

Raman-spektroskopische Untersuchungen an Pflanzen und Mikroorganismen

Dissertation

zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Petra Rösch

aus
Stuttgart

Würzburg 2002

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)	5
2.1	Verstärkungsmechanismen	6
2.1.1	Elektromagnetische Verstärkung	7
2.1.2	Chemische Verstärkung	8
2.1.3	Oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS)	9
2.2	Substrate	9
2.2.1	Kolloide	10
2.2.2	Glasfaserspitzen	10
2.2.3	Aktivierung von SERS-Substraten	11
2.3	Anwendung auf biologische Proben	11
3	Chemometrik	13
3.1	Multivariate Analysenmethoden	14
3.2	Hierarchische Clusteranalyse (HCA)	18
3.2.1	Spektren-Vorbehandlung	19
	Glätten	19
	Basislinienkorrektur	21
	Ableitungen	22
	Normierung	22
3.2.2	Spektrale Bereiche	23
3.2.3	Ähnlichkeitsrechnungen	24

3.2.4	Clusteranalyse	27
4	Material und Methoden	33
4.1	Experimenteller Aufbau	34
4.1.1	Mikro-Raman-Spektroskopie	34
4.1.2	Labram-Raman-Spektrometer	35
4.1.3	Faseranschluss	38
4.2	Software	38
4.3	SERS-Substrate	39
4.3.1	Darstellung der Silberkolloide	39
4.3.2	Faserpräparation	39
4.4	Probenpräparation	39
4.4.1	Reinsubstanzen	39
4.4.2	Präparation der biologischen Proben	40
4.4.3	Probenpräparation für SERS-Untersuchungen	40
5	Inhaltsstoffe von Pflanzen	41
5.1	Anatomie von Pflanzengewebe	42
5.1.1	Anatomie	42
5.1.2	Reservestoffe und Kristalle	43
5.2	Raman-Spektroskopie an Pflanzen	45
5.3	SERS an Tabakpflanzen	45
5.3.1	Raman- und SERS-Spektren von Nicotin	46
5.3.2	Nicotin in Tabakpflanzen	49
5.3.3	Sonstige Substanzen	51
5.4	Kristalleinschlüsse	53

5.5	Speicherstoffe	55
6	Lipide im Xylem von Laubbäumen	57
6.1	Lipide	58
6.1.1	Struktur und Vorkommen	58
6.1.2	Lipide in der Auferstehungspflanze	60
6.1.3	Kältestress	61
6.2	Raman-Spektroskopie an Lipiden	62
6.3	Mikro-Raman-Spektroskopie von Öltröpfchen	62
6.3.1	Auferstehungspflanze	63
6.3.2	Pappel und Weide	64
6.3.3	Linde	76
7	Ätherische Öle	83
7.1	Exkretionszellen	84
7.1.1	Labiaten-Drüenschuppen	84
7.1.2	Lysigene Exkretionszellen	85
7.2	Taxonomie	86
7.3	Ätherische Öle	88
7.4	Analyse der ätherischen Öle	91
7.5	Untersuchung von Lamiaceae	91
7.5.1	Identifizierung von Inhaltsstoffen	92
	Untersuchung von Thymian und Oregano	93
	Untersuchung von Minzen	96
7.5.2	Unterschiedliche Kultivierung	107
7.5.3	Jahreszeitliche Variationen	112

7.6	Untersuchung von Citrus-Früchten	115
7.7	Hierarchische Clusteranalyse	118
7.7.1	Citrus-Früchte	119
7.7.2	Mentha	121
7.8	SERS-Sonde	125
8	Identifizierung von Mikroorganismen	129
8.1	Biologische Grundlagen	130
8.1.1	Bakterien	130
8.1.2	Pilze	131
8.2	Bestimmung von Mikroorganismen	132
8.3	Mikro-Raman-Spektroskopie	133
8.3.1	Untersuchungen an Kolonien	133
8.3.2	Raman-Mapping von Ausstrichen	136
8.3.3	Untersuchungen von Einzelorganismen	140
8.4	SERS-Sonde	141
8.5	Tip enhanced Raman spectroscopy (TERS)	144
9	Zusammenfassung	149
10	Summary	157
11	Literaturverzeichnis	165
	Anhang 1 - Strukturen der Monoterpene in den einzelnen ätherischen Ölen	185
	Anhang 2 - Gaschromatographische Analysen	191

Abkürzungen und Symbole

Botanik

f.	Form
L.	Linné
nm.	Nothomorphe
pip.	piperita
Syn.	Synonym
ssp.	Subspezies
var.	Varietät
ICBN	Internationalen Code der Botanischen Nomenklatur

Chemometrik

HCA	Hierarchische Clusteranalyse (<i>hierarchical cluster analysis</i>)
PC	<i>principal component</i>
FA	<i>factor analysis</i> (Faktoranalyse)
PCA	<i>principal component analysis</i>
SIMCA	<i>soft independent modeling of class analoga</i>
CLS	<i>classical least square</i>
PLR	<i>principal component regression</i>
ILS	<i>inverse least square</i>
PLS	<i>partial least square</i>

Kennzeichnung von Schwingungen

br	<i>broad</i>
m	<i>medium</i>
ip	<i>in plane</i>
s	<i>strong</i>
oop	<i>out of plane</i>
sh	<i>shoulder</i>
vs	<i>very strong</i>
vw	<i>very weak</i>
w	<i>weak</i>
v	Streckschwingung (<i>stretching vibration</i>)
δ	Deformationsschwingung (<i>deformation vibration</i>)
ρ	Pendelschwingung (<i>rocking vibration</i>)
τ	Torsionsschwingung (<i>twisting vibration</i>)
ω	Kippschwingung (<i>wagging vibration</i>)

Messmethoden und Geräte

ASR	<i>atomic scale roughness</i>
SERS	<i>surface enhanced Raman scattering</i>
SERRS	<i>surface enhanced resonance Raman scattering</i>
TERS	<i>tip enhanced Raman spectroscopy</i>
AFM	<i>atomic force microscope</i>
IR	Infrarot
NIR	<i>near infrared</i> (Nahes Infrarot)
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
CCD	<i>charge coupled devise</i>
OD	Optische Dichte
GC	Gas Chromatographie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>

Substanzen

Ste	Stearinsäure
Pam	Palmitinsäure
Myr	Myristinsäure
Ole	Ölsäure
Lin	Linolsäure
α Lnn	α -Linolensäure
γ Lnn	γ -Linolensäure
<i>sn</i>	<i>stereospecific numbering</i>
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin Monohydrat
DPPE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DPP	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat Dinatriumsalz
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine Dihydrat
DSPE	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine Monohydrat
DMPE	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
OPPC	1-Oleoyl-2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DLPC	1,2-Dilinoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
D α LPC	1,2-Dilinolenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PC	Phosphocholin
PE	Phosphoethanolamin
IPP	Isoprenpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
FPP	Farnesylpyrophosphat

1 Einleitung

„The idea of using vibrational spectroscopy to explore the properties of living organisms is as absurd as it is compelling. (...) But the prospect of attempting the vibrational spectrum of specific proteins, lipids, sugars or nucleic acids in a complex tissue matrix would send the most optimistic traditionalist fleeing in terror.“

R. A. Shaw, H. H. Mantsch, *J. Mol. Struct.* **1999**, 480-481, 1-13.

Die enorme Vielfalt der Biosynthesen, insbesondere des Sekundärstoffwechsels, führt zu Verbindungen, die auf biologische Systeme durch Beeinflussung der Stoffwechsel- und Regulationsvorgänge einwirken. Diese biogenen Wirkstoffe werden von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren gebildet. Die umfangreichste und vielseitigste Gruppe bilden die Wirkstoffe pflanzlicher Herkunft. Dazu gehören so unterschiedliche Substanz-Gruppen wie Toxine, Rauschmittel, Allergene, Arzneistoffe, Aroma- und Geschmacksstoffe. [1]

Die am längsten bekannten Arzneimittel sind biogener Herkunft. Dabei wird pflanzliches Material direkt (Blätter, Wurzeln, Früchte, etc.) oder in Form von Auszügen (Tees, Extrakte) bzw. isolierten stark wirksamen Verbindungen (Antibiotika, Alkaloide, herzwirksame Glykoside) verwendet. Als Phytotherapeutika werden die Zubereitungen höherer Pflanzen bezeichnet, die milde, in ihrer Wirkung nicht immer eindeutig und zuverlässig charakterisierbare Wirkstoffgemische enthalten. Zur Gewinnung neuer Wirkstoffe werden systematische Untersuchungen von Arzneipflanzen traditioneller Volksmedizinen durchgeführt. [1]

Für die Charakterisierung von Wirkstoffen und ihre Lokalisierung in den Organismen werden verschiedene Analysemethoden verwendet. Neben der traditionellen Extraktion mit anschließender chromatographischer Analyse, finden zunehmend auch Analysemethoden Anwendung, die es erlauben, Substanzen in ihrer natürlichen Umgebung zu analysieren, um chemische Reaktionen während des Extraktions-

schritten zu vermeiden. Neben der IR-Mikroskopie und der Festkörper-NMR ist das vor allem die Mikro-Raman-Spektroskopie [2].

Bei dieser Problemstellung bietet die Mikro-Raman-Spektroskopie mehrere Vorteile: Heterogene Proben können mit einer Ortsauflösung von weniger als 1 μm räumlich untersucht werden. Im Gegensatz zu vielen herkömmlichen Methoden wie NMR- oder IR-Spektroskopie, wird keine oder nur minimale Probenpräparation benötigt. Dies erlaubt eine schnelle Charakterisierung der Proben. Da Wasser nur schwache Raman-Signale zeigt, können auch stark wasserhaltige Gewebe (Protoplasma 60-90% Wasser) vermessen werden.

Durch die hohe örtliche Auflösung der Mikro-Raman-Spektroskopie sind tierische und pflanzliche Zellen mit einer Dimension von 1-200 μm bzw. Mikroorganismen (1-10 μm) leicht zugänglich. Zellen bestehen aus einer Vielzahl von unterschiedlichsten Substanzen (Proteine, DNA, Polysaccharide, Lipide, etc.) in einer Wasser-Matrix. Da jedes Molekül ein charakteristisches Raman-Spektrum („*Raman fingerprint*“) besitzt, ist es möglich, gesuchte Stoffe anhand von Markerbanden im Spektrum einer Zelle zu identifizieren. [3]

Durch die geringe Dimension einer Zelle und die Vielzahl der in ihr vorliegenden Stoffe, ist die Konzentration der gesuchten Substanz im Allgemeinen sehr gering. Zusätzlich besitzt der Raman-Effekt eine geringe Quantenausbeute. Daher ist es schwierig, Raman-Signale von Stoffen mit zu geringen Konzentrationen (< 1 %) zu detektieren. In einigen Fällen kommt es zudem bei einer Laserwellenlänge im sichtbaren Spektralbereich zur Anregung von Fluoreszenz, die die Raman-Signale vollständig überdecken kann. Da die Fluoreszenz ihren Ursprung in verschiedenen Zellinhaltsstoffen hat, ist es nicht möglich, diese durch „Ausbrennen“ (photochemische Zerstörung) zu entfernen. [4,5]

Verschiedene Möglichkeiten können das Auftreten von Fluoreszenz unterdrücken oder vermeiden. Durch die Verwendung von Lasern im NIR-Bereich [2,4-6], findet die Anregung außerhalb des Absorptions-Bereichs der meisten Moleküle statt, dadurch wird die Fluoreszenz-Anregung minimiert. Durch das ν^4 -Gesetz sind die Raman-Signale mit NIR-Anregung weniger intensiv als im sichtbaren Bereich, was

letztlich zu einer höheren Nachweisgrenze führt. Darüber hinaus ist die örtliche Auflösung der Mikro-Raman-Spektroskopie im IR-Bereich mit 10-15 μm (bei 1064 nm) deutlich höher als im sichtbaren Spektral-Bereich ($< 1 \mu\text{m}$). [7]

Eine weitere Möglichkeit Fluoreszenz zu vermeiden ist die Anregung im ultravioletten Spektral-Bereich. Allerdings kommt es bei dieser Methode häufig bei der Verwendung von zu hohen Leistungsdichten zu photochemischer Zersetzung der Probe. [3,8-10]

Eine andere Methode zur Fluoreszenz-Quenchung ist die Verwendung von SERS-Substraten wie Silber-Kolloiden. [11-18] Zusätzlich zu diesem Effekt treten bei der SERS-Spektroskopie Banden-Verstärkungen auf, wodurch die Nachweisgrenzen herabgesetzt werden. Durch die Anregung im sichtbaren Spektral-Bereich erhält man durch Kombination mit einem Raman-Mikroskop die gleiche örtliche Auflösung im *sub*- μm -Bereich, wie bei der Mikro-Raman-Spektroskopie. Allerdings kann es durch die Verwendung von SERS-Substraten zu einer Zerstörung der Probe über elektrochemische Reaktionen mit den Metall-Partikeln kommen. [19]

Die Untersuchung von Bakterien wird vor allem mit Anregungen im UV- [20] und IR-Bereich [21-23] vorgenommen, allerdings sind auch Analysen im sichtbaren Spektral-Bereich [24,25] bekannt. Dabei steht im Allgemeinen die Charakterisierung der Mikroorganismen [26] und nicht die Identifizierung der Inhaltstoffe [24,25,27] im Vordergrund.

Bisherige Anwendungen von Raman-Spektroskopie an eukariotischen Zellen liegen vor allem im medizinischen Bereich. In der Literatur sind die Raman-spektroskopischen Untersuchungen von Blutzellen bekannt. [28-30] Weiterhin können mit der Raman-Spektroskopie verschiedene Gewebetypen untersucht und z. B. zwischen gesundem und krankhaft veränderten Zelltypen unterschieden werden. [6,9,31-34]

Im Bereich der Raman-Spektroskopie an Pflanzen sind Untersuchungen an den Zellwänden von verschiedenen Hölzern [35] und über den Protein-Anteil von Weizen [36] bekannt. B. Schrader et al. [4,5] konnten durch FT-Raman-Spektroskopie verschiedene Pigmente und Inhaltstoffe in Pflanzen nachweisen. E. Urlaub [7] konnte

durch Mikro-Raman-Spektroskopie verschiedene Alkaloide im Gewebe der Liane *A. heyneanus* lokalisieren und charakterisieren.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der Mikro-Raman-Spektroskopie Inhaltsstoffe mit möglichst minimalem präparativem Aufwand direkt in Pflanzen und Mikroorganismen zu identifizieren und zu lokalisieren. Aufgrund der guten örtlichen Auflösung wird dabei eine Anregung im sichtbaren Spektral-Bereich mit geringen Laserleistungen verwendet, um gleichzeitig eine photochemische Zersetzung der Proben zu minimieren. Auftretende Fluoreszenz soll durch den Einsatz von unterschiedlichen SERS-Substraten unterdrückt werden.

Dabei sollen verschiedene Pflanzeninhaltsstoffe wie z. B. Alkaloide im Gewebe unterschiedlicher Pflanzenteile mittels Mikro-SERS-Spektroskopie lokalisiert und Zellkompartimente wie Speicherstoffe und Kristalle Raman-spektroskopisch charakterisiert werden.

Desweiteren sollen Öltröpfchen im Xylem verschiedener Laubbäume untersucht werden, ebenso wie die ätherischen Öle verschiedener Lamiaceen-Pflanzen und Citrus-Früchte. Anhand der spektroskopischen Daten soll eine chemotaxonomische Charakterisierung mit chemometrischen Methoden an Citrus-Früchten und Minzen durchgeführt werden.

Eine weitere Anwendung stellt die Charakterisierung und Identifizierung von Mikroorganismen dar. Dabei soll das Probenvolumen sukzessive von Kolonien bis auf einige wenige Mikroorganismen verringert werden.

2 Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS) kurz erläutert. Zu Beginn werden die wichtigsten Verstärkungsmechanismen diskutiert. Danach wird auf die eingesetzten SERS-Substrate und die benötigten Metalle eingegangen. Zum Schluss werden noch ausgewählte Beispiele der SERS-Spektroskopie an biologischen Proben präsentiert.

2.1 Verstärkungsmechanismen

Bei der Raman-Spektroskopie treten verschiedene Phänomene auf, die die Detektion von Raman-Signalen stören können oder sie zum Teil sogar verhindern. Der größte Störfaktor ist die Fluoreszenz, deren Intensität etwa sechs Größenordnungen stärker ist als die der Raman-Signale und diese völlig überdecken kann. Eine Möglichkeit die Raman-Banden zu verstärken besteht in der Anwendung der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie oder *surface enhanced Raman scattering* (SERS).

Die Oberflächen-verstärkte Raman Spektroskopie (SERS) beruht auf dem spektroskopischen Phänomen bei dem Moleküle oder Ionen in nahem Kontakt (chemi- oder physisorbiert) zu einer bestimmten metallischen Oberfläche (SERS-Substrat) ein Raman-Signal zeigen, das wesentlich intensiver ist als das Raman-Signal dieser Spezies in Abwesenheit der Oberfläche. [37]

In einigen Fällen erfahren die Raman-Signale eine Verstärkung in einer Größenordnung von 10^6 - 10^8 . Bei neuen Messungen wurde sogar von Verstärkungen in der Größenordnung von 10^{13} - 10^{14} berichtet. [38-40] Zusätzlich bewirkt der Einsatz von SERS-Substraten eine Fluoreszenz-Quenchung.

Da in dieser Arbeit die Anwendung der SERS-Spektroskopie und nicht ihre theoretische Betrachtung im Vordergrund steht, wird an dieser Stelle nur ein kurzer Einblick in die Theorie gegeben. Für eine eingehende Betrachtung soll auf die Literatur verwiesen werden. [41-43]

Raman-Streuung entsteht durch einen induzierten Dipol μ durch die Interaktion des elektromagnetischen Feldes E mit der molekularen Polarisierbarkeit α :

$$\mu = \alpha \cdot E . \quad (2.1)$$

Wird entweder α (chemisch) oder E (elektromagnetisch) erhöht, beobachtet man eine Verstärkung des Raman-Signals. In der Literatur werden daher hauptsächlich Verstärkungs-Mechanismen chemischen bzw. elektromagnetische Ursprungs diskutiert.

Des Weiteren wird diskutiert, ob die Verstärkung auch von solchen Spezies ausgehen kann, die durch eine Laser-bedingte Oberflächenzerstörung entstehen. Dies führt zu einer Konzentration der adsorbierten Moleküle an verbrannten Stellen auf der Metall-Oberfläche. [37]

2.1.1 Elektromagnetische Verstärkung

Oberflächen-Rauhigkeit ist eine essentielle Voraussetzung für das Entstehen einer Signalverstärkung. In einer glatten Metall-Oberfläche existieren Oberflächen-Plasmonen als an die Metall-Oberfläche gebundene Elektronenwellen. Sie sind ausschließlich in der Lage, sich parallel zur Oberfläche zu bewegen und können nicht austreten. Bei einer rauen Oberfläche sind die Plasmonen nicht länger in einer Bewegungsrichtung festgelegt, das resultierende elektrische Feld kann sowohl parallel wie auch senkrecht abgestrahlt werden. [44]

Wenn Photonen geeigneter Frequenz auf eine raue Metall-Oberfläche fallen, kann es zu einer Anregung der Plasmonen-Resonanz kommen. Aufgrund der rauen Oberfläche wird das Licht gestreut. Das Ergebnis der Plasmon-Anregung ist eine große Verstärkung des elektrischen Feldes. Es ist die Interaktion des elektrischen Feldes mit dem Adsorbat, das die verstärkte Streuung bewirkt. [44]

Zusätzlich bewirken die Unterschiede in den Dielektrizitäts-Konstanten zwischen der rauen Oberfläche und dem umgebenden Medium eine Konzentration der elektrischen Felddichte an den scharfenkantigen Bereichen der Oberfläche. Dieser Verstärkungs-Mechanismus ist als „*lightning rod effect*“ bekannt. [45,46]

In der Literatur wurde eine Abhängigkeit der Verstärkung von $(a/r)^2$ beschrieben, wobei r der Abstand des Moleküls von der gekrümmten Oberfläche des SERS-Substrats mit dem Krümmungsradius a ist. Ein Molekül muss sich nicht in unmittelbarer Nähe der SERS-aktiven Oberfläche befinden, um eine Verstärkung zu erfahren, allerdings ist die größte Signalverstärkung bei Molekülen in der ersten Monolage auf der Oberfläche zu erwarten. [37]

Betrachtet man nicht ein einzelnes, isoliertes Metall-Partikel sondern mehrere (z. B. Metallinseln oder Kolloide), so erkennt man, dass die elektrische Felddichte

zwischen zwei Partikeln unter bestimmten Umständen sehr groß werden kann. Dicht gepackte Partikel erzeugen ein vollständig anderes Plasmon-Resonanz-Feld als ein einzelnes Partikel. [47-51]

2.1.2 Chemische Verstärkung

Obwohl das elektromagnetische Modell mehrere wichtige Phänomene des SERS-Effekts erklärt, können nicht alle Eigenschaften beschrieben werden. Vor allem sollte nach dem elektromagnetischen Modell der SERS-Effekt unabhängig von der chemischen Natur der adsorbierten Moleküle sein, da die chemische Struktur im elektromagnetischen Modell nicht mit einbezogen wird. [52]

Ein theoretischer Ansatz im Bereich der chemischen Verstärkung wird als *charge-transfer*-Effekt bezeichnet. Er erklärt vor allem, dass die Verstärkung der ersten adsorbierten Schicht an der Metall-Oberfläche wesentlich stärker ist als die der zweiten. Grundsätzlich kommt der Verstärkungs-Anteil aus dem *charge-transfer*-Effekt, wenn Moleküle auf der aufgerauten Oberfläche chemi- oder physisorbieren und einen Adsorbat-Metall-Komplex bilden. [44]

Wenn Chemisorption stattfindet, werden die Molekül-Orbitale des Adsorbats durch eine Interaktion mit dem Leiterband der Metall-Oberfläche verbreitert. Dadurch können Elektronen von Metall zum Adsorbat und umgekehrt fließen.

Eine weitere Theorie ist die des Adatoms. [52] Die chemische Verstärkung ist vor allem bei Molekülen sehr effektiv, die an sogenannten Defekt-Stellen auf der Metall-Oberfläche adsorbiert sind. Das Adatom-Modell postuliert zusätzliche Raman-Verstärkung für Adsorbate, die an speziellen Stellen von atomarer Rauigkeit an das Metall gebunden sind (*atomic scale roughness* ASR). Diese Stellen sollen den *charge-transfer*-Verstärkungs-Mechanismus erleichtern, da sie den Adsorptions-Prozess des Moleküls vereinfachen. Man geht davon aus, dass diese Stellen eine Rauigkeit auf atomarer Ebene auszeichnen, und in der Größenordnung von fünf- bis sechsatomigen Clustern sind. [52]

Chemische Verstärkung kann zu Banden-Verschiebung solcher Moden führen, deren Atome an die Metall-Oberfläche gebunden sind. Eine bevorzugte Verstärkung dieser Moden wird erwartet, da diese Banden der Metall-Oberfläche am nächsten sind. [53]

2.1.3 Oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS)

Wird durch das eingestrahlte Laserlicht nicht nur eine Resonanz in den Oberflächen-Plasmonen des Metalls, sondern auch ein resonanter Übergang beim Raman-Effekt angeregt, so spricht man von SERRS (*surface enhanced resonance Raman scattering*). Das adsorbierte Molekül muss in diesem Fall im Bereich der eingestrahnten Frequenz absorbieren, ist also in aller Regel ein Chromophor. Die Verstärkung ist größer als die von Resonanz-Raman oder SERS alleine. Durch den SERRS-Effekt erhält man im Vergleich zu SERS eine Verstärkung von drei bis vier Größenordnungen, also eine Gesamt-Verstärkung von bis zu 10^{10} . [44]

2.2 Substrate

Als SERS-aktive Materialien werden im Allgemeinen Edelmetalle wie Gold [54], Silber oder Kupfer [55] verwendet. Für die Wahl des Metalls ist dabei die Anregungswellenlänge ausschlaggebend. Silber wird bei Anregung im blaugrünen Spektralbereich verwendet, während Gold für eine Anregung im roten Spektralbereich besser geeignet ist. Kupfer liegt in der Anregung im Bereich zwischen Silber und Gold. [56]

In der Literatur sind auch Verstärkungseffekte anderer Metalle beschrieben. Dabei handelt es sich um Übergangsmetalle wie Pt oder Ni bzw. um Alkalimetalle (Li, Na, K). [52,57] Auch binäre Metallinselnfilme wie Ag-Ni oder Ag-Fe finden Anwendung. [58]

SERS-Substrate müssen wie oben erwähnt eine raue Metalloberfläche besitzen. Die am häufigsten verwendeten SERS-Substrate sind Variationen von elektrochemisch aufgerauten Elektroden [42,59-61] oder Metallinselnfilmen [52,62,63]. Diese Substrate sind für den Gebrauch an oder innerhalb von pflanzlichem Gewebe nur bedingt

geeignet. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit vor allem Silberkolloide verwendet. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

2.2.1 Kolloide

Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten Kolloide darzustellen. Die am häufigsten verwendete Methode ist die chemische Reduktion von Silbernitrat mit Natriumcitrat [55,64-69] bzw. mit Borhydrat [55,67,70,71]. Bei der Reduktion von Silbernitrat bleiben immer geringe Rückstände der Ausgangssubstanzen (vor allem des Reduktionsmittels) erhalten. Bei der Reduktion mit Borhydrid bildet sich zum Beispiel Borat. Um diese Rückstände zu vermeiden, ist es auch möglich, Metall-Kolloide mit Hilfe der Laser-Ablations-Technik herzustellen [41]. Dabei werden durch einen stark fokussierten Laserstrahl einzelne Partikel aus einer Metalloberfläche herausgeschlagen. Da Borat für biologische Proben zu aggressiv ist und die ablatierten Kolloide nur schwer zu reproduzieren sind, wurden für diese Arbeit die Kolloide mit Natriumcitrat dargestellt (s. Kap. 4.3.1).

2.2.2 Glasfaserspitzen

Da Schwermetall in biologischen Geweben durch das Auslösen elektrochemischer Reaktionen immer als Zellgift angesehen werden muss, ist es wichtig, die Menge des eingebrachten Metalls zu minimieren. Bei der Verwendung von Kolloiden werden diese über die ganze Probe verteilt. Aus diesem Grund wurde eine Möglichkeit gesucht, sowohl eine minimale Menge an SERS-aktivem Material, als auch eine Methode mit nur lokaler Kontamination der Probe zu finden.

Eine Möglichkeit, SERS-Substrat auf kleine Flächen zu lokalisieren, ist die Verwendung einer Glasfaser mit einem Silber-beschichteten Faserende. [72,73] Für optimalen Lichtdurchsatz haben diese Glasfasern normalerweise ein stumpfes Faserende, und können daher nur schwer in Gewebe eingesetzt werden.

Eine Weiterentwicklung sind geätzte Glasfaserspitzen, die mit Silber beschichtet ist. [74,75] Dadurch kann die Schwermetall-Konzentration innerhalb der Probe minimiert und die SERS-aktive Spitze der Sonde unter Ausnutzung einer guten Ortsauflösung

selektiv auf bzw. in der zu untersuchenden Probe positioniert werden (Darstellung s. Kap. 4.3.2).

2.2.3 Aktivierung von SERS-Substraten

Anorganische Anionen spielen für die Aktivierung von SERS-Substraten wie Kolloide eine wichtige Rolle. Es konnte mehrfach beobachtet werden, dass Chromophore nur dann eine SERS-Verstärkung zeigen, wenn Chlorid auf der Metalloberfläche coadsorbiert wird. Für die Aktivierung von SERS-Substraten können F^- , Cl^- , Br^- , I^- und SO_4^{2-} verwendet werden, allerdings findet Cl^- in der Praxis am häufigsten Anwendung. [37,56]

Weiterhin führt die Zugabe von anorganischen Anionen wie Cl^- bei Metall-Kolloiden zu einer Aggregation der Partikel oder induziert darüber hinaus eine Adsorption von Spezies, die an die „saubere“ Metall-Oberfläche nur schwach binden. [37,76]

2.3 Anwendung auf biologische Proben

Die meisten Anwendungen der SERS-Spektroskopie sind an isolierten Substanzen beschrieben. Für forensische Untersuchungen ist die Identifikation von verschiedenen Lippenstift-Farben mittels SERS bekannt. [77-80] Weiterhin werden in der Literatur viele Einsatzbereiche für die SERS-Spektroskopie an biologisch relevanten Molekülen wie Peptiden oder Proteine [81-85], sowie die Untersuchung isolierter, photosynthetischer Membranen mit Kolloiden bzw. Elektroden [86-101] beschrieben. Silber-Kolloide werden auch für die Untersuchung von isolierten Augenlinsenzpigmenten in gesunden Linsen und bei Auftreten von Katarakt verwendet. [102,103]

Seltener wird diese Technik auf lebende Zellen angewendet. Hier sei vor allem die Interaktion von Anti-Tumor-Medikamenten mit DNA an isolierten Molekülen [104-108] und innerhalb von Krebszellen durch den Einsatz von Silber- und Gold-Kolloiden genannt. [11-14,16,17,109,110] Neben dem Einsatz von Kolloiden werden auch Mikroelektroden [59,61] verwendet. Eine Variation dieser Methode, bei der eine elektrochemisch gebildete Silberdrahtspitze als Sonde für die Untersuchung verwendet wird, erlaubt es, verschiedene Stellen in Zebrafischembryos durch

unterschiedliche Platzierung der Sonde im Gewebe zu untersuchen. [18] Eine weitere Arbeit bezieht sich auf die *In-Vivo*-Darstellung von Kolloiden innerhalb von Bakterienzellen. [111]

Die Kolloide werden im Fall von tierischen Zellen mittels Zentrifugieren [11-17] in die Zellen eingebracht. Bei der Verwendung von pflanzlichen Zellen ist diese Methode nur bedingt möglich, da pflanzliche Zellen eine zusätzliche Zellwand besitzen. Die Zellen liegen in der Regel nicht isoliert vor, sondern in einem Zellverbund. Durch Zentrifugieren des Gewebes kann es somit zu Störungen in der Umgebung kommen. Dies läuft dem Anspruch dieser Arbeit möglichst minimal invasiv zu arbeiten zuwider.

3 Chemometrik

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den statistischen Auswertemethoden einer Vielzahl von Raman-Spektren mit Hilfe der Chemometrik. Zu Beginn werden die einzelnen Methoden kurz beschrieben und charakteristische Beispiele gegeben. Bevor die in dieser Arbeit verwendete hierarchische Clusteranalyse (HCA) im Detail besprochen wird, wird noch kurz auf die Spektren-Vorbehandlungen wie Glätten, Basislinienkorrektur, Normierung und Bildung von Ableitungen eingegangen und die Auswahl von geeigneten spektralen Bereichen für die Clusteranalyse beschrieben.

3.1 Multivariate Analysenmethoden

Spektroskopische Untersuchungen an biologischen Proben wie Geweben oder ganzen Zellen ergeben eine Flut von Daten: Man erhält eine große Anzahl sehr ähnlicher Spektren, die wiederum aus Tausenden von Datenpunkten pro Spektrum bestehen. [112] Aus diesem Grund ist es daher unumgänglich, sich einer statistischen Auswertung zu bedienen, da eine intuitive Verarbeitung einer solchen Datenflut nicht realisierbar ist.

Spektroskopische Daten lassen oft Rückschlüsse auf physikalische oder chemische Eigenschaften der untersuchten Proben zu. [113] Auf diesen Tatsachen beruht die Chemometrik als Kombination von physikalischen Meßmethoden und statistischer Auswertung.

Eine allgemeine Definition beschreibt Chemometrik als die Anwendung von statistischen und mathematischen Methoden zur Analyse chemischer Daten. Eine weitergehende Definition wird von Beebe et al. [114] gegeben. Sie bezeichnet die Chemometrik als den vollständigen Prozess, bei dem Daten (z. B. Zahlen in einer Tabelle) in Informationen umgesetzt werden, die zur Entscheidungsfindung herangezogen werden können.

Eine grobe Unterteilung der Methoden kann prinzipiell in univariate und multivariate Analysemethoden vorgenommen werden. [115] Dabei betrachtet eine univariate Methode nur die Korrelation einer einzigen Eigenschaft, während sich multivariate Methoden auf eine Vielzahl von Eigenschaften stützen und somit optimal für spektroskopische Verfahren geeignet sind. Im Weiteren wird nur auf die multivariaten Verfahren eingegangen.

Die biologische Anwendung von multivariaten statistischen Methoden auf IR- und Raman-Daten geht zurück auf die Verwendung von *classical least square* (CLS) oder *multiple linear regression* (MLR) zur Analyse von Blut-Komponenten [116]. Seit den 1990ern ist die Kombination von IR- und Raman-Spektroskopie mit Chemometrik weit verbreitet.

Normalerweise ist für eine qualitative Schema-Erkennung das Ziel einer solchen Untersuchung, entweder Komponenten in einer Probe zu identifizieren oder Unterschiede zwischen verschiedenen Proben dafür zu verwenden, sie ohne vorherige Kenntnisse z. B. ihrer Zusammensetzungen oder chemischer bzw. physikalischer Eigenschaften in Klassen einzuteilen. [117]

Bei der Identifizierung von Komponenten wird zunächst ein Modell trainiert, die Unterschiede bekannter Proben festzustellen, um dann in einem zweiten Schritt unter Zuhilfenahme des aufgestellten Modells eine unbekannte Probe vorherzusagen. Da diese Klassifizierung vorheriges Wissen wie z. B. Zusammensetzung oder Eigenschaften der Proben für das aufzustellende Modell benötigt, spricht man in diesem Fall von einer überwachten Technik.

Die gebräuchlichste Technik hierfür ist SIMCA (*soft independent modeling of class analogy*). Dabei wird jede Objektgruppe durch ein geeignetes Hauptkomponentenmodell beschrieben und ein Testkomponentenmodell in diejenige Gruppe eingeordnet, zu deren Modell es am nächsten liegt. [118]

Ootake und Kokot [119,120] verwendeten NIR-, IR- und Raman-Spektroskopie um Gluten-haltigen von nicht Gluten-haltigen Reis mittels SIMCA zu unterscheiden. Weiterhin ist es mit dieser Methode z. B. möglich Parasiten in Kabeljau-Filets mit Hilfe von multispektralen *Images* zu identifizieren [121].

Ansätze die natürliche Gruppierungen oder Cluster in einem Datensatz identifizieren werden als nicht überwachte Verfahren bezeichnet, da keine weitergehenden Informationen wie Zusammensetzung oder andere Eigenschaften für die Berechnung des Modells benötigt werden.

Für nicht überwachte Analysen verwendet man die hierarchische Clusteranalyse (HCA), die *principal component analysis* (PCA) bzw. die Faktor-Analyse (FA). Bei der HCA wird der Datensatz in homogene Klassen (sogenannte Cluster) unterteilt. Die Objekte innerhalb eines Clusters sind sich dabei sehr ähnlich, während sich die Objekte verschiedener Cluster deutlich unterscheiden. [118]

Für die PCA wird die Datenmatrix eines Datensatzes durch Faktorisierung in einen „Struktur-Anteil“ und einen „Rausch-Anteil“ getrennt. Der Zweck der PCA ist dabei, die Hauptinformation des Datensatzes mit einer möglichst geringen Anzahl an Variablen darzustellen — den sogenannten Hauptkomponenten (*principal components*, PC). Die PCA führt dabei eine Transformation eines hochdimensionalen Originaldatensatzes in ein anderes Koordinatensystem mit einer geringeren Anzahl an Dimensionen durch. [116] Für die Faktor-Analyse (FA) werden die Hauptkomponenten aus der PCA durch Linearkombinationen in aussagekräftige (d. h. physikalisch oder chemisch relevante) Spektren überführt, die Faktoren genannt werden. [117]

Die hierarchische Clusteranalyse (HCA) wird oft verwendet, um mit spektroskopischen Methoden biologische Systeme zu klassifizieren oder zu identifizieren. Die wichtigsten Beispiele hierfür sind die Identifizierung von Mikroorganismen [112,122]. Es ist ebenfalls möglich, mittels NIR-FT-Raman-Spektroskopie einzelne Koniferen-Arten zu identifizieren [123]. Bei dieser Methode werden normalerweise außer den spektroskopischen Daten keine weiteren Informationen (Inhaltsstoffe, Konzentrationen, Klassenzugehörigkeit, etc.) verwendet, aus diesem Grund spricht man hier von einer nicht-überwachten Methode.

Mit Hilfe von *principal component analysis* (PCA) ist es möglich, eine verbesserte Auflösung von IR- und Raman-Spektren durch *Raman imaging* in Kombination mit multivariaten Datenverarbeitungstechniken zu erzielen. [124,125] Weiterhin kann PCA in der Gerichtsmedizin eingesetzt werden. Dabei konnte Cocain in verschiedenen Mischungen durch eine Kombination von Raman-Spektroskopie und PCA nachgewiesen werden. [126]

Shimoyama et al. [127] konnten zwischen hartem und weichem Elfenbein afrikanischer Elefanten unterscheiden. Auch die Erkennung von Koronar-arterielle Atherosklerose ist möglich [128]. Eine weitere Anwendung ist die Klassifikation und Analyse von isolierten Citrus-Ölen durch eine Kombination aus Gaschromatographie, Raman- bzw. IR-Spektroskopie und PCA. [129,130]

Neben der qualitativen ist auch eine quantitative Untersuchung mittels Chemometrik möglich. Viele chemometrische Methoden stellen einen Zusammenhang her zwischen den spektralen Unterschieden in einem Datensatz und den chemischen Informationen, wie z. B. Konzentrationen. Die verwendeten Methoden sind die *classical least squares* (CLS), *principal component regression* (PCR) und *partial least squares* (PLS).

Die CLS-Methode stellt ein Modell für die Kalibrierung auf, mit dem später Konzentrationen unbekannter Daten vorhergesagt werden können. Dabei kommt es darauf an, dass eine lineare Beziehung zwischen den gemessenen Daten (Spektren) und der Konzentration besteht. Die Messmethode muss also dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgen. Außerdem müssen die Spektren der Reinsubstanzen vorliegen. [114,131]

Liegen nicht alle Spektren der in der Probe vermuteten Reinsubstanzen vor oder ist das Modell zu komplex, so wird im Allgemeinen eine inverse Methode (*inverse least squares*, ILS) verwendet. Zu dieser Methode zählen PLS und PCR.

Die PCR- und PLS-Methoden verwenden das komplette Spektrum für die Analyse. Anstelle der Originalvariablen werden Linearkombinationen der Variablen (Faktoren) benutzt. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden ist die Art und Weise wie diese Faktoren berechnet werden. [132]

Für ein PCR-Modell wird zuerst eine Hauptkomponenten-Analyse (PCA) des Kalibrierungs-Datensatzes durchgeführt. Aus den ermittelten Hauptkomponenten (PC) werden die ausgewählt, die den Ausgangsdatsatz ausreichend beschreiben. Diese Hauptkomponenten werden auf die Originaldaten zurückgeführt, so dass *scores* für jede Kalibrierungs-Probe berechnet werden. Mit Hilfe dieser *scores*, werden Regressionskoeffizienten berechnet, die dann zur Vorhersage der Parameter einer unbekannt Probe verwendet werden können. [114,117]

Bei der PCR-Methode beruht die Faktorisierung der Kalibrierungs-Spektren ausschließlich auf den spektralen Schwankungen, ohne zu wissen, ob der Ursprung dieser Schwankungen in den Konzentrationsänderungen der Proben liegt. Aus diesem Grund werden für die PLS-Methode die spektralen Änderungen gewichtet, je nach

dem wie viel Einfluss die Änderung der gesuchten Größe auf die spektrale Varianz hat. [114,116,117]

Eine Anwendung von PLS wird z. B. bei der Identifikation von verschiedenen Komponenten in chemischen Mischungen [133] oder Benzin mit Hilfe von NIR-, MIR- und Raman-Spektroskopie beschrieben. [134] Mittels NIR-Spektroskopie und PLS konnten verschiedene Substanzen wie Glucose oder Lactat in wässrigen Lösungen quantifiziert werden. [135-137] Für die Bestimmung der Qualität von Bier wurden 60 verschiedene Biersorten NIR-spektroskopisch untersucht und mit PLS analysiert. [138]

Die Qualität von Kompost kann mit einer Kombination aus NIR-Spektroskopie und PLS vorhergesagt werden [139], ebenso wie die Konzentrationsbestimmungen einzelner Substanzen bei der Fermentation von *E. coli* [140] oder der Bestimmung der Glucose-Konzentration in Zellkultur-Medien [141]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Bestimmung der Stärke von Baumwollfasern durch PLS. [142] Auch ist es möglich, mit Hilfe von SERS und PLS Die Konzentration von Anti-Tumor-Mitteln in Blutplasma nachzuweisen. [143]

In dieser Arbeit wird vorwiegend auf die Unterscheidung und Identifizierung von verschiedenen Pflanzen eingegangen, ohne weiterführende Informationen über die Inhaltsstoffen und deren Konzentrationen zu besitzen. Hierzu eignet sich besonders die hierarchischen Clusteranalyse, auf die im Folgenden eingegangen wird.

3.2 Hierarchische Clusteranalyse (HCA)

In zwei- oder dreidimensionalen Plots ist die visuelle Erfassung von Gruppierungen in den Datensätzen im Allgemeinen relativ einfach. Bei hochdimensionalen Datensätzen sind diese einfachen Erkennungsmerkmale nicht mehr gegeben. Um Strukturen in solch hochdimensionalen Datensätzen erkennbar zu machen, wurde eine Reihe von Algorithmen entwickelt. [144]

Ausgehend von spektraler Ähnlichkeit bzw. multivariater Distanz werden Gruppen so gebildet, dass die Distanz der Objekte untereinander innerhalb eines Clusters möglichst gering und außerhalb möglichst groß ist.

Die Analyse beginnt mit der Distanzberechnung (Ähnlichkeit) zwischen allen Einzelspektren. Mit Hilfe eines zweiten Algorithmus werden die Cluster der Spektren die sich am ähnlichsten sind berechnet. Das Ergebnis dieser Kalkulation ist ein sogenanntes Dendrogramm. Eine erfolgreiche Clusterberechnung benötigt in Abhängigkeit der Probe u. U. vorbehandelte Spektren. Diese Operationen können unter Umständen zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen und werden zunächst getrennt behandelt, bevor in einem weiteren Abschnitt die Berechnung der spektralen Distanz und die Cluster-Algorithmen besprochen werden.

3.2.1 Spektren-Vorbehandlung

Die Vorbehandlung von Spektren gehört zu den wichtigen Abschnitten in einer chemometrischen Berechnung und wird definiert als jedwede mathematische Manipulation von Daten vor der eigentlichen Analyse. Sie wird dazu verwendet, irrelevante, zufällige oder systematische Variationsquellen zu reduzieren oder komplett zu entfernen. Allerdings werden bei der Vorbehandlung die spektralen Informationen verändert, was entweder positive oder negative Einflüsse auf das Ergebnis haben kann. [114].

Deshalb muss vorher immer abgewogen werden, ob die positiven oder negativen Einflüsse bei der Vorbehandlung von Spektren überwiegen. Die am häufigsten verwendeten Vorbehandlungen sind das Glätten, die Basislinienkorrektur, die Normierung und die Bildung von Ableitungen. Auf diese Funktionen soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Glätten

Glättungsmethoden werden angewendet, um mathematisch das willkürliche auftretende Rauschen zu reduzieren, mit dem Ziel das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern. Die grundlegende Annahme dabei ist, dass das Rauschen eine höhere Frequenz besitzt als das beobachtete Signal. Es gibt mehrere Verfahren zum Glätten von Spektren.

Am häufigsten werden die Verfahren Savitzky-Golay, gleitender Durchschnitt und FFT-Filter verwendet. Ein falsch gewähltes Verfahren, bzw. ein zu hoher Glättungsfaktor verfälschen oft die Situation im Spektrum.

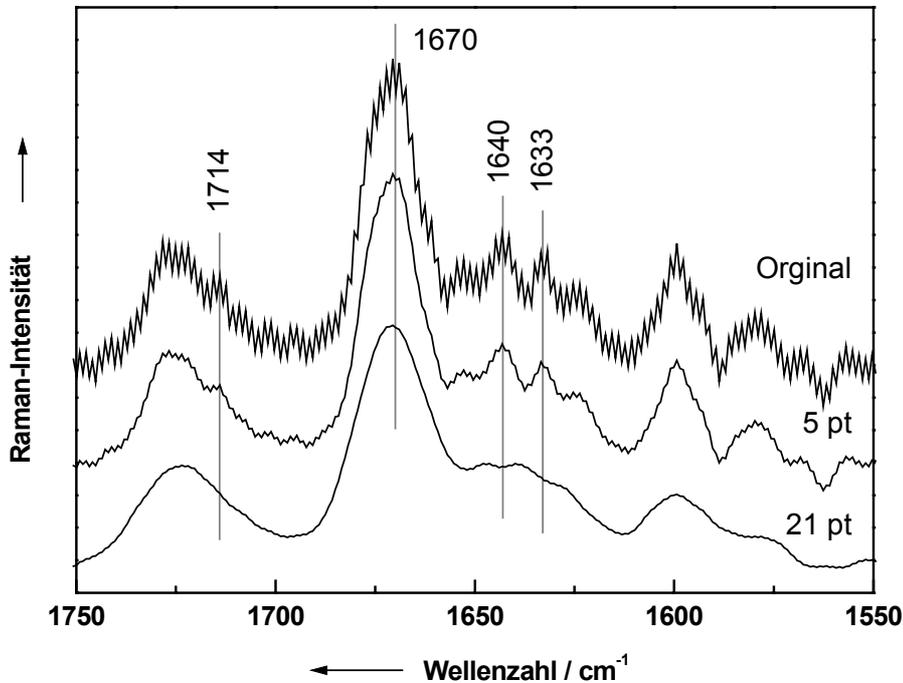


Abb. 3.1: Glätten eines Spektrums mittels gleitendem Durchschnitt mit zwei unterschiedlichen Fensterbreiten.

In Abb. 3.1 sind ein verrauschtes Spektrum und zwei mit verschiedenen Fensterbreiten geglättete Spektren dargestellt. Das Originalspektrum zeigt bei 1670 cm^{-1} eine Bande mit einer asymmetrischen Bandenform und bei 1633 und 1640 cm^{-1} zwei Banden mit geringer Intensität. Wird das Spektrum mit einem gleitenden Durchschnitt von 5 Punkten geglättet, sind diese Informationen im resultierenden Spektrum noch enthalten und das Rauschen weitgehend unterdrückt. Beim Glätten mit 21 Punkten wird die asymmetrische Form der Bande bei 1670 cm^{-1} nicht gut dargestellt und das Maximum der Bande wurde verschoben. Die wenig intensiven Banden zwischen 1620 und 1640 cm^{-1} sind nur noch ansatzweise zu erkennen und ihre Maxima signifikant verschoben. Die Bande bei 1714 cm^{-1} ist nach dem Glätten nicht mehr zu erkennen.

Die Methode des gleitenden Durchschnitts verwendet ein Fenster von n Punkten, um aus ihnen den Mittelwert zu berechnen. Durch Verschieben des Fensters wird eine ähnliche Anzahl an Datenpunkten wie im Originalspektrum erzielt.

Die Methode nach Savitzky-Golay entspricht einem gleitenden polynominalen Glätten. Innerhalb eines Fensters wird hier nicht der Durchschnitt der Datenpunkte gebildet, sondern ein Polynom kleiner Ordnung angenähert.

Ein FFT-Filter kann für eine allgemeine Glättung angepasst oder für die Entfernung von spezifischen Frequenzbereichen verwendet werden. Es wird zunächst eine Fourier-Transformation durchgeführt und danach wird die Transformation mit einer Apodisations-Funktion gewichtet und zurücktransformiert und dadurch hochfrequenten Rauschen abgeschnitten.

Basislinienkorrektur

Neben dem hochfrequenten Rauschen kann ein gemessenes Spektrum auch niederfrequente Variationsquellen enthalten, die keine Beziehung zu dem vermessenen chemischen System aufweisen. Der Ursprung dieser Variationen kommt entweder von einem Lumineszenz-Prozess (Fluoreszenz oder Phosphoreszenz), einer nicht-Laser-induzierten Emissionsquelle (Raumlicht, Sonnenlicht, Schwarzkörperstrahlung Chemiluminiszenz) oder Raman-Streuung anderer Quellen als der Probe (Substrat, Lösungsmittel, Optik). [117] Diese Basislinienänderungen können im Vergleich zu den Änderungen der zu untersuchenden Signale groß sein und dadurch die statistische Auswertung dominieren, wenn sie nicht korrigiert werden. Es ist ebenfalls möglich, dass sie von Probe zu Probe zufällig in Form und Intensität variieren. Allerdings kommt es bei diesen Operationen zu einer Zunahme des Rauschens. Die Qualität der Basislinienkorrektur beeinflusst z. T. erheblich die Qualität einer statistischen Berechnung.

Für die Basislinienkorrektur gibt es mehrere Methoden. Die einfachste Möglichkeit ist, einen konstanten *Offset* vom Spektrum abzuziehen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Subtraktion einer Geraden oder der Verwendung eines angenäherten

Polynoms. Dabei müssen jeweils Datenpunkte im Spektrum identifiziert werden, die nur Basislinieninformationen enthalten.

Ableitungen

Eine weitere Möglichkeit unerwünschte Basislinieninformationen aus dem Spektrum zu entfernen ist die Bildung von Ableitungen. Dies ist vor allem dann sinnvoll, wenn es nicht möglich ist diskrete Punkte mit Basislinieninformationen zu identifizieren. Eine Methode Ableitungen zu bilden ist die nach Sawitzky-Golay.

Normierung

Die Normierung reduziert systematische Variationen in den Daten, die normalerweise mit einer Variation der Gesamtprobenmenge korreliert, durch Division durch eine Konstante. Je nach Ursache der Variation kann eine Normierungsmethode besser geeignet sein als eine andere. Allerdings können durch Normierung der Spektren wichtige Konzentrations-Variationen verfälscht oder ganz verloren werden, da die Konzentration einer Komponente einen direkten Einfluss auf die Intensität ihrer Banden in den Spektren hat. Wird also eine Bande zur Normierung verwendet, die ein direkte Konzentrationsabhängigkeit der gesuchten Komponente widerspiegelt, wird diese durch die Normierung unterdrückt. Für die Normierung stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung:

Die Min-Max-Normierung skaliert die Intensitätswerte so, dass das Minimum jedes Spektrums bei 0 und das Maximum normalerweise bei eins liegt. Im Verwendeten Programm werden die Grenzen zwischen 0 und zwei gesetzt.

Die Vektornormierung berechnet zunächst den mittleren y -Wert a_m im gewünschten Frequenzbereich:

$$a_m = \frac{\sum_k a(k)}{N} . \quad (3.1)$$

Dieser Wert wird dann von allen anderen Werten abgezogen, so dass die Mitte des Spektrums bei 0 liegt:

$$a'(k) = a(k) - a_m . \quad (3.2)$$

Anschließend wird die Summe der Quadrate aller Intensitätswerte gebildet und das Spektrum durch die Wurzel dieser Summe dividiert:

$$a''(k) = \frac{a'(k)}{\sqrt{\sum_k (a'(k))^2}} . \quad (3.3)$$

Die Vektornorm des Spektrums a'' ist dann eins:

$$\sum_k (a''(k))^2 = 1 . \quad (3.4)$$

Dabei bezeichnet k die maximale Anzahl der Datenpunkte. Die maximale Distanz zwischen zwei Spektren ist hier zwei.

3.2.2 Spektrale Bereiche

Zur Berechnung der Cluster kann entweder der gesamte Spektralbereich oder nur ausgewählte Teile davon verwendet werden. Die Selektion einzelner kleiner Bereiche bewirkt, neben kürzeren Rechenzeiten, dass hauptsächlich Bereiche mit relevanter spektroskopischer Information verarbeitet werden und spektrale Bereiche mit starkem Rauschen bzw. ohne spektroskopische Information nicht in die Berechnung mit einbezogen werden.

Bei dem verwendeten Programm (OPUS-NT, IDENT Vers. 3.4 [145,146]) kann der Spektralbereich eingengt oder mehrere Spektralbereiche ausgewählt werden. Wird mehr als ein spektraler Bereich gewählt, so werden die einzelnen Spektralbereiche zu einem neuen, artifiziellen Spektrum zusammengesetzt, mit dem dann die darauf folgende Berechnung der spektralen Distanzen erfolgt.

Werden sich überlappende Spektralbereiche für die Auswertung gewählt, so werden diese je nach Verarbeitungs-Algorithmus unterschiedlich gewertet. Bei der Standard-Methode und der Faktor-Methode werden überlappende Spektralbereiche doppelt bzw. mehrfach verwendet (s. Abb. 3.2), was letztlich zu einer stärkeren Gewichtung des jeweiligen Bereichs führt.

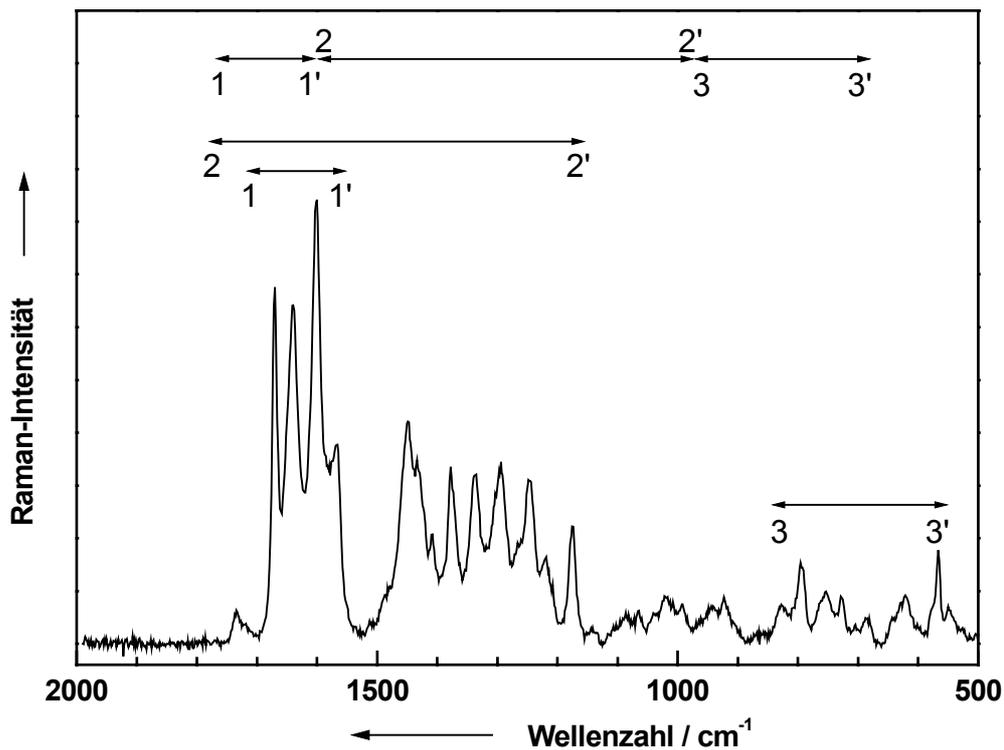


Abb. 3.2: Auswahl der spektralen Bereiche und Bildung eines artifiziellen Spektrums.

Bei den Methoden *Scaling to 1st Range* und *Normalization to Reproduction Level* werden überlappende Spektralbereiche nicht zu einem neuen Spektrum zusammengefasst. Hier wird jeder Spektralbereich gesondert betrachtet und es ist möglich unterschiedliche Gewichtungen für jeden Bereich festzulegen.

3.2.3 Ähnlichkeitsrechnungen

Die spektrale Distanz zwischen zwei Spektren beschreibt den Grad ihrer Ähnlichkeit [145,146]. Je ähnlicher zwei Spektren sind, desto geringer ist ihre spektrale Distanz. Zwei Spektren mit der spektralen Distanz Null sind identisch. Der Wert der spektralen Distanz nimmt in dem Grad zu, wie die Spektren unähnlicher werden.

Für die Berechnung der spektralen Distanz können mit dem verwendeten Programm vier Algorithmen verwendet werden, auf die im Folgenden eingegangen wird: Die Standard-Methode, die Faktor-Methode, *Scaling to 1st Range* und *Normalization to Reproduction Level*.

Die spektrale Distanz ist proportional zu der Fläche des Differenz-Spektrums zweier Spektren. Die Standard-Methode verwendet die euklidischen Distanzen um die spektralen Distanzen D zu berechnen. Dabei gilt

$$D = \sqrt{\sum_k (a(k) - b(k))^2}, \quad (3.5)$$

wobei $a(k)$ und $b(k)$ die Ordinatenwerte (Intensitäten) der Spektren a und b sind. Die Summe wird über alle k Punkte im ausgewählten Spektralbereich berechnet.

Bei der Faktor-Methode werden die Spektren in einer Hauptkomponenten-Analyse als Linearkombination von sogenannten Faktor-Spektren (*loadings*) geschrieben:

$$\mathbf{a} = T_{1a} \cdot f_1 + T_{2a} \cdot f_2 + T_{3a} \cdot f_3 + \dots \quad (3.6)$$

Dabei repräsentiert der Vektor \mathbf{a} das Spektrum a und die Faktor-Spektren werden als f_1, f_2, f_3 , etc. bezeichnet. Die Koeffizienten T_{1a}, T_{2a}, T_{3a} , etc. werden auch *scores* genannt. Mit diesen Koeffizienten wird bei der Faktor-Methode die spektrale Distanz D gebildet zu

$$D = \sqrt{\sum_i (T_{ia} - T_{ib})^2}. \quad (3.7)$$

Die Summation wird nur über eine bestimmte Anzahl i von *scores* durchgeführt. Die Differenz zwischen dem Originalspektrum und dem rekonstruierten Spektrum werden als spektrale Residuen bezeichnet.

Die Anzahl der Faktoren ist von entscheidender Bedeutung. Bei der Faktorisierung von Spektren sind diese Faktor-Spektren orthogonal zueinander. Die Relevanz eines bestimmten Faktor-Spektrums für die Reproduzierung des Referenzspektrums ist gegeben durch die Größe des zugehörigen Eigenwertes (s. Abb. 3.3). Da die Faktor-Spektren nach ihren Eigenwerten geordnet sind, ist das erste Faktor-Spektrum das wichtigste. Je größer die Anzahl der Faktoren ist, um so weniger aussagekräftig werden die Informationen dieses Faktor-Spektrums, bis zum Schluss nur noch spektrales Rauschen moduliert wird. Bei zu wenigen berücksichtigten Koeffizienten werden wichtige spektrale Informationen nicht berücksichtigt [114] — das Modell ist somit *underfitted*. Werden dagegen zu viele Koeffizienten verwendet, so nimmt im

Modell der Rauschanteil der Faktorspektren zu, man spricht in diesem Fall von *overfitting*.

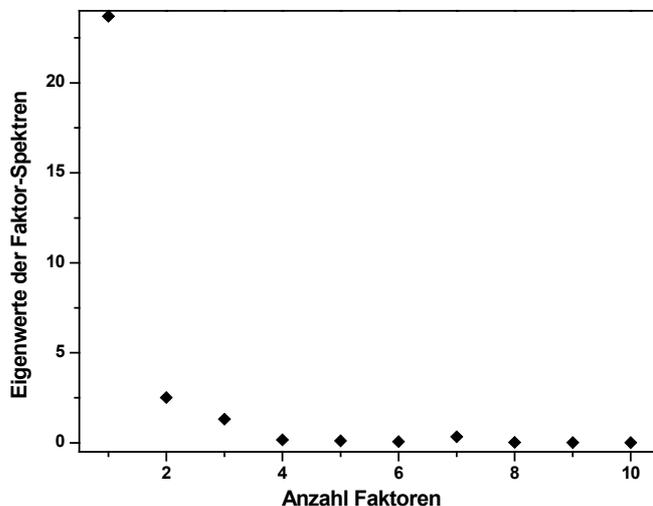


Abb. 3.3: Darstellung der Eigenwerte der Faktor-Spektren in Abhängigkeit der Anzahl der Faktoren.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Methoden verwenden *Scaling to 1st Range* und *Normalization to Reproduction Level* Korrelationskoeffizienten für die Berechnung der spektralen Distanz.

Zunächst wird in jedem Frequenzbereich eine Vektornormierung durchgeführt, anschließend wird der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r berechnet, der die Korrelation zwischen den Spektren a und b angibt:

$$r = \sum a_n''(k) \cdot b_n''(k). \quad (3.8)$$

Diese Korrelation wird für jeden ausgewählten spektralen Bereich separat berechnet. Die Summation geht über alle Datenpunkte k eines Frequenzbereichs. Bezeichnet man die normierten Spektrenintensitäten als a_n'' und b_n'' , sowie die mittleren Spektrenintensitäten als a_m und b_m im Vergleich zu den Originalwerten $a(k)$ und $b(k)$, so lassen sich die obigen Formeln (3.3) und (3.8) zusammenfassen zu:

$$r = \frac{\sum (a_n(k) - a_m) \cdot (b_n(k) - b_m)}{\sqrt{\sum (a_n(k) - a_m)^2} \cdot \sqrt{\sum (b_n(k) - b_m)^2}}. \quad (3.9)$$

Der Wertebereich des Korrelationskoeffizienten bewegt sich dabei von +1 (identisches Spektrum) zu -1 (inverses Spektrum). Der Korrelationskoeffizient r wird dann in eine spektrale Distanz D transformiert, die Werte zwischen 0 (identische Spektren) und 2000 (inverse Spektrum) annehmen kann:

$$D = (1 - r) \cdot 1000. \quad (3.10)$$

Bei der Verwendung von *Scaling to 1st Range* wird zunächst für den ersten Spektralbereich das Minimum und Maximum der spektralen Distanz berechnet. Die Distanzen in den anderen Frequenzbereichen werden danach so skaliert, dass diese Distanzen den gleichen Wertebereich abdecken, d. h. dieselben Minima und Maxima besitzen. Diese Distanzen werden daher in der Form skaliert, dass mit der Formel

$$D \rightarrow 0,5 \cdot D - 1 \quad (3.11)$$

die spektralen Distanzen im gleichen Werte-Bereich liegen. Da sich die Skalierung auf den ersten Frequenzbereich bezieht, ist die Wahl dieses ersten spektralen Bereichs von entscheidender Bedeutung.

Bei der Verwendung von *Normalization to Reproduction Level* kann für jeden Spektralbereich das Reproduktionsniveau definiert werden. Die einzelnen Distanzen werden dann durch die Reproduktionsniveaus dividiert und in Einheiten dieser Reproduktionsniveaus ausgedrückt.

Die für die einzelnen Frequenzbereiche berechneten spektralen Distanzen können anschließend (unabhängig von der Methode) gewichtet werden. Mit den Wichtungsfaktoren w_j wird dann die endgültige spektrale Distanz berechnet zu

$$D = \frac{\sum w_j \cdot D_j}{\sum w_j}. \quad (3.12)$$

3.2.4 Clusteranalyse

Nach der Berechnung der spektralen Distanzen D der Orginalspektren, werden im Folgenden die spektralen Distanzen zur Berechnung der neu zu bildenden Cluster herangezogen. Es gibt mehrere Verfahrensweisen (s. Abb. 3.4), die z. T. zu erheblich voneinander abweichenden Ergebnissen führen können. Der erste Cluster wird aus

den beiden Objekten mit geringster spektraler Distanz gebildet (s. Abb. 3.4, Objekte 1 und 2).

Die Distanz zu dem dritten Objekt zu dem neu entstandenen Cluster kann auf verschiedene Weise berechnet werden. Die Distanz kann z. B. berechnet werden als Abstand zu den ursprünglichen Datenpunkten (Bilder A und B) oder zum Mittelpunkt des neuen Clusters (Bild C).

Je nachdem in welcher Reihenfolge bzw. mit welcher Methode die Cluster berechnet werden, stehen verschiedene Algorithmen zur Verfügung. [144]

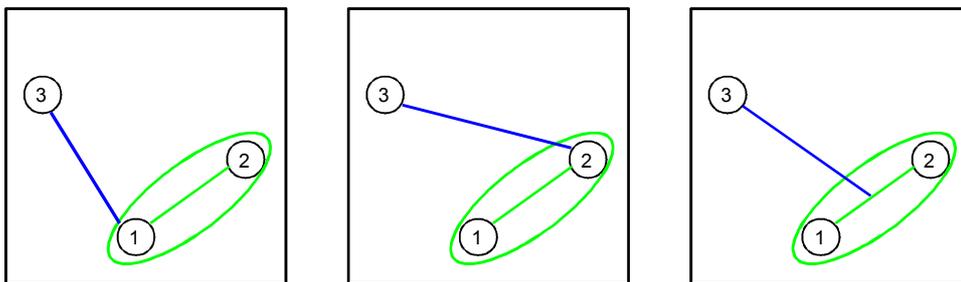


Abb. 3.4: Verschiedene Möglichkeiten Datenpunkte zu *clustern*.

Bei der Methode *Single Linkage* werden die Objekte p und q zu einem neuen Objekt r zusammengefasst. $D(p,i)$ bzw. $D(q,i)$ sind die spektralen Distanzen zwischen den Objekten p und i bzw. q und i . Die Distanz $D(r,i)$ zwischen dem neuen Objekt und dem Objekt i wird berechnet mit

$$D(r,i) = \min[D(p,i), D(q,i)] , \quad (3.13)$$

wobei die Distanz die kleinere der beiden Distanzen zu den ursprünglichen Objekten ist. Diese Methode bildet große Cluster, bei denen die Objekte aneinander gereiht sind und Ausreißer isoliert werden.

Beim *Complete Linkage* wird die größere der beiden ursprünglichen Distanzen als neue Distanz verwendet:

$$D(r,i) = \max[D(p,i), D(q,i)] . \quad (3.14)$$

Diese Methode erzeugt kleinere Cluster, als die *Single Linkage*-Methode.

Beim *Average Linkage* wird das arithmetische Mittelwert berechnet, nach

$$D(r,i) = \frac{D(p,i) + D(q,i)}{2} . \quad (3.15)$$

Durch diese Methode wird die reale Struktur eines Datensatzes gut wiedergegeben.

Beim *Weighted Average Linkage* wird das arithmetische Mittel mit der Anzahl der im Cluster enthaltenen Referenzspektren $n(p)$ bzw. $n(q)$ gewichtet.

$$D = \frac{n(p) \cdot D(p,i) + n(q) \cdot D(q,i)}{n(p) + n(q)} \quad (3.16)$$

Diese Methode ist eine Verallgemeinerung von *Average Linkage*.

Die *Median Technique* definiert als $D(p,q)$ als spektrale Distanz zwischen den Punkten p und q . Diese wird berechnet als

$$D(r,i) = \frac{D(p,i) + D(q,i)}{2} - \frac{D(q,p)}{4} . \quad (3.17)$$

Das Centroid-Verfahren verwendet zur Berechnung der Distanz, die Distanz der Mittelwerte der einzelnen Gruppen:

$$D = \frac{n(p) \cdot D(p,i) + n(q) \cdot D(q,i)}{n} + \frac{n(p) \cdot n(q) \cdot D(p,q)}{n^2} . \quad (3.18)$$

Dabei bezeichnet n die Gesamtzahl der Referenzspektren. Bei diesem Verfahren wird die reale Struktur des Datensatzes gut wiedergegeben.

Die am häufigsten verwendete Technik ist die Methode nach Ward [144]. In den vorhergegangenen Verfahren werden jeweils die ähnlichsten Gruppen zu einem neuen Cluster zusammengefasst. Bei dieser Methode wird dagegen versucht, möglichst homogene Gruppen zu finden. Die beiden Gruppen werden zu einem neuen Cluster zusammengefasst, der den geringsten Zuwachs des sogenannten Heterogenitätsmaßes verzeichnet. Bei dieser Berechnung bezeichnet $n(i)$ die Anzahl der Spektren die im Objekt i zusammengefasst sind. Die Heterogenität H (spektrale Distanz) berechnet sich hier zu

$$H(r,i) = D(r,i) = \frac{[n(p) + n(i)] \cdot D(p,i) + [n(q) + n(i)] \cdot D(q,i) - n(i) \cdot D(q,i)}{n + n(i)} . \quad (3.19)$$

Bei diesem Verfahren wird die reale Struktur des Datensatzes gut wiedergegeben, wenn die Cluster eine vergleichbare Größe besitzen, also die Anzahl ihrer Spektren nicht stark voneinander abweicht.

Nach der Berechnung der Cluster werden die Ergebnisse in Form eines Dendrogramms (Baumdiagramm) ausgegeben [114,144]. Hier werden die einzelnen Datensätze (Spektren) gegen die spektrale Distanz oder Heterogenität aufgetragen (s. Abb. 3.5).

Je unähnlicher sich zwei Spektren bei dieser Darstellung sind, desto höher ist die spektrale Distanz bzw. der Heterogenitätswert an ihrer Verbindungsstelle (vertikale Linien).

In Abb. 3.5 sind zwei Dendrogramme aufgetragen, die mit dem gleichen Datensatz und den gleichen Parametern berechnet wurden. Sie unterscheiden sich lediglich durch die Verwendung verschiedener Cluster-Algorithmen. In Abb. 3.5 a) wurde *single linkage* verwendet. Hier erhält man eine sehr heterogene Clusterung, bei der sogar einige Spektren nicht zu ihren Clustern gezählt werden. Lediglich in Cluster B sind alle Spektren dieser Gruppe vereint dargestellt. Im Dendrogramm b) wurde die Clusterberechnung mit Ward's Algorithmus durchgeführt. Hier werden alle Spektren korrekt den jeweiligen Clustern zugeordnet. Je nach Anwendung muss also zunächst nach dem für die Clusterberechnung geeigneten Algorithmus gesucht werden.

Bei der Durchführung einer hierarchischen Clusteranalyse ist es folglich notwendig die Parameter, wie Spektren-Vorbehandlung, Wahl der spektralen Bereiche, Methode zur Berechnung der spektralen Distanz und den Cluster-Algorithmus, sorgfältig auf die jeweilige Problemstellung anzupassen. Selbst leichte Änderungen in der Proben-Aufbereitung oder Messmethode können zu veränderten Verhältnissen bei der HCA führen.

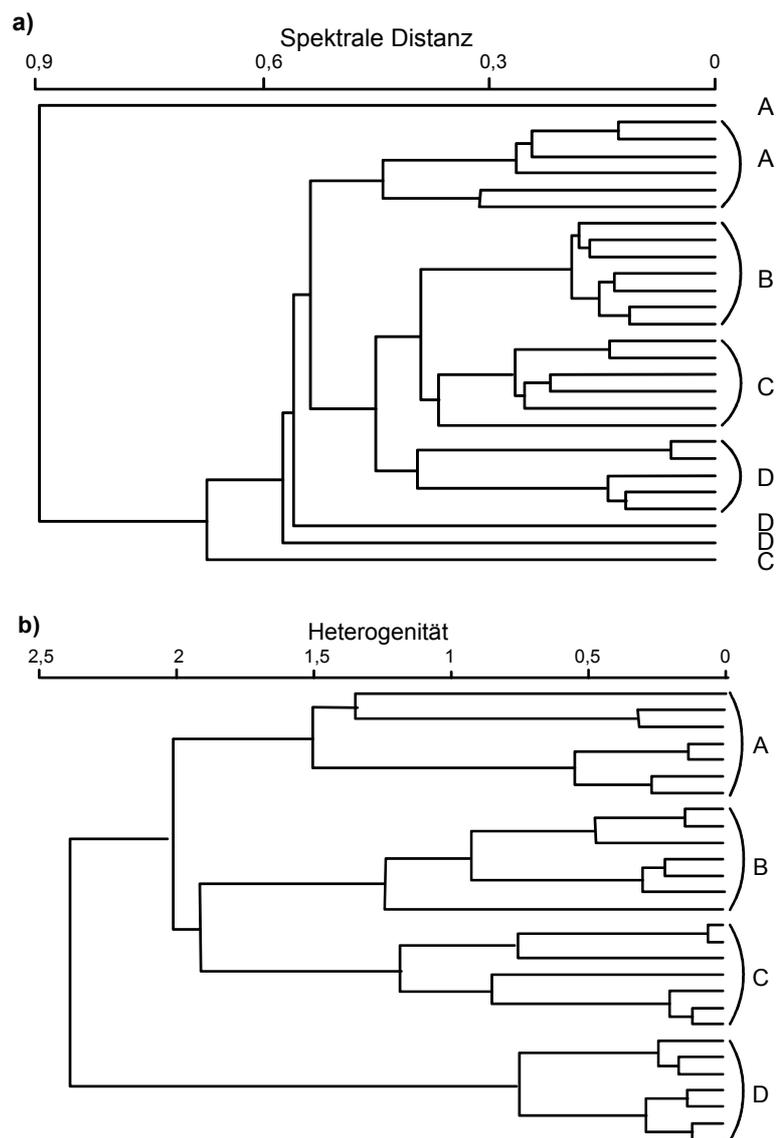


Abb. 3.5: Mit dem gleich Datensatz berechnete Beispiel-Dendrogramme mit unterschiedlicher Clusterberechnung. a) *single linkage*, b) Methode nach Ward.

4 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird auf die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Methoden eingegangen. Zunächst werden die verschiedenen Raman-Apparaturen sowie ihre Eigenschaften beschrieben. In einem weiteren Schritt werden die benutzten Programme zur statistischen Auswertung erläutert. Am Ende des Kapitels werden die Darstellungsverfahren der SERS-Substrate sowie die Probenpräparation beschrieben.

4.1 Experimenteller Aufbau

4.1.1 Mikro-Raman-Spektroskopie

Zur Aufnahme der Spektren wird ein konventioneller Mikro-Raman-Aufbau verwendet. Ein Argon-Ionen-Laser (Spectra Physics, Modell 165) mit einer Wellenlänge von 514,5 nm wird als Anregungslaser eingesetzt, wobei die Plasmlinien durch ein Pellin-Broca Prisma ausgeblendet werden.

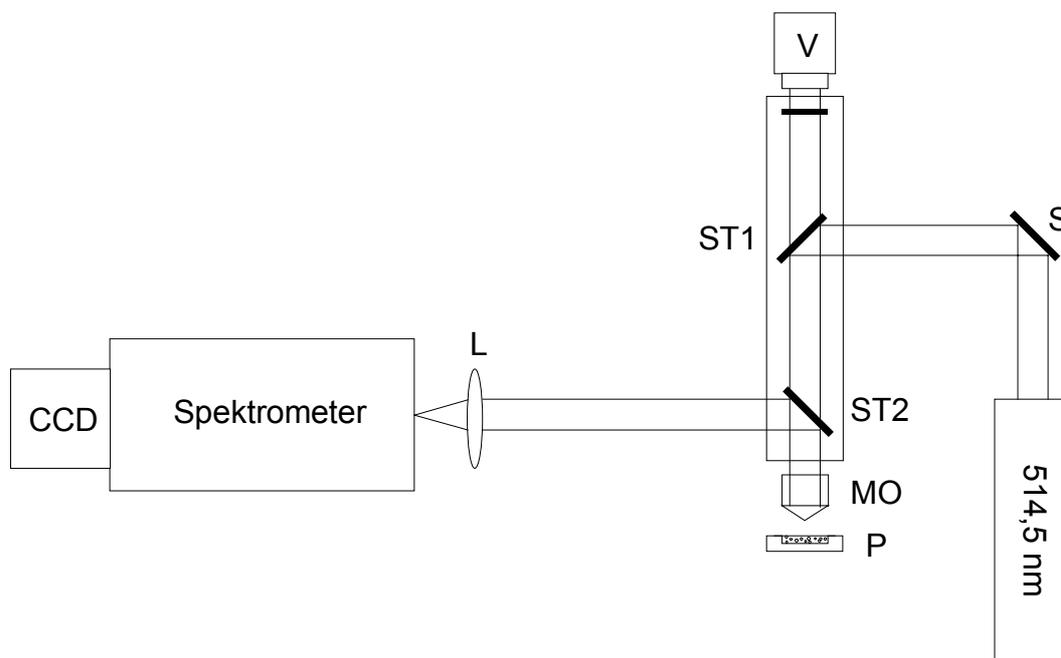


Abb. 4.1: Schematischer Mikro-Raman-Aufbau: S: Spiegel; ST1,2: Strahlteiler; N: Notchfilter; V: Videokamera; MO: Mikroskopobjektiv; P: Probe; L: Linse.

Das Laserlicht wird über einen Strahlteiler (ST1, s. Abb. 4.1) in das Mikroskop eingekoppelt und über ein Mikroskopobjektiv (MO; Olympus ULWDPlan 80x) auf die Probe (P) fokussiert. Das gestreute Licht wird über das selbe Objektiv gesammelt und mittels eines zweiten Strahlteilers (ST2) aus dem Mikroskop ausgekoppelt. Das Licht wird über eine Linse (L) auf den Eintrittsspalt eines Doppelmonochromators (SPEX, Modell 1404) fokussiert, der mit zwei holographischen Gittern (1800 Linien/mm) ausgestattet ist. Die Detektion erfolgt mit Hilfe einer Stickstoff-gekühlten CCD-Kamera (Photometrics, Modell SDS 9000). Die spektrale Auflösung liegt bei

3 cm^{-1} . Die Spektren werden mittels Scanning-Multichannel-Technik (SMT) [147] aufgenommen. Die Ansteuerung des Spektrometers und die Aufnahme der Spektren erfolgt mit Hilfe des Programmpakets MAPS.

Neben der Messung ist es möglich, die Probe über eine Videokamera (V) zu beobachten. Um das Laserlicht auszublenden, wird vor der Kamera ein entsprechender Notch-Fliter montiert.

4.1.2 Labram-Raman-Spektrometer

Für die Messungen der Pflanzenschnitte und der Reinsubstanzen wird ein Labram-Raman-Spektrometer der Firma Dilor verwendet. Dieses Gerät hat den Vorteil, dass mit möglichst geringen Laserintensitäten ein guter Lichtdurchsatz erhalten wird.

Hierbei stehen die 514,5 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers (Spectra Physics, Modell 2016), die 633 nm Linie des Labram-internen HeNe-Lasers und die 785 nm Linie eines Diodenlasers (SDL-XC 30) zur Verfügung. Der Wechsel der Wellenlänge wird durch ein gleichzeitiges Wechseln der Notch-Filter sowie der dazugehörigen Interferenzfilter (hier nicht abgebildet) bewerkstelligt. Durch die Anordnung der Notch-Filter (N1/2) im Labram (s. Abb. 4.2) ist es möglich ohne großen Justageaufwand die Anregungswellenlängen zu wechseln. Der Laser fällt durch eine Blende (B) auf einen Spiegel und wird unter einem einzustellenden spitzen Winkel am Notch-Filter (N1) reflektiert. Durch Verwendung unterschiedlicher *Spacer* kann der Winkel für jede Wellenlänge verändert werden. Der Laserstrahl wird dadurch in das Mikroskop eingekoppelt und mit Hilfe eines Mikroskopobjektivs (MO) auf die Probe fokussiert. Die maximale Laserleistung auf der Probe liegt zwischen 1 mW (633 nm) und 50 mW (514,5 nm) und kann noch zusätzlich durch ein über die Software ansteuerbares Graufilterrad verändert werden.

Zur Beobachtung der Probe wird über ein Strahlteiler-System (ST1+2) das Licht aus dem Mikroskop so umgelenkt, dass es von einer Videokamera aufgenommen wird. Das elastisch und inelastisch gestreute Laserlicht verlässt auf demselben Weg das Mikroskop und passiert dieses Mal den Notch-Filter (N1), wobei das Rayleigh-Licht

(Anregungswellenlänge) herausgefiltert wird. Über einen zweiten Spiegel (S2) wird das Licht zum Spektrometer gelenkt.

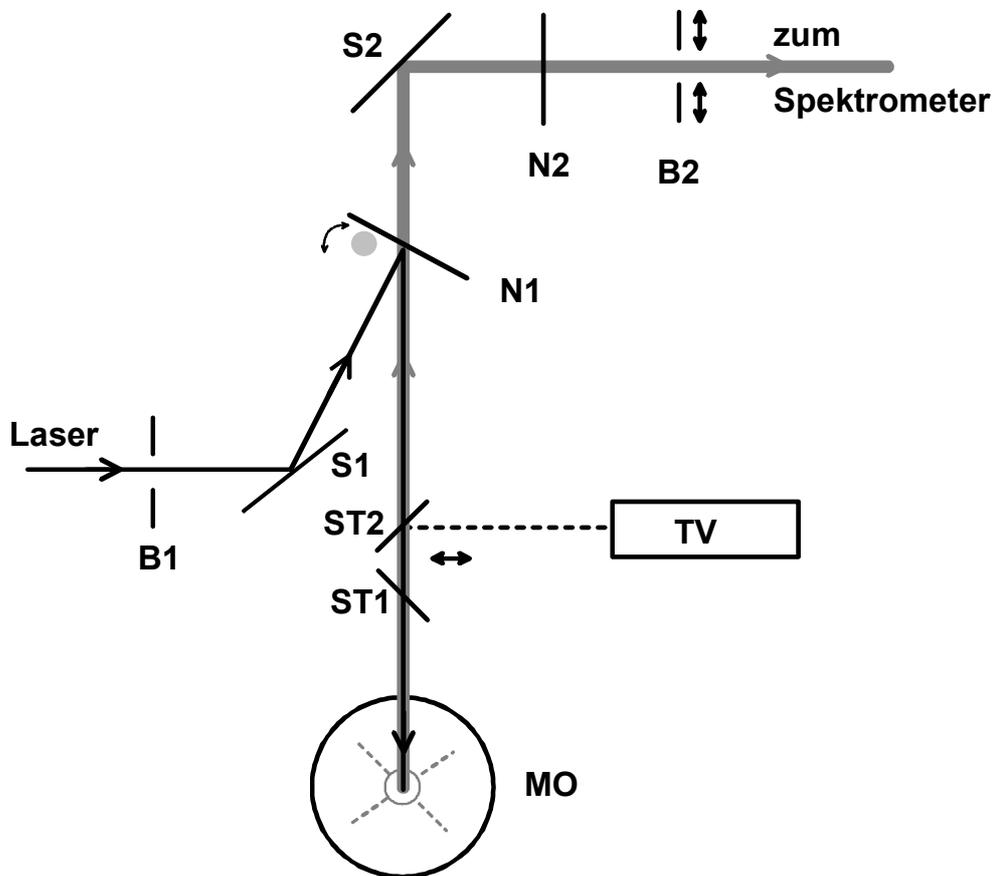


Abb. 4.2: Notch-Filter-Anordnung am Labram; B1: Blende (fest); B2: Blende 2 (variabel); S1,2: Spiegel; N1,2: Notch-Filter; ST1,2: Strahlteiler; TV: Videokamera; MO: Mikroskopobjektiv.

Optional kann für die Laserwellenlänge 514,5 nm noch ein zusätzlicher Notch-Filter (N2) eingesetzt werden, der es erlaubt, bis auf 50 cm^{-1} an die Rayleigh-Linie heran zu messen. Eine zweite variable Blende (B2, 10-1200 μm) kann dazu verwendet werden, konfokale Messungen durchzuführen.

Das Spektrometer ist optional mit zwei verschiedenen Gittern (950 bzw. 1800 $1/\text{mm}$) ausgestattet, die Detektion erfolgt mit einer Peltier-gekühlten CCD-Kamera. Die Spektren werden mit Hilfe der Software Labspec von Dilor aufgenommen. Je nach Wahl der Anregungswellenlänge und Gitter ergeben sich unterschiedliche spektrale Auflösungen (s. Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Spektrale Auflösung bei unterschiedlichen Gittern am Labram.

Wellenlänge	Gitter (in 1/mm)	Auflösung (in cm^{-1})
514,532 nm	950	6,5
	1800	3
632,817 nm	950	4
	1800	2
785 nm	950	3

Bei der Verwendung des Mikroskops werden die Mikroskopobjektive Olympus LMPlanFL 50x mit einer Brennweite von $f = 3,6$ mm, einer Numerischen Apertur von $NA = 0,50$ und einem Arbeitsabstand von $D = 10,5$ mm bzw. das Olympus LMPlanFL 100x mit einer Brennweite von $f = 1,8$ mm, einer Numerischen Apertur von $NA = 0,80$ und einem Arbeitsabstand von $D = 3,4$ mm eingesetzt. Bei einem gerätebedingten Durchmesser des einfallenden Laserstrahls von $d = 2,5$ mm errechnen sich der Fokusbereich W nach

$$W \cong \frac{4\lambda f}{d\pi} \quad (4.1)$$

und die Fokusslänge L nach

$$L = \frac{16f^2\lambda}{\pi d^2} \quad (4.2)$$

Die daraus erhaltenen Werte sind in Tab. 4.2 aufgelistet.

Tab. 4.2: Fokusdimensionen (in μm) für die verwendeten Mikroskopobjektive bei verschiedenen Laserwellenlängen.

Wellenlänge	LMPlanFL 50x		LMPlanFL 100x	
	Durchmesser	Fokusslänge	Durchmesser	Fokusslänge
514,532 nm	0,943	5,433	0,471	1,358
632,817 nm	1,160	6,682	0,580	1,670
784,8 nm	1,438	8,288	0,719	2,072

Für die Messung von Lösungen wird ein Küvettenaufsatz mit einer Linse und einem Parabolspiegel zur Signalverstärkung verwendet (s. Abb. 4.3).

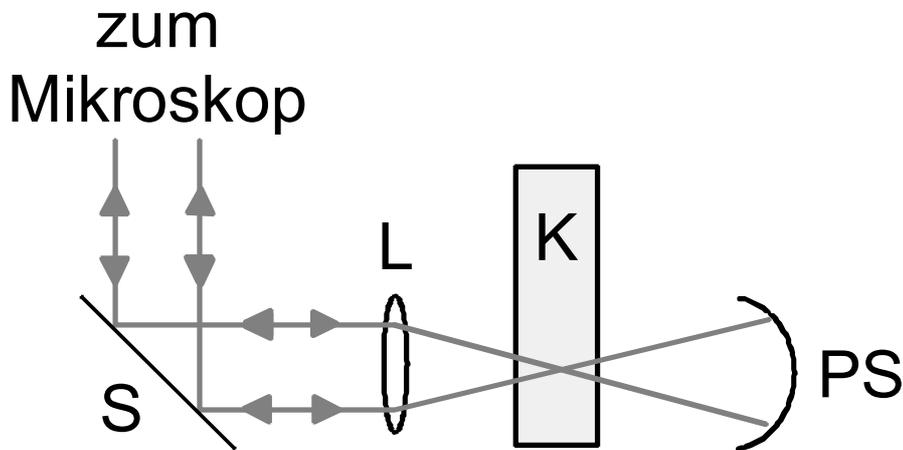


Abb. 4.3: Aufbau Küvettenaufsatz; S: Spiegel, L: Linse, K: Küvette, PS: Parabolspiegel.

Für die orts aufgelöste Untersuchung zur Verteilung von Substanzen in verschiedenen Proben wird ein ansteuerbarer xy-Tisch (Merzhäuser) verwendet. Die minimal anzusteuernde Schrittgröße beträgt $0,1 \mu\text{m}$ mit einer Reproduzierbarkeit von $0,1 \mu\text{m}$.

4.1.3 Faseranschluss

Für die Einkopplung der Laser in die Glasfaser (s. Kap. 4.3.2) wird eine Einkoppel-einheit (New Focus, Model 9091 mit 9131) in Kombination mit einem Mikroskopobjektiv (Olympus ULWD MIRPlan 20x, NA 0,40) verwendet. Zur exakten Fixierung der Glasfaserspitze unter dem Mikroskop wird ein Mikromanipulator (Leitz) verwendet [75].

4.2 Software

Für die statistische Auswertung der Spektren wird eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Hierzu wird das Programm IDENT (Version 2.2/OS/2 bzw. 3.1/NT) von Bruker verwendet. Für jedes Spektrum wird im Regelfall eine Basislinienkorrektur durchgeführt, sowie die erste und zweite Ableitung gebildet.

4.3 SERS-Substrate

4.3.1 Darstellung der Silberkolloide

Die Silberkolloide werden nach Lee und Meisel [69] hergestellt: 43 mg (0,25 mmol) Silbernitrat wird in 250 ml Wasser unter Rückfluss erhitzt. Unter Stickstoffatmosphäre wird innerhalb von 5 min 5 ml einer Lösung aus 50 mg (0,17 mmol) Natriumcitrat in 5 ml Wasser zugegeben. Dabei ändert sich die Farbe der Reaktionslösung langsam von farblos nach grünlich-grau. Nach einer Stunde Rühren unter Rückfluss wird das Kolloid langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und unter Lichtausschluss verwahrt. Mit dieser Methode erhält man Kolloide mit einem Absorptionsmaximum von ca. 410-420 nm. Die Kolloide werden zur Aktivierung mit einer 10^{-2} M NaCl-Lösung im Verhältnis 10:1 versetzt.

4.3.2 Faserpräparation

Die Glasfasern (Alcatel *Single Mode Fiber*, *Core*: 9 μm , *Cladding*: 125 μm) werden nach der Methode von Stöckle et al. [148] mit Flusssäure geätzt und anschließend in einer modifizierten Bedampfungsanlage (Edwards Sputter Coater S150B) mit den verschiedenen Metallen thermisch beschichtet. [74]

4.4 Probenpräparation

4.4.1 Reinsubstanzen

Zur Zuordnung der Spektren biologischer Proben wurden Vergleiche mit den aus der Literatur bekannten Reinsubstanzen angestellt. Diese wurden ohne weitere Aufarbeitung als feste oder kristalline Proben auf einem Objektträger mit Hilfe der Mikro-Raman-Spektroskopie bzw. als flüssige Proben im Küvettenaufsatz (Schichtdicke 10 mm, 1,5 ml) untersucht. Sehr geringe Mengen flüssiger Proben wurden in einer Mikroküvette (0,1 ml) unter dem Mikroskop vermessen.

4.4.2 Präparation der biologischen Proben

Für die Mikro-Raman-spektroskopischen Untersuchungen von pflanzlichem Gewebe wurden von den zu untersuchenden Pflanzenteilen je nach Art der Pflanze mit dem Skalpell oder dem Mikrotom dünne Schnitte (ca. 50-200 μm) angefertigt. Um ein Austrocknen des Pflanzenmaterials unter dem Mikroskop und damit eine Veränderung der Proben zu verhindern, wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gelagert und mit einem Deckgläschen unter Verwendung von Schliff fett bzw. Nagellack luftdicht abgeschlossen. Die Isolationen einzelner Pflanzenteile werden in den entsprechenden Kapiteln näher erläutert.

Bei der Messung von Mikroorganismen wurden mit der Öse dünne Abstriche auf Objektträger aufgebracht. Da sich diese Art der Proben durch Austrocknung nicht wesentlich ändern, wurden hier keine weiteren Probenvorbereitungen vorgenommen.

4.4.3 Probenpräparation für SERS-Untersuchungen

Für SER-spektroskopische Untersuchungen an Pflanzen werden verschiedene Applikationsmethoden der Kolloide eingesetzt. Bei der am häufigsten verwendeten Methode werden die Pflanzenschnitte vor der Präparation auf dem Objektträger für 5-10 min in 1 ml aktiviertes Silber-Kolloid eingelegt. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Pflanzen-Inhaltsstoffe ist es, die Pflanzen bzw. ausgewählte Teile davon wie z. B. Stängel oder Wurzeln für mehrere Stunden in das Silber-Kolloid zu stellen. Dadurch wird das Kolloid im Gewebe angereichert, was als dunkler Ring zu erkennen ist.

5 Inhaltsstoffe von Pflanzen

In Pflanzen findet man viele unterschiedliche (chemische) Inhaltsstoffe. Durch die Vielzahl an Substanzen und deren geringe Konzentration in den Pflanzenzellen, ist es nicht einfach, die gesuchten Inhaltsstoffe mit herkömmlichen Methoden zu lokalisieren. In den Solanaceaeen wie z. B. Tabak sind das zumeist die Pyridin-Alkaloide wie zum Beispiel Nicotin, das mit Hilfe der Mikro-SERS-Spektroskopie identifiziert und lokalisiert werden kann. Neben Alkaloiden finden sich aber auch in vielen Pflanzen Kristalleinschlüsse oder Reservestoffe. Mittels Mikro-Raman-spektroskopischen Untersuchungen kann man diese Substanzen in ihrer natürlichen Umgebung nachweisen, ohne sie extrahieren zu müssen.

5.1 Anatomie von Pflanzengewebe

In diesem Abschnitt wird kurz auf die wichtigsten biologischen Begriffe eingegangen, die für die Untersuchung von Pflanzeninhaltsstoffen notwendig sind.

5.1.1 Anatomie

Die Kormophyten (Sprosspflanzen) werden in drei Abschnitte gegliedert: Wurzel (w), Stängel und Blätter (s. Abb. 5.1 links). Dabei dient die Sprossachse als tragendes sowie transportierendes Element und sorgt für eine günstige Stellung der Blätter (b) zum Licht. [149] Der Spross (s. Abb. 5.1 rechts) besitzt als primäres Abschlussgewebe eine Epidermis (epd) mit nur wenigen Spaltöffnungen. Die Leitbündel (lb) sind im Kreis angeordnet und bilden zusammen mit dem Mark den Zentralzylinder (zz).

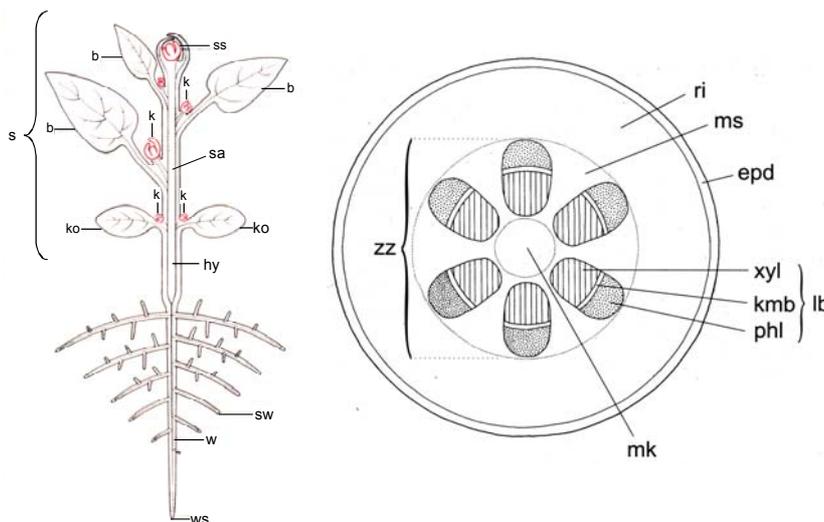


Abb. 5.1: Schematische Zeichnung einer Sprosspflanze (links); b: Blatt, k: Achselknospen, ko: Kotyledonen, s: Spross, sa: Sprossachse, sw: Seitenwurzel, ss: Sprossscheitel, w: Wurzel, ws: Wurzelscheitel (nach [150]); rechts: Anatomie eines Sprosses (dikotyle Pflanze) epd: Epidermis, kmb: Kambium, lb: Leitbündel mk: Mark, ms: Markstrahl, phl: Phloem, ri: Rinde, xyl: Xylem, zz: Zentralzylinder (nach [151]).

Außerhalb des Leitbündelringes befindet sich das interzellularenreiche Parenchym der primären Rinde (ri). Im Zentrum der Sprossachse liegt das Mark (mk), das überwiegend als Speicherparenchym fungiert. [151]

Die Blattorgane dienen hauptsächlich der Photosynthese und des Gasaustausches. Sie absorbieren mit Hilfe des Chlorophylls der Chloroplasten die zur Photosynthese notwendige Strahlungsenergie. Daher ist das Blatt flächig ausgebildet und die Einzelblätter stehen „auf Lücke“, um eine optimale Lichtaufnahme zu gewährleisten. Voraussetzung für eine hohe Photosyntheseleistung ist ein optimaler Gasaustausch (CO₂-Aufnahme und Abgabe von Wasserdampf) über die Spaltzellen. Ein typisches Laubblatt (s. Abb. 5.2 links) gliedert sich in eine flächige, meist grüne Blattspreite (blsp), den stängelartigen Blattstiel (blst) und den Blattgrund mit dem das Blatt an der Sprossachse festgewachsen ist. Ein System von Leitbündeln (nv) versorgt das Blatt mit den notwendigen Nährstoffen. [151]

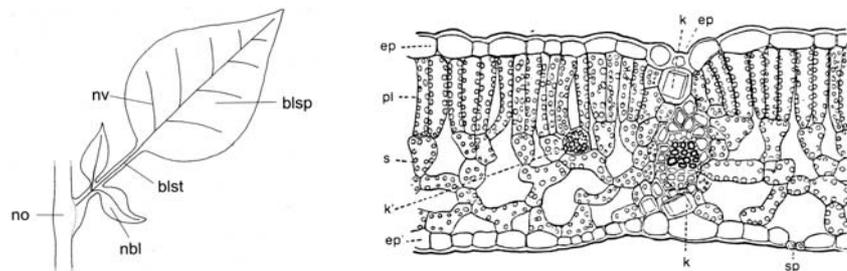


Abb. 5.2: Schematischer Aufbau eines Blattes (links; blsp: Blattspreite, blst: Blattstiel, nbl: Nebenblätter, no: Nodium, nv: Nervatur) und Anatomie eines Laubblattes (rechts; ep, ep': Epidermis, pl: Palisadenparenchym, s: Schwammparenchym, k, k': Kristalle, sp: Spaltöffnung). [151]

Ein Laubblatt (s. Abb. 5.2 rechts) zeigt im Querschnitt einen ganz charakteristischen Aufbau. Eine obere und untere Epidermis (ep) schließt das in Palisadenparenchym (pl) und Schwammparenchym (s) gegliedertes Mesophyll ein.

Die Wurzel erfüllt zwei wichtige Aufgaben. Sie dient der Verankerung der Pflanze im Boden und der Aufnahme von Wasser und Salzen aus dem Boden. [151]

5.1.2 Reservestoffe und Kristalle

Reservestoffe und Kristalle sind Stoffwechselprodukte, die in der Vakuole der Zelle eingelagert werden.

Das für Pflanzen typische und zugleich wichtigste Reservekohlenhydrat ist die Stärke. Stärkekörner werden in sogenannten Amyloplasten gebildet und befinden sich hauptsächlich in den Zellen des Speichergewebes. [149,151]

D-Glucose wird in höheren Pflanzen meist als Stärke abgespeichert. Dieses Reservepolysaccharid wird in Form wasserunlöslicher Körner (Granula) abgelagert, deren Form charakteristisch für eine bestimmte Pflanzenart sein kann. Stärke ist ein Polysaccharid bestehend aus α -1,4-glykosidisch verknüpfter α -D-Glucose. Stärke tritt in Form von zwei verschiedenen Polysacchariden auf: Amylose und Amylopektin. Amylose stellt eine reine Glucosespirale dar und ist in Wasser löslich. Im Amylopektin treten zusätzliche Glucoseseitenketten auf, die über 1,6-Bindungen an die Hauptkette geknüpft sind. Amylopektin ist in Wasser unlöslich. [1] Das Verhältnis von Amylopektin und Amylose ist je nach Herkunft sehr unterschiedlich. Reservestärke „normaler“ höherer Pflanzen enthält je nach Herkunft zwischen 11 und 35 % Amylose und zwischen 75 und 89 % Amylopektin. [152]

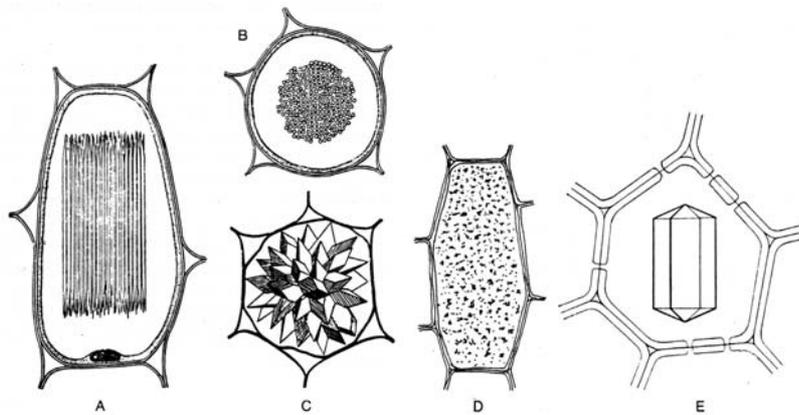


Abb. 5.3: Calciumoxalat-Kristalle A: Raphidien von der Seite, B: Raphidien im Querschnitt, C: Druse, D: Kristallsand, E: tetragonaler Solitärkristall (nach [151]).

Neben zahlreichen Salzen, die im Zellsaft gelöst sind, befinden sich in den Vakuolen von pflanzlichen Zellen häufig auch Kristalle schwerlöslicher Salze. Dabei handelt es sich meistens um Calciumoxalat. Im Stoffwechsel anfallende Oxalsäure, die ein starkes Zellgift darstellt, wird in unlöslicher Form ausgefällt. Die Zelle wird dadurch entgiftet. [151] In monoklinen Kristallen tritt Calciumoxalat normalerweise als Monohydrat $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ auf, während es in den tetragonalen Kristallen als Dihydrat

$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ vorkommt. Der Form nach lassen sich Kristallsand, Drusen, Raphidien und Solitärkristalle unterscheiden (s. Abb. 5.3). Seltener findet sich Calciumcarbonat oder Calciumsulfat, welche meist in mikrokristallinem Zustand auftreten. [150]

5.2 Raman-Spektroskopie an Pflanzen

Durch Anwendung von Raman-Spektroskopie auf pflanzliche Proben können einzelne Inhaltsstoffe im Gewebe analysiert werden. Dabei ist es möglich Carotenoide wie β -Carotin oder Lycopin in Karotten- bzw. Tomaten-Saft [153,154] oder Crocetin in getrocknetem Safran [155-157] nachzuweisen. B. Schrader ist es gelungen, mit der Hilfe der FT-Raman-Spektroskopie und einem speziellen Probenraum verschiedene Pflanzen-Farbstoffe und verschiedene Inhaltsstoffe in ätherischen Ölen [4,5] zu bestimmen. E. Urlaub konnte mittels Mikro-Raman-Spektroskopie Alkaloide im Gewebe einer indischen Liane lokalisieren [7].

5.3 SERS an Tabakpflanzen

Tabak gehört zu der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae) deren Hauptverbreitungsgebiet in den Tropen und Subtropen liegt. [158] Chemisch gesehen zeichnen sich diese Gewächse durch ihre Bildung von Pyridin-Alkaloiden aus, im Fall des Tabaks ist es hauptsächlich Nicotin. Dieses wird in den Wurzeln gebildet und über den Saftstrom (Transpirationsstrom) in die oberirdischen Teile (Stängel und Blätter der Pflanze) transportiert und dort gespeichert. [159] Neben dem Nicotin treten noch andere Alkaloide wie Anabasin, Nornicotin, Nicotyrin oder Cotinin auf (Abb. 5.4).

Nicotin liegt in unterschiedlichen Tabak-Züchtungen in einem Mengen-Verhältnis von 0,05 % (Virginia-Tabak) bis 7,5 % (Machorka) vor. In einigen Tabaksorten wird während des Nicotin-Transports in den Spross ein Teil des Nicotins zu Nornicotin demethyliert. In den sogenannten Nicotin-armen Tabaksorten sind häufig Nornicotin und Anabasin die Hauptalkaloide. [159]

Zum Vergleich wurden für die SERS-spektroskopischen Untersuchungen verschiedene Tabakarten verwendet – der Rauchtobak *Nicotiana tabacum* L. und der Bauertobak *Nicotiana rustica* L.

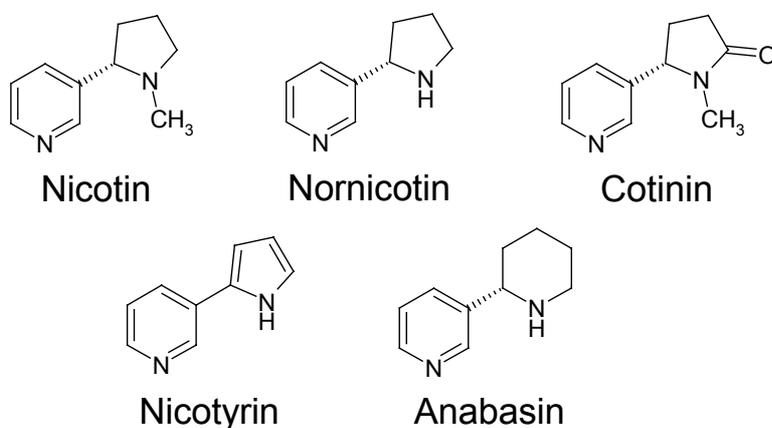


Abb. 5.4: Verschiedene Pyridin-Alkaloide des Tabaks.

5.3.1 Raman- und SERS-Spektren von Nicotin

Zum besseren Vergleich der *In-vivo*-Spektren von Tabak werden zunächst die Raman- und SERS-Spektren des Hauptalkaloids Nicotin diskutiert. In Abb. 5.5 ist in Spektrum a das Raman-Spektrum und in Spektrum b das SERS-Spektrum von Nicotin dargestellt. Als Anregungswellenlänge wurde in beiden Fällen 514,5 nm verwendet. Für das SERS-Spektrum wurden 100 µl (-)-Nicotin zu 2,4 ml aktiviertem Silber-Kolloid gegeben.

In Tabelle 5.1 werden die Zuordnungen der gemessenen Raman- und SERS-Banden von Nicotin gezeigt und mit den Literaturdaten verglichen. [160] Das Raman-Spektrum wird von einem sehr intensiven Duplett bei 1042 und 1026 cm^{-1} dominiert, welches den trigonalen bzw. symmetrischen Ring-Atmungs-Schwingungen des Pyridin-Rings entspricht. Die entsprechende Ring-Streckschwingung des Pyrrolidin-Rings ist bei 922 cm^{-1} zu erkennen. Die Bande bei 569 cm^{-1} wird der *In-plane*-Ring-Deformationsschwingung des Pyrrolidin-Rings zugeordnet, die entsprechende Schwingung der Pyridin-Rings ist bei 614 bzw. 664 cm^{-1} zu erkennen.

Die Bande bei 1087 cm^{-1} kann der Kombination einer *In-plane*-C–H-Deformation mit einer CH_2 -Spreizschwingung von Pyridin zugeschrieben werden. Das schwache

Duplett bei 1101 und 1117 cm^{-1} bzw. die Banden bei 1222 und 1247 cm^{-1} gehören zu den CH_2 -Kippschwingungen von Pyrrolidin. Die CH_2 -Torsionsschwingungen des Pyrrolidin-Rings sind bei 1317 und 1343 cm^{-1} zu detektieren. Die Bande bei 1457 cm^{-1} wird der CH_2 -Spreizschwingung des Pyrrolidin-Rings zugeordnet. Die C–H *In-plane*-Deformationsschwingung von Pyridin ist bei 1192 cm^{-1} zu erkennen. Die Banden bei 1363, 1415, 1479, 1578 und 1590 cm^{-1} können den Ring-Streckschwingungen des Pyridin-Rings zugeordnet werden.

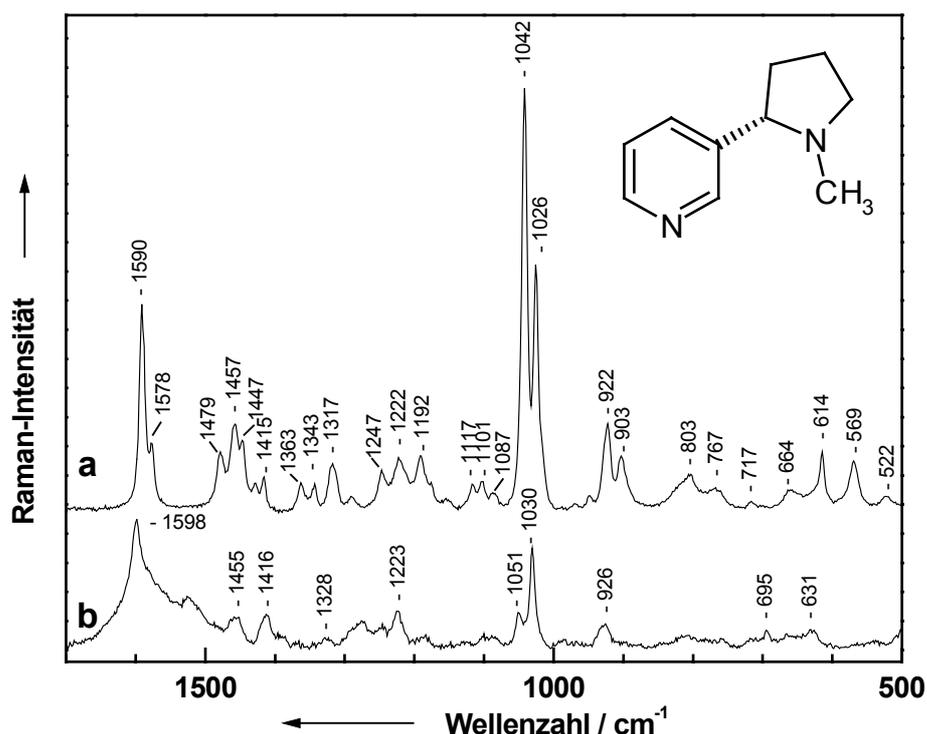


Abb. 5.5: a: Raman- und b: SERS-Spektrum von Nicotin.

Spektrum a ist das Spektrum von reinem Nicotin in einer Küvette mit 10 mm Schichtdicke und einer Integrationszeit von 8 s. Für Spektrum b wurde 100 μl Nicotin in 2,4 ml aktiviertem Silber-Kolloid mit einer Integrationszeit von 180s gemessen. Durch die schlechte Löslichkeit des Nicotins in Wasser, sowie die deutlich geringere Konzentration ist die geringere Intensität des SERS-Spektrums im Vergleich zum Raman-Spektrum zu erklären.

Im SERS-Spektrum des Nicotins (b) wird von der intensiven Bande der symmetrischen Ring-Atmung des Pyridin-Rings bei 1030 cm^{-1} dominiert. Die

trigonale Ring-Atmungsschwingung bei 1051 cm^{-1} ist im Vergleich zum Raman-Spektrum schwach. Beide Banden sind im Vergleich zum Raman-Spektrum zu höheren Wellenzahlen verschoben.

Tab. 5.1: Zuordnung der Raman- und SERS-Banden [160] von Nicotin (in cm^{-1})

Raman		SERS		Zuordnung
Gemessen	Literatur	Gemessen	Literatur	
522	523 (vw)	-	532 (m)	Pyrrolidin
569	568 (m)	-	573 (m)	Pyrrolidin, <i>ip</i> Ring-Deformation
614	617 (m)	631	615 (mw)	Pyridin, <i>ip</i> Ring-Deformation
664	661 (w)	695	665 (w)	Pyridin, <i>ip</i> Ring-Deformation
717	713 (vw)	-	720 (w)	Pyridin, <i>oop</i> C–H-Deformation
767	769 (m)	-	772 (m)	Pyrrolidin
803	809 (mw, br)	-	815 (m)	Pyridin
903	903 (m)	-	901 (m)	
922	923 (m)	926	923 (w)	Pyrrolidin, Ring-Streckschwingung
1026	1028 (s)	1030	1030 (vs)	Pyridin, sym. Ring-Atmung
1042	1044 (vs)	1051	1051 (s)	Pyridin, trigonale Ring-Atmung
1087	1087 (w)	-	-	Pyridin, <i>ip</i> C–H-Deformation und CH_2 -Spreizschwingung
1101	1103 (w)	-	1105 (w)	Pyrrolidin, CH_2 -Kippschwingung
1117	1117 (w)	-	1127 (mw)	Pyrrolidin, CH_2 -Kippschwingung
1192	1192 (mw)	-	1187 (m)	Pyridin, C–H <i>ip</i> Deformation
1222	1223 (m)	1223	1227 (w)	Pyrrolidin, CH_2 -Kippschwingung
1247	1246 (m)	-	-	Pyrrolidin, CH_2 -Kippschwingung
1317	1318 (m)	1328	1318 (w)	Pyrrolidin, CH_2 -Torsionsschwingung
1343	1345 (w)	-	-	Pyrrolidin, CH_2 -Torsionsschwingung
1363	1364 (w)	-	1376 (w)	Pyridin, Ring-Streckschwingung
1415	1429 (w)	1416	1422 (w)	Pyridin, Ring-Streckschwingung
1457	1459 (m)	1455	1456 (w)	Pyrrolidin, CH_2 -Spreizschwingung
1479	1480 (mw)	-	1476 (m)	Pyridin, Ring-Schwingung
1578	1582 (m)	-	1578 (w)	Pyridin, Ring-Streckschwingung
1590	1595 (mw)	1598	1597 (m)	Pyridin, Ring-Streckschwingung

vs: very strong, *s:* strong, *m:* medium, *mw:* medium weak, *w:* weak, *br:* broad, *ip:* in plane, *oop:* out of plane

Die zweite intensive Bande des SERS-Spektrums ist bei 1598 cm^{-1} zu erkennen. Es handelt sich um die Pyridin-Ring-Streckschwingung. Als weitere schwache Banden des Pyridin-Rings sind die Ring-Streckschwingung bei 1416 cm^{-1} bzw. die *in plane* Ring-Deformation bei 631 und 695 cm^{-1} zu erkennen. Die CH_2 -Banden des Pyrrolidin-Rings sind bei 1455 cm^{-1} (Spreizschwingung), 1328 cm^{-1} (Torsionschwingung) und 1223 cm^{-1} (Kippschwingung) als schwache Banden zu sehen. Weiterhin tritt noch eine schwache Bande bei 926 cm^{-1} auf, die der Ring-Streckschwingung zugeordnet werden kann. Mit diesen Informationen werden nun die Untersuchungen in den Pflanzenschnitten von Tabak durchgeführt.

5.3.2 Nicotin in Tabakpflanzen

Für die SERS-spektroskopischen Untersuchungen des Stängels bzw. der Blattstiele wird die in Kap. 4.4.3 beschriebene Methode verwendet. Dabei wird das Kolloid auf zwei verschiedene Arten in das Gewebe des Tabaks eingebracht. Bei der von E. Urlaub [19] beschriebenen Methode werden dünne Gewebeschnitte aus dem Stängel oder dem Blattstiel für 5 min in aktiviertes Silberkolloid eingelegt, anschließend gewaschen und auf einem Objektträger präpariert. Für die zweite Methode wird ein Stängel in eine Silberkolloidlösung gestellt. Die Ausbreitung des Kolloids im Gewebe kann an der Verfärbung beobachtet werden. Das Kolloid wird von der Pflanze innerhalb einer halben Stunde vollständig aufgenommen. Dies ist daran zu erkennen, dass sich die Lösung völlig entfärbt.

In Abb. 5.6 sind die SERS-Spektren von verschiedenen Schnitten zu erkennen. Spektrum A zeigt einen Schnitt von der Rinde eines Blattstiels von *N. rustica* (Bauerntabak). Spektrum B ist in der Rinde des Blattstiels *N. tabakum* (Rauchtabak) aufgenommen worden. Spektren C und D sind Spektren aus dem Stängel von *N. tabakum*. Spektrum C ist aus dem Mark-Bereich und Spektrum D aus der Rinde. Bei diesen beiden Spektren wurde das Silber dadurch in das Gewebe gebracht, dass der Stängel in das Kolloid gestellt wurde.

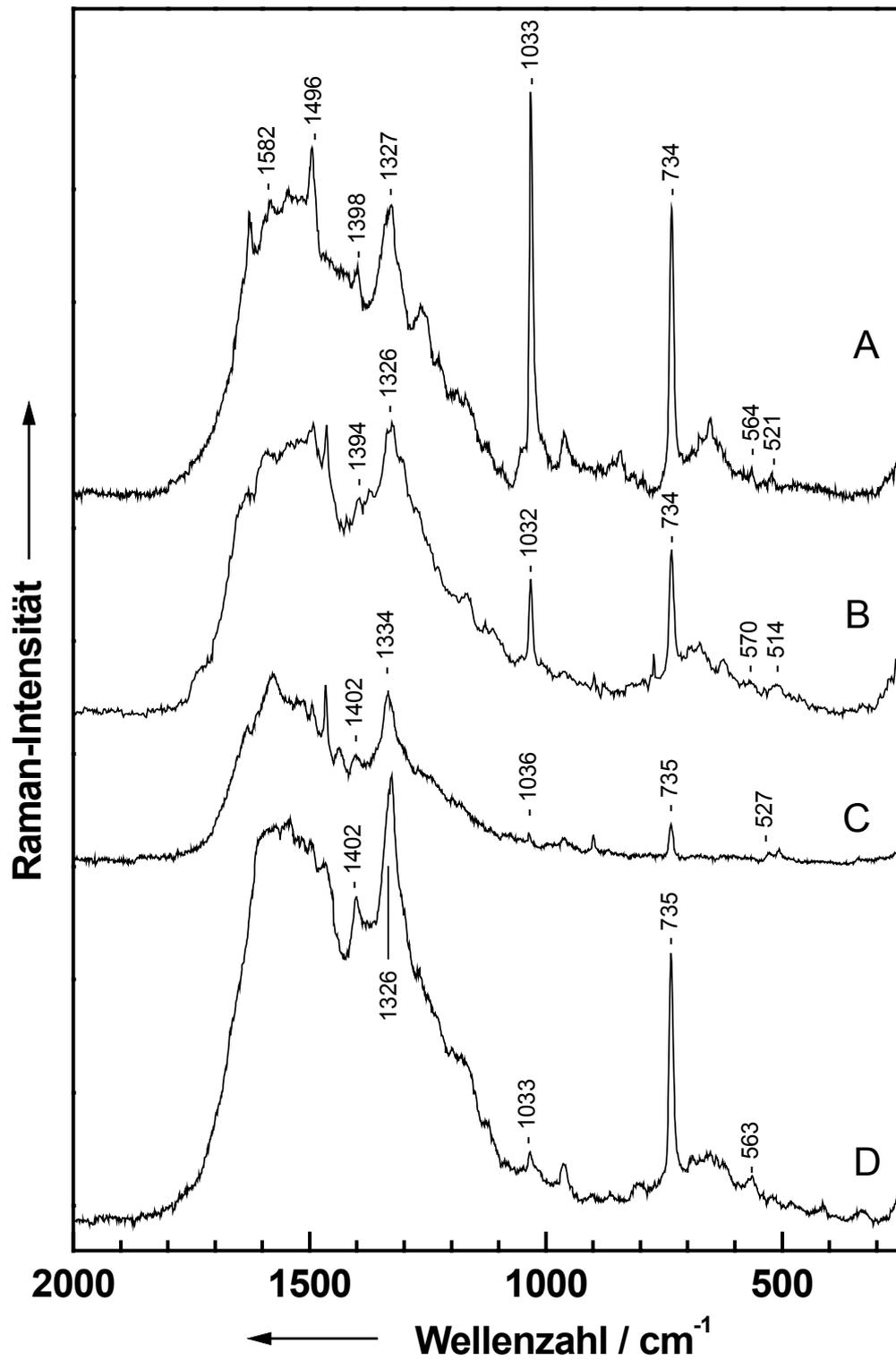


Abb. 5.6: SERS-Spektren von verschiedenen Tabaksorten; A: *N. rustica* (Blattstiel, Rinde); B: *N. tabakum* (Blattstiel, Rinde); C: *N. tabakum* (Stängel, Mark, Fütterung); D: *N. tabakum* (Stängel, Rinde, Fütterung).

Die sehr intensive Bande der symmetrischen Ring-Atmungsschwingung des Pyridin-Rings bei 1033 cm^{-1} zeigt, dass es sich hier um ein echtes SERS-Spektrum handelt (s. Tab. 5.1). In den Spektren B bis D ist diese Bande wesentlich weniger intensiv, dies lässt auf einen geringeren Nicotin-Gehalt schließen. Weitere wichtige Markerbanden sind die CH_2 -Spreizschwingung des Pyrrolidin-Rings bei 1327 cm^{-1} .

Die *In-plane*-Deformations-Schwingung des Pyrrolidin-Rings ist bei 521 bzw. 564 cm^{-1} nur als sehr schwache Banden zu erkennen. Die Ringschwingungen des Pyridin-Rings bei 1496 bzw. 1582 cm^{-1} sind unter den breiten Banden in diesem Bereich nur schwer zu erkennen. Diese Verbreiterung ist wahrscheinlich auf eine beginnende Zersetzung der Gewebestruktur durch das Einbringen des Kolloids zurückzuführen. Durch das Silber ändert sich das elektrochemische Potential der Zelle, was zu einer Zerstörung des Gewebes führt.

Die sehr intensive Bande bei 734 cm^{-1} sowie die Bande bei 1389 cm^{-1} gehören zum Zellmaterial. Sie sind in allen Spektren zu sehen, auch wenn keine Nicotin-Signale zu erkennen sind.

5.3.3 Sonstige Substanzen

Neben dem Alkaloid Nicotin werden im Gewebe von Tabak noch andere Substanzen gefunden. In den grünen Zellen im Rindenbereich des Tabaks findet sich vor allem das Tetraterpen β -Carotin (s. Abb. 5.7 A). Neben den Hauptbanden von β -Carotin, der symmetrischen $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung bei 1525 cm^{-1} , der $\text{C}-\text{C}$ -Streckschwingung bei 1158 cm^{-1} und der $\text{C}-\text{C}$ Streckschwingung der $\text{C}-\text{CH}_3$ -Gruppen bei 1006 cm^{-1} , sind noch die Kombination der $\text{C}-\text{C}$ -Streckschwingung mit der $\text{C}-\text{H}$ -Spreizschwingung bei 1211 cm^{-1} bzw. 1190 cm^{-1} und die *Out-of-plane*-Pendelschwingung der $\text{C}-\text{H}$ -Bindung von $\text{CH}=\text{CH}$ -Elementen bei 964 cm^{-1} zu beobachten. [157,161-164]

Vor allem in älteren Tabakproben beobachtet man das Auftreten von Kristallsand. Mittels Mikro-Raman-spektroskopischen Untersuchungen (Abb. 5.7 B) kann der Kristallsand dem CaC_2O_4 zugeordnet werden. Durch Vergleich mit Literaturdaten zeigt sich, dass es sich hierbei um das Monohydrat und nicht das Dihydrat handelt.

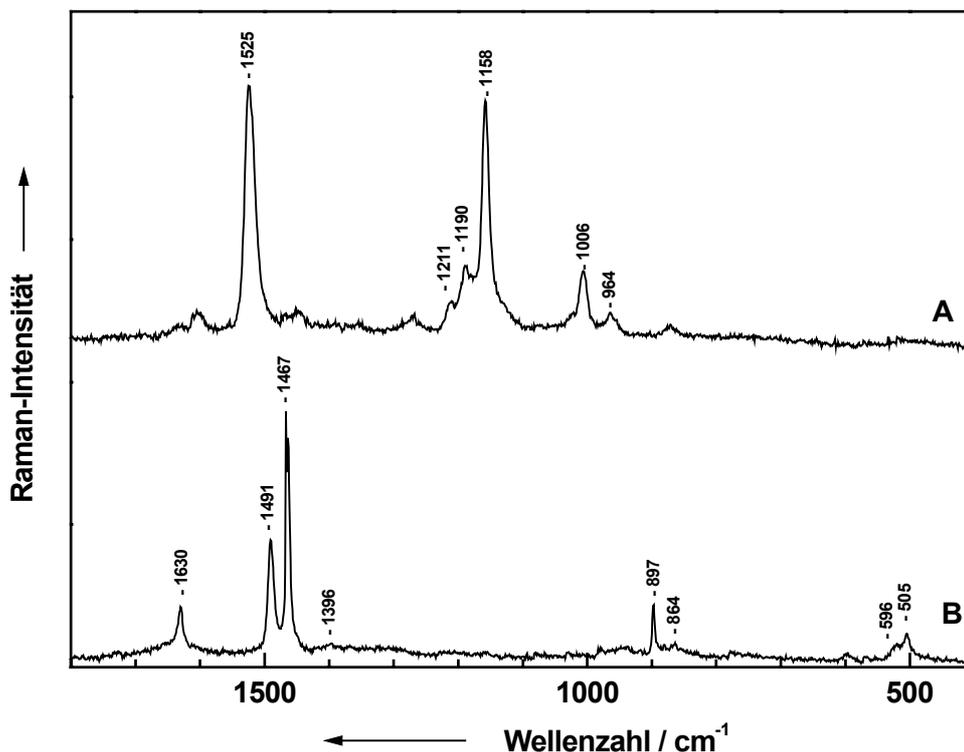


Abb. 5.7: SERS-Spektren von *N. tabacum*; A: β -Carotin in Stängel­epidermis; B: $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ im Kristallsand von Markzellen.

Tab. 5.2: Zuordnung der Calciumoxalat-Banden.

488 nm Literatur [165,166]		514,5 nm Gemessen		Zuordnung
$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Kristalle (B)	
508 (mw)	504 (mw)	504 (mw)	505	$\delta(\text{CO}_2)$ sym.
526 (mw,sh)	–	519 (mw)	–	$\delta(\text{CO}_2)$ sym.
603 (mw)	–	597 (mw)	596	$\rho(\text{CO}_2)$ asym.
868 (mw)	–	863 (mw)	864	$\nu(\text{C-C})$
902 (s)	911 (s)	897 (m)	897	$\omega(\text{CC})$
937 (w,br)	–	943 (w, br)	–	H_2O
1406 (w)	1413 (w)	1397 (w)	1396	$\omega(\text{CO}_2)$
1476 (vs)	1476 (vs)	1464 (vs)	1467	$\nu(\text{CO}_2)$ sym.
1498 (s)	–	1491 (s)	1491	$\nu(\text{CO}_2)$ sym.
1638 (m)	1637 (mw)	1630 (m)	1630	$\nu(\text{CO}_2)$ asym.
1732 (w)	–	1726 (w)	–	–

vs: very strong, s: strong, m: medium, mw: medium weak, w: weak, br: broad, sh: shoulder

Man beobachtet das Duplett der symmetrische CO_2 -Streckschwingungen bei 1491 und 1467 cm^{-1} bei Calciumoxalat Monohydrat die bei Calciumoxalat Dihydrat zu einem Singulett bei 1467 cm^{-1} würde (s. Tab. 5.2). Bei einem Dihydrat sollten ebenso die asymmetrische CO_2 -Pendelschwingungen bei 596 bzw. 864 cm^{-1} fehlen. [165-173]

5.4 Kristalleinschlüsse

Neben Tabak treten auch in anderen Pflanzen Kristalle auf. So findet man z. B. in der Efeutute (*Epipremnum aureum*) Raphidienbündel (Abb. 5.8 A) und im Rhabarber (*Rheum officinale*) Kristalldrüsen (Abb. 5.8 B).

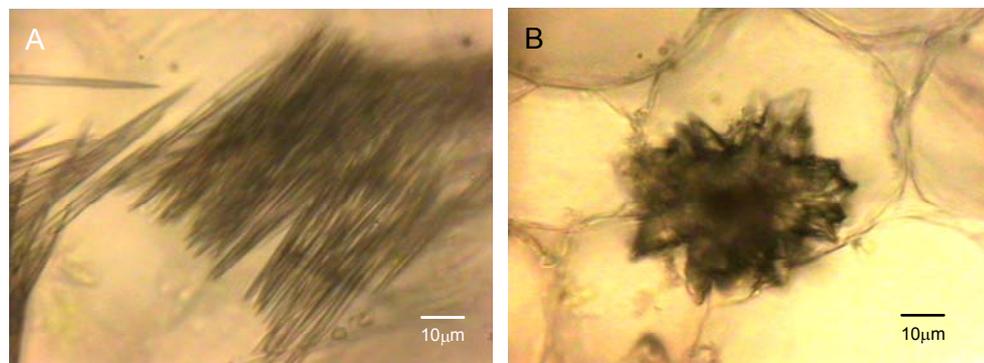


Abb. 5.8: Mikroskopische Aufnahmen von Kristalleinschlüssen; A: Efeutute (*Epipremnum aureum*), B: Rhabarber (*Rheum officinale*).

Die Mikro-Raman-Spektren an den Kristallen wurden mit einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm und einer Integrationszeit von 10 s aufgenommen. In Abb. 5.9 sind die entsprechenden Spektren dargestellt. Man erkennt deutlich, dass sowohl das Spektrum der Raphidien in der Efeutute (A) als auch das Spektrum der Druse in Rhabarber (B) dem Spektrum des Kristallsands von Tabak (C) sehr ähnlich sind. Auch der Vergleich mit dem Spektrum der Reinsubstanz (D) bestätigt, dass es sich in allen Fällen um Calciumoxalat-Monohydrat handelt.

Die einzelnen Spektren wurden an unterschiedlichen Kristallen aufgenommen. Die Intensität der polarisierten Banden bei 1630 , 1491 und 1467 cm^{-1} ändert sich aufgrund der unterschiedlichen relativen Lage der Kristalle unter dem Mikroskop.

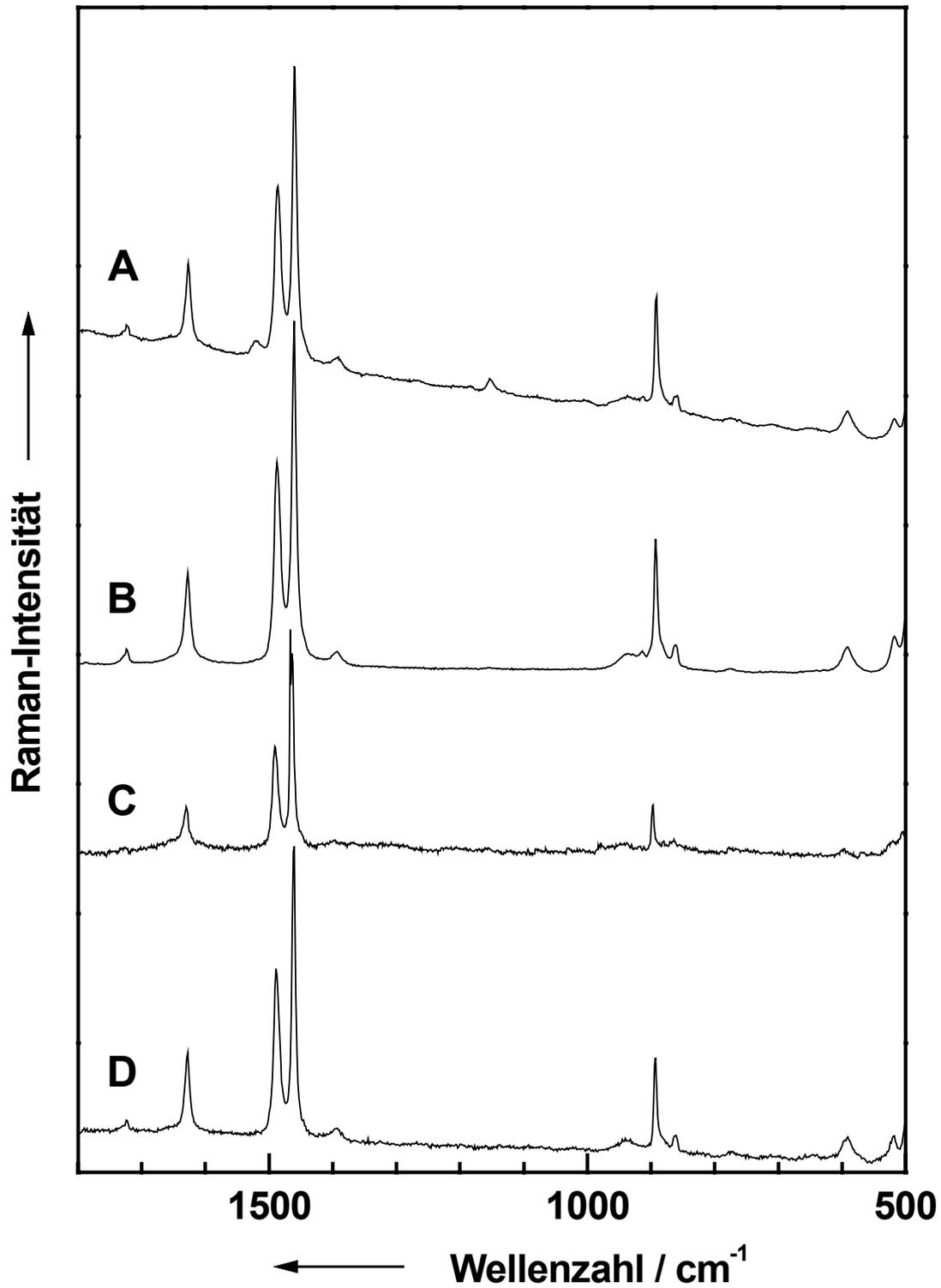


Abb. 5.9: Mikro-Raman-Spektren von Kristalleinschlüssen: A: Efeutute (*E. aureum*, Raphidien), B: Rhabarber (*R. officinale*, Druse), C: Tabak (*N. tabacum*, Kristallsand); D: Vergleichsspektrum von Calcium-oxalat-Monohydrat.

5.5 Speicherstoffe

In der Efeutute finden sich neben Kristalleinschlüssen auch Stärkekörner. Ihre Größe variiert zwischen 1 und 10 μm , wie in Abb. 5.10 zu sehen ist. Die Mikro-Raman-spektroskopischen Messungen an diesen Stärkekörnern zeigen eine gute Reproduzierbarkeit. Die Spektren wurden mit einer Laserwellenlänge von 514,5 nm und einer Integrationszeit von 10 s aufgenommen.



Abb. 5.10: Mikroskopische Aufnahme von Stärkekörnern in der Efeutute.

Vergleicht man ein typisches Spektrum der Stärkekörner mit den Spektren der Reinsubstanzen (s. Abb. 5.11), so erkennt man eine gute Übereinstimmung mit dem Spektrum der reinen Stärke. Die Spektren von Amylopektin und Amylose besitzen zwar eine gewisse Ähnlichkeit, weichen aber vor allem im Bereich unter 1000 cm^{-1} vom Spektrum der Stärkekörner ab, da die Signale aufgrund der geringeren Molekülgröße besser aufgelöst werden. Das Spektrum von D-Glucose, aus der die Stärke aufgebaut ist, besitzt keinerlei Ähnlichkeit mit dem Spektrum von Stärke bzw. Stärkekörnern.

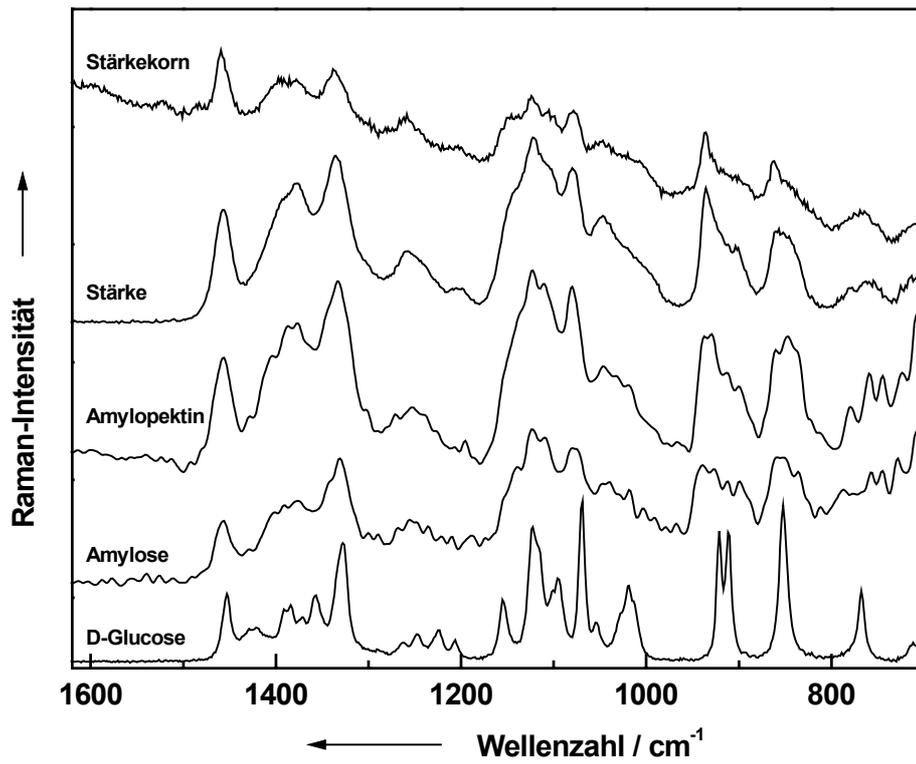


Abb. 5.11: Vergleich der Mikro-Raman-Spektren von Stärkekörnern mit Stärke, Amylose, Amylopektin und D-Glucose.

6 Lipide im Xylem von Laubbäumen

*In diesem Kapitel werden zunächst die Eigenschaften und das Vorkommen von verschiedenen Lipiden in Pflanzen diskutiert. Weiterhin wird auf die Funktion von Lipiden in der Auferstehungspflanze *Myrothamnus flabellifolia*, sowie beim Kältestress von Laubbäumen eingegangen.*

Im Anschluss daran werden die Mikro-Raman-spektroskopischen Untersuchungen von Öltröpfchen im Xylem der Auferstehungspflanze diskutiert.

Für die Untersuchung von Öltröpfchen im Xylem von Weide und Pappel werden neben Mikro-Raman-Spektren aus den Pflanzenschnitten auch Raman-Spektren von verschiedenen Fettsäuren und Phospholipiden diskutiert, um den Sättigungsgrad der gefundenen Lipide bestimmen zu können.

Von der Linde wird neben Xylem-Schnitten auch isolierter Xylemsaft Raman-spektroskopisch untersucht. Durch den Einsatz der Raman-Mapping-Technik über einen Xylem-Schnitt wird hier die genaue räumliche Verteilung der gefundenen Substanzen bestimmt.

6.1 Lipide

6.1.1 Struktur und Vorkommen

Als Lipide bezeichnet man eine Gruppe von Verbindungen, die meist aliphatische oder acyclische Kohlenwasserstoffreste besitzen. Dabei unterscheidet man prinzipiell apolare und polare Lipide. Apolare Lipide sind Verbindungen, die in Wasser nahezu unlöslich sind und auf einer Wasseroberfläche keine monomolekulare Schicht ausbilden. Sie dienen in Pflanzen zur Imprägnierung von Oberflächen und sollen Benetzung sowie Wasseraustausch verhindern. Als Beispiele seien hier die Wachse genannt. [152]

Polare Lipide haben eine höhere Affinität zu Wasser, allerdings kann der Anteil am hydrophilen Molekülteil sehr unterschiedlich sein. Man unterteilt die polaren Lipide aus diesem Grund in drei Klassen. Bei der ersten Klasse dominiert der lipophile Anteil. Die Moleküle sind in Wasser unlöslich, bilden aber stabile monomolekulare Schichten auf der Wasseroberfläche. Hierbei handelt es sich um Triacylglycerole bzw. viele fettlösliche Vitamine. Triacylglycerole werden häufig als Speicherlipide verwendet, die in energetisch hochwertige und schnell mobilisierbare Energiereserven umgewandelt werden können. Bei der zweiten Klasse sind die hydrophilen und lipophilen Bestandteile in etwa ausgewogen. Die Verbindungen sind praktisch nicht in Wasser löslich, quellen aber unter Wasseraufnahme. Diese Verbindungen bilden die wesentlichen Bestandteile in Membranen. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Phospholipide, wie z. B. Phosphocholine (PC) oder Phosphoethanolamine (PE). Bei der dritten Klasse überwiegt der hydrophile Teil des Moleküls. Die Verbindungen sind somit in Wasser löslich und bilden Mizellen aus. Es handelt sich hierbei um Saponine und Alkalisalze von Fettsäuren. [1,152]

Die hier diskutierten Phosphoglycerolipide bestehen im Wesentlichen aus drei Komponenten: Dem Glycerol, zwei langkettigen Acyl- oder Alkylresten und einer polaren Kopfgruppe, die über einen Phosphodiester an das Glycerol gebunden ist.

In Abb. 6.1 sind die Strukturen der wichtigsten in Lipiden gefundenen Fettsäuren dargestellt. Die Zahlen beziehen sich dabei auf das Verhältnis der C-Atome zu der Anzahl der Doppelbindungen im Molekül.

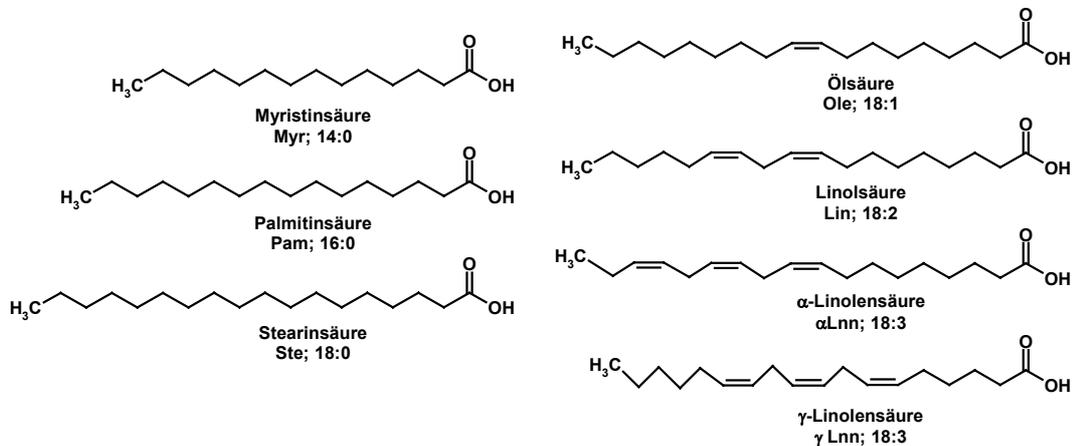


Abb. 6.1: Verschiedene gesättigte und ungesättigte Fettsäuren. (Legende: Ste; 18:0 entspricht: Stearinsäure; 18 C-Atome, keine Doppelbindungen)

Die in Pflanzen vorkommenden Fettsäuren sind unverzweigt und besitzen im Allgemeinen eine geradzahlige Anzahl an Kohlenstoffatomen, was sich auf ihre Biosynthese zurückführen lässt. Sie können in zwei große Klassen unterteilt werden, dabei ist die erste Klasse die der gesättigten Fettsäuren. Hier findet man vor allem Myristinsäure (Myr; 14:0), Palmitinsäure (Pam; 16:0), und Stearinsäure (Ste; 18:0). Die zweite große Klasse ist die der ungesättigten Fettsäuren, die sich durch eine unterschiedliche Anzahl cis-ständiger Doppelbindungen auszeichnet. Die Doppelbindungen sind durch jeweils eine CH₂-Gruppe getrennt. Hier sind Ölsäure (Ole; 18:1), Linolsäure (Lin; 18:2), α-Linolensäure (αLnn; 18:3) und γ-Linolensäure (γLnn; 18:3) die wichtigsten Vertreter.

Die Strukturen der in diesem Kapitel verwendeten Phospholipide, Phosphocholine und Phosphoethanolamin, sowie eines Phosphats sind in Abb. 6.2 mit ihren Abkürzungen dargestellt. Da das mittlere Kohlenstoffatom des Glycerols ein Chiralitätszentrum darstellt, ist bei Phospholipiden mit zwei unterschiedlichen Säureresten die Reihenfolge der Fettsäuren wichtig. Die hydrophile Kopfgruppe steht bei natürlich vorkommenden Phospholipiden normalerweise an der *sn*-3-Position. [1,152]

Die folgenden Phospholipide werden bei der Untersuchung verwendet: das 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphat Dinatriumsalz (DPP), die Phosphoethanolamine 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DPPE), 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DSPE), 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DMPE), und die Phosphocholine 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC), 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC), 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1-Oleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (OPPC), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC), 1,2-Dilinoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC) und 1,2-Dilinolenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (D α LPC).

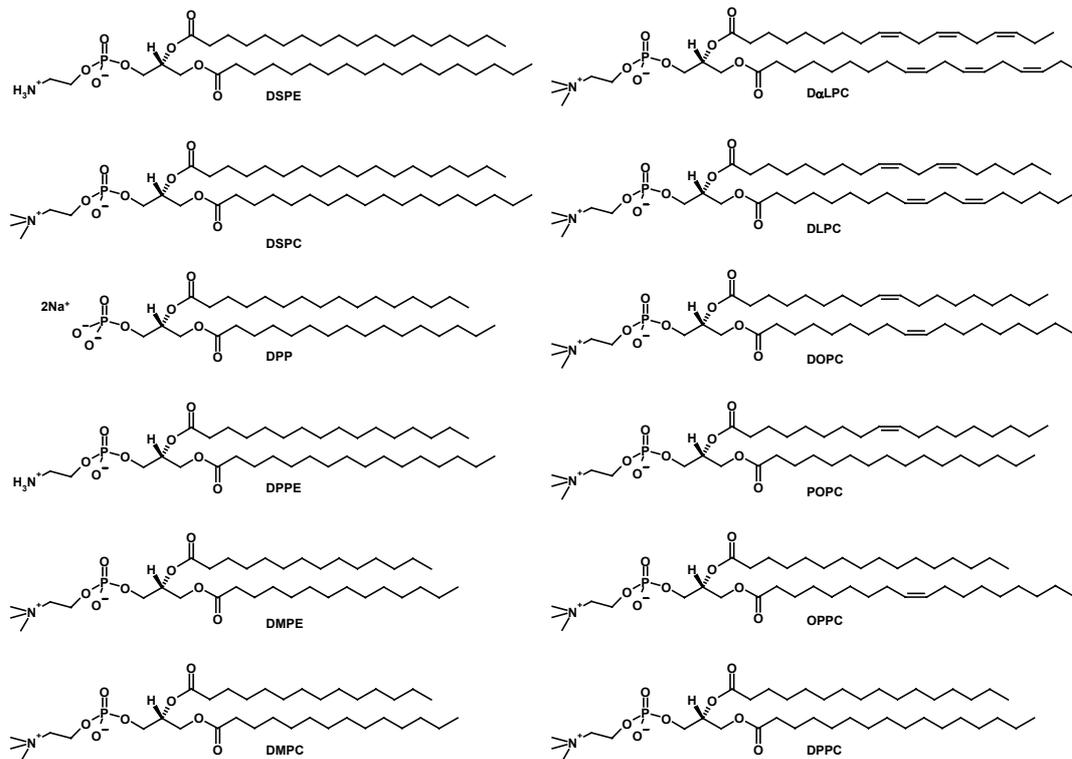


Abb. 6.2: Strukturen verschiedener gesättigter und ungesättigter Phospholipide.

6.1.2 Lipide in der Auferstehungspflanze

Die Auferstehungspflanze *Myrothamnus flabellifolia* ist im südlichen Afrika beheimatet. [174] An die dort herrschenden, im Allgemeinen extremen

Umweltbedingungen hat sich die Pflanze gut angepasst und ist in der Lage, lang anhaltende Trockenperioden zu überstehen. Sie trocknet auf einen Wassergehalt von nur 7 % ein. Erhält die trockene Pflanze Wasser, so entfalten sich ihre eingetrockneten Blätter innerhalb von wenigen Stunden und werden grün. Die Photosynthese setzt bereits nach ca. vier Stunden ein. [174,175]

Schneider et al. [176] konnten erstmals nachweisen, dass bei der trockenen Pflanze ein Lipidfilm im Inneren der Leitbahnen die Parenchymzellen vor dem Austrocknen bewahrt. Erhält die Pflanze Wasser werden zahlreiche Lipid-Tröpfchen in den Leitbahnen gefunden. Diese Lipide werden aus den Parenchymzellen sezerniert und über den Xylemweg umverteilt. Die Querverbindungen zwischen Xylem und den Zellen (Tüpfel) sind mit Lipid gefüllt, dies soll den Wasserverlust in Richtung Xylem und somit ein Austrocknen der Zellen unterbinden.

Es wird vermutet, dass die Fähigkeit, solch extreme Situationen zu überstehen, eng mit dem Vorkommen dieser Lipid-Tröpfchen in den Xylemgefäßen korreliert. [177-179] Die Lipide scheinen das schnelle Austrocknen der Pflanze zu verhindern und die Zellorganellen in Position zu halten.

6.1.3 Kältestress

Eine weitere wichtige Rolle spielen Lipide bei Pflanzen, die Kältestress ausgesetzt sind. Der durch Frost am weitesten verbreitete Schaden an Pflanzen entsteht durch Dehydration. Eiskristalle bilden sich außerhalb der Zelle und entziehen dieser dann Wasser, wodurch die Zelle austrocknet und letztendlich zerstört wird. [180] Eiskristallbildung in der Zelle führt zu einer Zerstörung der Membranen. Unterschiedliche Substanzen werden zu verschiedenen Zeitpunkten im Gewebe angereichert, um die Pflanze auf kältere Temperaturen vorzubereiten. Die Anreicherung von kleinen Zuckermolekülen wie Glucose oder Saccharose im Gewebe zum Ende des Sommers führt dazu, dass die Zellen durch das Absenken des Gefrierpunkts besser vor Frost geschützt sind. [181,182] Es konnte nachgewiesen werden, dass vor allem ungesättigte Fettsäuren eine entscheidende Rolle in der Erlangung von Frosttoleranz spielen. [183] In Parenchymzellen der Weide wurden

hohe Konzentrationen von 18:2 und 18:3 Fettsäuren bei der Winteradaptation nachgewiesen. [184]

Im Xylem von verschiedenen Laubbäumen konnten von August bis Oktober erstmals Öltröpfchen in Xylemgefäßen nachgewiesen werden. [185] Das kurzzeitige Erscheinen der Lipide im Xylemsaft deutet darauf hin, dass eine Umverteilung der Lipide durch das Xylemsystem stattfindet, um besonders empfindliche Pflanzenteile, wie z. B. Knospen, vor Kältestress zu schützen.

6.2 Raman-Spektroskopie an Lipiden

Raman-spektroskopische Untersuchungen an Lipiden wurden nicht nur an Modellsystemen von Mono- und Bilayern [186-194] durchgeführt, sondern auch an isolierten Biomembranen [195]. Neben SERS-Studien an verschiedenen Lipiden [61,196], wurde auch die Hydrolyse synthetischer und extrahierter Lipide [197,198] Raman-spektroskopisch untersucht. Bei den Raman- und IR-spektroskopischen Untersuchungen von menschlichen Koronar-Arterien [199-201], bei der Untersuchung von menschlichen Haut-Lipiden [202] und der Unterscheidung von normalem und malignen Gewebe im Mundbereich [203] sind die Signale von Lipiden als Markerbanden für Veränderungen im Gewebe wichtig.

Weiterhin wird die Raman-Spektroskopie von Lipiden eingesetzt, um die Zusammensetzung von essbaren pflanzlichen Ölen [204], von Weizen [36] und Milch [205] zu bestimmen.

6.3 Mikro-Raman-Spektroskopie von Öltröpfchen

Ziel der folgenden Untersuchung ist die Bestimmung der Zusammensetzung von Öltröpfchen im Xylem von verschiedenen Laubbäumen mit Hilfe der Mikro-Raman-Spektroskopie. Die untersuchten Xylem-Schnitte sowie die isolierten Xylem-Säfte wurden von der AG Prof. Zimmermann, Lehrstuhl für Biotechnologie (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

6.3.1 Auferstehungspflanze

E. Urlaub hat an der Auferstehungspflanze *Myrothamnus flabellifolia* Raman-spektroskopische Untersuchungen [19] sowohl im NIR (1064 nm) als auch im sichtbaren Spektralbereich (514,5 nm) durchgeführt. Aufgrund der starken Fluoreszenz der Probe bei einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm wurden die Untersuchungen bei 1064 nm durchgeführt. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen Bereichen mit und ohne Lipid-Tröpfchen gefunden werden. Versuche zur Fluoreszenz-Quenchung mit Silber-Kolloid (514,5 nm) schlugen fehl. Mit Hilfe von Trapping-Versuchen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei den beobachteten Tröpfchen nicht um mit einer Ölschicht stabilisierte Gasblasen sondern tatsächlich um Öltröpfchen handelt.

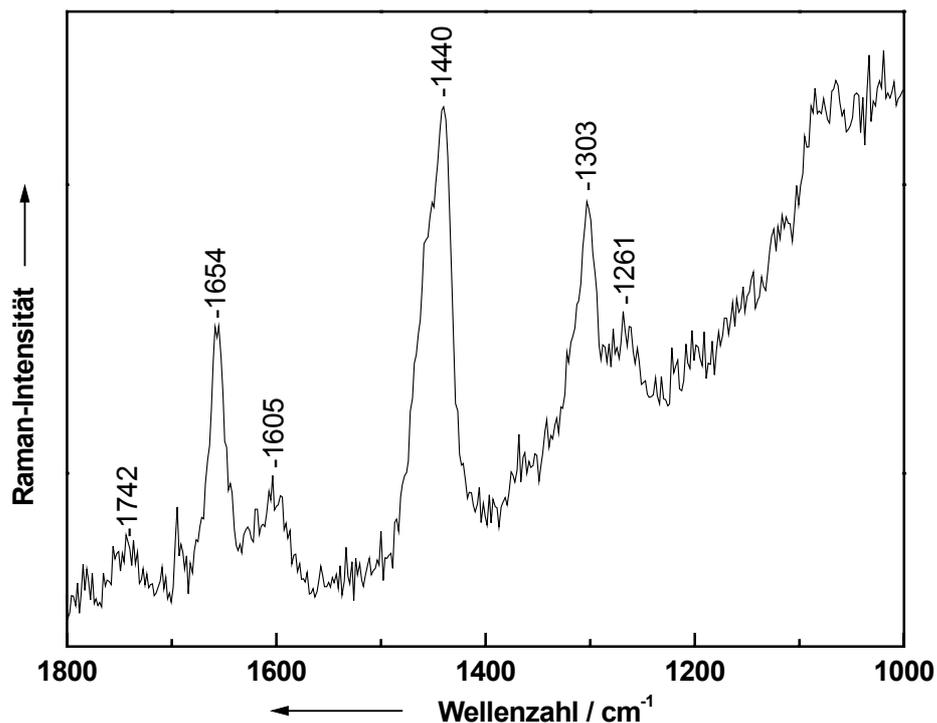


Abb. 6.3: Mikro-Raman-Spektrum des Öltröpfchens einer Auferstehungspflanze (*Myrothamnus flabellifolia*).

Aufgrund dieser Erfahrung wurden die folgenden Untersuchungen bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm durchgeführt. In Abb. 6.3 ist das Raman-Spektrum eines Öltröpfchens im Xylem der Auferstehungspflanze zu sehen. Die

Integrationszeit betrug 20 min. Für die Messung wurde ein Graufilter mit OD 0,6 und eine Lochblende im Detektionsstrahlengang von 500 μm verwendet.

Die Ester C=O-Bande bei 1742 cm^{-1} deutet auf eine veresterte Fettsäure hin. Dabei könnte es sich um ein Phospholipid handeln. Allerdings können die Banden der Phosphatgruppe nicht beobachtet werden. Die Bande bei 1440 cm^{-1} kann der CH_2 -Deformationsschwingung und die bei 1303 cm^{-1} der CH_2 -Torsionsschwingung zugeordnet werden. [187,196,206] Da die =CH-*in-plane*-Deformationsbande bei 1261 cm^{-1} nur wenig ausgeprägt ist, muss davon ausgegangen werden, dass nur ein geringer Anteil der C=C-Bande bei 1654 cm^{-1} dem Lipid zugeordnet werden kann. Es sollte sich in diesem Fall um ein gesättigtes Phospholipid oder ein Lipid mit sehr geringem Anteil an C=C-Doppelbindungen handeln. Ein Teil der C=C-Bande bei 1654 cm^{-1} , sowie die weniger intensive Bande bei 1605 cm^{-1} müssen einer weiteren Substanz zugeordnet werden. Da das Spektrum eine relativ schlechte Qualität aufweist, ist es allerdings nicht möglich, die Signale einem speziellen Phospholipid zuzuordnen.

6.3.2 Pappel und Weide

Für weitere Untersuchungen wurden Xylem-Schnitte von Weide und Pappel verwendet. In Abb. 6.4 sind mikroskopische Aufnahmen von Öltröpfchen im Xylem von Pappel (*Populus nigra* L., Bild A) und Weide (*Salix fragilis* L., Bild B) zu sehen.

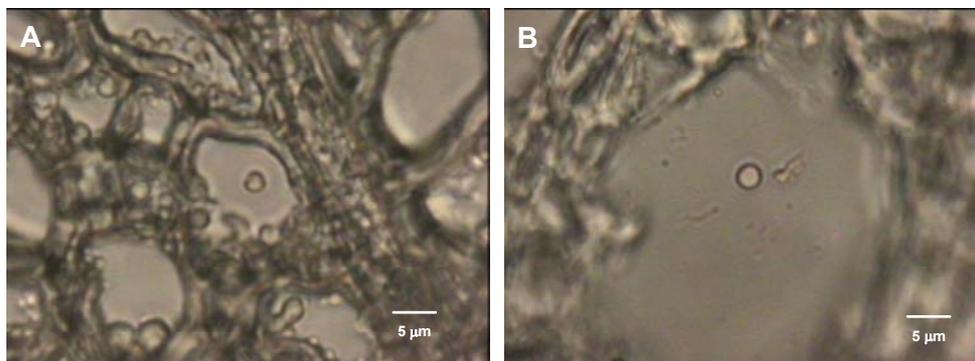


Abb. 6.4: Mikroskopische Aufnahmen von Xylemschnitten der Pappel (A) und der Weide (B).

Die zur Verfügung gestellten isolierten Xylem-Säfte dieser Laubbäume konnten nicht untersucht werden, da die Öltröpfchen aufgrund der geringen Größe im Fokus nicht stabil gefangen werden konnten.

In Abb. 6.5 sind die Mikro-Raman-Spektren aus dem Xylemschnitt der Pappel (*Populus nigra* L.) zu sehen. Spektrum a ist in der Zellwand und Spektrum b von einem Öltröpfchen aufgenommen. Die Integrationszeit für beide Spektren beträgt 10 min. Es wurde eine Laserleistung von 1 mW an der Probe und eine Lochblende im Detektionsstrahlengang von 500 μm verwendet.

Spektrum a besteht im Wesentlichen aus den Signalen von zwei Substanzen: Lignin und Cellulose. Die Hauptbanden von Lignin [35,207-217] sind die Bande einer Ketogruppe in Konjugation mit einem Phenylring bei 1659 cm^{-1} und die aromatische Ring-Streckschwingung bei 1606 cm^{-1} .

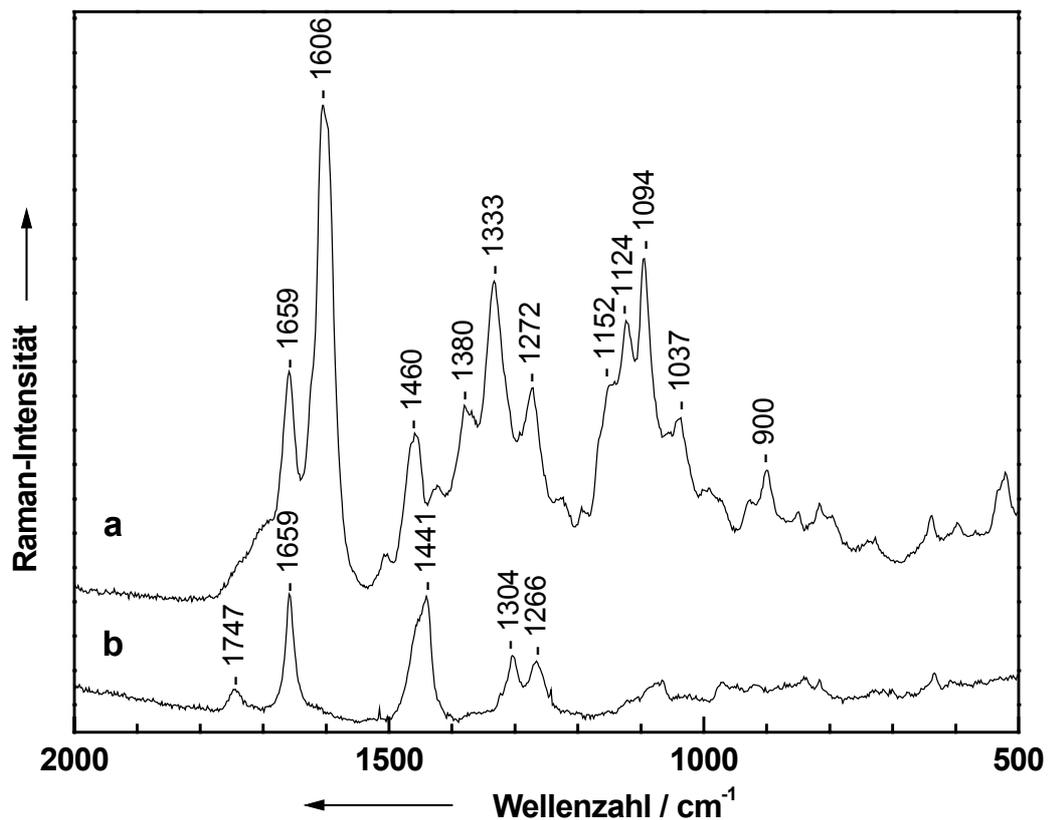


Abb. 6.5: Mikro-Raman-Spektren eines Xylemschnitts von Pappel. a: Zellwand; b: Öltröpfchen.

Von den charakteristischen Banden der Cellulose kann man die Kombination der CH_2 -Deformationsschwingung mit der COH -Deformationsschwingung von primären und sekundären Alkoholen bei 1460 cm^{-1} erkennen. Die CH_2 -Deformationsschwingung findet man bei 1380 cm^{-1} und die Kombination aus CH_2 -Kippschwingung mit der OH -Deformationsschwingung bei 1333 cm^{-1} , während die CH_2 -Torsionsschwingung bei 1272 cm^{-1} lokalisiert ist. Bei 1152 cm^{-1} erscheint die asymmetrische C-C-Ring-Atmungsschwingung. Eine Kombination der symmetrischen Streckschwingung der C-O-C-glycosidischen Bindung und der C-O-C-Ring-Atmungsschwingung kann der Bande bei 1124 cm^{-1} zugeordnet werden, während die asymmetrische Streckschwingung der C-O-C-glycosidischen Bindung bei 1094 cm^{-1} zu finden ist. Die Bande bei 1037 cm^{-1} kann der C-O-Streckschwingung primärer Alkohole zugeordnet werden. Die symmetrische *in plane* C-O-C-Streckschwingung ist bei 900 cm^{-1} zu erkennen. [35,36,187,206,210,218-226]

Spektrum b ist das Raman-Spektrum eines Öltröpfchens. Die Banden entsprechen wiederum denen eines Phospholipids. Bei 1747 cm^{-1} kann man die Bande der symmetrischen C=O-Streckschwingung des Esters erkennen. Die C=C-Streckschwingung bei 1659 cm^{-1} kann der cis-ständigen Doppelbindung zugeordnet werden. [225] Die Bande bei 1441 cm^{-1} entspricht der CH_2 -Deformationsschwingung, die beiden Banden bei 1304 und 1266 cm^{-1} können den Torsionsschwingungen von $-\text{CH}_2$ bzw. der *in-plane* Deformationsschwingung von $=\text{CH}$ zugeordnet werden. [187,196,206] Auch in diesem Fall sind die Banden der Phosphat-Gruppe nicht zu beobachten, aus diesem Grund kann nicht positiv geklärt werden, ob ein Phospholipid vorliegt. Der Sättigungsgrad des Moleküls kann nicht direkt über die Intensität der C=C-Doppelbindung bestimmt werden, da ein Referenzwert für die Kalibrierung fehlt. Aus diesem Grund werden die Intensitätsverhältnisse der CH_2 - und $=\text{CH}$ -Schwingungen als Markerbanden für die Bestimmung des Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren herangezogen. [36] Daher werden im Folgenden die Spektren von Fettsäuren und als Referenzsubstanzen für verestert Fettsäuren die von Phospholipiden näher untersucht.

In Abb. 6.6 sind die Raman-Spektren der Fettsäuren Stearinsäure (a), Palmitinsäure (b), Ölsäure (c), Linolsäure (d) und α -Linolensäure (e) zu sehen. Für die Spektren der

Reinsubstanzen wurden Integrationszeiten von 30 bis 120 s verwendet. Die Strukturen der Fettsäuren sind in Abb. 6.1 dargestellt.

Die Spektren a und b der gesättigten Fettsäuren Stearinsäure und Palmitinsäure wurden an festen Proben gemessen. Aus diesem Grund sind vor allem die CH_2 -Deformationsbanden um 1440 cm^{-1} sehr scharf und gut aufgelöst. Aufgrund des sukzessiven Einbaus von einer oder mehreren cis-ständigen Doppelbindungen in die Fettsäureketten bei der Ölsäure (c), Linolsäure (d) und Linolensäure (e), ist die Packung der Moleküle nicht mehr so dicht, die Fettsäuren sind flüssig, und die Banden in den Spektren breiter und weniger gut aufgelöst. [222]

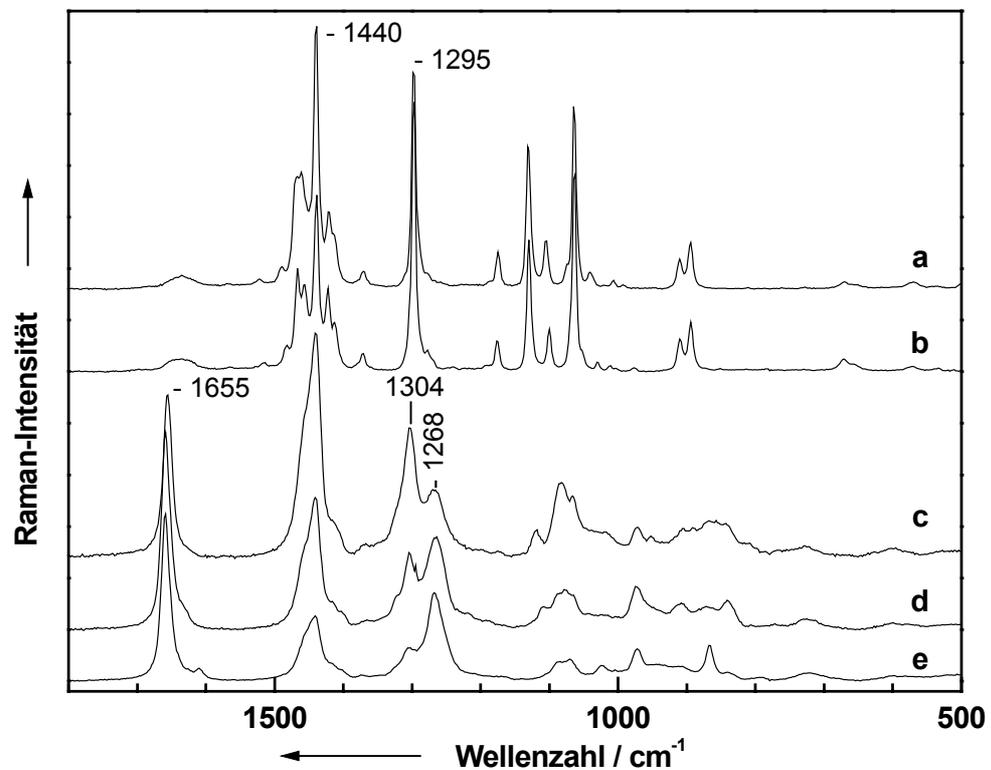


Abb. 6.6: Raman-Spektren verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren. a: Stearinsäure; b: Palmitinsäure; c: Ölsäure; d: Linolsäure; e: α -Linolensäure.

In dem Maße, wie die Intensität der C=C-Doppelbindungsbande bei 1655 cm^{-1} mit der Anzahl der cis-ständigen Doppelbindungen zunimmt, nimmt gleichzeitig auch die Intensität der =CH-*in-plane*-Deformationsbande bei 1268 cm^{-1} zu und die Intensität der $-\text{CH}_2$ -Torsionsbande bei 1304 cm^{-1} ab.

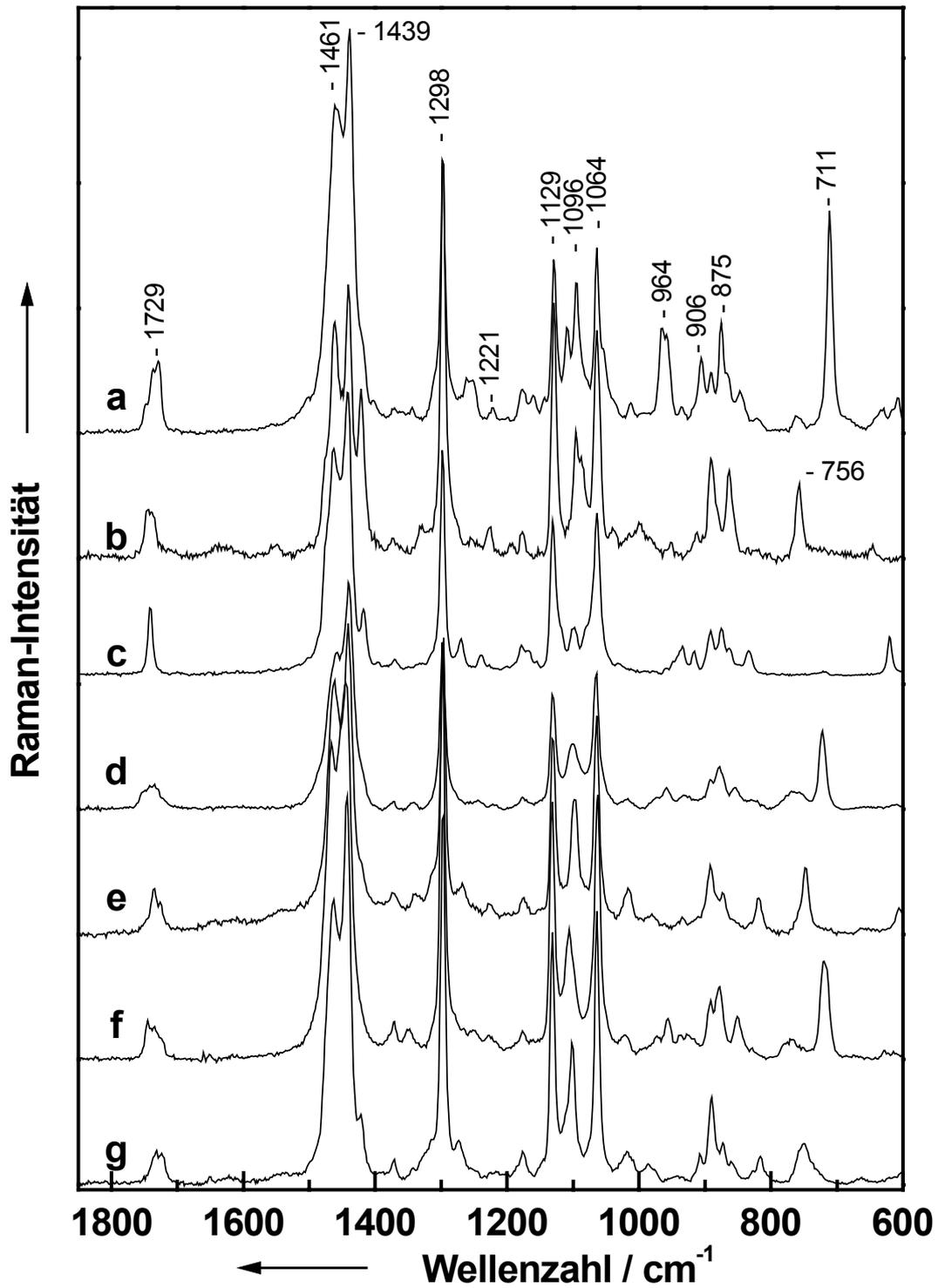


Abb. 6.7: Raman-Spektren verschiedener Phospholipide gesättigter Fettsäuren.
 a: DMPC; b: DMPE; c: DPP; d: DPPC; e: DPPE; f: DSPC; g: DSPE.

Diese beiden Banden können somit als Markerbanden für den Sättigungsgrad einer Fettsäure verwendet werden. Für vollständig gesättigte Fettsäuren ist die CH_2 -Torsionsbande nach 1295 cm^{-1} verschoben.

Betrachtet man anstelle der reinen Fettsäuren nun die einzelnen Phospholipide, so erhält man ähnliche Werte. In Abb. 6.7 sind zunächst die Spektren verschiedener Phospholipide gesättigter Fettsäuren dargestellt. Es handelt sich dabei um die Spektren von 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC, Spektrum a), 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DMPE, Spektrum b), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphat Dinatriumsalz (DPP, Spektrum c), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC, Spektrum d), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DPPE, Spektrum e), 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC, Spektrum f) und 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DSPE, Spektrum g).

In Abb. 6.1 ist die Struktur verschiedener Fettsäuren und in Abb. 6.2 die verschiedener Phospholipide dargestellt. Die Zuordnungen der einzelnen Banden der Phospholipide sind in Tab. 6.1 aufgeführt.

In Abb. 6.7 erkennt man im Gegensatz zu den Raman-Spektren der Fettsäuren die Carbonylschwingung der Estergruppe bei 1729 cm^{-1} . Die Banden der CH_2 -Deformationsschwingungen der Phosphocholine (DMPC, DPPC, DSPC) sind bei 1461 und 1439 cm^{-1} zu erkennen. Bei DPP ist eine weitere Bande bei 1418 cm^{-1} und bei den Phosphoethanolaminen (DMPE; DPPE, DSPE) bei 1421 cm^{-1} zu erkennen.

Die CH_2 -Torsionsschwingung der gesättigten Phospholipide bei 1298 cm^{-1} ist unabhängig von der Kopfgruppe. Auch die asymmetrische und symmetrische PO_2^- -Streckschwingungen bei 1221 bzw. 1096 cm^{-1} , sowie die C-C-Streckschwingungen bei 1129 bzw. 1064 cm^{-1} werden von der Kopfgruppe nur minimal beeinflusst.

Die N- CH_3 -Pendelschwingung bei 964 cm^{-1} ist ausschließlich bei den Phosphocholinen zu beobachten. Die Bande ist bei DMPC besonders intensiv, allerdings in den Spektren von DPPC und DSPC nur noch als schwache Bande bei 959 bzw. 956 cm^{-1} zu sehen.

Tab. 6.1: Zuordnung der Raman-Banden verschiedener Phospholipide (Wellenzahlen in cm^{-1}). [36,187,206,221-226]

DMPC	DMPE	DPP	DPPC	DPPE	DSPC	DSPE	POPC	OPPC	DOPC	DLPC	D α LPC	Zuordnung
1729	1744	1742	1735	1735	1745	1731	1727	1736	1738	1740	1736	$\nu(\text{C}=\text{O})$
-	-	-	-	-	-	-	1657	1657	1657	1658	1659	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{cis}}$
1461	1461	1463	1461	1461	1467	1463	1452	1452	1453	1453	-	$\delta(\text{CH}_2)$ und $\delta(\text{CH}_3)$
1441	1441	1442	1441	1441	1444	1442	1439	1439	1443	1444	1442	$\delta(\text{CH}_2)$
1439	1421	1418	1441	1420	1444	1421	1299	1299	1302	1302	1302	$\tau_{\text{ip}}(-\text{CH}_2)$
1298	1298	1298	1298	1297	1298	1296	1262	1262	1273	1267	1266	$\delta_{\text{ip}}(=\text{CH})$
-	-	-	-	-	-	-	1223	1223	-	-	-	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$
1221	1225	1240	-	1227	-	-	-	-	-	-	-	-
1176	1176	1178	1176	1175	1176	1176	-	-	-	-	-	-
1129	1129	1131	1132	1132	1131	1131	1130	1130	1124	-	-	$\nu(\text{C}-\text{C})$
1096	1096	1098	1100	1098	1106	1102	1096	1096	1088	1090	1088	$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$
1064	1064	1064	1064	1064	1062	1064	1065	1065	1068	1068	1068	$\nu(\text{C}-\text{C})$
1013	1001	-	1017	1017	1023	1019	1015	1015	1023	-	1018	-
964	-	-	959	-	956	-	959	961	963	962	970	$\rho(\text{N}-\text{CH}_3)$
906	892	892	892	892	892	890	890	892	890	890	-	$\rho(\text{C}-\text{CH}_3)$
875	863	875	878	874	877	873	876	876	878	875	867	$\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{C}-\text{N}^+)$
-	-	834	-	818	-	816	-	-	-	-	-	$\nu_{\text{as}}(\text{O}-\text{P}-\text{O})$
763	-	-	769	-	771	-	761	763	-	-	-	$\nu_{\text{s}}(\text{O}-\text{P}-\text{O})$ und $\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{N})$
711	756	620	721	748	719	750	711	711	719	719	717	$\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{N})$

Dagegen taucht die C-CH₃-Pendelschwingung zwischen 906 und 892 cm⁻¹ ebenso wie die C-C-N⁺-Streckschwingung bei 875 cm⁻¹ in allen Phospholipiden auf. Die symmetrische C-N-Streckschwingung ist wiederum als Markerbande für die Kopfgruppe geeignet.

Bei den Phosphoethanolaminen ist sie im Bereich von 750 cm⁻¹ lokalisiert. In DPP ist diese Bande bei 620 cm⁻¹ am weitesten zu niedrigen Wellenzahlen verschoben. Bei den Phosphocholinen findet man diese Bande zwischen 711 und 721 cm⁻¹.

In Abb. 6.8 sind die Raman-Spektren von fünf ungesättigten Phosphocholinen im Vergleich zum Spektrum von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC, Spektrum a) dargestellt. Bei den ungesättigten Phosphocholinen handelt es sich um 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC, Spektrum b), 1-Oleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (OPPC, Spektrum c), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC, Spektrum d), 1,2-Dilinoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC, Spektrum e) und 1,2-Dilinolenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (D α LPC, Spektrum f).

Für die Messungen wurden Integrationszeiten von 60 bis 300 s verwendet. Die Strukturen der Phospholipide sind in Abb. 6.2 abgebildet, die Banden und ihre Zuordnung in Tab. 6.1 aufgelistet.

Die Carbonyl-Streckschwingung der Estergruppe ist bei 1740 cm⁻¹ zu erkennen und die C=C-Streckschwingung bei 1658 cm⁻¹. Die CH₂-Deformationsschwingung erscheint bei 1440 cm⁻¹ mit einer Schulter bei 1435 cm⁻¹, die mit steigender Anzahl an C=C-Doppelbindungen an Intensität verliert. Die Torsionsschwingungen der -CH₂- und =CH-Gruppen sind bei 1303 und 1267 cm⁻¹ zu beobachten. In dem Maß wie die Intensität der C=C-Doppelbindung zunimmt, erhöht sich die Intensität der =CH-Bande, und die Intensität der -CH₂-Bande sinkt.

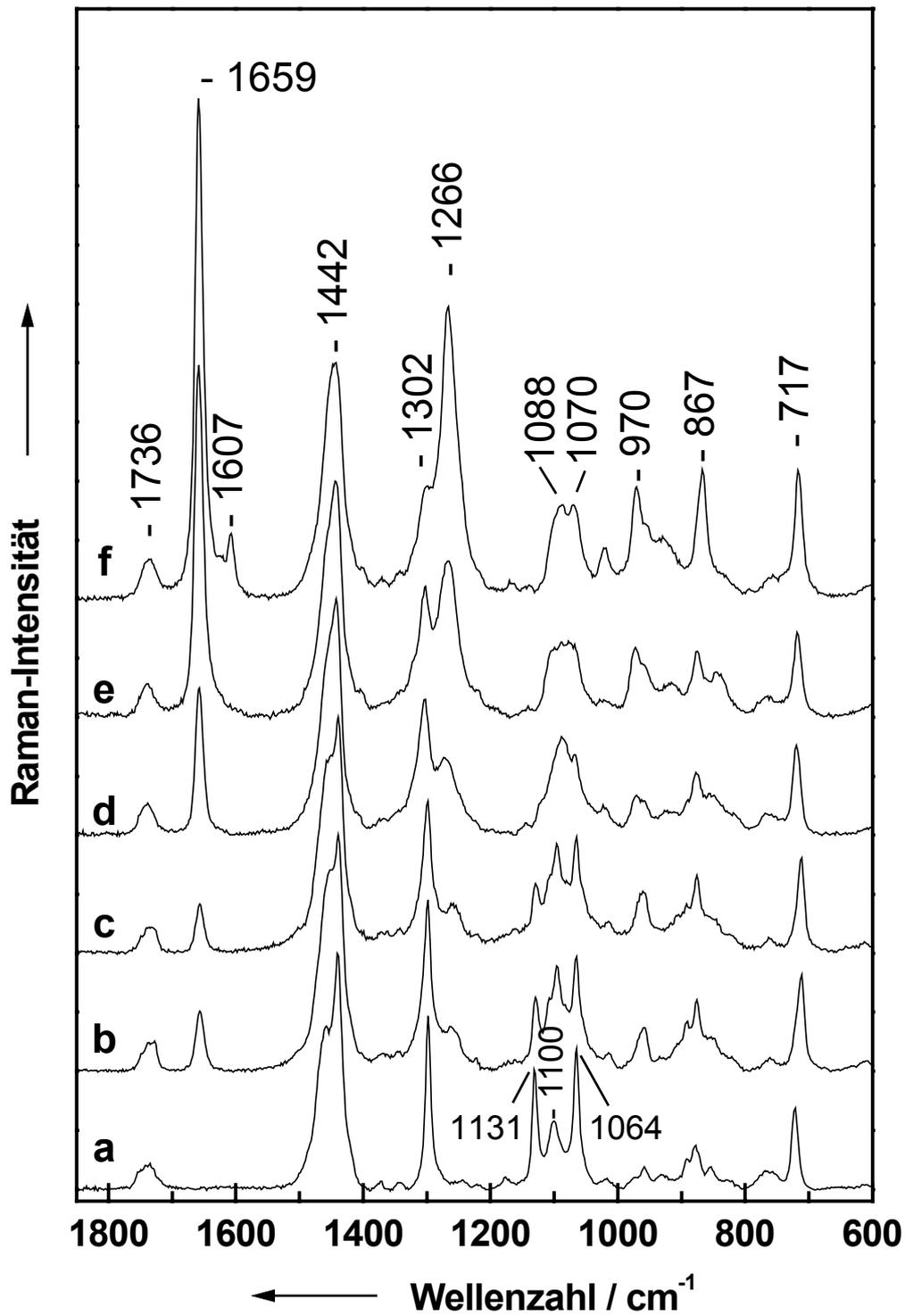


Abb. 6.8: Raman-Spektren verschiedener Phosphocholine mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. a: DPPC; b: POPC; c: OPPC; d: DOPC; e: DLPC; f: D α LPC.

Die C-C-Banden sind in DPPC bei 1132 und 1064 cm^{-1} zu beobachten. Dazwischen ist die PO_2^- -Bande lokalisiert. Die Banden des scharfen Triplets in den gesättigten Phospholipiden rücken mit steigender Anzahl der C=C-Doppelbindungen bei den ungesättigten Phosphocholinen zusammen. Bei $\text{D}\alpha\text{LPC}$ erscheint nur noch ein Dublett bei 1088 und 1070 cm^{-1} . Die Signale der Kopfgruppe der Phosphocholine zeigen sich in den Banden der N- CH_3 -Pendelschwingung bei 970 cm^{-1} , der C-C-N⁺-Streckschwingung bei 867 cm^{-1} , sowie der C-N-Streckschwingung bei 717 cm^{-1} .

Um den Anteil an ungesättigten Gruppen im Molekül der Phosphocholine zu bestimmen, werden im Folgenden die Intensitätsverhältnisse der CH_2 -Torsionsschwingung und der =CH-Deformationsschwingungen verwendet. In Tab. 6.2 sind die Intensitäten der Banden sowie das Verhältnis der gesättigten $-\text{CH}_2$ -Bande bei 1303 cm^{-1} zu den ungesättigten =CH-Bande bei 1267 cm^{-1} aufgelistet.

Tab. 6.2: Intensitätsverhältnisse der =CH (1267 cm^{-1}) und $-\text{CH}_2$ (1303 cm^{-1}) Banden von verschiedenen Phospholipiden.

Phospholipid	$I_1(1267 \text{ cm}^{-1})$	$I_2(1303 \text{ cm}^{-1})$	I_2/I_1	Anzahl $-\text{CH}_2$ /Anzahl =CH
POPC	0,34	1,31	3,90	(28/2) = 14
OPPC	0,31	1,19	3,84	(28/2) = 14
DOPC	0,51	0,98	1,91	(28/4) = 7
DLPC	1,13	0,90	0,80	(24/8) = 3
$\text{D}\alpha\text{LPC}$	2,26	0,73	0,32	(20/12) = 1,67

Für eine Auswertung der relativen Intensitäten dieser beiden Banden werden die Intensitätsverhältnisse gegen den Anteil an $-\text{CH}_2$ -Gruppen im Verhältnis zu den =CH-Gruppen der Fettsäuren im Molekül aufgetragen.

In Abb. 6.9 ist diese Auftragung abgebildet. Man erhält eine lineare Beziehung. Die beiden Phosphocholine 1-Oleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (OPPC) und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) mit jeweils einer C=C-Doppelbindung liegen mit einem Intensitätsverhältnis von 3,84 bzw. 3,90 und einem Verhältnis der einzelnen Gruppen im Molekül von 14 am weitesten von den anderen Phosphocholinen im Plot entfernt. Ihre Intensitätsverhältnisse sind minimal zu hoch.

Mit zwei bzw. vier Doppelbindungen liegen 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) und 1,2-Dilinoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC) genau auf der angefütteten Kurve, während 1,2-Dilinenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (D α LPC) mit sechs C=C-Doppelbindungen ein etwas zu tiefes Intensitätsverhältnis aufweist.

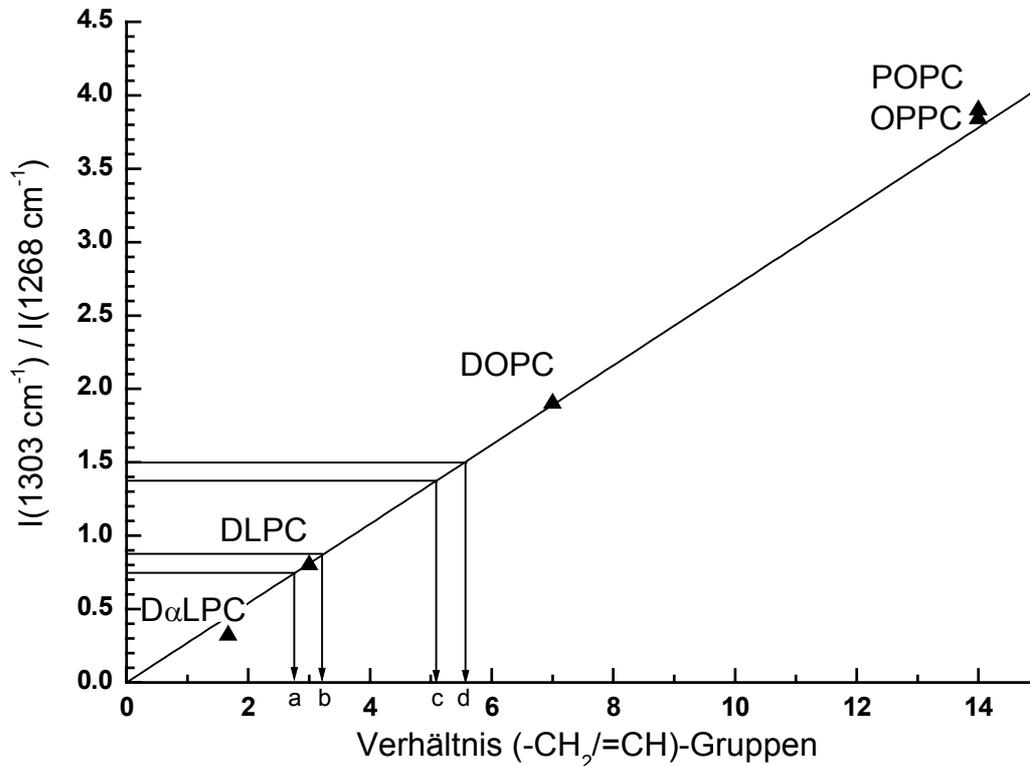


Abb. 6.9: Intensitätsverhältnisse (-CH₂/=CH) zu dem Verhältnis der -CH₂- zu den =CH-Gruppen. Die Markierungen beziehen sich auf die Verhältnisse in den Pflanzen. a: Weide; b: Pappel; c: isolierter Xylemsaft, Linde; d: Linde aus Xylem.

Vergleicht man in Abb. 6.10 die beiden Mikro-Raman-Spektren von Öltröpfchen aus der Weide (a) und der Pappel (b), so erkennt man, dass die Intensitätsverhältnisse der CH₂- bzw. =CH-Gruppen sehr ähnlich sind. Vergleicht man diese Spektren mit den Spektren der in Frage kommenden Reinsubstanzen DOPC (c) und DLPC (d), zeigt sich, dass die Intensitätsverhältnisse der Öltröpfchen zwischen den Intensitätsverhältnissen der beiden Phosphocholine liegen. Bei einer genaueren Überprüfung der Torsionsbanden erhält man für Weide ein Intensitätsverhältnis von 0,74 und für Pappel von 0,88. Die Werte sind in Tab. 6.3 angegeben.

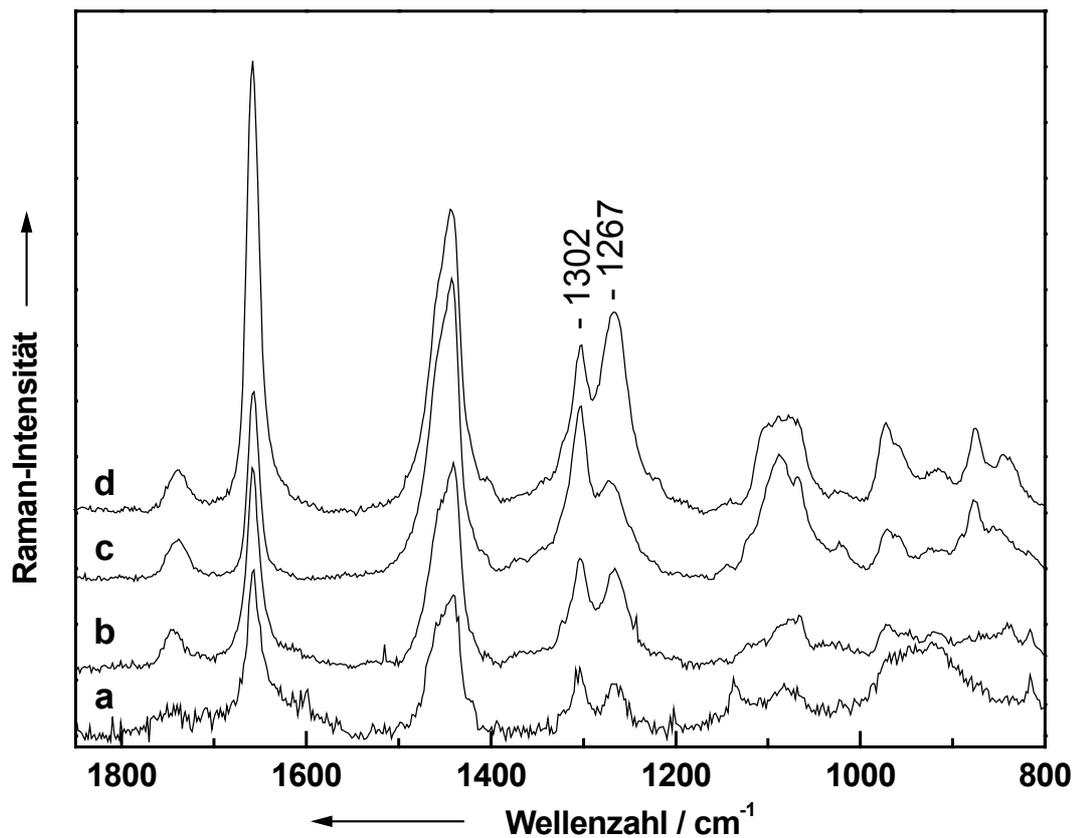


Abb. 6.10: Mikro-Raman-Spektren von Öltröpfchen in Xylem von Weide (a) und Pappel (b) im Vergleich zu den Phospholipiden DOPC (c) und DLPC (d).

Gibt man diese Werte in den Plot von Abb. 6.9 ein, so erhält man ein Verhältnis der $-\text{CH}_2-$ zu $=\text{CH}$ -Gruppen von 2,74 für Weide (Wert a) und 3,26 für Pappel (Wert b). Daraus lässt sich das Verhältnis aller Kohlenstoffatome zu der Anzahl von $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindungen im Fettsäureanteil der Phosphocholine zu 34:4 bei Weide und 38:4 bei Pappel berechnen.

Tab. 6.3: Intensitätsverhältnisse der $=\text{CH}$ (1267 cm^{-1}) und $-\text{CH}_2$ (1303 cm^{-1}) Banden von Pappel und Weide.

Pflanze	$I_1(1267 \text{ cm}^{-1})$	$I_2(1303 \text{ cm}^{-1})$	I_2/I_1	Verhältnis ($-\text{CH}_2/=\text{CH}$)	Lipid C-Atome:C=C
Weide	0,98	0,73	0,74	2,74	34:4
Pappel	0,86	0,76	0,88	3,26	38:4

Das gesuchte Lipid ist also dem DLPC sehr ähnlich, muss aber nicht unbedingt eine gleichmäßige Verteilung der C=C-Doppelbindungen oder gleich lange Fettsäureketten aufweisen.

6.3.3 Linde

Neben Weide und Pappel wurden auch Proben von Linde (*Tilia cordata* L.) untersucht. In Abb. 6.11 sind mikroskopische Aufnahmen von der Emulsion eines isolierten Xylemsafts (A) und eines Xylemschnitts (B) dargestellt.

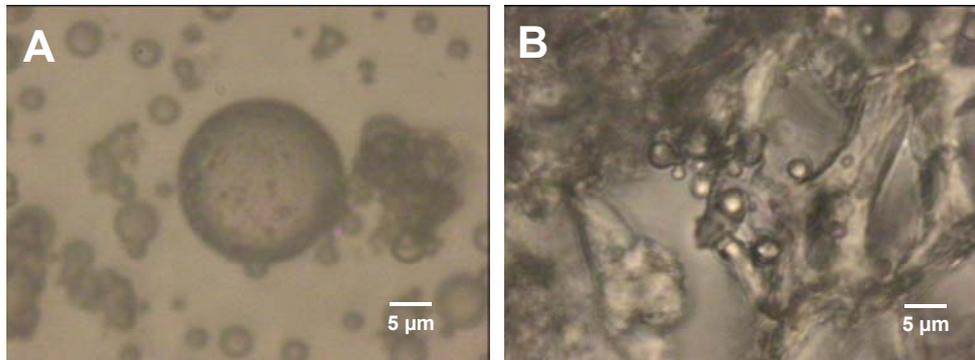


Abb. 6.11: Mikroskopische Aufnahmen einer Emulsion des Xylemsafts (A) und eines Xylemschnitts (B) von Linde.

Der Xylemsaft wurde im Lehrstuhl für Biotechnologie nach der Kompressions-Dekompressionsmethode von V. Schill [227] isoliert. Diese Methode stellt sicher, dass mit Ausnahme des Cytoplasmas der zerstörten Zellen an der Schnittfläche ausschließlich der Inhalt der Xylemgefäße extrahiert wird. Die Öltröpfchen im Xylemschnitt sind wesentlich kleiner als die Öltröpfchen im isolierten Xylemsaft. Dies lässt darauf schließen, dass es bei der Isolation des Xylemsafts zumindest zu einer Koaleszenz der kleineren Öltröpfchen kommt.

In Abb. 6.12 sind die Mikro-Raman-Spektren der Linde dargestellt. Dabei stammt Spektrum a von einem Öltröpfchen aus isoliertem Xylemsaft und die Spektren b und c aus der Zellwand bzw. einem Öltröpfchen eines Zellschnitts. Für die Messungen wurde die Laserleistung von 1 mW an der Probe mit einer Integrationszeit von jeweils 20 min verwendet.

Die Signale im Spektrum der Zellwand (c) können hauptsächlich den aromatischen C=C-Doppelbindungen von Lignin (1659 und 1602cm^{-1}) und den Banden von Cellulose (1379 cm^{-1} $\delta(\text{CH}_2)$, 1333 cm^{-1} $\delta(\text{COH})$, 1272 cm^{-1} $\tau(\text{CH}_2)$, 1153 cm^{-1} $\nu(\text{C-C})$, 1120 cm^{-1} $\nu_s(\text{C-O-C})$, 1096 cm^{-1} $\nu_{as}(\text{C-O-C})$, 1039 cm^{-1} $\nu(\text{C-O})$ und 902 cm^{-1} $\nu_s(\text{C-O-C})$ *in plane*) zugeordnet werden. Allerdings treten in diesem Spektrum auch Lipid-Banden (1659 und 1740cm^{-1}) auf. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei der Präparation des Xylemschnitts wahrscheinlich ein Lipid-Tröpfchen über die Zellwand verschmiert wurde.

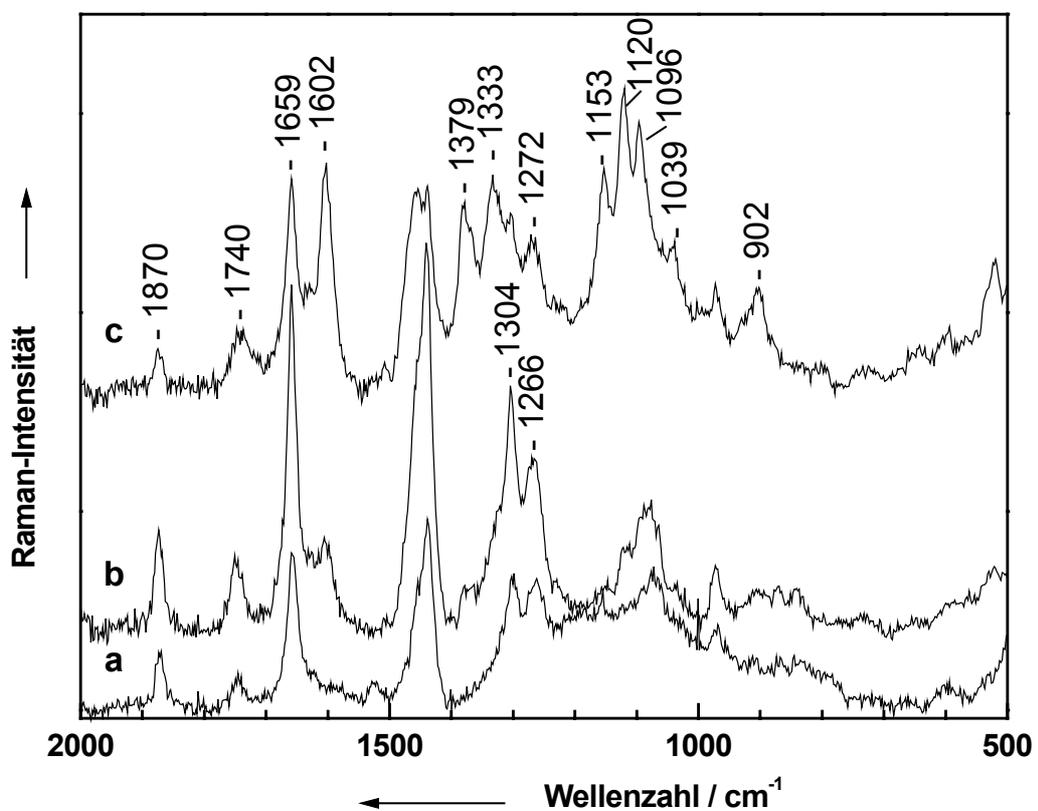


Abb. 6.12: Mikro-Raman-Spektren von Linde. a: Emulsion des Xylemsaft; b: Öltröpfchen im Xylemschnitt, c: Zellwand.

Die Banden des Öltröpfchens sind die typischen Banden eines ungesättigten Phospholipids. Man erkennt die Carbonyl-Ester-Bindung bei 1740 cm^{-1} , die C=C-Doppelbindung bei 1659 cm^{-1} und die $-\text{CH}_2$ -Torsionsschwingung bzw. $=\text{CH-in-plane}$ -Deformationsschwingung bei 1304 und 1266 cm^{-1} . Eine weitere signifikante Bande ist bei allen drei Spektren die Bande bei 1870 cm^{-1} . Diese gehört nicht zu einem Signal

der Phospholipide, ist allerdings in allen Spektren der Öltröpfchen der Linde zu beobachten. In der Literatur wird diese Bande als die eines gesättigten, anhydridischen Fünfrings beschrieben. [228,229] Da die Lipide in einem wässrigen System vorliegen, ist diese Interpretation aber wenig wahrscheinlich.

Der Fluoreszenzuntergrund in Spektrum a ist wesentlich höher als bei den beiden anderen Spektren. Die einzelnen Banden sind aber identisch zu den Banden im Spektrum des Xylemschnitts (b). Der einzige Unterschied zwischen den Spektren a und b sind die Intensitäten der Torsionsschwingungen. In Spektrum b ist die $-\text{CH}_2$ -Bande deutlich intensiver als die $=\text{CH}$ -Bande, d. h. das Phospholipid hat einen höheren Anteil an gesättigten Bereichen, als dies bei den Spektren der Pappel und Weide zu erkennen war. In Spektrum a sind die Intensitäten der beiden Banden nahezu gleich groß, wenn man den Fluoreszenz-Untergrund nicht berücksichtigt. Wird dieser in der Berechnung berücksichtigt, so erhält man ähnliche Intensitätsverteilungen wie in Spektrum b. In Tab. 6.4 sind die Intensitäten der Marker-Banden und ihre Verhältnisse dargestellt.

Tab. 6.4: Intensitätsverhältnisse der $=\text{CH}$ (1267 cm^{-1}) und $-\text{CH}_2$ (1303 cm^{-1}) Banden von Linde.

Pflanze	$I_1(1267\text{ cm}^{-1})$	$I_2(1303\text{ cm}^{-1})$	I_2/I_1	Verhältnis ($-\text{CH}_2/=\text{CH}$)	Lipid C-Atome:C=C
Linde (Xylemsaft)	0,63	0,87	1,37	5,07	40:3 28:2
Linde (Xylemschnitt)	0,63	0,93	1,50	5,56	44:3 30:2

Für den Xylemschnitt erhält man ein Intensitätsverhältnis von 1,50 und für den isolierten Xylemsaft von 1,37. Durch Verwendung des Plots in Abb. 6.9 erhält man die Verhältnisse der $-\text{CH}_2$ - zu $=\text{CH}$ -Gruppen mit 5,56 (Xylemschnitt, Wert d) bzw. 5,07 (Xylemsaft, Wert c). Daraus errechnet sich das Verhältnis aller Kohlenstoffatome zu der Anzahl von C=C-Doppelbindungen im Fettsäureanteil der Phosphocholine zu 40:3 oder 28:2 für den Xylemsaft bzw. 44:3 oder 30:2 für den Xylemschnitt. Auch in diesem Fall sagen die Werte nur etwas über die Gesamtsituation im Fettsäure-Teil des Moleküls und nichts über die tatsächliche Länge bzw. deren Sättigungsgrad aus.

Da im Mikro-Raman-Spektrum der Zellwand von Abb. 6.12 c neben den Signalen des Lignins und der Cellulose auch Lipid-Banden zu erkennen sind, soll im Folgenden mit Hilfe der Raman-Mapping-Technik die räumliche Verteilung des Phospholipids in einem frisch präparierten Xylemschnitt untersucht werden.

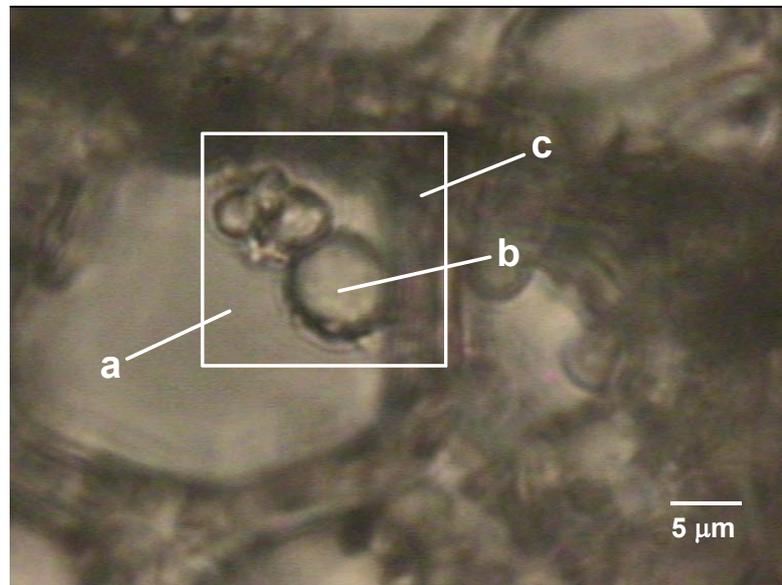


Abb. 6.13: Mikroskopische Aufnahme eines Xylemschnitts von Linde. Der weiße Rahmen bezeichnet die Fläche für das Raman-Mapping; a-c: verschiedene Messpunkte.

In Abb. 6.13 ist eine mikroskopische Aufnahme eines Xylemschnittes von Linde dargestellt. Der weiß umrahmte Bereich bezeichnet die Stelle, über die gemessen wurde. Für die Messung wurde ein Raman-Spektrum pro μm gemessen. Die Messung wurde mit einem Filter von OD 0,3 (0,5 mW an der Probe) durchgeführt. Die Integrationszeit pro Spektrum betrug 120 s. Bei einer Anzahl von 19×19 Spektren betrug die Gesamtmesszeit für das komplette Raman-Mapping ca. 13 Stunden. Um den Untergrund zu minimieren, wurde eine Lochblende im Detektionsstrahl von 500 μm verwendet.

Die Punkte a bis c bezeichnen drei typische Stellen im Xylemschnitt. Die Raman-Spektren dieser Positionen werden in Abb. 6.14 dargestellt. Dabei handelt es sich bei a um das Spektrum von Wasser, b ist das Raman-Spektrum eines Lipid-Tröpfchens und c das aus der Zellwand. Die Bande bei 1870 cm^{-1} ist nur in den Spektren der

Öltröpfchen zu sehen und fehlt sowohl in den Spektren von Wasser als auch der Zellwand.

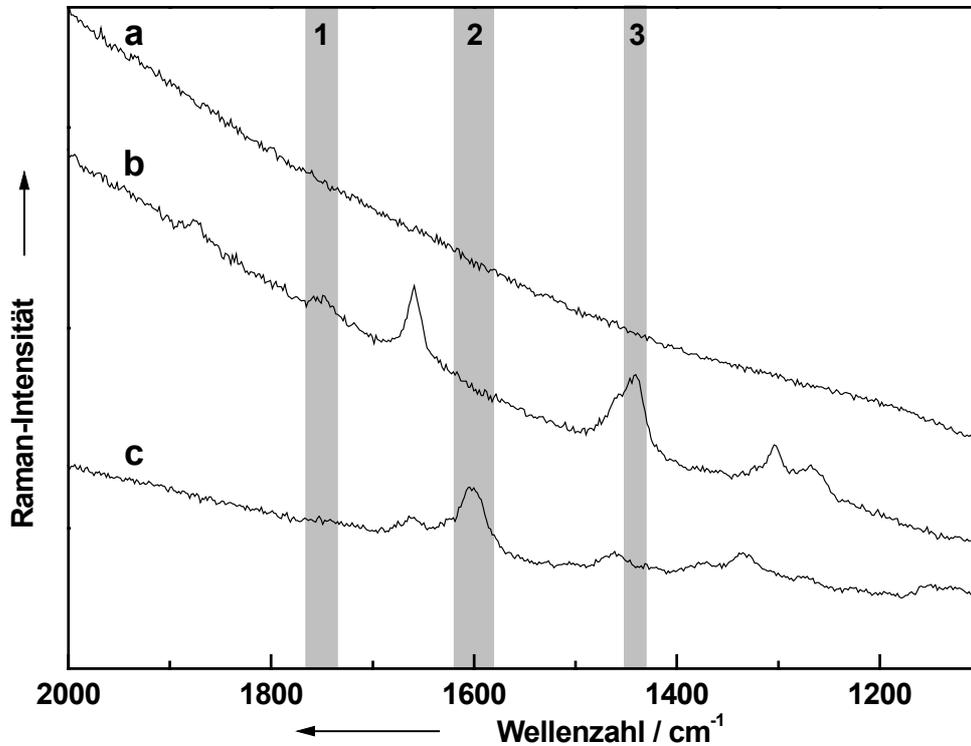


Abb. 6.14: Mikro-Raman-Spektren von drei unterschiedlichen Stellen im Schnitt. a: Wasser; b: Tröpfchen; c: Zellwand. 1-3: Verschiedene spektrale Bereiche für den Falschfarbenplot.

Für die Berechnung der Falschfarbenplots werden die mit 1 bis 3 bezeichneten Bereiche in Abb. 6.14 verwendet. Es werden ausschließlich Banden verwendet, die in Bereichen liegen, die eine Überlagerung durch Signale anderer Substanzen ausschließen. Dabei handelt es sich bei 1 um die C=O-Streckschwingung des Esters, bei 2 um die C=C-Streckschwingung des Lignins und bei 3 um die CH₂-Deformationsschwingung des Phospholipids. Für die Berechnung der Falschfarbenplots wird die mittlere Intensität der markierten Bereiche verwendet.

In Abb. 6.15 sind die berechneten Falschfarbenplots für die einzelnen Banden dargestellt. In x und y ist der abgerasterte Bereich der Probe (weißer Rahmen in Abb. 6.13) in μm dargestellt. Die Raman-Intensitäten der Banden werden als Farben dargestellt. Hier gilt: Je höher die Intensität einer Bande an einem Messpunkt, desto

heller ist die Farbe in diesem Bereich. Die Intensitätsskala ist jeweils neben den einzelnen Plots dargestellt.

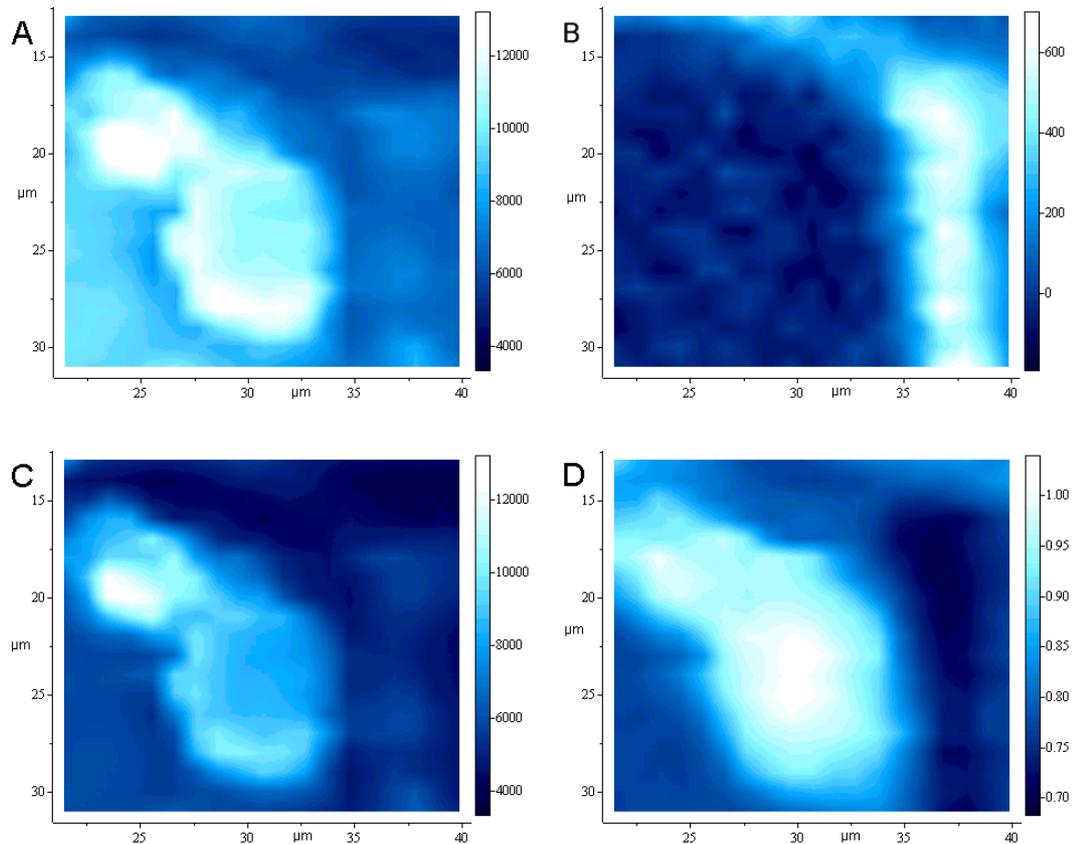


Abb. 6.15: Falschfarbenplots eines Xylemschnitts von Linde. A: Bande 1 (1740 cm^{-1}) ohne Basislinienkorrektur; B: Bande 2 (1605 cm^{-1}) mit Basislinienkorrektur; C: Bande 3 (1440 cm^{-1}) ohne Basislinienkorrektur ; D: Bande 3/ Bande 2 ohne Basislinienkorrektur.

Für den Falschfarbenplot in Abb. 6.15-A wurde die C=O-Streckschwingung des Phospholipids bei 1740 cm^{-1} ohne Basislinienkorrektur verwendet. Man kann deutlich die hohen Raman-Intensitäten der Öltröpfchen und der Wasserfläche von dem dunklen Bereich niedriger Raman-Intensität der Zellwand unterscheiden. Allerdings ist es schwer, den Unterschied in den Intensitäten von Wasser und Lipid zu erkennen.

In Abb. 6.15-B wurde die aromatische C=C-Streckschwingung bei 1605 cm^{-1} mit Basislinienkorrektur verwendet. Die hellen Stellen hoher Raman-Intensität tauchen hier ausschließlich im Bereich der Zellwand auf. Die Bereiche von Wasser und Phospholipid stellen sich einheitlich dunkel dar.

Betrachtet man die Intensität der CH₂-Deformationsbande des Phospholipids bei 1440 cm⁻¹ (Abb. 6.15-C) ohne Basislinienkorrektur, so erkennt man die Bereiche der Öltröpfchen als helle Stellen im Plot. In dieser Falschfarbenberechnung sind sowohl die Bereiche der Zellwand als auch die des Wassers als dunkle Stellen zu sehen und nicht zu unterscheiden.

Im vierten Plot (Abb. 6.15-D) ist das Verhältnis der Banden bei 1440 cm⁻¹ zu der bei 1605 cm⁻¹ ohne Basislinienkorrektur dargestellt. In dieser Darstellung können die hellen Bereiche den Öltröpfchen und die sehr dunklen Bereiche der Zellwand zugeordnet werden. Bereiche mit einer relativen mittleren Intensität können Wasser zugeordnet werden.

Durch die Verwendung des Raman-Mappings ist es möglich, die genaue räumliche Verteilung der Substanzen aufzuzeigen. Im Fall der Öltröpfchen im Xylem kann gezeigt werden, dass das Phospholipid nur im Bereich der Tropfen und nicht in der Zellwand des Xylems zu finden ist. Die zusätzlichen Lipid-Signale im Spektrum der Zellwand von Abb. 6.12 c sind also auf ein Artefakt aus der Probenpräparation und nicht auf ein grundsätzliches Anlagern der Lipide an der Zellwand zurückzuführen.

Für diese Arbeit wurden beispielhaft Phosphocholine als Vergleichssubstanzen herangezogen, da diese den Hauptanteil in pflanzlichen Zellen ausmachen. Da in den Mikro-Raman-Spektren der Pflanzen keine Banden der Kopfgruppe identifiziert werden konnten, ist die Zuordnung nur für die beteiligten Fettsäurereste bindend. Es könnte sich bei diesen Systemen natürlich auch um andere Fettsäureester, wie Triacylglycerole oder Phospholipide mit anderen Kopfgruppen handeln. Dies müsste in einer weiterführenden Untersuchung unter Verwendung anderer Messmethoden bestimmt werden.

7 Ätherische Öle

In diesem Kapitel werden zunächst unterschiedliche Exkretionszellen als Entstehungsort der ätherischen Öle diskutiert. Nach einer kurzen Einführung in die Taxonomie werden die Zusammensetzung der ätherischen Öle, der Biosyntheseweg der Terpene, sowie die Analysenmethoden und die Verwendung der ätherischen Öle angesprochen.

Im Anschluss daran werden die Raman-spektroskopischen Untersuchungen der ätherischen Öle direkt in den Exkretionszellen von Lamiaceen und Citrus-Früchten ohne vorausgehenden Extraktionsschritt diskutiert. An verschiedenen Beispielen wird aufgezeigt, dass es möglich ist, die Inhaltsstoffe der ätherischen Öle in den Exkretionszellen zu identifizieren und Variationen in der Zusammensetzung der Öle durch unterschiedliche Kultivierung der Pflanzen oder jahreszeitliche Änderungen nachzuweisen.

In einem weiteren Schritt wird gezeigt, dass es durch die Kombination von Raman-Spektroskopie und multivariater Analyse möglich ist, chemotaxonomische Klassifizierungen vorzunehmen.

Am Ende dieses Kapitels wird auf die Anwendung einer SERS-Sonde zur minimal invasiven Untersuchung von Minzen eingegangen.

7.1 Exkretionszellen

Die ätherischen Öle von Pflanzen entstehen in sogenannten Exkretionsgeweben. Diese können, wie im Falle der Labiaten oder der Asterales, an der Außenseite der Epidermis als Drüenschuppen entstehen oder als Exkretbehälter, wie z. B. bei den Citrus-Arten. Im Folgenden sollen die in diesem Kapitel auftretenden Ölbehälter besprochen werden.

7.1.1 Labiaten-Drüenschuppen

Das ätherische Öl der Lamiaceen (Schmetterlingsblütler), zu denen viele Gewürzpflanzen, wie z. B. Minzen oder Thymian gehören, wird in sogenannten Drüenschuppen gebildet und gespeichert (s. Abb. 7.1).

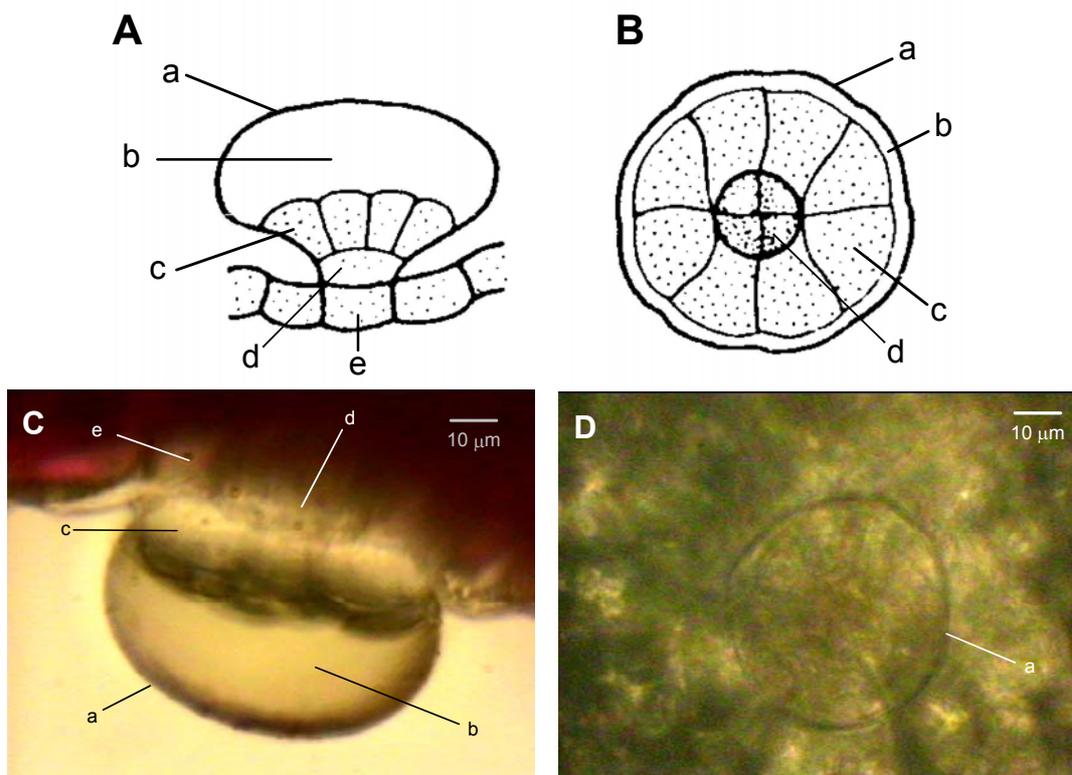


Abb. 7.1: Schemazeichnung [151] bzw. mikroskopische Aufnahmen von den Drüenschuppen einer Minze; **A,C:** Seitenansicht, **B,D:** Aufsicht (a: Cuticula, b: subcuticulärer Raum, c: sezernierende Zellen, d: Stielzelle, e: Epidermis).

Die Drüsenschuppen sind in die Epidermis (e) eingesenkt und stehen auf einer Stielzelle (d). Über den sezernierenden Zellen (c), in denen das ätherische Öl gebildet wird, liegt die Cuticula (a), die den mit dem ätherischen Öl gefüllten subcuticulären Raum (b) umhüllt. [151]

Die Anzahl der Drüsenschuppen ändert sich mit dem Wachstum der Blätter. Die maximale Anzahl von 100 Drüsenschuppen/mm² (2-10 mm lange Blätter) sinkt durch das Blattwachstum und das damit einhergehende Auseinanderrücken auf 6,5 Drüsenschuppen/mm² für voll entwickelte, adulte Blätter. [230,231]

Durch physikalisches Aufbrechen der Cuticula (z. B. durch eine Berührung) werden die Bestandteile des ätherischen Öls freigesetzt, die für den charakteristischen Geschmack und das Aroma der Pflanze verantwortlich sind. [232]

7.1.2 Lysigene Exkretionszellen

Citrus-Früchte bewahren ihr ätherisches Öl in den sogenannten lysigenen Ölbehältern in der Fruchtschale (Perikarp) auf. Diese Ölbehälter bilden sich durch Auflösung der gesamten Exkretionszellen (Abb. 7.2), wobei die Zellwand wie auch die Protoplasten zugrunde gehen. [149] Das ätherische Öl fließt dann in den freiwerdenden Hohlraum.

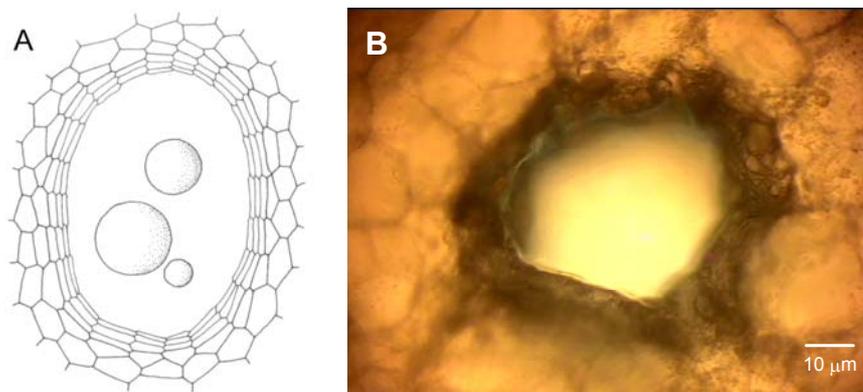


Abb. 7.2: Lysigene Ölbehälter A: schematische Darstellung (nach [151]), B: Mikroskopische Aufnahme der Fruchtwand einer Mandarine.

Von den um den Hohlraum im Kreis angeordneten Zellen stellen die inneren Schichten (dunkler Ring) die sezernierenden Zellen dar. Sie sind schmal und dünnwandig und z. T. in Auflösung begriffen.

7.2 Taxonomie

Die Systematik ist die Wissenschaft der Vielfalt der Organismen, ihrer Differenzierung, ihrer verwandtschaftlichen Beziehung und ihrer entwicklungsgeschichtlichen Entstehung. Die Taxonomie ist nur ein Teilbereich der Systematik und beschäftigt sich mit der Klassifizierung von Organismen, einschließlich der hierfür erforderlichen Verfahren und Regeln. Taxon (Sippe, Plural Taxa, s. Tab. 7.1) ist hierbei der Begriff für eine systematische Einheit, ungeachtet ihrer Rangstufe. [233]

Tab. 7.1: Nomenklatur hierarchisch abgestufter Taxa am Beispiel von einigen Minzen [158,233].

Sippe (Taxon)	Endung	Beispiel
Abteilung	-phyta	Spermatophyta
Unterabteilung	-phytina	Magnoliophytina
Klasse	-opsida	Rosopsida
Unterklasse	-idae	Asteridae
Überordnung	-anae	Laminanae
Ordnung	-ales	Laminales
Familie	-aceae	Lamiaceae
Gattung		Mentha
Art		Mentha spicata L.
Unterart		Mentha spicata L. ssp. crispata
Varietät		<i>Mentha × piperita</i> L. var. pip. pallescens pallescens
Form		<i>Mentha × piperita</i> L. var. pip. f. piperita

Die Grundeinheit für die Klassifizierung ist die Art (Spezies). Die Artnamen werden nach den Regeln des Internationalen Codes der Botanischen Nomenklatur (ICBN) festgelegt. In der von Linné 1753 eingeführten binären Nomenklatur wird der wissenschaftliche Name, zum Beispiel von einer Pfefferminze, wie folgt zusammengesetzt:

<i>Mentha</i>	×	<i>piperita</i>	LINNÉ
Gattungsname	Bastard-Art	Artepitheton	Autornamen
Art (Spezies)			

Dabei wird als Autor immer derjenige vermerkt, der die entsprechende Pflanze zuerst beschrieben hat. Im Falle von Linné wird der Name meist mit L. abgekürzt. [158]

In Tab. 7.2 sind die bei den spektroskopischen Untersuchungen verwendeten Minzen aus dem Botanischen Garten Würzburg aufgeführt.

Tab. 7.2: Bei den spektroskopischen Untersuchungen verwendete Minzen (kultiviert im Botanischen Garten Würzburg)

Minze (Flora Europaea)	deutsche Bezeichnung
<i>Mentha spicata</i> L. ssp. <i>spicata</i>	„Ährenminze“ (Grün- bzw. Rossminze)
<i>Mentha spicata</i> L. ssp. <i>crispata</i>	„Krauseminze“
<i>Mentha</i> × <i>piperita</i> L. nm. <i>citrata</i> (EHRH.) BOIVIN Syn.: <i>Mentha odorata</i> SOLE <i>Mentha adpersa</i> MOENCH	„Bergamott-Minze“
<i>Mentha</i> × <i>piperita</i> L. var. <i>pip. pallescens</i> <i>pallescens</i> Stamm 541 UdSSR BCBP Nr. 2	Pfälzer Ware
<i>Mentha</i> × <i>piperita</i> L. var. <i>piperita</i> f. <i>piperita</i>	Rötliche Kulturform der echten Pfefferminze, Mitchum-Sorte (<i>black mint</i>)

Bei der Art *Mentha* × *piperita* handelt es sich um einen sogenannten Tripelbastard, also eine Kreuzung zwischen *M. aquatica* und *M. spicata*. *M. spicata* ist ihrerseits wieder eine Kreuzung zwischen *M. rotundifolia* und *M. longifolia*. [234]

Mentha ist mit 15 bis 30 Arten und zahlreichen Hybriden ein taxonomisch sehr komplexer Genus. Minzen zu identifizieren ist meist sehr schwierig, da zusätzlich zu einer phänotypischen Plastizität und genetischen Variabilität die meisten Arten miteinander hybridisieren. [234]

Neben der Klassifikation von pflanzlichen Organismen nach morphologischen und anatomischen Gesichtspunkten spielen auch chemische und damit molekulare

Merkmale eine große Rolle für die Taxonomie. Bei der Chemotaxonomie nutzt man chemische Informationen aus dem Bereich des sogenannten Sekundärstoffwechsels der Pflanzen. [233]

Nahezu in allen Pflanzen vorkommende Inhaltsstoffe wie Chlorophylle, Zellulose, Stärke oder Lignin, tragen oft zur Abgrenzung der großen Gruppen des Organismenreiches bei. [158] Niedermolekulare chemische Verbindungen aus dem Sekundärstoffwechsel haben eine weniger zentrale Bedeutung für den Organismus und sind somit stärkeren Variationen unterworfen als Verbindungen des Grundstoffwechsels. Aus diesem Grund sind sie meist spezifisch in kleinen Organisationsgruppen zu finden. Ihr Vorkommen lässt sich besonders zur Charakterisierung der Taxa unterhalb der Familienstufe nutzen. In manchen Fällen finden sie sogar Anwendung bei der Klassifizierung von Individuen bis auf die Ebene von Arten, Subspezies oder (chemischen) Rassen. Grundsätzlich können Verbindungen aus allen Stoffklassen zur chemotaxonomischen Charakterisierung verwendet werden. Die wichtigsten Stoffklassen hierfür sind jedoch die phenolischen, alkaloiden und terpenoiden Inhaltsstoffe der Pflanzen. [233] Niedermolekulare Terpene z. B. findet man vor allem in ätherischen Ölen vieler Pflanzen.

7.3 Ätherische Öle

Ätherische Öle sind Gemische flüssiger, ölartiger, in Wasser schwer löslicher, leicht flüchtiger Kohlenwasserstoffe sehr unterschiedlicher Zusammensetzung (Aldehyde, Alkohole, Ester, Säuren, Terpene). [235] Sie hinterlassen nach dem Verdampfen im Gegensatz zu den fetten Ölen auf Papier keinen Fettfleck. Die ätherischen Öle von Mentha- und Citrus-Arten bestehen hauptsächlich aus Monoterpenen, mit einigen wenigen Sesquiterpenen. Diese Naturprodukte spielen in der Verteidigung der Pflanzen gegen Pathogene und Herbivoren, sowie als Attraktoren für Bestäuber und Samenverbreiter und *allelopathic agents* (d. h. chemische Einfluss gegenüber anderen Pflanzen) eine wichtige Rolle. [236,237]

Minz-Öle gehören zu den am häufigsten verwendeten ätherischen Öle. Kommerziell wichtige Öle sind die der Pfefferminze (*M. × piperita* L.), der amerikanischen

Spearmint (*M. spicata* L.), der schottischen *Spearmint* (*M. × gracilis* Sole), der Ackerminze (*M. arvensis* L. var. *piperascens* Malinv.) und der Poleiminze (*M. pulegium* L.). [232] Unter den Arznei- und Gewürzpflanzen, die in Deutschland angebaut werden, steht der Anteil der Pfefferminze mit mehr als 400 ha Anbaufläche an vierter Stelle nach Kamille, Majoran und Blattpetersilie. [238]

Das ätherische Öl der Minzen wird in zahlreichen Anwendungen verwendet, wie z. B. als Duftstoffe in der Parfümerie, als Geschmacksstoffe in zahlreichen Lebensmitteln (wie Schokolade, Kaugummi, etc.) oder auch in Hygieneartikeln, wie Zahnpasta oder Mundwasser. [232,239] Neben diesen Anwendungen werden Minzen auch als Tee-Drogen verwendet oder ihre ätherischen Öle in pharmazeutischen Präparaten aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit eingesetzt. [240-242]

Die Qualität und damit der Wert der ätherischen Öle hängt stark von deren Zusammensetzung ab. [239] Bei Pfefferminz-Öl wird ein hoher Menthol-Gehalt gefordert bei gleichzeitig geringem Menthofuran-Gehalt, da Menthofuran den Geruch des ätherischen Öls negativ beeinflusst. [243] Die Zusammensetzung der ätherischen Öle verändert sich mit dem Wachstum der Pflanzen. Das Pfefferminz-Öl hat zu Beginn der Wachstumsperiode einen hohen Gehalt an Menthon, der im Laufe der Wachstumsperiode abnimmt. Dem gegenüber nimmt der Gehalt an Menthol zu, um gegen Ende der Wachstumsperiode zu Gunsten von Menthylacetat abzunehmen. Gleichzeitig steigt auch der Gehalt an Menthofuran, wenn auch auf niedrigerem Niveau. Der optimale Erntezeitpunkt liegt bei möglichst hohen Menthol- bzw. Menthylacetat-Werten und geringem Menthofuran-Gehalt. [230,231,238,244,245]

Betrachtet man den Biosyntheseweg der Mono- und Sesquiterpene in der Pfefferminze in Abb. 7.3, so erkennt man, dass die Terpene aus dem Vorprodukt Geranylpyrophosphat (GPP) gebildet werden. Wird GPP mit einem weiteren Molekül Isoprenpyrophosphat (IPP) zu Farnesylpyrophosphat (FPP) umgesetzt, entstehen die Sesquiterpene, wie z. B. Germacren D oder β -Caryophyllen. Aus GPP entstehen aber auch unterschiedliche Monoterpene. Zum einen durch Tautomerisierung die offenen Monoterpene wie Ocimen oder Mycren. Andererseits erhält man über unterschiedliche

Cyclisierungsmechanismen Bicyclen, wie α -Pinen, β -Pinen, 1,8-Cineol (Eucalyptol) oder Sabinen.

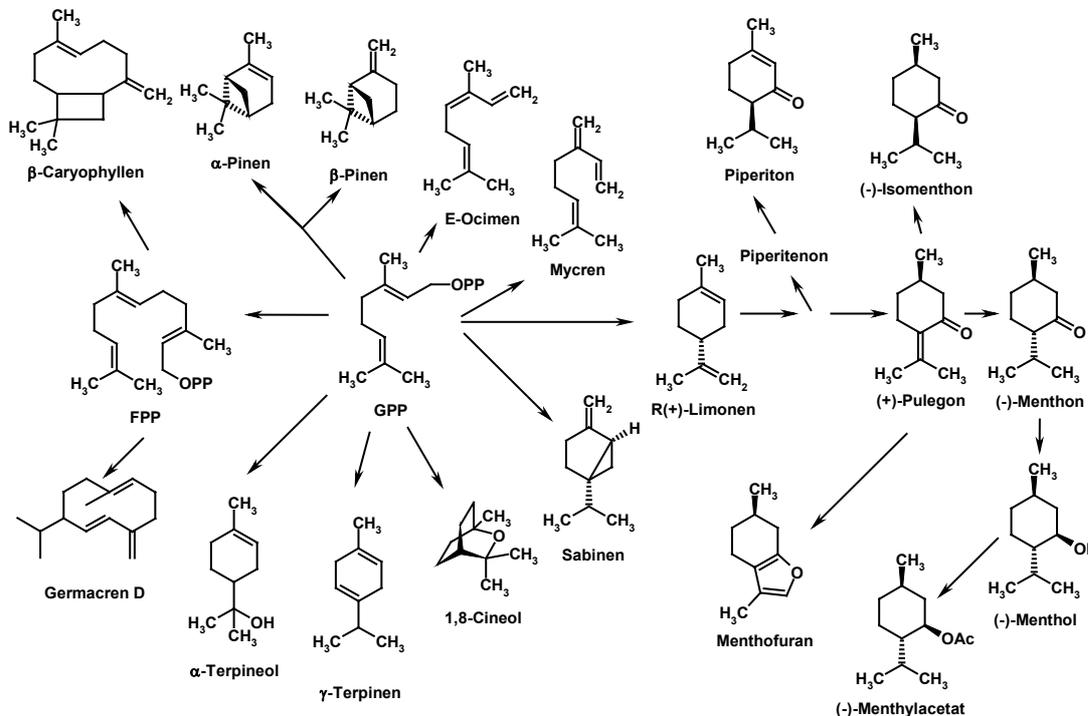


Abb. 7.3: Biosynthese-Weg von verschiedenen Mono- und Sesquiterpenen im ätherischen Öl von *M. x piperita* [nach [239]]. FPP: Farnesylpyrophosphat, GPP: Geranylpyrophosphat.

Durch einfache Cyclisierung erhält man die Cyclohexan-Derivate wie α -Terpineol, γ -Terpinen oder Limonen. Letzteres wird über zahlreiche Schritte zu Piperitenon und Pulegon umgewandelt. Pulegon ist die Vorstufe für die wichtigsten Monoterpene in der Pfefferminze, wie Isomenthon und Menthofuran. Ein weiterer Biosyntheseweg führt von Pulegon über Menthon zu Menthol und schließlich Menthylacetat. Dies erklärt die unterschiedlichen Konzentrationen dieser Komponenten im Verlauf der Wachstumsperiode. [232,236,237,239,246,247]

Die unterschiedliche Zusammensetzung der ätherischen Öle kann nicht nur durch unterschiedliches Pflanzenmaterial und verschiedene Erntezeitpunkte erklärt werden. [248] Auch zahlreiche andere Umweltfaktoren, wie z. B. Temperatur, Feuchtigkeit, Bodenqualität und Düngung, sowie Dauer und Intensität der Sonneneinstrahlung haben einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen, als auch die Menge und Qualität des ätherischen Öls. [249-252]

7.4 Analyse der ätherischen Öle

Die klassische Form der Analyse ätherischer Öle ist eine Extraktion (i. A. Wasserdampfextraktion) mit einer anschließenden gaschromatographischen Analyse bzw. HPLC-Analyse. [253-260] Durch diese Kombination ist man in der Lage, selbst Inhaltsstoffe minimaler Konzentration zu analysieren und erhält zu Vergleichszwecken bzw. als Qualitätskontrolle sogenannte charakteristische *Fingerprints* der ätherischen Öle. Diese Probenaufbereitung und die anschließende Analyse ist relativ zeitaufwendig und kostenintensiv, deshalb werden zahlreiche Versuche unternommen, weniger aufwendige Schnellanalysen zu etablieren.

Schon in den 1970ern wurde NMR- bzw. Absorptionsmethoden sowie IR- und Raman-Spektroskopie zur Identifizierung isolierter Öle verwendet [241,261-269]. In den letzten Jahren werden isolierte ätherische Öle neben Fluoreszenz-Spektroskopie [270] und Absorptions-Spektroskopie [271] vor allem unter Anwendung schwingungsspektroskopischer Methoden, wie z. B. NIR-Spektroskopie [130,238,272,273], FTIR- und Raman-Spektroskopie [274] qualitativ und in Verbindung mit chemometrischen Methoden auch quantitativ beschrieben.

Um die Isolierung der ätherischen Öle vermeiden zu können, wird im Folgenden eine Methode vorgestellt, bei der mit Hilfe der Mikro-Raman-Spektroskopie und der Verwendung von Silber-Kolloiden die ätherischen Öle direkt in den Pflanzen untersucht werden können.

7.5 Untersuchung von Lamiaceae

Die meisten Pflanzen aus der Familie der Lamiaceae (Lippenblütler) gehören zu den Gewürz- und Heilpflanzen. Wie in den vorausgegangenen Kapiteln erwähnt, werden ihre ätherischen Öle in sogenannten Drüsenschuppen produziert und gelagert. Diese Strukturen haben eine Größe von 10-80 μm und sind somit durch die Mikro-Raman-Spektroskopie einfach zugänglich.

7.5.1 Identifizierung von Inhaltsstoffen

Für die folgenden Untersuchungen werden jeweils ca. 300 μm dicke Stängel-Querschnitte der zu untersuchenden Pflanzen angefertigt. Als Anregungswellenlänge wird die 514,5-nm-Linie gewählt, um eine gute Fokussierung des Lasers auf ca. 1 μm zu erzielen. Durch das ν^4 -Gesetz erhält man gleichzeitig gute Spektren bei geringen Integrationszeiten. Werden die Drüsenschuppen der Lamiaceen untersucht, so erhält man die in Abb. 7.4 dargestellten Spektren.

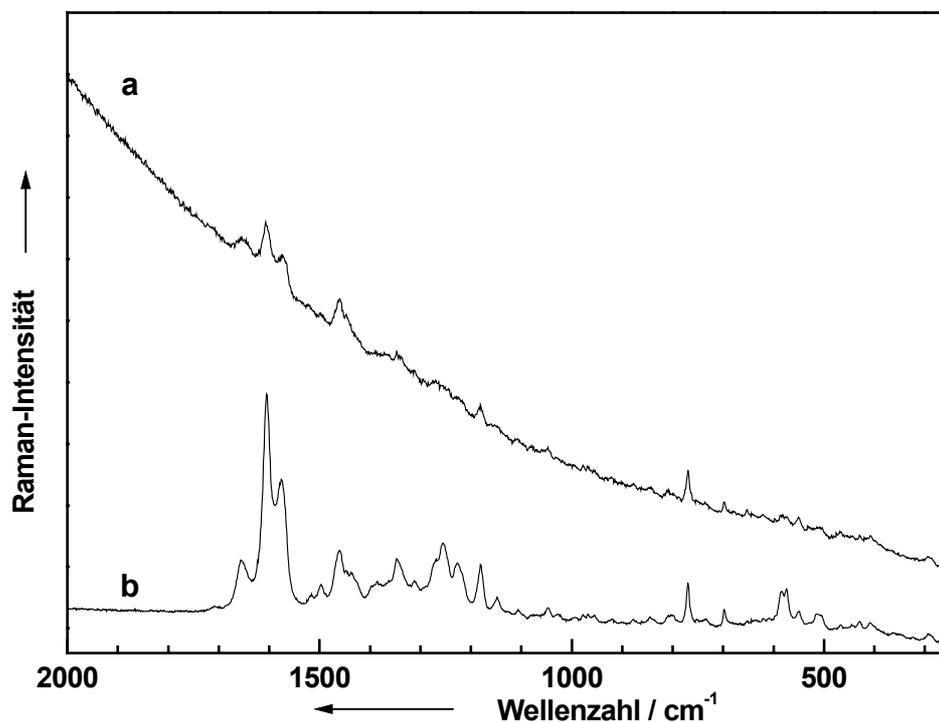


Abb. 7.4: Mikro-Raman-Spektren einer Pfefferminze (*M. x piperita* L.) bei einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm; a: konventionelles Mikro-Raman-Spektrum, b: Verwendung von Silberkolloid.

Spektrum a zeigt das Mikro-Raman-Spektrum einer Pfefferminze ohne weitere Vorbehandlung bei einer Laserleistung von 60 mW und einer Integrationszeit von 10 s. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist nicht besonders gut und es tritt ein starker Fluoreszenz-Untergrund auf. In Spektrum b wird unter Beibehaltung der Messparameter zu einem Stängelquerschnitt aktiviertes Silberkolloid gegeben. Durch Quenchung der Fluoreszenz und gleichzeitiger Signalverstärkung durch den SERS-Effekt erhält man an einer Drüsenschuppe mit vergleichbarer Größe ein Spektrum mit

deutlich besserem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und minimalem Fluoreszenzuntergrund. Die Qualitätszunahme von Spektrum b im Vergleich zu Spektrum a erlaubt es Aussagen über die Zusammensetzung der ätherischen Öle zu machen. Aus diesem Grund sind die in diesem Kapitel gezeigten Spektren (sofern nichts anderes erwähnt wird) alle mit der hier beschriebenen SERS-Methode aufgenommen worden.

Untersuchung von Thymian und Oregano

Vor der Untersuchung von ätherischen Ölen an ihrem Entstehungsort in den Pflanzen, werden die isolierten Öle von Thymian (*Thymus vulgaris* L.) und Oregano (*Origanum vulgare* L.) untersucht. Die Hauptkomponenten dieser ätherischen Öle sind die Monoterpene p-Cymol, Carvacrol und Thymol (s. Abb. 7.5). Die Zusammensetzung dieser beiden Öle ist sehr ähnlich. Im Thymian-Öl überwiegt das Thymol und im Oregano-Öl das Carvacrol.

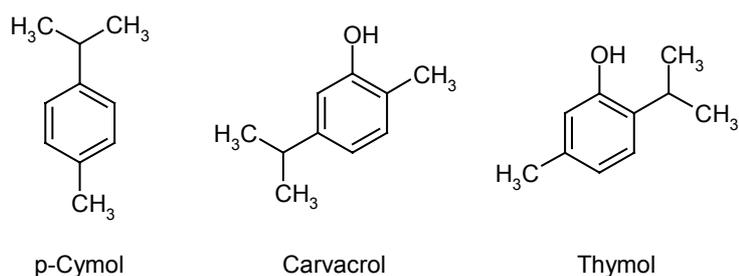


Abb. 7.5: Struktur der Monoterpene im ätherischen Öl von Thymian und Oregano: p-Cymol, Carvacrol und Thymol.

In früheren Studien war es nicht möglich Raman-Spektren des ätherischen Öls von *T. vulgaris* zu erhalten, da die Fluoreszenz zu hoch war. Das Raman-Spektrum von *O. vulgare* hat lediglich Signale der Hauptkomponente Carvacrol gezeigt. [262,268] In Abb. 7.6 zeigt Spektrum a das Raman-Spektrum des ätherischen Öls von Thymian und Spektrum b das von Oregano. [275]

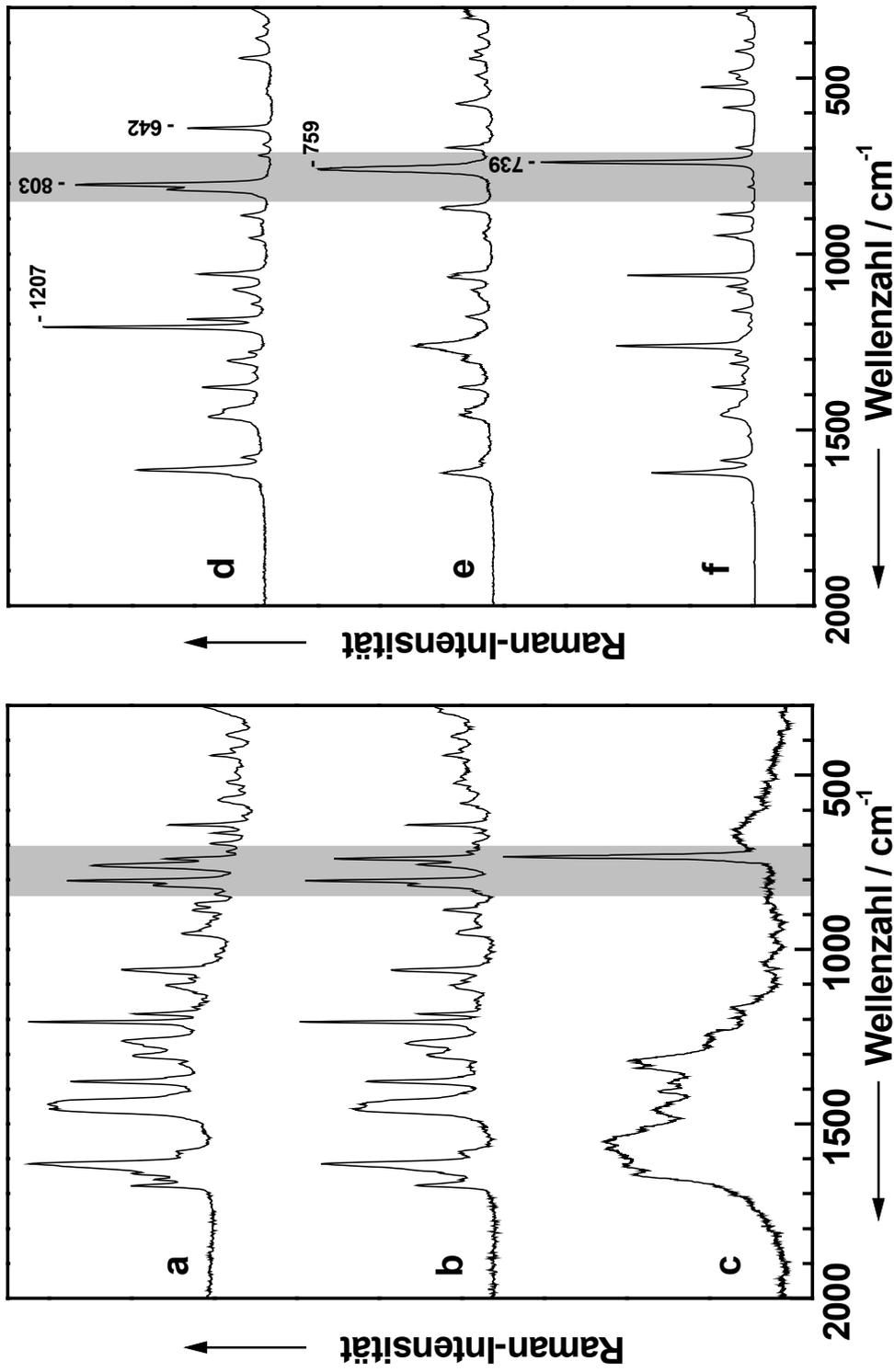


Abb. 7.6: Raman-Spektren von Thymian- (a) und Oregano-Öl (b), und Mikro-Raman-Spektrum einer Drüzenschuppe von Thymian (c). Die Spektren der Vergleichssubstanzen sind p-Cymol (d), Carvacrol (e) und Tymol (f). Der markierte Bereich entspricht dem Ring-Streckschwingungs-Bereich der Monoterpene

Beide Spektren zeigen zahlreiche Banden, die den drei Haupt-Monoterpenen p-Cymol (d), Carvacrol (e) und Thymol (f) zugeordnet werden können. Aufgrund ihrer sehr ähnlichen chemischen Struktur sind sich auch die drei Raman-Spektren sehr ähnlich. Durch Vergleich mit den Spektren dieser Reinsubstanzen können die Banden bei 1207, 1182, 803 und 642 cm^{-1} dem p-Cymol und die Signale bei 759 und 739 cm^{-1} dem Carvacrol bzw. Thymol zugeordnet werden. Die anderen Linien sind Kombinationen von Banden zweier oder mehrerer Monoterpene und lassen sich deshalb nicht zur Identifizierung verwenden.

Die Ring-Streckschwingungen der drei Substanzen bei 803, 759 bzw. 739 cm^{-1} können als Markerbanden für die verschiedenen Monoterpene verwendet werden. Damit ist es möglich, eine quantitative Abschätzung der drei Inhaltsstoffe vorzunehmen. Betrachtet man den grau unterlegten Bereich in den beiden Spektren der ätherischen Öle, so erkennt man in ihnen jeweils Banden vergleichbarer Intensität für p-Cymol. Im Spektrum des Thymian-Öls ist die Bande des Thymols intensiver als die des Carvacrols, während die Intensitätsverhältnisse im Spektrum des Oregano-Öls vertauscht sind. Aus diesem Grund sollte im Thymian-Öl umgekehrt zum Oregano-Öls Thymol einen größeren Anteil besitzen als Carvacrol.

Spektrum c in Abb. 7.6 zeigt ein Mikro-Raman-Spektrum, das direkt in der Drüsen-schuppe von *T. vulgaris* L. aufgenommen wurde. Anhand der Ring-Streckschwingung bei 739 cm^{-1} kann eindeutig die Hauptkomponente des Thymian-Öls Thymol nachgewiesen werden. Die Markerbanden für p-Cymol oder Carvacrol können nicht detektiert werden. Die restlichen Banden im Spektrum können keiner Komponente des ätherischen Öls zugeordnet werden. Es wird vermutet, dass diese Signale von Pflanzengewebe verursacht werden.

Die Abwesenheit von Carvacrol und p-Cymol im Spektrum von *T. vulgaris* kann zwei Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass die Signal-Verstärkung durch das Silber-Kolloid nicht so hoch ist wie bei Thymol. Es wäre auf der anderen Seite aber auch möglich, dass die Konzentration der beiden Substanzen zu gering ist, um detektiert zu werden, da die Pflanze einem anderen Chemotyp angehört als die, aus denen das verwendete ätherische Öl gewonnen wurde.

Untersuchung von Minzen

Die Minzen der Gattung *Mentha* gehören in Bezug auf ihre ätherischen Öle zu den ertragreichsten Heil- und Gewürzpflanzen. Die Zusammensetzung dieser ätherischen Öle unterscheidet sich je nach Art, Unterart oder Chemotyp. In diesem Kapitel soll näher auf die Untersuchung ihrer ätherischen Öle ohne vorhergehenden Extraktionsschritt eingegangen werden.

Die im Folgenden aufgeführten gaschromatographischen Untersuchungen der einzelnen Minzen wurden von G. Binder am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie (Würzburg) zu Vergleichszwecken durchgeführt. Die ätherischen Öle der Stängel wurden durch dreistündige Wasserdampfdestillation mit 1 ml Pentan als Vorlage gewonnen. Die Gaschromatographie wurde mit einem GC 8000 Carlo Erba durchgeführt. Die verkürzten Analysendaten sind bei den einzelnen Minzen wiedergegeben, die ausführlichen Tabellen befinden sich im Anhang 2.

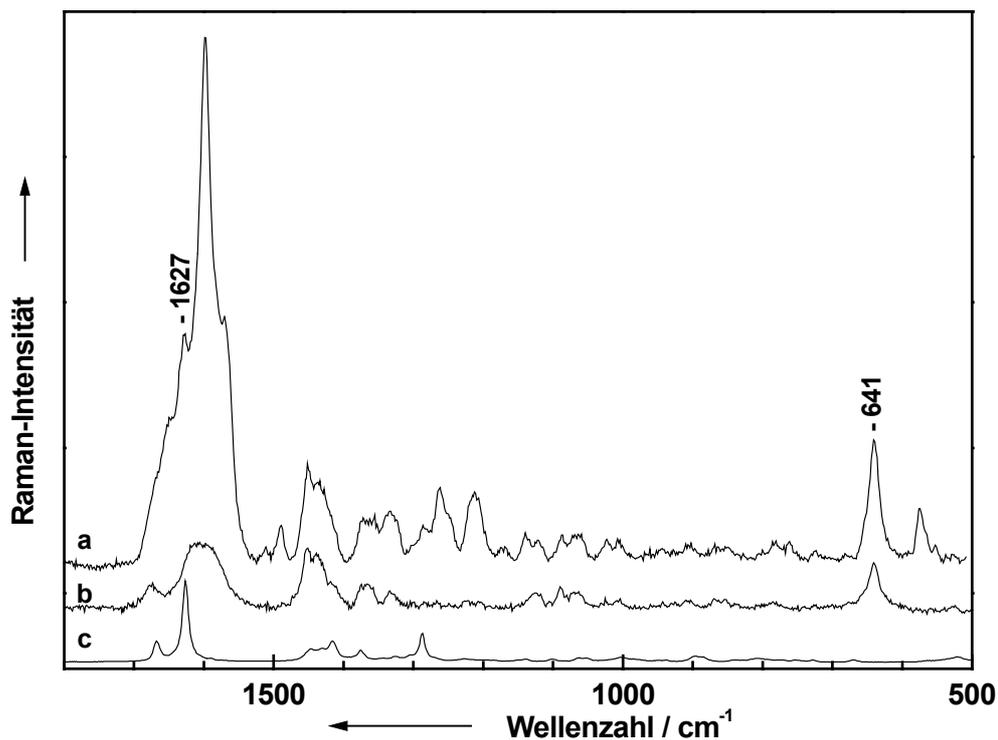


Abb. 7.7: Vergleich von Mikro-Raman-Spektren von *M. spicata* L. ssp. *spicata* (a) mit verschiedenen Monoterpenen: b: Pulegon; c: Myrcen.

In Abb. 7.7 a wird das Mikro-Raman-Spektrum einer Drüsenschuppe von *M. spicata* L. ssp. *spicata* (Ährenminze) gezeigt. Als Haupt-Inhaltsstoff kann das Monoterpen Pulegon (Spektrum b) identifiziert werden, dessen Signale das Spektrum der Ährenminze dominiert. Die Intensitäten der Monoterpen-Spektren sind an das der Drüsenschuppe angepasst. In Abb. 7.8 sind die Strukturen der wichtigsten Monoterpene der Art *M. spicata* L. dargestellt, die vollständige Auflistung befindet sich in Anhang 1.

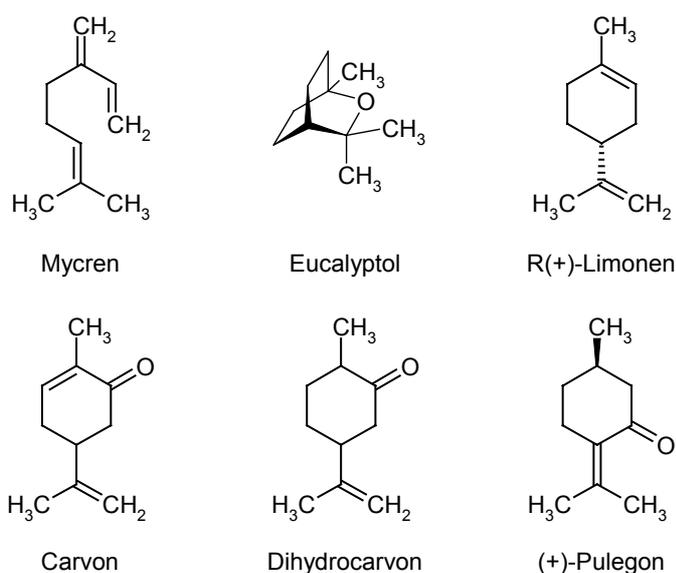


Abb. 7.8: Struktur der wichtigsten Monoterpene von *M. spicata* L.

Neben der breiten C=C-Doppelbindungs-Bande von Pulegon um 1600 cm^{-1} ist vor allem die charakteristische Ringatmungs-Schwingung bei 641 cm^{-1} zu erkennen. Eine weitere charakteristische Bande ist die C=C-Doppelbindungs-Bande von Mycren (Spektrum c) bei 1627 cm^{-1} .

Beim Vergleich der Ergebnisse der Raman-spektroskopischen Untersuchung mit den Ergebnissen der Gaschromatographie in Tab. 7.4 erkennt man deutliche Übereinstimmungen. Die Untersuchungen wurden zeitgleich durchgeführt, um den Einfluss von Umweltbedingungen zu minimieren. Bei den in Abb. 7.7 aufgeführten Monoterpenen handelt es sich um die vier wichtigsten Bestandteile des ätherischen Öls. Die Monoterpene Pulegon und Mycren werden mit einem Anteil von 69,34 bzw. 1,40 % nachgewiesen. Die Markerbanden der Monoterpene Eucalyptol und Limonen,

die mit 3,64 bzw. 0,44 % nachgewiesen wurden, können im Spektrum nicht gefunden werden.

Tab. 7.3: Gaschromatographische Analyse des ätherischen Öls von *M. spicata* L. (Erntezeitpunkt: Ende Juni, Anteile in %, verkürzt).

Monoterpene	<i>M. spicata</i> L. ssp. <i>crispata</i>	<i>M. spicata</i> L. ssp. <i>spicata</i>
Myrcen	7,35	1,40
Limonen	8,63	0,44
Eucalyptol	2,66	3,06
Dihydrocarvon	1,22	-
Carvon	70,15	-
Pulegon	-	69,34

In Abb. 7.9 (a) ist das Spektrum der Krauseminze (*M. spicata* L. ssp. *crispata*) zu sehen. Dieses Spektrum unterscheidet sich vollständig vom Spektrum der Ährenminze (*M. spicata* L. ssp. *spicata*, s. Abb. 7.7 a). Beide Minzen gehören zur gleichen Art besitzen aber unterschiedlichen Inhaltsstoffe.

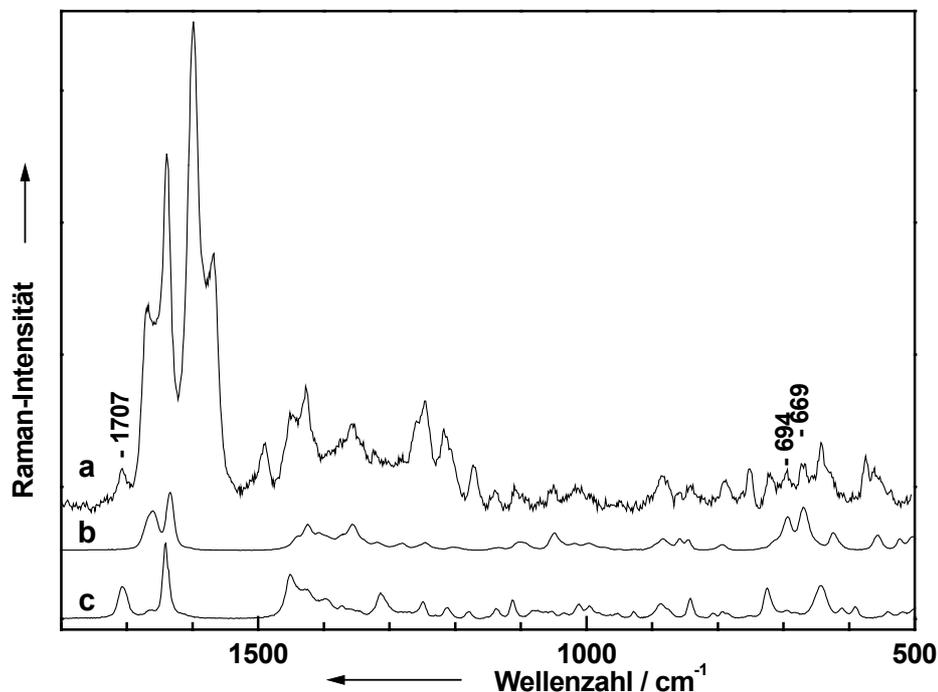


Abb. 7.9: Vergleich des Mikro-Raman-Spektrums (a) der Krauseminze (*M. spicata* L. ssp. *crispata*) mit den Spektren verschiedener Monoterpene: b: Carvon; c: Dihydrocarvon.

Das Duplett bei 694 und 669 cm^{-1} ist sehr charakteristisch für die Ringatmungsschwingung von Carvon. Die Carbonyl-Bande bei 1707 cm^{-1} kann eindeutig dem Dihydrocarvon zugeordnet werden. Die Intensitäten der Spektren sind so gewählt, dass sie den Intensitäten der Komponenten im Spektrum der Drüsenschuppe entsprechen.

Im Vergleich mit Tab. 7.3 sieht man, dass Carvon mit über 70 % den Hauptanteil des ätherischen Öls ausmacht, Dihydrocarvon allerdings hinter Limonen, Myrcen und Eucalyptol (1,8-Cineol) an fünfter Stelle steht. Diese Substanzen können im Spektrum der Drüsenschuppe nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dies kann damit erklärt werden, dass die Markerbanden dieser Monoterpene von Banden anderer Inhaltsstoffe überlagert werden und daher nicht eindeutig identifiziert werden können.

Minzen der Art *M. × piperita* L. werden als Pfefferminzen bezeichnet. Ihre ätherischen Öle sind bekannt für ihren hohen Anteil an Menthol. In Abb. 7.10 sind zwei Mikro-Raman-Spektren von unterschiedlichen Pfefferminzen zu sehen: *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*, Spektrum b) und *M. × piperita* L. var. *piperita* *pallescens* (*pallescens*, Spektrum a).

Die Spektren beider Pfefferminzen wurden Ende Juni zeitgleich mit den gaschromatographischen Untersuchungen (s. Tab. 7.4) aufgenommen und zeigen deutlich unterschiedliche Inhaltsstoffe. In beiden Spektren können die Banden von Menthol bei 1039 und 761 cm^{-1} identifiziert werden. In Spektrum a (*M. × piperita* L. var. *piperita* *pallescens*) ist die Intensität dieser Banden deutlich höher als in Spektrum b (*M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*)), was mit den deutlich geringeren Menthol-Werten in der „*black mint*“ erklärt werden kann. Die Schulter bei 766 cm^{-1} kann dem Menthylacetat zugeordnet werden. In Spektrum a kann außerdem im Vergleich zu Spektrum b ein hoher Gehalt an Eucalyptol (643 cm^{-1}) beobachtet werden. Die Strukturformeln der wichtigsten Monoterpene der Pfefferminzen sind in Abb. 7.11 zu sehen.

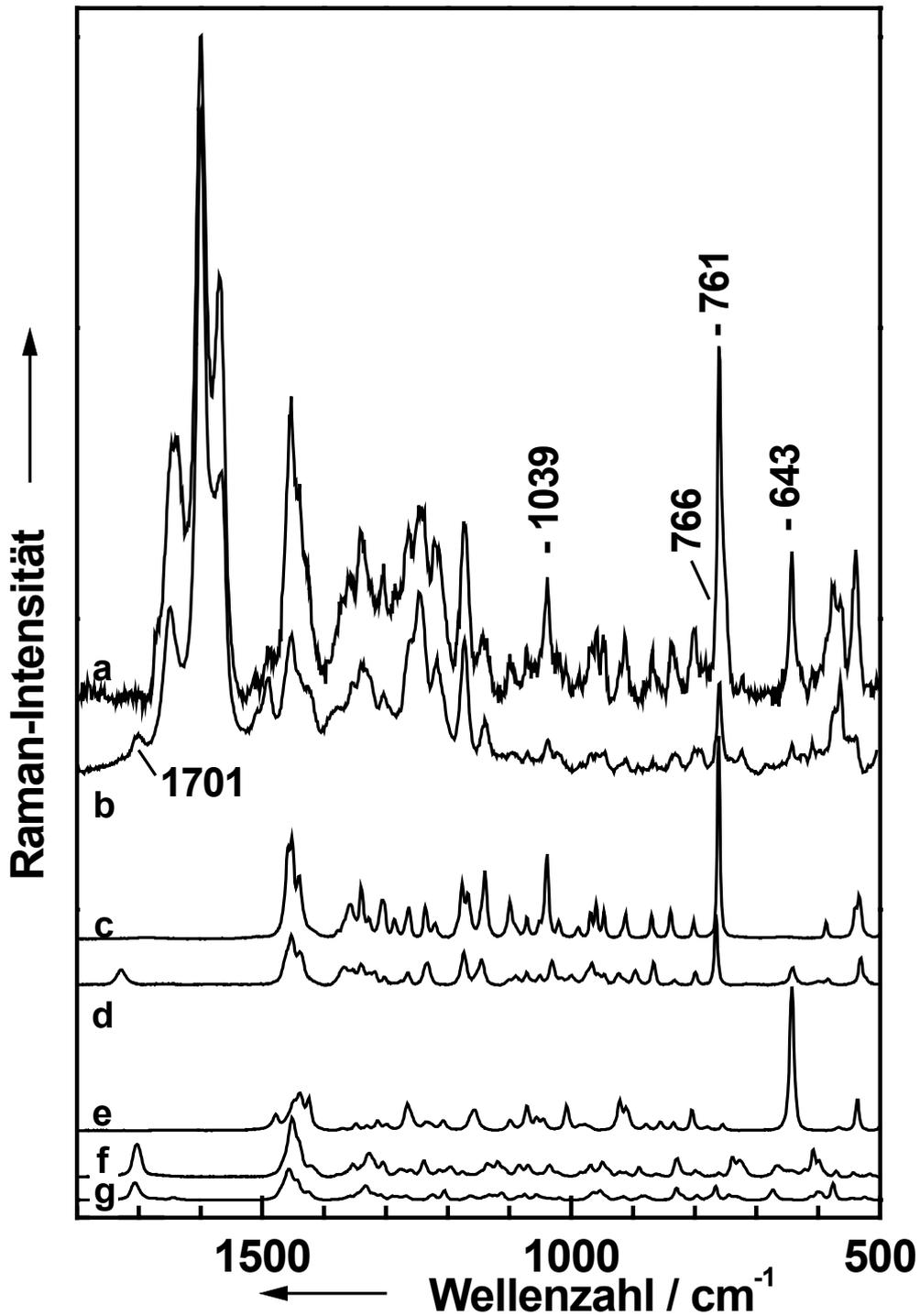


Abb. 7.10: Hauptinhaltsstoffe von zwei verschiedenen Pfefferminzen a: *M. × piperita* L. var. *piperita* pallescens pallescens; b: *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*), c: Menthol, d: Menthylacetat, e: Eucalyptol, f: Menthon, g: Isomenthon.

Die Pfefferminze *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*) zeigt im Gegensatz zu *M. × piperita* L. var. *piperita* *pallescens* *pallescens* relativ große Konzentrationen an Menthon und Isomenthon. Diese Substanzen können anhand der Doppelbande bei 1701 cm^{-1} identifiziert werden.

Das Monoterpen Limonen ebenso, wie die Sesquiterpene β -Caryophyllen und Germacren D, kann in den Spektren aufgrund fehlender Markerbanden nicht nachgewiesen werden.

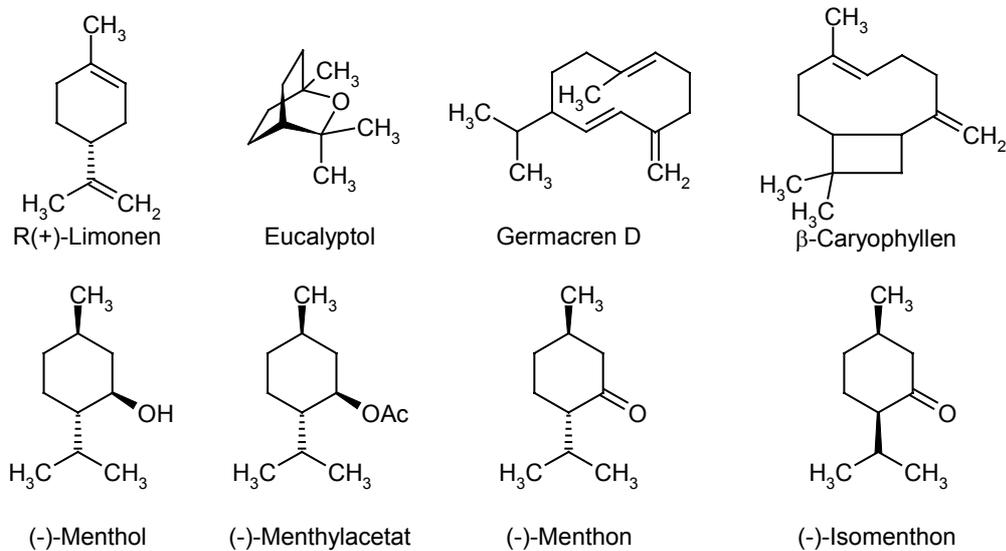


Abb. 7.11: Struktur der wichtigsten Monoterpene von Pfefferminzen (*M. × piperita* L.).

Ein anderer Chemotyp aus der Spezies der Pfefferminze ist die Bergamott-Minze (*M. × piperita* L. nm. *citrata*). Wie der Name schon andeutet, weist das ätherische Öl dieser Minze nicht den typischen Pfefferminz-Geruch auf, sondern riecht nach Bergamott-Öl. Die Zusammensetzung des ätherischen Öls unterscheidet sich stark von dem normaler Pfefferminzen (s. Tab. 7.4). Die in Pfefferminz-Öl vorkommenden Monoterpene Menthol, Menthylacetat, Menthon oder Isomenthon spielen bei der Bergamott-Minze keine oder nur eine untergeordnete Rolle.

In Abb. 7.12 (a) ist das Mikro-Raman-Spektrum einer Drüschuppe der Bergamott-Minze *M. × piperita* L. nm. *citrata* zu sehen. Die Spektren d bis h sind die Spektren der Haupt-Monoterpene. Die Symbole kennzeichnen die Markerbanden der einzelnen

Substanzen. Für die Markerbanden wurden immer Signale ausgewählt, die nicht von Banden anderer Substanzen überlagert werden.

Bei 729 cm^{-1} ist die Bande von Linalool (■) zu sehen. Die Carbonyl-Schwingung des Linalylacetats (●) ist bei 1730 cm^{-1} zu beobachten. Die Carbonylschwingung von Geranylacetat (◆) liegt bei 1738 cm^{-1} und ist somit von der von Linalylacetat eindeutig zu unterscheiden. Die Ringatmungs-Schwingung von Eucalyptol (▲) kann bei 643 cm^{-1} beobachtet werden. Die Ringatmungs-Schwingung von α -Terpineol (★) liegt bei 753 cm^{-1} . Die Strukturen dieser Monoterpene sind in Abb. 7.13 aufgeführt.

Tab. 7.4: Vergleich der ätherischen Öle von verschiedenen Pfefferminzen (*M. × piperita* L.) zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten (Anteile in %, verkürzt).

Monoterpene	<i>M. × piperita</i> L. var. <i>piperita</i> f. <i>piperita</i> "black mint"		<i>M. × piperita</i> L. var. <i>piperita</i> <i>pallescens</i> <i>pallescens</i>		<i>M. × piperita</i> L. nm. <i>citrata</i>	
	Ende Juni	Ende Juli	Ende Juni	Ende Juli	Ende Juni	Ende Juli
Limonen	0,66	0,46	7,23	6,81	0,27	0,25
Eucalyptol	3,13	3,04	4,60	4,69	1,43	3,04
Menthon	37,91	18,12	10,86	2,25	-	-
Isomenthon	6,94	5,87	1,27	0,79	-	-
Linalool	0,17	0,15	0,22	0,31	37,49	33,28
Linalylacetat	-	-	-	-	29,37	35,74
Menthylacetat	7,98	18,99	7,57	13,00	-	-
β -Caryophyllen	2,73	1,34	0,60	0,60	0,26	0,16
α -Terpineol	-	-	-	-	1,59	2,91
Geranylacetat	-	-	-	-	2,06	2,35
Menthol	27,50	38,83	45,63	48,36	-	-
Germacren D	2,09	1,01	1,88	1,90	3,89	2,55

Die Intensitäten der Spektren der Monoterpene d bis h sind so angepasst, dass sie den Intensitäten im Spektrum der Drüsenschuppe (a) entsprechen. Summiert man diese Spektren auf, so erhält man als Summe das Gesamtspektrum (c) der identifizierten Monoterpene.

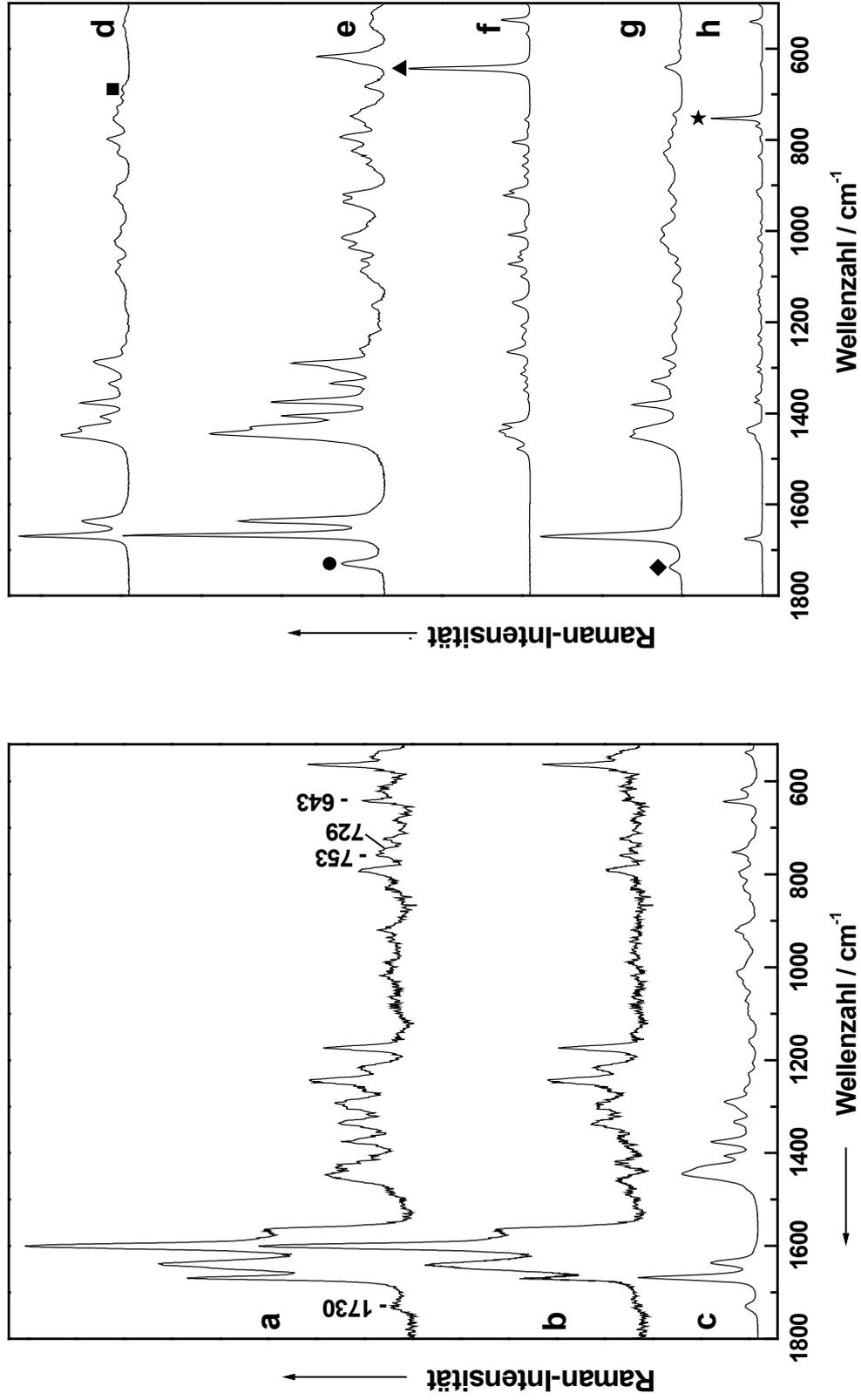


Abb. 7.12: Mikro-Raman-Spektren einer Drüzenschuppe (a) der Bergamott-Minze und der verschiedenen Inhaltsstoffe. d: Linalool, e: Linalylacetat, f: Eucalyptol, g: Geranylacetat, h: α -Terpineol, c: Summe d bis h, b: Differenz a-c. Die Symbole beziehen sich auf die Markerbanden der Inhaltsstoffe.

Man erkennt deutlich, dass viele Banden des Spektrums a nicht durch das Spektrum der Monoterpene erklärt werden können. Zum besseren Vergleich zeigt Spektrum b die Differenz zwischen den Spektren der Drüsenschuppe (a) und der Summe der Monoterpene (c).

Die verbleibenden Banden in Spektrum b können auch nicht durch Signale von anderen, hier nicht aufgeführten Monoterpenen bzw. Sesquiterpenen erklärt werden. Weiterhin gehören die Banden nicht zu Substanzen, die im umliegenden Gewebe vorliegen, wie z. B. Chlorophyll . [276-279]

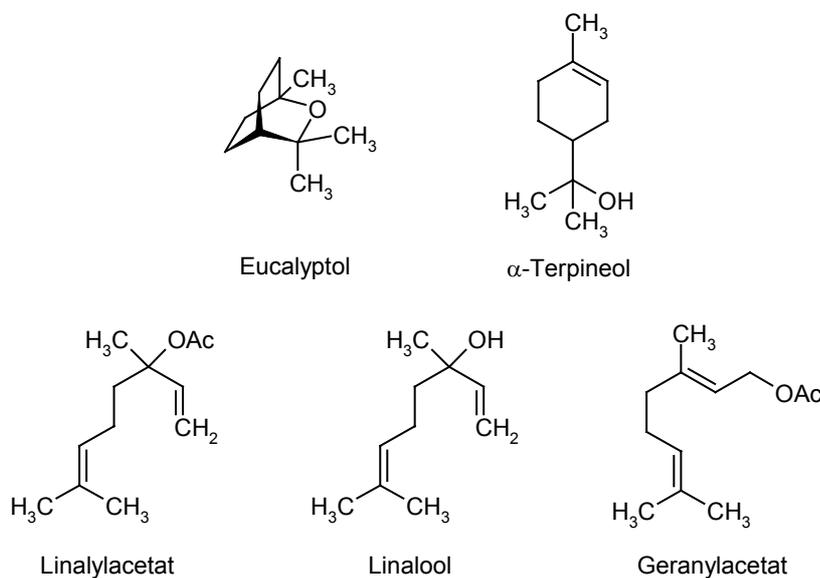


Abb. 7.13: Struktur der wichtigsten Monoterpene der Bergamott-Minze (*M. × piperita* L. nm. citrata).

Wie zu Beginn des Abschnitts erwähnt, werden bei den Messungen Silber-Partikel zum Quenchen der Fluoreszenz verwendet. Durch die Anwendung des Silber-Kolloids lagern sich die Metall-Partikel am äußeren Rand der Drüsenschuppe an der Cuticula an. Die Cuticula besteht zum Großteil aus langkettigen Alkanen, so dass es für die Partikel nicht möglich sein sollte, diese zu durchdringen. Der SERS-Effekt der Silber-Kolloide wirkt sich also vor allem auf Moleküle aus, die durch die Cuticula nach außen diffundieren.

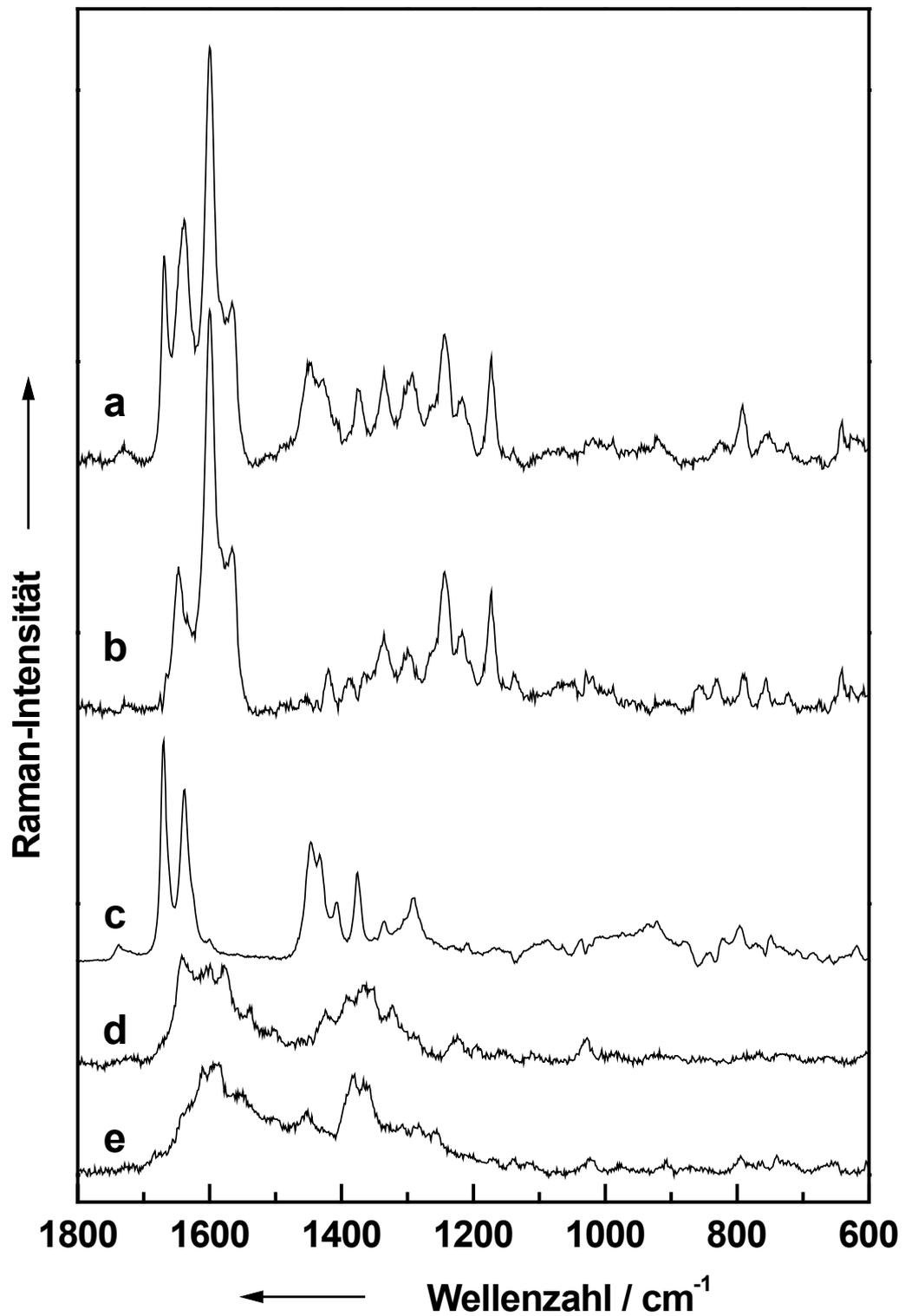


Abb. 7.14: Mikro-Raman-Spektren (a) der Bergamott-Minze (*M. × piperita* L. nm. citrata) im Vergleich zu c: isoliertem ätherischen Öl und d+e: isolierter Cuticula. Spektrum b zeigt die Differenz zwischen den Spektren a und c.

Aufgrund der Stärke der Cuticula von ungefähr $1\ \mu\text{m}$ ist eine Verstärkung der Raman-Signale aus dem Inneren der Drüsenschuppe nicht vorhanden. Gleichzeitig werden die Schwingungen der Cuticula-Wachse verstärkt. Um diese Theorie untersuchen zu können, werden im Folgenden die isolierten Komponenten der Drüsenschuppe untersucht.

In Abb. 7.14 (a) ist noch einmal das Mikro-Raman-Spektrum einer Drüsenschuppe von *M. × piperita* L. nm. citrata zu sehen. Dieses Mal wird es mit dem Raman-Spektrum des gleichzeitig isolierten ätherischen Öls der Bergamott-Minze verglichen (Spektrum c). Die Differenz dieser beiden Spektren (Spektrum b) ist Spektrum b in Abb. 7.12 sehr ähnlich.

Dies zeigt eindeutig, dass es sich bei den noch nicht identifizierten Banden nicht um Komponenten des ätherischen Öls handelt. Auch das Spektrum des isolierten ätherischen Öls weist nur geringe Abweichungen von dem Spektrum des simulierten Öls (Spektrum c in Abb. 7.12) auf.



Abb. 7.15: Mikroskopische Aufnahme einer isolierten Cuticula mit der leeren Drüsenschuppe einer Bergamott-Minze.

Am Lehrstuhl für Ökophysiologie und Vegetationsökologie wurde die Cuticula der Minze isoliert. Dazu wurden kleine Stücke des Blattes einer Bergamott-Minze für sechs Wochen in eine Enzymlösung gegeben, um das Gewebe zu zersetzen. Danach wurden die Cuticula-Stücke für weitere vier Wochen mit einer Borhydrid-Lösung

behandelt, um verbleibende Gewebereste zu entfernen. [280,281] Abb. 7.15 zeigt eine mikroskopische Aufnahme der isolierten Cuticula mit einer leeren Drüsenschuppe.

Die Spektren d und e der Abb. 7.14 zeigen zwei Aufnahmen der Cuticula an verschiedenen Stellen. Man erkennt zum einen, dass die Cuticula nicht homogen ist, zum anderen sind die Banden nicht eindeutig zuzuordnen. Vor allem die Lage der Banden im C=C-Doppelbindungs-Bereich um 1600 cm^{-1} stimmt recht gut mit den Banden von Spektrum b überein. Allerdings weichen die relativen Intensitäten der Banden deutlich von denen in Spektrum b ab. Dies kann davon herrühren, dass die Cuticula durch die Behandlung mit Enzym-Lösung und vor allem Borhyrat einer Strukturänderung unterlegen ist. Für eine genaue Zuordnung der Banden sind noch weiterführende Untersuchungen notwendig. Ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei der gesuchten Komponente um das Spektrum von Cuticula-Wachs handelt, ist in der Literatur zu finden. Edwards et al. [282] haben bei FT-Raman-spektroskopischen Untersuchungen an verschiedenen isolierten Wachsen von Palmen ähnliche Spektren erhalten. Die Banden wurden den C=C-Doppelbindungen langkettiger Säuren zugeordnet.

7.5.2 Unterschiedliche Kultivierung

Wie bereits angesprochen, werden die Inhaltsstoffe bzw. deren Konzentrationen in den ätherischen Ölen durch verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst. Bei diesen Faktoren kann es sich um unterschiedliche Böden bzw. Düngung, um allgemeine Klimaänderungen wie Temperatur, Regen oder Sonnenintensität und –dauer, ebenso wie um jahreszeitliche Änderungen handeln.

Um diese Unterschiede zu erfassen, werden die Spektren von im Freiland gezogenen Minzen mit denen aus Sterilkulturen verglichen. Zu diesem Zweck werden von drei Minzen Sterilkulturen auf Nähragar unter UV-Bestrahlung angefertigt. Die Pflanzen sind deutlich kleiner als die im Freiland gezogenen.

In Abb. 7.16 sind die Spektren der Ährenminze (*Mentha spicata* L. ssp. *spicata*) einmal in der Freiland-Form (a) und einmal in der Kultur-Form (d) zu sehen. Zum Vergleich sind auch die Spektren der Hauptinhaltsstoffe abgebildet. Im Fall der

Freiland-Minze ist dies das Monoterpen Pulegon (c). Das Spektrum der Kulturminze besteht hauptsächlich aus Carvon (f). Die spektralen Daten werden von den gaschromatographischen Analysen (s. Tab. 7.5) bestätigt. Das Monoterpen Pulegon im Öl der Ährenminze wird in der Freiland-Form zu 74,27 % gefunden, während es in der Kultur-Form nur zu 0,2 % nachgewiesen werden kann. Dagegen kann Carvon im ätherischen Öl der Freiland-Minze nicht gefunden werden.

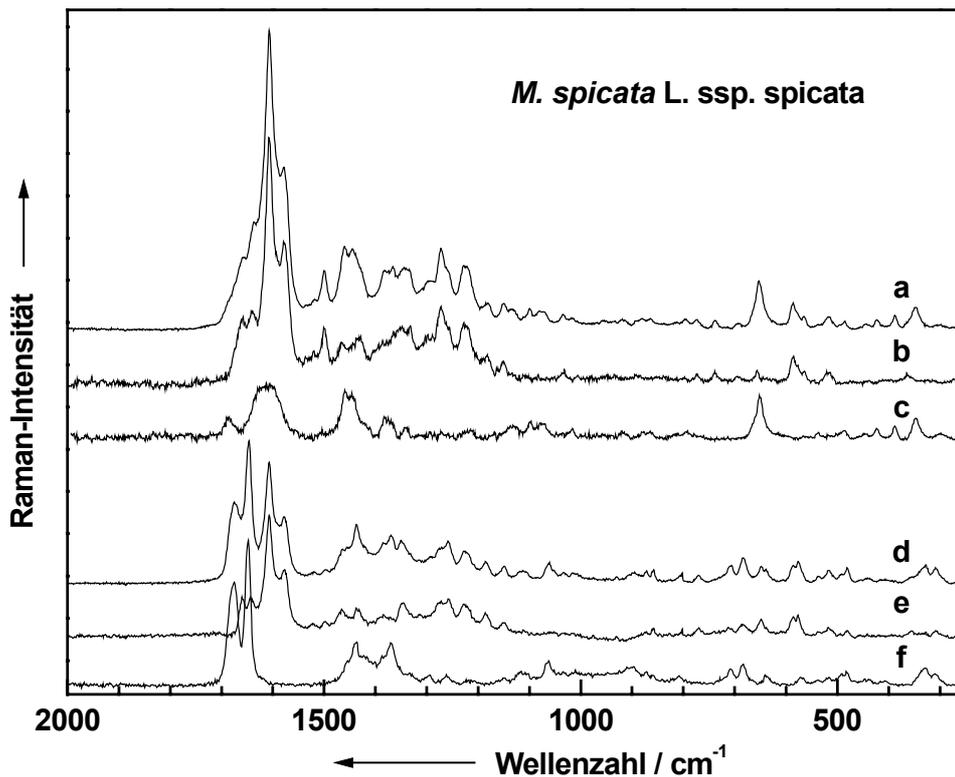


Abb. 7.16: Ährenminze (*Mentha spicata* L. ssp. spicata) mit unterschiedlicher Kultivierung. a: Freiland-Minze; b: Differenz (a-c); c: Pulegon; d: Kultur-Minze; e: Differenz (d-f); f: Carvon.

In der Kultur-Form ist es zu 73,44 % vorhanden. Markerbanden der anderen Monoterpene, auch die mit Anteilen größer 1 %, können in den beiden Spektren nicht identifiziert werden.

Die Spektren b und e in Abb. 7.16 sind die Differenzen zwischen den Spektren der Drüsenschuppen und denen der jeweiligen Hauptkomponente. Die Spektren sind dem in Abb. 7.12-b sehr ähnlich und gehören somit wahrscheinlich wieder zu den Banden des Cuticula-Wachses.

Tab. 7.5: Gaschromatographischer Vergleich des ätherischen Öls von Freiland- und Kultur-Minzen von *M. spicata* L. var. *spicata* (verkürzt, Anteile in %).

Monoterpene	Freiland	Kultur
Pulegon	74,27	0,20
Eucalyptol	5,20	0,95
Caryophyllen	2,18	0,74
Carvon	-	73,44
β-Pinen	0,72	4,44
Limonen	0,72	3,91

Die Spektren in Abb. 7.17 sind von Drüsenschuppen der *Mentha × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*) im Freiland bzw. in Sterilkultur. Die beiden Spektren unterscheiden sich nicht nur aufgrund der unterschiedlichen Inhaltsstoffe. Die Intensitäts-Unterschiede der Spektren bei gleichen experimentellen Bedingungen können mit den sehr verschiedenen Größenverhältnissen der Drüsenschuppen erklärt werden. Die Drüsenschuppen der Freilandform haben im Allgemeinen einen Durchmesser von 50-80 µm. Die Drüsenschuppen der Sterilkultur sind mit 20-30 µm wesentlich kleiner.

Die beiden Minzen zeigen die Markerbanden von unterschiedlichen Monoterpenen. Das Spektrum der Freiland-Minze weist vor allem Banden von Menthol und Menthon auf. Diese beiden Monoterpene können zu 43,38 bzw. 29,08 % durch eine gaschromatographischen Analyse nachgewiesen werden (s. Tab. 7.6). In der Kultur-Minze sind sie nur zu 0,40 bzw. 0,90 % zu finden.

Im Spektrum der Kultur-Form sind die Markerbanden von Menthofuran und Pulegon zu erkennen. Diese Substanzen werden im ätherischen Öl dieser Minzen zu 21,96 bzw. 54,20 % nachgewiesen und machen damit den Hauptanteil des Öls aus. Im Öl der Freiland-Form sind diese Monoterpene nur zu 1,15 bzw. 0,67 % vorhanden.

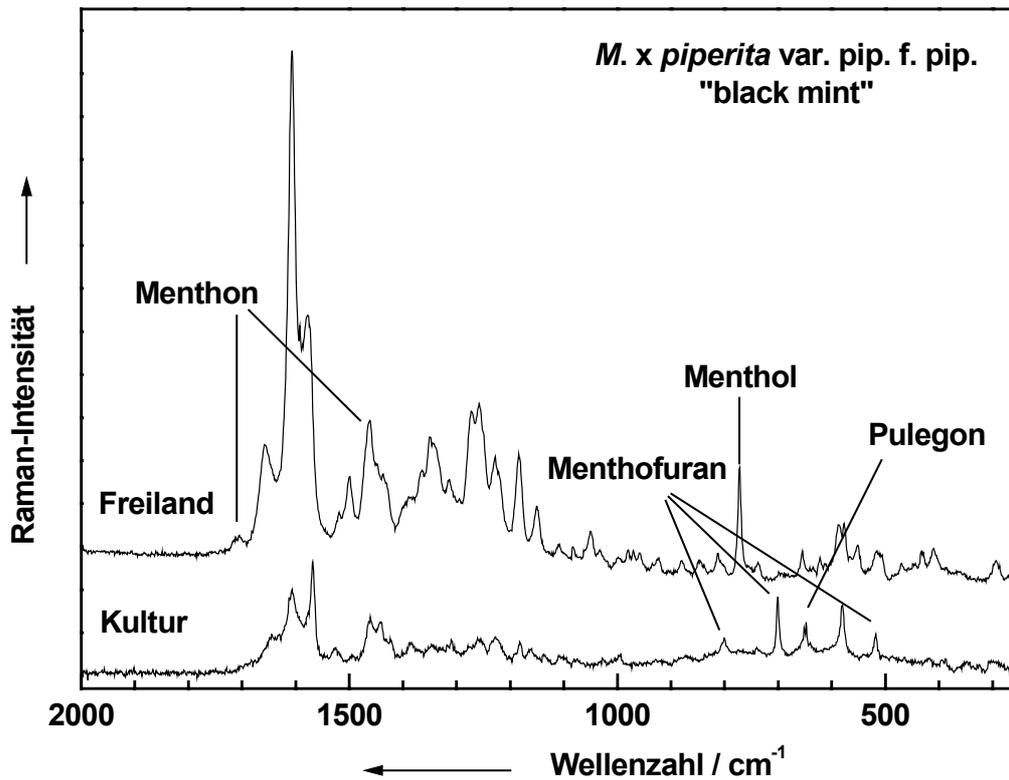


Abb. 7.17: *Mentha × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*) in zwei unterschiedlichen Kultivierungsformen.

Die beiden Monoterpene Isomenthon und Limonen, die jeweils am dritt-häufigsten in den ätherischen Ölen gefunden werden, können in den Spektren nicht nachgewiesen werden.

Tab. 7.6: Gaschromatographische Analyse des ätherischen Öls der Freiland- und Kultur-Minzen von *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* "*black mint*" (verkürzt, Anteil in %).

Monoterpene	Freiland	Kultur
Menthon	43,38	0,40
Menthol	29,08	0,90
Isomenthon	6,20	0,14
Pulegon	0,67	54,20
Menthofuran	1,15	21,96
Limonen	0,90	4,15

Die dritte untersuchte Minze ist die Bergamott-Minze (*Mentha × piperita* L. nm. citrata). Spektrum a in Abb. 7.18 zeigt das Spektrum der Freiland-Minze, während das der Kultur-Form in Spektrum b dargestellt ist.

Im Spektrum der Freiland-Minze (a) sind Markerbanden von Linalylacetat (Spektrum c) und Eucalyptol zu erkennen. Das Spektrum der Kultur-Minze besteht hauptsächlich aus Linalylacetat, dies ist durch Vergleich mit dem Spektrum der Reinsubstanz gut zu sehen. In diesem Fall sind keine Banden von anderen Substanzen identifizierbar.

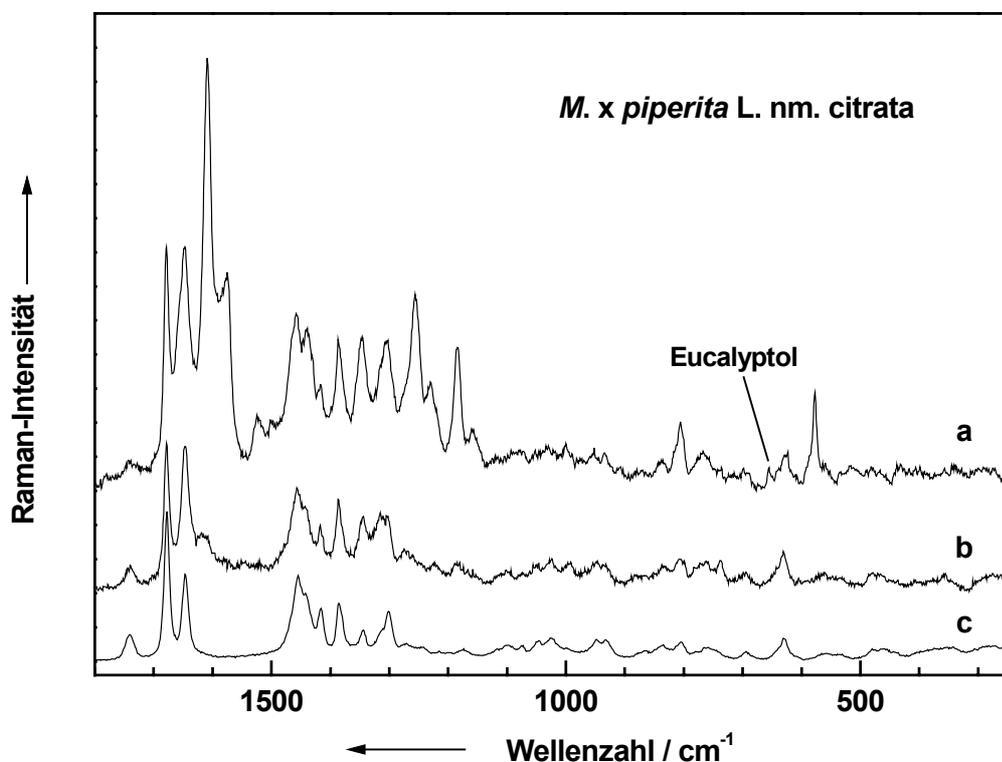


Abb. 7.18: Bergamott-Minze (*Mentha × piperita* L. nm. citrata) in unterschiedlicher Kultivierung. a: Freiland-Minze; b: Kultur-Minze; c: Linalylacetat.

Die gaschromatographische Analyse weist für beide Minzen die gleichen fünf Haupt-Inhaltsstoffe nach. Das Monoterpen Linalool (53,60 bzw. 40,62 %) ist nur schwer nachzuweisen, da die einzige Bande, die nicht von Signalen anderer Substanzen überlagert ist, eine sehr geringe Intensität aufweist. Die Banden der Monoterpene α -Terpineol und Geranylacetat werden nicht gefunden.

Tab. 7.7: Gaschromatographischer Vergleich des ätherischen Öls von Freiland- und Kultur-Minzen von *M. × piperita* L. nm. citrata (verkürzt, Anteil in %).

Monoterpene	Freiland	Kultur
Linalool	53,60	40,62
Linalylacetat	8,86	17,96
Eucalyptol	5,44	0,09
α -Terpineol	3,58	8,45
Geranylacetat	3,04	7,57

Im Spektrum der Kultur-Minze sind die Intensitäten der Banden um 1600 cm^{-1} im Vergleich zu denen der Freiland-Minze minimal. Geht man davon aus, dass diese Banden ihren Ursprung in der Cuticula finden, so erklärt sich die Abnahme der Bande durch die gleichmäßigen, sehr milden Umweltbedingungen der Kultur-Minze. Durch diese Bedingungen ist es nicht nötig, eine dicke, widerstandsfähige Cuticula für den Schutz gegen ein raues Klima zu entwickeln.

7.5.3 Jahreszeitliche Variationen

Neben den Veränderungen der ätherischen Öle durch Umweltfaktoren ergeben sich auch noch Unterschiede durch jahreszeitliche Schwankungen. In diesem Abschnitt wird das ätherische Öl der Bergamott-Minze zu verschiedenen Erntezeitpunkten untersucht, um Aufschluss über jahreszeitliche Änderungen zu erhalten.

In Abb. 7.19-A sind exemplarisch die Mikro-Raman-Spektren der Bergamott-Minze (*M. × piperita* L. nm. citrata) von vier verschiedenen Erntezeitpunkten abgebildet. Die Spektren wurden Ende April (a), Anfang Juni (b), Ende Juni (c) und Ende Juli (d) aufgenommen.

Die vier Spektren zeigen auffallende Unterschiede, die mit den wechselnden Zusammensetzungen des ätherische Öls erklärt werden können. Zum besseren Vergleich wurden alle Spektren auf die intensivste Bande bei 1602 cm^{-1} normiert. Diese Bande wird der Cuticula zugeordnet und hat somit keinen Einfluss auf den Monoterpen-Gehalt.

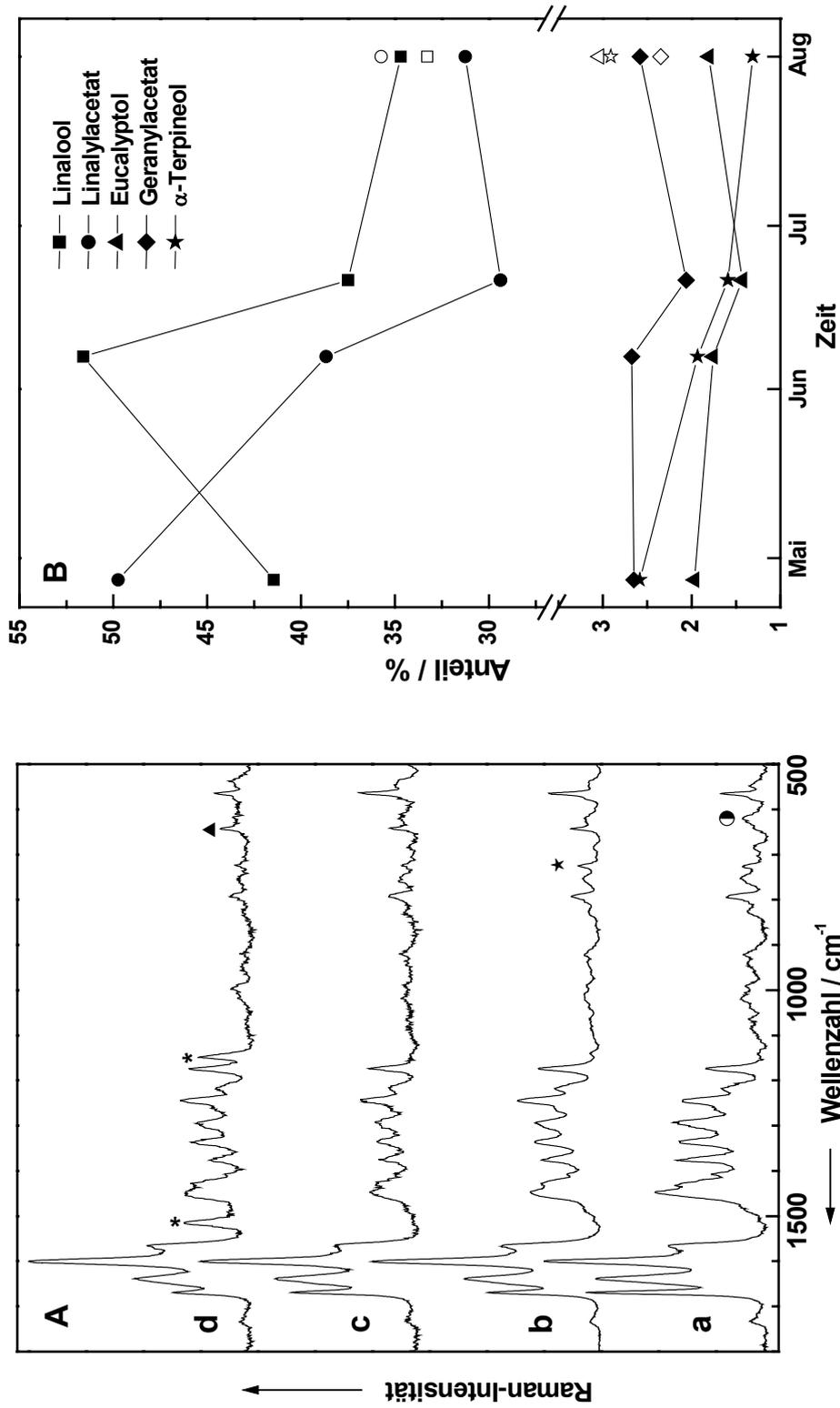


Abb. 7.19: A: Mikro-Raman-Spektren der Bergamott-Minze (*M. × piperita* L. nm. citrata) an vier unterschiedlichen Erntezeitpunkten. a: Ende April; b: Anfang Juni; c: Ende Juli. B: Zeitlicher Verlauf der prozentuale Anteile der Inhaltsstoffe.

Beispielsweise kann man anhand der Markerbande von Eucalyptol (▲) bei 643 cm^{-1} erkennen, dass der Anteil dieser Komponente im Laufe des Jahres zunimmt. Die Bande (●) bei 618 cm^{-1} gehört zum Monoterpen Linalylacetat. Die Intensität der Bande nimmt im Verlauf der Wachstumsperiode ab. Die Markerbande für α -Terpineol (★) bei 753 cm^{-1} hat in den Spektren a und b eine hohe Intensität, während die Intensität in den Spektren c und d geringer ist. Die mit (*) markierten Banden in Spektrum d können dem β -Carotin zugeordnet werden. Das β -Carotin ist nicht im ätherischen Öl der Minze lokalisiert, sondern stammt von Verunreinigungen (z. B. Mikro-Algen) auf der Außenseite der Drüsenschuppe.

Für die Berechnung der Anteile der fünf Hauptinhaltsstoffe (s. Tab 7.4) der Bergamott-Minze werden die in Abb. 7.12 markierten Banden verwendet. Das ist, wie schon erwähnt, für Linalool (■) die Bande bei 729 cm^{-1} . Die Markerbande des Linalylacetats (●) ist bei 1730 cm^{-1} zu beobachten. Diese Bande ist aussagekräftiger, als die Bande (●) bei 618 cm^{-1} . Die Carbonyl-Schwingung von Geranylacetat (◆) liegt bei 1738 cm^{-1} und ist somit von der von Linalylacetat eindeutig zu unterscheiden. Die Ringatmungs-Schwingung von Eucalyptol (▲) kann bei 643 cm^{-1} beobachtet werden. Die Ringatmungs-Schwingung von α -Terpineol (★) liegt bei 753 cm^{-1} .

In Abb. 7.19-B wird die Änderung der Monoterpen-Anteile im ätherischen Öl der Minze *M. × piperita* L. nm. citrata gegen den Erntezeitpunkt aufgetragen. Für die Berechnung werden die Intensitätswerte jedes Erntezeitraums aus drei Spektren gemittelt. Die prozentualen Anteile werden durch die gaschromatographischen Analysen (s. Tab. 7.4) für Ende Juni normiert. Die Werte für die drei verbleibenden Erntezeitpunkte werden danach berechnet. Die gaschromatischen Werte für den letzten Erntezeitpunkt werden durch nicht gefüllte Symbole dargestellt.

Die prozentualen Anteile der beiden Monoterpene Linalool und Linalylacetat liegen wesentlich höher als die Anteile an Eucalyptol, Geranylacetat und α -Terpineol. Der Gehalt an Linalool (■) durchläuft Anfang Juni sein Maximum und fällt danach wieder unter den Ausgangswert ab. Der berechnete Wert für August liegt über dem gemessenen (□), jedoch ist die Abweichung vom gemessenen Wert gering. Der Anteil an Linalylacetat (●) nimmt im Verlauf der Wachstumsperiode stark ab und erst am

Schluss wieder leicht zu. Der gemessene Wert (○) Ende Juli liegt allerdings deutlich über dem berechneten Anteil.

Der prozentuale Anteil von Eucalyptol (▲) fällt bis Ende Juni und steigt dann über das Ausgangsniveau. Der gemessene Wert (△) liegt deutlich höher als der berechnete Anteil. Die berechneten Anteile von α -Terpineol (★) fallen konstant über die gesamte Wachstumsperiode. Allerdings ist der gemessene Wert (☆) für α -Terpineol deutlich höher als der berechnete. Die Konzentration an Geranylacetat (◆) schwankt nur in einem sehr geringen Bereich. Der gemessene (◇) und der berechnete Anteil für Ende Juli weichen nur geringfügig voneinander ab.

Für eine genaue Kalibrierung der prozentualen Anteile der Monoterpene wären mehr Erntezeitpunkte mit gleichzeitiger gaschromatographischer Analyse notwendig gewesen. Daneben müsste auch die Anzahl der verwendeten Spektren pro Erntezeitpunkt erhöht werden, um individuelle Schwankungen zu minimieren. Eine weitere Fehlerquelle ist die Basislinien-Korrektur, da sich der Untergrund von Erntezeitpunkt zu Erntezeitpunkt verändert.

Mit diesen Untersuchungen sollte es möglich sein eine schnelle Untersuchungsmethode ohne hohen präparativen Aufwand für die Bestimmung des optimalen Erntezeitpunkts zu etablieren.

7.6 Untersuchung von Citrus-Früchten

Das ätherische Öl von Citrus-Früchten wird, wie in Abschnitt 7.1.2 beschrieben, in sogenannten lysigenen Ölbehältern in der Fruchtwand (Perikarp) gespeichert.

Die meisten Citrus-Arten besitzen ätherische Öle mit sehr ähnlichen Zusammensetzungen und einem großen Anteil an Limonen (75-90 %). Eine Ausnahme bildet hier die Limette (*Citrus aurantiifolia*), deren ätherisches Öl neben Limonen höhere Anteile an Citral und in geringeren Konzentrationen β -Pinen, γ -Terpinen, Geranylacetat und Nerylacetat enthält. Die Strukturen der Inhaltsstoffe sind in Abb. 7.20 zu sehen. Die Citrus-Öle enthalten in geringen Mengen p-Cymol, dessen

Konzentration sich während des Alterungsprozesses der Öle erhöht.
[243,260,283,284]

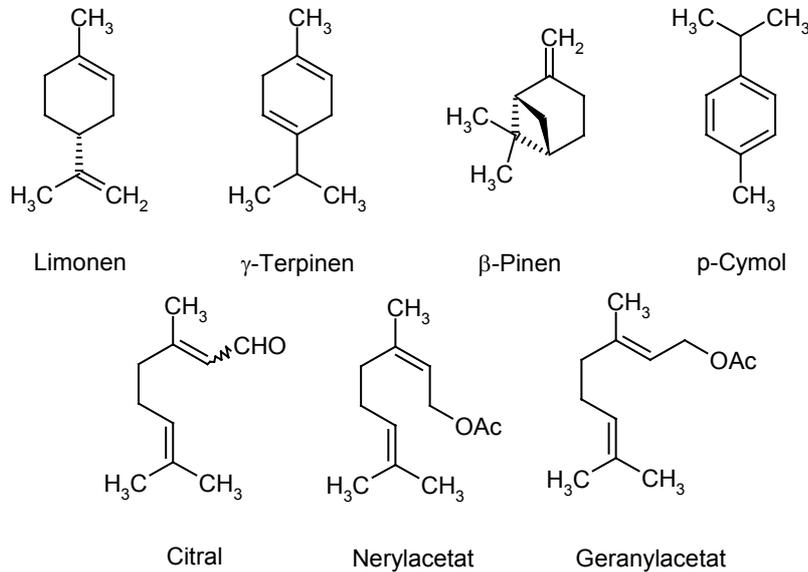


Abb. 7.20: Strukturformeln der Inhaltsstoffe verschiedener Citrus-Öle.

Für die Mikro-Raman-Messungen werden die Fruchtwände der Citrus-Früchte tangential mit einem Skalpell angeschnitten und der Abschnitt in Wasser ohne weitere Aufarbeitung auf einem Objektträger fixiert.

In Abb. 7.21 sind die Mikro-Raman-Spektren aus dem Perikarp von Limette (a) und Citrone (b) dargestellt. Die mit * markierten Banden können der C=C-Streckschwingung bzw. der C–C-Streckschwingung von β -Carotin aus der Fruchtwand zugeordnet werden.

Als Hauptkomponente beider Spektren kann das Limonen (c) mit der charakteristischen Markerbande bei 754 cm^{-1} identifiziert werden. Die Bande bei 1700 cm^{-1} ist die C=C-Streckschwingung von γ -Terpinen (d). Das schwache Signal bei 851 cm^{-1} kann der Markerbande von β -Pinen (g) zugeordnet werden. Der Peak bei 640 cm^{-1} ist eine Kombination von Banden der Monoterpene Limonen, β -Pinen, Geranylacetat und Nerylacetat.

Das Citral, das aufgrund der hohen Konzentration (bis 10%) im ätherischen Öl vor allem im Spektrum der Limette zu erkennen sein sollte, besitzt nur eine einzige Markerbande, die als Schulter bei 1633 cm^{-1} zu erkennen ist.

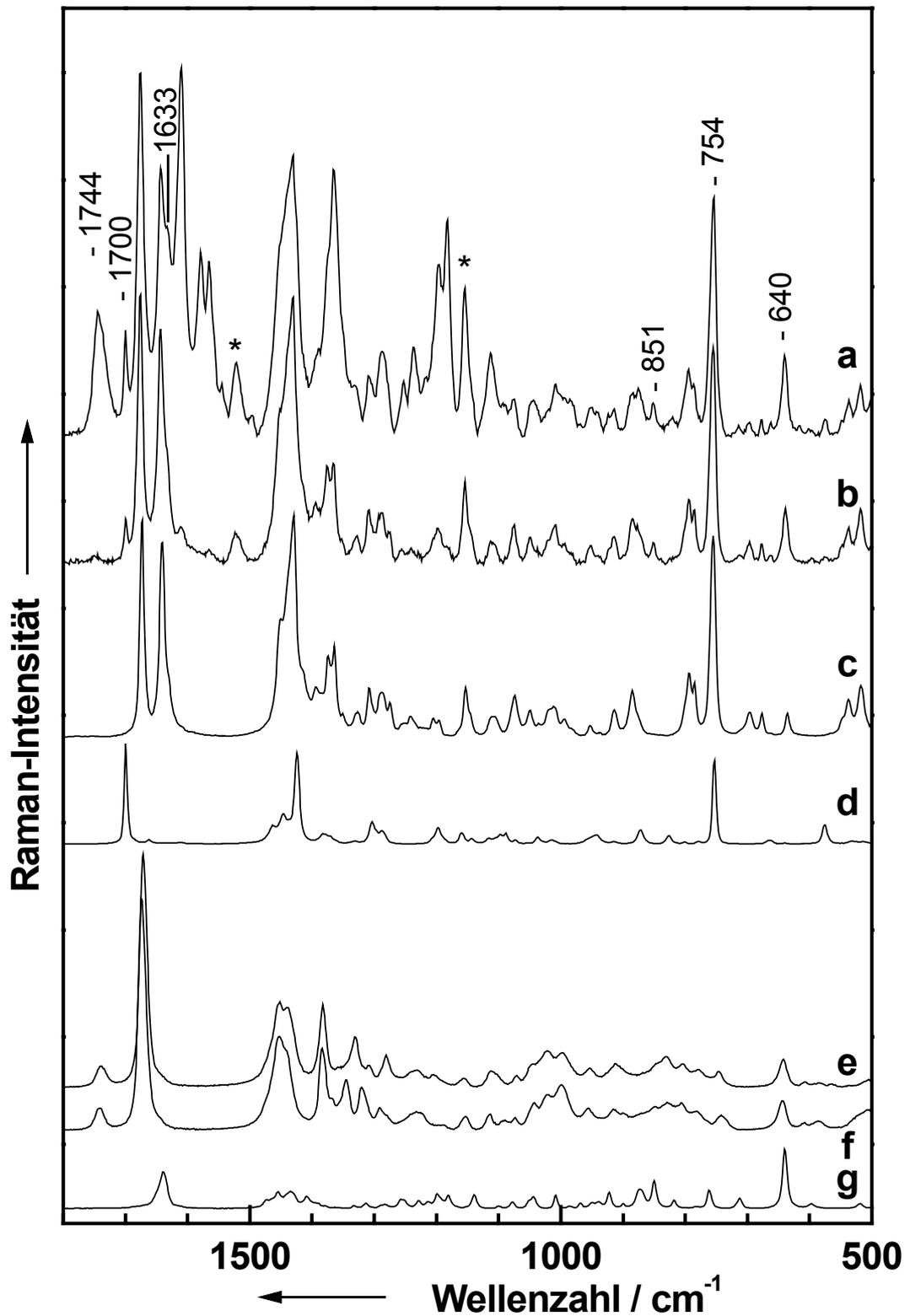


Abb. 7.21: Mikro-Raman-Spektren von Limette (a) und Citrone (b) im Vergleich zu Limonen (c), γ -Terpinen (d), Geranylacetat (e), Nerylacetat (f) und β -Pinen (g). (*: β -Carotin).

Das Spektrum der Limette (a) weist neben den Banden der erwähnten Monoterpene noch andere charakteristische Signale auf. Am auffälligsten ist die Bande bei 1744 cm^{-1} , welche den C=O-Streckschwingungen der Ester von Geranylacetat (e) und Nerylacetat (f) zugeordnet werden kann.

7.7 Hierarchische Clusteranalyse

Chemotaxonomische Klassifizierungen beruhen auf den Ähnlichkeiten der chemischen Inhaltsstoffe von nah verwandten Pflanzen. Im Falle der Lamiaceen oder Citrus-Arten kann man davon ausgehen, dass die Verwandtschaftsverhältnisse umso enger sind, je ähnlicher die Zusammensetzung der ätherischen Öle ist.

Da die Raman-Spektren aus Öl-produzierenden Bereichen der Pflanzen Informationen sowohl über das jeweilige ätherische Öl, als auch über die pflanzliche Matrix liefert, sollten diese Messungen besonders dazu geeignet sein eine Klassifizierung der Pflanzen vorzunehmen.

Durch die Kombination von spektroskopischen Studien mit multivariaten Analysemethoden (PCA) ist es z. B. möglich, einen quantitativen Nachweis von Cocain in verschiedenen Pulvern [126] zu führen. Weiterhin ist es gelungen, menschliche Koronararterien mit einer Kombination von Raman-Spektroskopie und PCA [128] zu untersuchen. Neben der Detektion von Parasiten in Fischfilet durch multispektrale Images und PCA [121] ist auch eine Identifizierung von Mikroorganismen durch Raman-Spektroskopie [112,285] in Kombination mit Neuronalen Netzen bzw. einer hierarchischen Clusteranalyse (HCA) möglich.

Erb et al. [123] konnten durch Raman-spektroskopische Untersuchungen von Nadeln verschiedener Coniferen-Arten und einer anschließenden hierarchischen Clusteranalyse die unterschiedlichen Arten charakterisiert werden. Daneben ist es auch möglich, unterschiedliche Holztypen durch Raman-Spektroskopie und generischen Algorithmus (GA) zu klassifizieren [286].

Bei den ätherischen Ölen wurde die Charakterisierung isolierter Citrus- und Lamiaceen-Öle mit PCA und NIR- [129,130,238,272,273] bzw. ATR- und Raman-Spektroskopie [130,274] untersucht.

Für die folgende chemotaxonomischen Untersuchungen wird die hierarchische Clusteranalyse (HCA) verwendet, da bis auf wenige Ausnahmen keine Angaben zu den Zusammensetzungen der ätherischen Öle vorliegen.

7.7.1 Citrus-Früchte

Die Mikro-Raman-Spektren der untersuchten Citrus-Arten sind in Abb. 7.22 zu sehen. Dabei entspricht Spektrum a der Limette (*Citrus aurantiifolia*), Spektrum b der Mandarine (*Citrus deliciosa*), Spektrum c der Orange (*Citrus sinensis*) und Spektrum d der Citrone (*Citrus limon*). Anhand der Spektren kann man sofort das Spektrum der Limette (c) identifizieren, da es aufgrund der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung des ätherischen Öls stark abweicht. Die Spektren der Mandarine (b) Orange (c) und Citrone(d) sind sich dagegen sehr ähnlich.

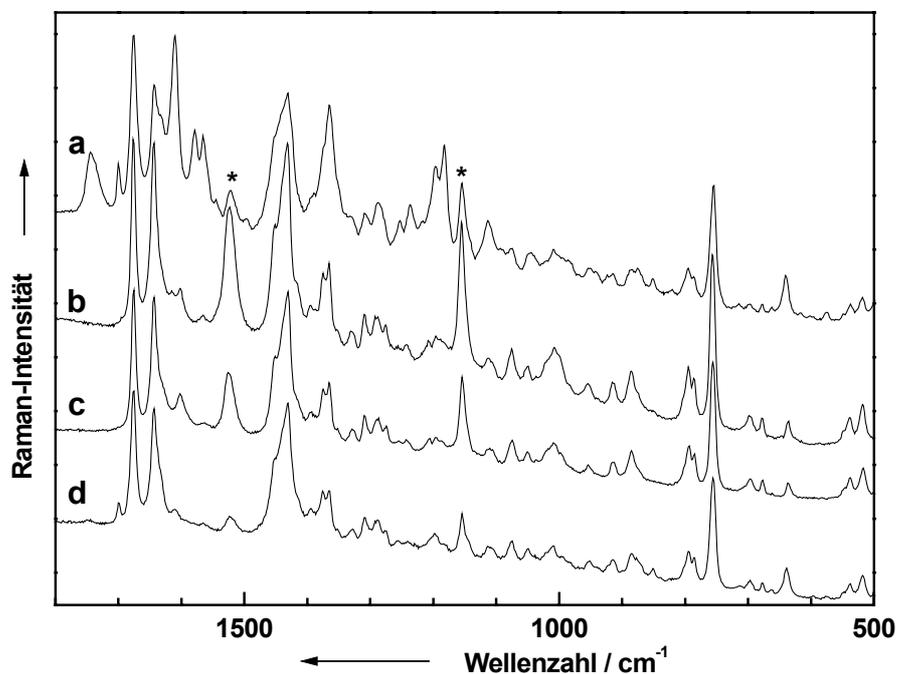


Abb. 7.22: Mikro-Raman-Spektren von lysigenen Öldrüsen in verschiedenen Citrus-Arten: a: Limette, b: Mandarine, c: Orange; d: Citrone (*: β -Carotin).

Neben den Inhaltsstoffen der ätherischen Öle (s. Abb. 7.21) ist in den Spektren auch noch β -Carotin zu erkennen. β -Carotin (*) ist kein Bestandteil der ätherischen Öle, sondern hat seinen Ausgang in den mehr oder weniger intensiv gefärbten Schalen. Die gelbe Schale der Citrone (d) hat den geringsten Anteil an β -Carotin. Auch die grünliche Schale der Limette (a) zeigt nur sehr wenig β -Carotin. Der höchste Gehalt findet sich in Orange (c) und vor allem Mandarine (b).

Da die Mikro-Raman-Spektren der einzelnen Citrus-Früchte z. T. nur schwer zu erkennen sind, ist zur Unterscheidung der Arten eine multivariate Analyse notwendig.

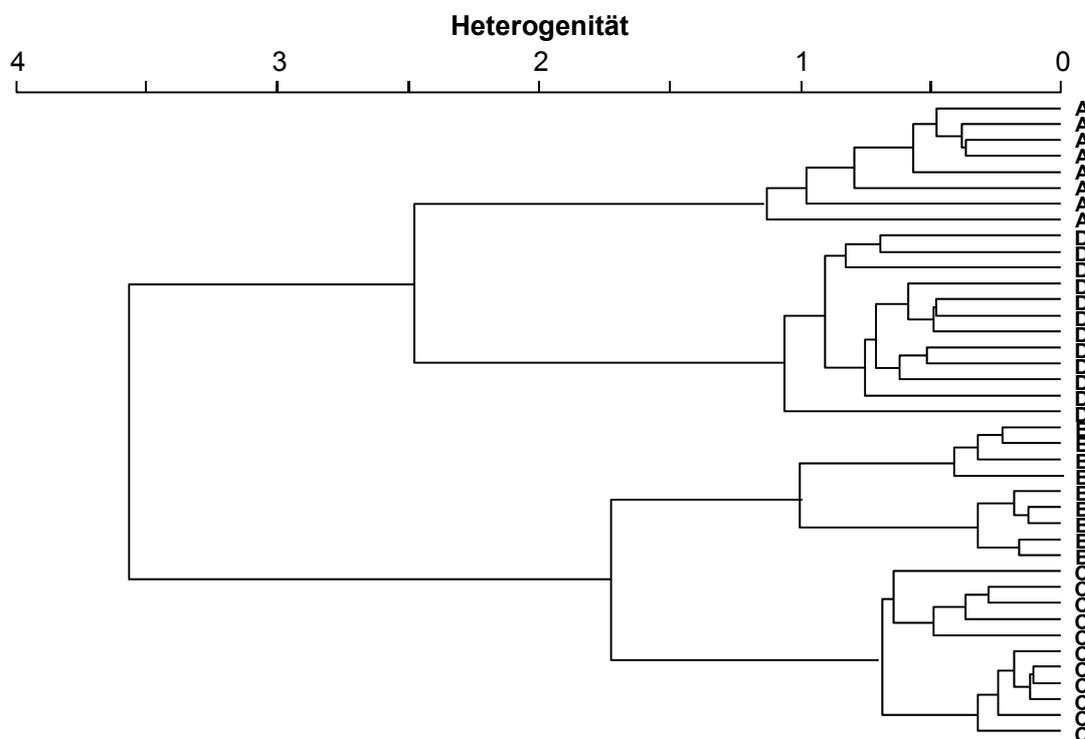


Abb. 7.23: Hierarchische Clusteranalyse von vier verschiedenen Citrus-Arten.
A: Limette, B: Mandarine; C: Orange; D: Citrone.

In Abb. 7.23 ist das Ergebnis der Ähnlichkeitsrechnung mit 40 Raman-Spektren der vier Citrus-Früchte zu sehen. Dazu wurde die zweite Ableitung verwendet, die ohne vorhergehende Basislinienkorrektur gebildet wurde. Für die Berechnung der spektralen Distanz wurde der Standard-Algorithmus mit gleichzeitiger Vektornormierung verwendet. Als spektrale Bereiche wurde zum einen die Bereiche

der Hauptbanden von β -Carotin bei 1117 – 1177 und 1494 – 1552 cm^{-1} zum anderen der C=O-Streckschwingungs-Bereich bei 1712 – 1762 cm^{-1} ausgewählt.

Für die Cluster-Berechnung wurde Ward's Algorithmus verwendet. Das Dendrogramm in Abb. 7.23 stellt in der vertikalen Achse die Spektren der einzelnen Citrus-Früchte (A bis D) gegen die Heterogenität der Spektren in der horizontalen Achse dar.

Die Cluster der einzelnen Citrus-Früchte besitzen mit Werten zwischen 0,7 und 1,2 eine hohe spektrale Ähnlichkeit. Dabei sind die Spektren der Orange (C) am ähnlichsten und die von Limette (A) am unterschiedlichsten. Die beiden Cluster der Limette (A) und Citrone (D) bilden bei einem Wert von 2,5 einen Cluster, der deutlich (3,5) von dem zweiten Cluster von Orange (C) und Mandarine (B) bei einem Wert von 1,7 getrennt wird. Auch in diesen Werten spiegelt sich die große Ähnlichkeit der Raman-Spektren wider. Allerdings ist es durch diese Rechnung möglich, eine eindeutige Zuordnung der Citrus-Früchte zu treffen.

7.7.2 Mentha

Für die chemotaxonomische Untersuchung wurden fünf Minzen aus zwei verschiedenen Arten verwendet. Die Mikro-Raman-Spektren dieser Minzen sind in Abb. 7.24 zu sehen: A: Ährenminze (*M. spicata* L. ssp. *spicata*), B: Krauseminze (*M. spicata* L. ssp. *crispata*), C: Bergamott-Minze (*M. × piperita* L. nm. *citrata*) sowie die Pfefferminzen D: *M. × piperita* L. var. *pip. pallescens pallescens* und E: *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*). [287]

Die Raman-Spektren der beiden Pfefferminzen (D und E) sind sehr ähnlich und nur schwer zu unterscheiden. Dagegen weicht das Spektrum der Bergamotte-Minze stark von diesen beiden Spektren ab, obwohl alle drei Minzen zu der Art *M. × piperita* L. gehören. Die Spektren der Krauseminze (B) und der Ährenminze (A) unterscheiden sich ebenfalls stark. Die Unterschiede zwischen den Spektren der Unterarten bzw. Varietäten sind nicht so offensichtlich wie die Unterschiede zwischen den Spektren der beiden Arten. Die Mikro-Raman-Spektren sind für einen bestimmten Erntezeitpunkt reproduzierbar, ändern sich aber im Verlauf der Wachstumsperiode (s. Abb. 7.19-A) aufgrund der wechselnden Zusammensetzung der ätherischen Öle.

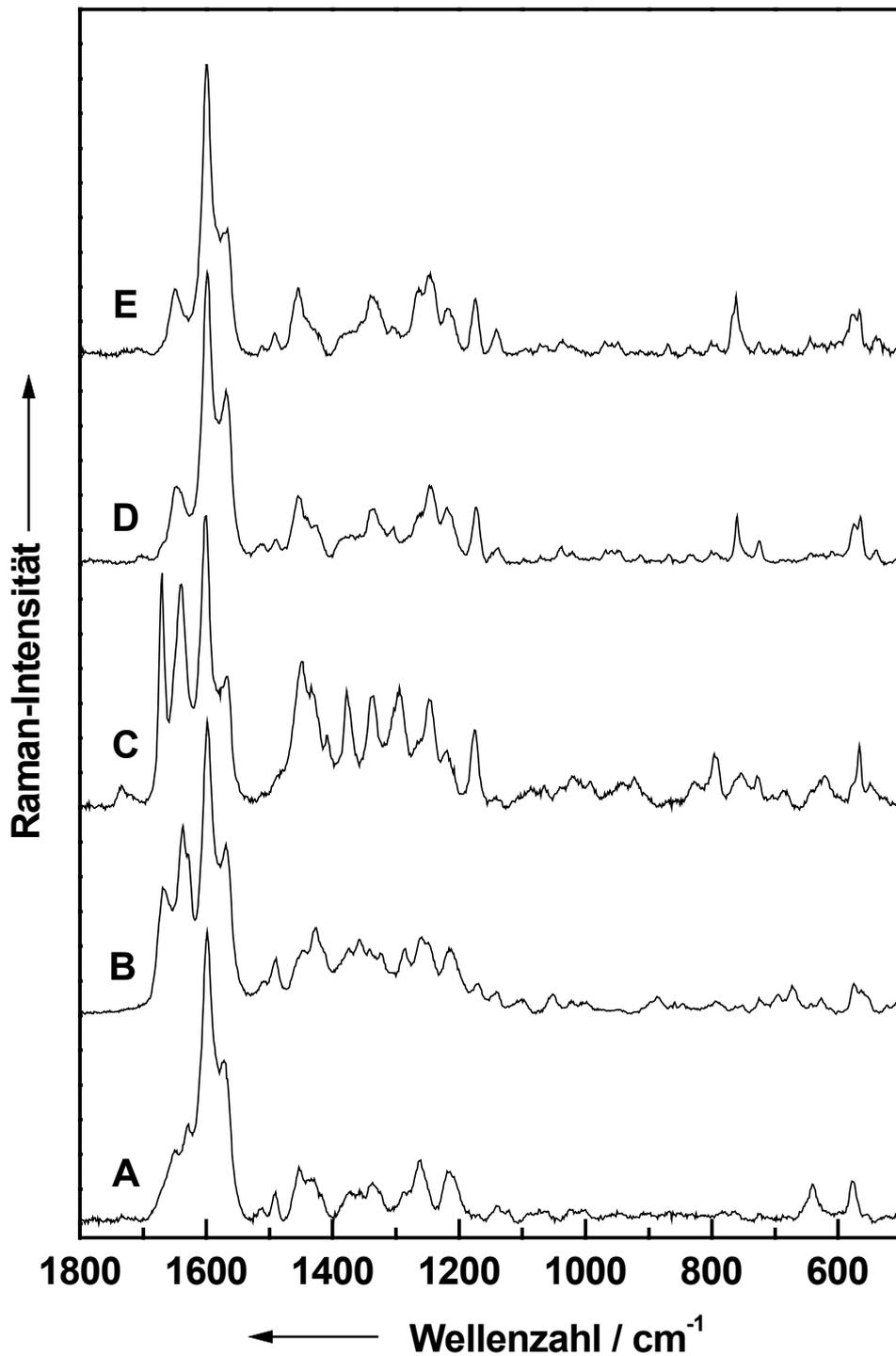


Abb. 7.24: Mikro-Raman-Spektren von fünf verschiedenen Minzarten A: *M. spicata* L. ssp. *spicata*, B: *M. spicata* L. ssp. *crispata*, C: *M. × piperita* L. nm. *citrata*, D: *M. × piperita* L. var. *pip. pallescens pallescens*, E: *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*).

Um die Unterschiede der Spektren besser quantifizieren zu können, wird zur chemotaxonomischen Klassifizierung der Minzen eine Hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. In Abb. 7.25 ist ein Dendrogramm von 21 Spektren der fünf verschiedenen Minzen für einen Erntezeitpunkt abgebildet.

Als Vorbehandlung wurden alle Spektren basislinienkorrigiert und die zweite Ableitung gebildet. Um den geeigneten spektralen Bereich für die Berechnung zu finden, wurden verschiedene Bereiche auch mit unterschiedlicher Wichtung der einzelnen Bereiche geprüft. Beispielsweise wurde der Bereich der Cuticula-Signale zwischen 1620 und 1160 cm^{-1} oder die Bereiche der ätherischen Öle bei $1690 - 1620$ und $1120 - 500\text{ cm}^{-1}$ für die Ähnlichkeitsberechnungen herangezogen. Die besten Ergebnisse werden aber für einen spektralen Bereich von 520 and 1690 cm^{-1} erzielt.

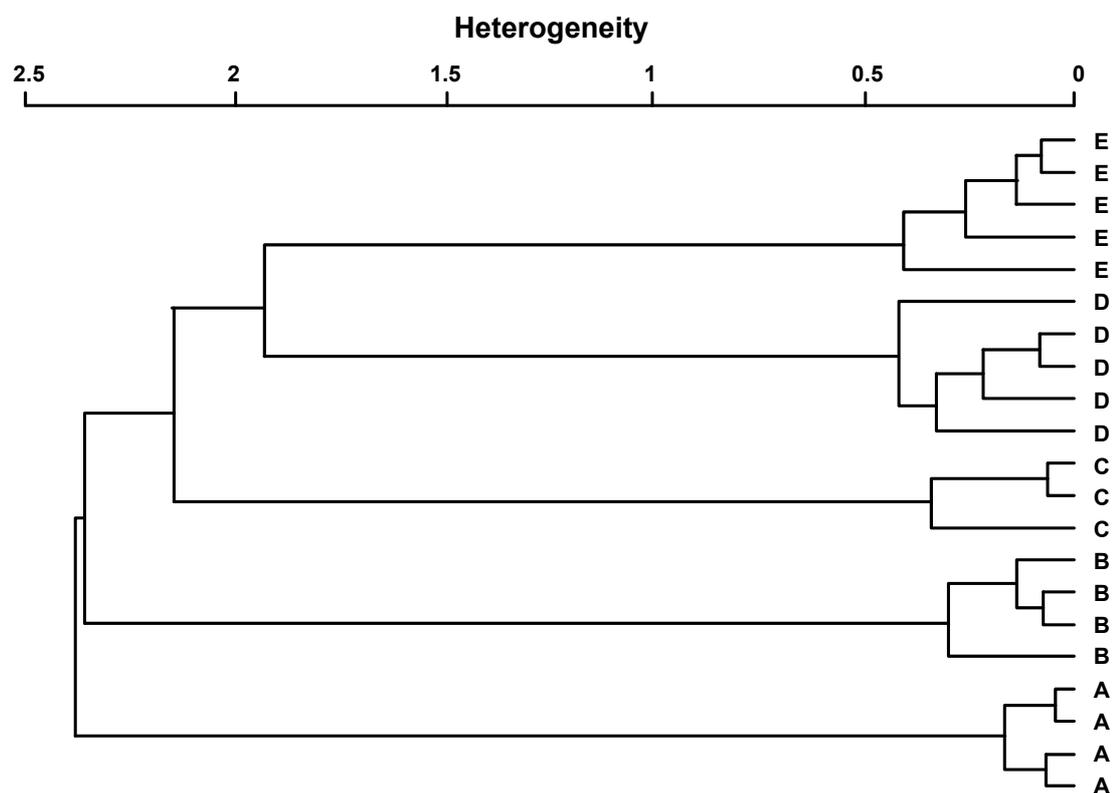


Abb. 7.25: Dendrogramm von einem Erntezeitpunkt. A: *M. spicata* L. ssp. *spicata*, B: *M. spicata* L. ssp. *crispata*, C: *M. × piperita* L. nm. *citrata*, D: *M. × piperita* L. var. *pip. pallescens pallescens*, E: *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*).

Die spektrale Distanz zwischen den Spektren wurde mit Hilfe des Faktor-Algorithmus und einem Faktor von 5 bei gleichzeitiger Verwendung einer Vektornormierung berechnet. Für die Cluster-Berechnung wurde Ward's Algorithmus verwendet.

Die Cluster der einzelnen Minzen zeigen einen geringen Unterschied mit Werten von 1,15 bis 0,41. Die nächsten Cluster verbinden sich alle bei wesentlich höheren Werten über 1,9. Der direkt folgende Cluster wird von den beiden Pfefferminzen (E und D) gebildet, die sich bei einem Wert von 1,95 verbinden. Die Bergamott-Minze als dritte Minze der Art *M. × piperita* L. fügt sich zu diesem Cluster bei einem Wert von 2,2.

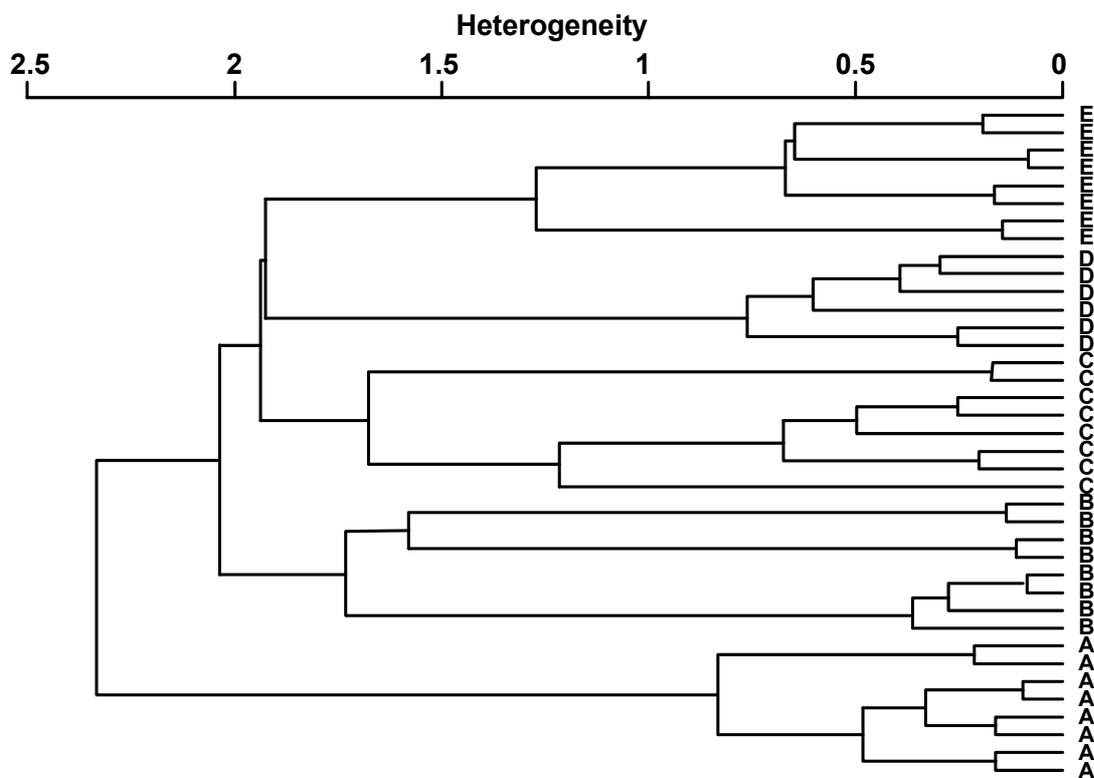


Abb. 7.26: Dendrogramm der fünf Minzen von vier verschiedenen Erntezeitpunkten. A: *M. spicata* L. ssp. *spicata*, B: *M. spicata* L. ssp. *crispata*, C: *M. × piperita* L. nm. *citrata*, D: *M. × piperita* L. var. *pip. pallescens pallescens*, E: *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*).

Die Spektren der Art *M. spicata* L. unterscheiden sich stärker von denen der *M. × piperita* L., was daran zu sehen ist, dass die nächsten Cluster der Krauseminze (B) bei 2,4 und der Ährenminze (A) bei 2,42 mit den vorhergegangenen verbunden wird. Durch diese Rechnung ist es somit möglich, nicht nur die beiden Arten *M. × piperita*

L. und *M. spicata* L. deutlich voneinander zu unterscheiden, sondern auch die Unterarten bzw. Varietäten.

In Abb. 7.26 ist ein Dendrogramm von 38 Spektren der fünf Minzen aus vier verschiedenen Erntezeitpunkten dargestellt. Wie in Abb. 7.19-A gezeigt, ändert sich die Zusammensetzung des ätherischen Öls der Minzen innerhalb der Wachstumsperiode, was zum Teil zu starken Veränderungen der Spektren führt. Aus diesem Grund wurden die Spektren nach der Basislinien-Korrektur geglättet (23 Punkte) und anschließend einer Minimum/Maximum-Normierung unterzogen.

Die Clusteranalyse wurde im Spektralbereich von 500 bis 2000 cm^{-1} durchgeführt. Die spektrale Distanz wurde mit dem Faktor-Algorithmus und einem Faktor von 10 bei gleichzeitiger Vektornormierung durchgeführt. Für die Clusterberechnung wurde Ward's-Algorithmus verwendet.

Da die Raman-Spektren der einzelnen Minzen innerhalb einer Wachstumsperiode aufgrund wechselnder Zusammensetzung der ätherischen Öle stärker variieren als innerhalb eines Erntezeitpunkts, sind im Dendrogramm die Cluster der einzelnen Minz-Taxa mit wesentlich höheren Werten von 0,78 (bei B) bis 1,75 (bei D) dargestellt. Auch die Unterscheidung zwischen den Clustern der einzelnen Minzen und der Clusterung zwischen verschiedenen Minzen ist nicht mehr so offensichtlich wie in Abb. 7.25 bei nur einem Erntezeitpunkt. Allerdings ist die Reihenfolge der Clusterung auch hier beibehalten. Zunächst bildet sich ein Cluster der beiden Pfefferminzen (D und E) bei 1,93, dicht gefolgt von der Einbindung der Bergamott-Minze (C) bei 1,94. Der Abstand zu den *M. spicata* L. ist mit 2,05 für die Krauseminze (B) bzw. 2,35 für die Ährenminze (A) etwas größer.

7.8 SERS-Sonde

In den vorangegangenen Kapiteln wurde Silber-Kolloid verwendet, um eine effektive Quenchung der Fluoreszenz und eine gleichzeitige Signal-Erhöhung zu erreichen. Durch das Einbringen großer Mengen von Metall-Partikeln in das Gewebe von Pflanzen kann es allerdings aufgrund elektrochemischer Reaktionen zu einer

Zerstörung des Gewebes kommen. Aus diesem Grund wird in diesem Abschnitt das SERS-aktive Material als dünner Silber-Film auf einer geätzten Glasfaser Spitze lokalisiert (Präparation s. Abschnitt 4.3.2 [74]). Durch diese Methode wird zum einen die Menge an Schwermetall in der Zelle minimiert und an wenigen ausgewählten Stellen lokalisiert und zum anderen durch die besondere Beleuchtung der Probe mit der Glasfaser Spitze eine minimale Laserleistung verwendet.

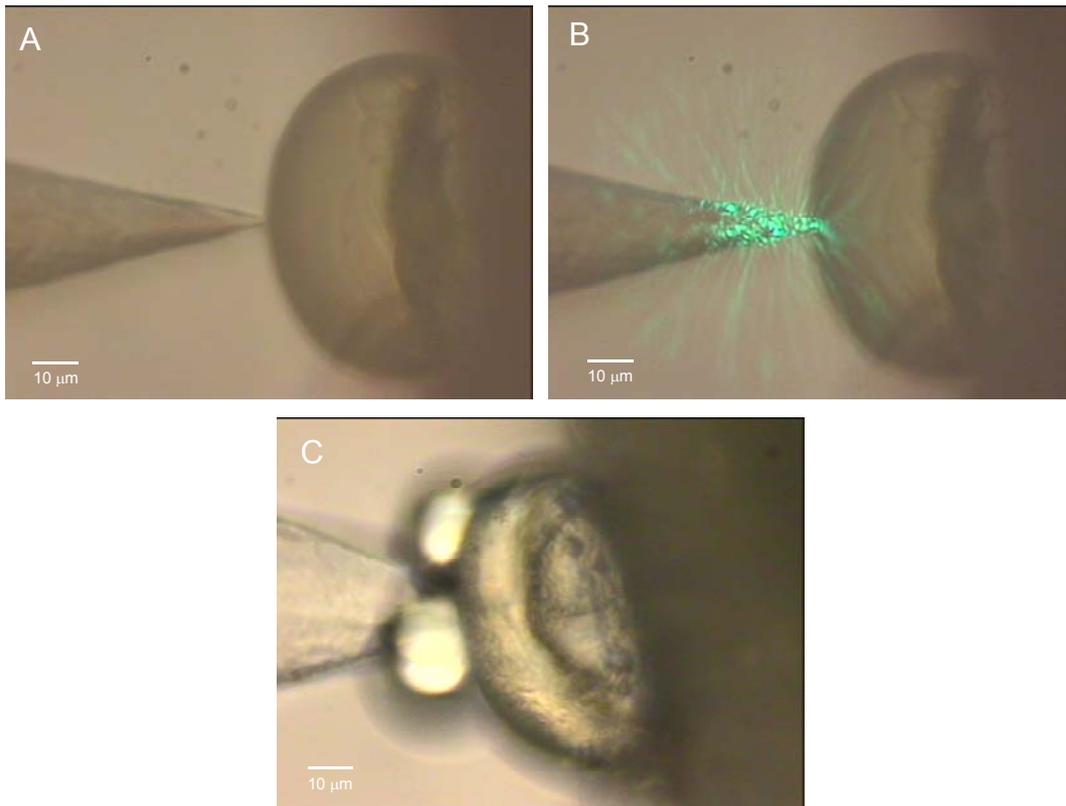


Abb. 7.27: Mikroskopische Aufnahmen der SERS-Sonde an einer Drüsen-
schuppe von *M. × piperita* L. nm. A: Sonde an der Drüsen-
schuppe; B: Sonde an der Drüsen-
schuppe mit eingekoppeltem Laser; C:
Sonde in der Drüsen-
schuppe.

Über einen Mikromanipulator wird die Glasfaser Spitze unter dem Mikroskop an einer Drüsen-
schuppe der Bergamott-Minze *M. × piperita* L. nm. ausgerichtet. Je nach
Position der Spitze sind Messungen an verschiedenen Stellen der Probe möglich. In
Abb. 7.27 sind mikroskopische Aufnahmen von zwei verschiedenen Positionen
dargestellt. In Abbildung A ist die Glasfaser Spitze außen an der Cuticula einer
Drüsen-
schuppe lokalisiert. In Abbildung B sieht man bei gleicher Position der

Glasfaserspitze den durch die Glasfaser eingekoppelten Laser (514,5 nm). Die maximale Intensität des Lasers ist an der Faserspitze lokalisiert, was zu einer guten örtlichen Auflösung der Raman-Spektren führt. In Abb. 7.27-C ist die Glasfaserspitze in die Drüsenschuppe eingestochen, wodurch Messungen der eingeschlossenen ätherischen Öle möglich sind. Durch den hohen Druck in der Drüsenschuppe tritt das ätherische Öl nach dem Öffnen der Drüsenschuppe zum Teil neben der Glasfaserspitze aus.

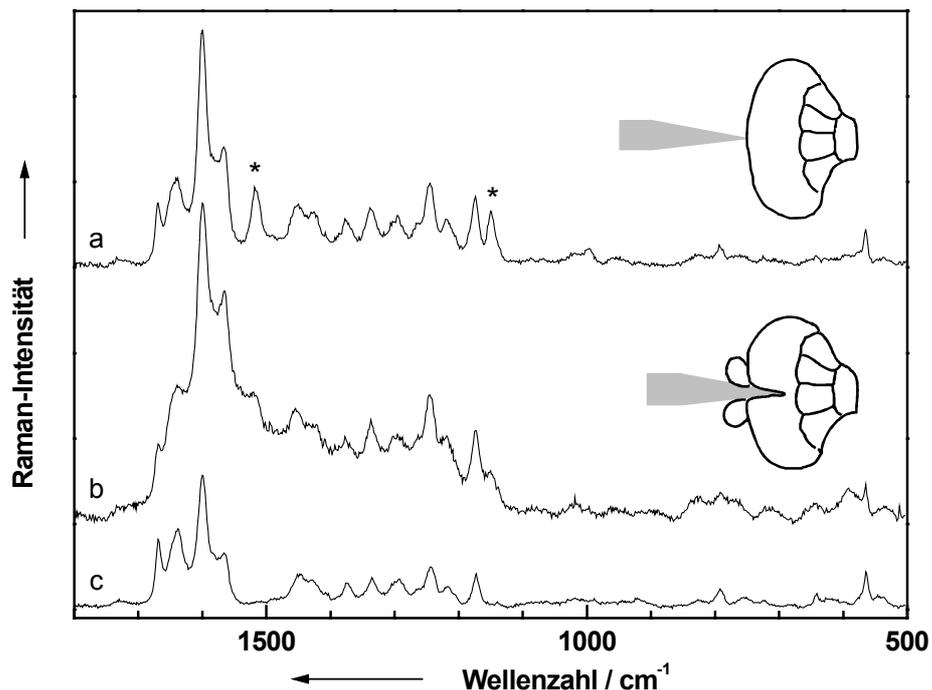


Abb. 7.28: Vergleich eines konventionellem Mikro-SERS-Spektrums mit Messungen der SERS-Sonde. a: Sonde an der Drüseschuppe, b: Sonde in der Drüsenschuppe, c: Mikro-Raman-Spektrum mit Kolloid. *: β -Carotin; die Zeichnungen zeigen die Position der Glasfaserspitze.

In Abb. 7.28 sind die Ergebnisse der Raman-Messungen mit der SERS-Sonde dargestellt. Zum Vergleich wird in Spektrum c ein konventionelles Mikro-Raman-Spektrum einer Drüsenschuppe mit Verwendung von Silber-Kolloiden dargestellt. Die Laserintensität an der Probe beträgt 50 mW. In den Spektren a und b wird der Anregungslaser über die Glasfaser auf die Probe gebracht. In diesem Fall wird eine Laserintensität von 1,2 mW an der Probe verwendet. Abgesehen von der unterschiedlichen Anregung und Laserintensität werden die Parameter für alle

Messungen gleich gehalten. In Spektrum a ist die SERS-Sonde an der Außenseite einer Drüsenschuppe lokalisiert. Das Spektrum hat eine bessere Qualität als Spektrum c aus dem konventionellen Mikro-Raman-Setup.

Zusätzlich tauchen noch zwei Banden (*) in Spektrum a auf, die dem β -Carotin zugeordnet werden können. Das β -Carotin ist nicht in der Drüsenschuppe lokalisiert, sondern kommt von Kontaminationen, wie z. B. Mikroalgen, an der Außenseite der Drüsenschuppe. Durch Zugabe von Kolloid (Spektrum c) werden diese Kontaminationen zerstört und können deshalb nicht detektiert werden. Daraus folgt, dass man mit der Spitze durch zerstörungsfreies Messen eine vollständige Information über die Situation am Messpunkt erhält.

Für die Aufnahme von Spektrum b wird die Glasfaser Spitze in die Drüsenschuppe gestochen (s. Abb. 7.27-C). Durch das Anstechen der Drüsenschuppe läuft das ätherische Öl aus und das Spektrum enthält fast keine Signale des ätherischen Öls mehr. Das Spektrum zeigt im Bereich von 1150 bis 1650 cm^{-1} einen etwas höheren Untergrund als Spektrum a. Die Banden können fast ausschließlich der Cuticula zugeordnet werden.

Durch die Verwendung der SERS-Sonde erhält man bei minimaler Laserleistung an der Probe und gleichzeitiger Reduzierung der Schwermetallbelastung des pflanzlichen Gewebes vergleichbare Daten wie mit der konventionellen Mikro-Raman-Spektroskopie. Je nach Position der Spitze in der Probe können Spektren selektiv von den gewünschten Bereichen nacheinander aufgenommen werden. Durch eine weitere Vereinfachung der Methode sollte es auch möglich sein, Pflanzen ohne Präparation (Anfertigung von Schnitten) zu vermessen.

8 Identifizierung von Mikroorganismen

In diesem Kapitel werden zunächst die biologische Grundlagen von Bakterien und Hefen diskutiert. Im Anschluss daran wird die experimentelle Durchführung zur Identifizierung von verschiedenen Mikroorganismen aufgezeigt. Begonnen wird mit der Raman-spektroskopischen Untersuchung von einzelnen Bakterienkolonien auf Anzuchtplatten. Im Anschluss daran wird die orts aufgelöste Unterscheidung von Mikroorganismen in einem Ausstrich demonstriert. An ausgewählten Beispielen wird gezeigt, dass es durch Mikro-Raman-Spektroskopie möglich ist, auch nicht kolorierte Bakterien in sehr geringen Mengen bis hin zu einer einzelnen Zelle nachzuweisen und selbst verschiedene Bakterien aus der selben Art zu unterscheiden.

In einem weiteren Abschnitt wird die Anwendung einer speziellen, neu entwickelten SERS-Sonde zur Identifizierung von geringen Mengen von Mikroorganismen diskutiert. Am Schluss dieses Kapitels wird diese Methode durch Kombination von AFM und einem Raman-Mikroskop verfeinert, so dass trotz einer räumliche Auflösung von 70 nm noch Raman-Spektroskopie an einer einzelnen Zelle durchgeführt werden kann.

8.1 Biologische Grundlagen

Man unterteilt grundsätzlich alle Organismen in zwei verschiedene Reiche, das der Prokaryoten (Bakterien, Cyanobakterien und Archebakterien) und das der Eukaryoten (Pilze, Hefen, Pflanzen, Tiere). Den Prokaryoten fehlt ein von einer Membran umgebener Kern. Die DNA liegt als ringförmig geschlossener Strang frei im Cytoplasma. Die prokaryotische Zelle enthält keine Organellen und ist morphologisch kaum differenziert. Der Gestalt nach lassen sich nur wenige Formen unterscheiden, die sich im Wesentlichen auf Kugeln, sowie gerade oder gekrümmte Zylinder-Formen zurückführen lassen.

Eukaryoten verfügen über einen Zellkern, der den größten Teil des Genoms enthält. Zusätzlich zum Zellkern enthalten eukariotische Zellen noch andere Zellorganellen, wie zum Beispiel Mitochondrien oder Chloroplasten (bei Pflanzen); diese enthalten einen weiteren, sehr kleinen Teil des Genoms.

8.1.1 Bakterien

Die Gruppe der Prokaryoten lässt sich mit Hilfe verschiedener Merkmale, wie der mikroskopisch leicht erfassbaren Gestalten (Kugeln, Stäbchen, Spirillen), der Gram-Färbbarkeit sowie dem Verhältnis zu Sauerstoff (aerob, anaerob) gliedern. *Micrococcus luteus* gehört zu den Gram-positiven, aeroben Kokken und *Pseudomonas fluorescens* zu den Gram-negativen, aeroben Stäbchen.

Zur Gattung *Micrococcus* gehören die pigmentierten Bakterien, deren gelbe oder rote Kolonien man auf „Luftplatten“ häufig begegnet. Wegen der Bildung von Tetraden zählt man sie zur Gattung *Sarcina*. Ein Vertreter dieser Gattung *Micrococcus luteus* ist obligat aerob; seine Pigmentierung erhält er von dem Carotenoid Sarcinaxanthin (s. Abb. 8.1).

Pigmente schützen viele Mikroorganismen gegen Licht und UV-Strahlung. Die Abtötung von Bakterien im sichtbaren Spektralbereich erfolgt nur in Anwesenheit von Luftsauerstoff und beruht auf Photooxidation. Carotenoide sind meist in der

Plasmamembran lokalisiert und schützen die empfindlichen Regionen der Zelle vor der Photooxidation [288].

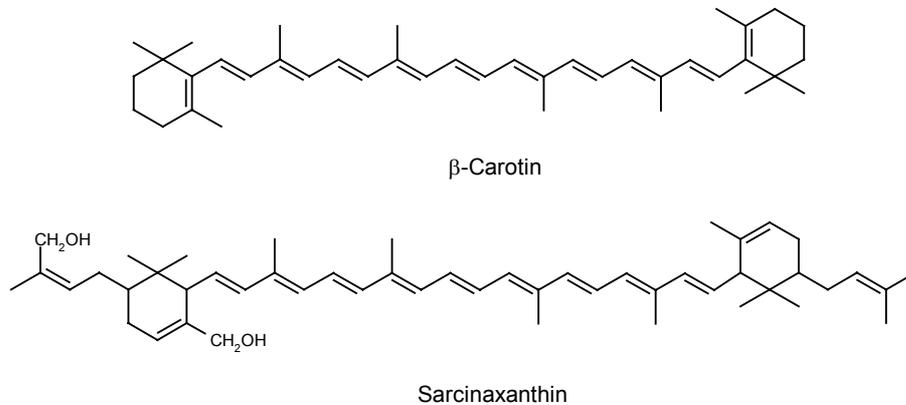


Abb. 8.1: Carotenoide in Bakterien.

Die Bakterien *Bacillus subtilis* sowie *Bacillus sphaericus* gehören zu den Gram-positiven, aeroben Stäbchen. Sie leben im Boden und haben die Fähigkeit, mehr oder weniger thermoresistente Endosporen zu bilden.

Als Pseudomonaten werden die polar begeißelten Gram-negativen Stäbchen bezeichnet, die keine Sporen bilden und aerob wachsen. Pseudomonaden sind aufgrund ihrer Anspruchslosigkeit überall zu finden (Boden, Wasser, Abwasser, Luft). *Pseudomonas fluorescens* ist eine weitverbreitete Wasser- und Bodenbakterie, die eine ungewöhnlich große Zahl an verschiedenen organischen Substanzen zu stoffwechseln vermag.

8.1.2 Pilze

Die Bezeichnung für Pilze leitet sich von ihren auffälligsten Vertretern, den Hutzpilzen ab. Sie sind Eukaryoten und besitzen wie die Pflanzen eine Zellwand und zell-saftgefüllten Vakuolen. Sie enthalten jedoch keine photosynthetischen Pigmente sondern sind chemoorganoheterotroph und wachsen unter aeroben Bedingungen. Die hier untersuchten Hefen gehören zu den Protoascomyceten (Sprosspilze). Sie vermehren sich typischerweise durch Zellsprossung, eine Querteilung (Spaltung) tritt selten auf. Die Hefe *Rhodotorula mucilaginosa* (rubra) zeichnet sich durch eine deutliche Rotfärbung aus, die durch β-Carotin hervorgerufen wird (s. Abb. 8.1).

8.2 Bestimmung von Mikroorganismen

Der erste Schritt zur konventionellen Identifizierung von Mikroorganismen besteht in der Anlage einer Reinkultur. Dafür muss eine Probe angezchtet und die erhaltenen Mikroorganismen müssen vereinzelt werden.

Für die weiteren Untersuchung werden vor allem Beschreibungen der Kolonie- und Zellmorphologie, sowie weitere physiologische Daten wie Nährstoffbedarf, Fermentationsprodukte und Pigmentbildung benötigt. Mit diesen Daten lässt sich der Phänotyp der Mikroorganismen bestimmen. Weitere notwendige Tests beruhen auf dem Wachstum und der Aktivität auf selektiven Medien sowie den Ergebnissen von diagnostischen Färbungen [289].

Die komplette Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen ist durch die Notwendigkeit zur Anlage von Reinkulturen sehr zeitaufwendig und dauert üblicherweise mehrere Tage. Da exotische Bakterien spezielle Umweltbedingungen benötigen ist ihre Anzucht noch zeitaufwendiger, als dies bei normalen Stämmen der Fall ist.

Eine andere Möglichkeit zur Identifizierung von Mikroorganismen stellen schwingungsspektroskopische Verfahren dar. Die Untersuchungen werden in allen Spektralbereichen durchgeführt, wobei zur Vermeidung von Fluoreszenz, Anregungswellenlängen im IR- bzw. UV-Bereich Anwendung finden.

Die Identifizierung von Mikroorganismen kann mittels der NIR- [26], der FT-IR- [22,26,122,290-293] und der FT-Raman-Spektroskopie [21,23,112] zusammen mit chemometrischen Methoden durchgeführt werden. Auch eine Kombination aus verschiedenen spektroskopischen Methoden (Massenspektrometrie, FT-IR- und Raman-Spektroskopie) in Kombination mit Neuronalen Netzen [285,294] ist bekannt.

Die Untersuchung von Bakterien im sichtbaren Spektralbereich dient z. B. zur Überwachung biotechnologischer Produktionen [24,25,295]. Da bei diesen Anregungswellenlängen aufgrund starker Fluoreszenz nur wenige Mikroorganismen untersucht werden können, ist es notwendig das Fluoreszenz-Problem zu umgehen. Dies geht durch die Verwendung von SERS. Dabei werden unterschiedliche Substrate wie Silber- und Gold-Kolloide [296] an die Zellen gebracht bzw. in den Zellen von

Bakterien dargestellt [111] oder die Mikroorganismen mit Silber beschichtet [297]. Algen bzw. photosynthetische Bakterien können mit der Resonanz-Raman-Spektroskopie [298-301] untersucht und detektiert werden. Dabei werden hauptsächlich Signale von Carotenoiden beobachtet, welche sich allerdings nur bedingt als Marker für die Identifizierung von Mikroorganismen verwenden lassen. Chlorophylle sind als Unterscheidungskriterium besser geeignet. Sie können aber nur bei tiefen Temperaturen (30 K) [302] erfasst werden.

Bei der Anwendung der UV-Raman-Spektroskopie an Bakterien [8,20,301,303-310] und Sporen [311,312] ist es möglich, durch resonante Anregung Informationen über Makromoleküle wie DNA, RNA oder Proteine zu erhalten. Dadurch erhält man direkte Informationen z. B. über das Verhältnis der DNA-Basen, die zur Identifizierung von Mikroorganismen verwendet werden können.

8.3 Mikro-Raman-Spektroskopie

In diesem Kapitel wird der Versuch gemacht, mit der Mikro-Raman-Spektroskopie eine schnelle Identifizierung geringer Mengen bzw. sogar einzelner Mikroorganismen zu finden. Dabei wird vor allem die minimale Probenpräparation sowie die einfache Durchführbarkeit der Methode hervorgehoben. Durch die Verwendung von Anregung im sichtbaren Spektral-Bereich lässt sich die gute räumliche Auflösung mit einer minimalen Probenbelastung verbinden.

8.3.1 Untersuchungen an Kolonien

Für die folgenden Untersuchungen werden die Mikroorganismen *M. luteus*, *B. subtilis* und *Ps. fluorescens* verwendet. Alle drei Stämme werden auf Standard-Agar kultiviert. Die Raman-spektroskopischen Untersuchungen finden ohne weitere Präparation an Mikrokolonien direkt auf den Kulturplatten statt. Vergleichsspektren zeigen, dass keines der Signale der Anzuchtmedien zu den registrierten Banden der Bakterien gehört (die Vergleichsspektren werden hier nicht gezeigt).

Die Spektren der Kultur von den Bakterien *M. luteus* bei verschiedenen Anregungswellenlängen sind in Abb. 8.2 zu sehen. Für die Spektren, die mit einer

Anregungswellenlänge von 514,5 nm aufgenommen wurden, wurde eine Integrationszeit von 3 s verwendet. Bei 633 bzw. 785 nm wurden Integrationszeiten von 30 s bzw. 120 s benötigt. Die relativen Intensitäten der Hauptbanden wechseln mit der Anregungswellenlänge. β -Carotin zeigt ein Absorptionsmaximum bei 450 nm, was die Resonanzverstärkung der Raman-Banden im Spektrum mit einer Laseranregung von 514,5 nm sowie die deutlich kürzere Messzeit erklärt. Allerdings sind die Hauptbanden von β -Carotin auch bei Anregungswellenlängen von 633 und 785 nm deutlich zu erkennen.

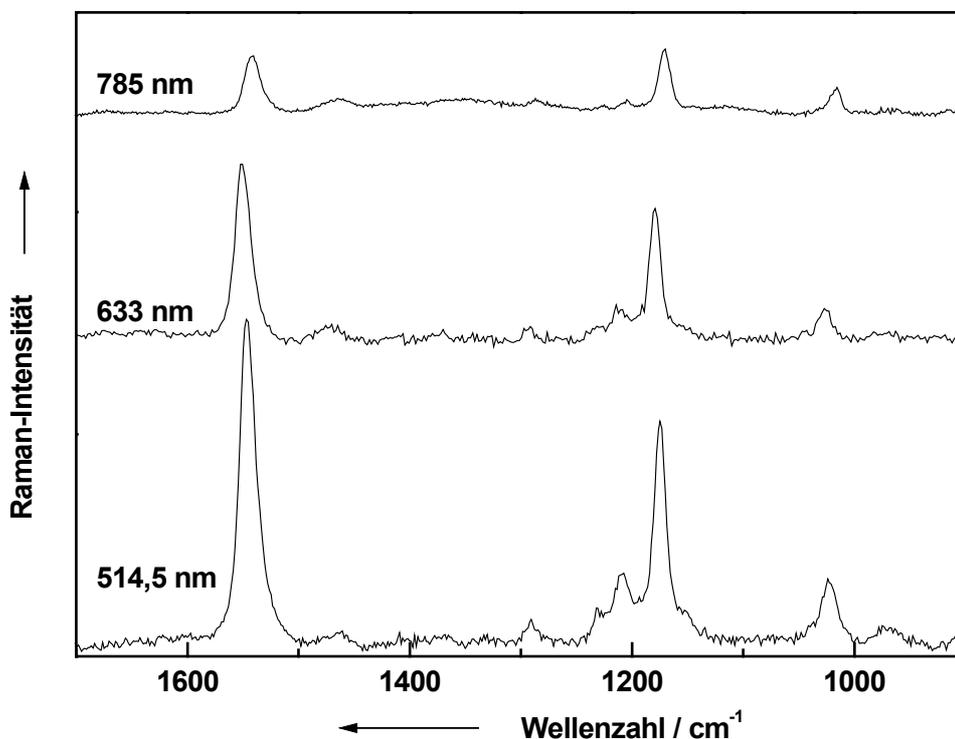


Abb. 8.2: Raman-Spektren einer *M. luteus*-Kolonie bei drei unterschiedlichen Anregungswellenlängen.

Kolonien nicht gefärbter Bakterien sind mit Anregungswellenlängen im sichtbaren Spektralbereich spektroskopisch nicht nachweisbar. Aus diesem Grund wurden Kolonien der Bakterien *M. luteus*, *B. subtilis* und *Ps. fluorescens* mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm untersucht (s. Abb. 8.3). Die Integrationszeiten betragen für die Kolonien von *M. luteus* und *B. subtilis* 120 s sowie für *Ps. fluorescens* 90 s. Die Spektren der drei Bakterien lassen sich eindeutig unterscheiden. Das Spektrum von

M. luteus (A) ist von β -Carotin-Banden dominiert; andere Banden sind nur mit geringer Intensität zu erkennen und deshalb nicht eindeutig zuzuordnen.

Die Mikro-Raman-Spektren des Bakteriums *B. subtilis* (B) zeigt ein eindeutiges Protein-Spektrum [225], während das Spektrum von *Ps. fluorescens* (C) hauptsächlich breite, nicht zu identifizierende Banden aufweist.

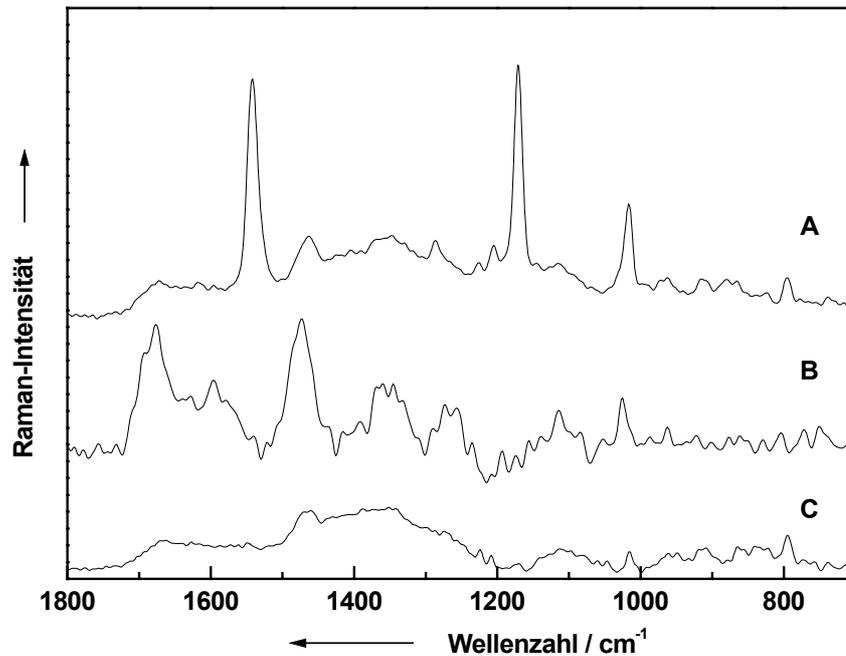


Abb. 8.3: Mikro-Raman-Spektroskopie von Kolonien verschiedener Mikroorganismen bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm. A: *M. luteus*, B: *B. subtilis*, C: *Ps. fluorescens*.

Die Spektren der drei Bakterienkolonien sind eindeutig unterscheidbar, allerdings kommt es bei allen drei Bakterienarten durch die Messung zu einer Zerstörung von Zellen. Nach der Messung ist bei allen untersuchten Kolonien, unabhängig von der verwendeten Anregungswellenlänge, eine Einbuchtung am Messort zu erkennen. Dies deutet entweder auf eine Verdampfung von Wasser oder eine Zerstörung der Bakterien an der Messstelle hin. Um zerstörungsfreie Messungen an Mikroorganismen durchführen zu können, wurden im Folgenden Spektren an Monolagen aufgenommen.

8.3.2 Raman-Mapping von Ausstrichen

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Mischung aus *R. mucilaginosa* (rubra) und *M. luteus* auf einem Objektträger ausgestrichen. Die resultierende Monolage aus Mikroorganismen wurde mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm untersucht. Die Messungen wurden mit einem konfokalen Element (Irisblende: 300 μm) durchgeführt, um den Einfluss des Glasuntergrunds zu minimieren und trotzdem relativ kurze Messzeiten zu gewährleisten.

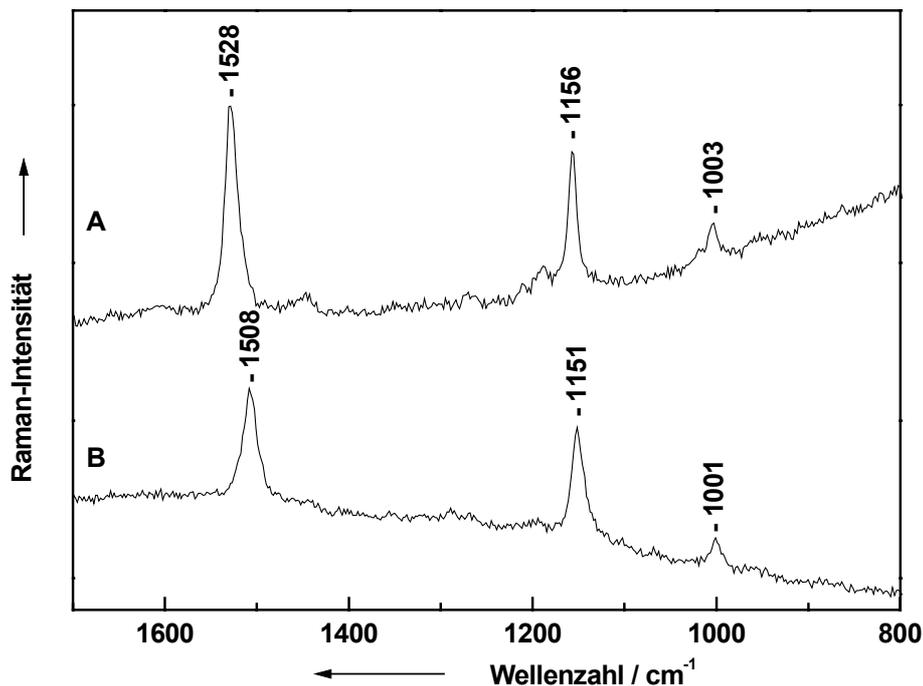


Abb. 8.4: Mikro-Raman-Spektren eines Ausstrichs von A: *M. luteus* und B: *R. mucilaginosa* (rubra).

In Abb. 8.4 sind die Mikro-Raman-Spektren von Kolonien der beiden Mikroorganismen bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm und einer Integrationszeit von 40 s gezeigt. Beide Mikroorganismen sind gefärbt. Die rote Farbe der Hefe *R. mucilaginosa* (rubra) (Spektrum B) rührt von β -Carotin her und die gelbe Farbe der Bakterie *M. luteus* (Spektrum A) von Sarcinaxanthin (s. Abb. 8.1).

Die Spektren der Pigmente β -Carotin und Sarcinaxanthin unterscheiden sich hauptsächlich in der symmetrischen Streckschwingung der C=C-Doppelbindung von 1528 bzw. 1508 cm^{-1} . Die symmetrische Streckschwingung der C-C-Einfachbindung

bei 1156 bzw. 1151 cm^{-1} sowie die C-C-Streckschwingung der C-CH₃-Gruppe bei 1003 bzw. 1001 cm^{-1} sind nur geringfügig verschieden, so dass sie sich als Markerbanden nur bedingt eignen.

In Abb. 8.5 ist eine mikroskopische Aufnahme von einem Ausstrich von *M. luteus* und *R. mucilaginosa* (rubra) dargestellt. Die Bakterien *M. luteus* haben kugelförmige Form, während die Hefe *R. mucilaginosa* (rubra) als eine fadenförmige Aneinanderreihung von Zellen zu erkennen ist. Für das Raman-Mapping wurde die mit einem weißen Rechteck gekennzeichnete Fläche von $22 \times 20\text{ }\mu\text{m}^2$ gewählt und mit Hilfe eines steuerbaren xy-Tisches angefahren. Da die laterale Dimension des Laserstrahls ca. $1\text{ }\mu\text{m}$ beträgt, wurde eine Schrittweite von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ gewählt um den Bereich vollständig abuscannen. Bei einer Integrationszeit von 30 s pro Messpunkt führt dies zu einer Gesamtmesszeit von ca. 14 Stunden .

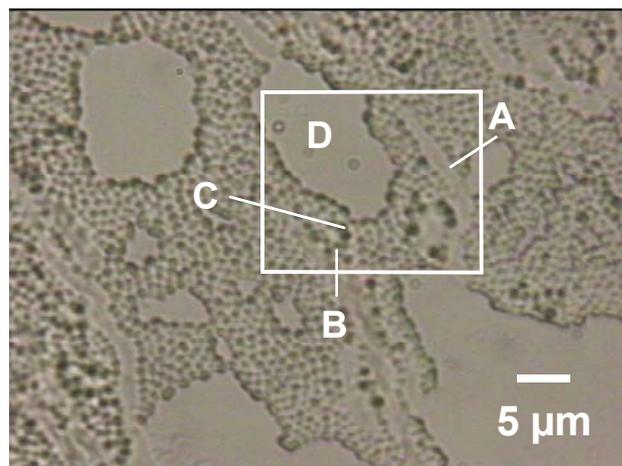


Abb. 8.5: Mikroskopische Aufnahme eines Ausstrichs auf einer Glasoberfläche mit *M. luteus* und *R. mucilaginosa* (rubra). A-D bezeichnet verschiedene Messpunkte auf der Probe.

Die typischen Raman-Spektren aus diesem Bereich sind in Abb. 8.6 zu sehen. Dabei handelt es sich um die Spektren der Punkte, die in Abb. 8.5 markiert sind. Spektrum A ist ein typisches Spektrum des β -Carotins der Hefe *R. mucilaginosa* (rubra) und Spektrum C, das des Sarcinaxanthins der Bakterien *M. luteus*. Spektrum B ist das Spektrum eines Messpunktes, an dem sowohl Signale von *M. luteus* als auch von *R. mucilaginosa* (rubra) vorliegen. Die Banden der C=C-Doppelbindung der beiden Carotenoide können deutlich unterschieden werden, während sowohl die C-C-

Einfachbindung wie auch die C-CH₃-Bande hier nur schwer zu unterscheiden sind. Spektrum D ist ein typisches Glas-Spektrum des Objektträgers.

Für die Erstellung der Falschfarbenplots werden die mittleren Intensitäten der ausgewählten Bereiche für jeden Scanpunkt berechnet (s. Abb. 8.7). Die Intensitäten werden als Helligkeitsstufen dargestellt, wobei gilt: je heller die Farbe ist, desto intensiver ist die Bande. Bei der Erstellung der Falschfarbenplots ist es möglich, die Bande so zu berechnen, wie sie spektroskopiert wurde oder eine einfache Basislinienkorrektur in dem gekennzeichneten Bereich durchzuführen.

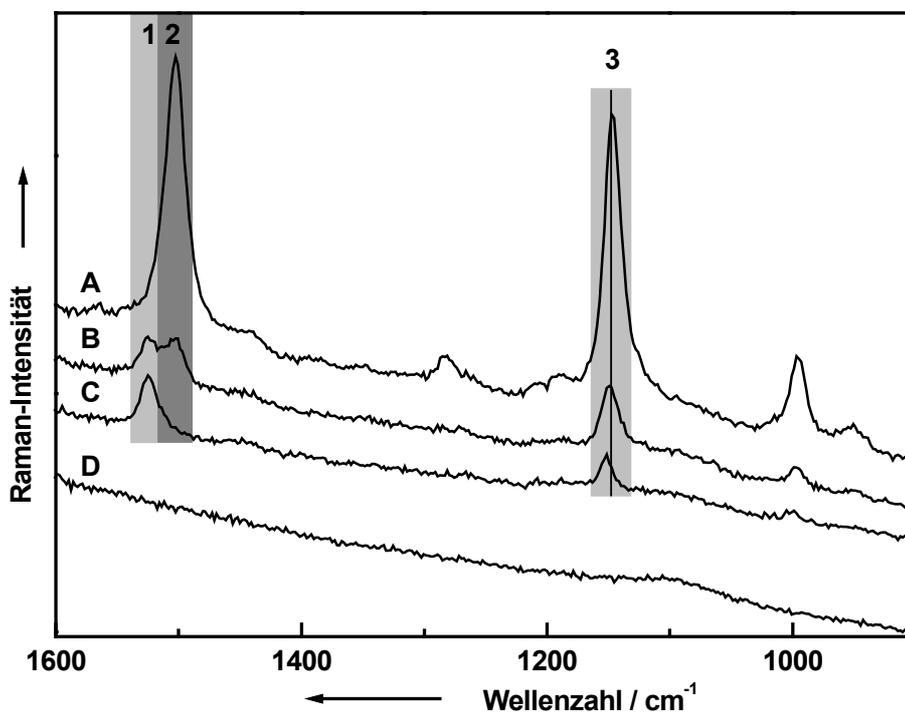


Abb. 8.6: Spektren von vier verschiedenen Punkten innerhalb des bezeichneten Scan-Bereichs mit den markierten Banden für die Falschfarbenplots (s. Abb. 8.7). A: *R. mucilaginosa* (rubra), B: beide Mikroorganismen werden gleichzeitig erfasst, C: *M. luteus*, D: Glasuntergrund.

Als Banden wurden die in Abb. 8.6 gekennzeichneten Bereiche gewählt. Der Bande (1) ist der C=C-Bande von Sarcinaxanthin zuzuordnen. Die C=C-Bande von β -Carotin wird als Bande (2) gekennzeichnet. Da die C-C-Banden der beiden Pigmente zu nahe zusammen liegen, um sie spektral auflösen zu können, wird dieser Bereich als (3) gekennzeichnet.

In Abb. 8.7 werden die berechneten Falschfarbenplots in dem gewählten Scanbereich dargestellt. Im Plot A ist die Verteilung der Bande (1) und somit des Bakteriums *M. luteus* zu erkennen. Da diese Bande die geringste Intensität besitzt, ist eine Basislinienkorrektur für die Berechnung der Intensitätsverteilung notwendig. Die Basislinien wird Programm-bedingt nicht über das gesamte Spektrum sondern nur als Gerade zwischen den beiden gesetzten Grenzen berechnet. Im Vergleich zu Abb. 8.5 sieht man deutlich, dass die hellen Bereiche genau mit den Bereichen korrelieren, in denen die Bakterien *M. luteus* zu sehen sind. Die tief dunklen Bereiche gehören zu den Hefen *R. mucilaginosa* (rubra). In Plot B ist die inverse Situation zu Plot A dargestellt. Hier wird die Intensität mittels Bande (2) ohne Basislinienkorrektur berechnet, wodurch die hellen Bereiche der Hefe *R. mucilaginosa* (rubra) dargestellt werden.

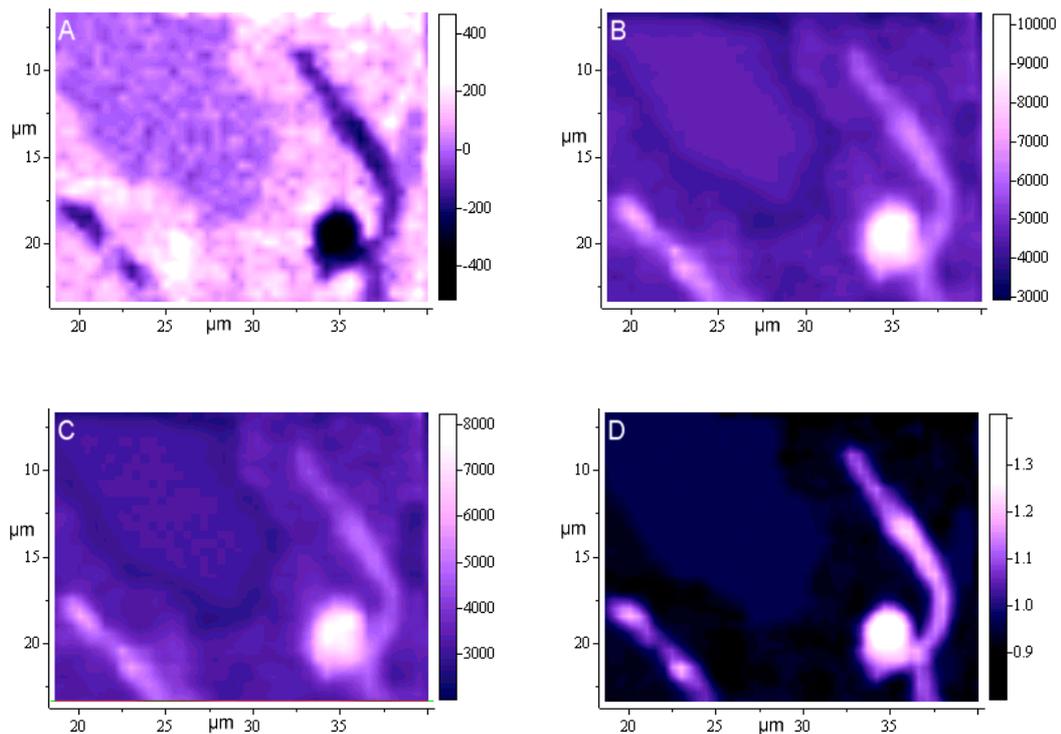


Abb. 8.7: Falschfarbenplots der Oberfläche von verschiedenen Banden (s. Abb. 8.7) A: 1524 cm^{-1} mit Basislinienkorrektur (1), B: 1502 cm^{-1} (2), C: 1150 cm^{-1} (3), D: $1502\text{ cm}^{-1}/1524\text{ cm}^{-1}$ (2/1).

In Plot C wird die Verteilung der C-C-Bande beider Carotenoide ohne Basislinienkorrektur dargestellt. Durch die Intensitätsunterschiede zwischen β -Carotin und

Sarcinaxanthin sind die hellsten Bereiche den Hefen und die Bereiche mittlerer Intensität den Bakterien zuzuordnen. Die dunklen Bereiche gehören zum Glasuntergrund. In Plot D wird das Verhältnis der beiden C=C-Doppelbindungen (2)/(1) der Carotenoide zueinander dargestellt. Dabei wird die Lokalisierung der Hefe in Form heller Bereiche wiedergegeben, während die Bakterien den dunklen Bereiche entsprechen. Die Bereiche mittlerer Intensität können dem Glasuntergrund zugeordnet werden.

Die Untersuchungen mit Hilfe der Raman-Mapping-Technik sind hervorragend geeignet, um heterogene Proben zu untersuchen. Die verwendeten Organismen sollten aber ein ausreichend starkes Raman-Signal aufweisen, weil sonst aufgrund der zu langen Gesamtmesszeit die Messung nicht mehr durchführbar ist. Eine Möglichkeit die Messungen weniger zeitintensiv zu gestalten, wäre die Verwendung von Raman-Imaging, da in diesem Fall der komplette Untersuchungs-Bereich auf einmal gescannt werden kann. Für die Unterscheidung nicht kolorierter Mikroorganismen wird aus diesem Grund im folgenden Kapitel eine andere Methode vorgestellt.

8.3.3 Untersuchungen von Einzelorganismen

Zur Untersuchungen von kleinen Mengen an Mikroorganismen in Form eines Agglomerats einiger weniger Zellen bzw. einzelner Mikroorganismen wird die konfokale Mikro-Raman-Spektroskopie benötigt. Bei dieser Methode kann man neben der axialen Auflösung im sub- μm -Bereich, ein laterales Einengen des Fokusbereichs erzielen, um die Signale des Untergrunds zu unterdrücken. Die Messungen werden als Ausstrich von Bakterien auf CsI-Platten durchgeführt, um den Fluoreszenzuntergrund von Glas bei sichtbaren Wellenlängen auszuschließen.

Die in Abb. 8.8 dargestellten Spektren wurden an den nicht kolorierten Bakterien *B. subtilis* und *B. sphaericus* durchgeführt. Für die Messungen wurde eine Anregungswellenlänge von 633 nm, mit einer Laserleistung von 1 mW an der Probe, einer Lochblende von 300 μm im Detektionsstrahlengang und einer Integrationszeit von 3600 s verwendet.

In Spektrum A der Bakterien *B. subtilis* ist neben der CH₂-Deformationsbande bei 1449 cm⁻¹ keine weiter identifizierbare Bande zu erkennen. In Spektrum B von *B. sphaericus* ist ein eindeutiges Proteinspektrum mit der Amid I Bande bei 1660 cm⁻¹ sowie CH₂-Scherenschwingungen bei 1445 cm⁻¹ und einer aromatischen Ringatmungsschwingung bei 1002 cm⁻¹ zu erkennen.

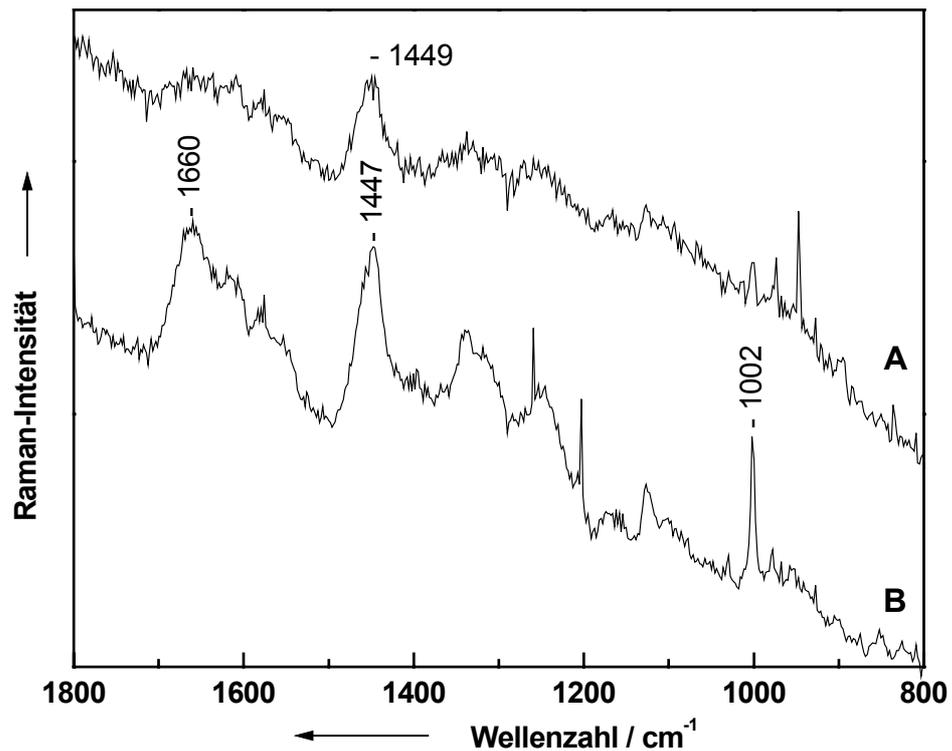


Abb. 8.8: Mikro-Raman-Spektren von einzelnen Bakterien auf CsI-Platten (A: *B. subtilis* und B: *B. sphaericus*).

8.4 SERS-Sonde

Um einzelne Mikroorganismen mit einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm messen zu können, werden extrem geringe Laserleistungen benötigt, da diese sonst photochemisch bzw. photothermisch zersetzt werden. Bei kolorierten Mikroorganismen ist durch die Resonanz-Anregung die Gefahr einer Zerstörung sogar noch größer. Bei Mikro-Raman-Untersuchungen mit einer Laserleistung von 1-50 mW auf der Probe ist es nicht möglich, einen Ausstrich auf einer Oberfläche zu detektieren, da

dieser durch den Laser vollständig zerstört wird. Deshalb wird auf eine SERS-Sonde zurückgegriffen [74]. Die SERS-Sonde besteht aus einer geätzten und mit einer dünnen Silberschicht bedampften Glasfaserspitze. Das verwendete Laserlicht wird in die Glasfaser eingekoppelt, was zu einer guten räumlichen Auflösung führt. Durch die Verwendung eines dünnen Silberfilms kann eine Signalverstärkung durch die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) realisiert werden. Gleichzeitig ist es möglich, die Laserleistung zu minimieren.

In Abb. 8.9-A ist ein Ausstrich von *R. mucilaginosa* (rubra) nach einem Raman-Mappings zu sehen (50 mW Laserleistung an der Probe, Laserdurchmesser ca. 1 μm , $1,6 \cdot 10^6 \text{ W/cm}^2$). Durch die Messung mit einem stark fokussierten Laserstrahl wurden die Zellen selbst bei geringen Laserleistungen zerstört. Es wurde eine Integrationszeit von 10 s pro Spektrum mit einer Laserleistung von 50 mW auf der Probe verwendet. Bei geringer Laserleistung ist zwar kein optischer Schaden zu erkennen, aber auch unter diesen Umständen ist es nicht möglich Raman-Signale zu detektieren.

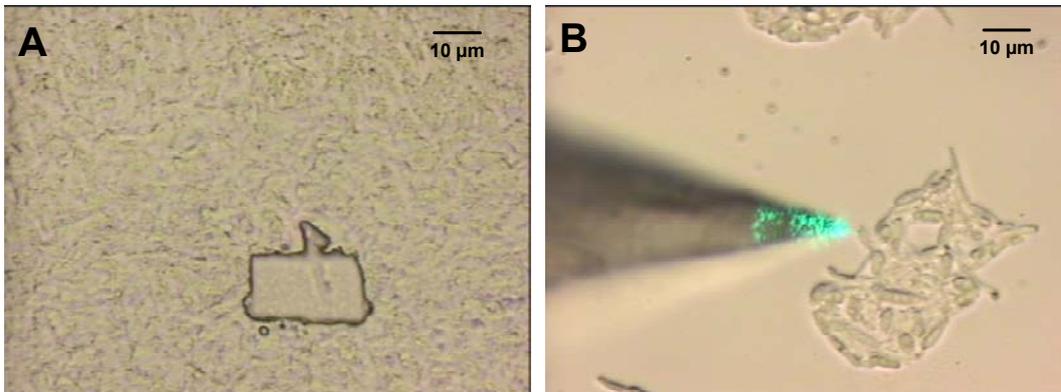


Abb. 8.9: A: Zerstörung eines Ausstrichs der Hefen *R. mucilaginosa* (rubra) durch den anregenden Laserstrahl; B: Messung an wenigen Hefezellen mit der SERS-Spitze.

In Abb. 8.9-B wird eine SERS-Sonde für die Messung an nur wenigen Hefezellen verwendet. Die Laserleistung an der Probe beträgt 0,2 mW. Eine Zerstörung der Probe kann hier erst nach längerer Integrationszeit ($t > 60 \text{ s}$) beobachtet werden. In diesen Fällen ist es trotz der Zerstörung der Probe noch möglich ein Spektrum aufzunehmen.

In Abb. 8.10 wird die Anregung über eine Faserspitze mit der konventionellen Mikro-Raman-Spektroskopie bei einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm verglichen. In

Abb. 8.10-B ist das Spektrum einer Kolonie von *R. mucilaginosa* (rubra) zu sehen. Die Integrationszeit beträgt 1 s und die Laserleistung 50 mW auf der Probe. Bereits nach dieser kurzen Messzeit sind deutliche Zerstörungsspuren an der Probe zu beobachten. Wie bereits erwähnt ist es nicht möglich einzelne Mikroorganismen mit diesem Aufbau zu messen. Deshalb wird in Spektrum A das Laserlicht über die Glasfaserspitze auf die Probe gebracht. Das Spektrum wurde an wenigen Hefezellen mit einer Integrationszeit von 20 s detektiert. Da die Anregung nicht über einen 180° Winkel erfolgt, wurde die Irisblende auf $500 \mu\text{m}$ gestellt, um Hintergrundeffekte zu minimieren. Die Laserleistung an der Probe beträgt $0,2 \text{ mW}$. Spektrum A hat nicht die gleiche Qualität wie Spektrum B, allerdings ist sowohl die Laserleistung an der Probe wie auch die Probenmenge in Vergleich zu Spektrum B minimal.

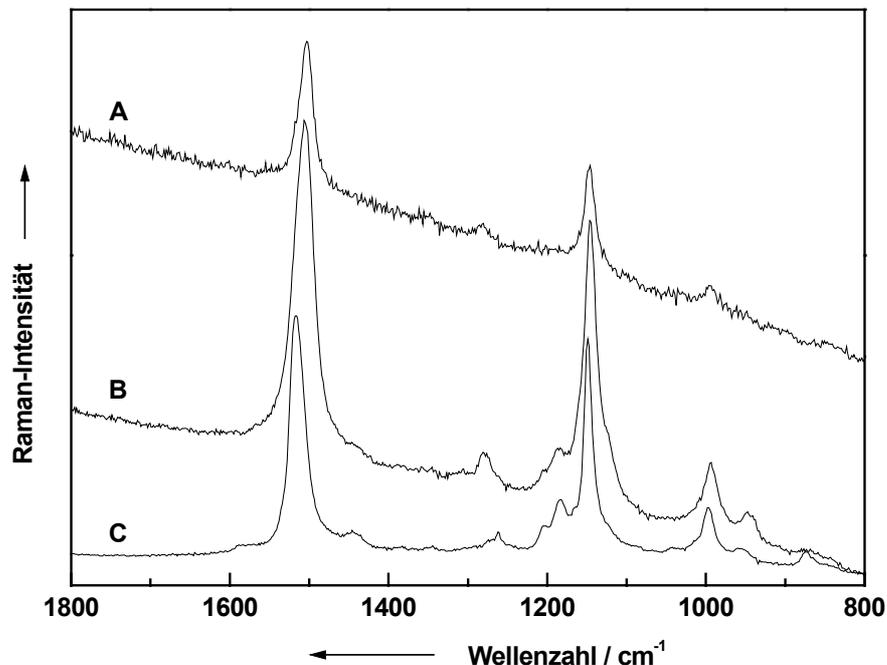


Abb. 8.10: Raman-Spektren von *R. mucilaginosa* (rubra), A: Spektrum einer SERS-Sonde an wenigen Einzelzellen, B: Mikro-Raman-Spektrum einer Kolonie auf der Anzuchtplatte, C: Vergleichsspektrum von β -Carotin in Ethanol.

In Abb. 8.10-C ist das Spektrum von β -Carotin in Ethanol zu sehen. Man kann deutlich erkennen, dass eine gute Übereinstimmung zwischen den Spektren besteht. Allerdings wird die Bande der C=C-Doppelbindung des gelösten β -Carotins bei

größeren Wellenzahlen detektiert als die Banden des β -Carotins in der Hefe. Die Bande der C-C-Einfachbindung ist hingegen nahezu unverändert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die β -Carotin-Spektren in zwei unterschiedlichen chemischen Umgebungen aufgenommen wurden: Zum einen im Lösungsmittel Ethanol, zum anderen in einer Proteinmatrix. In der Literatur wird beschrieben, dass es unter diesen Umständen zu einer Verschiebung vor allem der ν_1 -Mode (C=C-Doppelbindung) nach kleineren Wellenzahlen kommt [162-164,313-317]. Solche spektralen Verschiebungen werden auf Konformationsänderungen der Carotenoid-Struktur durch die Protein-Matrix zurückgeführt.

8.5 Tip enhanced Raman spectroscopy (TERS)

TERS (*tip enhanced Raman spectroscopy*) steht für eine Modifikation der SERS-Spektroskopie. Es handelt sich dabei um eine Kombination eines AFMs (*atomic force microscope*) mit einem inversen Mikro-Raman-Setup. Für diese Methode wird das SERS-aktive Substrat auf einer AFM-Spitze platziert. Diese Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit V. Decker in der Gruppe um R. Zenobi an der ETH Zürich durchgeführt [39,40,148,318-323].

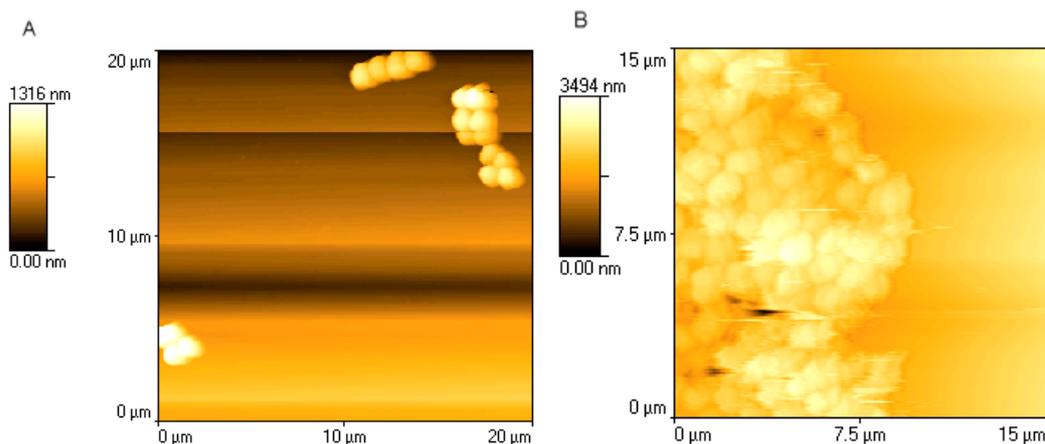


Abb. 8.11: AFM Aufnahmen einer Monolage von *M. luteus*; Topographie: A: *drop coating*; B: *spin coating*.

Für diese Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Probenpräparationen angewendet. Es wurde jeweils eine Probe der Mikroorganismen in destilliertem Wasser vereinzelt. Einmal wurde diese Suspension direkt auf den Glasuntergrund aufgetragen und das Wasser verdunsten lassen (*drop coating*). Bei dieser Methode werden vereinzelt Agglomerate von wenigen Mikroorganismen erzeugt (s. Abb. 8.11-A). Bei der zweiten Methode wurde die Suspension mittels schneller Rotation auf dem Glasuntergrund verteilt (*spin coating*). Hierbei wird ein größeres Agglomerat von ca. 50 μm gebildet (s. Abb. 8.11-B). Man kann in den AFM-Aufnahmen deutlich erkennen, dass es sich bei der Probe A um isolierte einzelne Bakterien von *M. luteus* handelt. Das Höhenprofil zeigt eine maximale Höhe von 1,3 μm . Dies entspricht ungefähr der Dimension der Bakterien.

In Abb. 8.11-B ist das AFM-Bild einer Probe zu sehen, die durch *spin coating* entstanden ist. Man erkennt in der Abbildung deutlich die einzelnen Bakterien innerhalb eines Agglomerats einiger hundert Bakterien. In diesem Fall handelt es sich nicht um eine Monolage, was an der Höhenanzeige von ca. 3,5 μm zu erkennen ist. Dies deutet darauf hin, dass an einigen Stellen drei Bakterienlagen übereinander liegen.

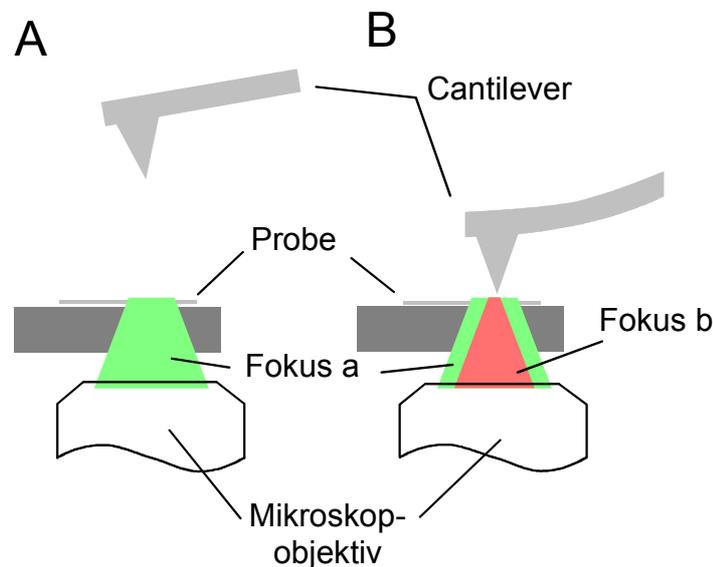


Abb. 8.12: Unterschiedliche Stellung des Cantilevers mit den jeweiligen Erfassungsbereichen; A: Cantilever „oben“ B: Cantilever „unten“.

In Abb. 8.12 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Bild A beschreibt die Situation mit herausgenommenem Cantilever, was im Wesentlichen einem konventionellen Mikro-Raman-Setup mit einem inversen Aufbau entspricht. Das Laserlicht wird von unten auf die Probe fokussiert, wobei sich der Fokusbereich (Fokus a) durch die verwendete Wellenlänge und das Mikroskopobjektiv definiert. In Bild B befindet sich der Cantilever in der Nähe der Probe. Der Cantilever besitzt eine Silberbeschichtete Glasfaser Spitze, die als SERS-Substrat verwendet wird. Durch die Geometrie der Spitze wird nur der äußerste Rand vom Laser beleuchtet, was in diesem Bereich (Fokus b) zu einem Verstärkungseffekt führt. Dadurch wird der effektive Messbereich in diesem Fall ausschließlich durch die Geometrie des Cantilevers bestimmt.

Die Raman-Spektren in Abb. 8.13 sind an einer zusammenhängenden Schicht von *M. luteus* an einer Stelle durchgeführt worden, an der eine Monolage vorliegt. Beide Spektren sind stark verrauscht und weisen einen deutlichen Fluoreszenzuntergrund auf, allerdings sind in beiden Spektren die Hauptbanden von Sacinaxanthin zu erkennen. In Spektrum A ist die Aufnahme von *M. luteus* mit herausgenommenem Cantilever zu sehen. Sowohl die C=C-Doppelbindungsbande bei 1516 cm^{-1} als auch die C-C-Einfachbindungsbande bei 1168 cm^{-1} sind nur im Ansatz zu erkennen. Durch die Anregungswellenlänge von 488 nm ergibt sich ein Erfassungsbereich von ca. $1\text{ }\mu\text{m}$.

Nach der Aufnahme von Spektrum A wird der Cantilever an die Probe herangeführt, um Spektrum B aufzunehmen. Der Cantilever ist so konstruiert, dass die SERS-aktive Zone im optimalen Fall an der Spitze auf ein einziges Silberpartikel reduziert wird, dass zu einer optimalen Verstärkung in einem sehr begrenzten Raum führt. Das Spektrum zeigt ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis als Spektrum B. Durch den minimalen Erfassungsbereich von ca. 70 nm erhält man ein Spektrum von einem kleinen Bereich einer einzelnen Bakteriums.

In Abb. 8.13 ist Spektrum B ca. dreimal intensiver als Spektrum A. Mit dem unterschiedlichen Erfassungsbereich von 1 bzw. $0,07\text{ }\mu\text{m}$ ergibt sich somit eine 43-fache Verstärkung der Signale.

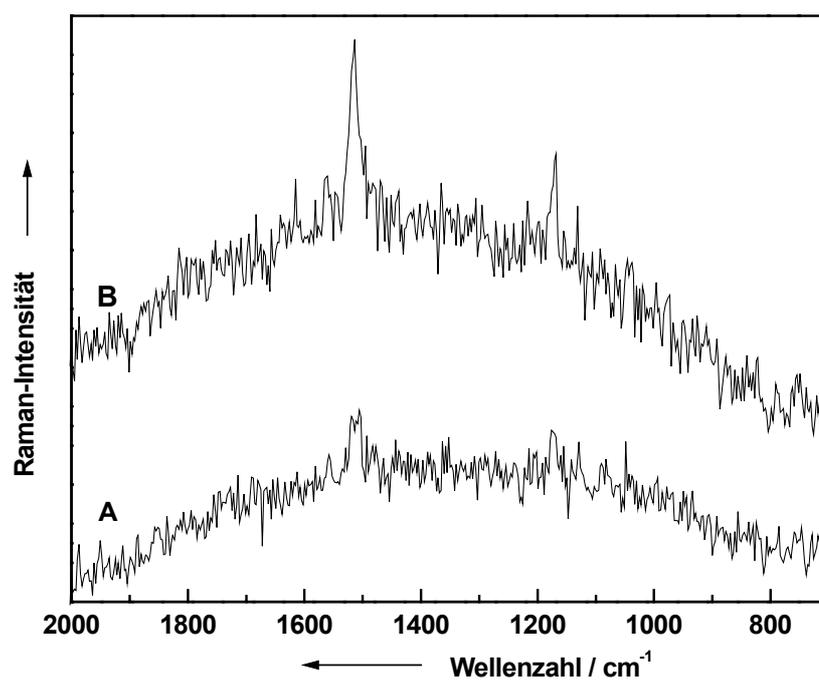


Abb. 8.13: TERS-Spektren an *M. luteus*. A: Cantilever „oben“ B: Cantilever „unten“.

9 Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden Pflanzen, Pflanzengewebe, Pflanzenzellen und Mikroorganismen spektroskopisch untersucht und ihre Inhaltsstoffe unter minimaler Probenpräparation im biologischen Gewebe direkt lokalisiert und identifiziert. Unter den verfügbaren Schwingungs-spektroskopischen Methoden ist die Mikro-Raman-Spektroskopie für diese Fragestellungen besonders gut geeignet. Wasser beispielsweise zeigt in der Infrarot-Spektroskopie starke Absorptionen, wogegen es in der Raman-Spektroskopie die Spektren weit weniger beeinflusst, da Wasser ein schlechter Raman-Streuer ist. Daher kann mit Raman-spektroskopischen Methoden auch in stark wasserhaltigem Gewebe gemessen werden. Weiterhin erhält man mit der Mikro-Raman-Spektroskopie eine gute räumliche Auflösung im sub- μm -Bereich, wodurch es möglich, ist heterogene Proben zu untersuchen. Darüber hinaus kann die Mikro-Raman-Spektroskopie mit anderen Methoden, wie z. B. der SERS-Spektroskopie, kombiniert werden.

In pflanzlichen Zellen liegt eine Vielzahl von Substanzen in geringen Konzentrationen vor. Aufgrund der niedrigen Quantenausbeute des Raman-Effekts treten vor allem Substanzen, die eine Resonanz-Verstärkung erfahren, in den Spektren hervor. Diese Substanzen, wie z. B. β -Carotin, können deshalb in geringen Konzentrationen detektiert werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Untersuchung von Sekundär-Metaboliten wie Alkaloiden, Lipiden oder Terpenen, die in der Pflanze agglomerieren.

Zunächst wurden unterschiedliche Inhaltsstoffe in Tabak identifiziert. Mit der Mikro-SERS-spektroskopischen Untersuchung verschiedener Tabak-Arten (*N. tabakum* und *N. rustica*) wurden unterschiedliche Gewebetypen in Schnitten der Stängel und der Blattstiele analysiert. Das SERS-Substrat wurde dabei über zwei unterschiedliche Methoden in das Gewebe der Pflanze gebracht. Zum einen wurden die Schnitte für mehrere Minuten in aktiviertes Silber-Kolloid eingelegt und zum anderen werden

entweder die Pflanzen oder ausgewählte Teile davon in eine Silberkolloid-Lösung gestellt.

Nicotin kann in verschiedenen Gewebetypen in den Pflanzenschnitten nachgewiesen werden. Dabei dient die Ring-Atmungsschwingung des Pyridin-Rings bei 1033 cm^{-1} als Markerbande. Diese SERS-Bande tritt je nach Konzentration des Alkaloids im Gewebe mit unterschiedlicher Intensität auf. Allerdings muss bei einigen Spektren von einer beginnenden Zersetzung des Gewebes aufgrund der breiten Banden im Bereich von 1200 bis 1600 cm^{-1} ausgegangen werden.

Neben dem Nicotin können in Tabak-Pflanzen noch weitere Inhaltsstoffe identifiziert werden. Im grünen Rindenbereich findet sich vor allem das Tetraterpen β -Carotin. In älteren Tabak-Pflanzen beobachtet man das Auftreten von Kristallsand. Durch Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchungen können die Kristalle dem Calciumoxalat Monohydrat zugeordnet werden. Auch in anderen Pflanzen, wie der Efeutute und im Rhabarber, können Kristalle in Form von Raphidienbündel (Nadeln) bzw. Drusen gefunden werden, die sich ebenfalls dem Calciumoxalat Monohydrat zuordnen lassen.

In der Efeutute findet man neben den Kristalleinschlüssen auch Granula (Speicherstoffe). Durch Vergleich der Mikro-Raman-Spektren der Granula mit denen von reiner Stärke und ähnlicher Substanzen, können sie eindeutig als Stärke identifiziert werden.

Die Mikro-Raman-Spektren können auch zur Charakterisierung von Öltröpfchen im Xylem verschiedener Pflanzen herangezogen werden. Zunächst wurden Öltröpfchen in der Auferstehungspflanze *Myrothamnus flabellifolia* analysiert. Bei 1742 cm^{-1} kann die C=O-Bande eines Esters beobachtet werden. Aufgrund der vorliegenden biologischen Informationen kann man darauf schließen, dass es sich um ein Phospholipid handelt. Die auftretenden C=C-Doppelbindungsbanden deuten auf ein ungesättigtes System hin. Da allerdings die =CH-*in-plane*-Deformationsbande nur eine geringe Intensität aufweist, handelt es sich nicht um ein ungesättigtes Phospholipid. Die C=C-Doppelbindungen wurden einer zweiten unbekannt Komponente zugeordnet. Aufgrund der schlechten Qualität des Spektrums ist es nicht möglich, die Signale einem speziellen Phospholipid zuzuordnen.

Bei der Untersuchung von Xylemschnitten der Pappel kann im Spektrum der Zellwand Lignin und Cellulose identifiziert werden. Die Spektren der Öltröpfchen von Pappel und Weide können einem ungesättigten Phospholipid zugeordnet werden. Da die Phosphat-Banden sehr schwach sind, können sie nicht eindeutig identifiziert und somit auch keiner Kopfgruppe zugeordnet werden. Anhand der Spektren von mehreren Fettsäuren und ungesättigten Phospholipiden wurden die Zuordnungen der Banden diskutiert. Für die ungesättigten Phospholipide wurden exemplarisch Phosphocholine verwendet. Das Intensitätsverhältnis der CH_2 -Torsionsbande zu der $=\text{C-H-in-plane}$ -Deformationsbande wurde durch Auftragung zum Verhältnis der CH_2 - zu den $=\text{C-H}$ -Gruppen im Fettsäureanteil der Phospholipide dazu verwendet, den Sättigungsgrad der Moleküle zu bestimmen. Für die Weide erhält man dabei ein Verhältnis der Kohlenstoffatome zu der Anzahl von Doppelbindungen im Fettsäureanteil von 34:4 und für Pappel von 38:4. Anhand der Raman-Spektren kann nur der Anteil der Doppelbindungen, nicht aber die einzelnen, tatsächlich vorkommenden Fettsäuren bestimmt werden.

Bei der Mikro-Raman-spektroskopischen Untersuchung der Linde wird neben den Xylemschnitten auch isolierter Xylemsaft vermessen. Im Raman-Spektrum der Zellwand können neben Lignin und Cellulose auch Banden von Lipiden identifiziert werden. Dies kann darauf hindeuten, dass Öltröpfchen bei der Präparation über die Zellwand verschmiert wurden. Die Mikro-Raman-Spektren der Öltröpfchen im Xylemschnitt und im isolierten Xylemsaft zeigen beide charakteristische Signale ungesättigter Phospholipide, allerdings weichen sie leicht voneinander ab. Dies könnte auf eine Veränderung der Probe bei der Herstellung des Xylemsaft hindeuten. Der Sättigungsgrad der Phospholipide ist mit 40:3 bzw. 28:2 für den Xylemsaft und 44:3 bzw. 30:2 für den Xylemschnitt, abweichend von den Verhältnissen in Pappel und Weide. Zusätzlich zu den Signalen des Phospholipids ist noch eine weitere Bande in den Spektren der Linde zu erkennen, die noch nicht eindeutig zugeordnet werden kann.

Um zu klären, ob das Lipid nur in den Öltröpfchen oder auch im restlichen Bereich des Xylems auftritt, wurde mittels der Raman-Mapping-Technik ein Falschfarbenplot der Probe angefertigt. Durch die Verwendung geeigneter Markerbanden konnte

gezeigt werden, dass Lipid nur im Bereich der Öltröpfchen und nicht in der Zellwand gefunden wird.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Charakterisierung von ätherischen Ölen von Lamiaceen und Citrus-Früchten direkt an ihrem Entstehungsort, den Drüenschuppen bzw. lysigenen Ölbehältern. Die Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchung von ätherischen Ölen in Lamiaceen zeigt einen hohen Fluoreszenz-Untergrund und ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Aus diesem Grund wurden die Stängelquerschnitte mit Silber-Kolloid präpariert. Dies führte zu einer Fluoreszenz-Quenchung und einer besseren Qualität der Spektren.

Durch Vergleich mit Raman-Spektren der Reinsubstanzen konnten die Raman-Spektren der isolierten ätherischen Öle von Thymian und Oregano als Gemische aus p-Cymol, Carvacrol und Thymol in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen identifiziert werden. Das Mikro-Raman-Spektrum einer Drüenschuppe von Thymian weist neben Signalen des Gewebes nur Banden von Thymol auf, die anderen Substanzen konnten hier nicht nachgewiesen werden.

Für die weiteren Untersuchungen wurden wegen ihrer größeren marktwirtschaftlichen Bedeutung Minzen verwendet. Bei der Raman-spektroskopischen Charakterisierung der ätherischen Öle in den Drüenschuppen verschiedener Minz-Taxa, wie Ährenminze (*M. spicata* L. ssp. *spicata*), Krauseminze (*M. spicata* L. ssp. *crispata*), Bergamott-Minze (*M. × piperita* L. nm. *citrata*) sowie Pfefferminzen *M. × piperita* L. var. *pip. pallescens* *pallescens* und *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*) konnten die Hauptinhaltsstoffe der ätherischen Öle identifiziert und die Ergebnisse mit denen einer gaschromatographischen Analyse verglichen werden.

Beim Vergleich der Spektren aus den Drüenschuppen mit denen der Reinsubstanzen fällt auf, dass nicht alle Banden durch die Inhaltsstoffe der ätherischen Öle erklärt werden können. Es wird angenommen, dass diese Banden von der Cuticula der Minzen herrühren. Da bei den Untersuchungen Silber-Kolloide zur Fluoreszenz-Quenchung verwendet wurden, sollten sich die Metallpartikel an der Außenseite der Drüenschuppe anlagern und zu einer SERS-Verstärkung der Signale aus dem

Cuticula-Wachs führen. Ähnliche Spektren werden in der Literatur von isolierten Wachsen von Palmen berichtet. Das Raman-Spektrum des isolierten ätherischen Öls zeigt die unbekanntenen Banden nicht. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Schritt die Cuticula der Minze isoliert. Die Mikro-Raman-Spektren der isolierten Cuticula, deuten auf einen heterogenen Aufbau der Cuticula hin. Es können nur sehr breite unstrukturierte Banden gefunden werden, die in der Position aber nicht in der relativen Intensität mit denen der gesuchten Banden in den Spektren der Drüsen-schuppen übereinstimmen. Diese Abweichung kann zum Teil mit dem aggressiven Isolationsverfahren der Cuticula erklärt werden.

Die Inhaltsstoffe und ihre Konzentrationen in den ätherischen Ölen können durch verschiedene Umwelteinflüsse verändert werden. Dabei spielen die allgemeinen Anbaubedingungen der Pflanzen eine ausschlaggebende Rolle. Um diese Bedingungen selektiv zu untersuchen, wurden drei verschiedene Minzen je einmal im Freiland und einmal in Sterilkultur kultiviert.

Die Raman-Spektren zeigen erhebliche Differenzen in den Inhaltsstoffen der unterschiedlich kultivierten Minzen. Beim Mikro-Raman-Spektrum der in Sterilkultur gezogenen Bergamott-Minze sind die Intensitäten der Banden, die der Cuticula zugeordnet werden, nur sehr schwach. Dies kann damit erklärt werden, dass sich aufgrund der gleichmäßigen, sehr milden Umweltbedingungen an der Kultur-Minze nur eine sehr dünne Cuticula ausbildet.

Weitere beobachtete Variationen in den ätherischen Ölen der Minzen sind bedingt durch die jahreszeitlichen Variationen. Beispielhaft werden diese Änderungen an der Bergamott-Minze dargestellt. Für diese Untersuchungen wurden die Inhaltsstoffe der Bergamott-Minze an vier verschiedenen Erntezeitpunkten Raman-spektroskopisch anhand von Markerbanden identifiziert. Mittels einer vergleichenden gaschromatographischen Untersuchung wurden die Konzentrationsänderungen der einzelnen Inhaltsstoffe für eine Wachstumsperiode berechnet. Mit dieser Methode ist es möglich, ein schnelles und einfaches Verfahren zur Bestimmung des geeigneten Erntezeitpunkts zu erhalten.

Bei der Mikro-Raman-spektroskopischen Untersuchung der ätherischen Öle von verschiedenen Citrus-Früchten (Limette, Mandarine, Orange und Zitrone) in den lysigenen Ölbehältern, konnte Limonen als Hauptinhaltsstoff in allen vier Früchten identifiziert werden. Neben den Banden aus dem ätherischen Öl sind auch Signale von β -Carotin in den Spektren zu erkennen. β -Carotin ist kein Bestandteil des ätherischen Öls, sondern liegt in den mehr oder weniger intensiv gefärbten Schalen der Citrus-Früchte vor.

Neben der Charakterisierung der ätherischen Öle ist eine weitere Zielsetzung dieses Abschnitts, eine Möglichkeit zur chemotaxonomischen Klassifizierung von Pflanzen zu finden. Für diesen Zweck wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit den Mikro-Raman-Spektren der einzelnen Pflanzen durchgeführt. Für die einzelnen Citrus-Arten konnte eine Klassifizierung über die β -Carotin-Banden und eine Ester-C=O-Bande vorgenommen werden. Dabei ist eine eindeutige Zuordnung der Raman-Spektren zu den einzelnen Citrus-Arten vorhanden.

Bei der Klassifizierung von fünf Minzen wurden zwei verschiedene Arten (*M. × piperita* L. und *M. spicata* L.) und mehrere Unterarten bzw. Varietäten untersucht. Auf Grund der nahen Verwandtschaft sind die Raman-Spektren der Minzen z. T. sehr ähnlich. Dies erschwert die Klassifizierung mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse. Werden Raman-Spektren der fünf Minzen aus einem einzigen Erntezeitpunkt verwendet, erhält man eine eindeutige Unterscheidung zwischen den Arten *M. × piperita* L. und *M. spicata* L., sowie eine Trennung der Unterarten. Die Cluster der einzelnen Minzen sind sehr homogen und eindeutig von denen der anderen Minzen abgegrenzt.

Werden dagegen Raman-Spektren der fünf Minzen aus vier verschiedenen Erntezeitpunkten für die hierarchische Clusteranalyse verwendet, so gestaltet sich die Klassifizierung aufgrund der Variationen der ätherischen Öle innerhalb der Wachstumsperiode schwierig. Die beiden Arten *M. × piperita* L. und *M. spicata* L. können ebenso wie die Unterarten und Variationen voneinander unterschieden werden. Allerdings sind die Cluster der einzelnen Minzen weniger einheitlich als bei Verwendung eines einzigen Erntezeitpunkts.

Für die Raman-spektroskopischen Untersuchungen der ätherischen Öle der Lamiaceen wurden zur Fluoreszenz-Quenchung Silber-Kolloide verwendet. Um die Belastung der Probe mit Schwermetall zu minimieren und gleichzeitig eine Signalverstärkung bzw. Fluoreszenz-Quenchung zu erzielen, wurde eine Silber-beschichtete Glasfaserspitze verwendet. Diese SERS-Sonde kann an ausgewählten Stellen an bzw. in der Probe eingesetzt werden. Mit der beschichteten Glasfaserspitze erhält man mit geringerer Laserintensität an der Probe qualitativ vergleichbare Spektren wie mit konventioneller Mikro-Raman-Spektroskopie in Kombination mit Silber-Kolloiden. Zusätzlich kann man durch die schonende Messweise weitere Banden von Komponenten erkennen, die aufgrund der Zugabe von Silber-Kolloiden nicht auftreten.

Abschließend wurden Mikroorganismen mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Dabei sollte die Menge an für die Untersuchung verwendeten Mikroorganismen sukzessiv verringert werden, so dass es schließlich möglich wird, einzelne Zellen zu untersuchen.

Zu Beginn wurden verschiedene Bakterien-Kolonien mit Mikro-Raman-Spektroskopie direkt auf einer Anzuchtplatte untersucht. Für die Bakterien *M. luteus* konnten aufgrund ihrer Pigmentierung, mehrere Anregungswellenlängen im sichtbaren Spektralbereich verwendet werden. Nicht-kolorierte Bakterien-Kolonien konnten nur außerhalb ihrer Fluoreszenzanregung mit 785 nm spektroskopiert werden. Allerdings kam es bei allen Messungen zu einer lokalen Zerstörung der Kolonien.

Um die Zerstörung der Mikroorganismen zu minimieren, wurden weitere Untersuchungen an Ausstrichen auf einer Glasplatte vorgenommen. Mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm wurde mittels der Raman-Mapping-Technik eine Mischung aus der Bakterie *M. luteus* und der Hefe *R. mucilaginosa* (rubra) als Monolage auf einer Glasplatte vermessen. Dabei konnten die C=C-Doppelbindungsbanden der zwei Carotenoide als Markerbanden für die beiden Mikroorganismen verwendet werden. Mit dieser Methode konnte die räumliche Verteilung der Mikroorganismen in der Monolage bestimmt werden.

Die Detektion nicht kolorierter Mikroorganismen unter diesen Versuchsbedingungen gelang nur auf CsI-Platten mit konfokaler Mikro-Raman-Spektroskopie und extrem langen Messzeiten. Hier können zwei Unterarten, *B. subtilis* und *B. sphaericus*, Raman-spektroskopisch unterschieden werden.

Die Verwendung einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm führt bei Monolagen zu einer Zerstörung der Mikroorganismen. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung der Hefe *R. mucilaginosa* (rubra) eine SERS-Sonde verwendet. Das Spektrum mit der SERS-Sonde zeigt bei der eingesetzten geringen Laserleistung auf der Probe und einer minimalen Probenmenge von wenigen Hefezellen, dass es möglich ist, einzelne Mikroorganismen mit dieser Technik zu untersuchen.

Eine Weiterführung der SERS-Sonde ist die Kombination eines AFMs (*atomic force microscope*) mit einem inversen Mikro-Raman-Setup. Für diese TERS-Messungen (*tip enhanced Raman spectroscopy*) wurde das SERS-aktive Substrat auf einer AFM-Spitze lokalisiert. Dieser Aufbau ermöglicht die Untersuchung mit einer räumlichen Auflösung von 70 nm. An der Bakterie *M. luteus* wurde beispielhaft gezeigt, dass es selbst mit einer so hohen räumlichen Auflösung möglich ist, über die Signalverstärkung ein Spektrum aus einer einzelnen Bakterie zu erhalten, das für eine eindeutige Zuordnung herangezogen werden kann.

Mit Hilfe der Mikro-Raman-Spektroskopie ist es möglich, Inhaltsstoffe in pflanzlichem Gewebe zu lokalisieren und zu identifizieren. Auftretende Fluoreszenz im Gewebe kann durch SERS-Substrate unterdrückt werden, wobei je nach untersuchtem System unterschiedliche SERS-Methoden verwendet werden. Weiterhin können die Raman-Spektren von Pflanzen für die chemotaxonomische Klassifizierung mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse verwendet werden.

Die Identifizierung von Mikroorganismen auch in sehr geringen Mengen (Monolage, einzelne Zellen) ist mit der Mikro-Raman-Spektroskopie nur unter bestimmten Voraussetzungen durchführbar. Für weitergehende Untersuchungen sollte hier die SERS-Sonde oder ein TERS-Aufbau verwendet werden.

10 Summary

This thesis concentrates on the spectroscopic investigation of plants, plant tissue, plant cells as well as microorganisms. The characteristic components of the biological cells have been localized and identified directly in the biological tissue with minimal sample preparation only. Among the different vibrational spectroscopic methods micro Raman spectroscopy appears to be the most suitable technique for such scientific investigations. For example, water which shows sharp absorptions in the infrared is only a weak Raman scatterer. Thus biological tissues containing a high amount of water can be easily studied with Raman spectroscopy. Due to the use of laser light for the excitation of Raman scattering sub- μm spatial resolution can be realized by micro Raman spectroscopy. This allows the investigation of very heterogeneous samples. Furthermore, micro Raman spectroscopy can be combined with other methods such as SERS spectroscopy.

Plant cells consist of a great variety of substances at low concentrations. As the Raman effect has a poor quantum yield mostly resonance enhanced substances can be identified in the resulting spectra. These substances like e. g. β -carotene can be detected down to very low concentrations. The main focus lies on the investigation of secondary metabolites such as alkaloids, lipids or terpenes, which agglomerate in the plant.

Initially different components in tobacco plants were identified. With the micro SERS spectroscopic analysis of different tobacco species (*N. tabakum* und *N. rustica*) several tissues in cross sections of the stems and leaf stalks were investigated.

The SERS substrate was incorporated in the plant tissue in two different ways. On one hand the cross sections are soaked in activated silver colloid for several minutes, on the other hand the plant respectively selected plant parts were placed in a silver colloid solution.

So the existence of nicotine can be shown in different tissues in the plant cross sections. The ring breathing vibration of the pyridine ring at 1033 cm^{-1} serves as

marker band. The band's intensity changes due to the alkaloid's concentration in the investigated tissue. Unfortunately there seems to occur a destruction of the tissue in some spectra, noticeable through the broad bands in the region between 1200 and 1600 cm^{-1} .

Besides nicotine several other components can be identified in the tobacco plant. The tetraterpene β -carotene can be found in the green bark and in older plants the occurrence of crystal sand can be observed. The crystal sand can be identified as calcium oxalate monohydrate by micro Raman spectroscopy. Crystals can also be found in other plants like rhubarb and *E. aureum*. They form raphids (needles) or druses, which can also be identified as calcium oxalate monohydrate.

E. aureum shows granules (storage substances) in addition to these crystal inclusions. By comparing micro Raman spectra of granules with those of pure starch and similar substances they can be clearly identified as starch.

Micro Raman spectroscopy can also be used for the characterization of oil droplets in the xylem of several plants. First oil droplets in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia* were analysed. At 1742 cm^{-1} the C=O band of an ester was observed. Due to the available biological information it was assumed that it is a phospholipid. The =C-H in-plane deformation vibration is only of minimal intensity, therefore it should be a unsaturated phospholipid. The vibrations of the C=C double bonds belong to a second so far unknown component. The spectra are of poor quality and it is not possible to assign the signals to a specific phospholipid.

In spectra of xylem cuts of poplar lignin and cellulose was identified in the cell wall. The spectra of oil droplets of poplar and willow were assigned to an unsaturated phospholipid. The phosphate bands are very weak and could not be definitely assigned. Therefore it was not possible to assign a certain head group. The band assignment was discussed on the basis of spectra of several fatty acids and unsaturated phospholipids. Phosphocholines were used exemplary as unsaturated phospholipids. The intensity ratio of CH_2 twisting towards =C-H in-plane deformation mode was used to determine the molecule's degree of unsaturation by setting it in relation to the

ratio of CH_2 - and $=\text{C-H}$ -groups in the fatty acid part of the phospholipid. For willow the ratio of carbon atoms to the number of double bonds in the fatty acid part is 34:4 and for poplar it is 38:4. The Raman spectra allow the determination of the rate of double bonds, but cannot classify the fatty acids present.

Xylem cuts as well as isolated xylem sap of lime tree were analyzed by micro Raman spectroscopy. Here beside lignin and cellulose, lipids could be identified in the cell walls. The lipids might result from smearing oil droplets on the sample during the preparation. The micro Raman spectra of the oil droplets in the xylem cuts as well as of the isolated sap are characteristic spectra of unsaturated phospholipids, although they differ slightly. These spectral differences might be due to changes of the sample during the preparation of the sap. The degree of unsaturation of the phospholipids is 40:3, respectively 28:2 for the xylem sap and 44:3, respectively 30:2 for the xylem cut. The ratios differ from those for poplar and willow. In addition to phospholipid signals there is another band in the lime tree spectra discernible, which could not be assigned so far.

In order to proof if lipids can only be found in the oil droplets or if they exist in other parts of the xylem Raman mapping was applied. By using suitable marker bands it could be shown, that lipids only exists in the area of the oil droplets and not in the cell wall.

Another aspect is the characterization of essential oils of laminaceae plants and citrus fruits directly at the point of origin, the glandular trichomes or lysigenous oil cavities. Micro Raman spectra of essential oils of laminaceae plants exhibit high fluorescence backgrounds and poor signal to noise ratios. Therefore, the stem cross sections were treated with silver colloid, to quench the fluorescence and enhance the spectral quality. The isolated essential oils of thyme and oregano could be identified as mixtures of p-cymene, carvacrol and thymol in different concentrations by comparing their Raman spectra with those of pure components.

The micro Raman spectrum of a glandular trichome of thyme shows beside signals of tissues only those of thymol. The other substances could not be found here. Further

investigations concentrated on mints as they have a bigger economic impact. The studied mints were: the spearmints (*M. spicata* L. ssp. *spicata* and *M. spicata* L. ssp. *crispata*), the bergamot mint (*M. × piperita* L. nm. *citrata*) and two peppermints (*M. × piperita* L. var. *pip. pallescens pallescens* und *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (*black mint*)). With Raman spectroscopy it is possible to identify the main components of essential oils in the glandular trichomes and compare these with results from a gas chromatographic analysis.

Comparing spectra from the glandular trichomes with those from pure substances it became evident, that not all the bands can be assigned by components of the essential oil. It was assumed that the supplementary bands arise from the cuticula of the mints. The silver colloids used for fluorescence quenching will attach to the outer side of the glandular trichome and lead to a SERS enhancement of the signals from the cuticula wax. Similar spectra are reported for isolated palm waxes in literature. The unknown bands are missing in spectra of isolated essential oils, therefore, the cuticula of the mint is isolated. Spectra of the isolated cuticula indicate that the cuticula is a heterogeneous structure. Only broad unstructured bands were found, which resemble the unknown bands in the glandular trichrome spectra only in their spectral positions but not in intensity. These deviation might partly be due to the aggressive isolation method.

The composition of an essential oil as well as the concentration of its components changes due to environmental influences. To study the influence of the general cultivation conditions three types of mints were cultivated outdoors as well as under sterile conditions. Their Raman spectra show significant differences in the composition of the essential oil. The bands arising from the cuticula are of very low intensity in the Raman spectrum of the bergamot mint raised under sterile conditions. This is due to the even and mild environmental conditions in the culture. The culture mint only produced a very thin cuticula.

Additionally, the composition of the essential oil shows annual variations. This is exemplarily shown for the bergamot mint. Spectra were taken at four different collection dates and identified Raman spectroscopically with certain marker bands for

their main components. The concentration changes of the single components were determined for the whole growing season by comparison with gas chromatographic results. This method offers a quick and easy method for the determination of the best harvesting time.

The micro Raman spectroscopic investigation of the essential oils of several citrus fruits (lime, mandarin, orange and lemon) directly in the lysigenic oil cavities identified limonene as main component for all four fruits. The spectra show bands from the essential oil as well as β -carotene signals. β -carotene is no component of the essential oil, but is located in the more or less intensive colored fruit skin.

Another aim of this investigation is the realization of a chemotaxonomic classification of plants. Therefore, a hierarchical cluster analysis was performed with the micro Raman spectra of the single plants. Each citrus species can be classified using the β -carotene bands as well as the ester C=O band. The Raman spectra can be positively allocated to a specific citrus species.

In a similar manner five mints, two species (*M. × piperita* L. und *M. spicata* L.) and several subspecies and varieties were investigated. Some of the Raman spectra of these mints are very similar due to the near relationship of the mints, which complicates the classification with the hierarchical cluster analysis. A definite classification between the species *M. × piperita* L. und *M. spicata* L. as well as a separation in subspecies was possible when using only spectra from one harvest time. The clusters of the single mints show a high homogeneity and are well separated from those of the other mints.

A different situation results when spectra of the five mints from four different collection dates are used for the hierarchical cluster analysis. The classification is more complicated as the composition of the essential oils varies. Still both species *M. × piperita* L. und *M. spicata* L. as well as the subspecies and varieties can be separated, but the clusters of the single mints are much more heterogeneous.

Raman spectroscopic studies on the essential oils of lamiaceae plants were performed using silver colloids for fluorescence quenching. A silver coated glass fiber tip was used to minimize the heavy metal pollution of the sample without losing the signal

enhancement and fluorescence quenching abilities. This SERS probe can be placed at selected points on or in the sample. Raman spectra of similar quality as conventional micro Raman spectra with silver colloids could be collected with lower laser intensities at the sample using the coated glass fiber tip. An additional effect is the occurrence of bands from components which cannot be detected when using the more aggressive silver colloids.

Finally microorganisms are investigated with different spectroscopic methods. Here the amount of used sample will be reduced successively so that in the end single cells are investigated. First several bacteria colonies are studied with micro Raman spectroscopy directly on the culture plate. Spectra with visible excitation were taken from the bacteria *M. luteus* due to its pigmentation. Colorless bacteria colonies could only be investigated using excitation lines outside their fluorescence excitation e. g. 785 nm. Nevertheless all measurements result in a local destruction of the colonies.

Further investigations were performed on smear on a glass plate to minimize the destruction of the microorganisms. A monolayer of mixture of the bacteria *M. luteus* and the yeast *R. mucilaginosa* (rubra) on a glass plate was measured with an excitation wavelength of 633 nm and the Raman mapping technique. Here the C=C double bond modes of the two carotenoids was used as marker bands for the two microorganisms. This method allowed the determination of the spatial distribution of the microorganisms in the monolayer.

Colorless microorganisms can only be investigated under these experimental conditions on CsI plates with confocal micro Raman spectroscopy and very long measurement times. Two subspecies can be distinguished from each other by Raman spectroscopy: *B. subtilis* und *B. sphaericus*.

An excitation wavelength of 514,5 nm leads to a destruction of the monolayer. Therefore, the yeast *R. mucilaginosa* (rubra) is studied with the SERS probe. With this technique it is possible to take spectra of just a few yeast cells with minimal laser power at the sample.

A further development of the SERS probe is the combination of an AFM (*atomic force microscope*) with an inverse micro Raman setup. This technique is called TERS (*tip enhanced Raman spectroscopy*) and the SERS active substrate is located on an AFM tip. This setup allows investigations with a spatial resolution of 70 nm. Even with such a high spatial resolution it is possible to measure a well defined spectrum of a single bacteria of the species *M. luteus*.

With the micro Raman spectroscopy it is possible to localize and identify components in plant tissue. Occurring fluorescence can be suppressed by SERS substrates, which are chosen according to the system under investigation. Furthermore, Raman spectra allow the chemotaxonomic classification of plants when combined with a hierarchical cluster analysis.

The identification of microorganisms in low amounts (monolayers, single cells) could only be achieved with Raman spectroscopy when certain conditions are met. Further investigations should focus on the SERS probe or the TERS setup.

11 Literaturverzeichnis

- [1] P. Nuhn, *Naturstoffchemie: Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*, 3. Ed., S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [2] B. Schrader, B. Dippel, I. Erb, S. Keller, T. Löchte, H. Schulz, E. Tatsch, S. Wessel, *J. Mol. Struct.* **1999**, *481*, 21-32.
- [3] E. B. Hanlon, R. Manoharan, T.-W. Koo, K. E. Shafer, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Phys. Med. Biol.* **2000**, *45*, R1-R59.
- [4] B. Schrader, H. H. Klump, K. Schenzel, H. Schulz, *J. Mol. Struct.* **1999**, *509*, 201-212.
- [5] B. Schrader, H. Schulz, G. N. Andreev, H. H. Klump, J. Sawatzki, *Talanta* **2000**, *53*, 35-45.
- [6] B. Schrader, B. Dippel, S. Fendel, S. Keller, T. Löchte, M. Riedl, R. Schulte, E. Tatsch, *J. Mol. Struct.* **1997**, *408*, 23-31.
- [7] E. Urlaub, J. Popp, W. Kiefer, G. Bringmann, D. Koppler, H. Schneider, U. Zimmermann, B. Schrader, *Biospectrosc.* **1998**, *4*, 113-120.
- [8] J. Greve, G. J. Puppels, in *Advances in Spectroscopy, Vol. 20A*, 1. Ed. (Eds.: R. E. Hester, R. J. H. Clark), J. Wiley & Sons, Chichester, **1992**, pp. 231-265.
- [9] G. J. Puppels, T. C. Bakker Schut, P. J. Casper, R. Wolthuis, M. van Aken, A. van der Laarse, H. A. Bruining, H. P. J. Buschmann, M. G. Shim, B. C. Wilson, in *Handbook of Raman Spectroscopy, Vol. 28* (Eds.: I. R. Lewis, H. G. M. Edwards), Marcel Dekker, New York, **2001**, pp. 549-574.
- [10] R. A. Shaw, H. H. Mantsch, *J. Mol. Struct.* **1999**, *481*, 1-13.
- [11] I. R. Nabiev, H. Morjani, M. Manfait, *Eur. Biophys. J.* **1991**, *19*, 311-316.
- [12] H. Morjani, J.-F. Riou, I. Nabiev, F. Lavelle, M. Manfait, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4784-4790.
- [13] I. Chourpa, H. Morjani, J.-F. Riou, M. Manfait, *FEBS Letters* **1996**, *397*, 61-64.

- [14] A. Beljebbar, J. F. Angiboust, J. F. Morjani, G. D. Sockalingum, M. Polissiou, M. Manfait, *J. Raman Spectrosc.* **1997**, *28*, 159-163.
- [15] S. Y. Arzhantsev, A. Y. Chikishey, N. I. Koroteev, J. Greve, C. Otto, N. M. Sijtsema, *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30*, 205-208.
- [16] A. V. Feofanov, A. I. Grichine, L. A. Shitova, T. A. Karmakova, R. I. Ikabovskaya, *Asian J. Spectrosc.* **1999**, *3*, 23-31.
- [17] I. Chourpa, A. Beljebbar, G. D. Sockalingum, J.-F. Riou, M. Manfait, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1334*, 349-360.
- [18] E. A. Todd, M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 545-548.
- [19] E. Urlaub, Dissertation, Universität Würzburg, **1998**.
- [20] W. H. Nelson, R. Manoharan, J. F. Sperry, *Appl. Spectrosc. Rev.* **1992**, *27*, 67-124.
- [21] D. Naumann, D. Helm, H. Labischinski, *Nature* **1991**, *351*, 81-82.
- [22] D. Naumann, D. Helm, H. Labischinski, P. Giesbrecht, in *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*, (Ed.: W. H. Nelson), VCH Publisher, New York, **1991**, pp. 43-96.
- [23] D. Naumann, S. Keller, D. Helm, C. Schultz, B. Schrader, *J. Mol. Struct.* **1995**, *347*, 399-405.
- [24] K. C. Schuster, I. Reese, E. Urlaub, J. R. Gapes, B. Lendl, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5529-5534.
- [25] K. C. Schuster, E. Urlaub, J. R. Gapes, *J. Microbiol. Methods* **2000**, *42*, 29-38.
- [26] K. Maquelin, L.-P. Choo-Smith, T. van Vreeswijk, H. P. Endtz, B. Smith, R. Bennett, H. A. Bruining, G. J. Puppels, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 12-19.
- [27] K. C. Schuster, F. Mertens, M. Grube, J. R. Gapes, *Spectrosc. Biol. Mol.: New Dir., Eur. Conf., 8th* **1999**, 579-580.
- [28] G. J. Puppels, H. S. P. Garritsen, J. A. Kummer, J. Greve, *Cytometry* **1993**, *14*, 251.
- [29] G. J. Puppels, H. S. P. Garritsen, G. M. J. Segers-Nolten, F. F. M. d. Mul, J. Greve, *Biophys. J.* **1991**, *60*, 1046-1056.

- [30] G. J. Puppels, F. F. M. de Mul, C. Otto, J. Greve, M. Robert-Nicoud, D. J. Arndt-Jovin, T. M. Jovin, *Nature* **1990**, *347*, 301-303.
- [31] D. L. A. de Faria, M. A. de Souza, *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30*, 169-171.
- [32] J. F. Brennan, Y. Wang, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 201-208.
- [33] N. N. Boustany, R. Manoharan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 24-30.
- [34] A. Carden, M. D. Morris, *J. Biomed. Opt.* **2000**, *5*, 259-268.
- [35] P. A. Evans, *Spectrochim. Acta* **1991**, *47A*, 1441-1447.
- [36] O. Piot, J. C. Autran, M. Manfait, *J. Cereal Sci.* **2001**, *34*, 191-205.
- [37] E. S. Brandt, T. M. Cotton, in *Physical Methods of Chemistry, Vol. 9B*, J. Wiley & Sons, New York, **1986**, pp. 633-719.
- [38] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Curr. Sci.* **1999**, *77*, 915-924.
- [39] D. Zeisel, V. Deckert, R. Zenobi, T. Vo-Dinh, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *283*, 381-385.
- [40] D. Zeisel, B. Dutoit, V. Deckert, T. Roth, R. Zenobi, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 749-754.
- [41] M. Prochazka, P. Stepanek, J. Mojzes, B. Vlckova, P.-Y. Turpin, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5103-5108.
- [42] R. K. Chang, B. L. Laube, *CRC Critical Reviews in Solid State and Material Science* **1984**, *12*, 1-65.
- [43] T. E. Furtak, J. Reyes, *Surf. Sci.* **1980**, *93*, 351-382.
- [44] W. E. Smith, C. Rodger, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Vol. 2* (Eds.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), J. Wiley & Sons, Chichester, **2002**, pp. 775-784.
- [45] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, W. Akemann, *J. Phys.: Condens. Matter* **1992**, *4*, 1143-1148.

- [46] D. A. Weitz, M. Moskovits, J. A. Creighton, in *Chemistry and Structure at Interfaces, New Laser and Optical Techniques*, (Eds.: R. B. Hall, A. B. Ellis), VCH, Florida, **1986**, pp. 197-235.
- [47] P. Gadenne, X. Quelin, S. Ducourtieux, S. Gresillon, L. Aigouy, J.-C. Rivoal, V. Shalaev, A. Sarychev, *Physica B (Amsterdam)* **2000**, *279*, 52-55.
- [48] S. Gresillon, J. C. Rivoal, P. Gadenne, X. Quelin, V. Shalaev, A. Sarychev, *Phys. Status Solidi A* **1999**, *175*, 337-343.
- [49] V. A. Markel, V. M. Shalaev, P. Zhang, W. Huynh, L. Tay, T. L. Haslett, M. Moskovits, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1999**, *59*, 10903-10909.
- [50] G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Vol. 2* (Eds.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), J. Wiley & Sons, Chichester, **2002**, pp. 759-774.
- [51] A. Champion, P. Kambhampati, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 241-250.
- [52] T. Vo-Dinh, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*, 557-582.
- [53] T. M. Cotton, in *Advances in Spectroscopy, Vol. 16*, J. Wiley & Sons, Chichester, **1988**, pp. 91-153.
- [54] K. Kneipp, H. Kneipp, R. Manoharan, E. B. Hanlon, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Appl. Opt.* **1998**, *52*, 1493-1497.
- [55] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Langmuir* **2000**, *16*, 764-770.
- [56] I. R. Nabiev, K. V. Sokolov, M. Manfait, in *Advances in Spectroscopy, Vol. 20*, J. Wiley & Sons, Chichester, **1993**, pp. 267-338.
- [57] E. J. Zeman, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 634-643.
- [58] E. Vogel, Dissertation, Universität Würzburg, **1999**.
- [59] E. A. Todd, M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 855-857.
- [60] H. Wetzel, H. Gerischer, B. Pettinger, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *85*, 187-189.
- [61] M. K. Weldon, V. R. Zhelyaskov, M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52*, 265-269.

- [62] G. D. Sockalingum, A. Beljebbar, H. Morjani, J. F. Angiboust, M. Manfait, *Biospectrosc.* **1998**, *4*, S71-S78.
- [63] K. L. Norrod, L. M. Sudnik, D. Rousell, K. L. Rowlen, *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 994-1001.
- [64] P. Hildebrandt, M. Stockburger, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5935-5944.
- [65] C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P. C. White, *Langmuir* **1995**, *11*, 3712-3720.
- [66] L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, *Langmuir* **2000**, *16*, 9722-9728.
- [67] E. Wentrup-Byrne, S. Sarinas, P. M. Fredericks, *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 1192-1197.
- [68] L. Rivas, A. Murza, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Vib. Spectrosc.* **2001**, *25*, 19-28.
- [69] P. C. Lee, D. J. Meisel, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391-3395.
- [70] C. G. Blatchford, O. Sillman, M. Kerker, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2503-2508.
- [71] Y. Wang, Y.-S. Li, J. Wu, Z. Zhang, D. An, *Spectrochim. Acta A* **2000**, *56*, 2637-2644.
- [72] E. Polwart, R. L. Keir, C. M. Davidson, W. E. Smith, D. A. Sadler, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 522-527.
- [73] T. Vo-Dinh, *Sensors Actuators B* **1995**, *29*, 183-189.
- [74] R. Geßner, P. Rösch, W. Kiefer, J. Popp, *Biopolymers (Biospectrosc.)* **2002**, *67*, 327-330.
- [75] R. Geßner, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **2000**.
- [76] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2957-2975.
- [77] C. Rodge, V. Rutherford, D. Broughton, P. C. White, W. E. Smith, *Analyst* **1998**, *123*, 1823-1826.
- [78] P. C. White, C. H. Munro, W. E. Smith, *Analyst* **1996**, *121*, 835-838.

- [79] C. H. Munro, W. E. Smith, P. C. White, *Analyst* **1993**, *118*, 731-733.
- [80] C. H. Munro, W. E. Smith, P. C. White, *Analyst* **1995**, *120*, 993-1003.
- [81] E. S. Grabbe, R. P. Buck, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8362-8366.
- [82] G. Smulevich, T. G. Spiro, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 5168-5173.
- [83] C. Otto, F. F. M. de Mul, A. Huizinga, J. Greve, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 1239-1244.
- [84] G. D. Chumanov, R. G. Efremov, I. R. Nabiev, *J. Raman Spectrosc.* **1990**, *21*, 43-48.
- [85] I. R. Nabiev, G. D. Chumanov, R. G. Efremov, *J. Raman Spectrosc.* **1990**, *21*, 49-53.
- [86] R. Picorel, T. Lu, R. E. Holt, T. M. Cotton, M. Seibert, *Biochemistry* **1990**, *29*, 707-712.
- [87] R. Picorel, R. E. Holt, T. M. Cotton, M. Seibert, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 4374-4380.
- [88] M. Seibert, T. M. Cotton, J. G. Metz, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *934*, 235-246.
- [89] R. Picorel, R. E. Holt, R. Heald, T. M. Cotton, M. Seibert, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2839-2843.
- [90] P. Hildebrandt, T. G. Spiro, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 3355-3369.
- [91] L. L. Thomas, J.-H. Kim, T. M. Cotton, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9378-9386.
- [92] R. E. Holt, D. L. Farrens, P.-S. Song, T. M. Cotton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9156-9162.
- [93] D. L. Farrens, R. E. Holt, B. N. Rospendowski, P.-S. Song, T. M. Cotton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9162-9169.
- [94] C.-Y. Lin, T. G. Spiro, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 472-482.
- [95] T. M. Cotton, R. P. V. Duyne, *FEBS Letters* **1982**, *147*, 81-84.

- [96] E. Y. Kryukov, A. V. Feofanov, A. A. Moskalenko, I. R. Nabiev, *Asian J. Spectrosc.* **1997**, *1*, 65-70.
- [97] P. S. Woolley, M. D. Brown, C. C. Naylor, R. E. Hester, B. J. Keely, *Org. Geochem.* **1998**, *29*, 1063-1073.
- [98] P. S. Woolley, A. J. Moir, R. E. Hester, B. J. Keely, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 1833-1839.
- [99] P. S. Woolley, B. J. Keely, R. E. Hester, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 1731-1734.
- [100] D. H. Stewart, A. Cua, D. F. Bocian, G. W. Brudvig, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3758-3764.
- [101] T. M. Cotton, J.-H. Kim, G. D. Chumanov, *J. Raman Spectrosc.* **1991**, *22*, 729-742.
- [102] S. Nie, C. G. Castillo, K. L. Bergbauer, J. F. R. Kuck, I. R. Nabiev, N.-T. Yu, *Appl. Spectrosc.* **1990**, *44*, 571-575.
- [103] K. V. Sokolov, S. V. Lutsenko, I. R. Nabiev, S. Nie, N.-T. Yu, *Appl. Spectrosc.* **1991**, *45*, 1143-1148.
- [104] I. Chourpa, M. Manfait, *J. Raman Spectrosc.* **1995**, *26*, 813-819.
- [105] M. Nissum, P. W. Jensen, O. F. Nielsen, in *XVth International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS)*, J. Wiley & Sons, Pittsburg, **1996**, pp. 672-673.
- [106] I. Nabiev, A. Baranov, I. Chourpa, A. Beljebbar, G. D. Sockaligum, M. Manfait, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1608-1613.
- [107] S. Sanchez-Cortes, P. Miskovsky, D. Janurca, A. Bertoluzza, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 1938-1944.
- [108] I. R. Nabiev, K. V. Sokolov, O. N. Voloshin, *J. Raman Spectrosc.* **1990**, *21*, 333-336.
- [109] K. Kneipp, A. S. Haka, H. Kneipp, K. Badizadegan, N. Yoshizawa, C. Boone, K. E. Shafer-Peltier, J. T. Motz, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 150-154.
- [110] I. Nabiev, I. Chourpa, M. Manfait, *J. Raman Spectrosc.* **1994**, *25*, 13-23.

- [111] S. Efrima, B. V. Bronk, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 5947-5950.
- [112] D. Naumann, in *Practical Spectroscopy Series, Vol. 24* (Eds.: H.-U. Gremlich, B. Yan), Marcel Dekker, New York, **2001**, pp. 323-378.
- [113] R. DiFoggio, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 94A-113A.
- [114] K. R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz, *Chemometrics: A Practical Guide*, J. Wiley & Sons, New York, **1998**.
- [115] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, **1993**.
- [116] Y. Ozaki, K. Murayama, in *Practical Spectroscopy Series, Vol. 24* (Eds.: H.-U. Gremlich, B. Yan), Marcel Dekker, New York, **2001**, pp. 515-565.
- [117] J. M. Shaver, in *Handbook of Raman Spectroscopy, Vol. 28* (Eds.: I. R. Lewis, H. G. M. Edwards), Marcel Dekker, New York, **2001**, pp. 275-306.
- [118] R. Henrion, G. Henrion, *Multivariate Datenanalyse*, Springer Verlag, Berlin, **1994**.
- [119] Y. Ootake, S. Kokot, *J. NIR Spectrosc.* **1998**, *6*, 241-250.
- [120] Y. Ootake, S. Kokot, *J. NIR Spectrosc.* **1998**, *6*, 251-258.
- [121] J. P. Wold, F. Westad, K. Heia, *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 1025-1034.
- [122] H. C. van der Mei, D. Naumann, H. J. Busscher, *Infrared Phys. Technol.* **1996**, *37*, 561-564.
- [123] W. Erb, B. Schrader, T. Löchte, *Asian J. Phys.* **1998**, *7*, 259-264.
- [124] N. L. Jestel, J. M. Shaver, M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **1998**, *50*, 64-69.
- [125] C. A. Hayden, M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, 708-714.
- [126] A. G. Ryder, G. M. O'Connor, T. J. Glynn, *J. Raman Spectrosc.* **2000**, *31*, 221-227.
- [127] M. Shimoyama, H. Maeda, H. Sato, T. Ninomiya, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 1154-1158.

- [128] G. Deinum, D. Rodrigez, T. J. Römer, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, M. S. Feld, *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53*, 938-942.
- [129] B. Steuer, H. Schulz, E. Lager, *Food Chem.* **2000**, *72*, 113-117.
- [130] H. Schulz, B. Schrader, R. Quilitzsch, B. Steuer, *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 117-124.
- [131] J. E. Franke, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Vol. 3* (Eds.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), J. Wiley & Sons, Chichester, **2002**, pp. 2276-2292.
- [132] T. Hasegawa, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Vol. 3* (Eds.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), J. Wiley & Sons, Chichester, **2002**, pp. 2293-2312.
- [133] A. J. Durkin, M. N. Ediger, G. H. Pettit, *Lasers Med. Sci.* **1998**, *13*, 32-41.
- [134] J. B. Cooper, K. L. Wise, W. T. Welch, M. B. Sumner, B. K. Wilt, R. R. Bledsoe, *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 1613-1620.
- [135] P. Meuer, J. Popp, R. Grajewski, W. Schrader, W. Kiefer, in *European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules* (Eds.: V. Kopecky Jr., K. Ruzsova, J. Stepanek), Prag, **2001**, p. 256.
- [136] F. Adar, J. Noonan, A. Zhou, *AT-Process* **1997**, *3*, 12-17.
- [137] A. J. Berger, Y. Wang, M. S. Feld, *Appl. Opt.* **1996**, *35*, 209-212.
- [138] L. Norgaard, A. Wagner., J. Saudland, J. P. Nielsen, L. Munck, S. B. Engelsen, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 413-419.
- [139] H. S. S. Sharma, M. Kilpatrick, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 44-47.
- [140] J. W. Hall, B. McNeil, M. J. Rollins, I. Draper, B. G. Thompson, G. Macoloney, *Appl. Sepctrosc.* **1996**, *50*, 102-108.
- [141] C. B. Lewis, R. J. McNichols, A. Gowda, G. L. Coté, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 1453-1457.
- [142] Y. Liu, S. Kokot, T. J. Sambhi, *Analyst* **1998**, *123*, 633-636.
- [143] C. Eliasson, A. Loren, K. V. G. K. Murty, M. Josefson, M. Kall, J. Abrahamsson, K. Abrahamsson, *Spectrochim. Acta A* **2001**, *57*, 1907 - 1915.

- [144] K. Danzer, H. Hobert, C. Fischbacher, K.-U. Jagemann, *Chemometrik*, Springer, Berlin, **2001**.
- [145] Bruker Analytik GmbH, *Spektroskopiesoftware OPUS-NT, Vers. 3*, Ettlingen, **1998**.
- [146] Bruker Analytik GmbH, *OPUS-NT, IDENT, Vers. 3*, Ettlingen, **2000**.
- [147] V. Deckert, Dissertation, Universität Würzburg, **1994**.
- [148] R. Stöckle, C. Fokas, V. Deckert, R. Zenobi, B. Sick, B. Hecht, U. P. Wild, *Appl. Phys. Lett.* **1999**, 75, 160-162.
- [149] H. Becker, J. Reichling, *Grundlagen der Pharmazeutischen Biologie*, 4. Ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1999**.
- [150] W. Nultsch, *Allgemeine Botanik, Vol. 3*, 10. Ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [151] E. Stahl-Biskup, J. Reichling, *Anatomie und Histologie der Samenpflanzen*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **1998**.
- [152] H. Rimpler, *Biogene Arzneistoffe*, 2. Ed., Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **1999**.
- [153] L. Rimai, R. G. Kilponen, D. Gill, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 3824-3825.
- [154] D. Gill, R. G. Kilponen, L. Rimai, *Nature* **1970**, 227, 743-744.
- [155] P. A. Tarantilis, A. Beljebbar, M. Manfait, M. Polissiou, *Spectrochim. Acta A* **1998**, 54, 651-657.
- [156] M. K. Assimiadis, P. A. Tarantilis, M. G. Polissiou, *Appl. Spectrosc.* **1998**, 52, 519-522.
- [157] M. Polissiou, *6th Eur. Conf. Spectrosc. Biol. Mol.* **1995**, 599-602.
- [158] D. Frohne, U. Jensen, *Systematik des Pflanzenreichs*, 5. Ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1998**.
- [159] W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann, *Römpp Lexikon Naturstoffe*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**.

- [160] T. E. Barber, M. S. List, J. W. Haas, E. A. Wachter, *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 1423-1427.
- [161] S. Saito, M. Tasumi, *J. Raman Spectrosc.* **1983**, 310-321.
- [162] H. Hayashi, T. Noguchi, M. Tasumi, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 337-343.
- [163] L. Rimai, M. E. Heyde, D. Gill, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4493-4501.
- [164] R. J. H. Clark, G. A. Rodley, A. F. Drake, R. A. Church, P. F. Zagalsky, *Comp. Biochem. Physiol.* **1990**, *95B*, 847-853.
- [165] H. G. M. Edwards, D. W. Farwell, R. Jenkins, M. R. D. Seaward, *J. Raman Spectrosc.* **1992**, *23*, 185-189.
- [166] H. Chang, P. J. Huang, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1485-1491.
- [167] S. R. Letellier, M. J. Lochhead, A. A. Campbell, V. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1380*, 31-45.
- [168] H. G. M. Edwards, F. Full, F. R. Perez, *Biospectrosc.* **1999**, *5*, 47-52.
- [169] C. Paluszkiwicz, M. Galka, W. Kwiatek, A. Parczewski, S. Walas, *Biospectrosc.* **1997**, *3*, 403-407.
- [170] B. Prieto, M. R. D. Seaward, H. G. M. Edwards, T. Rivas, B. Silva, *Biospectrosc.* **1999**, *5*, 53-59.
- [171] H. G. M. Edwards, K. A. E. Edwards, D. W. Farwell, I. R. Lewis, M. R. D. Seaward, *J. Raman Spectrosc.* **1994**, *25*, 99-103.
- [172] E. L. Varetti, C. R. Volponi, *Appl. Spectrosc.* **1995**, *49*, 537-539.
- [173] N. C. Russell, H. G. M. Edwards, D. D. Wynn-Williams, *Antarct. Sci.* **1998**, *10*, 63-74.
- [174] G. H. Vieweg, H. Ziegler, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **1969**, *82*, 29-34.
- [175] L. Wilson, P. M. Drennan, *Electron Microsc. Soc. South. Africa* **1992**, *22*, 99-103.

- [176] H. Schneider, F. Thürmer, J. J. Zhu, N. Wistuba, P. Gessner, K. Lindner, B. Herrmann, G. Zimmermann, W. Hartung, F.-W. Bentrup, U. Zimmermann, *New Phytol.* **1999**, *143*, 471-484.
- [177] H. Schneider, N. Wistuba, H.-J. Wagner, F. Thürmer, U. Zimmermann, *New Phytol.* **2000**, *148*, 221-238.
- [178] H.-J. Wagner, H. Schneider, S. Mimietz, N. Wistuba, M. Rokitta, G. Krohne, A. Haase, U. Zimmermann, *New Phytol.* **2000**, *148*, 239-255.
- [179] U. Zimmermann, H.-J. Wagner, M. Szimtenings, H. Schneider, A. Haase, *New Phytol.* **2001**, *151*, 314-322.
- [180] R. S. Pearce, *Ann. Bot.* **2001**, *87*, 417-424.
- [181] J. J. Sauter, B. van Cleve, *Trees* **1994**, *8*, 297-304.
- [182] J. J. Sauter, U. Neumann, *J. Plant Physiol.* **1994**, *143*, 21-26.
- [183] S. Dalmannsdottir, A. Helgadottir, B. E. Gudleifsson, *Ann. Bot.* **2001**, *88*, 753-759.
- [184] H. Rosenqvist, S. Laakso, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 97-100.
- [185] M. Westhoff, Diplomarbeit, Würzburg, **2002**.
- [186] P. Krysinski, A. Zebrowska, A. Michota, J. Bukowska, L. Becucci, M. R. Moncelli, *Langmuir* **2001**, *17*, 3852-3857.
- [187] F. Lhert, F. Capelle, D. Blaudez, C. Heywang, J. M. Turlet, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11704-11707.
- [188] F. Lhert, F. Capelle, D. Blaudez, C. Heywang, J. M. Turlet, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2672.
- [189] X. Yiming, Z. Hongxia, Z. Zhiyi, *J. Photochem. Photobiol., B* **1998**, *43*, 41-46.
- [190] M. Aki, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10765-10774.
- [191] M. M. Batenjany, L. T. Boni, Y. Guo, M. E. Neville, S. Bansal, R. J. Robb, M. C. Popescu, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1514*, 280-290.
- [192] V. Chan, H.-Q. Mao, K. W. Leong, *Langmuir* **2001**, *17*, 3749-3756.

- [193] M. V. Fraile, P. Carmona, *Vib. Spectrosc.* **1997**, *15*, 149-155.
- [194] J. Yano, S. Ueno, K. Sato, F. Kaneko, D. R. Kodali, D. M. Small, *Phys. Prop. Fats, Oils, Emulsifiers* **1999**, 49-63.
- [195] R. Mendelsohn, D. J. Moore, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *96*, 141-157.
- [196] M. Saint-Pierre Chazalet, M. Masson, C. Bousquet, G. Bolbach, Y. Ridente, J. Bolard, *Thin Solid Films* **1994**, *244*, 852-856.
- [197] M. K. Weldon, M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 20-23.
- [198] M. K. Weldon, M. D. Morris, A. B. Harris, J. K. Stoll, *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 1896-1899.
- [199] P. J. M. Brands, S. W. E. van de Poll, J. A. Quaedackers, P. H. A. Mutsaers, G. J. Puppels, A. van der Laarse, M. J. A. de Voigt, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2001**, *181*, 454-459.
- [200] T. J. Römer, J. F. Brennan, 3rd, M. Fitzmaurice, M. L. Feldstein, G. Deinum, J. L. Myles, J. R. Kramer, R. S. Lees, M. S. Feld, *Circulation* **1998**, *97*, 878-885.
- [201] J. F. Brennan, III., T. J. Römer, R. S. Lees, A. M. Tercyak, J. R. Kramer, Jr., M. S. Feld, *Circulation* **1997**, *96*, 99-105.
- [202] E. E. Lawson, A. N. C. Anigbogu, A. C. Williams, B. W. Barry, H. G. M. Edwards, *Spectrochim. Acta A* **1998**, *54A*, 543-558.
- [203] J.-G. Wu, Y.-Z. Xu, C.-W. Sun, R. D. Soloway, D.-F. Xu, Q.-G. Wu, K.-H. Sun, S.-F. Weng, G.-X. Xu, *Biopolymers* **2001**, *62*, 185-192.
- [204] G. F. Bailey, R. J. Horvat, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1972**, *49*, 494-498.
- [205] G. Forrest, *Chem. Phys. Lipids* **1978**, *21*, 237-252.
- [206] T. Lefevre, M. Picquart, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *92*, 79-89.
- [207] Q. Shen, H. Rahiala, J. B. Rosenholm, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *206*, 558-568.
- [208] R. H. Atalla, U. P. Agarwal, *J. Raman Spectrosc.* **1986**, *17*, 229-231.
- [209] D. S. Himmelsbach, D. E. Akin, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 991-998.

- [210] U. P. Agarwal, S. A. Ralph, *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 1648-1655.
- [211] T. Ona, T. Sonoda, K. Ito, M. Shibata, Y. Ootake, J. Ohshima, S. Yokota, N. Yoshizawa, *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53*, 1078-1082.
- [212] M. Kacurakova, N. Wellner, A. Ebringerova, Z. Hromadkova, R. H. Wilson, P. S. Belton, *Food Hydrocolloids* **1999**, *13*, 35-41.
- [213] D. S. Himmelsbach, S. Khahili, D. E. Akin, *Vib. Spectrosc.* **1999**, *19*, 361-367.
- [214] T. Ona, T. Sonoda, K. Ito, M. Shibata, T. Kato, Y. Ootake, *J. Wood Chem. Technol.* **1997**, *17*, 399-417.
- [215] T. Ona, T. Sonoda, K. Ito, M. Shibata, T. Katayama, T. Kato, Y. Ootake, *J. Wood Chem. Technol.* **1998**, *18*, 43-51.
- [216] T. Ona, T. Sonoda, K. Ito, M. Shibata, T. Kato, Y. Ootake, Y. Tamai, Y. Kojima, *J. Pulp Pap. Sci.* **2000**, *26*, 43-47.
- [217] R. H. Wilson, A. C. Smith, M. Kacurakova, P. K. Saunders, N. Wellner, K. W. Waldron, *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 397-405.
- [218] H. G. M. Edwards, D. W. Farwell, A. C. Williams, *Spectrochim. Acta* **1994**, *50A*, 807-811.
- [219] H. G. M. Edwards, D. W. Farwell, D. Webster, *Spectrochim. Acta A* **1997**, *53*, 2383-2392.
- [220] Y. Liu, S. Kokot, T. J. Sambhi, *Analyst* **1998**, *123*, 633-636.
- [221] J. Grdadolnik, D. Hadzi, *Spectrochim. Acta A* **1998**, *54A*, 1989-2000.
- [222] F. Parker, *Applications of Infrared, Raman and Raman Resonance Spectroscopy in Biochemistry*, Plenum Press, New York, **1983**.
- [223] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Vol. 5* (Eds.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), J. Wiley & Sons, Chichester, **2002**, pp. 3447-3464.
- [224] D. Göttges, Dissertation, Würzburg, **1993**.
- [225] A. T. Tu, *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications*, J. Wiley & Sons, New York, **1982**.

- [226] P. Greenwell, J. D. Schofield, *Cereal Chem.* **1986**, 38, 379-380.
- [227] V. Schill, W. Hartung, B. Orthen, M. H. Weisenseel, *J. Exper. Botany* **1996**, 47, 123-133.
- [228] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, Boston, **1991**.
- [229] F. R. Dollish, W. G. Fateley, F. F. Bentley, *Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds*, J. Wiley & Sons, New York, **1974**.
- [230] G. W. Turner, J. Gershenzon, R. B. Croteau, *Plant Physiol.* **2000**, 124, 655-664.
- [231] G. W. Turner, J. Gershenzon, R. B. Croteau, *Plant Physiol.* **2000**, 124, 665-679.
- [232] R. Croteau, *Planta Med.* **1991**, 57, S10-S14.
- [233] O. Spring, H. Buschmann, *Grundlagen und Methoden der Pflanzensystematik*, Quelle & Meyer, Wiesbaden, **1998**.
- [234] R. M. Harley, in *Flora Europaea - Diapensiaceae to Myoporaceae, Vol. 3* (Eds.: T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb), Cambridge University Press, Cambridge, **1972**, pp. 183-186.
- [235] W. Franke, *Nutzpflanzenkunde*, 6. Ed., Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [236] D. McCaskill, R. Croteau, *Prospects for the Bioengineering of Isoprenoid Biosynthesis, Vol. 55*, Springer Verlag, Berlin, **1997**.
- [237] M. L. Wise, R. Croteau, *Monoterpene Biosynthesis, Vol. 2*, Pergamon Press, Oxford, **1999**.
- [238] H. Schulz, H. Krüger, *Dragoco-Report* **1999**, 47, 56-67.
- [239] M. Maffei, D. Canova, C. M. Berteà, S. Scannerini, *J. Photochem. Photobiol., B* **1999**, 52, 105-110.
- [240] S. C. Chao, D. G. Young, C. J. Oberg, *J. Essent. Oil Res.* **2000**, 12, 639-649.
- [241] H. Hendriks, *Perfum. Flavor.* **1998**, 23, 15-23.

- [242] K. A. Hammer, C. F. Carson, T. V. Riley, *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86*, 985-990.
- [243] D. Martinetz, R. Hartwig, *Taschenbuch der Riechstoffe*, Verlag Harri Deutsch, Thun, **1998**.
- [244] J.-C. Chalchat, A. Michet, B. Pasquier, *Perfumer & Flavorist* **1997**, *22*, 15-21.
- [245] W. A. Court, R. C. Roy, R. Pocs, *Can. J. Plant. Sci.* **1993**, *73*, 815-824.
- [246] H. Rothbächer, *Pharmazie* **1968**, *23*, 389-391.
- [247] H. Rothbächer, H. Heltmann, *Pharmazie* **1968**, *23*, 387-388.
- [248] F. Pank, *Pharmazie* **1974**, *29*, 344-346.
- [249] U. Schröder, *Pharmazie* **1969**, *24*, 179.
- [250] M. Maffei, S. Scannerini, *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12*, 523-529.
- [251] C. Franz, *Planta Med.* **1972**, *22*, 160-183.
- [252] A. H. A. Farooqi, N. S. Sangwan, R. S. Sangwan, *Plant Growth Regul.* **1999**, *29*, 181-187.
- [253] M. Stompfova, H. Büblova, J. Chladek, *Pharmazie* **1973**, *28*, 134.
- [254] G. S. Ranade, *Indian Perfum.* **1982**, *26*, 183-190.
- [255] A. Nagell, F. W. Hefendehl, *Planta Med.* **1974**, *26*, 1-8.
- [256] M. D. Guillen, M. J. Manzanos, *Flavour Fragrance J.* **1998**, *13*, 259-262.
- [257] M. D. Guillen, M. J. Manzanos, *Food Chem.* **1998**, *63*, 373-383.
- [258] J.-M. D. Dimandja, S. B. Stanfill, J. Grainger, D. G. Patterson, Jr., *J. High Res. Chromatogr.* **2000**, 208-214.
- [259] S. Aleksovski, H. Sovova, F. A. Poposka, S. Kulevanova, M. Ristic, *Acta Pharm. (Zagreb)* **1999**, *49*, 51-57.
- [260] M. Sawamura, *Recent Res. Dev. Agric. Food Chem.* **2000**, *4*, 131-164.
- [261] A. Herisset, J. Jolivet, P. Rey, *Plantes Med. Phyto.* **1971**, *5*, 188-189.

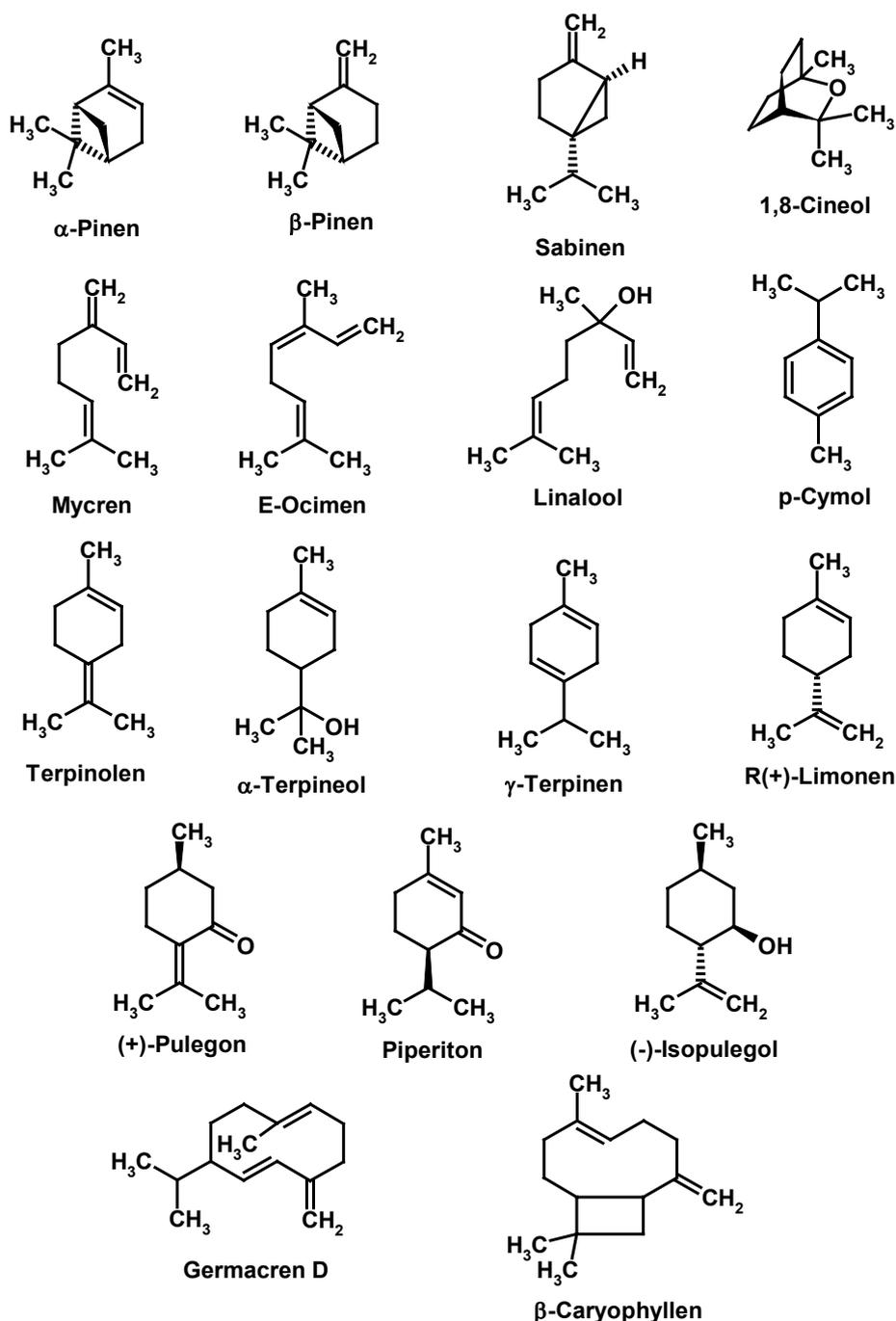
- [262] J. Jolivet, P. Rey, M.-F. Boussarie, *Plantes Med. Phyto.* **1971**, 5, 199-208.
- [263] A. Herisset, J. Jolivet, P. Rey, *Plantes Med. Phyto.* **1971**, 5, 305-314.
- [264] A. Herisset, J. Jolivet, P. Rey, *Plantes Med. Phyto.* **1972**, 6, 11-19.
- [265] A. Herisset, J. Jolivet, P. Rey, *Plantes Med. Phyto.* **1972**, 6, 137-148.
- [266] A. Herisset, J. Jolivet, P. Rey, *Plantes Med. Phyto.* **1972**, 6, 194-203.
- [267] A. Herisset, J. Jolivet, P. Rey, *Plantes Med. Phyto.* **1972**, 6, 281-201.
- [268] A. Herisset, J. Jolivet, P. Rey, *Plantes Med. Phyto.* **1973**, 7, 37-47.
- [269] A. Herisset, J. Jolivet, P. Rey, M. Lavault, *Plant. Med. Phytother.* **1973**, 7, 306-318.
- [270] A. K. Rai, A. K. Singh, *Spectrochim. Acta* **1990**, 46A, 1269-1272.
- [271] S. Gunasekaran, R. Rajkumar, *Asian Chem. Lett.* **1999**, 3, 195-198.
- [272] H. Schulz, G. Lösing, *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1995**, 91, 239-242.
- [273] H. Schulz, H.-H. Drews, H. Krüger, *J. Essent. Oil Res.* **1999**, 11, 185-190.
- [274] B. Steuer, H. Schulz, R. Quilitzsch, H. Krüger, in *34. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung*, **1999**, pp. 73-77.
- [275] P. Rösch, J. Popp, W. Kiefer, *J. Mol. Struct.* **1999**, 480-481, 121-124.
- [276] H. Sato, K. Okada, K. Uehara, Y. Ozaki, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 61, 175-182.
- [277] M. Fujiwara, M. Tasumi, *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 250-255.
- [278] M. Fujiwara, M. Tasumi, *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 5646-5650.
- [279] M. Lutz, *Biospectrosc.* **1995**, 1, 313-327.
- [280] S. Niederl, T. Kirsch, M. Riederer, L. Schreiber, *Plant Physiol.* **1998**, 116, 117-123.
- [281] J. Schönherr, M. Riederer, *Plant Cell Environ.* **1986**, 9, 459-466.
- [282] H. G. M. Edwards, M. J. P. Falk, *Spectrochim. Acta A* **1997**, 53, 2685-2694.

- [283] P. L. Mahia, J. S. Gandara, P. P. Losada, *Food Chem.* **1993**, *46*, 193-197.
- [284] G. Lösing, M. Degener, G. Matheis, *Dragoco-Report* **1998**, *45*, 180-187.
- [285] R. Goodacre, E. M. Timmins, R. Burton, N. Kaderbhai, A. M. Woodward, D. B. Kell, P. J. Rooney, *Microbiology-UK* **1998**, *144*, 1157-1170.
- [286] B. K. Lavine, C. E. Davidson, A. J. Moores, P. R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 960-966.
- [287] P. Rösch, W. Kiefer, J. Popp, *Biopolymers (Biospectrosc.)* **2002**, *67*, 358-361.
- [288] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**.
- [289] S. Isaac, D. Jennings, *Kultur von Mikroorganismen*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [290] A.-M. Melin, A. Perromat, G. Deleris, *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 23-28.
- [291] A. Fehrmann, M. Franz, A. Hoffmann, L. Rudzik, E. Wust, *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 1537-1542.
- [292] A. Fehrmann, M. Franz, A. Hoffmann, L. Rudzik, E. Wust, *J. Mol. Struct.* **1995**, *348*, 13-16.
- [293] D. Naumann, C. P. Schultz, D. Helm, in *Infrared Spectroscopy of Biomolecules, Vol. 1*, Wiley-Liss, New York, **1996**, pp. 279-310.
- [294] R. Goodacre, R. Burton, N. Kaderbhai, E. M. Timmins, A. Woodward, P. J. Rooney, D. B. Kell, *NATO ASI Ser., Ser. 1* **2000**, *30*, 111-136.
- [295] R. A. Dalterio, M. Baek, W. H. Nelson, D. Britt, J. F. Sperry, F. J. Purcell, *Appl. Spectrosc.* **1987**, *41*, 241-244.
- [296] G. D. Sockalingum, H. Lamfarraj, A. Beljebbar, P. Pina, M. Delavenne, F. Witthuhn, P. Allouch, M. Manfait, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1999**, *3608*, 185-194.
- [297] S. Efrima, B. V. Bronk, J. Czege, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1999**, *3602*, 164-171.
- [298] S. K. Brahma, P. E. Hargraves, W. F. Howard, W. H. Nelson, *Appl. Spectrosc.* **1983**, *37*, 55-58.

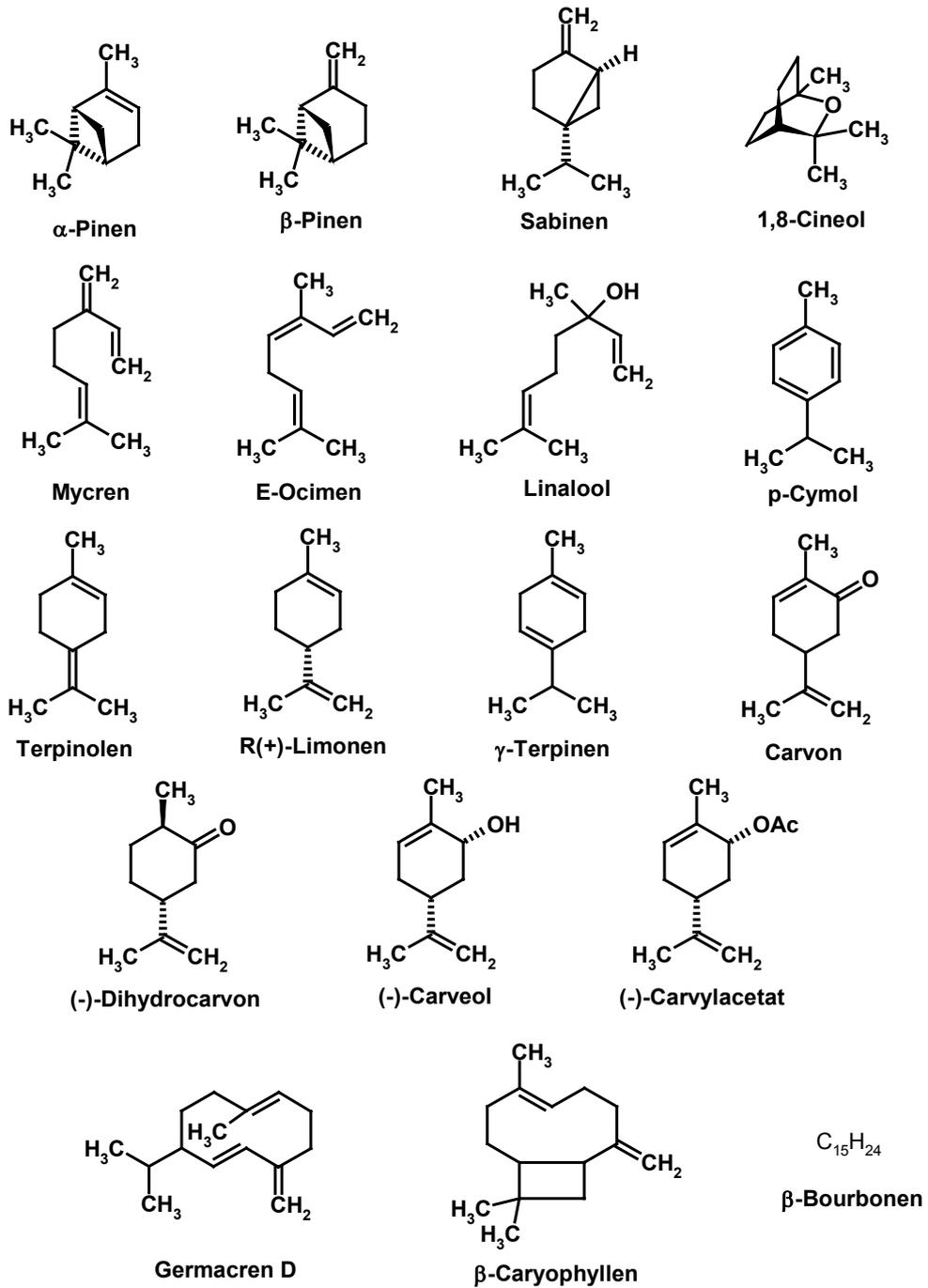
- [299] W.-D. Wagner, W. Waidelich, *Appl. Spectrosc.* **1986**, *40*, 191-195.
- [300] R. A. Dalterio, W. H. Nelson, D. Britt, J. F. Sperry, F. J. Purcell, *Appl. Spectrosc.* **1986**, *40*, 271-272.
- [301] Q. Wu, Dissertation, University of Rhode Island, USA, **1999**.
- [302] B. Robert, M. Lutz, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *807*, 10-23.
- [303] M. Baek, W. H. Nelson, P. E. Hargraves, *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 159-162.
- [304] M. Baek, W. H. Nelson, D. Britt, J. F. Sperry, *Appl. Spectrosc.* **1988**, *42*, 1312-1314.
- [305] R. A. Dalterio, W. H. Nelson, D. Britt, J. F. Sperry, *Appl. Spectrosc.* **1987**, *41*, 417-422.
- [306] Q. Wu, W. H. Nelson, S. Elliot, J. F. Sperry, M. Feld, R. Dasari, R. Manoharan, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2981-2986.
- [307] S. Chada, R. Manoharan, P. Moenne.Loccoz, W. H. Nelson, W. L. Peticolas, J. F. Sperry, *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 38-43.
- [308] G. P. Harhay, F. R. Siragusa, *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* **1999**, *7*, 25-38.
- [309] S. Chadha, W. H. Nelson, J. F. Sperry, *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, *64*, 3088-3093.
- [310] W. H. Nelson, J. F. Sperry, in *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*, (Ed.: W. H. Nelson), VCH Publisher, New York, **1991**, pp. 97-143.
- [311] E. Ghiamati, R. Manoharan, W. H. Nelson, J. F. Sperry, *Appl. Spectrosc.* **1992**, *46*, 357-364.
- [312] R. Manoharan, E. Ghiamati, R. A. Dalterio, K. A. Britton, W. H. Nelson, J. F. Sperry, *J. Microbiol. Methods* **1990**, *11*, 1-15.
- [313] J. C. Merlin, E. W. Thomas, C. C. Shone, G. Britton, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *913*, 111-116.
- [314] T. W. Goodwin, *Prog. Ind. Microbiol.* **1972**, *11*, 29-88.
- [315] C. Arcangeli, S. Cannistraro, *Biopolymers* **2000**, *50*, 179-186.

- [316] M. Lutz, I. Agalidis, G. Hervo, R. J. Codgell, F. Reiss-Husson, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *503*, 287-303.
- [317] J. C. Merlin, *J. Raman Spectrosc.* **1987**, *18*, 519-523.
- [318] R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, R. Zenobi, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *318*, 131-136.
- [319] B. Dutoit, D. Zeisel, V. Deckert, R. Zenobi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 6955-6959.
- [320] V. Deckert, D. Zeisel, R. Zenobi, T. Vo-Dinh, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2646-2650.
- [321] R. M. Stöckle, N. Schaller, V. Deckert, C. Fokas, R. Zenobi, *J. Microscopy* **1999**.
- [322] J. A. Veerman, A. M. Otter, L. Kuipers, N. F. van Hulst, *Appl. Phys. Lett.* **1998**, *72*, 3115-3117.
- [323] M. S. Anderson, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 349-352.

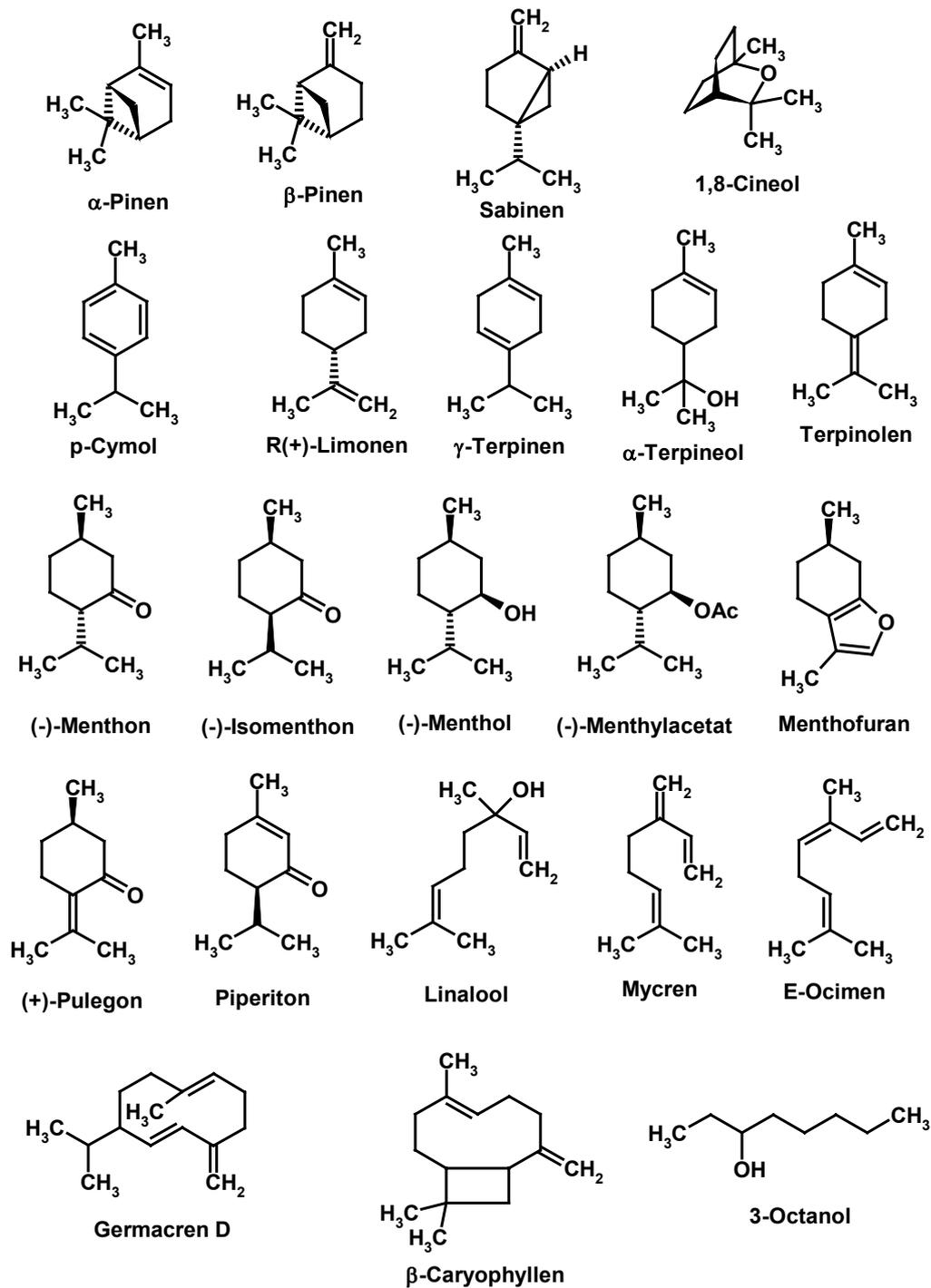
Anhang 1 - Strukturen der Monoterpene in den einzelnen ätherischen Ölen



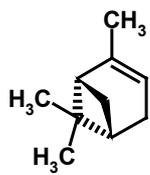
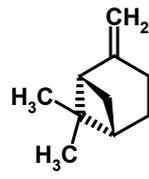
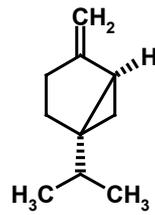
Ätherisches Öl von *M. spicata* L. ssp. *spicata*



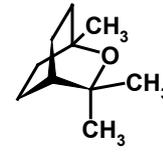
Ätherisches Öl von *M. spicata* L. ssp. *crispata*



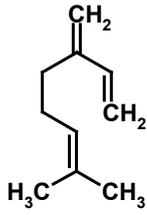
Ätherisches Öl von *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* (black mint)

 α -Pinen β -Pinen

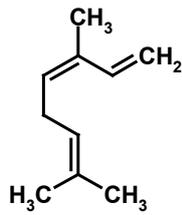
Sabinen



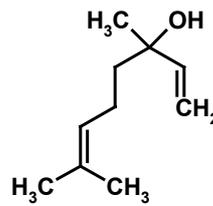
1,8-Cineol



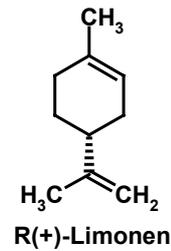
Myrcen



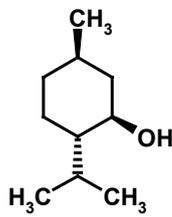
E-Ocimen



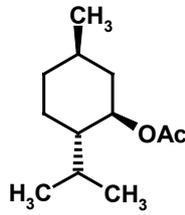
Linalool



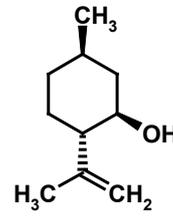
R(+)-Limonen



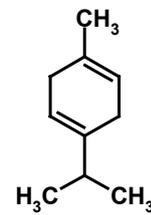
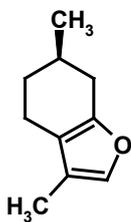
(-)-Menthol



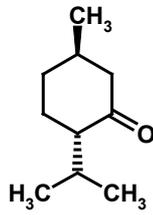
(-)-Menthylacetat



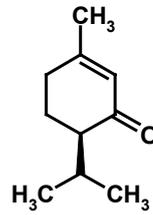
(-)-Isopulegol

 γ -Terpinen

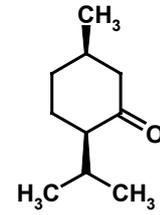
Menthofuran



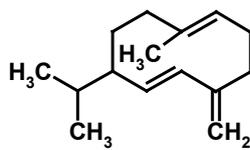
(-)-Menthon



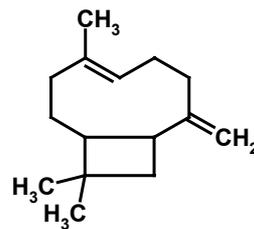
Piperiton



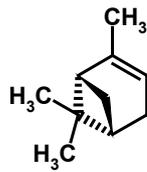
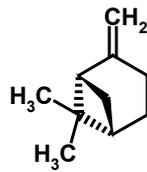
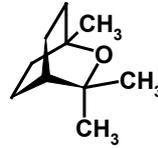
(-)-Isomenthon



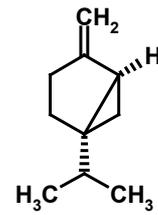
Germacren D

 β -Caryophyllen

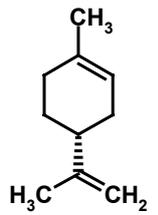
Ätherisches Öl von *M. × piperita* L. var. *piperita pallescens pallescens*

 α -Pinen β -Pinen

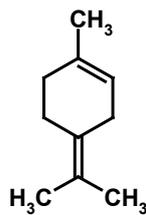
1,8-Cineol



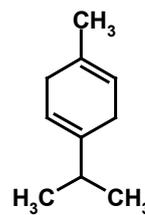
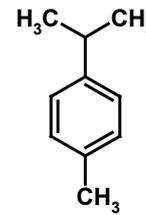
Sabinen



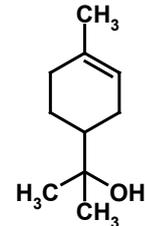
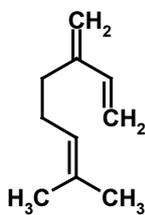
R(+)-Limonen



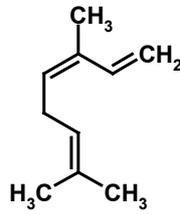
Terpinolen

 γ -Terpinen

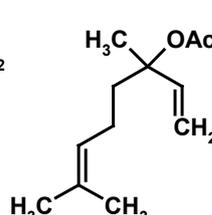
p-Cymol

 α -Terpineol

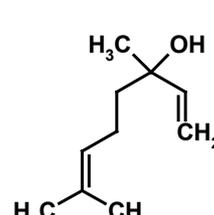
Myrcen



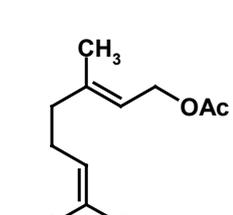
E-Ocimen



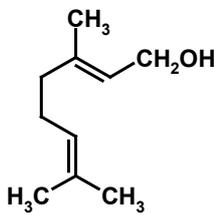
Linalylacetat



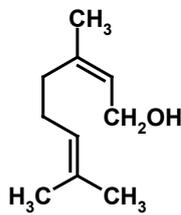
Linalool



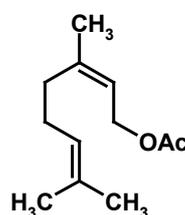
Geranylacetat



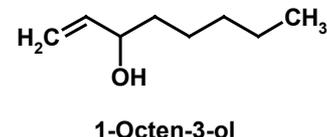
Geraniol



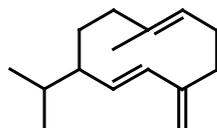
Nerol



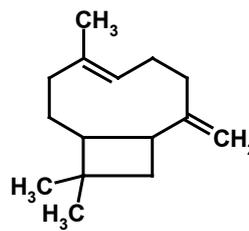
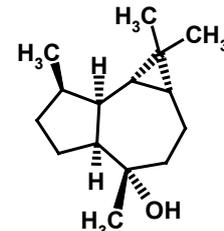
Nerylacetat



1-Octen-3-ol



Germacren D

 β -Caryophyllen

Viridiflorol

Ätherisches Öl von *M. × piperita* L. nm. citrata

Anhang 2 - Gaschromatographische Analysen

Tab. 1: Gaschromatographische Analyse des ätherischen Öls von *M. × piperita* L. nm. citrata (Vergleich von Freiland- und Kultur-Minzen)

Monoterpene	Freiland Anteil in %	Kultur Anteil in %
α -Pinen	0,29	0,14
β -Pinen	0,26	0,06
Sabinen	0,31	0,02
Myrcen	0,69	1,18
Limonen	1,36	1,90
Eucalyptol (1,8-Cineol)	5,44	0,09
cis-Ocimen	0,42	0,55
γ -Terpinen	0,11	0,11
trans-Ocimen	0,52	0,90
p-Cymol	0,12	0,17
Terpinolen	0,14	0,25
1-Octen-3-ol	0,09	0,02
Linalool	53,60	40,62
Linalylacetat	8,86	17,96
Caryophyllen	0,11	0,41
α -Terpineol	3,58	8,45
Germacren D	0,79	0,43
Nerylacatat	1,76	3,69
Geranylacetat	3,04	7,57
Nerol	0,76	1,72
Geraniol	1,84	4,44
Viridiflorol	1,51	0,94
Summe	85,60	91,62

Tab. 2: Gaschromatographische Analyse des ätherischen Öls von *M. × piperita* L. var. *piperita* f. *piperita* "black mint" (Vergleich von Freiland- und Kultur-Minzen)

Monoterpene	Freiland Anteil in %	Kultur Anteil in %
α -Pinen	0,43	0,49
β -Pinen	0,52	0,37
Sabinen	0,23	0,14
Myrcen	0,23	0,26
Limonen	0,90	4,15
Eucalyptol (1,8-Cineol)	3,82	0,51
cis-Ocimen	0,36	0,14
γ -Terpinen	0,03	0,21
trans-Ocimen	0,11	0,12
p-Cymol	-	0,33
Terpinolen	-	0,07
3-Octanol	0,19	-
Menthon	43,38	0,40
Menthofuran	1,15	21,96
Isomenthon	6,20	0,14
β -Bourbonen	0,17	
Linalool	0,28	0,46
Menthylacetat	3,29	0,43
β -Caryophyllen	1,00	-
Menthol	29,08	0,90
Pulegon	0,67	54,20
Germacren D	0,98	0,18
Piperiton	0,55	0,06
Summe	93,57	85,52

Tab. 3: Gaschromatographische Analyse des ätherischen Öls von *M. spicata* L. var. *spicata* (Vergleich von Freiland- und Kultur-Minzen)

Monoterpene	Freiland Anteil in %	Kultur Anteil in %
α -Pinen	0,51	0,85
β -Pinen	0,72	4,44
Sabinen	0,23	0,32
Myrcen	1,77	0,45
Limonen	0,72	3,91
Eucalyptol (1,8-Cineol)	5,20	0,95
cis-Ocimen	0,29	0,29
γ -Terpinen	-	0,16
trans-Ocimen	0,09	0,15
p-Cymol	0,04	0,23
Terpinolen	0,14	0,06
3-Octanol	0,19	0,16
Menthon	-	0,34
Isomenthon	0,26	-
β -Bourbonen	0,37	0,10
Linalool	0,25	0,63
Caryophyllen	2,18	0,74
trans-Dihydrocarvon	-	0,70
Pulegon	74,27	0,20
α -Terpineol	-	0,33
Germacren D	1,32	0,81
Carvon	-	73,44
trans-Carvylacetat	-	0,05
cis-Carveol	-	0,29
trans-Carveol	-	0,03
Summe	88,55	89,63

Tab. 4: Vergleich der ätherischen Öle von verschiedenen Pfefferminzen (*M. × piperita*) an unterschiedlichen Erntezeitpunkten.

Monoterpene	<i>M. × piperita</i> L. var. piperita f. piperita "black mint"		<i>M. × piperita</i> L. var. piperita pallescens pallescens		<i>M. × piperita</i> L. nm. citrata	
	21.6.2000	31.7.2001	21.6.2000	31.7.2001	21.6.2000	31.7.2001
	Anteil (%)	Anteil (%)	Anteil (%)	Anteil (%)	Anteil (%)	Anteil (%)
α-Pinen	0,40	0,32	0,44	0,41	Spur	0,09
β-Pinen	0,55	0,47	0,72	0,65	0,10	0,23
Sabinen	0,33	0,28	0,49	0,41	Spur	0,10
Myrcen	0,30	0,20	0,39	0,32	0,26	0,70
Limonen	0,66	0,46	7,23	6,81	0,27	0,25
Eucalyptol	3,13	3,04	4,60	4,69	1,43	3,04
cis-Ocimen	0,58	0,32	1,20	0,89	0,19	0,41
γ-Terpinen	Spur	Spur	0,29	0,33	0,17	0,12
trans-Ocimen	Spur	0,07	0,32	0,28	0,23	0,54
p-Cymol	Spur	0,04	-	-	-	-
Menthon	37,91	18,12	10,86	2,25	-	-
Menthofuran	Spur	0,19	Spur	0,10	-	-
Isomenthon	6,94	5,87	1,27	0,79	-	-
Linalool	0,17	0,15	0,22	0,31	37,49	33,28
Linalylacetat	-	-	-	-	29,37	35,74
Menthylacetat	7,98	18,99	7,57	13,00	-	-
β-Caryophyllen	2,73	1,34	0,60	0,60	0,26	0,16
α-Terpineol	-	-	-	-	1,59	2,91
Nerylacetat	-	-	-	-	0,75	1,02
Geranylacetat	-	-	-	-	2,06	2,35
Menthol	27,50	38,83	45,63	48,36	-	-
Isopulegol	0,20	0,13	Spur	Spur	-	-
Germacren D	2,09	1,01	1,88	1,90	3,89	2,55
Nerol	-	-	-	-	0,31	0,62
Geraniol	-	-	-	-	0,83	1,71
Piperiton	0,66	0,59	1,25	0,93	-	-
Summe	92,13	90,42	84,96	83,03	79,20	85,82

Tab. 5: Gaschromatographische Analyse des ätherischen Öls von *M. spicata* L.

Monoterpene	<i>M. spicata</i> L. ssp. crispata		<i>M. spicata</i> L. ssp. spicata
	21.6.2000	31.7.2001	21.6.2000
	Anteil (%)	Anteil (%)	Anteil (%)
α -Pinen	0,66	1,26	0,30
β -Pinen	0,89	1,37	0,55
Sabinen	0,60	0,75	0,25
Myrcen	7,35	7,20	1,40
Limonen	8,63	9,98	0,44
Eucalyptol (1,8-Cineol)	2,66	4,91	3,06
cis-Ocimen	0,08	Spur	0,49
γ -Terpinen	0,04	Spur	0,09
trans-Ocimen	0,05	Spur	0,10
p-Cymol	Spur	Spur	0,05
Terpinolen	0,20	0,15	0,09
β -Bourbonen	0,46	0,75	-
Linalool	0,04	Spur	0,08
β -Caryophyllen	0,41	0,63	4,10
trans-Dihydrocarvon	1,22	7,33	-
Germacren D	0,59	0,26	3,81
Piperiton	-	-	0,10
Carvon	70,15	60,50	-
Isopulegol	-	-	0,29
Pulegon	-	-	69,34
α -Terpineol	-	-	0,08
trans-Carvylacetat	0,19	0,28	-
cis-Carveol	0,09	0,15	-
trans-Carveol	0,30	0,25	-
Summe	94,61	95,77	84,62

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. W. Kiefer möchte ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis und den großen Freiraum bei der Durchführung meiner Arbeit danken. Die vielen Tagungen im In- und Ausland an denen ich teilnehmen durfte, sowie der Messaufenthalt an der ETH Zürich, waren für mich nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht wertvolle Erfahrungen.

Prof. Dr. Jürgen Popp möchte ich nicht nur für die große Unterstützung im Labor danken, sondern auch für die fruchtbaren Diskussionen. Es war sicherlich nicht immer einfach meine Begeisterung für eine neue Pflanze zu teilen. Vielen Dank, dass du es trotzdem versucht hast.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Petra Meuer. Du hast mir nicht nur zugehört, wenn gar nichts mehr lief, sondern auch mit dem richtigen Kommentar wieder Mut zum Weitermachen gegeben. Und ohne deine Korrektur wäre ich heute noch nicht fertig. Ich werde es vermissen, mich von dir bekochen zu lassen!

Ralph Geßner danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit in den ganzen Jahren. Hoffentlich bin ich dir manchmal nicht zu sehr auf die Füße getreten.

Ralph Geßner und Marion Schöller möchte ich auch noch für das Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Meinem F-Praktikanten Oliver Seiler danke ich für sechs gute Wochen der Zusammenarbeit, in denen du vieles sehr selbstständig erarbeitet hast.

Unserer Sekretärin Frau Müller danke ich für ihr Verständnis, sowie die Ruhe mit der sie auch den größten bürokratischen Schlamassel wieder auf die Reihe bekommen hat. Unserer Feinmechanik- und Elektronik-Werkstatt gilt mein besonderer Dank dafür, dass sie immer das gebaut haben was ich benötigt habe, auch wenn meine ersten

Entwürfe häufig anders aussahen. Allen nicht genannten Mitgliedern des Arbeitskreises sei für die gute Atmosphäre gedankt.

Dr. Heike Schneider, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, möchte ich für die gute Zusammenarbeit im Bereich der Öltröpfchen danken.

Frau Ursula Hoffmann, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, gilt mein besonderer Dank für die Isolierung der Kutikula. Herrn Dr. Erhard Pfündel, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, möchte ich für die zahlreichen Diskussionen bedanken in denen er mir, als absolutem biologischen Laien, auch die abgedrehtesten Fragen beantwortet hat. Frau Dr. M. Grünsfelder, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, möchte ich für die Einführung in die Taxonomie danken. Herrn Dr. G. Binder, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, danke ich für die Isolierung der ätherischen Öle. Dem Botanischen Garten in Würzburg gilt mein besonderer Dank für die vielen Pflanzen die ich dort bekommen habe.

Dr. Petra Hess, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, möchte ich für die Hilfe bei der Kultivierung der verschiedenen Mikroorganismen danken.

Dr. Volker Deckert danke ich für die Möglichkeit seine Anlage am Institut für Organische Chemie der ETH Zürich zu testen und Yung Dong Suh für die Betreuung in diesen wirklich kalten Katakomben.

Dr. Knut Baumann, Institut für Pharmazeutische Chemie, möchte ich für die vielen interessanten Diskussionen über Chemometrik und die etwas kurzfristige Korrektur dieses Kapitels meiner Dissertation danken.

Zu guter Letzt noch ein ganz großes Dankeschön an meine Eltern, ohne die ich sicherlich nicht so weit gekommen wäre. Und an Andreas für die vielen kulinarischen Genüsse, die mich für die nächsten Wochen wieder aufgemuntert haben, auch wenn man in Deutschland nur schwer an Alligator kommt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Petra Ulrike Rösch
geboren am 09.November 1970 in Stuttgart

Schulbildung

1977–1981 Grund- und Hauptschule, Vaihingen/Enz
1981–1990 Friedrich Abel Gymnasium, Vaihingen/Enz
1990 Abitur

Berufliche Ausbildung

1990–1997 Studium der Chemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
10/1993 Diplom-Vorprüfung
07/1997 Diplom-Hauptprüfung
07/1997 Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie am Lehrstuhl von Prof. Dr. W. Kiefer
Raman-spektroskopische Untersuchungen von Polymerisationsreaktionen in einzelnen Mikropartikeln
seit 12/1997 Doktorarbeit am Institut für Physikalische Chemie am Lehrstuhl von Prof. Dr. W. Kiefer

Tätigkeiten

11/96–12/96 Studentische Hilfskraft am Institut für Physikalische Chemie, Universität Würzburg.
10/97–02/98 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physikalische Chemie, Universität Würzburg.
Seit 05/98 Wissenschaftliche Hilfskraft/Angestellte am Institut für Physikalische Chemie, Universität Würzburg.

