gel-Permeations-Chromatographie) wurden die injizierten Lösungen nach ihren Molmassen aufgetrennt. Das Trennprinzip beruht auf der vom hydrodynamischen Volumen der Moleküle abhängigen, unterschiedlich langen Verweilzeit in einer porösen Trennphase (Säule). Das

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

System wurde mit Polystyrol-Standards (PPS) kalibriert. Neben oligomeren Verbindungen mit einem Polymerisationsgrad von bis zu 10 Einheiten sind bei der Polymerisation im Tropfen auch höhermolekulare Polymere entstanden. Die molare Masse der Oligomeren beträgt 300–2000 g/mol und weist ausgeprägte Maxima bei 300 g/mol und 1000 g/mol auf. Die höhermolekularen Verbindungen weisen ein Maximum der mittleren Molmasse von ca. 10000 g/mol auf. Eine Abhängigkeit von dem eingesetzten Volumen Säure zur Menge des entstandenen Polymers war nicht zu erkennen. Zusätzliche Untersuchungen mit MALDI-TOF Massenspektrometrie (matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation, engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization*) bestätigten die Bildung von Polystyrol. Es konnten Peaks bis zu einer Molmasse von 8000 g/mol detektiert werden. Die Peakabstände betragen 104 g/mol und entsprechen der Masse von Styrol. Die Berechnung der Endgruppen führte durch Rückrechnung der Wiederholeinheiten zu einer Restmasse von 2 g/mol. Das entspricht zwei H-Endgruppen und bestätigt damit den durch TFMS initiierte Mechanismus der Polymerisation.

4.7 *Beeinflussung durch die Ultraschallfalle*

Ultraschall wird in der Medizin zur Ultraschalldiagnostik und Ultraschalltherapie am Menschen eingesetzt. Dabei durchdringt das Schallfeld, durch wirksame Einkopplung, den Körper und wird sogar zur Visualisierung ungeborener Kinder verwendet. Einige Säugetiere erzeugen selber Ultraschall zur Kommunikation (Delfin bis 150 kHz) und Orientierung (Fledermaus bis 70 kHz) wobei maximale Schallpegel von über 140 dB erzeugt werden [297]. Bei allen Experimenten konnte kein Einfluss der Ultraschallfalle auf Experimentierende festgestellt werden, was vor dem Hintergrund der relativ schwachen Einkopplung über Luft auch nicht zu erwarten ist. Akustische Levitation bedingt keine Einschränkungen, beispielsweise im Vergleich zu Methoden, welche aufgrund verwendeter Röntgenstrahlung für Schwangere tabu sind.

Das akustische Feld kann Strömungen im levitierten Tropfen induzieren. Diese sorgen als toroidale Wirbelsysteme für eine gute Durchmischung und konnten sowohl theoretisch beschrieben [169] als auch im Experiment visualisiert werden [261]. Daraus resultieren erhöhte Verdunstungsgeschwindigkeiten und guter Temperatúrausgleich. Durch das Ultraschallfeld steigt die Temperatur eines Tropfens maximal um 1°C an [266]. Das bestätigen eigene Messungen in Kooperation mit der PTB [298] an Feststoff (Polystyrol) und flüssigem Tropfen (Wasser) im akustischem Levitator, dargestellt als Wärmebild in Abb. 72.

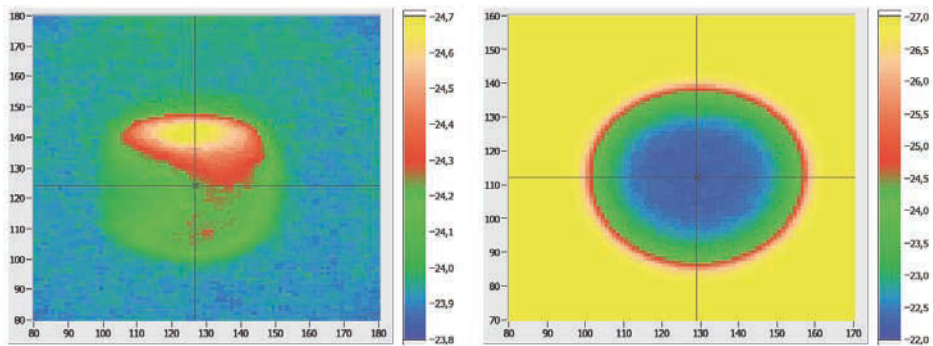


Abb. 72 Wärmebilder mit Temperaturskala (°C) von Styropor (links) und Wasser (rechts).

Dabei ist nach einer Levitationszeit von einigen Minuten von einer statischen Temperaturverteilung auszugehen. Während die Temperatur in der Flüssigkeit isotrop um den Mittelpunkt verteilt ist, zeigt die feste Probe eine deutliche Temperaturerhöhung auf der zur Sonotrode gerichteten Seite von weniger als 1 K. Die etwas unterschiedlichen absoluten Hintergrundtemperaturen können durch die Kalibration auf einen schwarzen Körper angeglichen werden. Die äußeren Strukturen am Tröpfchenrand zeigen einen Temperatúrausgleich in Richtung Hintergrundtemperatur, daher ist der radiale Verlauf auf dem Tröpfchen vermutlich nichts anderes als zunehmende Reflexion von

4. Einsatz der Ultraschallfalle in der Analytik

Hintergrundstrahlung (Fresnel) durch den flacher werdenden Beobachtungswinkel. Für quantitative Aussagen sollte ein Modell erstellt werden, in dem die unterschiedlichen Reflexionsgrade der Kugeloberfläche je nach Winkel berücksichtigt werden, um die Messungen mit der reflektierten Raumstrahlung zu korrigieren. Außerdem sind die Proben kein idealer Lambertstrahler und somit die Wärmestrahlung abhängig vom Beobachtungswinkel. Die unterschiedlich starke Erhitzung an den Polen lässt sich zusätzlich zur Durchmischung mit der unterschiedlichen Wärmeleitfähigkeit (0,027 zu 0,6) von Styropor und Wasser erklären. Die exakte Temperaturbestimmung einer levitierten Probe ist nicht trivial und stellt eine physikalische Herausforderung dar. Die Fragestellung hat neben ihrer akademischen Bedeutung zur Messung eine grundlegende Relevanz für die Überprüfung von Theorien zur Temperaturverteilung im Tropfen. Diese wiederum ist relevant zur Erforschung von Kristallisationsvorgängen im akustischen Levitator. Im Allgemeinen wird die Temperaturerhöhung einer akustisch levitierten Probe vernachlässigt und kühlende Effekte, z. B. durch die Verdunstungskälte, überwiegen [70].

Der Einfluss des Ultraschallfeldes konnte in der Unterdrückung von gravitationsinduziertem Seigern⁶ aufgrund von Strömungen innerhalb des Tropfens beobachtet werden [299]. Die Vermeidung heterogener Keimbildung an festen Probenwänden lässt sich zu Untersuchung von Unterkühlungseigenschaften wässriger Salzlösungen ausnutzen [72]. Durch Amplitudenmodifikation des Schallfeldes lassen sich Oszillationen der Tropfenoberfläche induzieren. Der Einfluss auf die Verdunstungsgeschwindigkeiten ist messbar, aber relativ gering (< 2 %) und zu vernachlässigen [38]. Außerdem wird die Nukleation an der Tropfenoberfläche durch Oberflächenschwingungen gefördert [299]. Nichtsdestotrotz kann ein hoher Schalldruck im akustischen Levitator, durch Scherkräfte im Tropfen während der Kristallisation, resultierende Kristallformen beeinflussen [300]. Untersuchungen der Enzymkinetik im akustisch levitierten Tropfen gleichen denen in der Küvette und weisen auf keine Störung der Enzyme Kinetik hin [301]. Für eine begrenzte Experimentdauer (30 min) und Frequenzen im MHz-Bereich werden Zellen nicht durch die Beschallung mit Ultraschall beeinflusst [302]. Als ein erster Beweis für die Eignung des akustischen Levitators als Technik für zeitaufgelöste Röntgenbeugung konnte die Kristallisation von NaCl aus wässriger Lösung *in situ* beobachtet werden [176].

⁶ Auch „Seigerung“, bezeichnet den Entmischungsvorgang beim Wiedererstarren flüssiger Metallgemische.

4.8 *Ausblick und offene Fragestellungen*

In diesem Kapitel erfolgt sowohl ein Ausblick, als auch die Diskussion angetesteter Einsatzmöglichkeiten der akustischen Levitation und offener Fragestellungen sowie Gedanken.

Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten parallel zu spektroskopischen Messungen am levitierten Tropfen ist vorteilhaft. So kann beispielsweise die Intensität von Fluoreszenz auch für konzentrierte Lösungen ausgewertet werden. Allerdings ist die Bestimmung der Absorption des levitierten Tropfens in Transmission aufgrund der variablen Beugung für verschiedene Tropfenradien schwierig. Die Totalreflexion an der Tropfengrenzfläche, analog zum Regenbogen, ermöglicht die Messung der Absorption [266] für verschiedene Tropfengrößen. Fluoreszenzabklingzeiten mittels zeitaufgelöster Einzelpulsspektroskopie und Messung des Anregungsspektrums würde FRET beweisen und Phosphoreszenz ausschließen.

Als weitere küvettenlose Spektroskopie könnte mittels Röntgenfluoreszenz untersucht werden, inwieweit Spuren von Blei in Wasser wandfrei in der Falle detektiert werden können. Zur Quantifizierung eignen sich auf Referenzmaterialien basierende Lösungen.

Erste Experimente zeigten die Chance der Falle als Probenhalter für Mikropartikel. Ein angeschlossenes Partikelmessgerät ermöglichte die Bestimmung der Größenverteilung. Es konnten sowohl das Pulver aus Siliciumcarbid Mikropartikeln ($\varnothing \approx 3 \mu\text{m}$, Logitech), als auch daraus erstellte wässrige Suspensionen levitiert werden. Im Gegensatz zu Aerosolen, ist nur die Levitation von Agglomeraten und größeren Partikeln mit Durchmessern im Bereich einiger Mikrometer möglich. Si-Carbid-Partikel in Wassersuspension zeigen interessante Effekte. So lässt sich durch Erhöhung des Schallfeldes die anfangs kugelförmige Probe zu einer Scheibe (Radius zu Dicke: $\approx 0,2$) verformen, was sich durch den Einfluss der Mikropartikel auf Viskosität und Oberflächenspannung begründet (Abb. 10). Außerdem bilden sie in einem vertikalen Schallfeld eine vertikale Materialverteilung nahe der Tropfenoberfläche, welche langsam um die vertikale Achse rotiert, so dass die Beobachtung durch den Ring möglich ist (Abb. 73). Diese Beobachtung lässt sich mit aktuellen Modellen nicht erklären. Sie zeigt, dass gegenwärtig eine Beherrschbarkeit nicht gegeben und für heterogene System zu entwickeln ist. Eine Erklärung wäre die Rotation des Tropfens um seine vertikale Achse, wodurch die Mikropartikel Richtung Oberfläche „geschleudert“ und sich entsprechend in einem Ring zentrieren. Zu klären sind des Weiteren die "Einwaage" von kleinen Mengen Mikropartikeln einer bekannten bzw. die Bestimmung einer unbekanntenen Konzentration von Mikropartikelsuspensionen in der Ultraschallfalle.

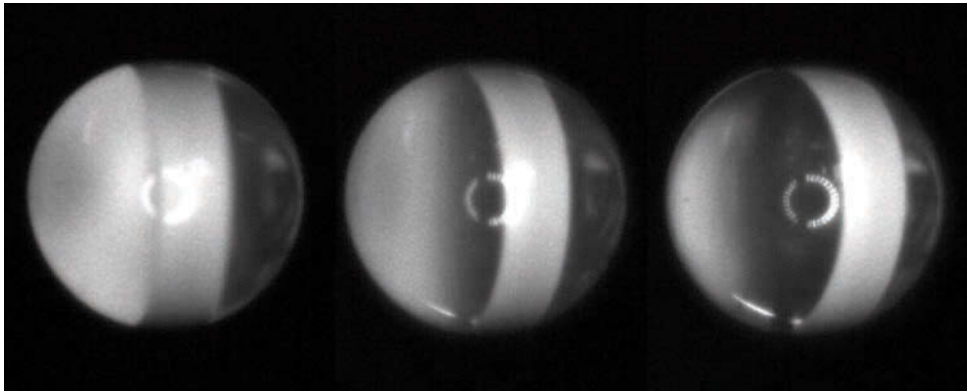


Abb. 73 *Siliciumcarbid Mikropartikel bilden vertikalen Ring im levitierten Wassertropfen.*

Kontaminationsfreier Probenhalter für die Bioanalytik sind eine attraktive Anwendung. Bindungsassays arbeiten mit einer Immobilisierung auf einer Oberfläche. Levitation von Tropfen ermöglicht die Probenhandhabung bis in den Nanoliter-Bereich, das eine Reduzierung des Verbrauchs von Biomolekülen ermöglicht. Besonders für homogene Immunoassays wie FPIA (engl. *fluorescence polarization immunoassay*) oder ARIS (engl. *apoenzyme reactivation immunoassay system*) in Kombination mit LIF könnte die Falle einen exzellenten "wandfreien Probenhalter" zum Studium von Interaktionen und Analyt-Konzentrationen darstellen.

Neben der Verwendung zur wandfreien Beobachtung kann eine akustisch levitierte Probe auch als Mikroreaktor eingesetzt werden. Neben der Herstellung von Polymeren (siehe Abschnitt 4.6) wurden auch katalytische Vorstufen (engl. *precursor*) im akustischen Levitator synthetisiert und sollen in Zukunft mit dieser Technik näher untersucht werden [303].

5. Zusammenfassung

Die intensiv erforschte und vielfach angewandte Technik der akustischen Levitation wurde in dieser Arbeit für den Einsatz in der Analytik untersucht. Ein bekanntes Problem in der Analytischen Chemie ist die Wechselwirkung des Analyten mit konventionellem Proben- bzw. Messgefäß, das aus Oberflächenkontakten resultiert. Diese Einflüsse werden durch die Nutzung der akustischen Levitation vermieden, welche zuverlässig eine berührungslose Probenhandhabung ermöglicht. Als Vorteil gegenüber alternativen Levitationstechniken ist aufzuführen, dass keinerlei spezifische Probenanforderungen (wie Transparenz, elektrische oder magnetische Eigenschaften) existieren. In dieser Arbeit wurde ihr Einsatz für spektroskopische Methoden (LIF, Raman) sowie erstmalig für Methoden der Röntgenstreuung (EDXD, SAXS, WAXS) und Röntgenfluoreszenz (RFA, XANES) charakterisiert. Eine besondere Herausforderung stellte die Integration des akustischen Levitators in die experimentellen Aufbauten der Beamlines am Synchrotron dar. Die Anwendung der Ultraschallfalle am BESSY konnte im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden und stellt derzeit eine Grundlage intensiver interdisziplinärer Forschung dar. Für alle genannten Methoden erwies sich die wandlose Probenhalterung als vorteilhaft. So sind die Untersuchungsergebnisse konsistent mit denen herkömmlicher Probenhalter und übertreffen diese teilweise hinsichtlich der Datenqualität.

In einem levitierten Tropfen lässt sich die Analytkonzentration über die Verdunstung des Lösungsmittels zeitabhängig ändern. Das Potential der Falle zur kontrollierten Aufkonzentration wurde erkannt und zum Studium verdunstungskontrollierter Prozesse angewendet. Dabei stellte sich die wandlose Probenhalterung als einzige Technik heraus, um Konzentrationsänderungen praktikabel über mehr als drei Größenordnungen durchzuführen. Dabei ist jeglicher Verlust an bzw. Einfluss auf Analyten durch feste Containerwände auszuschließen. Diese herausragende Möglichkeit gestattet die Untersuchung sowohl von Kristallisation, Aggregation (Atome und Moleküle) als auch Agglomeration (Nanopartikeln). Dabei ermöglichen Intervall-Messungen an derselben Probe im Sekundenbereich das Studium zeitabhängiger Prozesse. Das ist ein Vorteil gegenüber typischen zeitaufgelösten Messungen. Diese erlauben zu einem beliebigen Zeitpunkt im Experiment zwar gleiche, aber nicht dieselbe Probe zu untersuchen. So wird mit dem akustischen Levitator der Materialeinsatz von z. B. Proteinen minimiert.

Die Arbeit dokumentiert den Einsatz der Ultraschallfalle zur Kopplung mit analytischen Methoden. Es ergeben sich Vorteile zur Klärung von Fragestellungen beispielsweise auf den Gebieten der Biomineralisation, Katalyse und Polymerisation. Nach bestem Wissen sind diese Untersuchungen die ersten *in situ* Studien der Agglomeration, angefangen von kleinen (an)organischen Molekülen über Proteine bis hin zu Nanopartikeln in einem akustisch levitierten Tropfen. Die Ergebnisse eröffnen einen breiten Anwendungsbereich zur Benutzung der Ultraschallfalle als analytisches Werkzeug.

6. Appendix

6.1 Mathematische Grundlagen zur akustischen Levitation

Prinzipiell ist zur Probenlevitation eine Kraft erforderlich, die zusammen mit dem Auftrieb die Gravitation kompensiert. In der Praxis wird empfohlen diese Kraft ca. 20 % größer zu wählen um Instabilitäten (durch z. B. Luftströmungen) zu kompensieren, welche anderenfalls zum Fall der Probe führen. Im akustischen Levitator ist die Levitationskraft als Schallpegel über die Schwingungs-Amplitude der Sonotrode einstellbar. Ein zu hoher Schallpegel führt zum übermäßigen Energieeintrag auf die Probe. Außerdem können bei flüssigen Proben Schwingungen auf der Oberfläche induziert werden und die Probe wird deformiert, was zu deren Auseinanderreißen (Desintegration) führen kann [58]. Zur Erklärung der physikalischen Grundlagen des akustischen Levitators [6] wird sich typischerweise der folgenden mathematischen Darstellung bedient, welche die Wirkung einer stehenden Schallwelle als akustischen Strahlungsdruck in kompressiblen Medien auf kleine kugelförmige Teilchen beschreibt.

Die Grundlage ist die Kontinuitätsgleichung und die Bewegungsgleichung des Drucks p

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \rho \vec{q} = 0 \quad \text{und} \quad \rho \frac{D}{Dt} \vec{q} = -\nabla p \quad (35)$$

wobei der Vektor $\vec{q} = f(u, v, w)$ mit seinen drei Raumkomponenten die Geschwindigkeit der Gasteilchen im Medium beschreibt, ρ dessen Dichte, und D definiert ist als:

$$\frac{D}{Dt} = \frac{\partial}{\partial t} + u \frac{\partial}{\partial x} + v \frac{\partial}{\partial y} + w \frac{\partial}{\partial z}. \quad (36)$$

Für folgende Schritte werden weitere Vereinfachungen benötigt: Die Vernachlässigung der Ortsabhängigkeit der Mediumdichte, die Annahme, dass um das Teilchen keine Turbulenzen und Wirbel entstehen und weitere Randbedingungen zur Integration der Druckänderung über die Probenoberfläche. Daraus ergibt sich die Levitationskraft zu:

$$F_{Lev} = \frac{5}{8} \frac{2\pi^2}{\lambda_0} \rho_0 v_{max}^2 V_s f(x) \sin\left(\frac{4\pi}{\lambda_0} z\right), \quad (37)$$

wobei der Formfaktor als $f(x) = 3x^{-3}(\sin x - x \cos x)$ mit $x = 2\pi\rho_s / \lambda_0$ angegeben wird. F_{Lev} ist abhängig von der Dichte des Trägergases ρ_0 , der Wellenlänge λ_0 der Ultraschallfrequenz und der maximalen Amplitude der Schallschnelle v_{max} . Für Kugeln wird nach Einsetzen des Volumens in Gl. 37 angegeben [306]:

$$F_{Lev} = \frac{5}{6} \frac{2\pi^2}{\lambda_0} \bar{E} r^3 \sin \frac{4\pi}{\lambda_0} z \quad (38)$$

mit der Energiedichte \bar{E} , dem Probenradius r und der Auslenkung der Probe relativ zum Druckknoten z .

Die Größe der minimalen Levitationskraft lässt sich alternativ leicht abschätzen. Ein Wassertropfen der Masse m ($V = 5 \mu\text{L}$, $\rho = 997,04 \text{ kg/m}^3$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) unterliegt nach

$$F_g = m \cdot g \quad (39)$$

einer Gewichtskraft von $F_g = 49 \mu\text{N}$. Der Auftrieb in Luft ($\rho_0 = 1,293 \text{ kg/m}^3$) ergibt sich unter Normaldruck ($p_0 = 10^5 \text{ Pa}$) nach Gl. 40 zu $F_{auf} = 63 \text{ nN}$.

$$F_{auf} = m_0 \cdot g = \rho_0 V g \quad (40)$$

Eine Druckerhöhung im akustischen Levitator von bis zu 100 kPa erhöht diese Kraft auf 128 nN. Der Auftrieb ist somit für gewöhnliche Proben zu vernachlässigen, auch wenn beispielsweise für aufgeschäumtes Polystyren ($\rho = 20 \text{ kg/m}^3$) der Auftrieb ein Zehntel der Gewichtskraft ($F_g \approx 1 \mu\text{N}$) erreicht.

6.2 Abkürzungen, Akronyme und Formelzeichen

1D	Ein-dimensional
2D	Zwei-dimensional
3D	Drei-dimensional
a	kleine Halbachse
A	Absorption
AF	Schattenfläche
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. <i>atomic force microscope</i>)
APO	Apoferritin
α_{grenz}	Alpha, Grenzwinkel der Totalreflexion, Brewsterwinkel, Glanzwinkel
b	große Halbachse
B	magnetische Flussdichte
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
BESSY	Berliner Gesellschaft zur Speicherung von Synchrotronstrahlung
BFDH	Methode nach Bravais, Friedel, Donnay und Harker
c	Lichtgeschwindigkeit, Konstante
$c_{1,2,3}$	Konstanten
C	Konstante
CCD	ladunggekoppeltes (Halbleiter-)Baulement (engl. <i>charge-coupled device</i>)
CONTIN	engl. <i>constrained regularization program for inverting noisy linear equations</i>
conc.	Konzentration
cos	Funktionszeichen für Kosinus, aus neulat. <i>complementi sinus</i> für ergänzen Sinus
d	Abstand (der Gitterebenen im Kristall)
d_m	mittlere Interpartikel-Abstand
d_{PD}	Abstand zwischen Probe und Detektor
dt.	deutsch
D	Diffusionskoeffizient
DLS	Dynamische Licht-Streuung
engl.	englisch
E	Energie
ED	Elektronenbeugung (engl. <i>electron diffraction</i>)
EDXR	Energiedispersive Röntgenbeugung (engl. <i>energy dispersive X-ray diffraction</i>)
EXAFS	erweiterte Röntgenabsorptionsfeinstruktur (engl. <i>extended X-ray absorption fine structure</i>)
η	Viskosität, Wirkungsgrad
f	Frequenz
F	Kraft
FRET	Förster-Energietransfer (engl. <i>Förster oder fluorescence resonance energy transfer</i>)
griech.	griechisch
Gl.	Gleichung
h	Plancksches Wirkungsquantum, Konstante, $h \approx 6,626 \times 10^{-34}$ Js
I	Intensität
IR	Infrarot (engl. <i>infrared</i>)
ISAS	<i>Institute for Analytical Sciences, Department Berlin</i> (Institutsname)
J	Joule
k	Boltzmannkonstante, $k \approx 1,38 \times 10^{-23}$ J K ⁻¹
k_S	Konstante der Scherrer-Gleichung
K	Kelvin
l	Länge
L	Löslichkeit
LDV	Laserdopplergeschwindigkeitsmessung (engl. <i>laser doppler velocimetry</i>)
lat.	lateinisch
λ	Lambda, Wellenlänge

6. Appendix

Malvern	Malvern Instruments Ltd.
n	Brechzahl
nlat.	neulateinisch
N	Anzahl, z. B. Anzahl der Partikel pro Volumeneinheit
NEXAFS	vgl. XANES, engl. <i>near-edge X-ray absorption fine structure spectroscopy</i>
NIBS	nicht-invasive Rückstreuung (engl. <i>non-invasive back-scatter</i>)
NNLS	engl. <i>non-negatively constrained least-squares method</i>
o.	oben
OD	optische Dichte (engl. <i>optical density</i>)
OF	Oberfläche
p	Wahrscheinlichkeit
p. a.	für die Analyse (nlat. <i>pro analysi</i>) als Angabe chemischer Reinheit
P	Leistung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie (engl. <i>photon correlation spectroscopy</i>)
PDB	Proteindatenbank (engl. <i>Protein Data Bank</i>)
π	Pi, Konstante
q	Streuvektor
q _E	Teilchenladung
r	Radius
r _C	kritischer Radius (engl. <i>critical radius</i>)
r _F	Radius des Schwerpunktes zur Rotationsachse
R	Reflektor, Reflexion
R _G	Gyrationsradius
R _H	hydrodynamischer Radius
REM	Rasterelektronenmikroskop (engl. <i>scanning electron microscope, SEM</i>)
RFA	Röntgenfluoreszenzanalyse
RMS	Quadratwurzel aus dem Mittel der Quadrate (engl. <i>root mean 'square</i>)
RT	Raumtemperatur
ρ	Roh, Dichte
s	Sekunde
s.	siehe
S	Sonotrode
S.	Seite
SAXS	Kleinwinkelstreuung (engl. <i>small-angle X-ray scattering</i>)
sin	Funktionszeichen für Sinus, lat. <i>sinus</i> für Krümmung
t	Zeit
T	Temperatur
TDS	Thermisch Diffuse Streuung
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
tan	Funktionszeichen für Tangens, lat. <i>tangere</i> für berühre
θ	Theta, Streuwinkel
u.	unten
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
VIS	sichtbarer (engl. <i>visible</i>) Bereich des elektromagnetischen Spektrums
WAXS	Weitwinkelstreuung (engl. <i>wide-angle X-ray scattering</i>)
XANES	kantennahe Röntgenabsorptions-Feinstruktur (engl. <i>X-ray absorption near-edge (fine) structure</i>)
XRF	Röntgenfluoreszenzanalyse (engl. <i>X-ray fluorescence</i>)

6.3 *Stichwortverzeichnis*

Akustischer Levitator	30
Beugung, Bragg-Reflexion	23
Coffein	78
Diffusionskonstante	48
Energiedispersiv	39
Fluoreszenz.....	21
Gyrationsradius	44
Hydrodynamischer Radius	48
Inverse Fouriertransformation	41
J, Besselfunktion, Jablonski-Diagramm	21
Kristallbildung	26
Levitation	10
Lumineszenz.....	21
Monomer	28
Nukleation	27
Optische Levitation	16
Paul-Falle	15
Phosphoreszenz	21
Quantendots, Quantenpunkte.....	102
Ramanspektroskopie.....	109
Synchrotron	36
Totalreflexion	20, 115
Ultraschall	17
Volumenbestimmung	54
Wechselwirkung der Strahlung mit Materie	18
X-ray, Röntgenstrahlung (weiße)	23
Yukawa-Potential	98
Zeta-Potential	50

6.4 Literaturverzeichnis

1. Janasek D., Franzke J. und Manz A., *Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems*. Nature, 2006. **442**(7101): S. 374-380.
2. Kricka L.J., Park J.Y., Li S.F.Y. und Fortina P., *Miniaturized detection technology in molecular diagnostics*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2005. **5**(4): S. 549-559.
3. Dudenverlag, *Die deutsche Rechtschreibung*, in *DUDEN*. 2006, Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG: Mannheim.
4. Bücks K., *Some observations on the sound field of piezoquarz*. Physikalische Zeitschrift, 1933. **34**: S. 237-237.
5. Kundt A., *Über eine neue Art akustischer Staubfiguren und über die Anwendung derselben zur Bestimmung der Schallgeschwindigkeit in festen Körpern und Gasen*. Annalen der Physik und Chemie, 1866. **127**(4): S. 1-12.
6. King L.V., *On the acoustic radiation pressure on spheres*. Proceedings of Royal Society (London), 1934. **A147**: S. 212-240.
7. Yosioka K. und Kawasima Y., *Acoustic radiation pressure on a compressible sphere*. Acustica, 1955. **5**: S. 167-173.
8. Hasegawa T. und Yosioka K., *Acoustic-Radiation Force on a Solid Elastic Sphere*. Journal of the Acoustical Society of America, 1969. **46**(5p2): S. 1139-1143.
9. Gorkov L.P., *Forces Acting on a Small Particle in an Acoustic Field within an Ideal Fluid*. Doklady Akademii Nauk SSSR, 1961. **140**(1): S. 88-91.
10. Chu B.T. und Apfel R.E., *Are Acoustic Intensity and Potential-Energy Density 1st-Order or 2nd-Order Quantities*. American Journal of Physics, 1983. **51**(10): S. 916-918.
11. Crum L.A., *Acoustic Force on a Liquid Droplet in an Acoustic Stationary Wave*. Journal of the Acoustical Society of America, 1971. **50**(1): S. 157-163.
12. Chu B.T. und Apfel R.E., *Acoustic Radiation Pressure Produced by a Beam of Sound*. Journal of the Acoustical Society of America, 1982. **72**(6): S. 1673-1687.
13. Hanson A.R., Domich E.G. und Adams H.S., *Acoustical Liquid Drop Holder*. Review of Scientific Instruments, 1964. **35**(8): S. 1031-1034.
14. Oran W.A., Berge L.H. und Parker H.W., *Parametric Study of an Acoustic Levitation-System*. Review of Scientific Instruments, 1980. **51**(5): S. 626-631.
15. Trinh E.H., *Compact Acoustic Levitation Device for Studies in Fluid-Dynamics and Material Science in the Laboratory and Microgravity*. Review of Scientific Instruments, 1985. **56**(11): S. 2059-2065.
16. Lierke E.G., *Akustische Positionierung - Ein umfassender Überblick über Grundlagen und Anwendungen*. Acustica, 1996. **82**(2): S. 220-237.
17. Wang T.G., Saffren M.M. und Elleman D.D., *Acoustical Levitation for Space Processing*. Astronautics & Aeronautics, 1974. **12**(7-8): S. 42-45.
18. Barmatz M. und Collas P., *Acoustic Radiation Potential on a Sphere in Plane, Cylindrical, and Spherical Standing Wave Fields*. Journal of the Acoustical Society of America, 1985. **77**(3): S. 928-945.
19. Rey C.A., Merkle D.R., Hammarlund G.R. und Danley T.J., *Acoustic Levitation Technique for Containerless Processing at High-Temperatures in Space*. Metallurgical Transactions - Physical Metallurgy and Materials Science, 1988. **19**(11): S. 2619-2623.
20. Whymark R., Rey C., Yearnd J. und Broz R., *Acoustic Levitation Materials Processing Systems*, in *17th Aerospace Science Meeting*. 1979, American Institute of Aeronautics and Astronautics: New Orleans, LAS. 1-9.
21. Lierke E.G., Grossbach R. und Clancy P., *Acoustic Positioning in Mirror Furnaces - Esa Activities in Materials Processing*. Ieee Transactions on Sonics and Ultrasonics, 1985. **32**(1): S. 97-97.
22. Hatano H., *Axisymmetrical Analysis of a Tube-Type Acoustic Levitator by a Finite-Element Method*. Ieee Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control, 1994. **41**(5): S. 772-777.

23. Bauerecker S. und Neidhart B., *Formation and growth of ice particles in stationary ultrasonic fields*. Journal of Chemical Physics, 1998. **109**(10): S. 3709-3712.
24. Bauerecker S. und Neidhart B., *Atmospheric physics - Cold gas traps for ice particle formation*. Science, 1998. **282**(5397): S. 2211-2212.
25. Tuckermann R., Neidhart B., Lierke E.G. und Bauerecker S., *Trapping of heavy gases in stationary ultrasonic fields*. Chemical Physics Letters, 2002. **363**(3-4): S. 349-354.
26. Gao J.R., Cao C.D. und Wei B., *Containerless processing of materials by acoustic levitation*. Gravitational Effects in Materials and Fluid Sciences, 1999. **24**(10): S. 1293-1297.
27. Vandaele V., Lambert P. und Delchambre A., *Non-contact handling in microassembly: Acoustical levitation*. Precision Engineering-Journal of the International Societies for Precision Engineering and Nanotechnology, 2005. **29**(4): S. 491-505.
28. Zhuk A.P., *Effect of acoustic radiation on a spherical drop of liquid*. International Applied Mechanics, 2007. **43**(7): S. 726-733.
29. Tuckermann R., Bauerecker S. und Cammenga H.K., *Generation and characterization of surface layers on acoustically levitated drops*. Journal of Colloid and Interface Science, 2007. **310**(2): S. 559-569.
30. Schiffter H. und Lee G., *Single-droplet evaporation kinetics and particle formation in an acoustic levitator. Part 1: Evaporation of water microdroplets assessed using boundary-layer and acoustic levitation theories*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(9): S. 2274-2283.
31. Schiffter H. und Lee G., *Single-droplet evaporation kinetics and particle formation in an acoustic levitator. Part 2: Drying kinetics and particle formation from microdroplets of aqueous mannitol, trehalose, or catalase*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(9): S. 2284-2295.
32. Sloth J., Kiil S., Jensen A.D., Andersen S.K., Jorgensen K., Schiffter H. und Lee G., *Model based analysis of the drying of a single solution droplet in an ultrasonic levitator*. Chemical Engineering Science, 2006. **61**(8): S. 2701-2709.
33. Azzouz H., Alkhafadiji L., Balslev S., Johansson J., Mortensen N.A., Nilsson S. und Kristensen A., *Levitated droplet dye laser*. Optics Express, 2006. **14**(10): S. 4374-4379.
34. Field C.R. und Scheeline A., *Design and implementation of an efficient acoustically levitated drop reactor for in stillo measurements*. Review of Scientific Instruments, 2007. **78**(12): S. 125102-125108.
35. Tuckermann R., *Gase, Aerosole, Tropfen, Partikel in stehenden Ultraschallfeldern eine Untersuchung zur Anreicherung schwerer Gase, Verdampfung levitierter Tropfen, Kristall- und Partikelbildung*. 2002, GKSS-Forschungszentrum: Geesthacht. 109 Seiten.
36. Sprynchak V., *Ramanspektroskopische Untersuchungen an homogenen und inhomogenen sphärischen und sphäroiden Partikeln*, in Fakultät für Maschinenbau. 2003, Ruhr-Universität: Bochum. 138 Seiten.
37. Schiffter H.A., *Single Droplet Drying Of Proteins And Protein Formulations Via Acoustic Levitation*, in Naturwissenschaftliche Fakultäten. 2006, Friedrich-Alexander University: Erlangen-Nürnberg. 274 Seiten.
38. Rensink D., *Verdunstung akustisch levitierter schwingender Tropfen aus homogenen und heterogenen Medien*, in Technischen Fakultät. 2004, Universität Erlangen-Nürnberg: Erlangen. 251 Seiten.
39. Eberhardt R., *Entwicklung einer Ultraschall-Levitations-Apparatur für die Probenvorbereitung in der Mikro- und Spurenanalyse*. 1999, GKSS-Forschungszentrum: Geesthacht. 127 Seiten.
40. *Der Brockhaus in Text und Bild*. 2005, Bibliographisches Institut und F. A. Brockhaus: Mannheim.
41. Adewuyi Y.G., *Sonochemistry: Environmental science and engineering applications*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2001. **40**(22): S. 4681-4715.
42. Mason T.J., *Sonochemistry and the environment - Providing a "green" link between chemistry, physics and engineering*. Ultrasonics Sonochemistry, 2007. **14**(4): S. 476-483.

43. Mason T.J., *Sonochemistry - the Use of Ultrasound in Chemistry*. Chemistry in Britain, 1986. **22**(7): S. 661-661.
44. Suslick K.S., *Sonochemistry*. Science, 1990. **247**(4949): S. 1439-1445.
45. Cravotto G. und Cintas P., *The combined use of microwaves and ultrasound: Improved tools in process chemistry and organic synthesis*. Chemistry-a European Journal, 2007. **13**(7): S. 1903-1909.
46. Cains P.W., Martin P.D. und Price C.J., *The use of ultrasound in industrial chemical synthesis and crystallization. I. Applications to synthetic chemistry*. Organic Process Research & Development, 1998. **2**(1): S. 34-48.
47. Lohse D., *Cavitation physics - Lasers blow a bigger bubble*. Nature, 1998. **392**(6671): S. 21-21.
48. Brenner M.P., Hilgenfeldt S. und Lohse D., *Single-bubble sonoluminescence*. Reviews of Modern Physics, 2002. **74**(2): S. 425-484.
49. Lohse D., *Sonoluminescence - Cavitation hots up*. Nature, 2005. **434**(7029): S. 33-34.
50. Flannigan D.J. und Suslick K.S., *Plasma formation and temperature measurement during single-bubble cavitation*. Nature, 2005. **434**(7029): S. 52-55.
51. *Der Brockhaus Naturwissenschaft und Technik* 2003, Bibliographisches Institut, F. A. Brockhaus und Spektrum Akademischer Verlag: Mannheim und Heidelberg.
52. Taleyarkhan R.P., West C.D., Cho J.S., Lahey R.T., Nigmatulin R.I. und Block R.C., *Evidence for nuclear emissions during acoustic cavitation*. Science, 2002. **295**(5561): S. 1868-1873.
53. Taleyarkhan R.P., West C.D., Lahey R.T., Nigmatulin R.I., Block R.C. und Xu Y., *Nuclear emissions during self-nucleated acoustic cavitation*. Physical Review Letters, 2006. **96**(3): S. 034301-034304.
54. Hanson A.R., Domich E.G. und Adams H.S., *Shock Tube Investigation of the Breakup of Drops by Air Blasts*. Physics of Fluids, 1963. **6**(8): S. 1070-1080.
55. Annamalai P., Trinh E. und Wang T.G., *Experimental-Study of the Oscillations of a Rotating Drop*. Journal of Fluid Mechanics, 1985. **158**(Sep): S. 317-327.
56. Cronin J.T. und Brill T.B., *Acoustic Levitation as an Ir Spectroscopy Sampling Technique*. Applied Spectroscopy, 1989. **43**(2): S. 253-257.
57. Trinh E.H. und Ohsaka K., *Measurement of Density, Sound-Velocity, Surface-Tension, and Viscosity of Freely Suspended Supercooled Liquids*. International Journal of Thermophysics, 1995. **16**(2): S. 545-555.
58. Welter E. und Neidhart B., *Acoustically levitated droplets - A new tool for micro and trace analysis*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1997. **357**(3): S. 345-350.
59. Petersson M., Nilsson J., Wallman L., Laurell T., Johansson J. und Nilsson S., *Sample enrichment in a single levitated droplet for capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography B, 1998. **714**(1): S. 39-46.
60. Wiklund M., Spiegel P., Nilsson S. und Hertz H., *Ultrasonic-trap-enhanced selectivity in capillary electrophoresis*. Ultrasonics, 2003. **41**(4): S. 329-333.
61. Eberhardt R. und Neidhart B., *Acoustic levitation device for sample pretreatment in microanalysis and trace analysis*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1999. **365**(6): S. 475-479.
62. Hoffmann T.L., Chen W., Koopmann G.H., Scaroni A.W. und Song L., *Experimental and Numerical-Analysis of Bimodal Acoustic Agglomeration*. Journal of Vibration and Acoustics-Transactions of the Asme, 1993. **115**(3): S. 232-240.
63. Hoffmann T.L. und Koopmann G.H., *A New Technique for Visualization of Acoustic Particle Agglomeration*. Review of Scientific Instruments, 1994. **65**(5): S. 1527-1536.
64. Hoffmann T.L. und Koopmann G.H., *Visualization of acoustic particle interaction and agglomeration: Theory and experiments*. Journal of the Acoustical Society of America, 1996. **99**(4): S. 2130-2141.
65. Hoffmann T.L., *Environmental implications of acoustic aerosol agglomeration*. Ultrasonics, 2000. **38**(1-8): S. 353-357.

66. Gallego-Juarez J.A., et al., *Application of acoustic agglomeration to reduce fine particle emissions from coal combustion plants*. Environmental Science & Technology, 1999. **33**(21): S. 3843-3849.
67. Riera E., Gallego-Juarez J.A. und Mason T.J., *Airborne ultrasound for the precipitation of smokes and powders and the destruction of foams*. Ultrasonics Sonochemistry, 2006. **13**(2): S. 107-116.
68. Patterson H.S. und Cawood W., *Phenomena in a sounding tube*. Nature, 1931. **127**: S. 667-667.
69. Tuckermann R., Bauerecker S. und Neidhart B., *Evaporation rates of alkanes and alkanols from acoustically levitated drops*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002. **372**(1): S. 122-127.
70. Tuckermann R., Bauerecker S. und Cammenga H.K., *IR-thermography of evaporating acoustically levitated drops*. International Journal of Thermophysics, 2005. **26**(5): S. 1583-1594.
71. Santesson S. und Nilsson S., *Airborne chemistry: acoustic levitation in chemical analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **378**(7): S. 1704-1709.
72. Ohsaka K., Trinh E.H. und Glicksman M.E., *Undercooling of Acoustically Levitated Molten Drops*. Journal of Crystal Growth, 1990. **106**(2-3): S. 191-196.
73. Lu Y.J. und Wei B., *Supercooling of aqueous NaCl and KCl solutions under acoustic levitation*. Journal of Chemical Physics, 2006. **125**(14): S. -.
74. Wiklund M., Toivonen J., Tirri M., Hanninen P. und Hertz H.M., *Ultrasonic enrichment of microspheres for ultrasensitive biomedical analysis in confocal laser-scanning fluorescence detection*. Journal of Applied Physics, 2004. **96**(2): S. 1242-1248.
75. Mracek M. und Wallaschek J., *A system for powder transport based on piezoelectrically excited ultrasonic progressive waves*. Materials Chemistry and Physics, 2005. **90**(2-3): S. 378-380.
76. Hashimoto Y., Koike Y. und Ueha S., *Near-field acoustic levitation of planar specimens using flexural vibration*. Journal of the Acoustical Society of America, 1996. **100**(4): S. 2057-2061.
77. Hashimoto Y., Koike Y. und Ueha S., *Magnification of transportation range using non-contact acoustic levitation by connecting vibrating plates*. Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers, Short Notes & Review Papers, 1997. **36**(5B): S. 3140-3145.
78. Hashimoto Y., Koike Y. und Ueha S., *Transporting objects without contact using flexural traveling waves*. Journal of the Acoustical Society of America, 1998. **103**(6): S. 3230-3233.
79. Ueha S., Hashimoto Y. und Koike Y., *Non-contact transportation using near-field acoustic levitation*. Ultrasonics, 2000. **38**(1-8): S. 26-32.
80. Earnshaw S., *On the nature of the molecular forces which regulate the constitution of the luminiferous ether*. Trans. Camb. Phil. Soc, 1842. **7**: S. 97-112.
81. Herlach D.M., Cochrane R.F., Egry I., Fecht H.J. und Greer A.L., *Containerless Processing in the Study of Metallic Melts and Their Solidification*. International Materials Reviews, 1993. **38**(6): S. 273-347.
82. Rhim W.K., Collender M., Hyson M.T., Simms W.T. und Elleman D.D., *Development of an Electrostatic Positioner for Space Material Processing*. Review of Scientific Instruments, 1985. **56**(2): S. 307-317.
83. Wuerker R.F., Shelton H. und Langmuir R.V., *Electrodynamic Containment of Charged Particles*. Journal of Applied Physics, 1959. **30**(3): S. 342-349.
84. Gangopadhyay A.K., Lee G.W., Kelton K.F., Rogers J.R., Goldman A.I., Robinson D.S., Rathz T.J. und Hyers R.W., *Beamline electrostatic levitator for in situ high energy x-ray diffraction studies of levitated solids and liquids*. Review of Scientific Instruments, 2005. **76**(7): S. -.
85. Kelton K.F. und Gangopadhyay A.K., *Getting the hot structures*. Powder Diffraction, 2005. **20**(2): S. 87-93.

86. Strutt (Lord Rayleigh) J.W., *On the Equilibrium of Liquid Conducting. Masses Charged with Electricity*. Philos. Mag., 1882. **5**(14): S. 184-186.
87. Abbas M.A. und Latham J., *Instability of Evaporating Charged Drops*. Journal of Fluid Mechanics, 1967. **30**: S. 663-&.
88. Achtzehn T., Muller R., Duft D. und Leisner T., *The Coulomb instability of charged microdroplets: dynamics and scaling*. European Physical Journal D: Atomic, Molecular and Optical Physics, 2005. **34**(1-3): S. 311-313.
89. Schweizer J.W. und Hanson D.N., *Stability Limit of Charged Drops*. Journal of Colloid and Interface Science, 1971. **35**(3): S. 417-&.
90. Tafflin D.C., Ward T.L. und Davis E.J., *Electrified Droplet Fission and the Rayleigh Limit*. Langmuir, 1989. **5**(2): S. 376-384.
91. Reischl G., John W. und Devor W., *Uniform electrical charging of monodisperse aerosols*. Journal of Aerosol Science, 1977. **8**: S. 55-64.
92. Simon M. und Geim A., *Diamagnetic levitation: Flying frogs and floating magnets (invited)*. Journal of Applied Physics, 2000. **87**(9): S. 6200-6204.
93. Weber J.K.R., Hampton D.S., Merkley D.R., Rey C.A., Zatarski M.M. und Nordine P.C., *Aero-acoustic levitation: A method for containerless liquid-phase processing at high temperatures*. Review of Scientific Instruments, 1994. **65**(2): S. 456-465.
94. Dünges W., *Prächromatographische Mikromethoden, µl-Techniken für die biomedizinische Spurenanalytik*, 1979, Heidelberg: Verlag Dr. A. Hüthig.
95. Cserey A. und Gratzl M., *Rotating sample system: An equivalent of a rotating electrode for microliter samples*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(18): S. 3687-3692.
96. Neidhart B. und Welter E., *Analyses in Hanging Drops - a Modern Variant of Feigl Spot Tests*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1993. **346**(6-9): S. 536-538.
97. Cardoso A.A. und Dasgupta P.K., *Analytical-Chemistry in a Liquid-Film Droplet*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(15): S. 2562-2566.
98. Liu H.H. und Dasgupta P.K., *Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(11): S. 1817-1821.
99. Liu H.H. und Dasgupta P.K., *Analytical chemistry in a drop*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 1996. **15**(9): S. 468-475.
100. Welter E., *Ultraschalleiterte Tropfen – Ein neuer Ansatz für die chemische Mikroanalyse*. 1995, Philipps-Universität: Marburg.
101. Galipo R.C., Morgan S.L. und Brewer W.E., *A sample concentrator for sensitivity enhancement in chromatographic analyses*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(10): S. 2191-2195.
102. He Y. und Lee H.K., *Liquid phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(22): S. 4634-4640.
103. Reynolds O., *An Experimental Investigation of the Circumstances Which Determine Whether the Motion of Water Shall Be Direct or Sinuous, and of the Law of Resistance in Parallel Channels*. Philosophical Transactions Series I, 1883. **174**: S. 935-982.
104. Vogel H., *Gerthsen Physik*. Vol. 22, 1995: Springer-Verlag.
105. Kohlrausch F., *Praktische Physik*. Vol. 2, 1996, Stuttgart: Teubner.
106. Fechner G.T., *Elemente der Psychophysik*, 1860, Leipzig.
107. Schmidt W., *Optische Spektroskopie*, 1994, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
108. Mie G., *Articles on the optical characteristics of turbid tubes, especially colloidal metal solutions*. Annalen der Physik, 1908. **25**(3): S. 377-445.
109. Kubelka P. und Munk F., *Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche*. Z. tech. Physik., 1931. **12**: S. 593.
110. Förster T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **6**(2): S. 55-75.
111. Kasha M., *Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules*. Discussions of the Faraday Society, 1950(9): S. 14-19.

112. Pfaffl M.W., *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum, 2004. **10**(Sonderausgabe PCR): S. 92-95.
113. Ahmad A.I. und Ghasemi J.B., *New FRET primers for quantitative real-time PCR*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**(8): S. 2737-2743.
114. Levin R.E., *The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review*. Food Biotechnology, 2004. **18**(1): S. 97-133.
115. Massa W., *Kristallstrukturbestimmung*. 5. Ausgabe, Editor: Elschenbroich, Hensel und Hopf, 2007, Wiesbaden: Teubner Verlag.
116. Debye P. und Scherrer P., *Interference on inordinate orientated particles in roentgen light*. Physikalische Zeitschrift, 1916. **17**: S. 277-283.
117. Röntgen W.C., *Grundlegende Abhandlungen über die X-Strahlen*. Annalen der Physik und Chemie, 1898. **64**: S. 1-37.
118. Kramers H.A., *On the theory of X-ray absorption and of the continuous X-ray spectrum*. Philosophical Magazine, 1923. **46**(275): S. 836-871.
119. Koltay E., *X-Ray Spectroscopy in Atomic and Solid State Physics*, in *Nato ASI Series*, Editoren: Ferreira J.G. und M.T.Ramos. 1987, Plenum Press: New York, London.
120. Moseley H.G.J., *The High Frequency Spectra of the Elements*. Philosophical Magazine, 1913. **26**: S. 1024-1034.
121. Meneses C.T., Flores W.H., Sotero A.P., Tamura E., Garcia F. und Sasaki J.M., *In situ system for X-ray absorption spectroscopy experiments to investigate nanoparticle crystallization*. Journal of Synchrotron Radiation, 2006. **13**: S. 468-470.
122. Dudenverlag, *Das Wörterbuch chemischer Fachausdrücke*, in *DUDEN*. 2003, Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG: Mannheim.
123. Kashchiev D., *Nucleation: Basic Theory With Applications*. 2000.
124. Palms D., *Kristallisation von Zinkoxid in Gegenwart funktionalisierter Oberflächen*. 2003, Universität Mainz: Mainz.
125. Schmelzer J.W.P., *A new approach to nucleation theory and its application to phase formation processes in glass-forming melts*. Physics and Chemistry of Glasses, 2004. **45**(2): S. 116-120.
126. Wierzbowska B., Matynia A., Piotrowski K. und Koralewska J., *Solubility and nucleation in L(+)-ascorbic acid-methanol-ethanol-water system*. Chemical Engineering and Processing, 2007. **46**(4): S. 351-359.
127. Paul E.L., Tung H.H. und Midler M., *Organic crystallization processes*. Powder Technology, 2005. **150**(2): S. 133-143.
128. Ostwald W., *Über die vermeintliche Isomerie des roten und gelben Quecksilberoxyds und die Oberflächenspannung fester Körper*. Zeitschrift für Physikalische Chemie, 1900. **34**: S. 495-503.
129. Holleman A.F. und Wiberg E., *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Editor: Wiberg N. Vol. 101, 2007, Berlin; New York: de Gruyter.
130. Threlfall T.L., *Analysis of Organic Polymorphs - a Review*. Analyst, 1995. **120**(10): S. 2435-2460.
131. Jacob P., Stockhaus A., Hergenroder R. und Klockow D., *Phase transfer and freezing processes investigated on acoustically levitated aqueous droplets*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2001. **371**(6): S. 726-733.
132. Nagashio K., Takamura Y., Kuribayashi K. und Shiohara Y., *Microstructural control of NdBa2Cu3O7-delta superconducting oxide from highly undercooled melt by containerless processing*. Journal of Crystal Growth, 1999. **200**(1-2): S. 118-125.
133. Xie W.J., Cao C.D., Lu Y.J. und Wei B., *Levitation of iridium and liquid mercury by ultrasound*. Physical Review Letters, 2002. **89**(10): S. 104304-104304.
134. Tian Y. und Apfel R., *A novel multiple drop levitator for the study of drop arrays*. Journal of Aerosol Science, 1996. **27**(5): S. 721-737.

135. Gordon J.P., Zeiger H.J. und Townes C.H., *Molecular Microwave Oscillator and New Hyperfine Structure in the Microwave Spectrum of Nh3*. Physical Review, 1954. **95**(1): S. 282-284.
136. Johns H.E. und Cunningham J.R., *The Physics of Radiology*. 3. Ausgabe, Editor: Friedman M., 1978, Springfield, Illinois: Charles C Thomas.
137. Schwinger J., *On the Classical Radiation of Accelerated Electrons*. Physical Review, 1949. **75**(12): S. 1912-1925.
138. Tombouliau D.H. und Hartman P.L., *Spectral and Angular Distribution of Ultraviolet Radiation from the 300-Mev Cornell Synchrotron*. Physical Review, 1956. **102**(6): S. 1423-1447.
139. Cheetham A.K. und Wilkinson A.P., *Beugungsuntersuchungen mit Synchrotron-Röntgen- und Neutronenstrahlen in der Festkörperchemie*. Angewandte Chemie, 1992. **104**(12): S. 1594-1608.
140. Thompson A.C., et al., *X-RAY DATA BOOKLET*. 1. Ausgabe. Center for X-ray Optics and Advanced Light Source, Editor: Thompson A.C. und Vaughan D., 2001, Berkeley, California: Lawrence Berkeley National Laboratory.
141. Stribeck N., *X-Ray Scattering of Soft Matter*, 2006: Springer.
142. Ayers J.D., Elam W.T., Vold C.L., Qadri S.B., Skelton E.F. und Webb A.W., *Isothermal Study of Rapid Solid-State Reactions by Synchrotron Radiation*. Review of Scientific Instruments, 1985. **56**(5): S. 712-715.
143. Scherrer P., *Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen*, in *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften*. 1918: GöttingenS. 98-100.
144. Klug H.P. und Alexander L.E., *X-Ray Diffraction Procedures: For Polycrystalline and Amorphous Materials*. 2. Ausgabe, 1974: Wiley-Interscience. 992.
145. Mittelbach R., Fritz G. und Glatter O., *DECON for Windows*. 2005, Karl-Franzens University: Graz.
146. Forster S., Timmann A., Konrad M., Schellbach C., Meyer A., Funari S.S., Mulvaney P. und Knott R., *Scattering curves of ordered mesoscopic materials*. Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(4): S. 1347-1360.
147. Bergmann A., Fritz G. und Glatter O., *Singlebody for Windows*. 2005, Karl-Franzens University: Graz.
148. Bergmann A., Fritz G. und Glatter O., *Multibody for Windows*. 2005, Karl-Franzens University: Graz.
149. Schnablegger H. und Singh Y., *A Practical Guide to SAXS*, 2006: Anton Paar GmbH.
150. Pilz I., Glatter O. und Kratky O., *Small-angle X-ray scattering*. Methods Enzymol, 1979. **61**: S. 148-249.
151. Vandesinde W. und Persoons A., *The Size and Shape of Macromolecular Structures - Determination of the Radius, the Length, and the Persistence Length of Rodlike Micelles of Dodecyldimethylammonium Chloride and Bromide*. Journal of Physical Chemistry, 1985. **89**(3): S. 404-406.
152. Provencher S.W., *Contin - a General-Purpose Constrained Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic and Integral-Equations*. Computer Physics Communications, 1982. **27**(3): S. 229-242.
153. Grabowski E. und Morrison I., *Particle Size Distributions from Analysis of Quasi-Elastic Light-Scattering Data*, in *Measurements of Suspended Particles by Quasi-elastic Light Scattering*, Editor: Dahneke B. 1983, Wiley: New York.
154. Finsy R., *Particle Sizing by Quasi-Elastic Light-Scattering*. Advances in Colloid and Interface Science, 1994. **52**: S. 79-143.
155. Koppel D.E., *Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy - Method of Cumulants*. Journal of Chemical Physics, 1972. **57**(11): S. 4814-4820.
156. Internationalen Organisation für Normung, *Partikelgrößenanalyse - Photonenkorrelations-spektroskopie - ISO 13321*. 1996.

157. van de Hulst H.C., *Light scattering by small particles*, 1981, New York: Dover Publications.
158. Lakowicz J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Ausgabe, 2006, Berlin: Springer. 725.
159. Schulman S.G. und Sharma A., *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. 1. Ausgabe, 1999: Wiley & Sons.
160. Weinberg W., Mitschke M., Wriedt T. und Bauckhage K., *PDA measurements of evaporating inhomogeneous droplets trapped in an acoustic levitator*. *Technisches Messen*, 2000. **67**(3): S. 104-110.
161. Brenn G., Deviprasath L.J., Durst F. und Fink C., *Evaporation of acoustically levitated multi-component liquid droplets*. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2007. **50**(25-26): S. 5073-5086.
162. Rohling O., Weitkamp C. und Neidhart B., *Experimental setup for the determination of analytes contained in ultrasonically levitated drops*. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000. **368**(2-3): S. 125-129.
163. Ostwald W., *Studien über die Bildung und Umwandlung fester Körper*. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 1897. **22**: S. 289–330.
164. Krämer B., *Laboruntersuchungen zum Gefrierprozeß in polaren stratosphärischen Wolken, in Fachbereich Physik*. 1998, FU - Berlin: Berlin.
165. Krishnan S. und Price D.L., *X-ray diffraction from levitated liquids*. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2000. **12**(12): S. R145-R176.
166. Peng C.G., Chow A.H.L. und Chan C.K., *Study of the hygroscopic properties of selected pharmaceutical aerosols using single particle levitation*. *Pharmaceutical Research*, 2000. **17**(9): S. 1104-1109.
167. Meents A., *Zum Einfluss magnetischer Felder auf das Wachstum und die Qualität von Proteinkristallen*, in *Fachbereich Physik*. 2005, Universität Hamburg: Hamburg. 207 Seiten.
168. Lubbert D., Meents A. und Weckert E., *Accurate rocking-curve measurements on protein crystals grown in a homogeneous magnetic field of 2.4 T*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 2004. **60**: S. 987-998.
169. Yarin A.L., Brenn G., Kastner O., Rensink D. und Tropea C., *Evaporation of acoustically levitated droplets*. *Journal of Fluid Mechanics*, 1999. **399**: S. 151-204.
170. Santesson S., Cedergren-Zeppezauer E.S., Johansson T., Laurell T., Nilsson J. und Nilsson S., *Screening of nucleation conditions using levitated drops for protein crystallization*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(7): S. 1733-1740.
171. Cerenius Y., Oskarsson A., Santesson S., Nilsson S. und Kloo L., *Preliminary tests on the use of an acoustic levitator for liquid X-ray diffraction experiments*. *Journal of Applied Crystallography*, 2003. **36**: S. 163-164.
172. Pietsch U., Grenzer J., Geue T., Neissendorfer F., Brezsesinski G., Symietz C., Mohwald H. und Gudat W., *The energy-dispersive reflectometer at BESSY II: a challenge for thin film analysis*. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors, and Associated Equipment*, 2001. **467**: S. 1077-1080.
173. Savitzky A. und Golay M.J.E., *Smoothing + Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. *Analytical Chemistry*, 1964. **36**(8): S. 1627-1639.
174. Deshmukh B.T., Omanwar S.K. und Moharil S.V., *A New Color Center in NaCl*. *Physics Letters A*, 1983. **98**(4): S. 203-204.
175. Abrahams S.C. und Bernstein J.L., *Accuracy of an Automatic Diffractometer . Measurement of Sodium Chloride Structure Factors*. *Acta Crystallographica*, 1965. **18**: S. 926-932.
176. Leiterer J., Leitenberger W., Emmerling F., Thünemann A.F. und Panne U., *The use of an acoustic levitator to follow crystallization in small droplets by energy-dispersive X-ray diffraction*. *Journal of Applied Crystallography*, 2006. **39**: S. 771-773.
177. Zahn D., *Atomistic mechanism of NaCl nucleation from an aqueous solution*. *Physical Review Letters*, 2004. **92**(4): S. 040801-040804.

178. Zahn D., *Theoretical Approaches for the Investigation of Reaction Mechanisms, Crystal Nucleation and Phase Transitions*, in *Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften*. 2006, Technischen Universität Dresden: Dresden. 167 Seiten.
179. Kawaska A., Brickmann J., Kniep R., Hochrein O. und Zahn D., *An atomistic simulation scheme for modeling crystal formation from solution*. *Journal of Chemical Physics*, 2006. **124**(2): S. 024513-024517.
180. Zahn D., *Atomistic mechanisms of phase separation and formation of solid solutions: Model studies of NaCl, NaCl-NaF, and Na(Cl_{1-x}Br_x) crystallization from the melt*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2007. **111**(19): S. 5249-5253.
181. Guinier A., *X-Ray Diffraction: In Crystals, Imperfect Crystals, and Amorphous Bodies*, 1994: Dover Publications. 378.
182. OriginLab, *Origin*. 1991-2006, OriginLab Corporation: Northampton, MA, USA.
183. Lukacs E., *Characteristic functions*. 2. Ausgabe, 1970 (Original 1960), London: Griffin.
184. Paris O., Li C., Siegel S., Weseloh G., Emmerling F., Riesemeier H., Erko A. und Fratzl P., *A new experimental station for simultaneous X-ray microbeam scanning for small- and wide-angle scattering and fluorescence at BESSY II*. *Journal of Applied Crystallography*, 2007. **40**(s1): S. S466-S470.
185. Hammersley A.P., Svensson S.O., Hanfland M., Fitch A.N. und Hausermann D., *Two-dimensional detector software: From real detector to idealised image or two-theta scan*. *High Pressure Research*, 1996. **14**(4-6): S. 235-248.
186. Bond A.D., Boese R. und Desiraju G.R., *On the polymorphism of aspirin*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007. **46**(4): S. 615-617.
187. Weber P., Bendich A. und Schälch W., *Vitamin C and human health - A review of recent data relevant to human requirements*. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1996. **66**(1): S. 19-30.
188. *Powder Diffraction File (PDF)*. 2008, The International Centre for Diffraction Data (ICDD).
189. Ramstad K., Tydal T., Askvik K.M. und Fotland P., *Predicting carbonate scale in oil producers from high temperature reservoirs*, in *6th International Symposium on Oilfield Scale*. 2004, SPE 87430: Aberdeen (UK).
190. Zhang Y.P., Shaw H., Farquhar R. und Dawe R., *The kinetics of carbonate scaling - application for the prediction of downhole carbonate scaling*. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2001. **29**(2): S. 85-95.
191. Rieger J., Hadicke E., Rau I.U. und Boeckh D., *A rational approach to the mechanisms of incrustation inhibition by polymeric additives*. *Tenside Surfactants Detergents*, 1997. **34**(6): S. 430-435.
192. Kind M., *Product engineering*. *Chemical Engineering and Processing*, 1999. **38**(4-6): S. 405-410.
193. Gill R.A. und Fillers P.C.C., *High Opacity and a Whole Lot More*. 1990, TAPPI.
194. WU K.-T., Pat.PCT/US I., Editor. 1996.
195. Lowenstam H.A. und Weiner S., *On Biomineralization*, 1989, Oxford: University Press.
196. Bäuerlein E., *Biomineralization*, 2004, Weinheim: Wiley-VCH.
197. Beniash E., Addadi L. und Weiner S., *Cellular Control Over Spicule Formation in Sea Urchin Embryos: A Structural Approach*. *J. Struct. Biol.*, 1999. **125**(1): S. 50-65.
198. Colfen H. und Qi L.M., *A systematic examination of the morphogenesis of calcium carbonate in the presence of a double-hydrophilic block copolymer*. *Chemistry-a European Journal*, 2001. **7**(1): S. 106-116.
199. Rieger J., Frechen T., Cox G., Heckmann W., Schmidt C. und Thieme J., *Faraday Discussions*, 2007. **136**: S. 265-277.
200. Bolze J., Peng B., Dingenouts N., Panine P., Narayanan T. und Ballauff M., *Formation and growth of amorphous colloidal CaCO₃ precursor particles as detected by time-resolved SAXS*. *Langmuir*, 2002. **18**(22): S. 8364-8369.

201. Pontoni D., Bolze J., Dingenouts N., Narayanan T. und Ballauff M., *Crystallization of calcium carbonate observed in-situ by combined small- and wide-angle X-ray scattering*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(22): S. 5123-5125.
202. Chen T., Neville A., Sorbie K. und Zhong Z., *Using in situ synchrotron radiation wide angle X-ray scattering (WAXS) to study CaCO₃ scale formation at ambient and elevated temperature*. Faraday Discussions, 2007. **136**: S. 355-365.
203. Rieger J., Thieme J. und Schmidt C., *Study of precipitation reactions by X-ray microscopy: CaCO₃ precipitation and the effect of polycarboxylates*. Langmuir, 2000. **16**(22): S. 8300-8305.
204. Horn D. und Rieger J., *Nanoparticles in the Aqueous Phase—Theory, Experiment, and Use*. Angew. Chem. Int. Ed., 2001. **40**: S. 4340-4361.
205. Kitano Y., *The Behavior of Various Inorganic Ions in the Separation of Calcium Carbonate from a Bicarbonate Solution*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1962. **35**(12): S. 1973-1980.
206. Kitano Y., *A Study of the Polymorphic Formation of Calcium Carbonate in Thermal Springs with an Emphasis on the Effect of Temperature*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1962. **35**(12): S. 1980-1985.
207. Rietveld H.M., *A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures*. Journal of Applied Crystallography, 1969. **2**: S. 65-71.
208. Borchert H., Shevchenko E.V., Robert A., Mekis I., Kornowski A., Grubel G. und Weller H., *Determination of nanocrystal sizes: A comparison of TEM, SAXS, and XRD studies of highly monodisperse COPT₃ particles*. Langmuir, 2005. **21**(5): S. 1931-1936.
209. Khanna Y.P. und Taylor T.J., *Comments and Recommendations on the Use of the Avrami Equation for Physico-Chemical Kinetics*. Polym. Eng. Sci., 1988. **28**: S. 1042-1045.
210. Avrami M., *Kinetics of Phase Change. I. General Theory*. J. Chem. Phys., 1939. **7**: S. 1103-1112.
211. Ostwald W., *Z. Phys. Chem.*, 1897. **22**: S. 289-330.
212. Shen Q., Wei H., Zhou Y., Huang Y., Yang H., Wang D. und Xu D., *Properties of Amorphous Calcium Carbonate and the Template Action of Vaterite Spheres*. J. Phys. Chem. B, 2006. **110**: S. 2994-3000.
213. Faatz M., Grohn F. und Wegner G., *Amorphous calcium carbonate: Synthesis and potential intermediate in biomineralization*. Advanced Materials, 2004. **16**(12): S. 996-1000.
214. Debenedetti P.G., *Metastable Liquids*, 1996, Princeton: Princeton University Press.
215. Binder K., *Vol. 5 Phase Transformations in Materials, in Mater. Sci. Technol.*, Editor: Haasen P. 1991, VCH: Weinheim,.
216. Wolf S.E., Leiterer J., Emmerling F. und Tremel W., *New insights into the crystallization process of calcium carbonate by a contact-free in situ scattering technique using a levitating drop method*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **in press**.
217. Die Sterne, *Das Bißchen Besser*. Epc (Sony BMG). 1999
218. Deegan R.D., *Pattern formation in drying drops*. Physical Review E, 2000. **61**(1): S. 475-485.
219. Young T., *An Essay on the Cohesion of Fluids*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1805. **95**(65): S. 64-87.
220. Gennes P.G.D., *Wetting: statics and dynamics*. Reviews of Modern Physics, 1985. **57**(3): S. 827-863.
221. Decker E.L. und Garoff S., *Contact line structure and dynamics on surfaces with contact angle hysteresis*. Langmuir, 1997. **13**(23): S. 6321-6332.
222. Ristenpart W.D., Kim P.G., Domingues C., Wan J. und Stone H.A., *Influence of substrate conductivity on circulation reversal in evaporating drops*. Physical Review Letters, 2007. **99**(23): S. 234502-234501-234504.
223. Lehmann C.W. und Stowasser F., *The crystal structure of anhydrous beta-caffeine as determined from X-ray powder-diffraction data*. Chemistry-a European Journal, 2007. **13**(10): S. 2908-2911.

-
224. Brittain H.G., *Polymorphism and solvatomorphism 2005*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(4): S. 705-728.
225. Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T.F., Huber G., Nagel S.R. und Witten T.A., *Contact line deposits in an evaporating drop*. Physical Review E, 2000. **62**(1): S. 756-765.
226. Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T.F., Huber G., Nagel S.R. und Witten T.A., *Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops*. Nature, 1997. **389**(6653): S. 827-829.
227. Smalyukh I.I., Zribi O.V., Butler J.C., Lavrentovich O.D. und Wong G.C.L., *Structure and dynamics of liquid crystalline pattern formation in drying droplets of DNA*. Physical Review Letters, 2006. **96**(17): S. 177801-177804.
228. Christen W., Geggier S., Grigorenko S. und Rademann K., *Pulsed supersonic expansion of nonvolatile solids*. Review of Scientific Instruments, 2004. **75**(11): S. 5048-5049.
229. Derollez P., Correia N.T., Danede F., Capet F., Affouard F., Lefebvre J. und Descamps M., *Ab initio structure determination of the high-temperature phase of anhydrous caffeine by X-ray powder diffraction*. Acta Crystallographica. Section B, Structural Science, 2005. **61**: S. 329-334.
230. Andreeva L.V., Koshkin A.V., Letiedev-Stepanov P.V., Petrov A.N. und Alifimov M.V., *Driving forces of the solute self-organization in an evaporating liquid microdroplet*. Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **300**(3): S. 300-306.
231. Yakhno T.A., Yakhno V.G., Sanin A.G., Sanina O.A. und Pelyushenko A.S., *Protein and salt: Spatiotemporal dynamics of events in a drying drop*. Technical Physics, 2004. **49**(8): S. 1055-1063.
232. Hu H. und Larson R.G., *Marangoni effect reverses coffee-ring depositions*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(14): S. 7090-7094.
233. Elbahri M., Paretkar D., Hirmas K., Jebril S. und Adelung R., *Anti-Lotus effect for nanostructuring at the Leidenfrost temperature*. Advanced Materials, 2007. **19**(9): S. 1262-1266.
234. Adamson A.W., *Physical Chemistry of Surfaces*. 5. Ausgabe, 1990, New York: John Wiley & Sons, Inc.
235. Sutor D.J., *The Structures of the Pyrimidines and Purines. VII. The Crystal Structure of Caffeine*. Acta Crystallographica, 1958. **11**(7): S. 453-458.
236. Pirttimaki J., Laine E., Ketolainen J. und Paronen P., *Effects of Grinding and Compression on Crystal-Structure of Anhydrous Caffeine*. International Journal of Pharmaceutics, 1993. **95**(1-3): S. 93-99.
237. Griesser U.J., Szelagiewicz M., Hofmeier U.C., Pitt C. und Cianferani S., *Vapor pressure and heat of sublimation of crystal polymorphs*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 1999. **57**(1): S. 45-60.
238. Gennes P.G.D., Wyart F.B. und Quere D., *Capillarity and Wetting Phenomena Drops, Bubbles, Pearls, Waves*, 2004, New York: Springer.
239. *Cambridge Structural Database (CSD)*. 2007, The Cambridge Crystallographic Data Centre.
240. Bothe H. und Cammenga H.K., *Phase-Transitions and Thermodynamic Properties of Anhydrous Caffeine*. Journal of Thermal Analysis, 1979. **16**(2): S. 267-275.
241. Epple M., Cammenga H.K., Sarge S.M., Diedrich R. und Balek V., *The Phase-Transformation of Caffeine - Investigation by Dynamic X-Ray-Diffraction and Emanation Thermal-Analysis*. Thermochimica Acta, 1995. **250**(1): S. 29-39.
242. Bravais A., *Études Cristallographiques*, 1866, Paris: Gauthier Villars.
243. Friedel G., Bull. Soc. Franc. Mineral., 1907. **30**: S. 326.
244. Donnay J.D.H. und Harker D., *A new law of crystal morphology extending the law of bravais*. American Mineralogist, 1937. **22**(5): S. 446-467.
245. Leiterer J., Delißen F., Emmerling F., Thünemann A. und Panne U., *Structure analysis using acoustically levitated droplets*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(4): S. 1221-1228.
246. Glatter O. und Kratky O., *Small Angle X-ray Scattering*, 1982, London: Academic Press.

247. Huang T.C., Toraya H., Blanton T.N. und Wu Y., *X-Ray-Powder Diffraction Analysis of Silver Behenate, a Possible Low-Angle Diffraction Standard*. Journal of Applied Crystallography, 1993. **26**: S. 180-184.
248. Haussler W., Wilk A., Gapinski J. und Patkowski A., *Interparticle correlations due to electrostatic interactions: A small angle x-ray and dynamic light scattering study. I. Apoferitin*. Journal of Chemical Physics, 2002. **117**(1): S. 413-426.
249. Harrison P.M. und Arosio P., *Ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1996. **1275**(3): S. 161-203.
250. Chick H. und Martin C.J., *The density and solution volume of some proteins*. Biochemical Journal, 1913. **7**(1): S. 92-96.
251. *Protein Data Bank (PDB)*. 2008, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB).
252. Koradi R., *MOLMOL (MOLEcule analysis and MOLEcule display)*. 2003, ETH Zürich: Zürich.
253. Guinier A. und Fournet G., *Small-Angle Scattering of X-Rays*. Vol. XI, 1955, New York: Wiley. 268.
254. *IGOR Pro 6*. 2007, WaveMetrics, Inc.: Lake Oswego.
255. NIST, *SANS analysis package*. 2006, National Institute for Standards and Technology (NIST) Gaithersburgh, USA.
256. Percus J.K. und Yevick G.J., *Analysis of Classical Statistical Mechanics by Means of Collective Coordinates*. Physical Review, 1958. **110**(1): S. 1-13.
257. Zanchet D., Hall B.D. und Ugarte D., *Structure population in thiol-passivated gold nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(47): S. 11013-11018.
258. Pedersen J.S., *Analysis of small-angle scattering data from colloids and polymer solutions: modeling and least-squares fitting*. Advances in Colloid and Interface Science, 1997. **70**: S. 171-210.
259. Hoye J.S. und Blum L., *Solution of Yukawa Closure of Ornstein-Zernike Equation*. Journal of Statistical Physics, 1977. **16**(5): S. 399-413.
260. Liu Y., *Studies of Structure and Dynamics of Biological Macro-molecular Assemblies by Low Angle Neutron Diffraction and Inelastic X-ray Scattering*, in *Nuclear Science and Engineering*. 2005, Massachusetts Institute of Technology (MIT): Cambridge. 148 Seiten.
261. Chung S.K. und Trinh E.H., *Containerless protein crystal growth in rotating levitated drops*. Journal of Crystal Growth, 1998. **194**(3-4): S. 384-397.
262. Mori Y., Furukawa M., Hayashi T. und Nakamura K., *Size distribution of gold nanoparticles used by small angle x-ray scattering*. Particulate Science and Technology, 2006. **24**(1): S. 97-103.
263. Kohler J.M., Romanus H., Hubner U. und Wagner J., *Formation of star-like and core-shell AuAg nanoparticles during two- and three-step preparation in batch and in microfluidic systems*. Journal of Nanomaterials, 2007: S. 1-7.
264. van Bokhoven J.A., Louis C., T Miller J., Tromp M., Safonova O.V. und Glatzel P., *Activation of oxygen on gold/alumina catalysts: In situ high-energy-resolution fluorescence and time-resolved X-ray spectroscopy*. Angewandte Chemie-International Edition, 2006. **45**(28): S. 4651-4654.
265. Grego S., Velev O., Ramsey J.M. und Verpoorte S., *Symposium P: Materials and Strategies for Lab-on-a-Chip-Biological Analysis, Microfactories, and Fluidic Assembly of Nanostructures*, in *MRS Spring Meeting*. 2007: San Francisco, CA.
266. Davies A., Jacob P., Stockhaus A., Kuckuk R., Hill W., Hergenroder R., Zybin A. und Klockow D., *Acoustic trap for simplified micro-sample handling in laser spectroscopy*. Applied Spectroscopy, 2000. **54**(12): S. 1831-1836.
267. Puskar L., Tuckermann R., Frosch T., Popp J., Ly V., McNaughton D. und Wood B.R., *Raman acoustic levitation spectroscopy of red blood cells and Plasmodium falciparum trophozoites*. Lab Chip, 2007. **7**(9): S. 1125-1131.

268. Santesson S., Andersson M., Degerman E., Johansson T., Nilsson J. und Nilsson S., *Airborne cell analysis*. Anal. Chem., 2000. **72**(15): S. 3412-3418.
269. Evander M., Johansson L., Lilliehorn T., Piskur J., Lindvall M., Johansson S., Almqvist M., Laurell T. und Nilsson J., *Noninvasive acoustic cell trapping in a microfluidic perfusion system for online bioassays*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(7): S. 2984-2991.
270. Morgan J., Spengler J.F., Kuznetsova L., Coakley W.T., Xu J. und Purcell W.M., *Manipulation of in vitro toxicant sensors in an ultrasonic standing wave*. Toxicology in Vitro, 2004. **18**(1): S. 115-120.
271. Seaver M. und Peele J.R., *Noncontact Fluorescence Thermometry of Acoustically Levitated Waterdrops*. Appl. Opt., 1990. **29**(33): S. 4956-4961.
272. Omrane A., Sarner G. und Alden M., *2D-temperature imaging of single droplets and sprays using thermographic phosphors*. Appl. Phys. B, 2004. **79**(4): S. 431-434.
273. Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S. und Alivisatos A.P., *Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels*. Science, 1998. **281**(5385): S. 2013-2016.
274. de Mello A.J., *Seeing single molecules*. Lab Chip, 2003. **3**(2): S. 29N-34N.
275. Omrane A., Santesson S., Alden M. und Nilsson S., *Laser techniques in acoustically levitated micro droplets*. LAB ON A CHIP, 2004. **4**(4): S. 287-291.
276. Hertz P., *Concerning the average mutual distance between points, which are represented in space with a common density*. Mathematische Annalen, 1909. **67**: S. 387-398.
277. Seybold P.G., Gouterma.M und Callis J., *Calorimetric Photometric and Lifetime Determinations of Fluorescence Yields of Fluorescein Dyes*. Photochem. Photobiol., 1969. **9**(3): S. 229-242.
278. Charreyre M.T., Yekta A., Winnik M.A., Delair T. und Pichot C., *Fluorescence Energy-Transfer from Fluorescein to Tetramethylrhodamine Covalently Bound to the Surface of Polystyrene Latex-Particles*. Langmuir, 1995. **11**(7): S. 2423-2428.
279. Wang F., Tan W.B., Zhang Y., Fan X.P. und Wang M.Q., *Luminescent nanomaterials for biological labelling*. Nanotechnology, 2006. **17**(1): S. R1-R13.
280. Alivisatos A.P., *Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots*. Science, 1996. **271**(5251): S. 933-937.
281. Gaponenko S.V., *Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals*. Cambridge Studies in Modern Optics, 1998, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
282. Wang Y., *Luminescent CdTe and CdSe semiconductor nanocrystals: Preparation, optical properties and applications*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2008. **8**(3): S. 1068-1091.
283. Ziegler J., Merkulov A., Grabolle M., Resch-Genger U. und Nann T., *High-quality ZnS shells for CdSe nanoparticles: Rapid microwave synthesis*. Langmuir, 2007. **23**(14): S. 7751-7759.
284. Heidecker M., Yanmarriott Y. und Marriott G., *Proximity Relationships and Structural Dynamics of the Phalloidin Binding-Site of Actin-Filaments in Solution and on Single Actin-Filaments on Heavy-Meromyosin*. Biochemistry, 1995. **34**(35): S. 11017-11025.
285. Yu W.W., Qu L.H., Guo W.Z. und Peng X.G., *Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals*. Chemistry of Materials, 2003. **15**(14): S. 2854-2860.
286. Crooker S.A., Hollingsworth J.A., Tretiak S. und Klimov V.I., *Spectrally resolved dynamics of energy transfer in quantum-dot assemblies: Towards engineered energy flows in artificial materials*. Physical Review Letters, 2002. **89**(18): S. 1868021-1868024.
287. Franzl T., Koktysh D.S., Klar T.A., Rogach A.L., Feldmann J. und Gaponik N., *Fast energy transfer in layer-by-layer assembled CdTe nanocrystal bilayers*. Applied Physics Letters, 2004. **84**(15): S. 2904-2906.
288. Xu L., Xu J., Li W., Zhao W.M., Sun P., Ma Z.Y., Huang X.F. und Chen K.J., *Luminescence and resonant energy transfer of two sizes of CdTe quantum dots embedded in gelatin films*. Journal of Materials Science, 2007. **42**(23): S. 9696-9699.
289. Franzl T., Klar T.A., Schietinger S., Rogach A.L. und Feldmann J., *Exciton recycling in graded gap nanocrystal structures*. Nano Letters, 2004. **4**(9): S. 1599-1603.

290. Zhang K., Chang H.Y., Fu A.H., Alivisatos A.P. und Yang H., *Continuous distribution of emission states from single CdSe/ZnS quantum dots*. Nano Letters, 2006. **6**(4): S. 843-847.
291. Esen C., Weigel T., Sprynchak V. und Schweiger G., *Raman spectroscopy on deformed droplets: theory and experiment*. Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer, 2004. **89**(1-4): S. 79-85.
292. Wood B.R., Heraud P., Stojkovic S., Morrison D., Beardall J. und McNaughton D., *A portable Raman acoustic levitation spectroscopic system for the identification and environmental monitoring of algal cells*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(15): S. 4955-4961.
293. Lopez-Pastor M., Dominguez-Vidal A., Ayora-Canada M.J., Laurell T., Valcarcel M. und Lendl B., *Containerless reaction monitoring in ionic liquids by means of Raman microspectroscopy*. Lab on a Chip, 2007. **7**(1): S. 126-132.
294. Green J.H.S., *Vibrational Spectra of Benzene Derivatives .3. Anisole, Ethylbenzene, Phenetole Methyl Phenyl Sulphide and Ethyl Phenyl Sulphide*. Spectrochimica Acta, 1962. **18**(1): S. 39-50.
295. Howlett L.E., *Raman spectra of benzene and toluene*. Nature, 1931. **128**: S. 796-796.
296. Crigler E.A., *Raman spectra studies II The relative intensities of characteristic lines in Raman spectra of benzene-toluene mixtures*. Journal of the American Chemical Society, 1932. **54**: S. 4207-4217.
297. Surlykke A. und Kalko E.K.V., *Echolocating Bats Cry Out Loud to Detect Their Prey*. PLoS ONE, 2008. **3**(4): S. e2036.
298. Monte C., *interne Kommunikation mit AG 7.32 Infrarotstrahlungsthermometrie*. 2006, Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB).
299. Xie W.J., Cao C.D., Lu Y.J. und Wei B., *Eutectic growth under acoustic levitation conditions*. Phys. Rev. E, 2002. **66**(6).
300. Sacher S. und Krammer G., *Study of crystallization processes in an ultrasonic levitator*. Chemie Ingenieur Technik, 2005. **77**(3): S. 290-294.
301. Weis D.D. und Nardozi J.D., *Enzyme kinetics in acoustically levitated droplets of supercooled water: A novel approach to cryoenzymology*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(8): S. 2558-2563.
302. Haake A., Neild A., Radziwill G. und Dual J., *Positioning, displacement, and localization of cells using ultrasonic forces*. Biotechnology and Bioengineering, 2005. **92**(1): S. 8-14.
303. Bentrup U., Radnik J., Armbruster U., Martin A., Leiterer J., Emmerling F. und Brückner A., *Linking simultaneous in situ WAXS/SAXS/Raman with Raman/ATR/UV-vis spectroscopy: Multidimensional insight into the synthesis of molybdate catalyst precursors*. Topics in Catalysis, 2009. **52**(10): S. 1350-1359.
304. Biedasek S., Abboud M., Moritz H.-U. und Stammer A., *Online-Analysis on Acoustically Levitated Droplets*. Macromolecular Symposia, 2007. **259**: S. 390-396.
305. Jorabchi K., Westphal M.S. und Smith L.M., *In situ Mass Spectrometry of Levitated Droplets Using Charge Assisted Laser Desorption/Ionization*. 2008, Department of Chemistry, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706: 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics.
306. Stockhaus A., *Aufbau und Entwicklung einer akustischen Falle*, in *Institut für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie*. 1997, Universität Dortmund: Dortmund. 69 Seiten.

6.5 *Abbildungsverzeichnis*

Abb. 1	Analytische Anwendungen akustischer Levitation, von kleinen (links) zu großen (rechts) Abmessungen.....	9
Abb. 2	Einige Prinzipien der Levitation schematisch, angelehnt an [27].....	14
Abb. 3	Strahlung trifft auf Materie (Ellipse), schematisch im Modellbild der geometrischen Optik.....	18
Abb. 4	Schematisch Rayleigh- und Raman-Streuung im Energiediagramm.....	21
Abb. 5	Prinzip FRET im Energiediagramm vom Donor (links) zum Akzeptor (rechts).....	22
Abb. 6	Prozesse der Nukleation im Energiediagramm. Keimwachstum bis r_C vergrößert die Enthalpie (schraffierter Bereich); erst für größere Keimradien gelingt das Wachstum stabiler Partikel.....	26
Abb. 7	Schematisch Nukleation versus Kristallwachstum in der metastabilen Zone zwischen Löslichkeits- und Übersättigungskurve. Verlauf der Konzentration als Funktion der Temperatur.....	27
Abb. 8	Prinzip der Ultraschallfalle als akustischer Levitator. Schallpegel um 160 dB überwiegen die Gravitation. In jeden Druckknoten können Proben levitiert werden, wie in den drei mittleren Schallknoten durch die Levitation von drei Styroporbällen dargestellt.....	30
Abb. 9	Injektion eines Wassertropfens mittels μL -Pipette in den akustischen Levitator.....	31
Abb. 10	Suspendierte Siliciumcarbid-Partikel verschiedener Tropfenformen durch variierten Schallpegel.....	32
Abb. 11	Aufbau zweier gekreuzter Levitatoren. Horizontale ① und vertikale ② Falle sind ineinander verschiebbar ③, so dass sich die Schallfelder im gekoppelten Zustand senkrecht zueinander durchdringen.....	33
Abb. 12	Trockeneisversuche mit einer Ultraschallfalle.....	34
Abb. 13	Trockeneisversuche mit zwei gekreuzten Ultraschallfallen.....	34
Abb. 14	Würfelspiel mit Tröpfchen.....	34
Abb. 15	Würfelspiel mit Styroporkugeln.....	34
Abb. 16	Drehung der Rotationsachse eines rotationsellipsoidalen Styroporbällchens.....	35
Abb. 17	Vereinigung zweier Wassertropfen in gekreuzten Ultraschallfallen durch Änderung der Schallfelder.....	35
Abb. 18	Vereinigung von Styroporkugel mit Wassertropfen in gekreuzten Ultraschallfeldern.....	35
Abb. 19	Vereinigung von Styroporkugel mit Wassertropfen durch Positionieren zweier Ultraschallfallen.....	35
Abb. 20	Schematisch Erzeugung, Konditionierung und Nutzung von Synchrotronstrahlung.....	38
Abb. 21	Das magische Quadrat der Streuung kombiniert Funktionen im realen Raum (Abstände d) und Funktionen im reziproken Raum (Streuvektor q).....	42
Abb. 22	Streukurve und PDDF einfacher geometrischer Körper wie Kugel, Oblat, Prolat und Zylinder.....	46
Abb. 23	Optikschema und prinzipieller Aufbau des Zetasizer mit Blick von oben auf eine offene Standardküvette (angelehnt an Malvern Instruments, UK).....	49
Abb. 24	Bestimmung des Tropfenvolumens aus dessen Schattenfläche mittels drei unterschiedlicher Methoden.....	55
Abb. 25	Levitierte Referenzkugel.....	56
Abb. 26	Methodenvergleich zur Volumenbestimmung und deren Standardabweichungen.....	56
Abb. 27	Verlauf des Volumens eines verdunstenden Wassertropfens, bestimmt mit den Methoden A (Kreis), B (Ellipse) und C (Fläche).....	57

Abb. 28	Standardabweichung der Volumenbestimmung als Funktion der Messnummer und damit Tropfengröße.....	58
Abb. 29	Verhältnisse bei der Aufkonzentration in Kugelform und in einer Standardküvette.	59
Abb. 30	Volumen, Konzentration und Oberfläche eines verdunstenden Wassertropfens als Funktion der Zeit.	60
Abb. 31	Eingetrocknete Lösung aus L-Glutamin in Wasser im (REM).	61
Abb. 32	Eingetrocknete Lösung aus NaCl (links) bzw. Calciumcarbonat (rechts) in Wasser (REM).	61
Abb. 33	Schematischer Aufbau des Experiments an der Beamline mit integriertem akustischem Levitator (Falle).	63
Abb. 34	Diffraktogramme eines levitierten Tropfens wässriger Kochsalzlösung, beschriftet mit den Zeiten nach der jeweiligen Datenakkumulation.....	64
Abb. 35	Gemessene EDXD-Daten (kompakte Linie) und Reflexe von Natriumchlorid (ICSD, beschriftete Kreise). Die Intensität wurde bei den intensivsten Reflexen auf eins normiert.	65
Abb. 36	Skizze des experimentellen Aufbaus für Röntgenstreuexperimente (SAXS und WAXS) mit dem akustischen Levitator (Falle) als containerloser Probenhalter im Zentrum.	68
Abb. 37	Serie von Streukurven an Aspirin im wässrigen Tropfen als Funktion der Levitationszeit (31 min, oben) und Vergleich am Experimentende (kompakte Linie, unten) mit kristallographischer Datenbank (Deltafunktion).	70
Abb. 38	Streukurven von Vitamin C im Tropfen während der Verdunstung von Wasser (16 min, oben) und Vergleich am Experimentende mit Reflexen aus der Datenbank (Deltafunktionen, unten).	72
Abb. 39	Reaktionsgleichung und Streukurven während Wasser in einer Stunde verdunstet.	74
Abb. 40	Mikroskopbilder der verdunstenden Calciumcarbonatlösung im Levitator (links) und repräsentatives Streubild zum Experimentende (rechts).	75
Abb. 41	Partikel aus Calciumcarbonat nach 400 s im TEM (a, b) und nach kompletter Trocknung im REM (c, d). Die Maßstäbe sind a) 500 nm, b) 200 nm, c) 20 µm und d) 10 µm.	76
Abb. 42	400 s levitierter Tropfen im Kryo-REM mit Partikeln innen (a) und in einer 20 µm dicken Schicht an der Oberfläche (b). Die fasrigen Strukturen sind in beiden Bildern Artefakte der Probenpräparation bei der Gefrierdrying, die Maßstäbe a) 500 nm und b) 40 µm.	76
Abb. 43	Polymorphe von Coffein und deren strukturelle Beziehung in perspektivischen Blick (rechts) auf die Elementarzelle in Richtung [001] und zugehörige berechnete Pulverdiffraktogramme (links).	78
Abb. 44	Sitzender Coffeintropfen auf einer Polystyroloberfläche als Funktion der Zeit.	80
Abb. 45	Lichtmikroskopische Detail-Aufnahmen mitte links des Bildes in Abb. 44.	80
Abb. 46	Schema von Coffein (1,3,7-trimethylpurine-2,6-dione, $C_8H_{10}N_4O_2$) und Diffraktogramme zweier Regionen sowie theoretische Daten (gestrichelt) der α -Phase (grau) und β -Phase (schwarz).	81
Abb. 47	Coffein auf einem Glasplättchen (links unten) mit ausgewählten Regionen (A-D, rechts) und das indizierte Diffraktogramm der Region C sowie Reflexe der α -Modification (extrahiert aus Ref. [229]).	82
Abb. 48	Schematisch Kristallstruktur, Elementarzelle und BFDH Morphologie von α -Coffein. Die Glasoberfläche liegt in der Ebene, aufgespannt durch die b- und c-Achse.	83

Abb. 49	REM ausgerichteter Coffein-Nadeln in markierten Regionen (A, B und C). Die Vergrößerungen sind 370 (A), 2000 (B) und 1850 (C). Die dargestellten Maßstäbe 50 μm (A), 10 μm (B) und 10 μm (C).....	83
Abb. 50	AFM verschiedener Regionen A (20 \times 20) μm^2 , B (20 \times 20) μm^2 und C (40 \times 40) μm^2 und deren Höhenprofil im Diagramm (jeder Zehnte Punkt als Symbol).....	84
Abb. 51	Streukurven der Kristallisation von Coffein und REM am trockenen Rückstand.	85
Abb. 52	Streubilder von Coffein in der Falle (links) und auf einer Glasoberfläche (rechts) mit Miller-Indices.....	86
Abb. 53	Streubilder und gewonnene Streukurven von AgBeh bei verschiedenen Energien (9, 12 und 15 keV).	88
Abb. 54	Tropfenvolumen (Kreis) und entsprechende APO-Konzentration (Dreieck) als Funktion der Levitationszeit. Nur jeder 100ste Punkt ist mit einem Symbol markiert. Rechts: fester Rückstand im REM.	89
Abb. 55	Serie von SAXS-Kurven der Apoferritinlösung im levitierten Tropfen.	90
Abb. 56	Formfaktoren der Apoferritinlösung im levitierten Tropfen und der Simulation.	91
Abb. 57	Experimenteller (Kreise) und berechnete Formfaktoren mit monodispersen (Punkte) und polydispersen (Linie) Kern-Schale-Modell.	92
Abb. 58	Die Änderung des Strukturfaktors von APO mit zunehmender Konzentration.	93
Abb. 59	Streukurve von kolloidalem Gold in wässriger Lösung (Kreise) und Anpassung monodisperser (gestrichelte Linie) bzw. polydisperser (kompakte Linie) Kugeln. Das Photo zeigt deutlich die rote Farbe der kolloidalen Goldlösung im Tropfen.	94
Abb. 60	Typische TEM-Aufnahme sowie Korrelationsfunktion und Größenverteilung der Goldnanopartikel in der DLS.	95
Abb. 61	Verlauf des Tropfenvolumens und der daraus berechneten Konzentration des verdunstenden Tropfens.....	96
Abb. 62	Verlauf der Oberfläche und Exzentrizität des verdunstenden Tropfens.....	97
Abb. 63	Änderung der Streukurven als Funktion der Levitationszeit (oben) und Vergleich der Beugungsreflexe mit Datenbankdaten von Gold (unten).....	98
Abb. 64	SAXS Daten der Synthese von Goldnanopartikeln.	100
Abb. 65	XANES Daten der Synthese von Goldnanopartikeln einer Goldfolie [264] im Vergleich.	101
Abb. 66	Normierte Absorption und Fluoreszenz von Fluorescein bei 10 ⁻⁶ mol/L (oben) und Fluoreszenzspektren als Funktion der Konzentration (unten).	104
Abb. 67	Fluoreszenzspektren für Fluorescein als Funktion der Konzentration im akustischen Levitator (oben). Lage des Emissionsmaximums als Funktion der Farbstoffkonzentration (unten) in 10 mm-Küvette (Quadrat) und levitiertem Tropfen (Kreise). Einsatz: Tropfen unter Bestrahlung mit blauem Laser.....	105
Abb. 68	Normierte Spektren von CdSe/ZnS Nanokristallen in Lösung und schematischer Aufbau stabiler Nanokristalle.....	106
Abb. 69	Fluoreszenzspektren der Quantendots in Chloroform während der Levitation (Anregung mit $\lambda = 436 \text{ nm}$) sowie Intensität (Dreieck) und Lage (Quadrat) des Emissionsmaximums.....	107
Abb. 70	Levitierte Polyesterolkugel \textcircled{R} (rot) unter Bestrahlung eines He-Ne-Lasers \textcircled{L}	109
Abb. 71	Ramanspektren, aufgenommen in der Falle (durchgezogen) und in einer Standardküvette (gepunktet) für Toluol (oben) und Ethylbenzol (unten).	110
Abb. 72	Wärmebilder mit Temperaturskala ($^{\circ}\text{C}$) von Styropor (links) und Wasser (rechts).	113
Abb. 73	Siliciumcarbid Mikropartikel bilden vertikalen Ring im levitierten Wassertropfen.....	116

6.6 Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Fachgruppe „Strukturanalytik; Polymeranalytik“ an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) im Rahmen der Promotion an der Humboldt-Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe Instrumentelle Analytische Chemie von Prof. Dr. Ulrich Panne angefertigt. Der Dank gilt allen Beteiligten, angefangen bei meinem Doktorvater und Betreuenden, über Laboranten, Praktikanten, Diplomanden, Kollegen, Kooperationspartner bis hin zu den Meistern der Werkstatt und nicht zuletzt natürlich Freunden und Familie.

Dabei sind besonders hervorzuheben Arbeitsgruppenleiterin Dr. Franziska Emmerling, Fachgruppenleiter Dr. Andreas Thünemann und Abteilungsleiter Prof. Dr. Ulrich Panne. Der Gruppe Röntgenstrukturanalytik: Dr. Ralf Bienert, Dr. Burkhard Peplinski, Simone Rolf, Patrik Knappe, Jörg Polte, Werner Kraus, Jürgen Wenzel und Dr. Elena Maltseva danke ich für das freundliche Arbeitsklima, den Auszubildenden Sabine Anker, Dennis Erhardt und Dino Berners sowie den Praktikanten Sabrina Nowag, Madi Omirzak, Xeniya Kozina und Markus Jakobi für die tatkräftige experimentelle Unterstützung. Friedmar Delißen sei zusätzlich gedankt für die eifrige Bearbeitung der biologischen Themen im Rahmen seiner Masterarbeit. Dr. Markus Grabolle, Dr. Knut Rurack, Dr. Katrin Hoffmann, Dr. Ana Descalzo und Dr. Ute Resch-Genger danke ich für die unbürokratische Unterstützung und Hilfestellungen zur Fluoreszenz. Dr. Christian Monte ist für den physikalischen Halt und die Unterstützung bei Experimenten zu danken. Für die Chemie ist Stephan E. Wolf hervorzuheben, mit seinem fundiertem Wissen stets ein treuer Partner, auch zu nächtlichen Stunden am Synchrotron. Prof. Rademann gilt größter Dank für interessante Fragestellungen rund um Frühstadien der Kristallisation. Anka Kohl ist nicht nur als Lieblings-admin, sondern zusammen mit Franziska Schulte und Prof. Dr. Janina Kneipp auch für die Unterstützung zu IR und Raman zu danken. Maike Müller, Dr. Saara Kaaski und Dr. Igor Gornushkin haben immer das günstige Arbeitsklima im Labor- und Büro gefördert und konstruktiv geholfen. Für die tatkräftige Unterstützung am Synchrotron ist Dr. Stefan Siegel, Dr. Cheng Hao Li, Dr. Wolfram Leitenberger, Dr. Riesemeier zu danken, im speziellen danke ich für die Unterstützung zur Röntgenfluoreszenz Dr. Martin Radtke und Dr. Uwe Reinholz. Großer Dank gebührt auch den Experten der Polymeranalytik Dr. Steffen Weidner, Dr. Jana Falkenhagen und Volker Neyen. Für die gute Zusammenarbeit mit interessanten Fragestellungen zu katalytischen Reaktionen danke ich Dr. Jörg Radnik, Dr. Ursula Bentrup und Dr. Andreas Martin. Ebenso gilt Dank weiteren Initiatoren von Veröffentlichungen, wie Dr. Hans von Berlepsch, Prof. Dr. Rademann und Prof. Dr. Tremel. Ich danke den Gutachtern und Mitgliedern des Promotionsausschusses für ihre Expertise.

6.7 Publikationen

Im Rahmen der Promotion sind folgende Arbeiten entstanden und als Zeitschriftenartikel vorab veröffentlicht (siehe <http://www.leiterer.de/jork/veroeffentlichungen> für eine aktuelle Liste mit Tagungsbeiträgen wie Postern und Vorträgen).

- Leiterer J, Panne U, Thünemann A und Weidner S: *Intensified Polymerization in Acoustically Levitated Droplets*, in Vorbereitung, (2008).
- Leiterer J, Emmerling F, Radnik J, Armbruster U, Bentrup U, Martin A und Brückner A: *In situ monitoring of the drying process during the preparation of complex Mo-based oxides in levitated droplets with synchrotron X-ray scattering*, in Vorbereitung, (2008).
- von Berlepsch H, Wagner SC, Araghi RR, Pagel K, Leiterer J, Emmerling F, Schulz A, Böttcher C und Kokschi B: *Following the hydration state of de novo designed peptide-based amyloid fibrils: A combined TEM, AFM, and time-resolved WAXS study*, eingereicht, (2008).
- Bentrup U, Radnik J, Armbruster U, Martin A, Leiterer J, Emmerling F und Brückner A: *Linking simultaneous in situ WAXS/SAXS/Raman with Raman/ATR/UV-vis spectroscopy: Multidimensional insight into the synthesis of molybdate catalyst precursors*, **Topics in Catalysis** 52(10): S. 1350-1359, (2009).
- Leiterer J, Emmerling F, Panne U, Christen W und Rademann K: *Tracing coffee tabletop traces*, **Langmuir** 24(15): S. 7970, (2008).
- Wolf SE, Leiterer J, Emmerling F und Tremel W: *New insights into the crystallization process of calcium carbonate by a contact-free in situ scattering technique using a levitating drop method*, **Journal of the American Chemical Society** 130(37): S. 12342, (2008).
- Leiterer J, Grabolle M, Rurack K, Resch-Genger U, Ziegler J, Nann T und Panne U: *Acoustically Levitated Droplets – A Contactless Sampling Method for Fluorescence Studies*, **Annals of the New York Academy of Sciences** 1130: S. 78-84, (2008).
- Delißen F, Leiterer J, Bienert R, Emmerling F und Thünemann AF: *Agglomeration of Proteins in Acoustically Levitated Droplets*, **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 392(1-2): S. 161-165, DOI: (2008).
- Leiterer J, Delißen F, Emmerling F, Thünemann A und Panne U: *Structure analysis using acoustically levitated droplets*, **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 391(4): S. 1221, (2008).
- Delißen F, Leiterer J, Bienert R, Emmerling F, Panne U und Thünemann AF: *X-Ray Scattering of Suspended Proteins - Agglomeration of Apoferritin in Acoustically Levitated Droplets*, **BESSY Highlights 2007**, S. 32, ISSN: 1611-6127 (2008).
- Leiterer J, Emmerling F, Thünemann AF und Panne U: *Characterisation of levitated samples for modelling of condensed matter*. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie** 632(12-13): S. 2132, (2006).
- Leiterer J, Leitenberger W, Emmerling F, Thünemann AF und Panne U: *The use of an acoustic levitator to follow crystallization in small droplets by energy-dispersive X-ray diffraction*. **Journal of Applied Crystallography** 39: S. 771, (2006).