

**Untersuchungen an biologischen
Proben mit verschiedenen Raman-
und SERS-spektroskopischen
Techniken**

Dissertation

zur Erlangung des

Naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Bayerischen Julius–Maximilians–Universität Würzburg

vorgelegt von

Ralph Geßner

aus

Bad Neustadt

Würzburg 2003

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	9
2.1	Oberflächen-verstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)	10
2.1.1	Verstärkungsmechanismen	10
2.1.2	SERS-Substrate	14
2.2	Glasfasern als Lichtleiter	15
2.3	Optische Gradientenfalle	19
2.3.1	Funktionsprinzip der optischen Gradientenfalle	19
2.3.2	Funktionsprinzip einer optischen Gradientenfalle für Metallpartikel	22
3	Material und Methoden	25
3.1	Spektroskopische Untersuchungen	26
3.1.1	Labram	26
3.1.2	Mobiler Raman-Aufbau	28
3.2	Glasfasersonde	36
3.2.1	Herstellung der Sondenspitze durch Ätzen der Glasfaser	37
3.2.2	Vakuum-Bedampfung	38
3.2.3	Nasschemische Beschichtung	39
3.2.4	Funktionalisierung der Glasfaseroberfläche	39
3.2.5	Einkopplung des Lasers in die Glasfaser	40

3.2.6	Fasersplicing	41
3.3	Optische Gradientenfalle	41
3.3.1	Ein-Mikroskopobjektiv-Anordnung	42
3.3.2	Zwei-Mikroskopobjektiv-Anordnung	42
3.3.3	Optische Gradientenfalle für Metallpartikel	45
3.4	Kombination von Glasfasersonde und optischer Gradientenfalle	46
3.5	Oberflächencharakterisierung	47
3.5.1	Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)	47
3.5.2	Kraftfeldmikroskopie (AFM)	49
3.6	Probenpräparation	50
3.6.1	Metall-beschichtete Mikropartikel	50
3.6.2	Testsubstanzen	50
3.6.3	Pflanzen	50
3.6.4	Mikroorganismen	51
3.6.5	Erythrocyten	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Messungen mit der Fasersonde	54
4.1.1	Oberflächencharakterisierung der Fasersonde durch Raster- elektronenmikroskopie	54
4.1.2	Evaluierung der Fasersonde durch Messungen mit Kristallviolett	54
4.1.3	Messungen an einer Münze	64
4.1.4	Messungen am ätherischen Öl einer Kumquat-Frucht	67
4.1.5	Messungen an Mikroorganismen	68
4.1.6	Detektion von Pflanzenschutzmittel-Rückständen auf Reb- pflanzen	72
4.2	Optische Gradientenfalle (Optische Pinzette)	76
4.2.1	Messungen an gefangenen Polystyrolkugeln	76
4.2.2	Messungen an gefangenen Erythrocyten	78

4.2.3	Messungen an <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	91
4.2.4	Messungen mit gefangenen Metallpartikeln als SERS-Substrat	92
4.3	Kombination von Glasfasersonde und optischer Gradientenfalle	100
4.3.1	Messung an <i>Micrococcus luteus</i>	101
4.3.2	Messungen an Erythrocyten	103
5	Zusammenfassung	107
6	Summary	113
	Literaturverzeichnis	119

Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen

AFM	<i>atomic force microscope</i> (Kraftfeldmikroskop)
CCD	<i>charge coupled device</i>
DSMZ	Deutsche Sammelstelle für Mikroorganismen und Zellkulturen
FT	Fourier-Transform
NA	Numerische Apertur
RBC	<i>red blood cell</i> (Erythrocyten)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SERS	<i>surface enhanced Raman scattering</i> (Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie)

Symbole

δ	Deformationsschwingung
ν_{as}	asymmetrische Streckschwingung
ν_s	symmetrische Streckschwingung

1 Einleitung

Eine schnelle und zuverlässige Qualitätskontrolle ist eine der wichtigsten Voraussetzungen, die in der pharmazeutischen Industrie erfüllt werden muss. Biotische und abiotische Verunreinigungen können eine Produktion schwerwiegend beeinflussen. Daher ist es notwendig, derartige Verunreinigungen schnellstmöglich zu identifizieren, um sie beseitigen zu können. Da die Reinheitsanforderungen an pharmazeutische Produktionen sehr hoch sind, müssen auch solche Verunreinigungen, die nur in sehr kleinen Konzentrationen auftreten, sicher identifiziert werden können. Hierfür benötigt man eine empfindliche Analysemethode. Die Kenntnis der genauen Zusammensetzung von verunreinigenden Partikeln ist der Schlüssel zum Aufspüren der Quelle der Verunreinigung.

Die Untersuchung einzelner Partikel ist allerdings eine schwierige Aufgabe, da die meisten analytischen Methoden größere Probenvolumina oder aufwändige Probenpräparationen erfordern. In allen Fällen ist es notwendig, die Ampulle mit der pharmazeutischen Lösung zu öffnen, um die Mikropartikel isolieren zu können. Der Einsatz der Laserspektroskopie ermöglicht die Verwendung von *In-situ*-Verfahren, wie der Laser-Raman-Spektroskopie oder laserinduzierter Fluoreszenz, mit denen die chemische Zusammensetzung der Mikropartikel direkt bestimmt werden kann. Eine mögliche Methode hierfür ist die optische Gradientenfalle.

Optische Gradientenfalle

Verschiedene Analyseverfahren erfordern allerdings, dass sich das untersuchte Objekt für den Zeitraum der Spektren-Integrationszeit in einem bestimmten Beobach-

tungsvolumen befindet. Die Brown'sche Molekular-Bewegung der Flüssigkeitsmoleküle macht jedoch eine Beobachtung einzelner Mikropartikel über einen längeren Zeitraum, ohne dass weitere Vorkehrungen getroffen werden, sehr schwierig. Dieses Problem kann durch die Anwendung einer optischen Falle oder einer so genannten „Optischen Pinzette“ zur Stabilisierung der Mikropartikel in der Lösung, sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung, gelöst werden. Ein durch ein Mikroskopobjektiv stark fokussierter Laserstrahl erzeugt ein räumlich stark inhomogenes Laser-Feld, welches wiederum starke Gradientenkräfte in lateraler als auch axialer Richtung, bezogen auf die Achse des Laserstrahls, erzeugt. [1]

Die „optische Pinzette“ ist ein vielseitiges Werkzeug, mit dem es möglich ist, kleine Partikel festzuhalten und zu manipulieren. Daher soll ein kurzer Überblick über die Entwicklung der optischen Gradientenfalle und ihrer Anwendungen gegeben werden. In den frühen 70er Jahren hat Ashkin erste Ergebnisse zum Thema Strahlungsdruck und Mitte der 80er Jahre zur optischen Gradientenfalle veröffentlicht. [1–6] Wenig später konnte er erfolgreich demonstrieren, dass es nicht nur möglich ist, abiotische Partikel zu manipulieren, sondern auch biologische, wie Bakterien oder Viren. Außerdem war er in der Lage, Manipulationen innerhalb von biologischen Zellen durchzuführen. [7, 8]

Die Funktionalität einer optischen Gradientenfalle wird meistens mit Hilfe von Polystyrolkugeln demonstriert, deren Durchmesser nur einige Mikrometer beträgt. Kucik et al. haben beispielsweise eine optische Gradientenfalle benutzt, um kleine Latexkugeln auf Zellmembranen zu positionieren. [9] Andere Arbeitsgruppen haben modifizierte Mikrokugeln verwendet, um zwei- oder dreidimensionale Muster zu erzeugen. [10–13]

Einige Arbeitsgruppen haben die gefangenen Partikel sorgfältig untersucht und sowohl die in der Falle auftretenden Kräfte als auch die Kräfte zwischen Partikeln und den Wänden der Probenzelle berechnet. [14–22] Fuhr et al. führten solche Kräfte-messungen in elektro-optischen Käfigen durch. [23] Es wurden außerdem Ergebnisse veröffentlicht, die von Anwendungen der optischen Gradientenfalle zu Manipulatio-

nen in Zellen und bei Zellfusionen berichten. [24–28]

In Kombination mit anderen Methoden hat sich die optische Pinzette ebenfalls als sehr wertvolles Werkzeug erwiesen. So ist es möglich, mikroskopisch kleine Proben festzuhalten, während sie mit anderen Techniken untersucht werden, ohne dass die Wände der Probenzelle einen störenden Einfluss auf die Messung nehmen können. In der Kombination mit Fluoreszenzspektroskopie wurden beispielsweise Latex-Mikropartikel und Co-Polymer-Micellen, Ovarien von Chinesischen Hamstern, menschliche Spermien und die Eigenschaften von T-Zellen untersucht. [29–32] Andere Arbeitsgruppen haben die Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt, um den Polystyrol-Anteil einer gefangenen Polymer-Kugel zu bestimmen, während wieder andere diese Methode zur Charakterisierung einzelner Moleküle, die in einem Flüssigkeitsstrom von einer gefangenen Polystyrol-Kugel gelöst wurden, verwendet haben. [33–35]

Die optische Gradientenfalle wurde auch schon mit Raman-spektroskopischen Techniken kombiniert. So haben Thurn und Kiefer bald nach der Entdeckung des Strahlungsdrucks über die Anwendung der Optischen Levitation zur Manipulation kleiner Proben für die Raman-Spektroskopie berichtet. [36] Spektroskopische Untersuchungen wurden außerdem an gefangenen Mikrotröpfchen und an einzelnen gefangenen Zellen durchgeführt. [37–40]

Jüngste Arbeiten berichten über die Detektion und Charakterisierung einzelner intermolekularer Bindungen oder untersuchen die Kraft, mit der eine Hefezelle (*Candida albicans*) an einer Gefäßwand anhaftet. [41, 42] Sun et al. führen mit Hilfe der Falle in Kolloiden künstliche Partikelkollisionen herbei und untersuchen so das Aggregationsverhalten des Kolloids. [43] Andere Arbeitsgruppen experimentieren mit der Elektrorotation von gefangenen Polystyrolkugeln oder der Rotation von gefangenen bakteriellen Flagellar-Motoren. [44]

Die Methode des „optischen Fangen“ kann verwendet werden, um in Lösungen Experimente an Zellen durchzuführen, ohne dass diese an eine Oberfläche anhaften. Diese Fallen-Methode mit einem einzelnen Laserstrahl zum Fangen und Anregen

der Probe wurde bereits auf zahlreiche Mikropartikel, wie etwa Erythrocyten, Hefezellen, Polystyrolkugeln, Mesitylen-Tröpfchen, Kristallen aus Palmitinsäure oder Metallpartikeln angewendet. [39, 40, 45–51] Es ist sogar nicht nur möglich einzelne Zellen, sondern auch infektiöse Erreger von Krankheiten zu fangen. So wurden bereits Tabak-Mosaik-Viren und *E. coli*-Bakterien mit Hilfe der optischen Gradientenfalle untersucht. [40, 52]

Die optische Gradientenfalle ist allerdings nur für Flüssigkeits-basierte Proben einzusetzen. Für heterogene Proben, wie etwa Pflanzenmaterial ist es notwendig eine andere Technik zu verwenden.

Glasfaser-SERS-Sonde

Für pharmazeutische Erzeugnisse beginnt die Qualitätskontrolle allerdings nicht erst während der Produktion. Bereits die Rohstoffe stehen im Fokus genauester Prüfungen, bevor sie für einen Produktionsprozess freigegeben werden.

Für die Identifizierung von Inhaltsstoffen pflanzlicher oder anderer biologischer Proben eignet sich die Raman-Spektroskopie ebenfalls sehr gut. Die Untersuchung biologischer Proben stellt verschiedene Anforderungen an die Messmethode. Klassisch wurden die Proben hierfür bislang meistens extrahiert und die erhaltenen Extrakte mittels GC oder HPLC getrennt und analysiert. Bei dieser Methode können jedoch keinerlei Informationen über die räumliche Verteilung relevanter Substanzen in der Probe gewonnen werden. Weiterhin soll die Analyse schnell erfolgen können. Diese Anforderung wird von spektroskopischen Methoden, wie der NMR- und der IR-Spektroskopie erfüllt, allerdings werden die Spektren beider Methoden durch das in fast allen biologischen Proben enthaltene Wasser negativ beeinflusst. Mit der Raman-Spektroskopie eröffnet sich eine Methode, mit der es im Allgemeinen möglich ist, biologische Proben schnell und ohne großen präparativen Aufwand zu charakterisieren. [53] Wasser in der Probe stört die Messung nicht oder nur sehr wenig. Zudem bietet die Raman-Spektroskopie bei Verwendung eines Mikro-Raman-Setups eine

sehr hohe Ortsauflösung. Hierbei sind, in Abhängigkeit von der Laserwellenlänge, Ortsauflösungen im Mikrometerbereich möglich. [54] Dadurch wird es möglich, die Verteilung einzelner Komponenten in den oftmals inhomogenen Proben erfassen zu können.

Ein Nachteil der Raman-Spektroskopie ist, dass die Raman-Signale in biologischen Proben häufig durch Fluoreszenz überstrahlt werden, da die Quantenausbeute der Fluoreszenz im Vergleich zum Raman-Effekt um 6–10 Größenordnungen höher ist. [55] Außerdem kann es bei zu hohen Intensitäten des Anregungslasers zur Zerstörung des Probengewebes kommen. Als Lösung für dieses Problem eignet sich die Oberflächen-verstärkte Raman-Spektroskopie. Als Verstärkungsmedium bietet sich die Verwendung von Silber-Kolloid an, welches einfach herzustellen und flexibel einsetzbar ist. [56, 57] Allerdings kann es bei der Verwendung von SERS-Substraten zu einer Veränderung oder Zerstörung der Probe durch elektrochemische Reaktionen mit den Metallpartikeln kommen. [58] Es wäre also wünschenswert, dass die Probe nur in geringem Umfang mit dem SERS-Substrat in Kontakt kommt, um derartige Reaktionen zu vermeiden bzw. zu minimieren. Bei der Verwendung des Silber-Kolloids lässt sich dies leider nicht erreichen, da die Probe großräumig mit dem SERS-Substrat kontaminiert wird. Eine Möglichkeit, ein SERS-Substrat nach diesen Anforderungen zu gestalten, besteht darin, die SERS-aktive Silber-Schicht auf eine Glasfaser aufzubringen. Bei den im Anschluss vorgestellten Arbeiten, die Glasfasersonden einsetzen, werden Fasern oder Faserbündel mit einem glatten Ende eingesetzt. Um die Ortsauflösung bei der Messung mit der Glasfasersonde zu erhöhen, soll eine Glasfaser verwendet werden, deren Ende zu einer Spitze ausgeformt ist. Vo-Dinh hat in seiner Arbeit eine Fasersonde beschrieben, deren Ende zu einer feinen Spitze ausgezogen wird. [59] Für diese Arbeit soll jedoch die Verwendung einer durch Ätzen hergestellten Faserspitze beschrieben werden. [60]

Glasfasern werden schon seit langem als Lichtwellenleiter zur Signalübertragung in der Raman-Spektroskopie eingesetzt. In vielen Anwendungen geht es dabei in erster Linie darum, den eigentlichen Messort von den Messgeräten räumlich trennen zu

können. [61–69] Die Aus- und Einkopplung des Lichts von und in die Glasfaser wird dabei häufig durch zusätzliche optische Elemente erreicht. Zweck dieser Anordnungen ist es beispielsweise, die Messung an Orten zu erlauben, die Bedingungen aufweisen, die die Funktion der Messgeräte beeinträchtigen würden. In anderen Arbeiten wird über die Verwendung von verschiedenen Glasfaser-Anordnungen diskutiert. Dabei werden verschiedene Geometrien, die Anregungs- und Signal-Fasern zueinander einnehmen können, miteinander verglichen. [70,71] Viele Arbeitsgruppen verwenden ein System mit einer den Anregungslaser übertragenden Faser und einer oder mehreren Fasern, in verschiedenen Anordnungen, die das gestreute Licht sammeln und zum Spektrometer leiten. [72–77] Desweiteren wurden Faserbündel verwendet, um Raman-Imaging-Experimente durchzuführen. [78, 79] Schließlich wurde über Sonden berichtet, die derart präpariert wurden, dass eine pH-Wert-Bestimmung mittels Raman-Spektroskopie möglich ist [80], bzw. dass die Fasersonde als chemisches Dosimeter verwendet werden kann. [81]

Auf dem Gebiet hoch-ortsauffösender SERS-Mikrosonden ist die Arbeit von Todd et al. zu nennen, in der erstmalig mit einer geätzten Silber-Mikroelektrode Messungen an lebenden Zebrafisch-Embryonen vorgenommen wurden. [82]

Ziel dieser Arbeit ist es, Methoden zur Untersuchung empfindlicher Proben, insbesondere biologischer Art zu evaluieren. Dabei wird besonderer Wert auf eine hohe Ortsauflösung gelegt. Zudem sind biologische Proben häufig sehr empfindlich gegen zu hohe Laserleistungen und stören die Aufnahme von Raman-Spektren durch Fluoreszenz. Es wird also eine Methode benötigt, die einerseits sehr Proben-schonend ist und andererseits eine geeignete Verstärkung der Raman-Signale bietet. Zu diesem Zweck werden zwei Methoden für die Anwendung in biologischen Fragestellungen angepasst und an verschiedenen Proben getestet. Dabei wird ein Raman-Spektrometer mit einer optischen Gradientenfalle und einer Glasfasersonde kombiniert.

Mit der Glasfasersonde werden die Inhaltsstoffe von Pflanzen und Mikroorganis-

men identifiziert. Hierbei liegt der Hauptaspekt auf einer Verwendung kleinster Proben volumina und einer hohen Ortsauflösung. Es werden Messungen an verschiedenen Pflanzen, wie z. B. Minzen und Zitrusfrüchten, und an Blättern von Weinstöcken, zum Nachweis von Pestiziden, präsentiert.

Eine weitere Untersuchungsmöglichkeit, insbesondere mikropartikulärer Proben in Lösungen, bietet die Optische Gradientenfalle. Um die Funktionalität der optischen Falle zu überprüfen, werden zunächst Messungen an gefangenen Polystyrolkugeln durchgeführt. Danach werden die Ergebnisse messtechnisch anspruchsvollerer, biotischer Mikropartikel, wie Erythrocyten und Hefezellen, vorgestellt.

Für einige Proben hat es sich als sinnvoll erwiesen, einen Aufbau zu verwenden, der besonders schonende Messbedingungen für das Probenmaterial aufweist. Hierfür wird eine Kombination der optischen Gradientenfalle mit der Glasfasersonde verwirklicht.

Damit pharmazeutisch relevante Daten möglichst schnell zur Verfügung stehen, wird der Prototyp eines transportablen Mikro-Raman-Systems vorgestellt, mit dem es möglich ist, Raman-spektroskopische Untersuchungen direkt am Ort der Probenahme vorzunehmen, wodurch der Transport ins Labor entfällt.

2 Grundlagen

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Grundlagen der SERS-Spektroskopie besprochen. Dabei wird kurz auf den elektromagnetische und den chemischen Verstärkungseffekt eingegangen. Im darauf folgenden Abschnitt werden die SERS-Substrate erläutert, die eine Voraussetzung für den Verstärkungseffekt sind. Danach wird das Prinzip der Lichtausbreitung in Glasfasern vermittelt, die für einen Teil der Experimente dieser Arbeit zum Einsatz kommen. Zuletzt wird ein Überblick über das Funktionsprinzip der optischen Gradientenfalle, sowohl für dielektrische als auch für metallische Partikel, gegeben.

2.1 Oberflächen-verstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)

2.1.1 Verstärkungsmechanismen

Die Signalintensität von Raman-Signalen ist sehr niedrig. So ist beispielsweise die Quantenausbeute von Fluoreszenz als Konkurrenzprozess zum Raman-Effekt um etwa den Faktor 10^6 intensiver und kann somit das Raman-Signal leicht überdecken. Dies wirkt sich insbesondere bei der Untersuchung von biologischen Proben aus, die häufig einen Fluoreszenzuntergrund aufweisen. Eine Möglichkeit, diesen Nachteil zu umgehen, besteht darin, den Effekt der Oberflächen-verstärkten Raman-Streuung (*surface enhanced Raman scattering*; SERS) auszunutzen. Die Theorie des SERS-Effektes soll allerdings nicht das Thema dieser Arbeit sein. Außerdem wurde der SERS-Effekt bereits in vielen Publikationen, von denen hier nur einige genannt werden sollen, aufs Ausführlichste diskutiert. [83–95] Daher sollen hier nur kurz die Verstärkungsmechanismen sowie einige SERS-Substrate, die eine Relevanz für die in der Arbeit behandelten Themen aufweisen, behandelt werden.

Der Verstärkungseffekt des Raman-Signals bei der SERS-Spektroskopie beruht auf einer Wechselwirkung mit metallischen Oberflächen. [96] Dabei wurde für Raman-Messungen von Verstärkungsfaktoren von 10^6 – 10^8 bzw. in neueren Messungen sogar in Größenordnungen bis 10^{14} berichtet. [97–99] Desweiteren kann es durch die Verwendung von SERS-Substraten zu einer Fluoreszenz-Quenchung kommen.

Der Raman-Effekt ist auf eine Wechselwirkung des elektromagnetischen Feldes E mit der molekularen Polarisierbarkeit α zurückzuführen. Eine Verstärkung des Raman-Signals ist zu beobachten, wenn entweder α oder E erhöht werden. Daher spricht man von elektromagnetischer (E) oder von chemischer (α) Verstärkung. aufgrund der Reichweite der verschiedenen Verstärkungsmechanismen werden diese auch als *Long-range*- oder *Short-range*-Modelle bezeichnet.

Ein Modell für die elektromagnetische Verstärkung wurde von Kerker et al. ent-

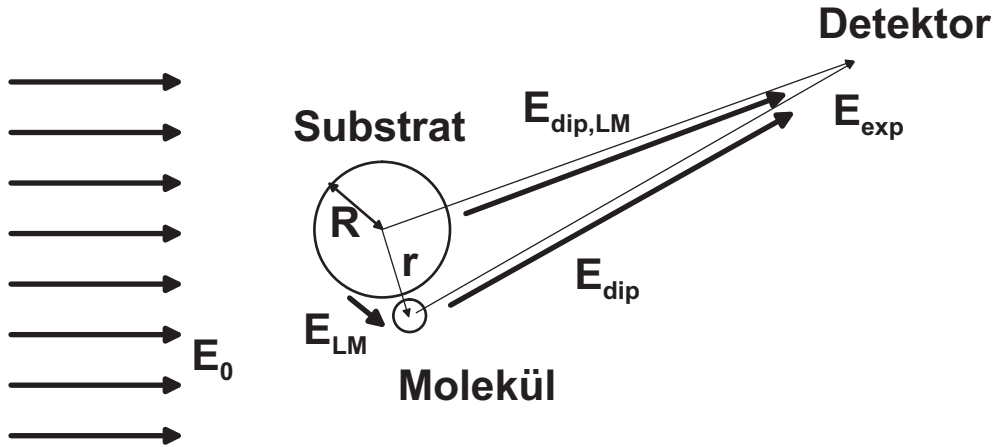


Abb. 2.1: Schemazeichnung zum elektromagnetischen Modell der Oberflächenverstärkung von Raman-Signalen. [100]

wickelt. [89] Eine stark vereinfachte Darstellung ist im Folgenden wiedergegeben. Zum besseren Verständnis wurde außerdem die Abb. 2.1 eingefügt. Man geht von sphärischen Metallpartikeln mit einem Radius $R \ll \lambda$ aus, wobei λ die Wellenlänge der eingestrahlten elektromagnetischen Welle ist. An diese Metallpartikel sollen Moleküle der zu untersuchenden Substanzen adsorbiert sein (in einem Abstand r vom Kugelursprung). Eine elektromagnetische Welle der Frequenz ν_0 , die auf das System trifft, wird im Molekül ein Dipolmoment μ induzieren, das mit der Rayleigh-Frequenz ν_0 oder der Raman-Frequenz ν oszilliert. Das Dipolmoment ergibt sich aus dem Polarisierbarkeitstensor α und dem anregendem Feld E :

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

Das anregende Feld E setzt sich dabei aus dem eingestrahlten Feld E_0 und dem am Metallpartikel elastisch gestreuten Feld E_{LM} zusammen:

$$E = E_0 + E_{LM}. \quad (2.2)$$

E_{LM} kann entsprechend der Lorentz–Mie-Theorie berechnet werden.

Für die Strahlung E_{dip} , die vom im Probenmolekül induzierten Dipol ausgesandt wird, kann ein analoger Mechanismus postuliert werden, da auch dieses Feld am Metallpartikel gestreut wird. Die insgesamt beobachtete Intensität ergibt sich daher zu:

$$E_{exp} = E_{dip} + E_{dip,LM}. \quad (2.3)$$

Die maximale Verstärkung kann erreicht werden, wenn die Frequenz des einstrahlten Lichts genau der Frequenz eines Oberflächenplasmons des verwendeten Metalls entspricht. [91]

Oberflächenplasmonen sind Elektronenwellen, die in einer glatten Metalloberfläche an diese gebunden sind. Diese Bindung wird für eine raue Oberfläche aufgehoben, so dass die Plasmonen nicht länger in der Bewegungsrichtung eingeschränkt sind und die resultierenden Felder auch aus der Metalloberfläche heraus abgestrahlt werden können. [101] Daher sind Oberflächen-Rauigkeiten eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung des SERS-Effektes. Das Modell am sphärischen Metallpartikel (z. B. Metallkolloid) kann damit auch auf aufgeraute Metalloberflächen (z. B. Elektroden, Metallinseln, usw.) erweitert werden.

Durch Wang et al. bzw. Gersten et al. wurde die Theorie von sphärischen auf ellipsoide Teilchen erweitert. [90,92,102] Außerdem wurde in Untersuchungen gezeigt, dass es aufgrund der Unterschiede in den Permittivitäten zwischen der rauen Oberfläche und dem umgebenden Medium zu einer Steigerung der elektrischen Felddichte an scharfen Kanten der Oberfläche kommt, was als „*lightning rod effect*“ bekannt ist. [103,104]

Für den Verstärkungseffekt besteht eine Abstandsabhängigkeit zwischen dem untersuchten Molekül und der Metalloberfläche. Diese Abhängigkeit wird in der Literatur mit $(a/r)^{12}$ beschrieben. [96] Dabei ist r der Abstand des Moleküls von der Metalloberfläche mit dem Krümmungsradius a . Daher sollten auch Moleküle in ei-

nem gewissen Abstand zur Metalloberfläche eine Verstärkung erfahren. Allerdings nimmt der Verstärkungseffekt mit abnehmendem Abstand zu und sollte für eine erste Monolage des Moleküls auf der Metalloberfläche ein Maximum erreichen.

Noch größere Verstärkungseffekte können für aggregierte Metallpartikel, wie beispielsweise aktivierte Metallkolloide oder Metallinseln, erzeugen. Dies resultiert daraus, dass das elektrische Feld zwischen mehreren Metallpartikeln deutlich stärker werden kann als für einzelne Partikel, wie durch Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte. [105–110]

Es treten bei der Oberflächen-verstärkten Raman-Spektroskopie allerdings auch Effekte auf, die sich durch den elektromagnetischen Verstärkungsmechanismus alleine nicht erklären lassen. Beispielsweise wird eine chemische Bindung durch ein elektromagnetisches Feld nicht in ihrer Stärke beeinflusst. Daher sollte die Kraftkonstante für die Bindung und damit auch die Frequenz für die zugehörige Schwingung konstant bleiben. In SER-Spektren können allerdings bei vielen Substanzen Bandenverschiebungen gegenüber einem herkömmlichen Raman-Spektrum beobachtet werden. Es muss also einen weiteren Mechanismus geben, der Einfluss auf die chemische Bindung nimmt. Man spricht von chemischer Verstärkung. [59]

Ein Ansatz zur Erklärung der chemischen Verstärkung erklärt, warum der Verstärkungseffekt für die erste Monolage der adsorbierten Substanz höher ist als für weitere Adsorptionsschichten. Dabei wird die Verstärkung durch einen *charge transfer* zwischen Metallpartikel und Adsorbat hervorgerufen. Das bedeutet allerdings auch, dass die chemische Verstärkung zwingend nur für die erste Monolage auftreten kann, da eine Chemisorption des untersuchten Moleküls Voraussetzung für einen *Charge-transfer*-Übergang ist. [101] Als Ursache für die Verstärkung wird postuliert, dass es durch den *Charge-transfer*-Übergang zu einer Verkleinerung des Abstandes zwischen dem Valenzband des Moleküls und dem Leiterband des Metalls kommt und dadurch elektronische Übergänge bereits mit geringerem Energieaufwand stattfinden können, als das ohne einen *Charge-transfer*-Komplex möglich wäre. Diese Rotverschiebung des elektronischen Übergangs konnte von Hildebrandt et al. für

Rhodamin 6G im Experiment bestätigt werden. [111]

Ein weiteres der *Short-range*-Modelle, das Adatom-Modell, postuliert, dass eine chemische Verstärkung nur an so genannten *active sites* stattfindet. Diese *active sites* sind Oberflächenrauigkeiten des Adsorbats in einer Größenordnung bis etwa sechs Atome. [59, 93, 94, 112]

2.1.2 SERS-Substrate

Damit ein Metall SERS-Aktivität zeigt, ist es notwendig, dass der eingestrahelte Anregungslaser eine Frequenz im Bereich der Oberflächenplasmonresonanz des verwendeten Metalls hat. Im Umkehrschluss eignen sich besonders Gold, Silber und Kupfer zum Einsatz als SERS-Substrate, da die Frequenzen ihrer Oberflächenplasmonresonanzen im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums zu finden sind. [113–115] Allerdings gibt es auch Berichte über den erfolgreichen Einsatz anderer Metalle wie etwa Platin, Nickel oder der Alkalimetalle Lithium, Natrium oder Kalium. [59, 116]

Die Präparation der Metalle muss so erfolgen, dass ihre Oberfläche die notwendige Rauigkeit aufweist. [96, 117, 118] Die bekanntesten und mit am häufigsten verwendeten Formen von SERS-Substraten sind elektrochemisch aufgeraute Elektroden oder auf ein Trägersubstrat aufgedampfte Metallinseln. [59, 85, 119–123] Desweiteren sind besonders für die Raman-spektroskopische Untersuchung von biologischen Proben kolloidale Lösungen der Metalle interessant, für die es verschiedene Herstellungsmethoden gibt. [56, 84, 115, 124–131]

Es ist allerdings auch bekannt, dass es durch den Einsatz von kolloidalen Schwermetall-Solen zu einer Denaturierung von Häm-Proteinen kommen kann. [132] Prinzipiell muss ein Schwermetall in biologischen Geweben immer als Zellgift angesehen werden, da es elektrochemische Reaktionen auslösen kann. Für *In-vivo*-Messungen an oder in biologischen Organismen ist es jedoch erstrebenswert, dass der Organismus möglichst nicht durch die Messung geschädigt wird. Eine kolloidale

Lösung wird immer das gesamte eingesetzte Probenmaterial kontaminieren und ist nach der Messung nicht vollständig zu entfernen. Es wurde daher nach einer Möglichkeit gesucht, die es erlaubt, die in die Probe eingebrachte Menge an Schwermetall sowohl in Hinsicht auf die Menge als auch auf den genauen Ort der Kontamination zu kontrollieren. Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, muss das SERS-Substrat gezielt von außen in die Probe eingebracht, dort manipuliert und nach Möglichkeit auch wieder entfernt werden können.

Einen Ansatz dazu bieten Mikroelektroden. Todd et al. haben beschrieben, wie eine an der Spitze nur Mikrometer große Silber-Elektrode hergestellt und zur Untersuchung von Zebrafisch-Embryonen eingesetzt werden kann. [82, 120] Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Glasfasern oder Glasfaserbündeln, deren Ende mit einer SERS-aktiven Metallschicht versehen wird. [133, 134] Die Verwendung von Glasfasersonden erlaubt außerdem die Messung an Orten, die der herkömmlichen Raman-Spektroskopie nur sehr schwer oder nicht zugänglich sind, wie beispielsweise zur Karies-Diagnose *in vivo*. [135] Die meisten dieser Sonden haben ein stumpfes Ende, um den Lichtdurchsatz zu erhöhen. Damit eignen sie sich allerdings kaum für den Einsatz im Gewebe. Daher wurde eine Sonde entwickelt, deren Ende zu einer Spitze geätzt wird und die anschließend mit Silber beschichtet wird. [136, 137] Ein weiteres Substrat, das es erlaubt, eine begrenzte Menge an SERS-Substrat in die Probe einzubringen, sind Silber-beschichtete Mikropartikel. Diese sind gezielt an den gewünschten Messort zu manipulieren und kontaminieren damit nur ein kleines Areal der Probe und nicht das gesamte Probenvolumen. [136] Die geätzte und Silber-beschichtete Glasfasersonde, sowie die Silber-beschichteten Mikropartikel sollen in dieser Arbeit als SERS-Substrate eingesetzt werden.

2.2 Glasfasern als Lichtleiter

Die Verwendung von Lichtleitern bringt mehrere Vorteile mit sich. Sie ermöglicht die Übertragung von Licht, sowohl in Form von Laserstrahlen als Werkzeug, als

auch zur Signalübertragung. Insbesondere als Lichtwellenleiter (LWL) haben Glasfasern ihr Haupteinsatzgebiet gefunden, da sie im Gegensatz zu elektrischen Übertragungsarten keine Isolierung benötigen, nicht anfällig gegen Magnetfelder sind und vor allen Dingen eine deutlich höhere Bandbreite erlauben als Kupferkabel. In der Medizintechnik wäre der Einsatz von Lasern oder endoskopischen Methoden ohne die Möglichkeit zur Verwendung von Glasfasern in der Form und dem Umfang, wie wir sie heute kennen, ebenfalls kaum möglich. [138] Beispielsweise kann man mit der Glasfaser den Laserstrahl flexibel von seiner Quelle zu dem Punkt leiten, an dem er seine Wirkung entfalten soll. Damit entfällt ein offener Strahlengang mit mehreren optischen Elementen, wodurch Kosten gespart werden können. Außerdem wird auch das Unfallrisiko durch Verletzungen gegenüber einer offenen Führung des Lasers gesenkt.

Da für einige Teilaspekte dieser Arbeit eine Glasfasersonde eingesetzt wurde, sollen hier kurz die wichtigsten Eigenschaften von Glasfasern vorgestellt werden.

Generell sind die meisten Glasfasern zylindersymmetrisch aufgebaut. [138, 139] Es gibt zwar einige Spezialformen von Glasfasern, die aber für diese Arbeit keine Rolle spielen und daher außer acht gelassen werden sollen. Im Prinzip besteht eine Glasfaser aus einem Kern (*core*), dem Mantel (*cladding*) und einer Kunststoffummantelung, dem *jacket* (Abb. 2.2a). Das *jacket* verleiht der Faser Stabilität und soll vor mechanischen Beschädigungen schützen. Das *cladding* ist die den Kern umgebende Schicht und der Kern der Faser dient der Übertragung des Lichts.

Kern und *cladding* unterscheiden sich in ihrem Brechungsindex, wobei der Brechungsindex des Kerns n_K höher ist als der des Mantels n_M . Auf diese Weise kommt es bei der Propagation einer Lichtwelle im Kern zur Totalreflexion an der Grenzfläche zwischen Kern und Mantel, sofern der Winkel, den der Lichtstrahl mit der Grenzflächen-Normalen bildet, größer ist als der Grenzwinkel ε_g (Abb. 2.2b):

$$\varepsilon > \varepsilon_g = \arcsin \frac{n_M}{n_K} \quad (2.4)$$

mit n_M : Brechungsindex des Mantels
 n_K : Brechungsindex des Kerns
 ε_g : Grenzwinkel für Totalreflexion.

Strahlen, deren Winkel kleiner ist als ε_g , werden nur schlecht von der Faser geführt und verlieren durch Brechung aus der Faser heraus sehr schnell an Intensität.

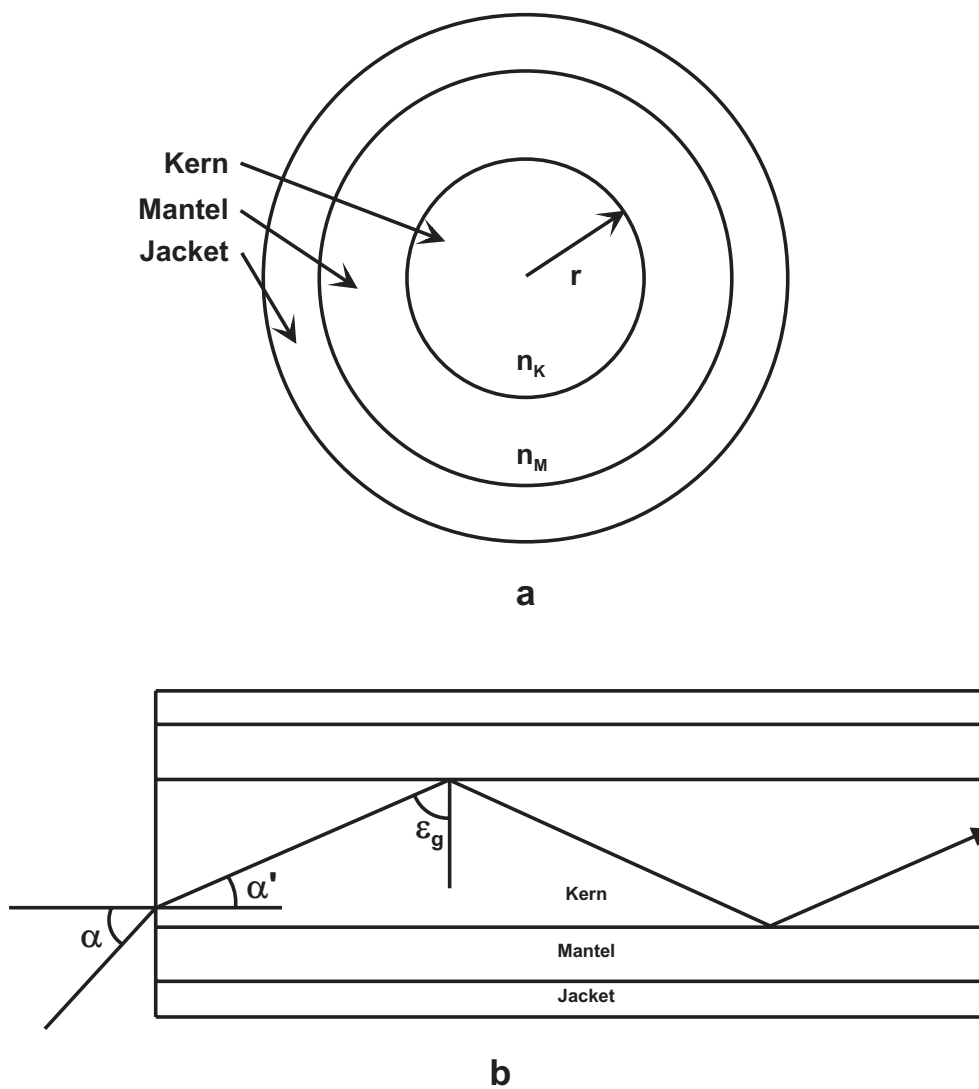


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Aufbaus (a) und der Funktionsweise (b) eines Lichtwellenleiters.

Daraus ergibt sich ein Akzeptanzwinkel α , der dem halben Öffnungswinkel eines Strahlenbündels entspricht, das sich in der Faser ausbreiten kann. Beim Eintritt in die Faser gilt:

$$\alpha' = 90^\circ - \varepsilon_g \quad (2.5)$$

$$\sin \alpha' = \cos \varepsilon_g \quad (2.6)$$

$$n_0 \sin \alpha = n_K \sin \alpha' \quad (2.7)$$

mit n_0 : Brechungsindex des die Faser umgebenden Mediums
(meistens Luft).

Mit Formel 2.4 und $\cos \varepsilon_g = \sqrt{1 - \sin^2 \varepsilon_g}$ ergibt sich für die Numerische Apertur NA der Faser:

$$NA \equiv n_0 \sin \alpha = n_K \cos \varepsilon_g = \sqrt{n_K^2 - n_M^2} \quad (2.8)$$

Um einen möglichst hohen Lichtdurchsatz zu erreichen, ist es daher notwendig, dass der Einkoppelwinkel α_{exp} eines Lichtstrahls in eine Glasfaser kleiner ist als der Akzeptanzwinkel α . Dies erreicht man am besten, indem man ein Mikroskopobjektiv benutzt, das die gleiche NA besitzt wie die Glasfaser (Die NA einer gebräuchlichen Glasfaser aus Glas beträgt etwa 0,24. [139]).

Sind diese Bedingungen alle erfüllt, wird das in die Glasfaser eingekoppelte Signal nur noch durch Absorption und Streuung gedämpft. Da die Dämpfung für die hier im Experiment verwendeten Faserlängen jedoch keine Rolle spielt, soll nicht näher darauf eingegangen werden. Es muss jedoch noch darauf hingewiesen werden, dass durch die Führung der Glasfaser durch Kurven mit kleinen Radien möglicherweise für einen Anteil des Strahlbündels die Bedingung $\varepsilon > \varepsilon_g$ nicht mehr erfüllt ist und es

so zu hohen Verlusten in der Signalintensität durch Lichtbrechung aus dem Faserkern in den Mantel kommen kann.

2.3 Optische Gradientenfalle

2.3.1 Funktionsprinzip der optischen Gradientenfalle

Das Prinzip der optischen Pinzette beruht auf der Wirkung von Licht auf dielektrische und idealerweise sphärischer Partikel mit einem relativen Brechungsindex $m > 1$ ($m = \frac{n_{\text{Partikel}}}{n_{\text{umgebendesMedium}}}$, d. h. der Brechungsindex des Partikels ist größer als der der umgebenden Materie). [28, 140] Zum Fangen des Partikels verwendet man einen Laser mit einem Gauß-förmigen Intensitätsprofil. Diesen Laserstrahl kann man zur Veranschaulichung in eine Schar von einzelnen Strahlen zerlegen, wobei die Intensität der einzelnen Teilstrahlen vom Rand zur Mitte des Laserstrahls zunimmt. Trifft einer dieser Teilstrahlen auf das zu fangende dielektrische Partikel, so ergeben sich auf Grund der Lichtbrechung und des Impulserhaltungssatzes die folgenden Kräfteverhältnisse (Abb. 2.3).

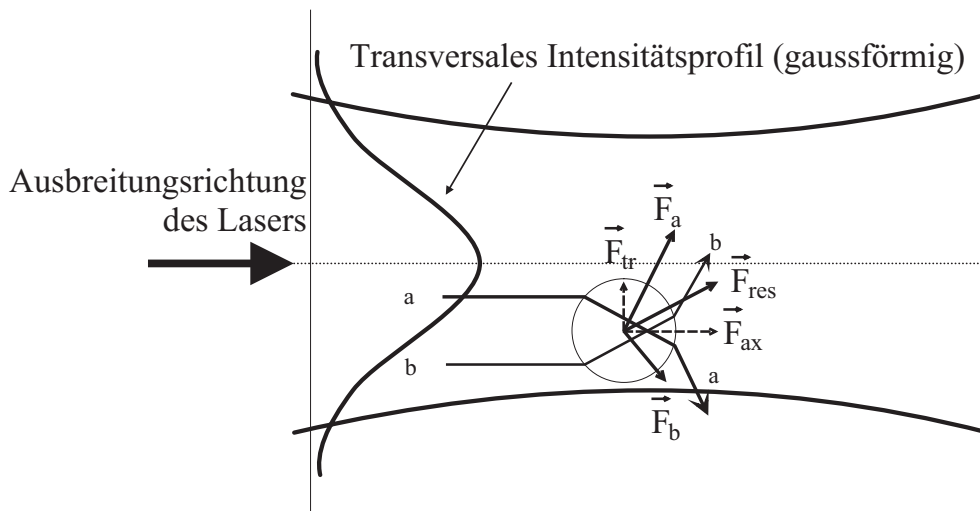


Abb. 2.3: Darstellung der auf ein sphärisches Partikel wirkenden Kräfte. [140]

In der Abbildung sind zwei repräsentative Strahlen a und b dargestellt, die das Teilchen im gleichen Abstand von dessen Mittelpunkt treffen. Ist der relative Brechungsindex n des Teilchen größer als eins, so werden die Teilstrahlen a und b entsprechend der gezeigten Darstellung gebrochen. Die bei der Brechung bewirkte Impulsänderung der Photonen resultiert in einer Kraftwirkung auf das Teilchen durch die einzelnen Strahlen, die durch die Vektoren dargestellt sind. Durch das Gauß-förmige Strahlprofil des Lasers ist der Teilstrahl a intensiver als der Teilstrahl b. Somit ist auch \vec{F}_a größer als \vec{F}_b , woraus wiederum folgt, dass das Teilchen zum Ort der höchsten Intensität, also zur Strahlmitte bewegt wird.

Die auf das Teilchen wirkende resultierende Kraft lässt sich nach einer Formel von Gordon [141]

$$\vec{F} = \underbrace{\alpha \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} (\vec{E} \times \vec{B})}_{\vec{F}_{ax}} + \underbrace{\alpha \frac{1}{2} (\nabla E^2)}_{\vec{F}_{tr}} \quad (2.9)$$

mit α : dielektrische Polarisierbarkeit des Teilchens
 c : Lichtgeschwindigkeit
 \vec{E} : elektrischer Feldvektor
 \vec{B} : magnetischer Feldvektor

in den Strahlungsdruck \vec{F}_{ax} und die Gradientenkraft \vec{F}_{tr} aufteilen. Hierdurch wird das Teilchen zum Ort der höchsten Laserintensität gezogen und dort stabil gefangen.

Durch einen sehr stark fokussierten Laserstrahl ist es weiter möglich, das gefangenen Partikel auch gegen den Strahlungsdruck zum Laserfokus zu ziehen. Hierbei werden durch das stark inhomogene Laser-Feld Gradientenkräfte erzeugt, die sowohl die Gewichtskraft des gefangenen Teilchens als auch den Strahlungsdruck des Lasers auf das Teilchen kompensieren und so das Teilchen halten können. Voraussetzung hierfür ist allerdings, wie bereits weiter oben erwähnt, dass das durch den Laser erzeugte Strahlungsfeld sehr stark inhomogen ist. Um eine derartige Inhomogenität

zu erreichen, verwendet man ein Mikroskopobjektiv mit einem möglichst großen Öffnungswinkel, also mit einer möglichst großen Numerischen Apertur NA. Außerdem ist es wichtig, dass das Mikroskopobjektiv von der Rückseite her vollständig ausgeleuchtet wird, da besonders die Randstrahlen des Lasers einen großen Beitrag zur Haltekraft liefern. Der Strahlengang und die besondere Rolle der Randstrahlen wird durch die Abb. 2.4 nochmals verdeutlicht. In dem stark fokussierten Laserstrahl werden die Teilstrahlen des Lasers (exemplarisch dargestellt durch a und b) durch das Partikel derart gebrochen, dass die aus der Impulsübertragung resultierende Kraft dem Strahlungsdruck entgegenwirken kann und das gefangene Teilchen zum Laserfokus zieht.

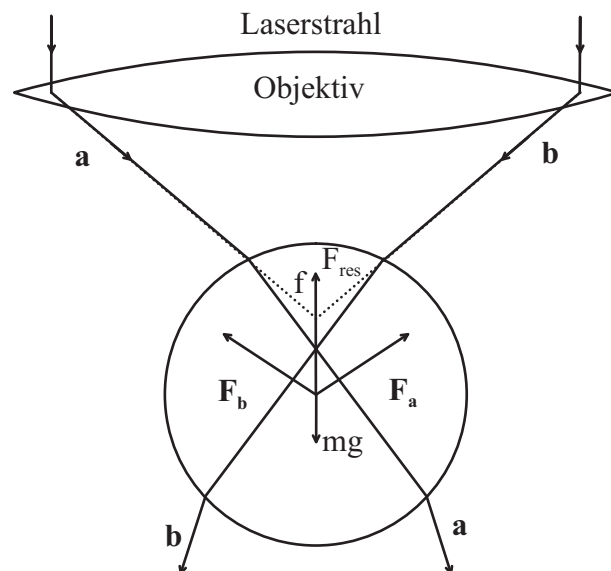


Abb. 2.4: Das gefangene Partikel wird in einem sehr stark fokussierten Laserstrahl durch die Gradientenkräfte gegen den Strahlungsdruck in den Laserfokus gezogen. [142]

Daraus ergibt sich, dass die dielektrischen Teilchen auch dann gefangen und dreidimensional manipuliert werden können, wenn der Laser „von oben“ kommt und die Gewichtskraft des gefangenen Teilchens nicht durch den Strahlungsdruck kompensiert werden kann, sofern ihr Eigengewicht nicht zu hoch ist.

2.3.2 Funktionsprinzip einer optischen Gradientenfalle für Metallpartikel

Für Partikel, deren relativer Brechungsindex m kleiner als eins ist oder die eine reflektierende Oberfläche besitzen, wie etwa Metallpartikel, ist ein Fangen mit der im letzten Abschnitt beschriebenen Form der optischen Pinzette nicht möglich, da auf Grund der veränderten Brechungsverhältnisse bzw. der Reflektion der resultierende Impuls derart an das Partikel übertragen wird, dass es aus dem Laserstrahl verdrängt wird. [143, 144] Der Aufbau der Falle muss daher an die veränderten Verhältnisse angepasst werden.

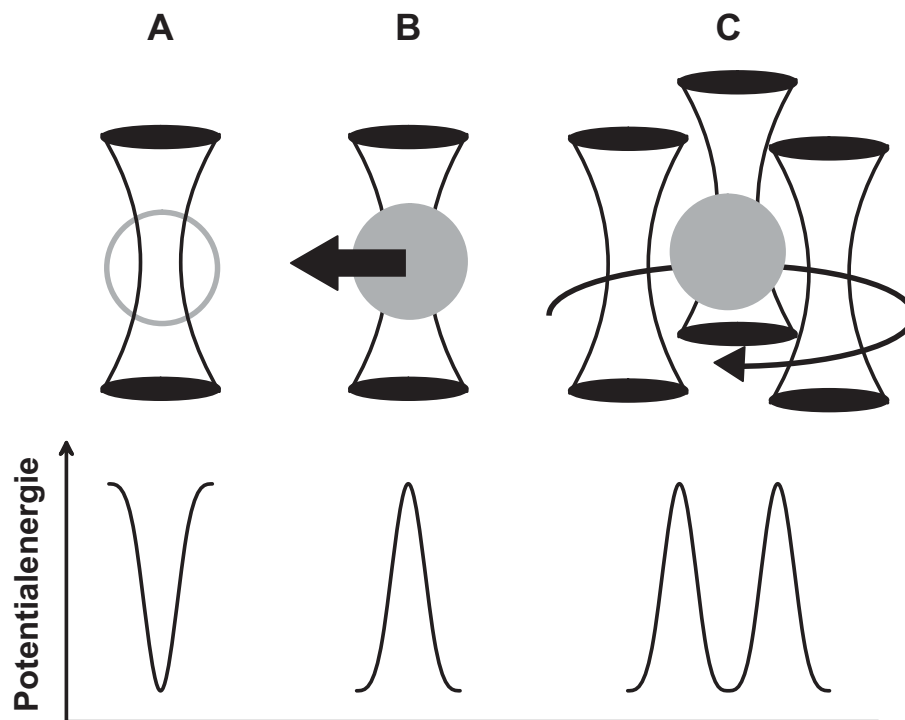


Abb. 2.5: Schematische Darstellung von verschiedenen Partikeln in Wechselwirkung mit dem Laserstrahl (oben) und die entsprechenden Potentialenergieverhältnisse (unten). [143, 144]

Um sich ein Bild über die unterschiedlichen Bedingungen in der Gradientenfalle machen zu können, wurde die Abb. 2.5 eingefügt. Die obere Reihe in der Schema-

zeichnung zeigt die Verhältnisse für die verschiedenen möglichen Fälle, während in der unteren Reihe die entsprechenden Potentialenergieverhältnisse dargestellt sind. Fall A entspricht der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Situation. Ein transparentes Partikel mit einem relativen Brechungsindex von $m > 1$ wird durch den Laser erfasst und kann stabil im Fokus gehalten werden. Für das Partikel befindet sich im Laserfokus ein Potentialenergieminimum. Fall B beschreibt den Effekt der optischen Gradientenfalle auf ein Partikel, dessen relativer Brechungsindex $m < 1$ ist oder das eine reflektierende Oberfläche besitzt, wie etwa Metallpartikel. Durch die umgekehrten Kräfteverhältnisse wird das Partikel aus dem Laserstrahl verdrängt, es besteht für das Partikel ein Potentialenergiemaximum im Laserfokus.

Um dennoch Partikel mit den letztgenannten Eigenschaften stabil fangen zu können, müssen die Eigenschaften des Lasers also dahingehend verändert werden, dass sich in der optischen Achse des Aufbaus ein Potentialenergieminimum bilden kann. Dies ist durch verschiedene Möglichkeiten zu erreichen. Beispielsweise kann man einen Laser verwenden, der nicht mit einer TEM_{00} -Mode betrieben wird und ein Gauß-förmiges Intensitätsprofil mit dem Maximum in der Strahlachse besitzt. Stattdessen kann man einen Laser mit einer TEM_{01}^* -Mode (*Donut-Mode*), die ein ringförmiges Intensitätsmaximum auf einer Kreisbahn um und eine Energieminimum in der Strahlachse besitzt, einsetzen. [3] Diese Lösung ist jedoch mit mehreren Nachteilen verbunden. Zum einen ist der Betrieb eines Lasers mit einer solchen Modenkonfiguration schwieriger als der Betrieb mit einer TEM_{00} -Mode, da eine entsprechende Modenblende für den Laser angefertigt und justiert werden muss. Zum anderen wäre durch die mit der Modenblende festgelegten Geometrie auch gleichzeitig die Größe (oder: ein eng umgrenzter Größenbereich) für ideal zu fangende Partikel festgelegt.

Eine andere Möglichkeit zum Fangen von Metallpartikeln mit einer optischen Gradientenfalle besteht darin, eine TEM_{01}^* -Mode des Lasers zu simulieren. Dies kann man erreichen, indem man einen Laser mit einer TEM_{00} -Mode um eine zentrale Achse rotieren lässt. [51] Diese Möglichkeit ist schematisch in Abb. 2.5 C darge-

stellt. Durch einen schnell um das zu fangende Partikel rotierenden Laser erfährt das Partikel im zeitlichen Mittel allseitig repulsiv wirkende Kräfte und kann so stabil gehalten werden. Dies wird auch nochmals durch die untere Reihe der Abbildung deutlich. Das für den Fall B dargestellte Potentialenergiemaximum wird durch die Rotation des Laserstrahls um das Partikel herum projiziert, so dass am Ort des Partikels auf der Rotationsachse ein lokales Potentialenergieminimum erzeugt wird. Die Rotation des Lasers lässt sich durch die periodische schnelle Verkippung von Spiegeln im Strahlengang des Fallenlasers erzeugen, wobei die Verkippung in x- und in y-Richtung phasenverschoben erfolgen muss. Diese Methode hat gegenüber der Verwendung einer echten TEM_{01}^* -Mode den Vorteil, flexibler zu sein. So muss beispielsweise keine Modenblende am Laser eingebaut werden und die räumliche Ausdehnung des durch die Rotation erzeugten lokalen Minimums kann einfach durch die Veränderung der Amplitude für die Verkippung variiert und damit an verschiedene Partikelgrößen angepasst werden.

3 Material und Methoden

Dieses Kapitel widmet sich der Beschreibung der verwendeten Geräte und der Methoden der Probenpräparation. Zu Beginn wird das verwendete Spektrometer und der Aufbau der mobilen Apparatur beschrieben. Danach wird auf die Herstellung und Verwendung der Glasfasersonde eingegangen. Der dritte Abschnitt dieses Kapitels behandelt die Implementierung der optischen Gradientenfalle in den bestehenden Aufbau. Nach einer kurzen Beschreibung der Kombination von Fasersonde und Gradientenfalle werden die Methoden zur Oberflächencharakterisierung der SERS-Substrate erläutert. Der letzte Abschnitt befasst sich mit der Präparation der in den Messungen verwendeten Proben.

3.1 Spektroskopische Untersuchungen

Die Raman-spektroskopischen Messungen wurden an einem Labram-System (Jobin–Yvon) und an einem mobilen System, das auf einem HE-Spektrometer (Jobin–Yvon) basiert, durchgeführt. Diese beiden Grundsysteme sollen im folgenden näher beschrieben werden.

3.1.1 Labram

Beim Labram-System (Jobin–Yvon) handelt es sich um ein auf einen hohen Lichtdurchsatz optimiertes Raman-Spektrometer, bei dem es möglich ist, ohne großen Justageaufwand zwischen verschiedenen Anregungslaserwellenlängen zu wechseln. In Abb. 3.1 ist der geräteinterne Strahlengang schematisch dargestellt.

Zur Anregung der Proben stehen die 514,5 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers (Spectra Physics, model 2016) und die 633 nm Linie des Labram-internen He:Ne-Lasers zur Verfügung. Der Wechsel zwischen den unterschiedlichen Anregungswellenlängen wird durch die Montage der entsprechenden Interferenz- (IF) und Notchfilter (NF) sowie eines zusätzlichen Spiegels M_a im Strahlengang ermöglicht. Der Justageaufwand beim Wechsel der Laserwellenlänge ist durch die spezielle Anordnung von Spiegeln und Notchfiltern sehr klein. Der Notchfilter, der in einem Rahmen vorjustiert ist, wird auf zwei Pfosten geschoben. Die Position der Pfosten und der Winkel bezüglich des einfallenden Laserstrahls, sowie des im Strahlengang vor dem Notchfilter positionierten Spiegels, können mittels einer kinematischen Aufhängung durch einen Spacer eingestellt werden. Der so in das Mikroskop eingekoppelte Laserstrahl wird durch ein Mikroskopobjektiv auf die Probe fokussiert. Die maximale Laserleistung auf der Probe beträgt bei Verwendung des Argon-Ionen-Lasers 50 mW und bei Verwendung des He:Ne-Lasers 1 mW. Diese Laserleistungen können im Bedarfsfall allerdings noch durch Geräte-interne Graufilter (GF) weiter abgeschwächt werden.

Zur Beobachtung und Justage der Probe kann diese durch zwei Weißlichtquellen,

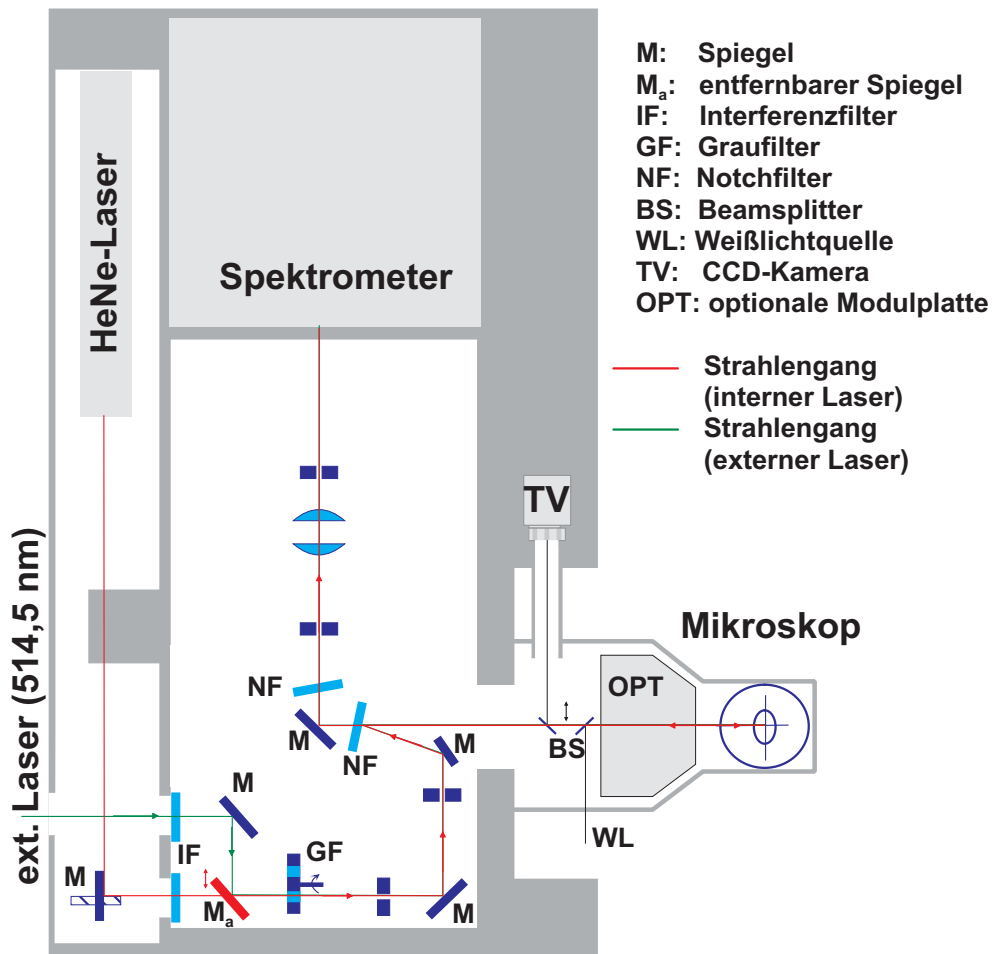


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Labram.

entweder im Durchlicht oder im Aufsicht (oder beides gleichzeitig), beleuchtet werden. Da das Mikroskop aus Sicherheitsgründen kein Okular besitzt, erfolgt die Beobachtung der Probe über eine TV-Kamera. Die Auskopplung der Bildinformation bzw. die Einkopplung des Weißlichts für die Aufsichtbeleuchtung in den Strahlengang erfolgt durch zwei bewegliche Strahlteiler (BS), die über einen Bajonettmechanismus während der Messung aus dem Strahlengang entfernt werden können.

Das von der Probe rückgestreute Laserlicht wird vom Mikroskopobjektiv (Olympus LMPlanFl 50x oder 100x) gesammelt und trifft wieder auf den Notchfilter (NF),

wobei der inelastisch gestreute Anteil des Laserlichts den Notchfilter passieren kann und über weitere Optiken zum Spektrometer geleitet wird. Das Spektrometer ist mit zwei verschiedenen Gittern (950 l/mm bzw. 1800 l/mm) ausgestattet, die für die unterschiedlichen Anregungswellenlängen optimiert sind. Die Detektion der Spektren erfolgt mit einer Peltier-gekühlten CCD-Kamera mit einem Aufnahme Fenster von 1024 x 256 Pixeln.

Die in Abb. 3.1 dargestellte optionale Modulplatte OPT kann in der Standardausführung des Labram entweder leer oder mit einer Autofokus-Einheit ausgerüstet sein (nicht dargestellt). Die von uns durchgeführte Modifikation wird in Abschnitt 3.3 beschrieben.

3.1.2 Mobiler Raman-Aufbau

Um Raman-Messungen an biologischen Proben vor Ort (d.h. außerhalb des Labors, im Feld) durchführen zu können, wurde eine transportable Raman-Apparatur unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Komponenten entwickelt. Bei der Auswahl der Komponenten standen insbesondere eine kompakte Bauweise und geringes

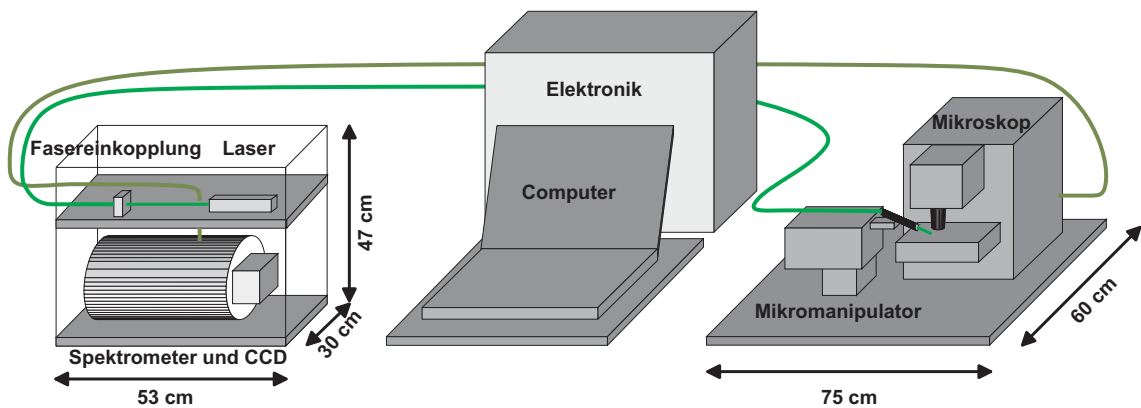


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau für die mobile Raman-Apparatur mit Spektrometermodul, Computer, Elektronik und Mikroskopmodul.

Gewicht sowie Robustheit gegenüber Stößen und Vibrationen im Vordergrund, um den Transport des Gerätes so einfach wie möglich gestalten zu können. Es wurde außerdem ein modularer Aufbau gewählt, da hierdurch das Verlademaß deutlich verringert werden konnte. Die Verbindung der einzelnen Module untereinander erfolgt durch Glasfaserkabel. Diese ermöglichen eine schnelle und flexible Übertragung der optischen Signale zwischen den Modulen bei minimalem Justageaufwand. Zum Einsatz kommen zwei vorkonfektionierte beidseitig mit SMA-Steckern versehene *Multi-mode*-Fasern mit einem Kerndurchmesser von 50 μm .

Im Folgenden werden nun die einzelnen Module mit den jeweils dazugehörenden Komponenten beschrieben.

Die mobile Raman-Apparatur besteht aus zwei Modulen, dem Spektrometermodul und dem Mikroskopmodul, und der zum Betrieb notwendigen Elektronik sowie einem Computer (Abb. 3.2; elektrische und Datenverbindungskabel wurden in der Schemazeichnung aus Übersichtlichkeitsgründen weggelassen).

Das Spektrometermodul (Abb. 3.3) beinhaltet den Laser und das Spektrometer. Die Komponenten beinhalten kaum bewegliche Bauteile und sind daher verhältnismäßig robust gegenüber Dejustage durch Transport oder Stöße. Als Laser wird ein CRL-GCL-100-S Diodengepumpter Festkörperlaser mit einer Wellenlänge von 532 nm (100 mW) verwendet. Für das Spektrometer kommt ein HIGH EFFICIENCY Raman-Process-Analyzer HE532 (Jobin-Yvon) mit Wright-CCD (1024 x 256 Pixel) als Detektor zum Einsatz, der auf diese Anregungswellenlänge optimiert ist. Die beiden Einzelkomponenten wurden in einen Rahmen aus Alu-Profilen verbaut, der sie beim Transport vor direkten Stößen schützt. Der Rahmen wurde mit einziehbaren Wänden ausgestattet und kann den Komponenten so zusätzlich auch Schutz vor Staub und in gewissem Maße vor Nässe bieten. Abb. 3.3 zeigt das Spektrometermodul mit geöffneten Seitenwänden. In der oberen Ebene ist der Laser (A) zu sehen und rechts davon die Fasereinkopplung (B), mit der der Laser in eine Glasfaser (B') eingekoppelt wird, die die Module verbindet. Direkt unter diese Ebene ist hängend das Netzteil für den Laser (C) montiert. Im unteren Teil des Moduls sitzt

das Spektrometer (D) mit der links angeflanschten CCD-Kamera (E). Außerdem ist noch die Glasfaser (F) zu sehen, die das Raman-Signal zum Spektrometer leitet. Sie wird durch eine Öffnung durch den Boden der oberen Ebene geführt und auf den Anschluss am Spektrometer geschraubt.

Das Mikroskopmodul (Abb. 3.4) besteht aus einer Grundplatte, auf der die einzelnen Komponenten montiert sind. Als Mikroskop kommt ein modifiziertes Olympus BX41 (A) mit einem Olympus LMPlanFl 50x Mikroskopobjektiv zum Einsatz. Zum Schutz vor Streulicht von außen und vor Windbewegungen während Messungen wurde um den Mikroskoptisch eine Schutzkammer gebaut, die außerdem zusätzlich noch die Mikroskopobjektive vor Staub und Stößen während des Transports schützen. Seitlich von der Lichtschutzabdeckung ist ein Leica Mikromanipulator L (C) montiert, der in erster Linie dazu dient, die Sondenspitze bei Verwendung der Fasersonde (siehe Kapitel 3.2) auf der Probe zu positionieren, aber auch zur Manipulation der Proben selbst verwendet werden kann. Der Manipulatorarm erhält durch eine seitliche Öffnung im Lichtschutz (B) Zugang zum Mikroskoptisch. Diese Öffnung wird während der Messungen durch eine flexible Stoffmanschette (Abb. 3.5) gegen Lichteinfall abgedichtet. Die für die Probenbetrachtung notwendige Weißlichtquelle (WL) ist mit dem Mikroskop durch Lichtleiterkabel verbunden und erlaubt die Beleuchtung der Proben sowohl im Durch- als auch im Auflichtmodus. Hinter dem Mikromanipulator sind außerdem noch die Fasereinkopplung (D) zur Einkopplung des Anregungslasers in die Fasersonde und der direkte Anschluss für den Anregungslaser an das Mikroskop (E) zu sehen.

In Abb. 3.6 ist ein Teil des Strahlengangs für Laser und Signale für konventionelle Mikro-Raman-Messungen anhand der geöffneten Mikroskoprückwand dargestellt. Der Strahlengang ist in analoger Weise wie der des Labram mit entsprechenden Anpassungen an die Erfordernisse des Geräts und der Glasfaseranbindung aufgebaut. Der Laser wird durch das Glasfaserkabel (bei A, nicht sichtbar) in das Mikroskop eingekoppelt und über verschiedene optische Elemente auf den Notchfilter B gelenkt. Die Notchfilterkonfiguration ist wie die des Labram-Systems einstellbar, d. h.

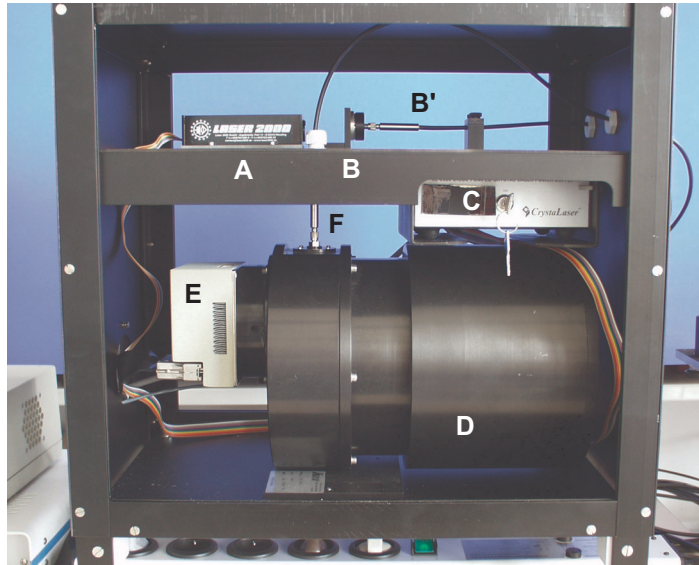


Abb. 3.3: Spektrometermodul mit offenen Seitenwänden. A: Laser; B: Fasereinkopplung; B': Glasfaserkabel für die Übertragung des Anregungslasers; C: Netzteil für den Laser; D: Spektrometer; E: CCD-Kamera; F: Glasfaserkabel für die Übertragung des Raman-Signals.

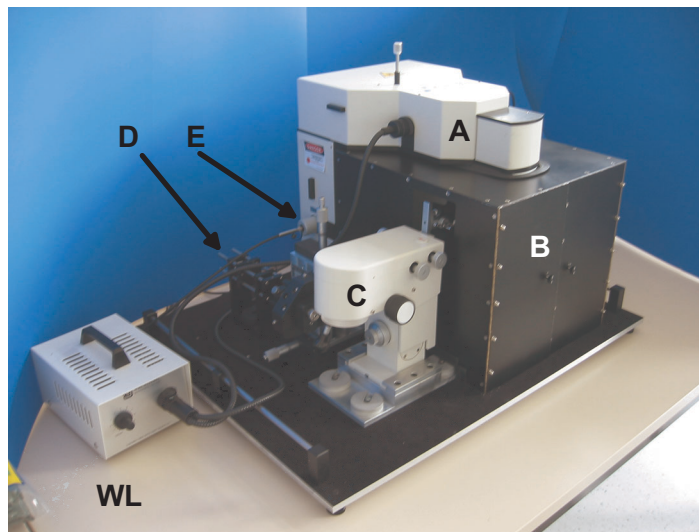


Abb. 3.4: Mikroskopmodul mit dem eigentlichen Mikroskopgrundkörper (A), angebautem Licht- und Windschutz (B), Mikromanipulator (C), Weißlichtquelle (WL), Faserkopplung zur Verwendung der Fasersonde (D) und Anschluss für den Laserinput (E).



Abb. 3.5: Stoffmanschette zur Abdeckung der Öffnung für den Mikromanipulator im Licht- und Windschutz des Mikroskopmoduls.

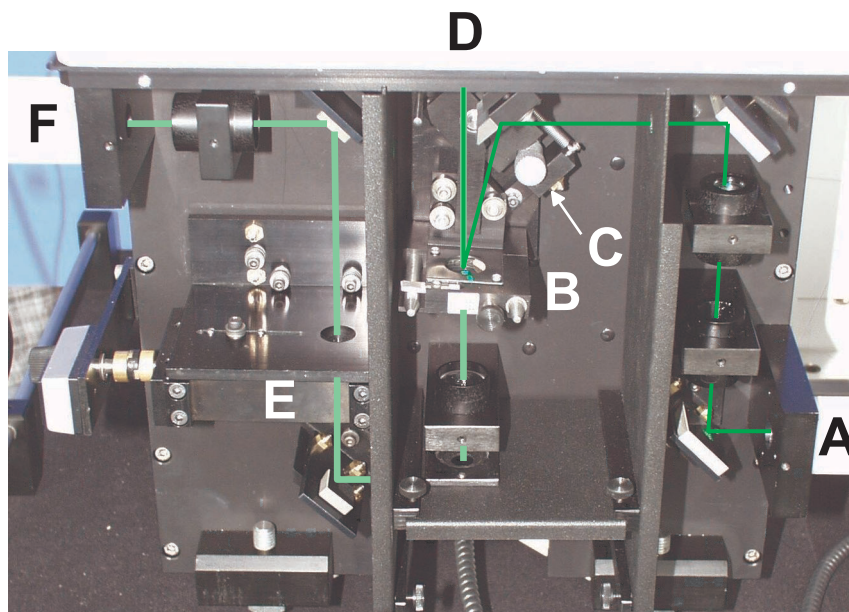


Abb. 3.6: Strahlengang von Anregungslaser und Signal im Mikroskop.

der Winkel des Notchfilters zum Laserstrahl ist durch einen Spacer (C) festzulegen. Der Laser wird am Notchfilter reflektiert und gelangt in Richtung D über weitere optische Elemente zur Probe (hier nicht gezeigt). Das inelastisch gestreute Licht gelangt über den selben Strahlengang zurück und kann den Notchfilter passieren. Bei E passiert der Strahl eine einstellbare Irisblende, wodurch auch konfokale Messungen möglich sind. Bei F wird das Signal in ein zweites Glasfaserkabel eingekoppelt und zum Spektrometer übertragen.

Bei Verwendung der Glasfasersonde wird der Anregungslaser vom Glasfaserkabel (Abb. 3.7, (A)) durch einen aufgeschraubten Kollimator (B) parallelisiert und anschließend durch ein Mikroskopobjektiv in die Sondenfaser eingekoppelt (C). Eine eingehende Beschreibung der Glasfasersonde und der Einkopplung des Lasers in dieselbe erfolgt in Abschnitt 3.2.

Die Positionierung der Sondenspitze auf der Probe erfolgt mit Hilfe eines Leica Mikromanipulators L. Die in Abb. 3.8 gezeigte Fotografie wurde der Übersicht wegen ohne Lichtschutz aufgenommen.

Für die Module wurde ein Wagen konstruiert, der eine problemlose Bewegung des Geräts auch in unebenem Gelände erlaubt, und nahezu alle Komponenten des Aufbaus für den Transport aufnehmen kann.

Die Abb. 3.9 zeigt den Wagen in verschiedenen Konfigurationen. In Bild A ist der Wagen in seiner „Nutzungs“-Konfiguration zu sehen. Das Mikroskopmodul sitzt dabei auf dem oberen Rahmen des Wagens und wird durch 4 Flügelmuttern fixiert. Im unteren Teil des Wagens finden das Spektrometermodul, der Computer und die gesamte Elektronik Platz. Der Wagen erlaubt durch seine dicke Gummibereifung auch ein Fahren in unbefestigtem Gelände, wie etwa Schotterwegen oder Wiesen. Bei der Konstruktion des Wagens wurde bewusst auf eine Lenkbarkeit der Räder verzichtet. Hierdurch kann die Gefahr minimiert werden, dass sich ein gelenktes Rad in einer Bodenunebenheit verfangen und den Wagen zum Umstürzen bringen könnte. Bild B zeigt den Wagen im Transport-Zustand. Hierfür wird die untere Ebene des Wagens entladen und die Sicherung des Mikroskopmoduls gelöst. Dieses kann dann auf

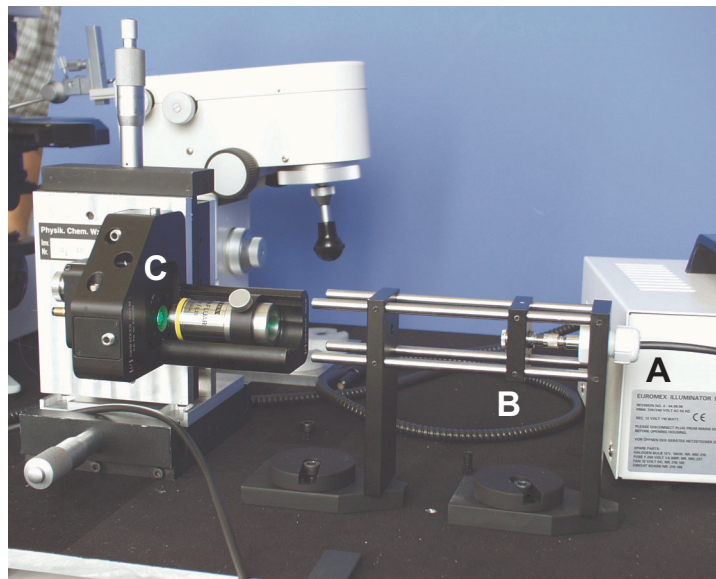


Abb. 3.7: Anordnung zur Einkopplung des Anregungslasers vom Glasfaserkabel in die Glasfaser der Fasersonde. A: Glasfaserkabel; B: Kollimator; C: Fasereinkopplung.

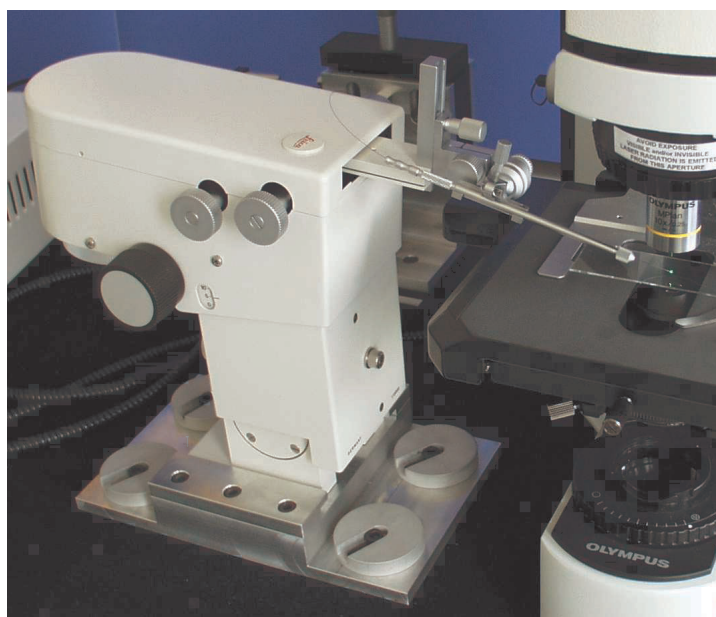


Abb. 3.8: Mikromanipulator mit Glasfasersonde.

die untere Ebene des Wagens gesetzt werden, bevor der Tragrahmen des Wagens zusammengeschoben wird. Auf diese Weise wird das Verlademaß des Wagens um etwa 50 % verringert und das Mikroskopmodul ist durch die umgebende Rahmenkonstruktion während des Transports vor Stößen geschützt. Mit dem verringerten Verlademaß ist es nun möglich, sämtliche für den Betrieb der transportablen Apparatur notwendigen Komponenten in einem VW Golf IV (Bild C) zu transportieren.

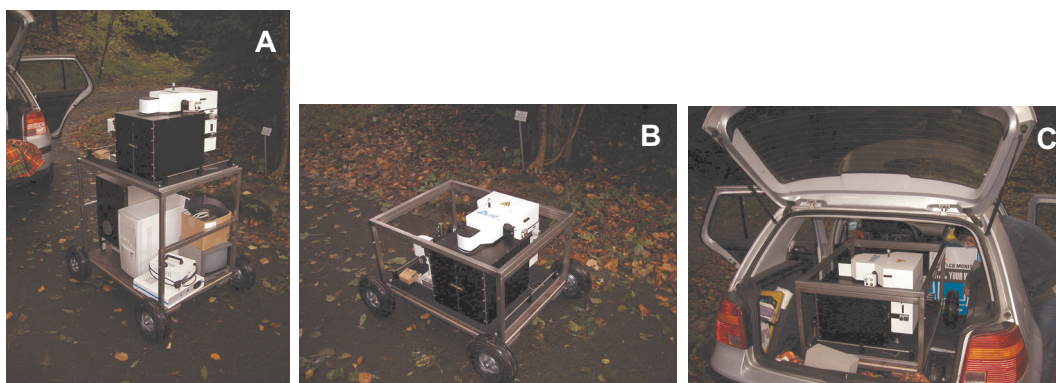


Abb. 3.9: Transportwagen für die mobile Apparatur. A: Wagen mit Modulen; B: Wagen mit Mikroskopmodul in Transportkonfiguration; C: Wagen verladen in einem VW Golf IV.



Abb. 3.10: Mobile Raman-Apparatur bei leichtem Nieselregen im Botanischen Garten der Universität Würzburg aus verschiedenen Perspektiven.

Um eine universelle Einsatzfähigkeit des mobilen Gerätes zu ermöglichen, wur-

de bei der Auswahl der Komponenten darauf geachtet, dass die Stromaufnahme möglichst gering ist. Daher ist auch ein netzunabhängiger Betrieb möglich, bei dem die Stromversorgung durch ein kleines Diesel- oder Benzin-betriebenes Generatoraggregat sichergestellt werden kann. In Abb. 3.10 ist ein Foto des Aufbaus zu sehen, das bei leichtem Nieselregen im Botanischen Garten der Universität Würzburg aufgenommen wurde. Das für die Stromversorgung verwendete Aggregat ist im rechten Bild zu erkennen.

Der gesamte Aufbau ist aufgrund seiner Bauweise verhältnismäßig unempfindlich gegen Witterungseinflüsse, solange die elektronischen Komponenten vor direktem Regen geschützt sind.

Der im Bild sichtbare Tisch wurde zur Ablage von Bildschirm, Tastatur und Maus verwendet. Außerdem wurden auf ihm die Probenpräparationen durchgeführt. Diese Trennung zwischen Mikroskopmodul und Präparationsarbeitsplatz hat den Vorteil, dass das Mikroskop während der Messungen nicht durch Vibrationen beeinflusst wird, die durch Präparationsarbeiten oder Eingaben mit Tastatur oder Maus entstehen können.

3.2 Glasfasersonde

Zur Untersuchung kleiner und empfindlicher Strukturen bei hoher Ortsauflösung wurde eine Glasfasersonde entwickelt und erprobt.

Abb. 3.11 zeigt schematisch die Position der Sondenspitze an der Probe unter dem Mikroskop. Zur Messung der Raman-Spektren mit der Glasfasersonde wird der Anregungslaser in die Glasfaser eingekoppelt und die Sondenspitze mit einem mechanischen Mikromanipulator (Leica) auf der Probe positioniert. Zur Anregung von Raman-Streulicht wurde die 514,5 nm Laserlinie eines Spectra Physics model 2016 Argon-Ionen-Lasers verwendet. Das von der Probe gestreute Licht wird durch ein Mikroskopobjektiv (Olympus LMPlanFl 50x) gesammelt und zum Spektrometer geleitet. Durch einen Notchfilter wird dabei das elastische Streulicht des Lasers

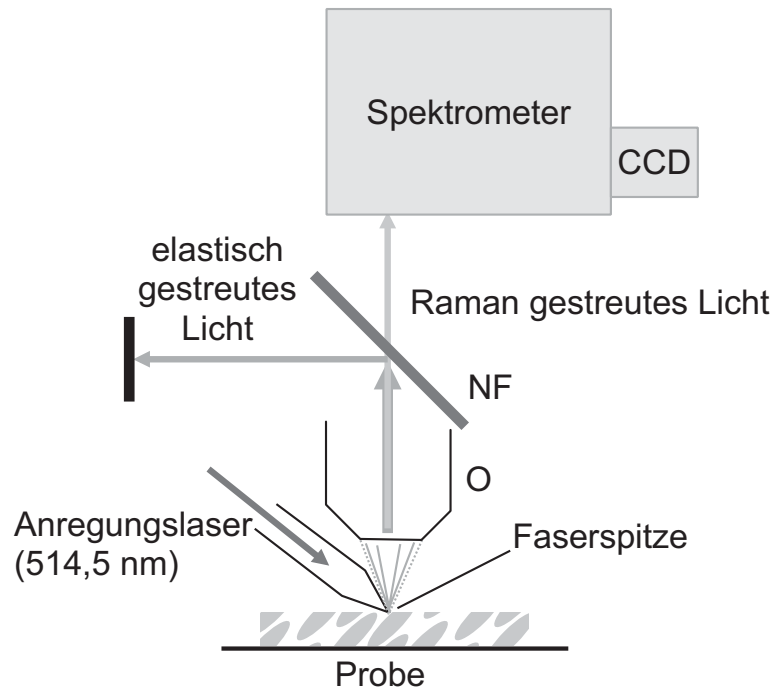


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des Meßsetups. O: Mikroskopobjektiv; NF: Notchfilter

unterdrückt.

In den folgenden Abschnitten wird zunächst die Herstellung der Sondenspitze durch Ätzung und die Funktionalisierung der Spitze beschrieben. Danach wird die Einbindung der Glasfasersonde in das Labram-Setup erläutert.

3.2.1 Herstellung der Sondenspitze durch Ätzen der Glasfaser

Zur Herstellung der Glasfaserspitzen werden die Fasern mit Flußsäure geätzt, wobei vor dem Ätzvorgang das Kunststoffjacket nicht vom Faserende entfernt wird. Die Methode des *tube etching* [60] und die dafür nötige Halterung wurden nach der Vorschrift von Stöckle et al. übernommen und wurden in dieser Form bereits angewandt. Eine genaue Beschreibung ist in der Literatur zu finden. [136]

Zur Herstellung der Fasersonde wurden Alcatel *Single-mode*-Fasern mit einem

Kerndurchmesser von $9\ \mu\text{m}$ und einem Cladding-Durchmesser von $125\ \mu\text{m}$, sowie einem Außendurchmesser des Kunststoffjackets von $250\ \mu\text{m}$ verwendet.

Es wurden ebenfalls Alcatel *Multi-mode*-Fasern mit einem Kerndurchmesser von $50\ \mu\text{m}$ und einem Cladding-Durchmesser von $125\ \mu\text{m}$, sowie einem Außendurchmesser des Kunststoffjackets von $250\ \mu\text{m}$ getestet, jedoch haben sich diese als ungeeignet erwiesen. Beim Ätzen der Glasfaser wird das Material des Kerns stärker von der Flußsäure angegriffen als das Cladding, wodurch es nicht zu der gewünschten Ausbildung einer Faserspitze kommt.

Um die SERS-aktive Metall-Schicht auf die Glasfaserspitzen aufzubringen, wurden drei verschiedene Methoden verwendet und in ihren Anwendungsmöglichkeiten getestet.

3.2.2 Vakuum-Bedampfung

Ein Teil der geätzten Glasfaserspitzen wurde in einer Vakuum-Bedampfungsanlage (Edwards Aufdampfanlage 610) mit Silber bzw. Gold bedampft. Die Bedampfung wurde am Institut für Physik (Universität Würzburg) durchgeführt. Hierfür werden die Glasfasern in ihren Halterungen in einer Vakuumkammer über einem beheizbaren Wolframschiffchen positioniert, das mit Silber bzw. Gold bestückt wird und als Metalldampfquelle dient. Anschließend wird die Kammer evakuiert und der Heizstrom angeschaltet. Über einen parallel zur Probe angebrachten Schwingquartzsensor kann sowohl die Aufdampftrate als auch die gesamte aufgebracht Schichtdicke kontrolliert werden. Die so auf die Fasern aufgedampfte Silber-Schicht hat nach den Messungen mit dem Sensor eine Dicke von $40\text{--}80\ \text{nm}$. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche auf den Fasern aufgebrauchte Schichtdicke von diesen Werten abweicht, da die Fasern senkrecht zur Silber-Quelle hängen, und damit dem Silber-Dampf nur wenig Fläche bieten.

3.2.3 Nasschemische Beschichtung

Für einige Glasfasern wurde versucht, eine SERS-aktive Silber-Beschichtung zu schaffen, indem aus einer Silbernitrat-Lösung durch Reduktion mit Natriumcitrat ein Silber-Kolloid hergestellt wird. Die Faserspitzen wurden hierzu in die Silbernitrat-Lösung gehängt. Die Vorschrift entspricht dabei den Anweisungen von Lee und Meisel [56] zur Herstellung eines Silber-Kolloids, jedoch wurde nicht gerührt, um die Faserspitzen nicht zu beschädigen.

3.2.4 Funktionalisierung der Glasfaseroberfläche

Für einen anderen Teil der Glasfasern wurde vor der Beschichtung mit Silber die Glasoberfläche mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) funktionalisiert, um eine bessere Haftung des Silbers auf der Glasfaserspitze zu erreichen. [134, 145]

Um sicherzustellen, dass auf den Faserspitzen vor der Funktionalisierung keine Reste des Kunststoffjackets mehr haften, wird die Oberfläche durch einstündiges Einhängen in konzentrierte Schwefelsäure mit gelöstem Kaliumpermanganat (Mischungsverhältnis: 10 mg KMnO_4 auf 100 ml H_2SO_4) nochmals gereinigt. Bei der Handhabung dieser Lösung ist besondere Vorsicht angebracht, da sie nicht nur stark ätzend, sondern auch stark oxidierend wirkt und bei Kontakt mit organischen Stoffen explosiv reagieren kann. Anschließend werden die Faserspitzen mit destilliertem Wasser und schließlich mit Methanol gespült.

Die so vorbereiteten Faserenden werden für 24 Stunden in eine 1:4 v/v Lösung von APTMS in Methanol eingehängt. Danach wird überschüssiges Silan durch Waschen mit Methanol entfernt und die Fasern werden für 24 Stunden an der Luft ausgehärtet.

Auf die funktionalisierte Oberfläche wird die Silber-Schicht entweder durch Adsorption aus einem wässrigen Kolloid, welches nach der Vorschrift von Lee und Meisel [56] hergestellt wurde, oder, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, durch Bedampfung mit Silber im Vakuum aufgebracht. Die bessere Haftung des Silbers auf

der funktionalisierten Oberfläche beruht dabei darauf, dass die Aminogruppe des Silans und das aufgetragene Silber eine Bindung eingehen.

3.2.5 Einkopplung des Lasers in die Glasfaser

Zur Einkopplung des Anregungslasers in die Sondenglasfaser wird ein Faser-Positionierer Modell 9131 (New Focus; Abb. 3.12) mit einem Zeiss MFluar 10x bzw. einem Olympus ULWD 20x Mikroskopobjektiv verwendet. Der Laser wird durch das Mikroskopobjektiv auf das Ende der Glasfaser fokussiert. Die Justage erfolgt durch Translation und Verkippung der Faser, bis das Faserende genau mit dem Laserfokus zusammenfällt. Eine Kontrolle erfolgt durch Messung der Leistung am anderen Faserende.

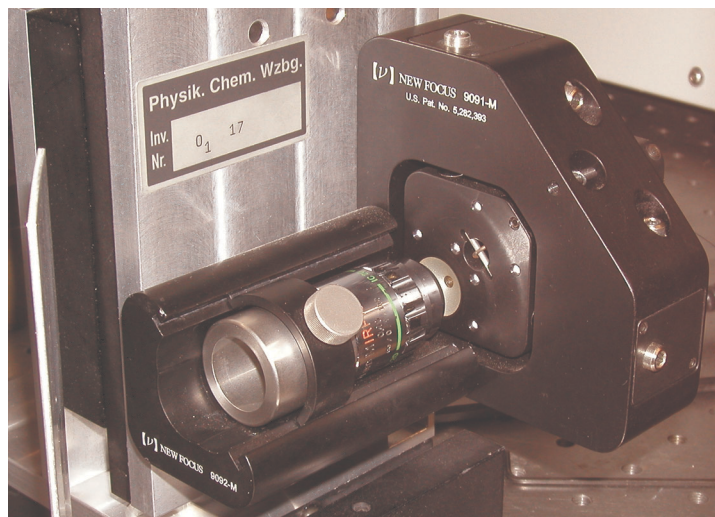


Abb. 3.12: Fotografie des Faserkopplers.

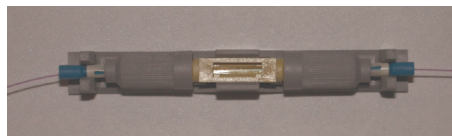


Abb. 3.13: Kupplung (*splice*) zur „justagearmen“ Übertragung von Licht von einer Glasfaser zur nächsten.

3.2.6 Fasersplicing

Um bei Benutzung der Fasersonde eine schnelle Austauschbarkeit der Sondenspitze zu erreichen, wird ein *single mode fiber to fiber splice* von Thorlabs verwendet (Abb.3.13).

Dieser dient dazu, das Laserlicht von einem Faserstück zum nächsten zu übertragen. Dazu werden an den beiden zu verbindenden Enden der Glasfasern zunächst die Jackets entfernt und eine saubere Endfläche geschaffen. Die so erzeugten Glasfaserenden werden dann vorsichtig in die Kupplung eingeführt, die aus einer Kunststoffführung und einer Glaskapillare besteht, die mit einem *index matching gel* gefüllt ist. Die Endflächen der Glasfasern werden in der Kapillare in Kontakt gebracht, wobei das Gel dafür sorgt, dass die Verluste durch Brechung möglichst klein bleiben. Die Position der Glasfaser in der Kapillare kann dabei über das Sichtfenster kontrolliert werden.

3.3 Optische Gradientenfalle

Zum Fangen bzw. zur Stabilisierung von Mikropartikeln oder Mikroorganismen in Lösungen wurde eine optische Gradientenfalle (optische Pinzette) am Labram realisiert. Die hierfür notwendigen Modifikationen am Standard-Aufbau des Labram werden im folgenden beschrieben.

Die Implementierung der Gradientenfalle am Labram-System von Jobin-Yvon wurde mit einem Nd:YAG-Laser (MBB medilas, 1064 nm, ca. 50 mW auf der Probe) als Fallenlaser realisiert. Die Raman-Spektren, die im sichtbaren Spektralbereich aufgenommen werden, werden durch den Fallenlaser nicht beeinflusst. Zusätzlich wird bei dieser Wellenlänge die Anregung von Fluoreszenz seitens des Fallenlasers vermieden.

Zur Fokussierung der Laser wurden Olympus ULWD 80x, LMPlanFl 50x bzw. 100x Mikroskopobjektive und ein Zeiss C-Apochromat 40x Wasserimmersions-

objektiv verwendet.

Für die Realisierung der optischen Gradientenfalle im Labram wurden zwei unterschiedliche Lösungswege erarbeitet, die im Folgenden vorgestellt werden sollen. In beiden Fällen muss dafür Sorge getragen werden, dass der Fokus des Fallenlasers und der des Anregungslasers an der gleichen Position sind.

3.3.1 Ein–Mikroskopobjektiv–Anordnung

Das Setup und der Strahlengang für die Implementierung der Gradientenfalle in das Labram-System sind in Abb. 3.14 dargestellt. Der Fallenlaser wird in ähnlicher Weise wie der Anregungslaser durch einen für das sichtbare Licht transparenten IR-Spiegel in den Strahlengang eingekoppelt. Der IR-Spiegel ist auf einer beweglichen Platte (OPT) montiert, um ihn aus dem Strahlengang entfernen zu können, wenn er nicht benötigt wird. Das von der Probe gestreute Licht wird durch das Mikroskopobjektiv gesammelt. Der IR-Spiegel reflektiert den Fallenlaser, lässt aber den Anregungslaser und das Raman-Streulicht passieren.

Die Position des Fallenlaserfokus bezüglich des Fokus des Anregungslasers kann durch Verkippung der beiden IR-Spiegel M_{IR} beeinflusst werden. In Abb. 3.15 ist die Anordnung der optischen Elemente dargestellt, wie sie in den Strahlengang des Anregungslasers (D) eingebracht werden, um beide Laserstrahlen kollinear justieren zu können. Der Notchfilter (C) soll zum einen den Strahlversatz des Anregungslasers, der durch den IR-Spiegel (B) verursacht wird, ausgleichen, als auch die anderen optischen Elemente des Labram vor einer Beschädigung durch den Fallenlaser (A) schützen.

3.3.2 Zwei–Mikroskopobjektiv–Anordnung

Eine weitere Möglichkeit zur Verwirklichung der optischen Pinzette mit dem Labram-System soll in diesem Abschnitt vorgestellt werden. Hier wird der Fallenlaser von unterhalb der Objektischebene eingekoppelt (Abb. 3.16). Für dieses Setup

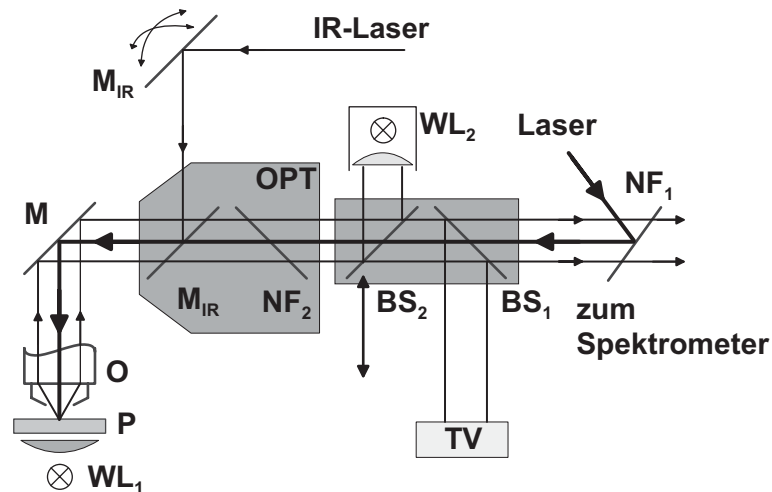


Abb. 3.14: Aufbau der Gradientenfalle: NF_1 : Notchfilter-System zur Einkopplung des Anregungslasers; M: Spiegel; $WL_{1,2}$: Weißlichtquellen; $BS_{1,2}$: Strahlteiler; Fallenlaser: Nd:YAG-Laser (1064 nm); NF_2 : Notchfilter zum Ausfiltern des Fallenlasers und zur Korrektur des Strahlengangs; M_{IR} : IR-Spiegel; O: Mikroskopobjektiv; P: Probe.

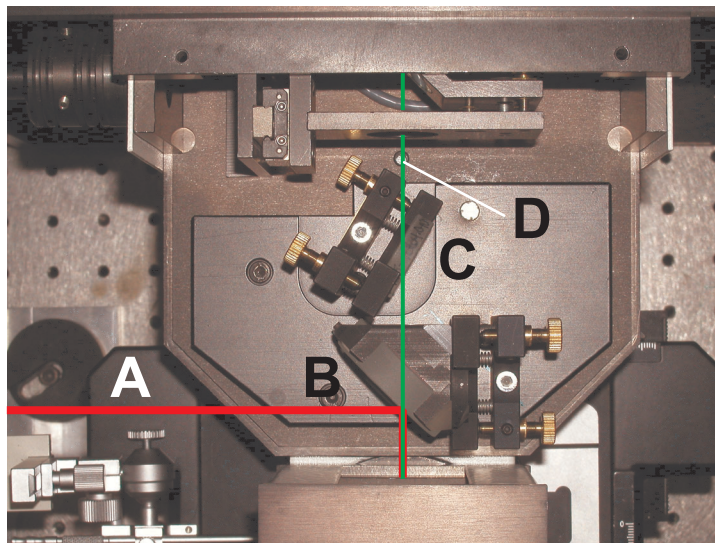


Abb. 3.15: Fotografie der zur Fallenimplementierung notwendigen optischen Elemente. A: Fallenlaser (rot); B: IR-Spiegel; C: Notchfilter zum Ausfiltern des Fallenlasers und zur Korrektur des Strahlengangs; D: Anregungslaser (grün).

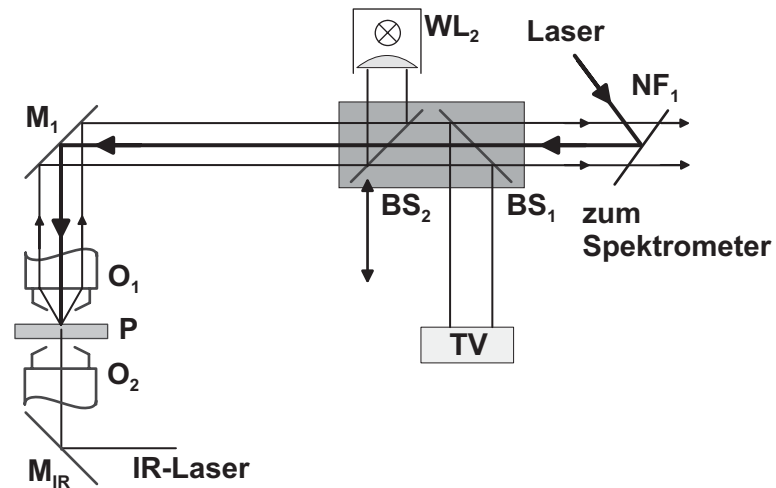


Abb. 3.16: Experimentelles Setup der Gradientenfalle mit inversem Aufbau: Anregungslaser (514.5 nm oder 633 nm); NF_1 : Notchfilter-System zur Einkopplung des Anregungslasers; M_1 : Spiegel; WL_2 : Weißlichtquelle; $BS_{1,2}$: Strahlteiler; O: Mikroskopobjektiv; S: Probe; O_2 : Mikroskopobjektiv für den Fallenlaser.

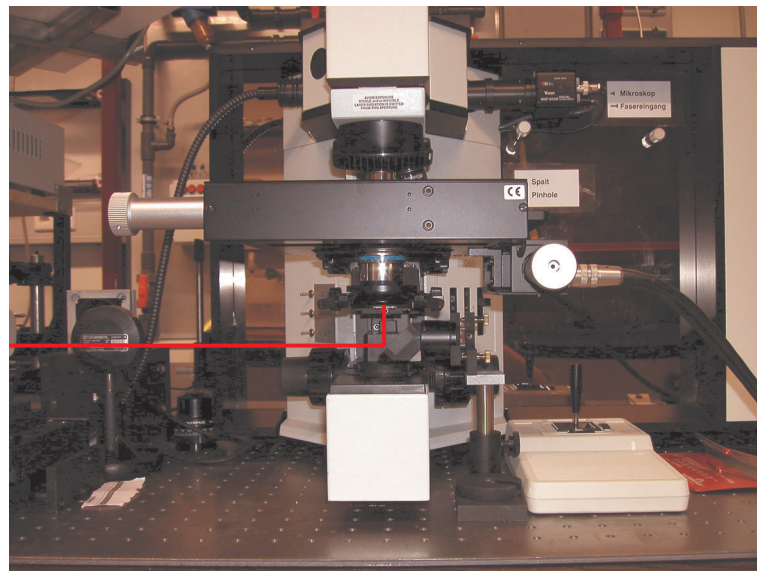


Abb. 3.17: Photographie des inversen Fallen-Setups. Die rote Linie repräsentiert den Strahlengang des Fallenlasers.

ist es notwendig, den Kondensator unterhalb des Objektisches auszubauen und durch einen Spiegel und ein zusätzliches Mikroskopobjektiv für den Fallenlaser zu ersetzen. Durch den inversen Aufbau der Falle tragen nicht nur die durch den Fallenlaser erzeugten Gradientenkräfte dazu bei, das gefangene Partikel gegen die Schwerkraft in der Schwebe zu halten, sondern auch der Strahlungsdruck. Damit ist es möglich, auch größere und schwerere Partikel zu fangen. Allerdings sind mit diesem Aufbau auch Nachteile verbunden. So wird durch den Ersatz des Kondensators durch das zweite Mikroskopobjektiv und die damit verbundene schlechtere Ausleuchtung der Probe die visuelle Erfassbarkeit durch die TV-Kamera sehr schlecht. Die Überprüfung, ob man das gewünschte Partikel fangen konnte, wird dann sehr schwierig.

Die Fotografie in Abb. 3.17 zeigt den realisierten Aufbau. Die rote Linie beschreibt den Strahlengang des Fallenlasers.

3.3.3 Optische Gradientenfalle für Metallpartikel

Um mit der optischen Gradientenfalle Metall- bzw. reflektierende Partikel oder Partikel mit einem relativen Brechungsindex $m < 1$ fangen zu können, sind Anpassungen am Aufbau nötig. Wie bereits in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, benötigt man zum Fangen eines derartigen Mikropartikels ein lokales Minimum in der Laserintensität, wie es beispielsweise durch eine TEM_{01}^* -Mode erzeugt werden kann. Eine derartige Mode wird simuliert, indem man den Fallenlaser schnell um ein Zentrum rotieren lässt, in dem die Metallpartikel gefangen werden sollen. Hierzu wird der Strahlengang des Fallenlasers auf einer kreisförmigen Bahn geführt, so dass er das zu fangende Partikel „umkreisen“ kann. Dies kann man erreichen, indem man den Laser mit Hilfe eines Piezo-gesteuerten Spiegels periodisch und phasenverschoben in zwei Raumrichtungen auslenkt. In der schematischen Darstellung des Aufbaus (Abb. 3.14) ist dies durch die beiden Doppelpfeile am ersten Spiegel des IR-Laser-Strahlengangs angedeutet. Selbstverständlich ist es aber auch möglich, diese Option bei dem in Abb. 3.16 beschriebenen Aufbau einzusetzen. Zur Auslenkung des Spiegels wurde

ein Spindler & Hoyer Torque-Drive TD3-200 und ein Piezo-Spiegelversteller PS-5 verwendet. Die Elektronik zur Erzeugung des Eingangssignals für die Steuerung wurde in der Elektronikwerkstatt des Instituts entwickelt und gebaut.

3.4 Kombination von Glasfasersonde und optischer Gradientenfalle

Für die Kombination der Glasfasersonde mit der optischen Gradientenfalle musste der Aufbau für die Glasfasersonde angepasst werden. Das für die optische Gradientenfalle verwendete Wasserimmersionsobjektiv bedingt durch seinen sehr kleinen Arbeitsabstand von nur 0,22 mm und seinem im Verhältnis zu anderen Mikroskopobjektiven großen Durchmesser, dass die Glasfasersonde waagrecht an den Fokus der optischen Gradientenfalle herangeführt werden muss. Außerdem muss die Sonde gleichzeitig in die Suspension geführt werden, in der das zu untersuchende Partikel vorliegt und gefangen werden soll.

Hierzu wurde der in Abb. 3.18 gezeigte Aufbau verwendet. Für die Messung wird ein Tropfen (20 μl) der Probensuspension auf einen Objektträger gebracht, an drei Seiten mit einem Wulst aus Schliff fett umgeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Der Objektträger wird dann so auf den Mikroskopisch positioniert, dass die Glasfasersonde mit dem Mikromanipulator durch die offene Seite der improvisierten Küvette in den Suspensionstropfen eingeführt werden kann.

Die Spitze der Glasfasersonde wird dann in die Suspension eingeführt und so justiert, dass die Spitze am Rand des Abbildungsbereich des Mikroskopobjektivs erscheint. Dabei ist es wichtig, dass die Glasfasersonde nicht in den Fokus des Fallenlasers gelangt, da es sonst durch lokale Absorption und Erhitzung an der Oberfläche der Sonde zur Bildung von Dampfblasen kommen kann, die es unmöglich machen würden, in diesem Bildausschnitt weiter zu arbeiten. Anschließend wird das zu untersuchende Partikel mit dem Fallenlaser gefangen und die Glasfaserspitze vor-

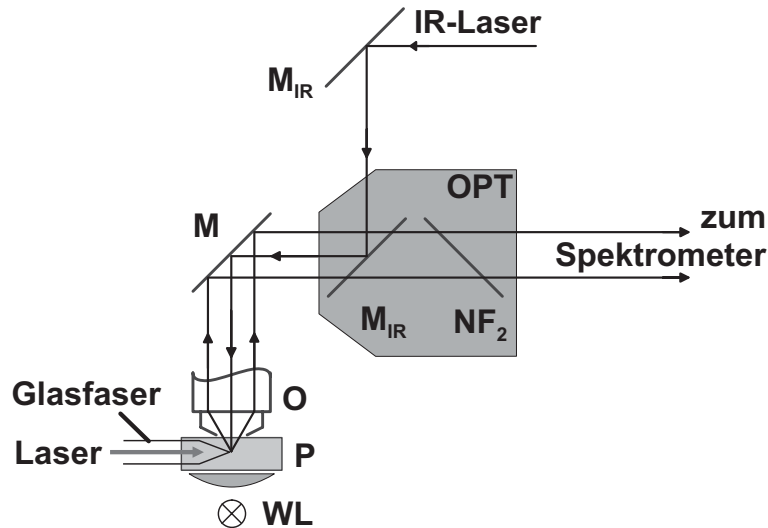


Abb. 3.18: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Messung an der mit der optischen Gradientenfalle kombinierten Glasfasersonde. M: Spiegel; M_{IR} : IR-Spiegel zur Ein- und Auskopplung des Fallenlasers; NF_2 : Notchfilter zum Ausfiltern des Fallenlasers und zur Korrektur des Strahlengangs; O: Mikroskopobjektiv; P: Probenküvette; WL: Weißlichtquelle.

sichtig mit dem Mikromanipulator an das gefangene Objekt herangeführt. Abb. 3.19 zeigt eine Fotografie der räumlichen Anordnung der Komponenten, aus der schnell deutlich wird, dass sämtliche Komponenten auf engstem Raum zusammen gebracht werden müssen und daher eine unachtsame Justage dazu führen kann, dass die Glasfasersonde abbricht.

3.5 Oberflächencharakterisierung

3.5.1 Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird ein Zeiss DSM 940 Raster-elektronenmikroskop (REM) verwendet. Die Messungen wurden am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde (Universität Würzburg)

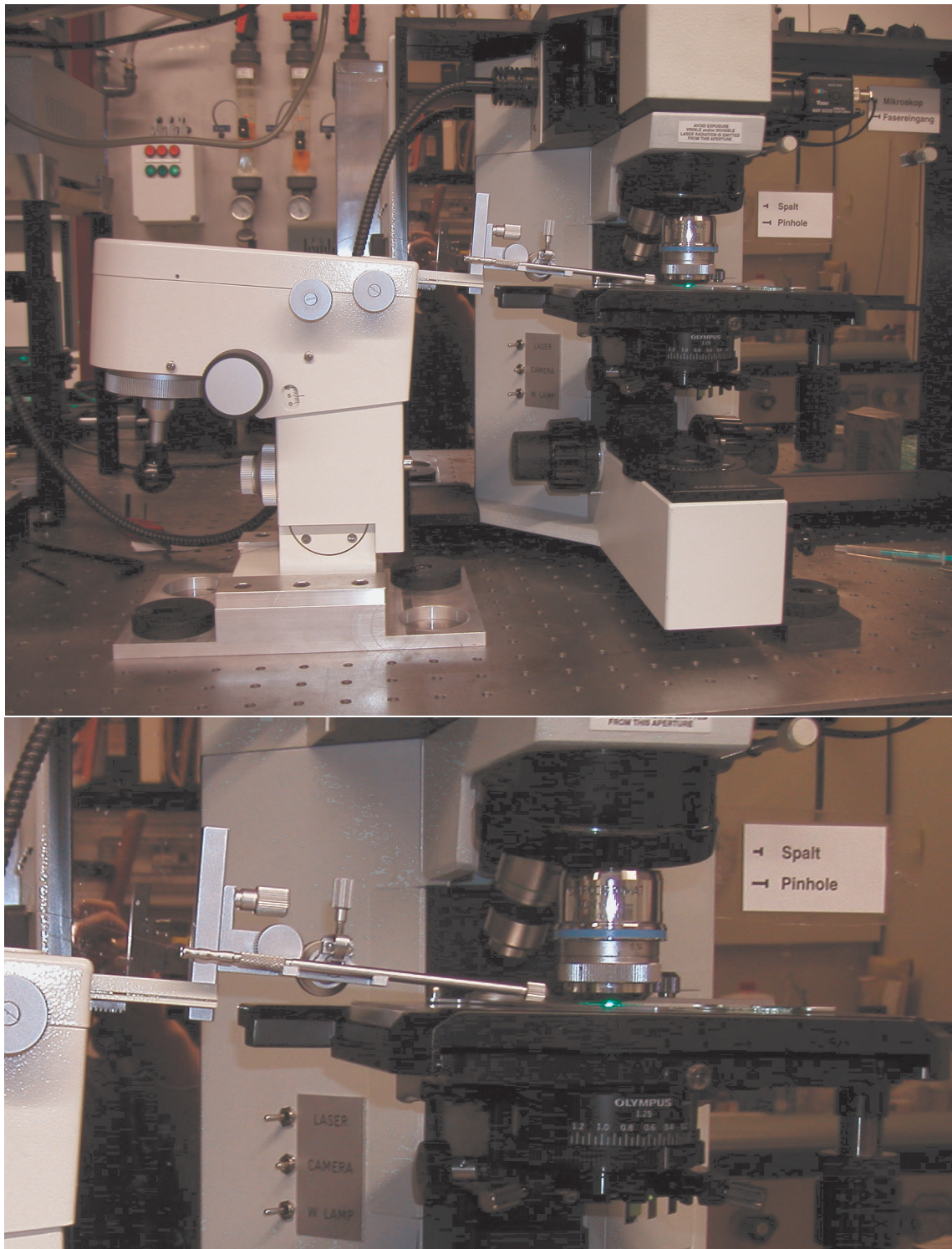


Abb. 3.19: Fotografie des verwendeten Aufbaus zur Kombination von Glasfaser-sonde und optischer Gradientenfalle (oben) und Detailausschnitt (unten).

durchgeführt. Etwa ein Zentimeter der Glasfasersondenspitze wird für die Aufnahme abgebrochen und mit Leitcarbon auf einen Probenteller aufgebracht. Die Aufnahmen werden durch einen Thermodrucker und durch Belichtung eines Kleinbildfilms ausgegeben.

Zur Oberflächencharakterisierung der Silber-beschichteten Mikropartikeln (Conduct-O-Fil) wird eine kleine Menge der Mikropartikel auf einen Probenteller aufgebracht. Eine weitergehende Präparation war nicht notwendig.

3.5.2 Kraftfeldmikroskopie (AFM)

Zur Untersuchung der Oberflächenmorphologie Silber-beschichteter Mikropartikel wurden Kraftfeld-mikroskopische Messungen (AFM) durchgeführt. Die Messungen wurden an einem ThermoMicroscopes-AFM 'Autoprobe CP-Research' am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde (Universität Würzburg) durchgeführt. Das AFM-Gerät ist mit 'Contact Ultralevers ULCT-AUMT-B'-Cantilevern ausgerüstet und wurde im Kontakt-Modus betrieben. Als Mess-Software und für die Bildverarbeitung wurde 'ProScan 1.6 beta' und 'Image Processing 2.0' von ThermoMicroscopes eingesetzt.

Die Mikropartikel, die in trockenem Zustand als sehr feines Pulver vorliegen, werden für die AFM-Messung wie folgt präpariert. Auf einem magnetischen Metallplättchen für den Probenhalter des AFM-Geräts wird ein dünner Film eines klaren, pigmentfreien Nagellacks als Kleber aufgebracht. Über den angetrockneteten, aber noch nicht ganz trockenen Film wird das zu untersuchende Pulver geblasen, so dass einige der Mikropartikel haften bleiben. Danach wird der Nagellack getrocknet und die Messung durchgeführt.

3.6 Probenpräparation

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie die einzelnen Proben präpariert wurden. Außerdem wird Bezug genommen auf die Herkunft der gekauften Materialien.

3.6.1 Metall-beschichtete Mikropartikel

Als SERS-Substrat und zum Testen der optischen Gradientenfalle wurden Silberbeschichtete Glas-Mikrokugeln mit der Markenbezeichnung Conduct-O-Fil[®] verwendet. Diese wurden von der PQ Corp. (Philadelphia, USA) bezogen und ohne weitere Vorbehandlung verwendet.

3.6.2 Testsubstanzen

Für erste Messungen mit der Gradientenfalle und der Fasersonde wurden folgende Testsubstanzen verwendet:

Zur Überprüfung, ob die Gradientenfalle mit dem gegebenen Setup arbeitet, werden Polystyrolkugeln verwendet, die von Aldrich in wässriger Suspension bezogen wurden und deren Durchmesser bei $11\ \mu\text{m}$ liegt. Die Suspension wird dafür verdünnt und die Verdünnung auf einen Objektträger aufgetropft. Der Tropfen wird mit einem Ring aus Silikonfett umgeben und mit einem Deckglas abgedeckt.

Zum Testen der Fasersonde werden verdünnte Lösungen von Kristallviolett in Wasser verwendet. Das Kristallviolett wurde von Riedel-de Haën bezogen. Es wurden jeweils Lösungen mit Verdünnungen bis zu 10^{-5} M hergestellt und bis zur Verwendung lichtgeschützt gelagert.

3.6.3 Pflanzen

Im Rahmen der Tests der Fasersonde und des mobilen Gerätes wurden Messungen an Minzen sowohl mit der Fasersonde an beiden Spektrometern, als auch mit dem Mikro-Raman-Setup am mobilen Gerät durchgeführt.

Bei der untersuchten Pflanzen handelt es sich um verschiedene Minzen. Die Pflanzenproben stammen von Freilandbeeten des Botanischen Gartens der Universität Würzburg und wurden bis zur Verwendung in Wasser gestellt. Für die Messungen werden mit einem Skalpell Querschnitte von etwa 0,5 mm Dicke aus den Stängeln präpariert.

Die Schnitte werden auf einen Objektträger präpariert und mit einem Ring aus Silikonfett umgeben. Diese „Messzelle“ wird mit Wasser aufgefüllt, um ein Austrocknen und damit eine Verformung der Schnitte während der Messungen zu vermeiden. Anschließend wird die Probe noch mit einem Deckglas abgedeckt, um Verzerrungen durch eine gewölbte Wasseroberfläche und Verdunstung des Wassers zu vermeiden.

Für SERS-Messungen mit dem Mikro-Raman-Setup werden die Querschnitte für zehn Minuten in Silber-Kolloid (Herstellung nach der Vorschrift von Lee und Meisel [56]) gelegt und dann, wie oben beschrieben, auf einen Objektträger präpariert.

Für die Messungen mit der Fasersonde wird ein offenes Kunststoffgefäß verwendet, das eine größere Menge Wasser aufnehmen kann, damit optische Verzerrungen durch die am Rand gewölbte Oberfläche nicht die Messungen beeinflussen.

3.6.4 Mikroorganismen

Die untersuchten biologischen Proben wurden vom DSMZ (Deutsche Sammelstelle für Mikroorganismen und Zellkulturen) bezogen. Die benutzten Zelllinien waren das Bakterium *Micrococcus luteus* (DSM 348) und die Hefe *Rhodotorula mucilaginosa* (DSM 70403). Die Mikroorganismen wurden auf Merck Standard I-Nährböden bei 30 (*M. luteus*) bzw. 25 °C (*R. mucilaginosa*) gezüchtet.

Für Messungen mit der Gradientenfalle wird mit einer Öse eine Kolonie der Mikroorganismen von der Nährplatte abgehoben und in Wasser vereinzelt. Anschließend wird ein Tropfen der so hergestellten Zellsuspension auf einen Objektträger gebracht, mit Silikonfett umgeben und mit einem Deckglas abgedeckt.

Für Messungen mit der Fasersonde wird ein Ausstrich auf einem Objektträger

erzeugt, indem mit einer Öse eine Kolonie der Mikroorganismen von der Nährplatte abgehoben und auf der Glasfläche verstrichen wird.

Für Vergleichsmessungen wurde eine gesättigte ethanolische Lösung von β -Carotin (Fluka) verwendet.

3.6.5 Erythrocyten

Für die Experimente mit Erythrocyten (RBC; *red blood cell*) wurde ein Tropfen Blut aus der Fingerkuppe eines gesunden freiwilligen Spenders 1:1000 mit einer isotonischen Kochsalzlösung (0,9 %) verdünnt.

Für die Herstellung deoxygenerter RBC wurde eine 1:100 Verdünnung von RBC in isotonischer Kochsalzlösung mit einer ebenfalls isotonischen Lösung von Natrium-Dithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 26,8 g/l) versetzt.

Zur Carboxylierung der RBC wurde für fünf Minuten Kohlenmonoxid durch die 1:1000-Verdünnung geleitet, um eine Sättigung der Suspension zu erreichen.

Für die Messung des Einflusses von Cyanid-Ionen auf die RBC wurde die 1:1000-Verdünnung mit der gleichen Menge an isotonischer Kaliumcyanid-Lösung (10,0 g/l) versetzt.

20 μl der verdünnten Lösungen wurden jeweils auf einen Objektträger aufgetropft. Der Tropfen wurde mit Silikonfett umgeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Für die Messungen wurden keine Blutproben verwendet, deren Entnahmezeitpunkt aus dem Körper länger als 30 Minuten vor der Messung lag.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse, die bei den durchgeführten Experimenten erhalten wurden, präsentiert. Der erste Abschnitt widmet sich dabei der Fasersonde. Es wird zunächst eine Oberflächencharakterisierung der Faserspitze durchgeführt und Testmessungen mit Kristallviolettlösungen bewertet. Anschließend wird die Sonde an biologischen Proben getestet, wobei das ätherische Öl einer Minze und einer Kumquat untersucht wird. Außerdem werden Experimente zur Detektion von Pflanzenschutzmitteln auf Weinstöcken beschrieben. Der zweite große Bereich dieses Kapitels befasst sich mit den Resultaten zu den Experimenten mit der optischen Gradientenfalle. Es werden zuerst Testmessungen mit Polystyrol-Mikrokugeln beschrieben, bevor zu biologischen Partikeln übergegangen wird. Hier werden dann Messungen an unterschiedlich behandelten Erythrocyten und an einzelnen Hefezellen diskutiert. Schließlich werden noch Ergebnisse vorgestellt, die mit gefangenen Metallpartikeln als SERS-Substrat erhalten wurden. Im letzten Abschnitt wird anhand von Messungen an Mikrokokken und Erythrocyten die Funktionalität der Kombination von Fasersonde und optischer Pinzette in einem Raman-Spektrometer verdeutlicht.

4.1 Messungen mit der Fasersonde

Die Verwendung der Glasfasersonde ermöglicht ein minimal-invasives Arbeiten mit hoher räumlicher Auflösung bei gleichzeitig sehr niedriger Laserleistung. Die von uns nach der Methode von Stöckle et al. [60] hergestellten Sonden haben einen Durchmesser an der Spitze, der im Submikron-Bereich ($0.2\text{--}1\ \mu\text{m}$) liegt. In den folgenden Abschnitten wird die Fasersonde charakterisiert und es werden die ersten Experimente vorgestellt, die mit der Sonde durchgeführt wurden.

4.1.1 Oberflächencharakterisierung der Fasersonde durch Rasterelektronenmikroskopie

Die Glasfasersonden wurden in einem Rasterelektronenmikroskop (REM) bezüglich ihrer Oberflächenbeschaffenheit untersucht. Da für das Auftreten eines SERS-Vertärkungseffektes eine raue Oberfläche des SERS-Substrates Voraussetzung ist [146], ist es notwendig, dass die Oberflächen der Faserspitzen nicht glatt sind. Die Bilder in Abb. 4.1, insbesondere die Ausschnittsvergrößerung in Bild B, lassen erkennen, dass bei den beschichteten Glasfasersonden Oberflächenrauigkeiten im Submikrometerbereich auftreten. Somit sollte ein SERS-Verstärkungseffekt möglich sein. Selbstverständlich ist es nicht möglich, mit dem REM Oberflächenrauigkeiten im atomaren Maßstab aufzulösen, jedoch ist davon auszugehen, dass bei den sichtbaren Oberflächenstrukturen genügend entsprechende Strukturelemente im atomaren Maßstab auftreten.

4.1.2 Evaluierung der Fasersonde durch Messungen mit Kristallviolett

Als Testsubstanz zur Charakterisierung der Eigenschaften der Glasfasersonde wurden wässrige Lösungen von Kristallviolett verwendet. Das Raman-Spektrum von Kristallviolett ist bereits gut in der Literatur dokumentiert. Daher sollen hier nur

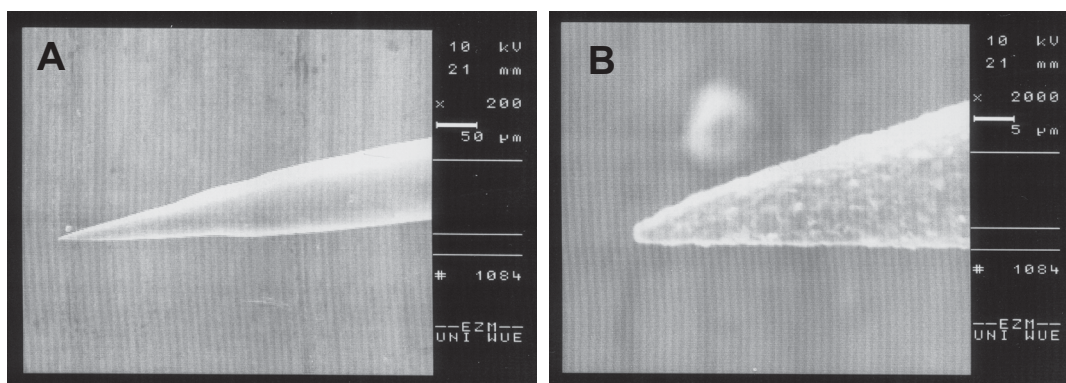


Abb. 4.1: Oberflächencharakterisierung einer mit Silber bedampften Glasfaserpitze. A: Übersichtsbild des gesamten Spitzenkonus bei 200facher Vergrößerung; B: Spitze der Faser bei 2000facher Vergrößerung.

kurz die intensivsten Banden zugeordnet werden (Abb. 4.2). [146–148]

Den beiden Signale bei 1614 und 1583 cm^{-1} entsprechen verschiedenen C–C-Streckschwingungen. Der Bande bei 1366 cm^{-1} lässt sich die Streckschwingung zwischen den Phenylresten und den Amino-Gruppen zuordnen. Den übrigen drei Signalen bei 1182 , 907 und 805 cm^{-1} sind verschiedenen C–H-Deformationen in den Phenylringen des Molekülgerüsts zuzuordnen. Eine Zusammenfassung dieser Zuordnung ist in Tab. 4.1 zu finden.

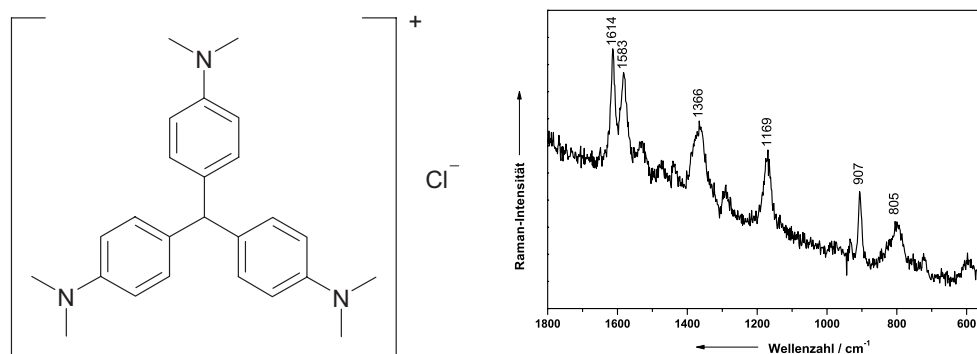


Abb. 4.2: Strukturformel und ein exemplarisches Raman-Spektrum von Kristallviolett.

Tab. 4.1: Zuordnung der wichtigsten Raman-Schwingungsbanden für Kristallviolett in wässriger Lösung. (Zuordnung nach Angeloni et al. und Giquel et al. [147, 148])

Schwingungsbande	zugeordnete Schwingung
1614	$\nu(\text{C-C})$
1583	$\nu(\text{C-C})$
1366	$\nu(\phi\text{-N})$
1169	$\delta(\text{C-H})$
907	$\delta(\text{C-H})$
805	$\delta(\text{C-H})$

Da direkt an der Spitze der Sonde die höchste Laserleistung aus der Faser austritt, kann davon ausgegangen werden, dass hier auch die höchsten Raman-Intensitäten erhalten werden können. Diese Annahme wurde durch das folgende Experiment verifiziert.

Eine mit Silber thermisch beschichtete Glasfasersonde wurde in eine Kristallviolett-Lösung ($10^{-5} M$) plaziert. Die Leistung des Anregungslasers an der Faserspitze betrug 0,2 mW. Anschließend wurde die Faserspitze entlang einer Linie auf der Achse der Glasfaser abgescannt. Hierfür wurde die in der Kristallviolett-Lösung befindliche Glasfasersonde durch einen elektronisch ansteuerbaren Mikroskopisch unter dem Mikroskopobjektiv bewegt. Die Messpunkte lagen für die einzelnen Messungen jeweils $0,5 \mu\text{m}$ voneinander entfernt.

In Abb. 4.3 sind drei Bilder zu sehen. Bei Bild A handelt es sich um eine Mikroskopaufnahme der beschichteten Glasfaserspitze in der Kristallviolett-Lösung. Der rote Pfeil indiziert die Strecke, auf der im Abstand von $0,5 \mu\text{m}$ die einzelnen Spektren aufgenommen wurden. Bild B zeigt in einem zweidimensionalen Plot die

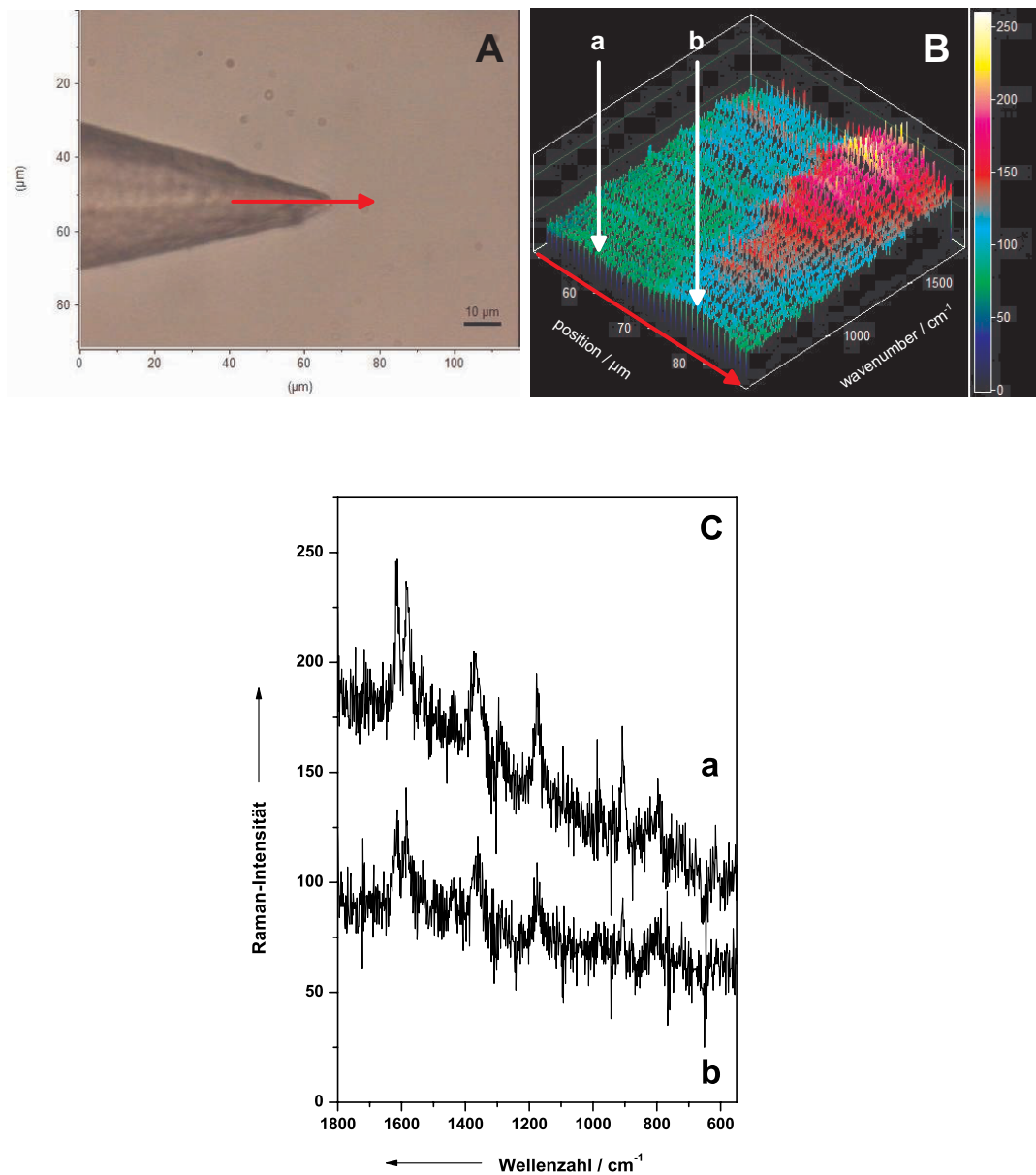


Abb. 4.3: Raman-Scan über die Faserspitze entlang der Achse der Glasfaser. Der rote Pfeil in Bild A bezeichnet die abgescannte Strecke auf der Faserspitze. In Bild B sind die einzelnen Spektren des Scans aneinandergereiht dargestellt. Die an den mit den Pfeilen a und b bezeichneten Positionen aufgezeichneten Spektren sind in Bild C nochmals gegenübergestellt.

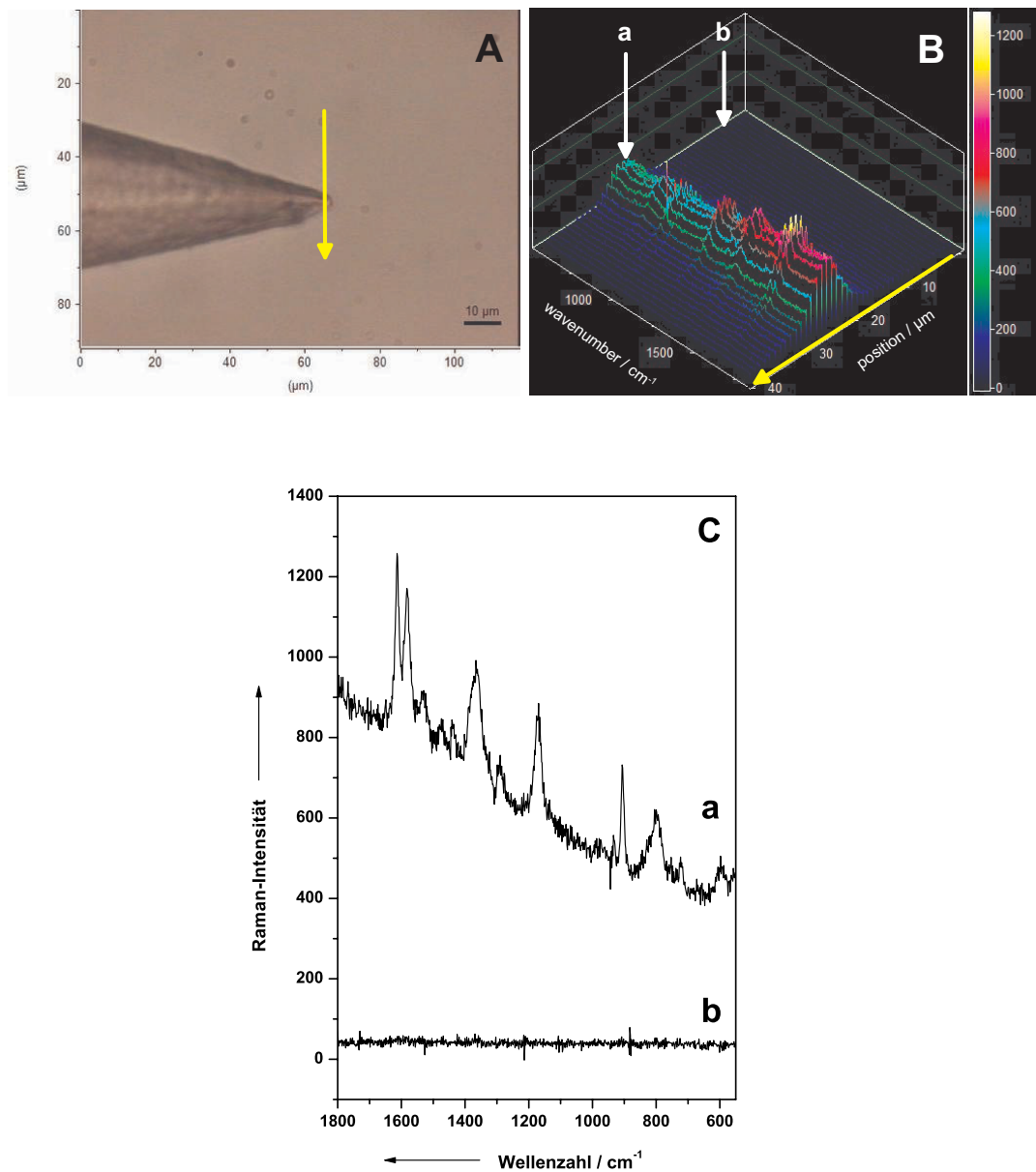


Abb. 4.4: Raman-Scan über die Faserspitze quer zur Achse der Glasfaser. Der gelbe Pfeil in Bild A bezeichnet die abgescannte Strecke über die Faserspitze. In Bild B sind die einzelnen Spektren des Scans aneinandergereiht dargestellt. Die an den mit den Pfeilen a und b bezeichneten Positionen aufgezeichneten Spektren sind in Bild C nochmals gegenübergestellt.

Aneinanderreihung der gemessenen Spektren. Dabei bedeuten blaue und grüne Farben eine niedrige und gelbe und rote Farben dagegen eine hohe Signalintensität. Der rote Pfeil, der an dem Spektrenplot entlang führt, entspricht dem Pfeil aus Bild A sowohl in der Position als auch in der Richtung. Daraus ist ersichtlich, dass die Spektren, die auf dem Konus der Spitze aufgenommen wurden, eine relativ niedrige Intensität aufweisen, während die Spektren, die aus dem unmittelbaren Bereich der Sondenspitze stammen, deutlich intensiver sind. Dies wird nochmals in Bild C der Abb. 4.3 verdeutlicht, in dem zwei exemplarische Spektren aus den Scans einander gegenübergestellt sind. Die relative Position der Spektren im Scan wird durch die beiden senkrechten weißen Pfeile in Bild B bezeichnet. Spektrum a, das direkt auf der Faserspitze aufgenommen wurde zeigt eine deutlich höhere Intensität und ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis als Spektrum b, welches auf dem Spitzenkonus aufgenommen wurde. Die Qualität dieser beiden Spektren ist verhältnismäßig schlecht. Dies lässt sich durch die sehr niedrige Anregungslaserleistung in Kombination mit einer kurzen Integrationszeit begründen. Ein weiterer negativer Einfluss ist möglicherweise, dass der Fokus nicht genau über der Achse der Glasfaser geführt wurde. Dieses Problem ist jedoch nicht ohne Weiteres zu beheben, da die Glasfaser zum einen in der Küvette nicht so gut fixiert werden kann wie am Mikromanipulator, der für Messungen an biologischen Gewebe eingesetzt wird. Zum anderen kann es bei der Ansteuerung des Mikroskoptisches durch die Messsoftware zu einem Versatz des Tisches kommen, so dass der Fokus des Mikroskops nicht mehr exakt auf der Achse der Faser entlanggeführt wird, sondern parallel dazu. Trotzdem ist die Abhängigkeit der Qualität der Spektren von der Position des Messpunktes entlang der Faserachse deutlich zu erkennen.

In einem weiteren Experiment wurde die Faser mit dem selben Aufbau entlang einer Linie quer zur Faserachse abgescannt. Bild A in Abb. 4.4 ist eine Mikroskopaufnahme der Faserspitze und Bild B zeigt die Aneinanderreihung der einzelnen gemessenen Spektren. Der gelbe Pfeil gibt die Position und die Abfolge der Messpunkte an. In Bild C sind wiederum zwei exemplarische Spektren aus dem Scan (a

und b, senkrechte weiße Pfeile) gegenübergestellt. Aus diesen Messungen wird die hohe Ortsauflösung, die mit der Fasersonde erreicht werden kann, noch deutlicher. Die Messpunkte, die auf oder sehr nahe an der Glasfaserspitze liegen, zeigen in den Spektren hohe Intensitäten, wobei die maximale Intensität direkt auf der Achse der Faser erhalten wird. Spektren, die in größerer Entfernung zur Faser aufgenommen wurden, zeigen dagegen kaum Intensität. Dies wird nochmals durch den Vergleich der beiden Spektren a und b in Bild C deutlich, wobei Spektrum a direkt auf der Faser aufgenommen wurde und Spektrum b mit einem gewissen Abstand von der Faserachse.

Das Experiment wurde bestätigt, indem eine chemisch beschichtete Sondenspitze unter sonst identischen Bedingungen in einem zweidimensionalen Mapping abgescannt wurde (Abb. 4.6). Die Messpunkte für die einzelnen Messungen lagen sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung ebenfalls $0,5 \mu\text{m}$ voneinander entfernt. Für jeden Messpunkt wurde ein komplettes Spektrum aufgenommen (Laserleistung auf der Probe: $0,2 \text{ mW}$, Integrationszeit: 10 s , Gesamtzeit: $2,5 \text{ h}$). Aus den Spektren wurde der Bereich von 1600 bis 1630 cm^{-1} ausgewählt (Markierung in Abb. 4.5).

Anhand der in Abb. 4.5 markierten Wellenzahl-Bereiche wird über die in der Mikroskopaufnahme markierte Fläche durch die Labspec-Software ein zweidimensionales Intensitätsprofil erstellt. Diese Intensitätsprofile zeigen, dass der Hauptbeitrag zu der Spektrenintensität aus dem unmittelbaren Bereich der Sondenspitze kommt (Abb. 4.6).

Die bis hier beschriebenen Methoden zur Faserpräparation weisen bestimmte Vor- und Nachteile auf. Die mit Metall bedampften Glasfaserspitzen zeichnen sich durch eine gute Reproduzierbarkeit aus. Sie eignen sich insbesondere zur Untersuchung von ätherischen Ölen in Pflanzen, wie in den Abschnitten 4.1.3 und 4.1.4 beschrieben. Ein Nachteil dieser Präparationsmethode ist allerdings die schlechte mechanische Belastbarkeit der Metallbeschichtung, was einen Einsatz der Faser in dichteren Gewebetypen verhindert, da es durch den Abrieb zu elektrochemischen Prozessen in der Zelle kommen kann. Bei den nasschemisch hergestellten Fasern kommt zu

dem Abriebproblem außerdem noch die sehr schlechte Reproduzierbarkeit hinzu. Allerdings eignen sich diese Fasern durch ihre besonders raue Silber-Oberfläche als Verstärkungssubstrat für die Raman-Spektroskopie. Um die genannten Nachteile zu umgehen, ohne die Vorteile zu verlieren, wurde eine weitere Präparationsmethode getestet.

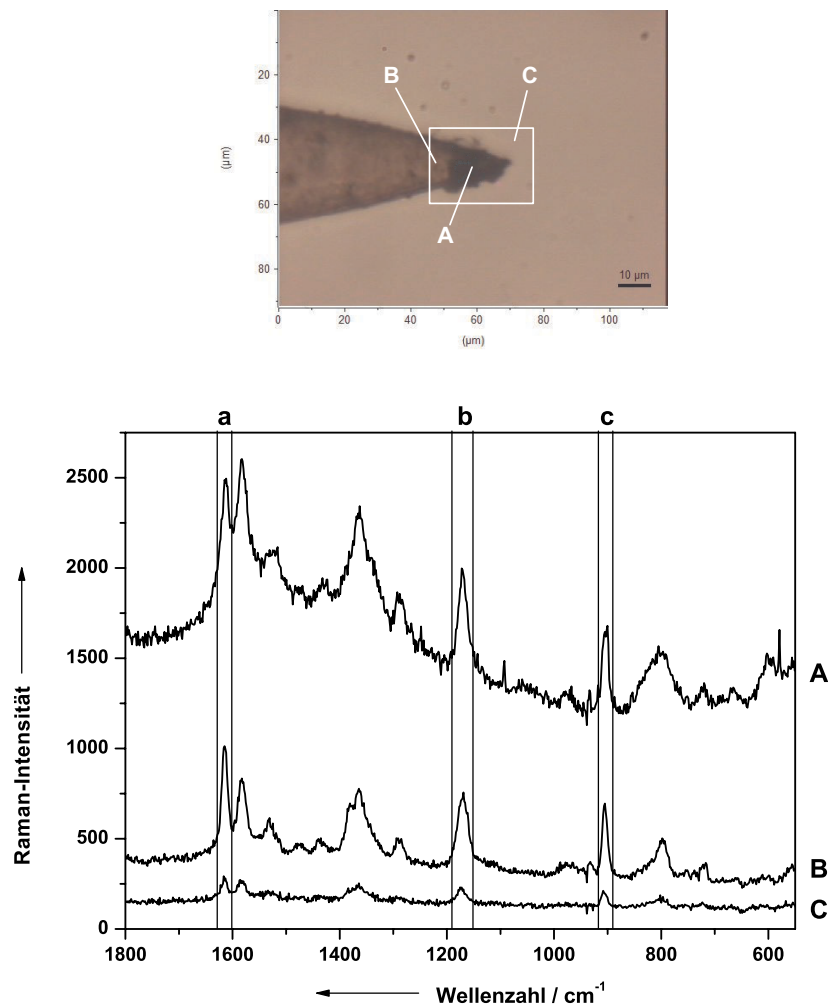


Abb. 4.5: Bild einer Silber-beschichteten Glasfaserspitze. In dem durch den weißen Kasten bezeichneten Bereich wurde ein Raman-Mapping durchgeführt. Die unten dargestellten Spektren A, B und C wurden von den im Bild bezeichneten Stellen aus dem Raman-Mapping extrahiert.

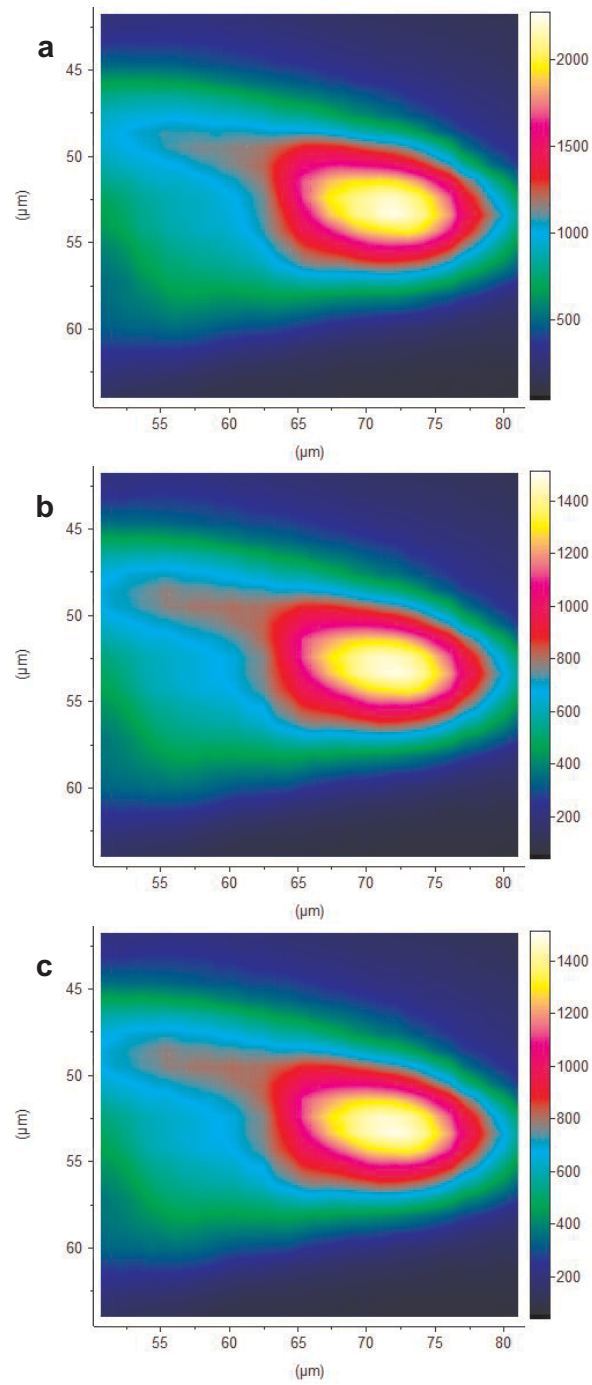


Abb. 4.6: Die Bilder a, b und c zeigen Falschfarben-Intensitätsprofile, die anhand der in Abb. 4.5 entsprechend bezeichneten Banden erstellt wurden.

Bei dieser Methode wird eine Glasfaser mit chemisch funktionalisierter Oberfläche verwendet. Bei der Adsorption von Silber-Kolloid auf der mit einem Aminosilan funktionalisierten Oberfläche wurde allerdings die Beobachtung gemacht, dass das Einbringen der funktionalisierten Faserspitzen in das Kolloid zu einer Fällung der nicht adsorbierten Silber-Partikel führt. Bedingt hierdurch ist es notwendig, für jeden Ansatz zu beschichtender Fasern eine frische Menge Silber-Kolloid zu verwenden, um konstante Bedingungen zu gewährleisten. Die beschichteten Fasern werden anschließend bis zur Verwendung in destilliertem Wasser aufbewahrt.

Für die Untersuchung der Fasern wurde die beschichtete Spitze ebenfalls in eine Kristallviolett-Lösung (10^{-5} M) positioniert. In die Faser wurde ein 514,5 nm-Laser eingekoppelt (Leistung an der Faserspitze: 0,2 mW). Anschließend wurden an einigen repräsentativen Positionen (siehe Abb. 4.6) der Faserspitze Raman-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen entsprechen den der vorhergehenden Evaluierungsexperimenten und sind daher nicht nochmals dargestellt. Damit konnte eine Faser zur Verfügung gestellt werden, die den Vorteil einer guten räumlichen Auflösung an der Faserspitze und einer besseren mechanischen Belastbarkeit vereint.

Wie in den oben dargestellten Ergebnisse zu sehen ist, wird die Hauptintensität der gewählten Raman-Banden im vordersten Bereich der Spitze erhalten. Die hinteren Bereiche auf der Glasfaser und die Bereiche neben der Glasfaser zeigen kaum Signalintensität. Damit konnte verdeutlicht werden, dass mit der Glasfaserspitze eine hohe Ortsauflösung erhalten werden kann, da die Beiträge der anderen Bereiche, abseits der Sondenspitze, nur in sehr geringem Maß zum Spektrum beitragen. Zusätzlich wird das den Messpunkt umgebende Probenmaterial vor einer übermäßigen Belastung durch den Anregungslaser geschützt, da der Laser erst im Bereich der Faserspitze, die direkt an den Messpunkt positioniert wird, austritt und mit der Probe wechselwirkt. Ein dritter Vorteil der Fasersonde ist, dass die Probe nicht komplett mit dem SERS-aktiven Substrat kontaminiert wird, sondern die SERS-aktive Silber-Schicht nur auf der Faserspitze vorhanden ist, und somit auch nur dort mit der Probe in Berührung kommen kann. Hierdurch kann die Möglichkeit, dass es

an der Oberfläche des Schwermetalls zu elektrochemischen Abbaureaktionen in der Probe kommen kann, minimiert werden.

4.1.3 Messungen an einer Minze

Nach den Evaluierungsexperimenten wurde die Sonde an Minzpflanzen und Mikroorganismen getestet. Für die Messungen an der Minze wurde eine Bergamott-Minze verwendet. Bei den Minzen wird das ätherische Öl in sogenannten Drüsenschuppen produziert und gespeichert. Diese Drüsenschuppen haben einen Durchmesser von etwa $60\ \mu\text{m}$ und sitzen auf der Außenseite der Pflanze.

Für die Experimente wurde ein Querschnitt des Stängels der Minzpflanze hergestellt. Die Dichte an Drüsenschuppen ist zwar auf den Blättern der Pflanze höher, allerdings sind die Drüsenschuppen auf der Stängelaussenseite leichter für die Sonde zugänglich. Die Fasersonde wurde unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Mikromanipulators so platziert, dass die Spitze der Sonde mit der Cuticula der Drüsenschuppe in Kontakt kommt (Bild in Abb. 4.7). Gleichzeitig muss der Kontaktpunkt sich im Fokus des Mikroskopobjektivs befinden, das zum Sammeln des Streulichts verwendet wird.

Abb. 4.7 zeigt zwei Spektren vom ätherischen Öl einer Bergamott-Minze (*Mentha × piperita* L. nm. citrata). [137] Spektrum B wurde mit einem herkömmlichen Mikro-Raman-Setup bei einer Laserleistung von 60 mW auf der Probe aufgenommen, wobei der Stängelquerschnitt vorher in aktiviertes Silber-Kolloid eingelegt worden ist. Spektrum A wurde dagegen mit Hilfe der Silber-beschichteten Glasfasersonde aufgenommen. Die Anregungslaserleistung betrug hier nur 1,2 mW an der Faserspitze. Die übrigen Randbedingungen waren für beide Spektren gleich. Für die Darstellung wurden die Spektren Basislinien-korrigiert.

Man kann sehr gut erkennen, dass die Qualität der Spektren vergleichbar ist, obwohl für das Spektrum, das mit der Fasersonde erstellt wurde, eine Laserleistung benutzt wurde, die um mehr als eine Größenordnung niedriger ist, als die des Mikro-

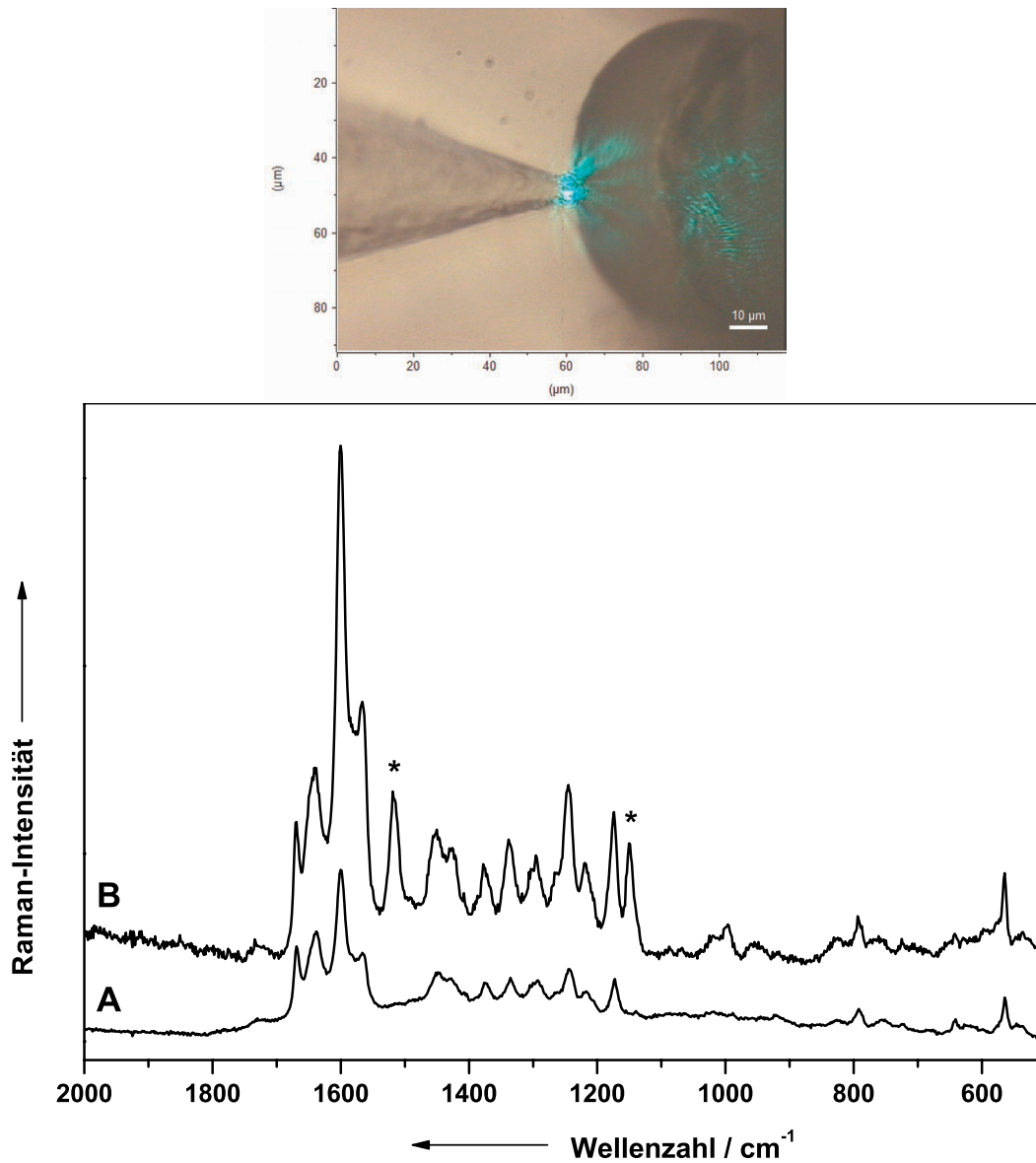


Abb. 4.7: Vergleich von SER-Spektren einer Bergamott-Minze mit verschiedenen Messmethoden: A: Glasfasersonde, 1,2 mW Laserleistung; das Bild zeigt die Glasfasersonde an der Drüsenschuppe (bei stark abgeschwächtem Laser); B: Mikro-Raman-Setup, Silber-Kolloid, 60 mW Laserleistung. Die mit * markierten Banden stammen von β -Carotin.

Raman-Setups. Die beiden durch * markierten Banden in der Abbildung bezeichnen die C–C-Einfach- und die C=C-Doppelbindungsschwingung von β -Carotin.

β -Carotin ist zwar im ätherischen Öl der Minze nicht enthalten, aber es ist ein Bestandteil von Mikroalgen, die auf der Oberfläche der Pflanzen siedeln. Diese Banden sind im Kolloid-Spektrum nicht zu sehen. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Mikroalgen durch das Silber-Kolloid zerstört werden, während dies bei Verwendung der Sonde nicht der Fall ist. Die Sonde ist also wesentlich schonender in Bezug auf eine Verfälschung der Probensubstanz als das Silber-Kolloid.

Es wurde ebenfalls getestet, ob auch mit dem mobilen Gerät Messungen mit der Fasersonde möglich sind. Dabei konnte ein Spektrum von einer Krauseminze (*M. spicata* ssp. *crispata*) erhalten werden, bei dem die Leistung des Anregungslasers nochmals deutlich gesenkt werden konnte. Für die Aufnahme des Spektrums wurde eine Leistung des Anregungslasers (532 nm) von nur zwei Mikrowatt an der Sondenspitze gemessen. Die Integrationszeit betrug 300 s. Das Spektrum ist in Abb. 4.8 dargestellt. Trotz der Leistungsminderung des Lasers um einen Faktor von 600 und eines stärkeren Grundrauschens sind die Merkmale des Spektrums gut zu erkennen.

Durch eine Senkung der notwendigen Laserleistung auf einen Wert, der sich nur noch im Bereich von einigen Mikrowatt bewegt, sollte es möglich sein, auch empfindlichste Proben untersuchen zu können.

Da sich aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung und den meist sehr geringen Anteilen der einzelnen Substanzen an der Gesamtmasse des ätherischen Öls eine genaue Zuordnung einzelner Banden zu bestimmten Signalen einzelner Komponenten recht schwierig gestaltet, sind für eine sichere Identifikation der Minz-Art numerische Methoden notwendig. Das Thema der Identifikation einzelner *Mentha*-Arten durch die Anwendung statistischer Methoden auf die Raman-Spektren wurde in der Literatur ausführlich behandelt. [149]

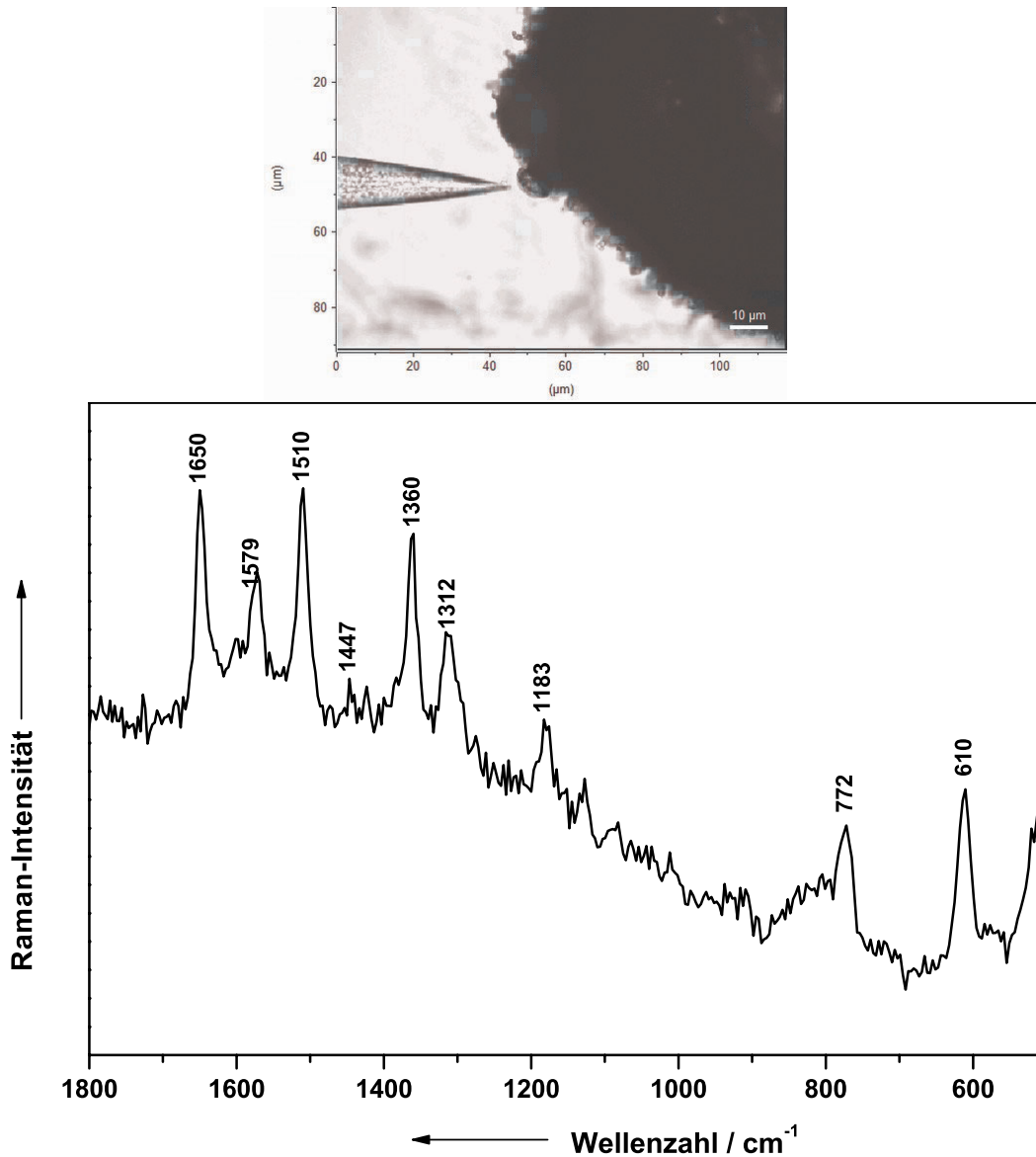


Abb. 4.8: Spektrum vom ätherischen Öl einer Krauseminze.

4.1.4 Messungen am ätherischen Öl einer Kumquat-Frucht

Zusätzlich zu den Minzen wurden auch Spektren vom ätherischen Öl einer Kumquat-Frucht erstellt. Im Gegensatz zu den Minzen befindet sich das Öl bei Citrusfrüchten nicht in Drüsenschuppen außen auf der Frucht, sondern in sogenannten lysigenen Ölbehältern, die sich direkt im Gewebe der Schale befinden. Auf diese Weise war es

möglich, die Fasersonde auch in einem Gewebe zu testen.

In Abb. 4.9 (oben) ist eine Mikroskopaufnahme einer Fasersonde in einem lysigenen Ölbehälter zu sehen. Die Aufnahme zeigt, wie die Fasersonde zum Erreichen des ätherischen Öls in den aufgeschnittenen Ölbehälter eindringen muss.

Abb. 4.9 (unten) sind die folgenden Spektren zu sehen: Spektrum A zeigt ein Spektrum, das mit der Fasersonde in dem lysigenen Ölbehälter aufgenommen wurde. Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen wurde für diese Messungen eine Goldbeschichtete Glasfasersonde verwendet. Es wurde bei einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm mit einer Laserleistung von 0,2 mW und einer Integrationszeit von 60 min gearbeitet. Demgegenüber wurde Spektrum B mit einem konventionellen Mikro-Raman-Aufbau gemessen (Laserleistung: 12 mW, Integrationszeit: 100 s). Die Hauptkomponente beider Spektren lässt sich dem Limonen zuordnen, das in Spektrum C dargestellt ist. Zusätzlich zu den Banden von Limonen sind in den Spektren des ätherischen Öls auch noch die Signale von β -Carotin zu erkennen. Während Spektrum B sehr intensive β -Carotin-Banden zeigt, ist im Spektrum der Fasersonde die Intensität von β -Carotin deutlich niedriger. Das Spektrum des β -Carotin ist für die Untersuchung nicht relevant, da das Signal von der Schale und nicht vom Öl selbst kommt. Daher ist die Untersuchung mit der Sonde vorteilhaft, da sie ein besseres Spektrum der Ölkomponenten liefert.

4.1.5 Messungen an Mikroorganismen

Für Messungen an Mikroorganismen wirkt sich die sehr geringe Laserleistung ebenfalls probenschonend aus. Dies konnte durch folgendes Experiment verifiziert werden: Auf einem Objektträger wurde ein Austrich von *Rhodotorula mucilaginosa* hergestellt. Hierbei handelt es sich um eine Hefe, die durch β -Carotin rot gefärbt ist.

Die Fasersondenspitze wurde auf einige einzelne Hefezellen des Ausstrichs positioniert. [137] Das bei einer Laserleistung von 0,2 mW mit einer Integrationszeit von 20 s an der Faserspitze erhaltene Spektrum ist in Abb. 4.10A zu sehen. Der Versuch,

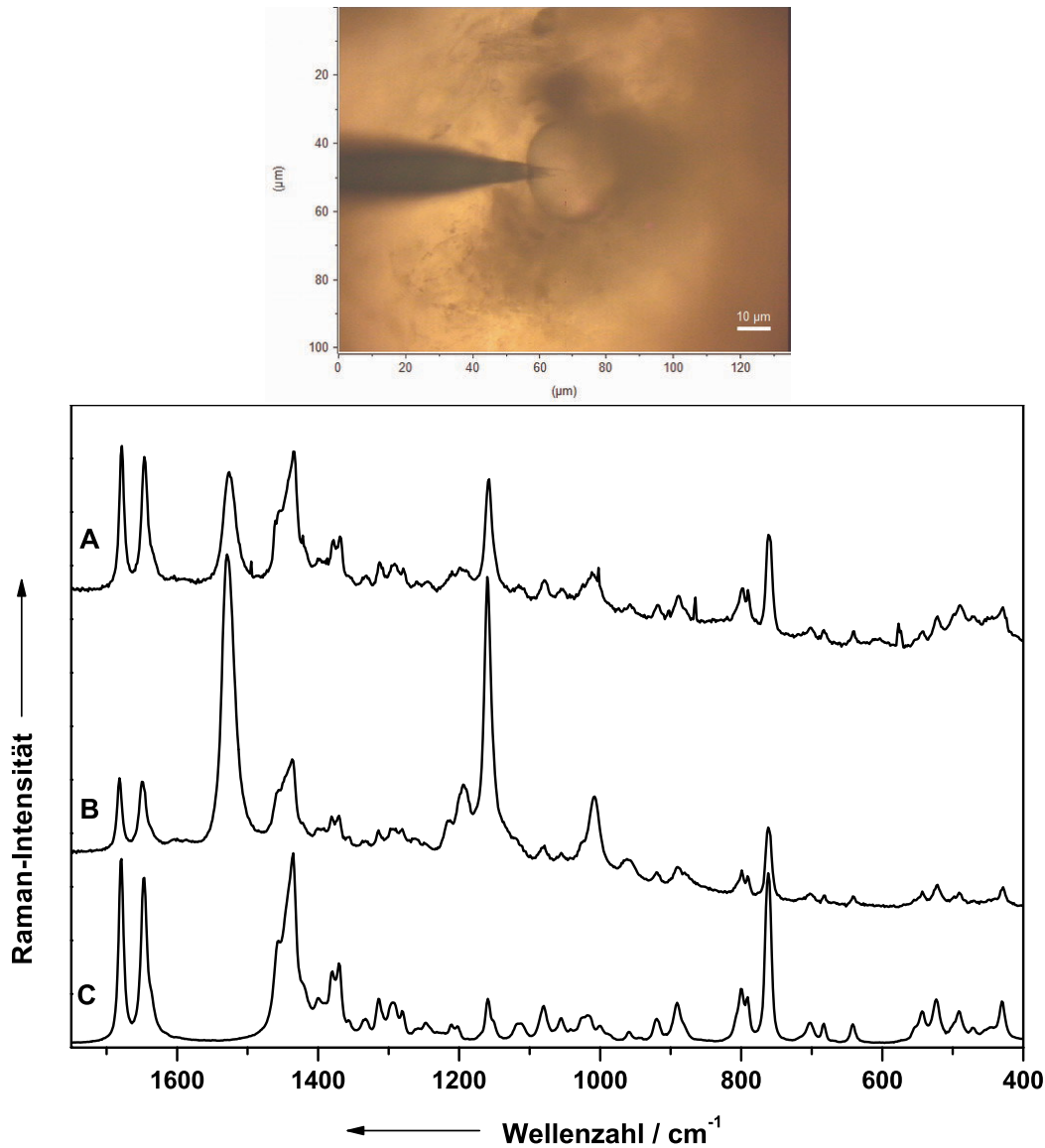


Abb. 4.9: Oben: Mikroskopaufnahme einer Fasersonde in einem Ölbehälter einer Kumquat-Schale; unten: Spektren vom ätherischen Öl im lysigenen Ölbehälter mit der goldbeschichteten Fasersonde (A), Mikro-Raman (B), Referenzspektrum von Limonen (C).

einen derartigen Ausstrich mit einem Mikro-Raman-Aufbau zu messen, führte zu keinem Ergebnis, da die Bakterien durch den Laser sofort zerstört wurden. Spektrum B zeigt das Ergebnis einer Messung, die mit dem Mikro-Raman-Setup (Laserleistung:

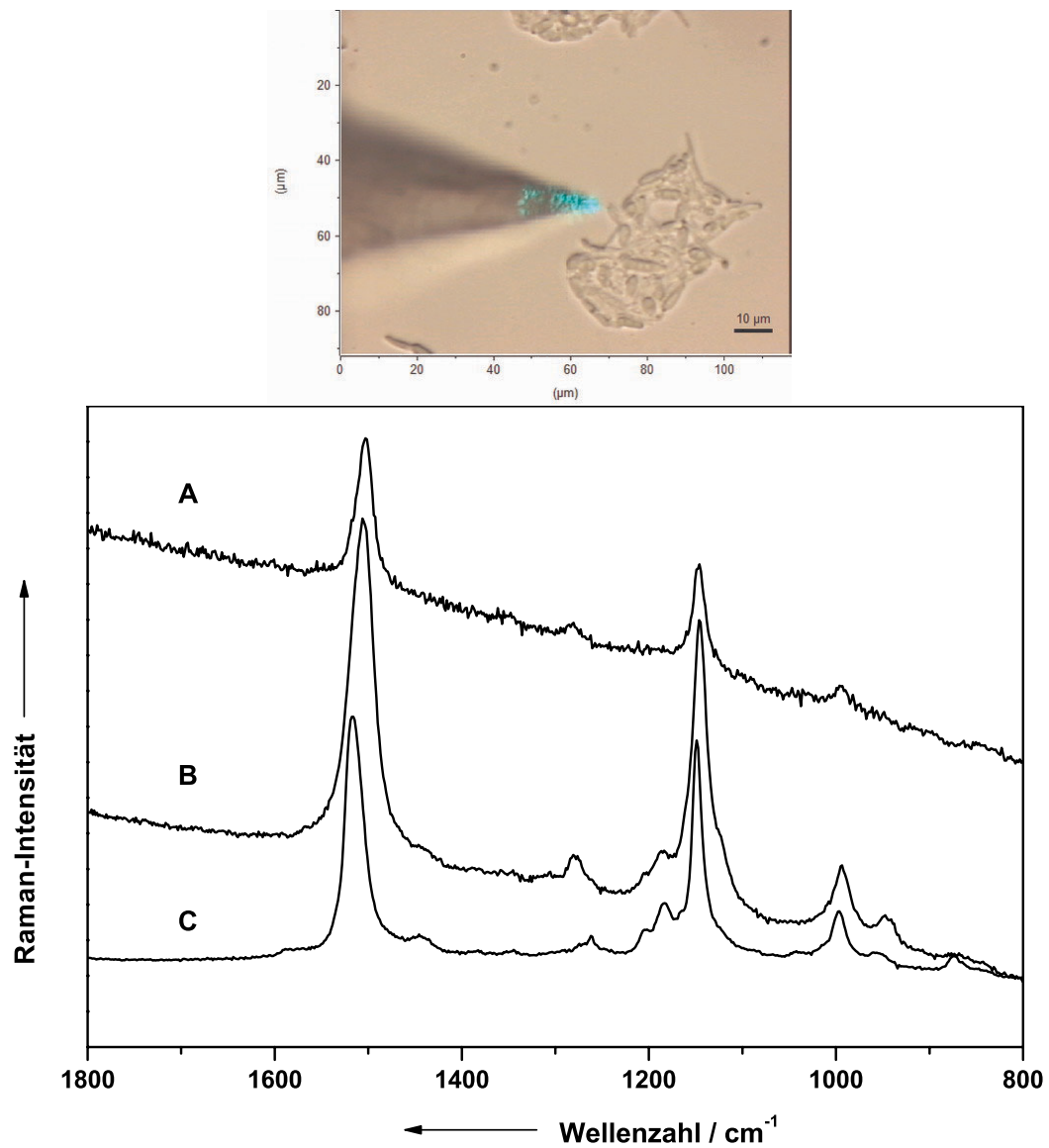
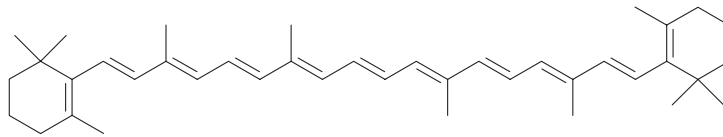


Abb. 4.10: Spektren von *R. mucilaginosa* mit verschiedenen Messmethoden: A: Spektrum einzelner Hefezellen, aufgenommen mit der Glasfasersonde; B: Spektrum einer Multischicht von Hefezellen, aufgenommen von der Nährplatte mit einem Mikro-Raman-Setup; C: Referenzspektrum einer ethanolischen β -Carotin-Lösung.



β -Carotin

Abb. 4.11: Strukturformel von β -Carotin.

50 mW; Integrationszeit: 1 s) direkt von der Zuchtplatte durchgeführt wurde, auf der die Zellen in Kolonien mit vielen Multilagen vorliegen. Auch dieser Messpunkt war nach der Aufnahme des Spektrums sichtbar durch den Laser geschädigt. Spektrum C wurde aus einer ethanolischen Lösung von β -Carotin aufgenommen und wurde hier zum Vergleich eingefügt.

Die Membranen dieser Hefezellen sind mit β -Carotin (Struktur, siehe Abb. 4.11), als Lichtschutzpigment, gefärbt. [150] Deutlich sind die Hauptbanden von β -Carotin bei 1513, 1159 und 1009 cm^{-1} zu erkennen. Diese sind der symmetrischen C=C-Doppelbindungsstrettschwingung, der symmetrischen C-C-Einfachbindungsstrettschwingung, bzw. der C-CH₃-Strettschwingung des Molekülgerüsts zuzuordnen.

Die Verschiebung der Banden in der ethanolischen Lösung und den Spektren an den Hefezellen resultiert dabei darauf, dass das β -Carotin im Mikroorganismus in die zelluläre Matrix der Zellwand eingebettet ist. Obwohl das Signal/Rausch-Verhältnis bei Spektrum B besser ist als bei Spektrum A, können doch alle relevanten Informationen aus Spektrum A entnommen werden. Insbesondere ist zu beachten, dass die Leistung des Anregungslasers auf der Probe um den Faktor 250 niedriger war als bei Spektrum B und eine wesentlich geringere Probenmenge für die Messung zur Verfügung stand.

Die Anwendung dieser Technik ist insbesondere dann interessant, wenn nur sehr geringe Probenmengen zur Verfügung stehen. Gerade bei der Identifizierung von Mikroorganismen könnte hierdurch ein Zeitgewinn erzielt werden, da es nicht nötig ist,

die Mikroben langwierig auf einem Nährmedium zu züchten. Zusätzlich zur niedrigen Laserleistung wird die Probe außerdem auch dadurch geschont, dass der Laser erst direkt am eigentlichen Messpunkt auf die Probe trifft und nicht das umgebende Material passieren muss.

4.1.6 Detektion von Pflanzenschutzmittel-Rückständen auf Rebpflanzen

Eine weitere Herausforderung für spektroskopische Anwendungen ist der Nachweis von Pflanzenschutzmittelrückständen auf den Pflanzen. In einer Zusammenarbeit mit der Landesanstalt für Wein- und Gartenbau (LWG) in Veitshöchheim wurde geprüft, ob es möglich ist, die Rückstände von Spritzmitteln auf den Blättern von Wein-/Rebstöcken zu detektieren.

Bei dem untersuchten Pestizid handelt es sich um Aktuan, ein im Weinbau unter anderem gegen den Falschen Mehltau (*Rebenperonospora*, *Plasmopora viticola*) und Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) eingesetztes Fungizid, dessen wirksame Bestandteile aus den beiden Substanzen Cymoxanil und Dithianon (Abb. 4.12) bestehen.

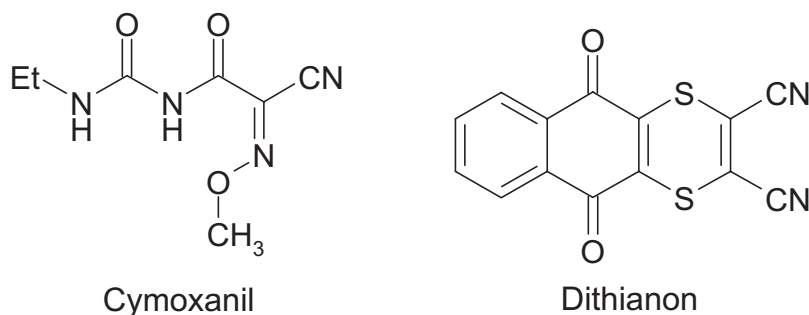


Abb. 4.12: Strukturformeln von Cymoxanil und Dithianon.

Hierfür wurden durch einen Mitarbeiter der Landesanstalt für Wein- und Gartenbau (LWG) in Veitshöchheim mehrere im Freiland stehende Pflanzen der Silvaner-Rebe jeweils mit der Fungizid-Lösung in einer anwendungsüblichen Konzentration

(0,125 % Aktuan in Wasser) besprüht. Die Anteile der Wirkstoffe an der Formulierung Aktuan betragen 100 mg/g Cymoxanil und 250 mg/g Dithianon. Nach einem Tag wurden von den Pflanzen einige Blätter als Proben genommen und im Labor untersucht. Hierfür wurden aus den Blättern Streifen geschnitten und auf einen Objektträger präpariert. Für die Messung wird mit dem Mikroskop auf den gewünschten Messpunkt fokussiert und — im Fall der Messung mit der Glasfasersonde — mit Hilfe des Mikromanipulators die Spitze der Fasersonde auf den zu messenden Punkt gefahren.

Die Messungen wurden vergleichend durchgeführt, d. h. es wurden sowohl Messungen mit einem Mikro-Raman-Setup als auch mit der SERS-Fasersonde durchgeführt und gegenübergestellt.

In Abb. 4.13 wird ein SERS-Spektrum einer Aktuan-Lösung in Silber-Kolloid (Spektrum A) mit den beiden Reinsubstanzen Dithianon (Spektrum B) und Cymoxanil (Spektrum C) verglichen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden alle Spektren Basislinien-korrigiert. Außerdem wurden die beiden Spektren der Reinsubstanzen jeweils mit einem Faktor 5 multipliziert, um den Vergleich mit dem Spektrum der Pestizid-Formulierung zu erleichtern. Die Konzentration von Aktuan in der Silber-Kolloidlösung betrug 10^{-4} M (bezogen auf den Wirkstoff Dithianon), während die beiden Reinsubstanzen in kristalliner Form spektroskopiert wurden. Der Vergleich mit den Spektren der Reinsubstanzen Cymoxanil und Dithianon zeigt eine hinreichende Übereinstimmung bestimmter Banden. Am auffälligsten sind jedoch die Banden der $C\equiv N$ -Streckschwingungen bei 2217 und 2235 cm^{-1} , die als Markerbande dienen können, da in diesem Bereich sonst keine anderen Signale auftreten. Im SERS-Spektrum der Aktuan-Lösung ist allerdings nur ein verhältnismäßig breites Signal im Bereich 2214 cm^{-1} zu finden. Dies lässt sich einerseits durch Wechselwirkungen mit den unbekanntem Beimengungen in der Formulierung und andererseits durch die anteilig niedrigere Konzentration des Wirkstoffs Cymoxanil erklären. Die Teile des Aktuan-Spektrums, die nicht durch die beiden Reinsubstanzspektren zu erklären sind, sind wahrscheinlich ebenfalls durch die nicht bekannten Beimischungen

der Pestizid-Formulierung erklärbar.

Bei der Untersuchung der Weinblätter mit dem Mikroskop fielen kleine Verfärbungen auf der Oberfläche des Blattes auf, die sich bei näherer Betrachtung als mikrokristalline Partikel identifizieren ließen. Da es sich bei Aktuan um ein wasserdispergierbares, regenfestes Präparat handelt [151], das teil-systemisch wirkt, wurden diese Verfärbungen spektroskopisch näher untersucht.

In Abb. 4.14 sind die Spektren solcher Mikrokristallite, die mit der Glasfasersonde (A) bzw. mit dem Mikro-Raman-Setup (B) erstellt wurden, gegenübergestellt. Spektrum A wurde mit einer Integrationszeit von 300 s bei einer Laserleistung von 0,1 mW an der Faserspitze aufgenommen. Bei der Aufnahme des Mikro-Raman-

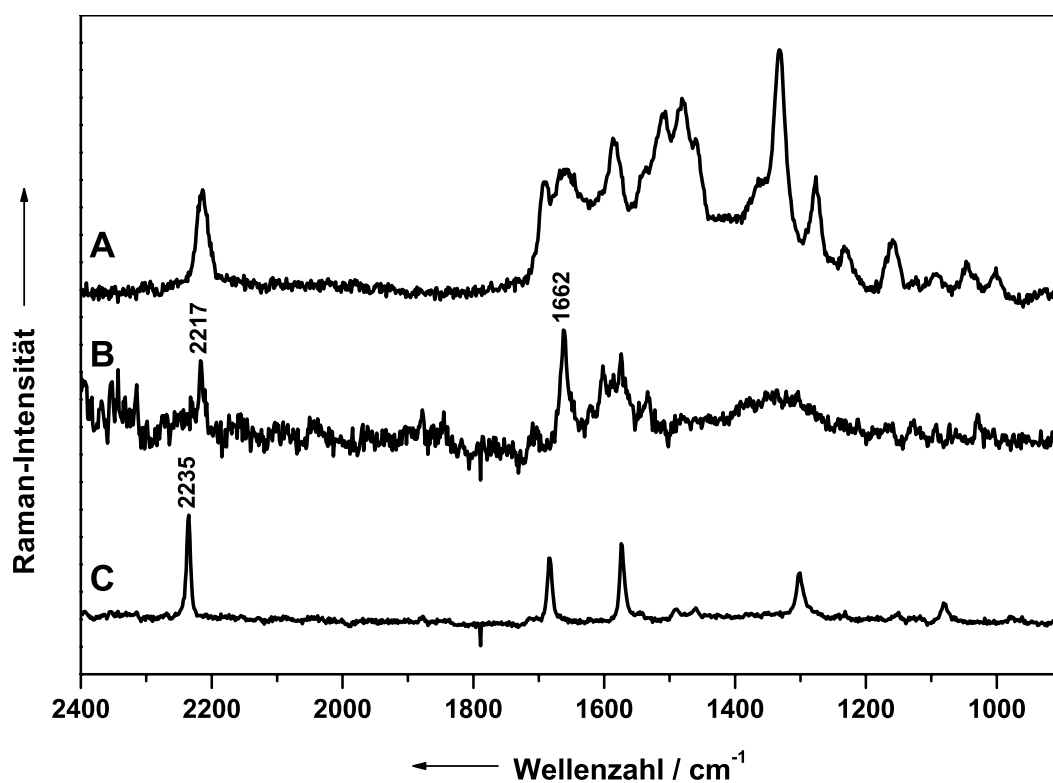


Abb. 4.13: SERS-Spektrum von Aktuan in Lösung (A) und den beiden Wirkstoffen Dithianon (B) und Cymoxanil (C) als Reinsubstanzen. Die Spektren von Cymoxanil und Dithianon wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit Faktor 5 multipliziert.

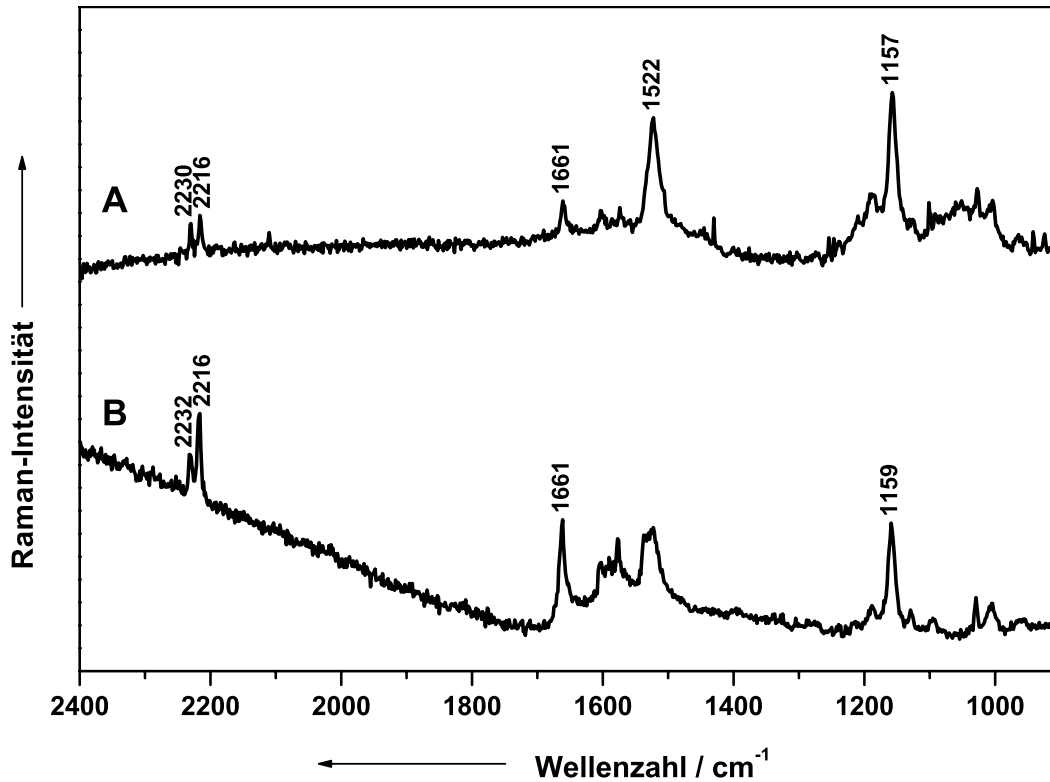


Abb. 4.14: Spektren von Aktuan auf einem Weinblatt. A: Spektrum mit der Fasersonde; B: Mikro-Raman-Spektrum.

Spektrums betrug die Integrationszeit 480 s und die Laserleistung musste durch Abschwächer auf $50 \mu\text{W}$ gesenkt werden, da sonst die Struktur des Blattes geschädigt wurde und der Messpunkt durch Verformung des Blattes aus dem Fokus lief. Bei Verwendung der Glasfasersonde traten derartige „Verbrennungen“ in weit geringerem Ausmaß auf, obwohl in diesem speziellen Fall die Laserleistung an der Faserspitze höher war, als beim Mikro-Raman-Setup. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt liegt in der unterschiedlichen Einstrahlrichtung des Anregungslasers. Während im Mikro-Raman-Experiment der Laser senkrecht auf die Probe trifft und damit die volle Laserleistung auf eine im Vergleich kleine Fläche konzentriert wird, wirkt der Laser bei Verwendung der Fasersonde nur „streifend“ auf die Blattoberfläche ein.

Bei etwa 2230 und 2216 cm^{-1} sind die beiden Banden der $\text{C}\equiv\text{N}$ -Streckschwingungen für die beiden Wirkstoffmoleküle zu erkennen. Ansonsten lässt

sich allerdings nur das Signal bei 1661 cm^{-1} mit einer Bande im Spektrum von Dithianon in Übereinstimmung bringen. Die Intensitätsverhältnisse der beiden Cyanid-Banden in den Spektren lässt vermuten, dass die Konzentration von Cymoxanil in den gefundenen Mikrokristalliten höher ist als in der Original-Formulierung. Des Weiteren sind in Spektrum A der Abb. 4.14 bei 1522 und 1157 cm^{-1} die Hauptbanden von β -Carotin zu erkennen, die in Spektrum B nicht erscheinen. Möglicherweise ist dies ebenfalls auf die unterschiedliche Bestrahlungsrichtung bei der Anregung der Probe zurückzuführen.

4.2 Optische Gradientenfalle (Optische Pinzette)

Zur Raman-spektroskopischen Untersuchung von Suspensionspartikeln oder Schwebeteilchen in der Luft ist es notwendig, diese in geeigneter Weise zu stabilisieren, da es sonst auf Grund der Brown'schen Bewegung der Flüssigkeitsmoleküle nicht möglich ist, den Anregungslaser für eine ausreichend lange Integrationszeit auf ein Partikel zu fokussieren. Als geeignete Methode hierfür hat sich die „Optische Gradientenfalle“ bewährt. Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse, die mit der Kombination der optischen Gradientenfalle und dem Labram-System erhalten werden konnten, vorgestellt werden.

Mit dem in Abschnitt 3.3 vorgestellten Aufbau ist es möglich, Partikel mit einem relativen Brechungsindex von $m > 1$ zu fangen und festzuhalten. Diese können dann durch Raman-Spektroskopie charakterisiert werden.

Um die Funktionalität der Gradientenfalle zu evaluieren, wurden verschiedene Experimente mit biologischen und nicht-biologischen Proben durchgeführt.

4.2.1 Messungen an gefangenen Polystyrolkugeln

Zunächst wurde die Falle mit in Wasser suspendierten Polystyrol-Mikrokugeln getestet. Zur Fokussierung des Fallenlasers wurde ein Olympus ULWD 80x-Objektiv

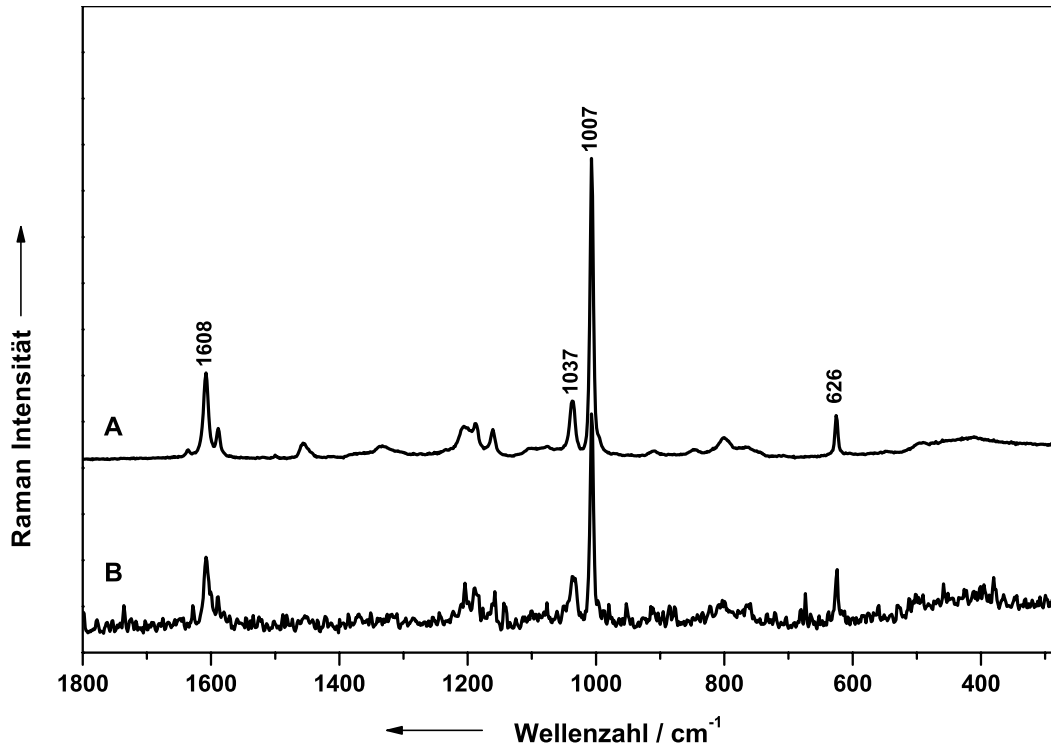


Abb. 4.15: Spektren von Polystyrol-Mikrokugeln in Wasser. A: Spektrum einer sedimentierten Polystyrolkugel; B: Spektrum einer gefangenen und levitierten Kugel.

mit einer Numerischen Apertur (NA) von 0,75 verwendet. Es zeigte sich jedoch sehr schnell, dass es mit diesem Aufbau nur schlecht möglich war, Mikropartikel dieser Größe zu manipulieren, da sie durch ihr Eigengewicht und den Strahlungsdruck des Fallenlasers sehr schnell aus der Suspension sedimentierten und an der Küvettenwand haften bleiben. Daher wurde ein Aufbau entwickelt, bei dem der Strahlungsdruck des Fallenlasers der Schwerkraft entgegenwirken sollte. Hierzu muss der Fallenlaser das zu fangende Partikel von unten treffen. Dies konnte mit dem in Abb. 3.16 beschriebenen Aufbau realisiert werden.

Als Anregungslaser wurde die 514,5 nm-Linie des Argon-Ionen-Lasers verwendet. Die Leistung des Anregungslasers unter dem Mikroskop betrug 50 mW und die Integrationszeit für die Spektren jeweils 60 Sekunden.

Die wichtigsten Banden für Polystyrol lassen sich dabei wie folgt zuordnen [152]: Die Bande bei 1608 cm^{-1} entspricht der C=C-Streckschwingung in Aromaten und das Signal bei 1037 cm^{-1} einer *in plane*-Deformationsschwingung am Phenylsubstituenten. Das sehr starke Signal bei 1007 cm^{-1} lässt sich der Ringatmungsschwingung des Phenylrings und die Bande bei 626 cm^{-1} einer Ringdeformationsschwingung zuordnen.

Spektrum A in Abb. 4.15 wurde zum Vergleich an einer sedimentierten Polystyrol-Mikrokugel aufgenommen. Der Fallenlaser war für dieses Spektrum ausgeschaltet. Spektrum B wurde von einer Kugel aufgenommen, die durch den IR-Fallenlaser stabil gefangen wurde.

Man kann erkennen, dass zwar für das Spektrum der Polystyrolkugel unter Verwendung der Gradientenfalle das Signal/Rausch-Verhältnis etwas schlechter ist als bei dem Spektrum, das bei ausgeschaltetem Fallenlaser aufgenommen wurde, allerdings sind alle Banden zu erkennen. Auch könnte das Signal/Rausch-Verhältnis durch eine längere Integrationszeit verbessert werden.

Das schlechtere Signal/Rausch-Verhältnis ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das gefangene Mikropartikel nicht genau vom Anregungslaser getroffen wird. Dies ließ sich jedoch nicht vermeiden, da durch den Einsatz des zweiten Mikroskopobjektivs für den Fallenlaser die Bildgebung des Mikroskops sehr schlecht und eine Justage der beiden Strahlengänge sehr schwierig war. Die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Fallenaufbaus war jedoch mit diesem Experiment erwiesen.

4.2.2 Messungen an gefangenen Erythrocyten

Seit etwa zehn Jahren finden immer mehr Anwendungen Beachtung, die sich mit der Untersuchung von biologischen Zellen beschäftigen, wie der letzte Absatz deutlich macht. An diesen Zellen soll der Verlauf physiologischer Vorgänge, wie beispielsweise Infektionen, verfolgt werden. Besonders interessant sind dahingehend vor allem Blutzellen und hier insbesondere Erythrocyten.

Erythrocyten zeichnen sich durch eine Größe von etwa $8\ \mu\text{m}$ im Durchmesser und $2\ \mu\text{m}$ in der Dicke aus und besitzen eine bikonkave Form. Jeder Mikroliter Blut eines Menschen enthält im Schnitt etwa 5×10^6 rote Blutkörperchen, die für die Rotfärbung des Blutes verantwortlich sind. Ein gesunder Erwachsener besitzt demnach ungefähr 25 Billionen Erythrocyten. [153,154]

Die Aufgabe der Erythrocyten besteht darin, Sauerstoff von den Lungen zu den Organen und allen Teilen des Körpers zu transportieren. Gleichzeitig sind die roten Blutkörperchen für den Transport des vom Organismus produzierten Kohlendioxids zur Lunge verantwortlich, von wo es abgeatmet wird. Erythrocyten sind für alle energetischen Prozesse im Körper essentiell. Jegliche Krankheit, die die Erythrocyten beeinflusst, kann daher möglicherweise tödlich sein. Derartige funktionellen Einschränkungen der roten Blutkörperchen können vielfältige Ursachen haben. Sie können beispielsweise durch Vergiftungen (z. B. durch Cyanid oder Kohlenmonoxid) oder durch Infektionen mit Viren, Bakterien oder Parasiten hervorgerufen werden.

Im Falle einer Vergiftung wird die Bindungsstelle für das Sauerstoff- bzw. Kohlendioxid-Molekül durch eine andere, giftige Substanz blockiert, die eine höhere Affinität zu der Bindungsstelle im Erythrocyten besitzt. Hierdurch wird der Sauerstofftransport von der Lunge zu den lebenswichtigen Organen blockiert und der Organismus nimmt Schaden oder stirbt durch Sauerstoffmangel. Im Falle von Infektionen mit Viren, Bakterien oder Parasiten wirken oftmals andere Mechanismen. In diesen Fällen wird nicht die Bindungsstelle des Sauerstoff blockiert, sondern wichtige Strukturen in der Zelle geändert. Allerdings sind die Mechanismen, wie Viren mit Blutzellen interagieren, noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch der Infektionsverlauf des Parasiten *Plasmodium falciparum*, des Auslösers der Malaria, ist nach wie vor Subjekt intensiver Forschung. Detaillierte Kenntnisse über die Mechanismen von Infektionen sind daher ein unverzichtbarer Bestandteil der Entwicklung von Medikamenten.

Erythrocyten wurden bereits intensiv mit Raman-spektroskopischen Methoden untersucht. In den meisten Fällen wurden die roten Blutkörperchen auf eine Poly-

L-Lysin-Schicht sedimentiert und getrocknet. An diesen getrockneten Erythrocyten wurden dann Mikro-Raman-, Resonanz-Raman- und Raman-Imaging-Experimente durchgeführt. [155, 156] Den Raman-Banden konnten die Schwingungsbanden der Häm-Gruppe im Hämoglobin zugeordnet werden. [157, 158] Dabei wurde festgestellt, dass der Spinzustand des zentralen Eisenatoms in der Häm-Gruppe in Abhängigkeit von dem jeweils koordinierten Liganden geändert werden kann und dies spektroskopisch verfolgbar ist. Durch Variation der Liganden können Hämoglobin-Spektren erhalten werden, die besonders für medizinische Anwendungen interessant sind. So wurden beispielsweise die Raman-Spektren von Oxy- und Deoxy-, sowie von Carboxy- und Cyano-Hämoglobin präsentiert. [155, 158–160] Weitere Experimente wurden mit Erythrocyten durchgeführt, deren Zellwände zerstört wurden. Hierfür wurden die Blutzellen entweder mit dem Erreger *Plasmodium berghei* infiziert oder die Zerstörung der Zellwand wurde durch Zugabe eines Proteins ausgelöst. [161–163] Weiterhin konnten Zellschäden Raman-spektroskopisch verfolgt werden, die durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid, Lanthan, Kalzium, Gadolinium, Ytterbium und durch photochemische Methoden ausgelöst wurden. [163–167] Um intakte von „beschädigten“ Erythrocyten zu unterscheiden, wurden Blut gesunder Testpersonen mit dem von Personen verglichen, die einen Herzinfarkt oder eine Blutvergiftung erlitten hatten. [168] Die meisten dieser Experimente wurden allerdings nicht an einzelnen Erythrocyten durchgeführt oder erforderten eine Trocknung bzw. die Adsorption auf einem Trägersubstrat. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Experimente in gewisser Weise die Schwingungsbanden der untersuchten Spezies beeinflussen.

Mit unserem Aufbau wurden Raman-Spektren von gefangenen Erythrocyten (RBC) aufgenommen. Außerdem wurden die Einflüsse verschiedener Chemikalien auf die RBC Raman-spektroskopisch verfolgt. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im Folgenden präsentiert.

Da die gemessenen biologischen Mikropartikel kleiner als die Polystyrolkugeln waren, war eine gute Bildgebung für die Justage des Aufbaus unerlässlich. Es musste also eine Lösung gefunden werden, mit der es möglich ist, genügend hohe Gradientenkräfte mit dem Fallenlaser zu erzeugen, um die zu fangenden Mikropartikel stabil festhalten und gleichzeitig den Kondensator des Mikroskops benutzen zu können (Abb. 3.14). Dies konnte nur erreicht werden, indem ein Mikroskopobjektiv mit einer größeren Numerischen Apertur verwendet wird.

Im Arbeitskreis stand hierfür ein Zeiss C-Apochromat 40x-Wasserimmersionsobjektiv zur Verfügung, das mit einem Wert von 1,2 die größte Numerische Apertur aufwies, und gleichzeitig für den IR-Fallenlaser transparent war. Leider war die Vergrößerung des Objektivs nur 40x, wodurch die biologischen Proben in den Bildern teilweise nur schwer zu erkennen sind.

Erste Experimente an biologischen Proben wurden mit Erythrocyten (red blood cell; RBC) aus einer frischen Blutprobe durchgeführt. Ein Blutropfen wurde hierfür 1:1000 mit einer isotonischen Kochsalzlösung verdünnt. Als Probengefäß wurde eine improvisierte Küvette verwendet, die aus einem Objektträger, Silikonfett und einem Deckglas hergestellt wurde. Dies war notwendig, da das verwendete Wasserimmersionsobjektiv nur einen Arbeitsabstand von 0,22 mm hatte und daher größere Wandstärken als die eines Deckglases für das Probengefäß ungeeignet waren. Diese Methode hatte den zusätzlichen Vorteil, dass für jede Probe ein „neues“, absolut sauberes Probengefäß verwendet wurde. Die Messung erfolgte direkt im Anschluss an die Probenpräparation. Als Anregungslaser wurde die 633 nm-Linie des He:Ne-Lasers, bzw. die 514,5 nm-Linie (Abschnitt 4.3.2) des Argon-Ionen-Lasers verwendet.

Für die Messung wurde zunächst ein frei diffundierendes RBC gesucht und mit dem Fallenlaser gefangen. Eine Kontrolle, ob die Zelle auch tatsächlich im Laserfokus gefangen war, konnte optisch erfolgen, indem man die Diffusion der umgebenden Zellen bezüglich des nun stationären, „gefangenen“ RBC betrachtete (Abb. 4.16). Anschließend wurde der Messlaser eingeschaltet und die Messung durchgeführt. Es wurden jeweils Spektren bei einer Anregungswellenlänge von 633 und 514,5 nm

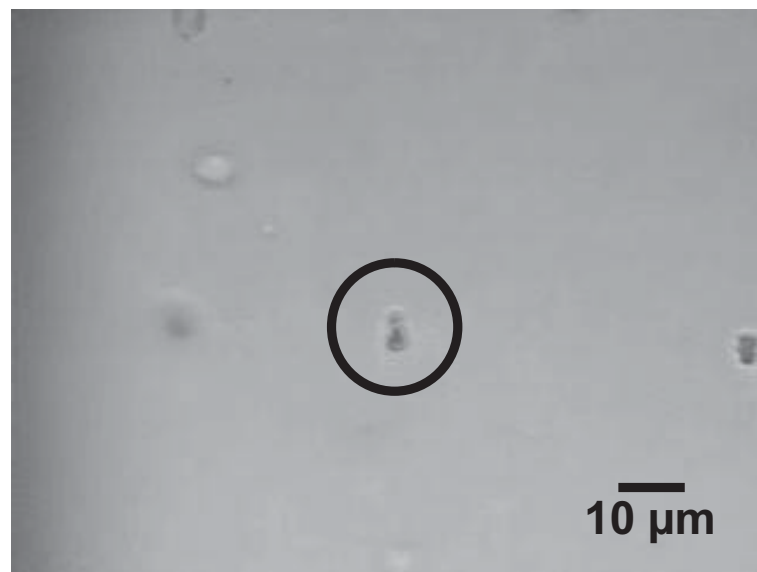


Abb. 4.16: Mikroskopaufnahme einer gefangenen RBC.

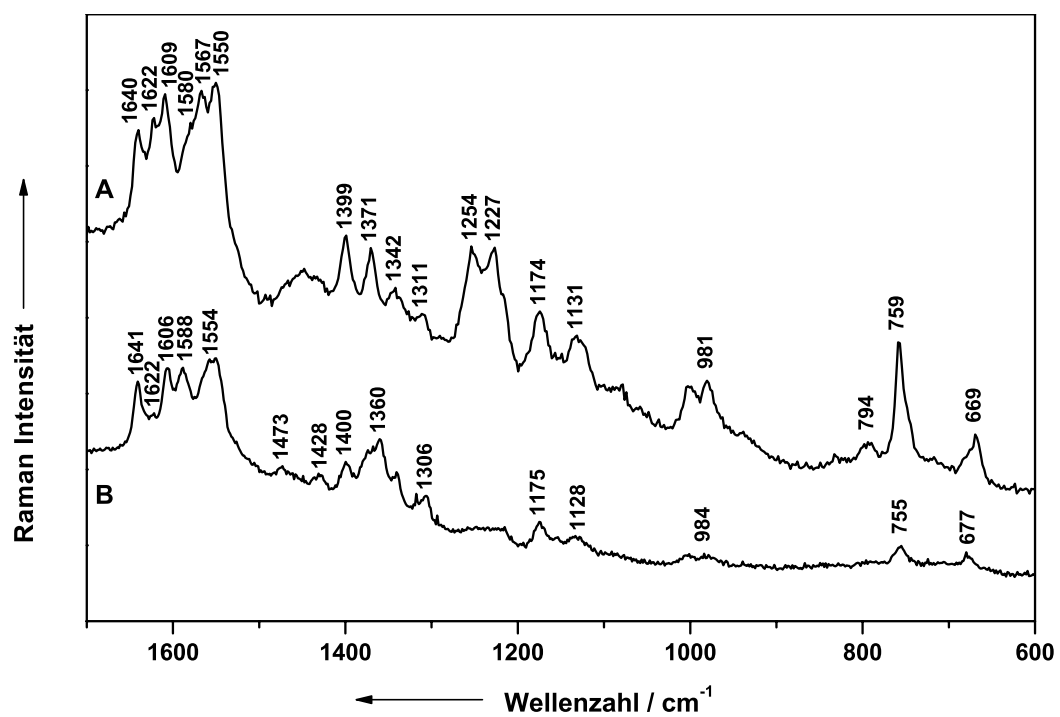


Abb. 4.17: Spektren von einzelnen gefangenen RBC bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm (A) und 514,5 nm (B).

aufgenommen. Die Messbedingungen für die dargestellten Spektren waren dabei jeweils 1 mW bei einer Integrationszeit von 300 s. Die Spektren, die von den RBC erhalten werden konnten, sind in Abb. 4.17 zu sehen.

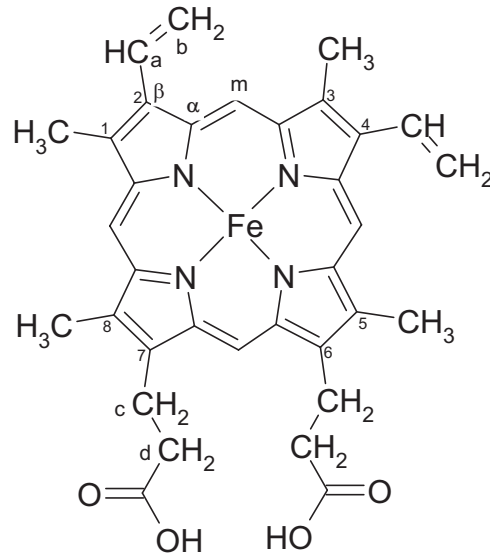


Abb. 4.18: Protoporphyrin als Modells substanz für das Häm im Hämoglobin.

Die Bandenpositionen stimmen relativ gut mit denen überein, die Wood und McNaughton [169] bei ihren Messungen an einzelnen auf eine Poly-L-Lysin-Schicht sedimentierten RBC erhalten haben. Für die Zuordnung der Banden wird Bezug auf die Arbeiten von Abe et al. sowie Hu et al. genommen, wobei als Modells substanz für den roten Blutfarbstoff das Eisen-Protoporphyrin-IX verwendet wurde. [170,171] Die Struktur dieser Substanz ist zum besseren Verständnis der Bandenzuordnungen mit den entsprechenden Indizes an den relevanten Atomen in Abb. 4.18 dargestellt. Die Banden bei 1640, 1609 und 1588 cm^{-1} können verschiedenen asymmetrischen Streckschwingungen zwischen dem C_α der Pyrrol-Ringe und dem Brückenatom C_m zwischen den Ringen zugeordnet werden. Die Schulter bei 1622 cm^{-1} wird durch die Doppelbindungsstreckschwingungen in den Seitenketten verursacht. Die schwache Bande bei 1429 cm^{-1} ist der symmetrischen Streckschwingung von C_α und C_m zuzuordnen. Die Banden bei 1311 und 1254 cm^{-1} gehören zu den

Tab. 4.2: Zuordnung der wichtigsten Raman-Schwingungsbanden für das mit der optischen Gradientenfalle gefangene RBC bei verschiedenen Anregungswellenlängen (Zuordnung nach Wood et al. [169–171])

633 nm	514,5 nm	zugeordnete Schwingung
1640	1641	$\nu_{as}(C_\alpha C_m)$
1622	1622	$\nu(C_a=C_b)$
1609	1606	$\nu_{as}(C_\alpha C_m)$
1580	1588	$\nu_{as}(C_\alpha C_m)$
1567		$\nu(C_\beta C_\beta)$
1550	1554	$\nu(C_\beta C_\beta)$
	1473	-CH ₂ (<i>scissor</i>)
	1428	$\nu_s(C_\alpha C_m)$
1399	1400	$\nu(\text{pyr quarter-ring})$
1371		$\nu_s(\text{pyr half-ring})$
	1360	
1342	1340	$\nu_s(\text{pyr half-ring})$
1311	1306	$\delta(C_m H)$
1254		$\delta(C_m H)$
1227		$\delta(C_m H)$
1174	1175	$\nu_{as}(\text{pyr half-ring})$
1131	1128	$\nu_{as}(\text{pyr half-ring})$
981	984	$\delta_{as}(\text{pyr deform})$
794		$\nu(\text{pyr breathing})$
759	755	$\nu(\text{pyr breathing})$
669	677	$\delta_s(\text{pyr deform})$

C_m -H-Deformationsschwingungen der Brückenatome. Die Signale bei 1399, 1371, 1342, 1174 und 1131 cm^{-1} werden durch verschiedene symmetrische und asymmetrische Streckschwingungen der Pyrrol-Ringe verursacht und die Banden bei 794 und 759 cm^{-1} gehören zu den Pyrrol-Ringatmungsschwingungen. Eine Zusammenfassung der Bandenzuordnung ist in Tab. 4.2 aufgelistet. Die Unterschiede in den Spektren sind auf Resonanzeffekte durch die verschiedenen Anregungslaser-Wellenlängen zurückzuführen. Dies ist besonders gut an den Banden bei 981, 1227 und 1254 cm^{-1} zu erkennen, die hauptsächlich in Spektrum A erscheinen.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, ob es mit der optischen Gradientenfalle auch möglich ist, den Einfluss von Chemikalien auf die Erythrocyten zu untersuchen. Hierzu wurde die verdünnte Lösung mit den RBC mit einer ebenfalls isotonischen Lösung von Natrium-Dithionit versetzt, um dem RBC den Sauerstoff zu entziehen. Anschließend wurde die Messung wie oben beschrieben durchgeführt. Als Anregungslaser diente hier die 514,5 nm-Linie des Argon-Ionen-Lasers. Dieses Experiment wurde ebenfalls bereits von Wood et al. [158,169] für RBC durchgeführt, die sich aus der Verdünnung auf einer Poly-L-Lysin-Schicht abgesetzt hatten.

Das Ergebnis dieser Messung ist in Abb. 4.19 dargestellt. Zum Vergleich wurde auch das Spektrum der oxygenierten Spezies bei der gleichen Anregungswellenlänge mit eingefügt. Am auffälligsten sind wohl die Änderungen in der *spin state marker band region* von 1650–1500 cm^{-1} . Die hier beobachtbaren Intensitätsänderungen werden durch eine Änderung des Spinzustandes des zentralen Eisenatoms in der Häm-Gruppe verursacht. Das Fehlen der Bande bei 1640 cm^{-1} ist durch das Weiss-Modell zu erklären. [157, 172] Nach diesem Modell beeinflusst der Ligand, der an das Zentralatom gebunden ist, stark den Spinzustand dieses Atoms. Ein koordiniertes Sauerstoffatom würde demnach Elektronendichte vom Eisenatom abziehen und das Eisen befände sich in einem *Low-spin*-Zustand, ohne den koordinierten Sauerstoff dagegen in einem *High-spin*-Zustand, da dann die Elektronendichte am Eisen erhöht ist. Der Spinzustand hat jedoch Auswirkungen auf die räumliche Struktur des Hämoglobins. Im *High-spin*-Zustand befindet sich das Eisenatom ca.

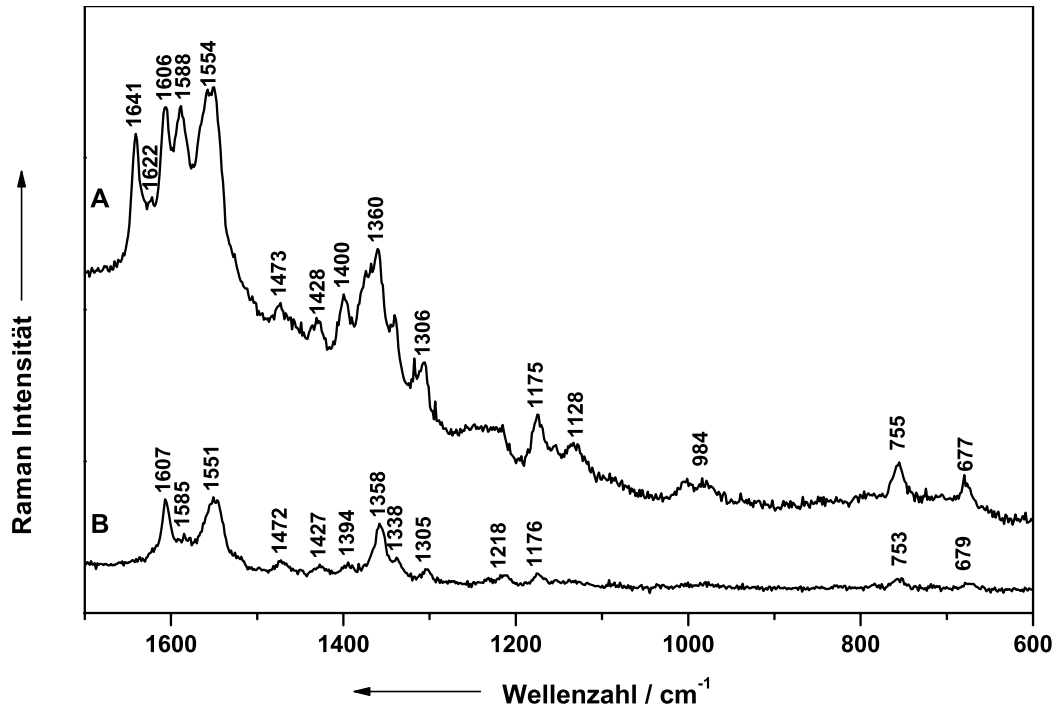


Abb. 4.19: Spektren von einem einzelnen gefangenem RBC bei einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm im oxygenierten (A) und deoxygenierten Zustand (B).

0.4 Å außerhalb der Ebene des Porphyrinringes und der Porphyrinring ist somit etwas gewölbt. Dadurch weist er eine idealisierte C_{4v} -Symmetrie auf. Im *Low-spin*-Zustand ist der Porphyrinring ebener und das Hämoglobin zeigt eine idealisierte C_{4h} -Symmetrie. Dadurch, dass das Eisenatom im *Low-spin*-Zustand mehr in der Ebene des Ringes liegt, kommt es zu Störungen der Schwingungen und der Anteil der nicht-totalsymmetrischen Banden nimmt zu. Eine Zusammenfassung der Zuordnung der Signale ist in Tab. 4.3 aufgelistet.

Weiterhin wurde der Einfluss einer Sättigung der RBC-Suspension mit Kohlenmonoxid auf des Raman-Spektrum des gefangenen Blutkörperchens untersucht. Hierfür wurde ein Kohlenmonoxid-Strom durch die verdünnte Blutsuspension geleitet. Die Resultate dieses Experiments sind in Abb. 4.20 dargestellt.

Spektrum A wurde von einem unbehandelten, oxygenierten RBC aufgezeichnet.

Tab. 4.3: Zuordnung der Raman-Schwingungsbanden für das mit der optischen Gradientenfalle gefangene RBC in oxygeniertem und in deoxygeniertem Zustand. (Zuordnung nach Wood et al. [169–171])

oxygeniert	deoxygeniert	zugeordnete Schwingung
1641		$\nu_{as}(C_{\alpha}C_m)$
1622		$\nu(C_a=C_b)$
1606	1607	$\nu_{as}(C_{\alpha}C_m)$
1588	1585	$\nu_{as}(C_{\alpha}C_m)$
1554	1551	$\nu(C_{\beta}C_{\beta})$
1473	1472	$-\text{CH}_2$ (<i>scissor</i>)
1428	1427	$\nu_s(C_{\alpha}C_m)$
1400	1394	$\nu(\text{pyr quarter-ring})$
1360	1358	$\nu_s(\text{pyr half-ring})$
1340	1338	$\nu_s(\text{pyr half-ring})$
1306	1305	$\delta(C_m\text{H})$
	1218	$\delta(C_m\text{H})$
1175	1176	$\nu_{as}(\text{pyr half-ring})$
1128		$\nu_{as}(\text{pyr half-ring})$
984		$\delta_{as}(\text{pyr deform})$
755	753	$\nu(\text{pyr breathing})$
677	679	$\delta_s(\text{pyr deform})$

Die Integrationszeit betrug 300 s und die Laserleistung 1 mW. Für Spektrum B (carboxyliertes RBC) wurde eine Integrationszeit von 600 s und eine Laserleistung von 0,25 mW gewählt. Um eine bessere direkte Vergleichbarkeit der Spektren zu erreichen, wurden die Intensitätswerte für das Spektrum des oxygenierten RBC durch

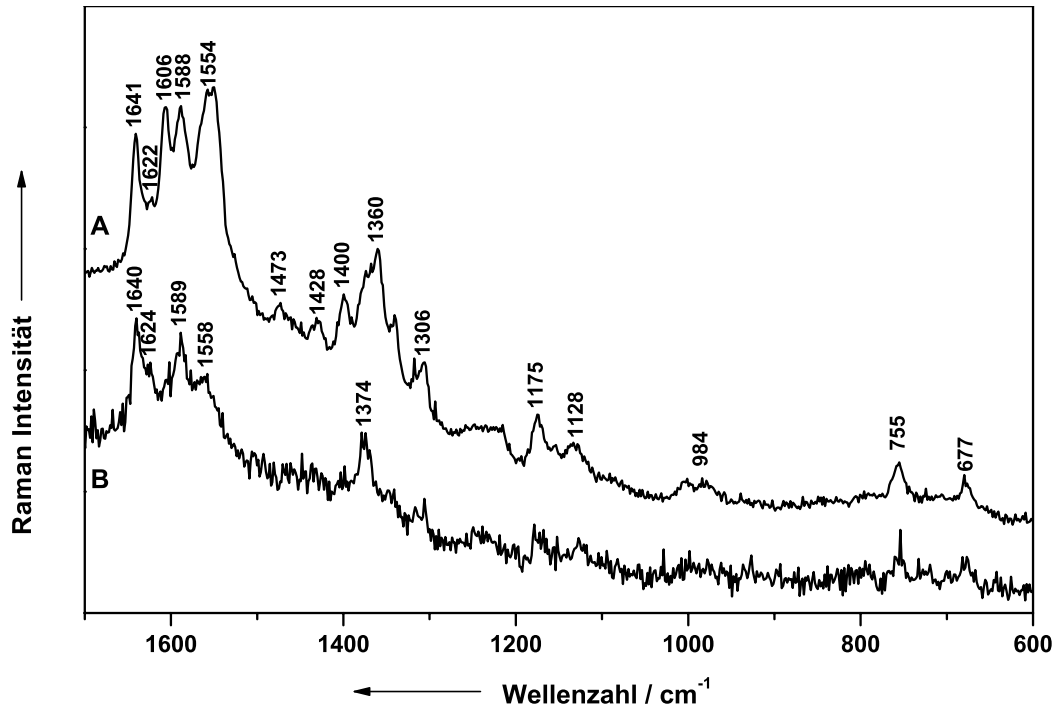


Abb. 4.20: Vergleich zwischen den Spektren eines oxygenierten (A) und eines carboxylierten (B) RBC.

den Faktor vier geteilt. Trotz der schlechteren Qualität des Spektrums ist gut zu erkennen, dass im Vergleich zu Spektrum A im Bereich bis etwa 1320 cm^{-1} kaum Änderungen im Spektrum auftreten. Bedeutende Änderungen sind dagegen wiederum in der *spin state marker band region* von $1650\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ festzustellen. Die Bande der $C_{\alpha}\text{--}C_m$ -Streckschwingung verschwindet und auch die Bande der $C_{\beta}\text{--}C_{\beta}$ -Streckschwingung verliert an Intensität. Dies lässt auf jeden Fall schließen, dass es zu einer Verdrängung des Sauerstoffs von seiner Koordinationsstelle am Eisen durch einen Kohlenmonoxid-Liganden gekommen sein muss.

Im Anschluss sollte noch geprüft werden, ob derartige Änderungen im Raman-Spektrum von Erythrocyten auch durch Cyanid-Ionen hervorgerufen werden. Hierfür wurde die 633 nm -Linie des He:Ne-Lasers zur Anregung verwendet.

Abb. 4.21 zeigt die bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm von der RBC-Cyanid-Lösung (Spektrum A) bzw. von der reinen Cyanid-Lösung bei einer Laser-

leistung von 1 mW und einer Integrationszeit von 300 s erhalten werden konnten. Man kann erkennen, dass in Gegenwart der Cyanid-Lösung eine sehr starke Fluoreszenz auftritt, die die Raman-Signale fast verdeckt. Dennoch sind einige Banden des Erythrocyten-Spektrums zu erkennen. Daher wurde in Abb. 4.22 das Spektrum eines oxygenierten RBC (A) dem Spektrum eines Cyanid-behandelten RBC (B) gegenübergestellt. Spektrum B wurde Basislinien-korrigiert, um eine vergleichbare Darstellung zu erhalten.

Ebenso wie für das carboxylierte RBC, zeigen sich im Bereich bis 1500 cm^{-1} kaum Änderungen im Spektrum. Lediglich in der *spin state marker band region* kommt es zu einer Verminderung der Intensität der Banden bei 1550 und 1609 cm^{-1} und die Maxima der Banden bei 1567 und 1640 cm^{-1} (Spektrum A) verschieben sich nach 1541 und 1646 cm^{-1} . Daher ist auch hier davon auszugehen, dass das

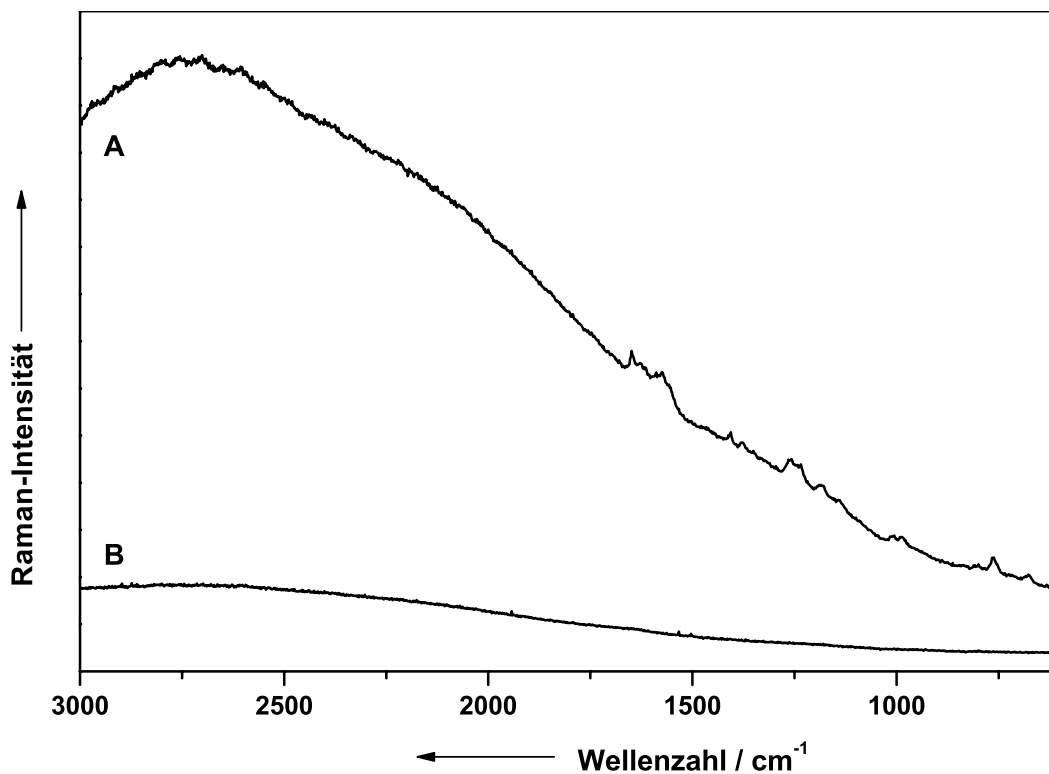


Abb. 4.21: Spektren eines RBC in einer Cyanid-haltigen Suspension (A) und der Cyanid-Lösung ohne RBC (B).

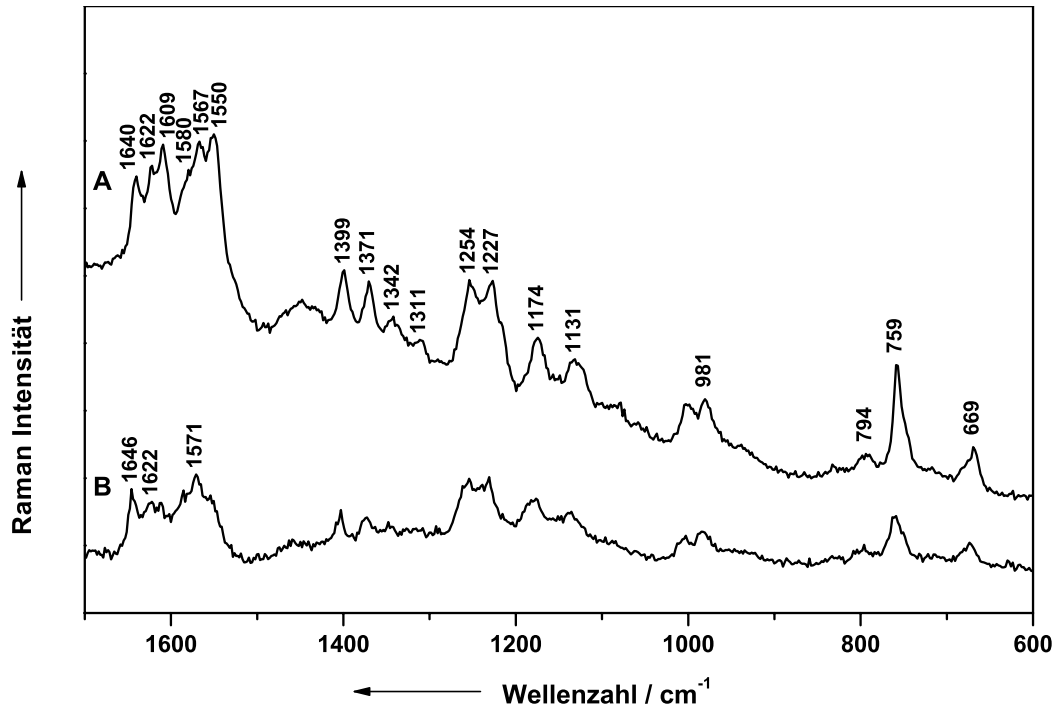


Abb. 4.22: Vergleich zwischen den Spektren eines oxygenierten (A) und eines Untergrund-korrigierten, Cyanid-behandelten RBC (B).

den Sauerstoff ersetzende Cyanid-Ion Einfluss nimmt auf den Spinzustand des im Hämoglobin koordinierten Eisenatoms, wie es für einen starken Liganden wie Cyanid auch zu erwarten ist.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der optischen Gradientenfalle eine Beobachtung von einzelnen Erythrocyten unter sehr schonenden Bedingungen möglich ist. Dabei sind Veränderungen im Spin-Zustand in Abhängigkeit der an das zentrale Eisenatom des Hämoglobins koordinierten Liganden zu erkennen. Durch die Trennung von Anregungs- und Fallenlaser ist es außerdem möglich, im Bedarfsfall schnell die Anregungslaserwellenlänge zu wechseln, ohne das gefangene Partikel zu verlieren.

4.2.3 Messungen an *Rhodotorula mucilaginosa*

Zusätzlich zu den Erythrocyten wurden Spektren von *Rhodotorula mucilaginosa* aufgenommen. Hierbei handelt es sich um Hefezellen, die keine ideal-runde, sondern eine längliche Form haben. Durch die Gradientenkräfte des Fallenlasers (50 mW) werden aber auch die länglichen Zellen der Hefe in Richtung der Strahlachse der Laser ausgerichtet und stabil gehalten. Dies hat den Vorteil, dass der Laserfokus, der ebenfalls seine größte Ausdehnung in Richtung der Strahlachse hat, in einem größeren Bereich mit der Probe überlappt. Abb. 4.23 zeigt das Spektrum von der Hefezelle, das bei einer Anregungswellenlänge von 514,5 nm aufgenommen wurde. Die Integrationszeit betrug 120 s bei einer Anregungslaserleistung von 50 mW auf der Probe. Messungen ohne den Einsatz der optischen Gradientenfalle erbrachten

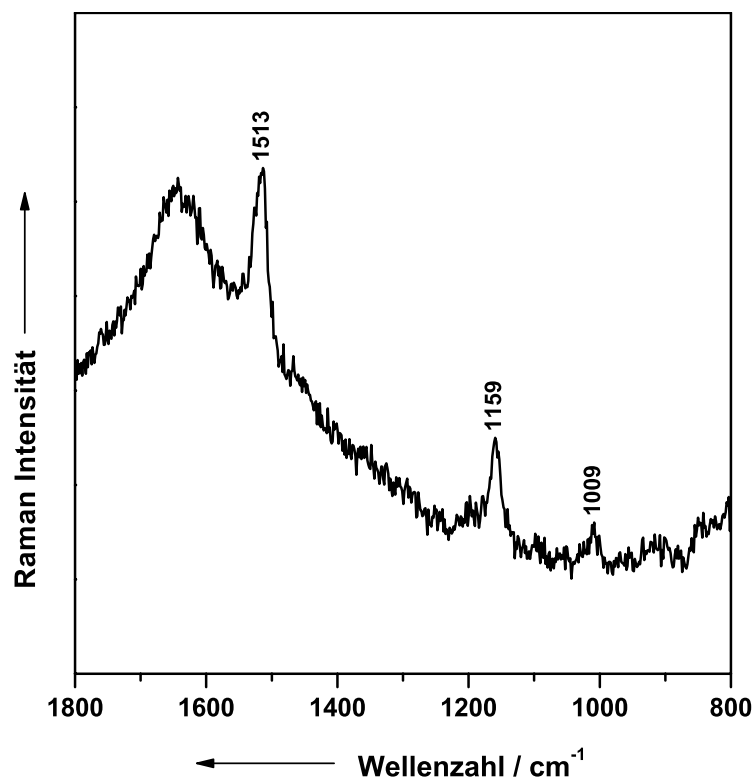


Abb. 4.23: Raman-Spektrum einer mit der Gradientenfalle gefangenen Hefezelle (*Rhodotorula mucilaginosa*).

dagegen keine verwertbaren Ergebnisse, da die Zellen nicht im Laserfokus des Anregungslasers blieben.

4.2.4 Messungen mit gefangenen Metallpartikeln als SERS-Substrat

Bei der Messung von biologischen Proben ist es häufig wünschenswert, die Vorteile der SERS-Verstärkung nutzen zu können, ohne dass die Probe dabei irreversibel mit einem beispielsweise kolloidalen SERS-Substrat kontaminiert wird. Deswegen wurde neben der Silber-beschichteten Glasfasersonde eine weitere Möglichkeit entwickelt, um ein SERS-aktives Substrat in kleinen kontrollierbaren Mengen in Zellsuspensionen verwenden zu können. Als SERS-Substrat dient Conduct-O-Fil[®]. Dabei handelt es sich um Silber-beschichtete Glas-Mikrokugeln, die als Additiv zu Füllstoffen oder Lacken konzipiert sind, um diesen eine elektrische und/oder thermische Leitfähigkeit zu verleihen. Eine ausführliche Diskussion der SERS-Eigenschaften von Conduct-O-Fil[®] wurde bereits an anderer Stelle ausführlich diskutiert. [136]

In ersten Tests wurde die Implementierung der Falle in den Aufbau des Labram geprüft, indem einfache Funktionstest durchgeführt wurden. Abb. 4.24 zeigt drei Mikroskopaufnahmen, die während dieser Experimente erstellt wurden. Bild A zeigt

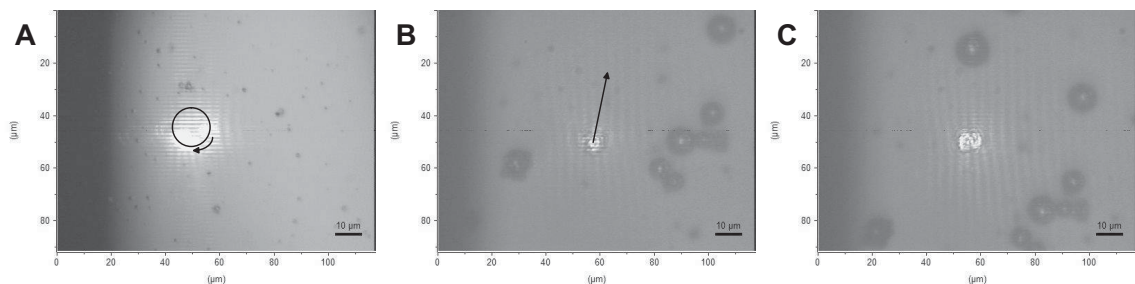


Abb. 4.24: Mikroskopaufnahmen von der Metallpartikel-Falle in Funktion. A: rotierender Laserstrahl auf einer reflektierenden Oberfläche; Silber-beschichtete Glaskugel von rotierendem Laserstrahl gefangen, wird durch die Suspension bewegt (Startpunkt B, Endpunkt C.)

die Reflektion des Fallenlasers auf dem Objektträger. Der zusätzlich eingezeichnete Kreis und der dazugehörige Pfeil sollen die Bahn verdeutlichen, auf der der Fallenlaser durch die Verkippung des Einkoppelspiegels geführt wird. Die genaue Position dieses Kreises im Gesamtbild kann ebenfalls über den Einkoppelspiegel erfolgen und damit der Position des Anregungslasers angepasst werden. Bild B und C zeigen den erfolgreichen Versuch, ein Silber-beschichtetes Mikropartikel zu fangen und gezielt zu bewegen. In Bild B sieht man die Startposition des zu bewegendes Partikels. Der Pfeil zeigt die Bewegungsrichtung an. Unter Bewegung ist dabei zu verstehen, dass das gefangene Partikel durch den Fallenlaser stationär gehalten und die umgebende Suspension mit Hilfe des Mikroskopisches „darunter“ in entgegengesetzter Richtung bewegt wird. In Bild C ist schließlich zu erkennen, dass die das Partikel umgebenden Strukturen verschoben sind, das gefangene Partikel also relativ dazu entlang des Pfeils verschoben wurde. Auf diese Weise ist es möglich, die SERS-aktiven Substratpartikel beispielsweise in einer Zellsuspension an den gewünschten Messpunkt zu positionieren, so dass man nicht darauf angewiesen ist, große Mengen an SERS-aktivem Material zu der Probe zu geben, um zu erreichen, dass an einem geeigneten Messpunkt auch SERS-Substrat vorliegt.

Oberflächencharakterisierung der Silber-beschichteten Mikropartikel durch Kraftfeldmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie

Um, ebenso wie für die Glasfasersonde, sicherzustellen, dass die Oberfläche eine gewisse Rauigkeit aufweist, wurde die Oberfläche der Glasmikrokugeln durch Elektronen- (REM) und Kraftfeldmikroskopie (AFM) charakterisiert. Zum Vergleich mit den Daten für die Oberfläche von Conduct-O-Fil[®] wurden außerdem noch AFM-Messungen für Glasmikrokugeln angefertigt, bei denen versucht wurde, selbst eine Silber-Schicht auf die Glasoberfläche aufzubringen [136].

Die Partikel wurden zur Fixierung auf eine noch nicht ausgehärtete Nagellackschicht präpariert. In Abb. 4.25 sind zunächst die Ergebnisse von zwei Messungen

dargestellt, die an den selbst beschichteten Glaskugeln durchgeführt wurden. Das linke Bild zeigt die Darstellung des Oberflächenprofils eines untersuchten Partikels auf einer Fläche von zehn mal zehn Mikrometern. Das Ergebnis wurde als Falschfarbendarstellung aufgearbeitet, wobei hellere Farben einer größeren Höhe im Profil entsprechen. In der Darstellung ist das Höhenprofil einer einzelnen Glaskugel zu sehen, die teilweise in die Nagellackoberfläche eingesunken ist. Für die Erstellung des Höhenprofils im rechten Bild wurde die Auflösung des Geräts erhöht und so ein Ausschnitt aus dem mittleren Bereich der Kugel aus dem Bild links mit einer Kantenlänge von $0,5 \mu\text{m}$ untersucht. In dieser Messung wurde eine Oberflächenrauigkeit festgestellt, bei der die größten Höhenunterschiede im Bereich von 10 nm liegen. Experimente mit diesen Mikropartikeln zeigten auch, dass sie sich nicht oder nur bedingt als SERS-Substrat eignen.

Die Untersuchungsergebnisse für die kommerziell hergestellten Conduct-O-Fil[®]-Mikropartikel sind in Abb. 4.26 gezeigt. Die Präparation der Probe wurde in der zuvor beschriebenen Weise durchgeführt. Für das linke Bild wurde zunächst eine Fläche mit der Kantenlänge $60 \mu\text{m}$ abgescannt. In der Darstellung sind zwei Mikropartikel zu erkennen. Die dunklen „Rinnen“ sind durch den Messmodus bedingt, der es erlaubt, eine große Fläche schnell abzurastern, aber dafür solche Artefakte erzeugt. Das eine Partikel wurde für das rechte Bild wiederum mit einer höheren Auflösung über eine Fläche mit der Kantenlänge von einem Mikrometer abgerastert. Man kann gut erkennen, dass für Conduct-O-Fil[®] die Oberfläche rauer ist, als bei den selbst beschichteten Glaskugeln. Der Höhenunterschied im Profil liegt hier bei 35 nm .

Zusätzlich wurden für Conduct-O-Fil[®] auch Elektronenmikroskop-Aufnahmen erstellt. Diese sind in Abb. 4.27 dargestellt. Das linke Bild zeigt eine Anhäufung der Mikrokugeln und verdeutlicht, dass das Substrat keine monodisperse Größenverteilung hat, wodurch man in der Lage sein sollte, für verschiedene Anforderungen das in der Größe passende Mikropartikel zu finden. Die das Bild dominierende Kugel hat einen Durchmesser von etwa $30 \mu\text{m}$. Im rechten Bild wurde eine Ausschnittsvergrößerung eines Bereichs dieser Kugel erstellt. Auch in diesem Bild ist, ebenso wie aus

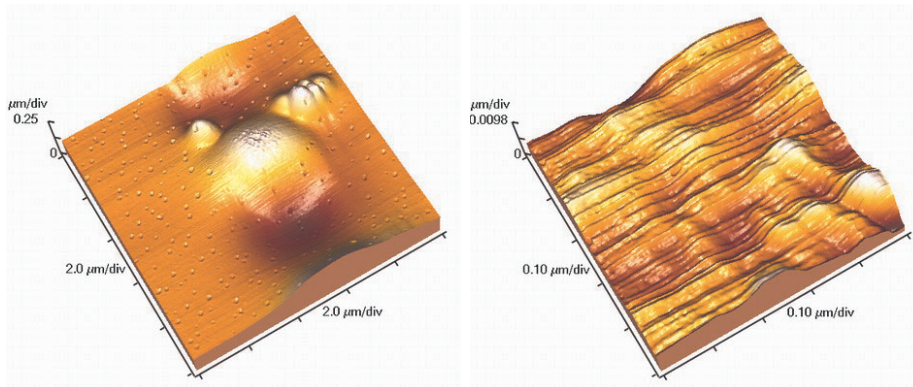


Abb. 4.25: AFM-Messungen von beschichteten Glasmikrokugeln.

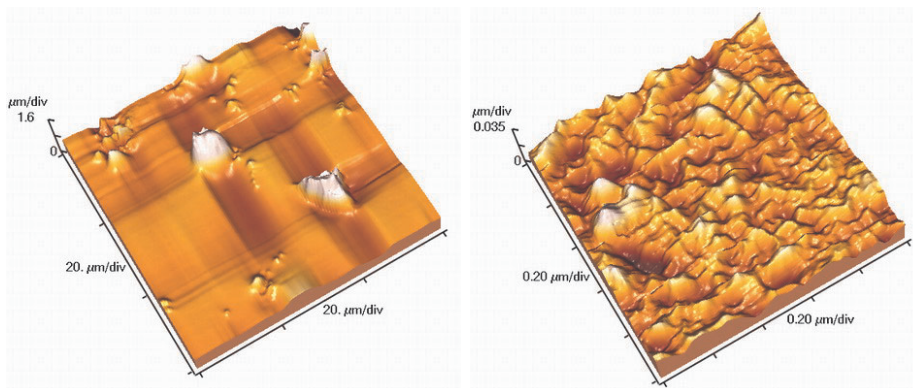


Abb. 4.26: AFM-Messungen an Conduct-O-Fil[®].

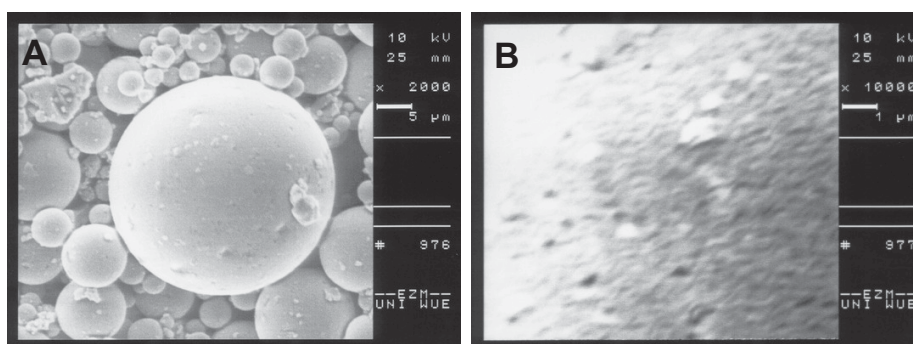


Abb. 4.27: REM-Bilder von Conduct-O-Fil[®].

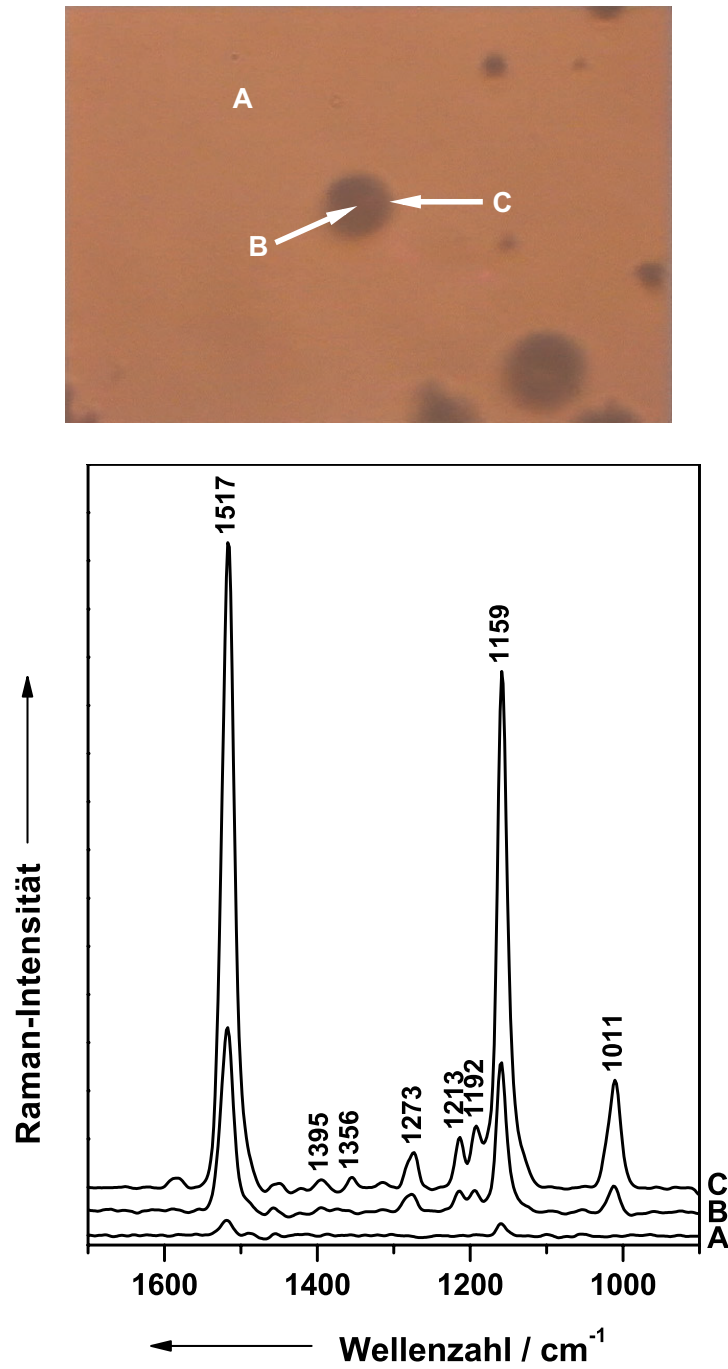


Abb. 4.28: Mikroskopaufnahme eines gefangenen Silber-beschichteten Mikropartikels in einer β -Carotin-Lösung. Die Spektren wurden an den im Bild bezeichneten Positionen aufgenommen: neben dem Partikel (A), zentral auf dem Partikel (B) und am Rand des Partikels (C).

der AFM-Untersuchung, zu erkennen, dass das Mikropartikel keine homogene und glatte Oberfläche besitzt, sondern dass die Oberfläche unregelmäßig strukturiert ist. Dies bestätigt nochmals die Eignung dieser Silber-beschichteten Glas-Mikrokugeln als SERS-Substrat.

Messungen von SER-Spektren an Conduct-O-Fil[®]-Partikeln in einer β -Carotin-Lösung

Um den SERS-Effekt der Conduct-O-Fil[®]-Partikel zu überprüfen, wurde folgendes Experiment durchgeführt: in einer ethanolischen β -Carotin-Lösung wurden einige Mikropartikel suspendiert und in eine Küvette überführt. Anschließend wurde ein Mikropartikel mit der optischen Gradientenfalle gefangen und mit dem Anregungslaser an verschiedenen Positionen bestrahlt. Als Anregungslaser wurde der He:Ne-Laser bei einer Laserleistung von 1 mW eingesetzt. Die Integrationszeit betrug für alle Spektren jeweils 60 s.

In Abb. 4.28 ist eine Mikroskopaufnahme des gefangenen Partikels in der β -Carotin-Lösung zu sehen. Die Buchstaben bezeichnen die Positionen, an denen die einzelnen Spektren aufgenommen wurden, die in der Abbildung unten dargestellt sind. Für Spektrum A wurde der Anregungslaser abseits des gefangenen Partikels in die Lösung fokussiert. Für die beiden anderen Messungen wurde der Anregungslaser zentral auf das gefangene Partikel fokussiert (Spektrum B), bzw. auf den Rand des Partikels gerichtet (Spektrum C).

Hier ist der Verstärkungseffekt des Silber-beschichteten Mikropartikels sehr gut zu beobachten, da für alle drei Spektren die gleichen Messbedingungen gewählt wurden. Während Spektrum A nur eine sehr niedrige Intensität aufweist, ist die Intensität der Banden in Spektrum B, das zentral auf der Kugel gemessen wurde, schon deutlich höher. Das beste Signal/Rausch-Verhältnis wird allerdings für Spektrum C erreicht. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass der Laserfokus, der seine größte Ausdehnung in Richtung der Strahlachse hat, in einem größeren Bereich mit der

SERS-aktiven Silber-Schicht wechselwirkt.

Messungen an *Rhodotorula mucilaginosa*

Die Ergebnisse, die für die Messungen an den Mikropartikeln in der Lösung erhalten wurden, konnten auch durch Spektren an Mikroorganismen bestätigt werden. Hierzu wurde in eine Suspension von *Rhodotorula mucilaginosa*-Zellen in Wasser eine geringe Menge von Conduct-O-Fil® gegeben. Unter dem Mikroskop wurde eines der Mikropartikel mit Hilfe der optischen Gradientenfalle so an sedimentierte Hefezellen positioniert, dass es möglich war, von der Kontaktstelle zwischen Hefezellen und SERS-Substrat ein Spektrum aufzunehmen.

Abb. 4.29 zeigt drei Mikroskopaufnahmen von Positionen in diesen Zellsuspensionen, an denen Spektren aufgenommen wurden. In Bild A wurde kein Conduct-O-Fil® zur Suspension hinzugefügt. Es sind nur die fadenförmigen Hefezellen zu erkennen. In den Suspensionen, die in Bild B und C zu sehen sind, wurde SERS-Substrat zugegeben. Zur Aufnahme der Spektren wurde mit der Anregungslaser in Bild A auf eine der Hefen, in Bild B auf das Zentrum der Substratkugel und in Bild C auf den Rand der Kugel fokussiert.

In Abb. 4.30 sind die Spektren, die von den drei verschiedenen Positionen aufgenommen wurden, zusammengefasst. Die Bezeichnungen korrespondieren dabei mit denen der Bilder. Alle Spektren wurden bei einer Anregungslaserleistung von 5 mW (514,5 nm) an der Probe und einer Integrationszeit von 30 s aufgenommen. Spektrum A zeigt nur eine sehr geringe Intensität und es sind nur die drei intensivsten Banden von β -Carotin zuzuordnen. Auch für Spektrum B, für das der Anregungslaser zentral auf das Silber-beschichtete Glaspartikel fokussiert worden ist, ist keine Verbesserung der Signale zu beobachten. Wird dagegen, wie für Spektrum C geschehen, an den Rand des SERS-aktiven Partikels fokussiert, so erhält man ein Spektrum, bei dem nicht nur die Hauptsignale deutlich verstärkt hervortreten, sondern auch Strukturen aufgelöst werden, die eine wesentlich geringere Intensität aufweisen,

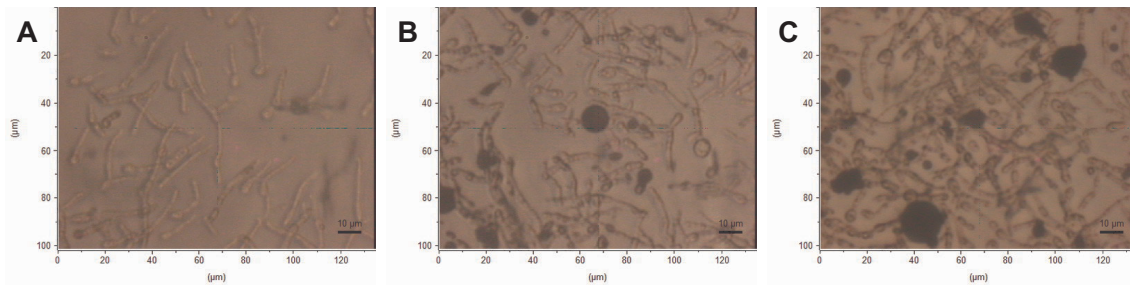


Abb. 4.29: Mikroskopaufnahmen von Zellsuspensionen ohne (Bild A) und mit Conduct-O-Fil® (Bild B und C).

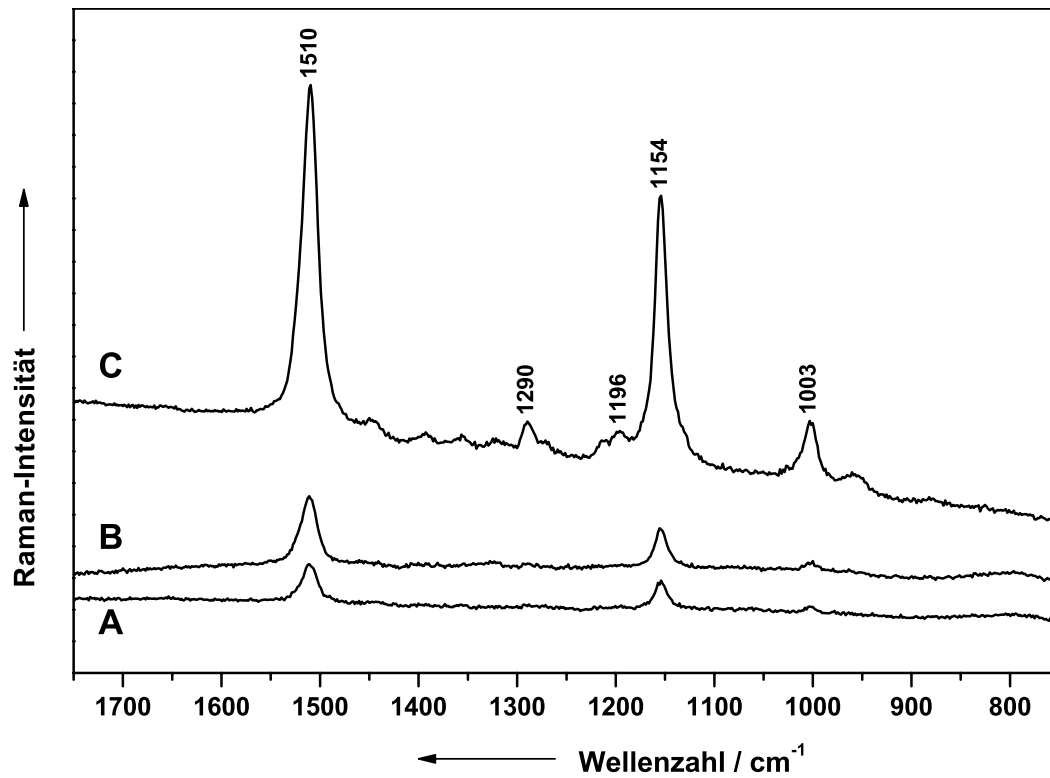


Abb. 4.30: Spektren von *Rhodotorula mucilaginosa* unter unterschiedlichen Bedingungen. A: Spektrum ohne Conduct-O-Fil®; B: Spektrum mit Conduct-O-Fil® (zentral fokussiert); C: Spektrum mit Conduct-O-Fil® (am Rand fokussiert)

wie etwa die Banden bei 1290 und 1196 cm^{-1} . Diese beiden Schwingungen sind einer *In-plane*-Deformationsschwingung sowie einer Ringvibration des β -Carotin-Gerüsts zuzuordnen.

Damit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, kleine SERS-aktive Partikel in einer Suspension zu manipulieren und einen Oberflächenverstärkungseffekt erhalten zu können, ohne dass es notwendig ist, die Probe mit einem Kolloid zu kontaminieren.

4.3 Kombination von Glasfasersonde und optischer Gradientenfalle

In einer weiteren Versuchsanordnung sollte geprüft werden, ob es möglich ist, die Glasfasersonde mit der optischen Gradientenfalle zu kombinieren. Mit einer derartigen Messanordnung wäre es möglich, besonders empfindliche Proben in Suspension zu messen. Außerdem wäre es möglich, SERS-Messungen an den gefangenen Mikropartikeln durchzuführen, ohne die gesamte Suspension mit einem SERS-aktiven Substrat kontaminieren zu müssen, da das kolloidale Silber durch die funktionalisier-

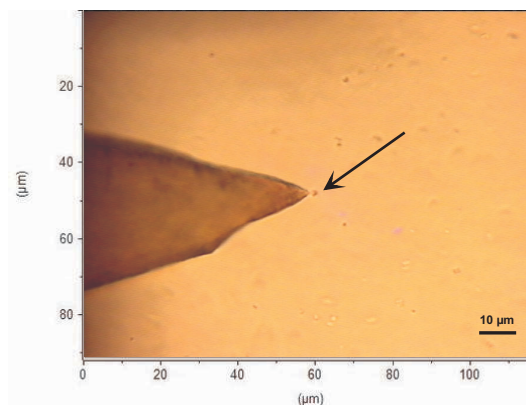


Abb. 4.31: Mikroskopaufnahme einer an einem gefangenen *Micrococcus luteus* positionierten Glasfasersonde. Der Pfeil bezeichnet die Position des gefangenen Mikroorganismus.

te Oberfläche der Glasfaser an dieser adsorbiert ist und die zu messende Suspension daher nicht verunreinigen kann. Getestet wurde dieser Aufbau an Suspensionen von *Micrococcus luteus* und Erythrocyten aus verdünntem Blut.

4.3.1 Messung an *Micrococcus luteus*

Da die *Micrococcus luteus* sehr klein sind (ca. 1 μm), ist es mit der zur Verfügung stehenden Vergrößerung sehr schwierig, diese einzeln zu erfassen. Aufgrund der geringen Größe der Mikrokokken kann man nicht davon ausgehen, dass über den gesamten Integrationszeitraum für das Spektrum konstant eine oder einige bestimmte Zellen in der optischen Gradientenfalle gehalten werden können, da andere Zellen, die in den Fokus des Fallenlasers diffundieren, bereits gefangene Partikel verdrängen.

Abb. 4.31 zeigt die Mikroskopaufnahme eines gefangenen *Micrococcus luteus* und der bereits für die Messung justierten Fasersonde. Die Position des gefangenen Mikroorganismus ist im Bild zur besseren Erkennung durch einen Pfeil bezeichnet. Wie bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben, liegt die größte Schwierigkeit darin, die Justage bei dem geringen zur Verfügung stehenden Platz durchzuführen. Dies trifft um so mehr zu, je kleiner die zu untersuchenden Mikropartikel sind.

In Abb. 4.32 sind zwei Spektren von *Micrococcus luteus* gegenübergestellt, von denen Spektrum A mit der hier beschriebenen Kombination von optischer Gradientenfalle und Glasfasersonde und Spektrum B mit Hilfe der optischen Gradientenfalle ohne die Glasfasersonde aufgenommen wurden. Die Banden stammen vom Sarcinaxanthin (Abb. 4.33), das zur Gruppe der Carotenoide gehört und für die Pigmentierung von *Micrococcus luteus* verantwortlich ist. [150] Die Bande bei 1532 cm^{-1} ist dabei der symmetrischen C=C-Doppelbindungsstreckschwingung, die Bande bei 1160 cm^{-1} der symmetrischen C-C-Einfachbindungs-Schwingung und die Bande bei 1007 cm^{-1} der C-CH₃-Streckschwingung des Molekülgerüsts zuzuordnen. Spektrum A wurde mit einer Integrationszeit von 600 s bei einer Laserleistung von 0,2 mW an der Faserspitze aufgenommen, während für Spektrum B eine Integra-

tionszeit von 900 s bei einer Laserleistung von etwa 5 mW auf der Probe verwendet wurde. Zwar ist die Qualität von Spektrum A wesentlich besser als die von Spek-

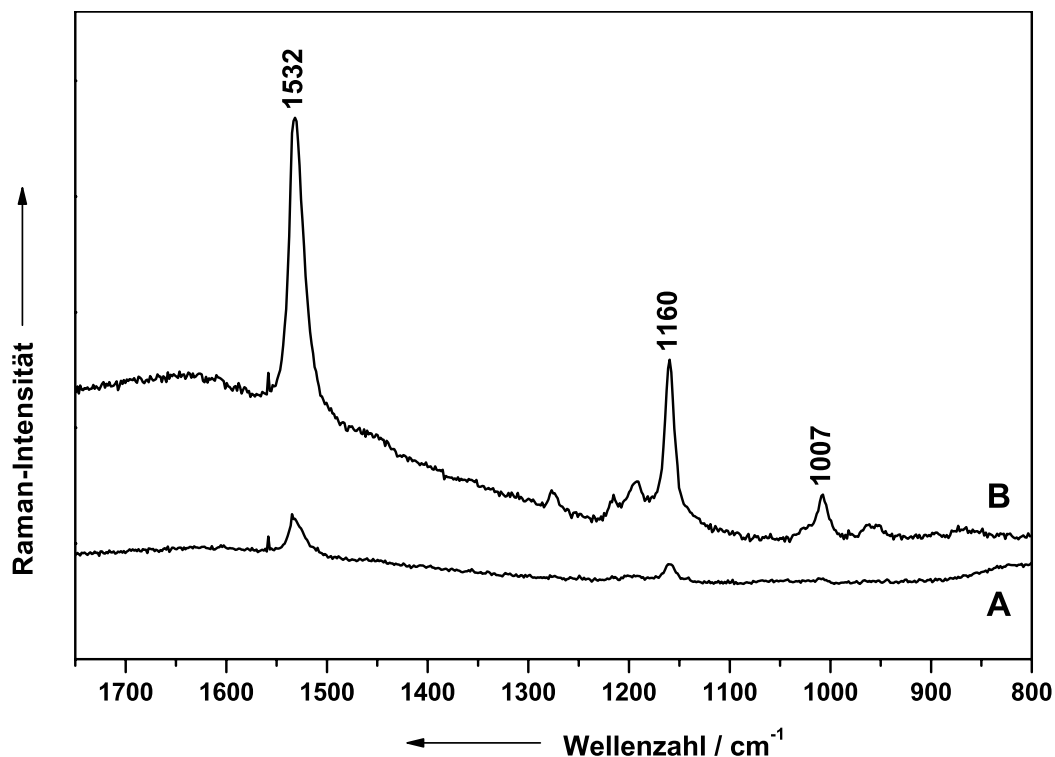


Abb. 4.32: Raman-Spektrum von einem gefangenen *Micrococcus luteus* mit der Glasfasersonde. A: Anregungslaser durch die Glasfasersonde (600 s; Leistung des Anregungslasers auf an der Faserspitze: 0,2 mW); B: Anregungslaser durch das Mikroskopobjektiv, ohne Glasfasersonde (900 s; Leistung des Anregungslasers auf der Probe: 5 mW)

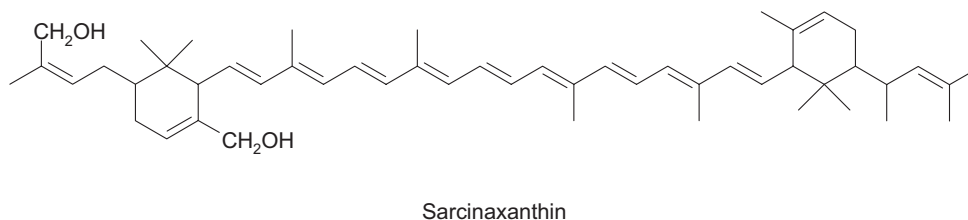


Abb. 4.33: Strukturformel von Sarcinaxanthin.

trum B, jedoch muss dabei die 50 % längere Integrationszeit und die 25fach höhere Laserleistung berücksichtigt werden. Die drei Hauptbanden sind auch in Spektrum B noch zu erkennen. Dieses Experiment zeigt jedoch auch die Grenzen dessen auf, bis zu welcher Größe Mikropartikel mit diesem Aufbau und den verwendeten Komponenten untersucht werden können.

4.3.2 Messungen an Erythrocyten

Von Erythrocyten wurde ebenfalls ein Spektrum mit dieser Methode erstellt. Zunächst wurde dabei die Glasfaser verwendet, die in Abb. 4.34 im Bild A zu sehen ist. Die Form der Faser erweckt den Eindruck, dass es sich um eine besonders gute Spitze handelt, die eine exzellente Ortsauflösung liefern wird. Allerdings konnte in Messungen mit dieser Faser kein verwertbares Spektrum erhalten werden. Der Grund hierfür wird aus Abb. 4.34 Bild B ersichtlich.

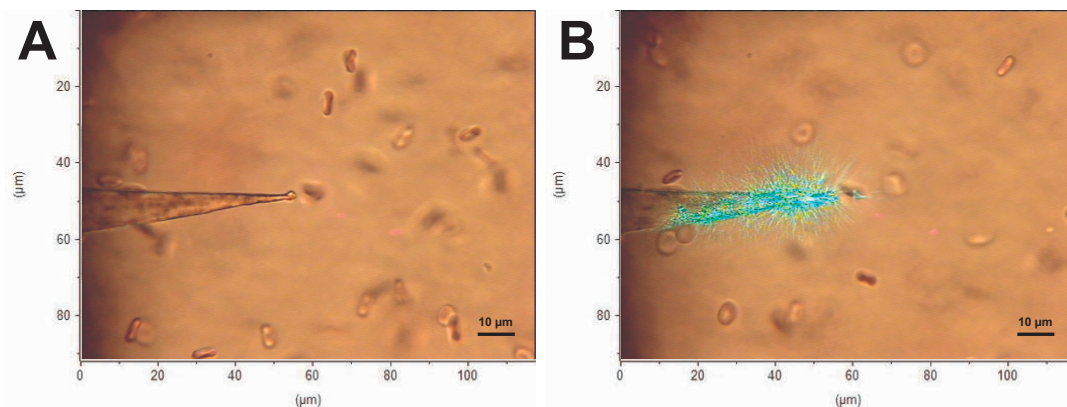


Abb. 4.34: Bild A: Mikroskopaufnahme der Suspension von RBC mit einer besonders dünn Glasfaserspitze. Bild B: Durch den sehr kleinen Öffnungswinkel des Faserkonus wird ein Großteil der Laserleistung zur Seite statt nach vorne abgestrahlt.

Wie man in diesem Bild sehen kann, wird der eingekoppelte Anregungslaser nicht wie erwartet über die Spitze nach vorne, sondern in erster Linie zur Seite abgestrahlt. Dies liegt wahrscheinlich an dem sehr kleinen Kegelwinkel des Spitzenkonus. Durch

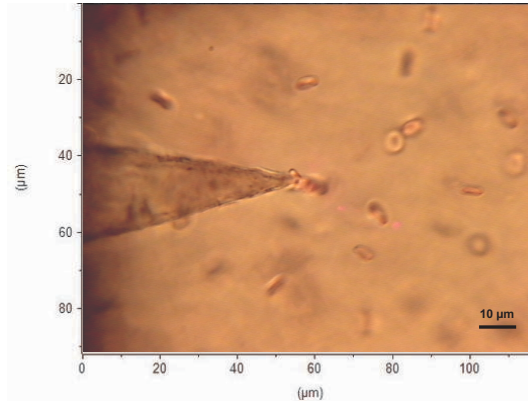


Abb. 4.35: Mikroskopaufnahme einer Glasfasersonde mit „stumpferer“ Spitze an einem gefangenen RBC.

diesen kleinen Winkel liegt der Kern der Glasfaser auf einer relativ großen Strecke frei. Im Falle eines stumpferen Winkels wäre der Faserkern näher zur Spitze hin mit dem Cladding bedeckt und der Laser könnte noch nicht aus der Faser austreten. Gerade bei diesem Experiment, wenn das Ziel durch die optische Gradientenfalle so gefangen wird, dass die Glasfasersonde mit der Spitze daran positioniert werden kann, ist es notwendig, dass der Hauptanteil der Laserintensität näher an der Faserspitze abgestrahlt wird, um eine höhere Leistung auf das gefangene Mikropartikel zu bringen.

Abb. 4.35 zeigt die Mikroskopaufnahme einer „stumpferen“ Faserspitze, die bereits an ein gefangenes RBC positioniert ist. Mit dieser Faser war es möglich, das in Abb. 4.36 gezeigte Spektrum aufzunehmen. Die Laserleistung an der Faserspitze betrug 0,4 mW (Anregungswellenlänge: 514,5 nm) für die Messung, bei einer Integrationszeit von 300 s. Eine Zuordnung der Banden wurde bereits in Abschnitt 4.2.2 vorgenommen. Für die Anregung bei 514,5 nm kommt es zu geringen Verschiebungen der Banden, die jedoch im Bereich der spektralen Auflösung von $3\text{--}4\text{ cm}^{-1}$ des Labram liegen. Größere Unterschiede in den spektralen Positionen und in den relative Intensitäten der Banden sind dadurch zu erklären, dass man das Hämoglobin des roten Blutfarbstoffs im Falle der Verwendung des 633 nm-Lasers resonant anregt.

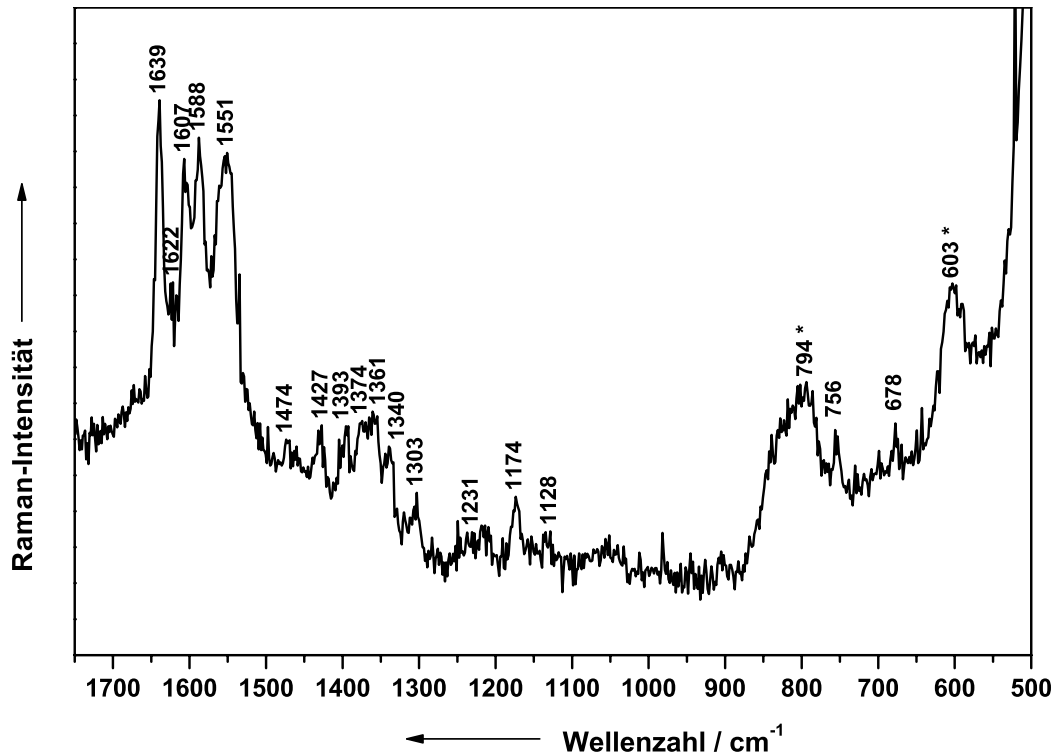


Abb. 4.36: Spektrum eines mit der optischen Gradientenfalle gefangenen RBC. Die Anregung erfolgte über die Glasfasersonde (Laserleistung: 0,4 mW).

Das Spektrum in Abb. 4.36 weist allerdings auch zwei breite Banden bei 794 und 603 cm^{-1} auf (jeweils mit * markiert), bei denen es sich um Glasbanden handelt, die durch die Glasfaser verursacht werden.

Sofern man den Aufbau weiter optimiert und eine geeignete Durchflussküvette für dieses Experiment entwirft, wäre es damit möglich, den Einfluss von gelösten Substanzen (beispielsweise im Serum) auf Blut- oder andere Zellen online zu untersuchen. Dabei könnte der Wirkungsverlauf auf die einzelne Zelle direkt von Expositionsbeginn mit der Substanz verfolgt werden, ohne auf statistische Ergebnisse aus größeren Zellmengen angewiesen zu sein.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Erprobung geeigneter Methoden zur Raman-spektroskopischen Untersuchung empfindlicher, insbesondere biologischer Proben. Das Ziel dabei ist, ein Werkzeug zur Verfügung zu stellen, mit dem es möglich ist, detaillierte Informationen über die Inhaltsstoffe einer Probe und deren räumlichen Verteilung zu sammeln. Diese Daten sind beispielsweise für die Qualitätssicherung pharmazeutischer Produktionen notwendig. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: ein Raman-Spektrometer wurde zum einen mit einer Glasfasersonde, zum anderen mit einer optischen Gradientenfalle kombiniert. Beide Ansätze wurden getestet und mit ihnen biologische Fragestellungen bearbeitet.

Die Empfindlichkeit biologischer Proben und die geringe Konzentration ihrer Inhaltsstoffe macht es dabei notwendig, besonderen Wert auf probenschonende Messverfahren und eine hohe Nachweisempfindlichkeit zu legen. Die Raman- bzw. SERS-Spektroskopie ist hierzu in der Lage und erfordert gleichzeitig nur eine minimale Probenpräparation.

Bei der Erläuterung der verwendeten Verfahren wird auch der Aufbau einer Raman-Apparatur beschrieben, das für den mobilen Einsatz konzipiert ist. Durch die Möglichkeit, direkt am Probenort zu messen, werden Probenveränderungen durch Lagerung und/oder Transport vermieden und damit die Messung von Artefakten verhindert. Der modulare Aufbau der Apparatur vereinfacht dabei den Transport des Geräts und ermöglicht einen schnellen und justagearmen Aufbau des Systems.

Zunächst wurde jedoch die Implementierung der optischen Gradientenfalle bzw.

der Glasfasersonde in ein bestehendes Raman-System getestet und optimiert.

Im Bereich des Experimentalteil dieser Arbeit wurde zunächst die Verwendung geätzter und Silber- oder Gold-beschichteter Glasfaserspitzen als SERS-Substrat an Testsubstanzen geprüft. In Kristallviolettlösungen wurden unter anderem Raman-Mapping-Experimente durchgeführt, die den Bereich, in dem das Laserlicht aus der Faser austritt, und damit die erwartete Ortsauflösung an der Sondenspitze bestätigen konnten. Des Weiteren wurden mehrere Methoden zur Präparation der Glasfasersonde verglichen, wobei sich herausgestellt hat, dass eine Aminosilan-funktionalisierte Fasersonde die beste Belastbarkeit gegen mechanischen Abrieb der SERS-aktiven Schicht zeigt und somit die günstigsten Eigenschaften für Experimente in biologischen Geweben mitbringt.

In Tests an pflanzlichen Proben wurden Messungen an den ätherischen Ölen von Minzen und Kumquat-Früchten durchgeführt und diese mit konventionellen Mikro-Raman- oder SERS-Spektren verglichen. Es wurden Spektren von den ätherischen Ölen einer Bergamott- und einer Krauseminze direkt in den Drüsenschuppen an einem Pflanzenschnitt gemessen. Anhand dieser Spektren ist es möglich, durch numerische Methoden die Inhaltsstoffe des Öls zu bestimmen und damit eine Qualitätsprüfung für industrielle Zwecke durchzuführen. In analoger Weise konnte das ätherische Öl in der Schale einer Kumquat-Frucht als Limonen identifiziert werden.

Hierbei hat sich gezeigt, dass die Qualität der Spektren, die mit der Sonde aufgenommen wurden und solchen, die von mit Silber-Kolloid behandelten Pflanzen aufgenommen wurden, vergleichbar ist. Allerdings war die Leistung des Anregungslasers auf der Probe bei Verwendung der Glasfasersonde um den Faktor 50 oder mehr niedriger als im Mikro-Raman-Experiment. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Verwendung der SERS-Sonde gegenüber dem Kolloid den Vorteil hat, dass es durch die minimale Kontamination der Probe mit dem Schwermetall nicht oder nur in sehr geringem Maß zu Abbaureaktionen in der Probe kommt. Auch hierdurch

ist diese Methode besonders probenschonend. In diesem Zusammenhang wurde die Anwendung der Fasersonde auch mit der mobilen Raman-Apparatur geprüft. Die Laserleistung auf der Probe konnte bei der hier verwendeten Anregungslaserwellenlänge bis auf etwa $2 \mu\text{W}$ vermindert werden, wodurch sich die Methode auch für empfindlichste Proben eignet.

Die Glasfasersonde eignet sich auch für Messungen an einzelnen Mikroorganismen. In den durchgeführten Experimenten wurden mit der Fasersonde Spektren der Ausstriche von *Rhodotorula mucilaginosa* gemessen. Hier konnte das in der Cytoplasmamembran der Hefe vorkommende β -Carotin identifiziert werden. Mit dem Mikro-Raman-Aufbau war es hier nicht möglich, verwertbare Spektren von einem Ausstrich der Mikroorganismen zu erhalten, da die Probe durch die höhere Laserleistung zerstört wurde. Durch die Verwendung der Fasersonde ist es damit möglich, kleinste Mengen von Mikroorganismen messtechnisch zu erfassen.

Auch bei der Detektion von Pestiziden auf Weinblättern kommt der probenschonende Effekt der Fasersonde zum Tragen. Anhand kleinster Mikrokristallite auf einem Weinblatt konnte das Fungizid Aktuan nachgewiesen werden. Während die Verwendung eines Mikro-Raman-Aufbaus hier bei einer zu hohen Laserleistung zu einer Verformung des Pflanzenmaterials führt, die die Messung unbrauchbar macht, kann mit der Fasersonde ein vergleichbares Spektrum sogar in kürzerer Zeit erhalten werden.

Anhand der präsentierten Experimente konnte gezeigt werden, dass sich die SERS-Glasfasersonde besonders zur Untersuchung empfindlicher Proben eignet. Insbesondere erlaubt sie minimal-invasives Arbeiten an biologischen Materialien. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Sonde aufgrund ihrer geometrischen Beschaffenheit eine gute Ortsauflösung, bis in den Sub-Mikrometerbereich, bei den Messungen erlaubt. Daher eignet sich die Fasersonde besonders zur Untersuchung von hoch-

empfindlichen biologischen Proben bei gleichzeitig sehr geringem Probenbedarf.

Für die Untersuchung mikropartikulärer Proben wurde das Raman-Mikroskop mit einer optischen Gradientenfalle kombiniert. Diese ermöglicht es, Mikropartikel für spektroskopische Messungen durch Gradientenkräfte festzuhalten, die nur aus der Wechselwirkung des Partikels mit dem Fallenlaser resultieren. Hierdurch können Einflüsse auf das zu messende Partikel beispielsweise durch eine Wand des Probengefäßes vermieden werden. Zusätzlich wird die Beeinflussung der gefangenen Partikel durch die Brown'sche Bewegung der Lösungsmittelmoleküle unterdrückt, wodurch längere Integrationszeiten möglich werden.

In Testmessungen an Polystyrolkugeln wurden zunächst verschiedene Strahlengänge für die optischen Pinzette getestet, von denen je nach Fragestellung der geeignetste verwendet wurde. Es hat sich gezeigt, dass für die Verwendung am Labram eine Lösung optimal ist, in der der Fallenlaser partiell den selben Strahlengang, wie der Anregungslaser, nutzt, also „von oben“ kommt. Eine weitere Voraussetzung für eine optimale Funktion der Gradientenfalle ist die Verwendung eines Mikroskopobjektivs mit einer möglichst großen Numerischen Apertur.

Anschließend wurde die Anwendung der optischen Pinzette zur Messung von Erythrocyten in verdünnten Suspensionen erläutert. Mit Hilfe der Falle konnten einzelne Erythrocyten gefangen und Spektren aufgenommen werden, die dem Porphyringerüst im Hämoglobin zugeordnet werden konnten. Durch die Trennung zwischen Anregungs- und Fallenlaser war es möglich, schnell zwischen den Anregungswellenlängen zu wechseln. Auf diese Weise können die Unterschiede in den Spektren, die auf Effekten verschiedener Anregungswellenlängen beruhen, an einem Partikel beobachtet werden.

Ferner war es möglich, die Einflüsse unterschiedlicher Liganden am Eisenzentralatom des Hämoglobins spektroskopisch zu verfolgen. Hier wurde der Effekt von Dithionit, Kohlenmonoxid und Cyanid auf die Spektren der roten Blutkörperchen

beobachtet. Diese Einflüsse machen sich in erster Linie in einem Bereich von 1650–1500 cm^{-1} bemerkbar, der auch als *spin state marker band region* bezeichnet wird. Diese Anwendung ist besonders dahingehend interessant, da mit ihr die Möglichkeit besteht, den Einfluss von beispielsweise Toxinen oder den Verlauf von Infektionen an einer Zelle zu verfolgen.

In einem weiteren Experiment wurde die Funktion der Falle auf nicht-sphärische Partikel anhand von einzelnen *R. mucilaginosa*-Zellen geprüft. Es hat sich gezeigt, dass auch nicht-sphärische Partikel stabil in der Falle gehalten und spektroskopiert werden können.

Für die Verwendung von Silber-beschichteten Glas-Mikrokugeln wurde die optische Gradientenfalle in ihrer Funktion angepasst, damit sie als Metallpartikelpinzette fungieren kann. Auf diese Weise steht auch bei Verwendung der Gradientenfalle ein SERS-Substrat zur Verfügung, mit dem es, wie bei der Glasfasersonde, möglich ist, die Kontamination der Probe mit Schwermetallen zu minimieren. Mit Hilfe der Gradientenfalle wurde ein SERS-Partikel so in einer Suspension von Hefezellen positioniert, dass durch das Partikel eine gute Verstärkung des Signals der Hefezellen erhalten werden konnte.

Abschließend wurde die optische Gradientenfalle für SERS-spektroskopische Messungen mit der Glasfasersonde kombiniert. Diese Messanordnung eignet sich für besonders empfindliche partikuläre Proben und kann die Vorteile beider Einzelanwendungen vereinen. Im Experiment wurden exemplarisch die Spektren von gefangenen *Micrococcus luteus* und Erythrocyten gemessen. Die Größe der Mikrokokken erwies sich dabei als Grenzwert, unterhalb dessen die Verwendung dieser Gerätekombination kaum mehr realisierbar ist. Bei der Messung der Spektren am Erythrocyten wurde deutlich, dass die Faserspitze eine geeignete Geometrie besitzen muss, durch die der Laser in erster Linie nach vorne und nicht seitlich abgestrahlt wird.

Mit der optischen Gradientenfalle hat man also ein Werkzeug zur Hand, mit dem

es möglich ist, einzelne Mikroorganismen oder Mikropartikel in Suspension zu vermessen. Bei Arbeit mit der optischen Gradientenfalle ist eine freie, dreidimensionale Manipulation der gefangenen Zellen im Probengefäß möglich. Auf diese Weise können einzelne Zellen über längere Zeit stabil im Laserfokus gehalten werden, wodurch längere Integrationszeiten möglich werden. Außerdem kann man auf diese Weise eine Immobilisierung der suspendierten Zellen auf einer funktionalisierten Oberfläche vermeiden, wodurch unerwünschte Effekte auf das zu messende Spektrum, wie z. B. Verschiebungen einzelner Banden oder Änderungen in den relativen Bandenintensitäten, ausgeschlossen werden können. Zur Untersuchung partikulärer Verunreinigungen ist es nicht notwendig, die Lösung aus dem Gefäß heraus zu präparieren. Vielmehr können die Mikropartikel durch die optische Gradientenfalle in der Lösung festgehalten und spektroskopisch identifiziert werden. Dies ermöglicht beispielsweise die Charakterisierung von Verunreinigungen in pharmazeutischen Lösungen, ohne dass dafür Ampullen geöffnet werden müssten. Auf diese Weise können Kontaminanten identifiziert werden, ohne Gefahr zu laufen, bei der Probenpräparation weitere Verunreinigungen zu verursachen und damit die Messungen zu verfälschen.

Durch die Kombination eines Raman-mikroskopischen Aufbaus mit der SERS-Glasfasersonde bzw. der optischen Gradientenfalle ist es gelungen, Fragestellungen an biologischen Systemen in sehr Proben-schonender, aber gleichzeitig hochortsauflösender Weise zu bearbeiten. Durch die Verwendung nicht-kontaminierender SERS-Sonden ist es möglich, zusätzliche Verstärkungseffekte zu erzielen. Die verwendeten Anregungslaserleistungen können daher generell niedrig gehalten werden. Dennoch erhält man aussagekräftige Spektren in einer akzeptablen Zeit. Die Zwei-Laser-Lösung für die optische Gradientenfalle stellt ein zuverlässiges Werkzeug zur berührungsfreien Manipulation kleiner Partikel bei gleichzeitiger Flexibilität in Bezug auf die Anregungswellenlänge dar.

6 Summary

This work deals with the development and evaluation of methods suitable for Raman spectroscopic investigations of sensitive samples and especially of biological samples. The aim of this work is to provide an instrument that allows the collection of detailed information on the constituents of a sample and their spatial distribution. These data are necessary e. g. to insure the quality assurance for pharmaceutical productions. For this purpose, two different approaches have been followed. One was the combination of a Raman spectrometer with a glass fiber probe, the other the combination of a Raman spectrometer with an optical gradient trap. Both strategies have been tested and applied to investigate biological problems.

The sensitivity of biological samples as well as the low concentration of their constituents requires non-destructive measuring techniques as providing a high detection limit. Raman spectroscopy or SERS spectroscopy, respectively, provide these features together with the necessity for only minimal sample preparation.

In connection with the description of the used methods a setup of a mobile Raman apparatus designed for on-site measurements is also described. The possibility of investigating the sample directly at its location avoids sample changes due to transportation or storage i. e. artifacts can be minimized. The modular setup of the mobile apparatus simplifies its transportation and enables a fast setup of the device where only a few adjustments are required.

However, first the implementation of an optical gradient trap and the glass fiber

probe in a commercial Raman setup was tested and optimized.

In the experimental part the application of etched silver or gold coated glass fiber tips acting as SERS substrate for various test samples has been tried. Raman mapping experiments carried out in crystal violet solutions revealed the area where the laser light leaves the fiber and therefore confirmed the expected spatial resolution of the probe tip. Furthermore, several methods for preparing glass fiber probes have been compared showing that a fiber probe functionalised with aminosilane had the highest resilience against mechanical abrasion of the SERS active layer and therefore, the most suitable characteristics for experiments with biological tissue.

Test measurements on plant samples were carried out, where spectra of the essential oils of mints and kumquats were recorded. These spectra were then compared with conventional micro Raman or SERS spectra. Spectra of the essential oils of a bergamot mint and a spearmint were taken directly in the glandular trichome within a plant's cross section. By means of these spectra, it is possible to determine the constituents of the oil by applying numerical methods on the spectra, so that a quality assurance for industrial purposes can be performed. Analogously the essential oil in the skin of a kumquat could be identified as limonene.

It could be shown, that the quality of the spectra recorded with the fiber probe and those of plants treated with silver colloid are comparable. However, when using the glass fiber probe the power of the excitation laser on the sample could be reduced by at least a factor of 50 compared to micro Raman experiments. It could be shown, that the application of the SERS probes compared to a silver colloid is more advantageous since the decomposition of the sample is minimized because of the minimal contamination of the sample with heavy metals, making this method extremely sparing. In this context, the application of fiber probes was also tested in combination with the mobile Raman apparatus. Here, the laser power on the sample could be reduced down to about 2 μ W for the used excitation laser wavelength,

which makes the method suited for even the most sensitive samples.

The glass fiber probe is also suitable for measuring single microorganisms. Spectra of smears of *Rhodotorula mucilaginosa* were recorded with the glass fiber probe. Here, β -carotin located in the yeast's cytoplasm membrane could be identified. With a standard micro Raman setup it was not possible to obtain any spectra from a smear of the microorganisms because the sample was destroyed due to the higher laser power. By using the fiber probe, measurements of minimal amounts of microorganism become possible.

Another project using the conserving effect of the fiber probes was the detection of pesticides on wine leaves. The fungicide Aktuan could be detected by means of smallest micro crystallites on a wine leaf. The application of a micro Raman setup with higher laser power causes deformations of the plant material making the measurements unusable.

The presented experiments show rather convincingly that the SERS glass fiber probe is especially suitable for the investigation of sensitive samples. In particular this method allows for minimal invasive studies of biological material. Furthermore, it could be shown, that due to its geometrical properties the probe has a good spatial resolution allowing measurement down to the sub-micrometer region. Therefore, the fiber probe is especially suited for the investigation of extremely sensitive biological samples combined with only minimal amount of sample needed.

For the investigation of micro particular samples the Raman microscope was combined with an optical gradient trap. This setup allows one to hold the microparticles for spectroscopic measurements through gradient forces, where the gradient forces arise only through interactions of the particle with the trap laser. Therefore, influences on the particle to be measured resulting from e. g. the wall of the sample container can be avoided. Additionally, the influence of Brownian motion of the solvent molecules on the trapped particle is suppressed, allowing longer integration

times.

First of all in test studies performed on polystyrene spheres different optical paths for implementation of the optical tweezers were tested. It could be shown, that the ideal solution while working with the Labram is the one, where the trap laser follows partially the same optical path as the excitation laser, that is coming from above. Another requirement for the optimal operation of the gradient trap is the use of a microscopy objective with a numerical aperture as high as possible.

In the following the application of the optical tweezers for measuring erythrocytes in diluted suspensions was discussed. By means of the trap single erythrocytes could be trapped and their spectra could be recorded. The observed bands are due to the porphyrin rings of the heme. By using two different lasers for trapping and Raman excitation the excitation wavelength could be easily varied. Therefore, differences in the spectra of single trapped particle different excitation wave lengths could be observed.

Furthermore, it was possible to monitor the impact of different ligands on the central Fe atom in heme. Here, the effect of dithionate, carbon monoxide and cyanide on the spectra of red blood cells were studied. These influences were mainly evident in a region between 1650 and 1500 cm^{-1} , which is also known as spin state marker band region. This application is especially interesting, as it offers the possibility to investigate the influence of e. g. toxins or the progression of infections in a cell.

The practicability of this setup to trap non spherical particles e. g. single *R. mucilaginosa* cells has been also tested. It was shown that even non spherical particles could be trapped and Raman spectra could be recorded.

The applicability of the optical gradient trap needs to be adjusted for the trapping of metal coated micro spheres. Therefore, even when using the gradient trap a SERS substrate was provided making it possible to minimize the contamination of the sample with the heavy metal. A SERS particle was positioned in a suspension of yeast cells by means of the optical gradient trap in such a way, that through the

particle a good signal enhancement from the yeast cells could be obtained.

Finally the optical gradient trap was combined with the glass fiber probe to perform SERS spectroscopic measurements. This setup is especially useful to investigate sensitive particular samples since it combines the advantages of both singular setups. By means of such a combination spectra of trapped *Micrococcus luteus* and erythrocytes were recorded experimentally. The size of the micrococci proved to be a threshold value below which the application of the combined instrumentation can hardly be realized anymore. While recording the spectra of single trapped erythrocytes it became obvious that the fiber tip has to have a suitable geometry, ensuring that the laser mainly radiates to the front and not to the sides.

The presented work nicely proves that the optical gradient trap provides a tool enabling the measurement of single microorganism or micro particles in suspension. When working with the optical gradient trap a free three dimensional manipulation of the trapped cells inside the sample container is possible. In this manner, single cells could be held stable in the laser focus for a longer time period, allowing longer integration times. Furthermore, in this way an immobilization of the suspended cells on a functionalized surface can be avoided, whereby unwanted effects e. g. shifts of single bands or changes in relative band intensities, can be excluded. For the study of particulate contaminations it is not necessary to prepare the solution out of the container. Instead the microparticles can be hold and spectroscopically identified within the solution by the optical gradient trap. This, for example, allows the characterization of contaminations of pharmaceutical solutions without the necessity to open any phials. By doing so contaminations can be identified without risking further contaminations and therefore causing adulterated spectra.

The combination of a micro Raman setup with a SERS glass fiber probe or an optical gradient trap allowed the study of biological systems in a sample sparing

way and with a high spatial resolution. Additional signal enhancing effects can be achieved by using non contaminating SERS probes. Therefore, the applied excitation laser power can be kept low, although reasonable Raman spectra could be obtained for short acquisition times. *The two laser solution for the optical gradient trap proved to be a reliable tool for the contact free manipulation of small particles in combination with flexibility in relation to the excitation wavelength.* The application of two different lasers for trapping and Raman excitation provides a reliable tool for a contact free manipulation of small particles together with the possibility to chose the Raman excitation wavelength according to the investigated samples.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, S. Chu, *Opt. Lett.* **1986**, *11*, 288–290.
- [2] A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.* **1970**, *24*, 156–159.
- [3] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, *Appl. Phys. Lett.* **1971**, *19*, 283–285.
- [4] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, *Appl. Phys. Lett.* **1974**, *24*, 586–588.
- [5] A. Ashkin, J. P. Gordon, *Opt. Lett.* **1979**, *4*, 161–163.
- [6] A. Ashkin, *Science* **1980**, *210*, 1081–1088.
- [7] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, *Science* **1987**, *235*, 1517–1520.
- [8] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, T. Yamane, *Nature* **1987**, *330*, 769–771.
- [9] D. F. Kucik, S. C. Kuo, E. L. Elson, M. P. Sheetz, *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 1029–1036.
- [10] A. E. Chiou, W. Wang, G. J. Sonek, J. Hong, M. W. Berns, *Opt. Commun.* **1997**, *133*, 7–10.
- [11] C. Mio, D. W. M. Marr, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 917–920.
- [12] R. E. Holmlin, M. Schiavoni, C. Y. Chen, S. P. Smith, M. G. Prentiss, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2000**, *39*, 3503–3506.
- [13] S. H. Xu, Y. M. Li, L. R. Lou, H. T. Chen, Z. W. Sun, *Jpn. J. Appl. Phys. Part 1 - Regul. Pap. Short Notes Rev. Pap.* **2002**, *41*, 166–168.

- [14] W. H. Wright, G. J. Sonek, M. W. Berns, *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *63*, 715–717.
- [15] R. B. Liebert, D. C. Prieve, *Ind. Eng. Chem. Res.* **1995**, *34*, 3542–3550.
- [16] M. T. Valentine, L. E. Dewalt, H. D. Ou-Yang, *J. Phys.: Condens. Matter* **1996**, *8*, 9477–9482.
- [17] W. Singer, S. Bernet, N. Hecker, M. Ritsch-Marte, *J. Mod. Opt.* **2000**, *47*, 2921–2931.
- [18] F. Nadal, A. Dazzi, F. Argoul, B. Pouligny, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 3887–3889.
- [19] G. J. Simpson, T. Wohland, R. N. Zare, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 207–210.
- [20] T. Ota, T. Sugiura, S. Kawata, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 3448–3450.
- [21] Y. Ohmachi, *Ashikaga Kogyo Daigaku Kenkyu Shuroku* **2002**, *35*, 35–41.
- [22] G. Romano, L. Sacconi, M. Capitanio, F. S. Pavone, *Opt. Commun.* **2003**, *215*, 323–331.
- [23] G. Fuhr, T. Schnelle, T. Muller, H. Hitzler, S. Monajembashi, K. O. Greulich, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **1998**, *67*, 385–390.
- [24] R. W. Steubing, S. Cheng, W. H. Wright, Y. Numajiri, M. W. Berns, *Cytometry* **1991**, *12*, 505–510.
- [25] G. Weber, K. O. Greulich, *Int. Rev. Cytology* **1992**, *133*, 1–41.
- [26] G. Leitz, G. Weber, S. Seeger, K. O. Greulich, *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **1994**, *26*, 69–88.
- [27] K. O. Greulich, *BioMethods (Basel)* **1999**, *10*, 453–474.
- [28] K. O. Greulich, in *Micromanipulation by Light in Biology and Medicine*, Birkhäuser, Basel, **1999** S. 88–96.
- [29] K. König, Y. G. Liu, G. J. Sonek, M. W. Berns, B. J. Tromberg, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 830–835.

- [30] K. König, Y. Liu, T. Krasieva, P. Patrizio, Y. Tadir, G. J. Sonek, M. W. Berns, B. J. Tromberg, *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering* **1995**, 2391, 238–249.
- [31] T. Gensch, J. Hofkens, J. van Stam, H. Faes, S. Creutz, K. Tsuda, R. Jerome, H. Masuhara, F. C. De Schryver, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 8440–8451.
- [32] X. Wei, T. B. Krasieva, Z. Zhang, P. A. Negulescu, C.-H. Sun, M. D. Cahalan, B. J. Tromberg, *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering* **1998**, 3260, 24–29.
- [33] K. D. Crawford, K. D. Hughes, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 2325–2328.
- [34] K. D. Crawford, K. D. Hughes, *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* **1998**, 36, 999–1004.
- [35] N. P. Machara, P. M. Goodwin, J. Enderlein, D. J. Semin, R. A. Keller, *Bioimaging* **1998**, 6, 33–42.
- [36] R. Thurn, W. Kiefer, *Appl. Spectrosc.* **1984**, 38, 78–83.
- [37] T. Kaiser, G. Roll, G. Schweiger, *Appl. Opt.* **1996**, 35, 5918–5924.
- [38] K. Ajito, *Thin Solid Films* **1998**, 331, 181–188.
- [39] C. G. Xie, M. A. Dinno, Y. Q. Li, *Opt. Lett.* **2002**, 27, 249–251.
- [40] C. G. Xie, Y. Q. Li, *J. Appl. Phys.* **2003**, 93, 2982–2986.
- [41] A. L. Stout, *Biophys. J.* **2001**, 80, 2976–2986.
- [42] J. M. Sharp, A. R. Clapp, R. B. Dickinson, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2003**, 27, 355–364.
- [43] Z. Sun, S. Xu, G. Dai, Y. Li, L. Lou, Q. Liu, R. Zhu, *J. Chem. Phys.* **2003**, 119, 2399–2405.
- [44] A. D. Rowe, M. C. Leake, H. Morgan, R. M. Berry, *J. Mod. Opt.* **2003**, 50, 1539–1554.

- [45] R. Petry, M. Schmitt, J. Popp, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 14–30.
- [46] K. Visscher, G. J. Brakenhoff, *Cytometry* **1991**, *12*, 486–491.
- [47] K. Visscher, G. J. Brakenhoff, J. J. Krol, *Cytometry* **1993**, *14*, 105–114.
- [48] S. Sato, Y. Harada, Y. Waseda, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 1807–1809.
- [49] M. Lankers, J. Popp, E. Urlaub, H. Stahl, G. Rossling, W. Kiefer, *J. Mol. Struct.* **1995**, *348*, 265–268.
- [50] C. G. Xie, Y. Q. Li, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 951–953.
- [51] K. Sasaki, M. Koshioka, H. Misawa, N. Kitamura, H. Masuhara, *Appl. Phys. Lett.* **1992**, *60*, 807–809.
- [52] A. Ashkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4853–4860.
- [53] B. Schrader, B. Dippel, I. Erb, S. Keller, T. Lochte, H. Schulz, E. Tatsch, S. Wessel, *J. Mol. Struct.* **1999**, *481*, 21–32.
- [54] L. G. Thygesen, M. M. Lokke, E. Micklander, S. B. Engelsen, *Trends Food Sci. Technol.* **2003**, *14*, 50–57.
- [55] B. Schrader, H. H. Klump, K. Schenzel, H. Schulz, *J. Mol. Struct.* **1999**, *509*, 201–212.
- [56] P. C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391–3395.
- [57] J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II* **1979**, *75*, 790–798.
- [58] E. Urlaub, *Anwendung der Mikro-Ramanspektroskopie in der Biologie und der Pharmazie*, Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **1998**.
- [59] T. Vo-Dinh, *TrAC-Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*, 557–582.
- [60] R. Stöckle, C. Fokas, V. Deckert, R. Zenobi, B. Sick, B. Hecht, U. P. Wild, *Appl. Phys. Lett.* **1999**, *75*, 160–162.

- [61] J. M. Bello, V. A. Narayanan, D. L. Stokes, T. Vo Dinh, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2437–2441.
- [62] J. P. Alarie, D. L. Stokes, W. S. Sutherland, A. C. Edwards, T. Vo Dinh, *Appl. Spectrosc.* **1992**, *46*, 1608–12.
- [63] S. K. Sharma, C. L. Schoen, T. F. Cooney, *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 377–9.
- [64] J. Ma, Y.-S. Li, *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 1529–31.
- [65] S. M. Angel, J. C. Carter, D. N. Stratis, B. J. Marquardt, W. E. Brewer, *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30*, 795–805.
- [66] J. C. Carter, W. E. Brewer, S. M. Angel, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 1876–1881.
- [67] P. Niemela, J. Suhonen, *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 1337–1340.
- [68] C. J. Barbosa, F. H. Vaillancourt, L. D. Eltis, M. W. Blades, R. F. B. Turner, *J. Raman Spectrosc.* **2002**, *33*, 503–510.
- [69] A. McCabe, W. E. Smith, G. Thomson, D. Batchelder, R. Lacey, G. Ashcroft, B. F. Foulger, *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 820–826.
- [70] T. F. Cooney, H. T. Skinner, S. M. Angel, *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, 836–848.
- [71] T. F. Cooney, H. T. Skinner, S. M. Angel, *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, 849–860.
- [72] R. L. McCreery, M. Fleischmann, P. Hendra, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 146–148.
- [73] S. D. Schwab, R. L. McCreery, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 2199–2204.
- [74] K. P. J. Williams, *J. Raman Spectrosc.* **1990**, *21*, 147–51.
- [75] Y.-S. Li, J. Ma, *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 277–279.
- [76] M. G. Shim, B. C. Wilson, E. Marple, M. Wach, *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53*, 619–627.

- [77] X. Zheng, W. Fu, S. Albin, K. L. Wise, A. Javey, J. B. Cooper, *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55*, 382–388.
- [78] H. T. Skinner, T. F. Cooney, S. K. Sharma, S. M. Angel, *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, 1007–1014.
- [79] J. C. Carter, W. A. Scrivens, M. L. Myrick, S. M. Angel, *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, 761–767.
- [80] K. I. Mullen, D. Wang, L. G. Crane, K. T. Carron, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 930–936.
- [81] T. Vo-Dinh, D. L. Stokes, *Field Anal. Chem. Technol.* **1999**, *3*, 346–356.
- [82] E. A. Todd, M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 545–548.
- [83] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163–166.
- [84] M. Prochazka, P. Mojzes, J. Stepanek, B. Vlckova, P. Y. Turpin, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5103–5108.
- [85] R. K. Chang, B. L. Laube, *Crc Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* **1984**, *12*, 1–73.
- [86] T. E. Furtak, J. Reyes, *Surf. Sci.* **1980**, *93*, 351–382.
- [87] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, M. S. Feld, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 1667–1670.
- [88] M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* **1985**, *57*, 783–826.
- [89] M. Kerker, D. S. Wang, H. Chew, *Appl. Opt.* **1980**, *19*, 3373–3387.
- [90] D. S. Wang, M. Kerker, *Phys. Rev. B* **1981**, *24*, 1777–1790.
- [91] J. A. Creighton, in *Spectroscopy of Surfaces* (Hg. R. J. H. Clark, R. E. Hester), John Wileys & Sons, Chichester, Bd. 16 von *Advances in Spectroscopy*, **1988** S. 37–89.

- [92] J. I. Gersten, A. Nitzan, in *Surface Enhanced Raman Scattering* (Hg. R. K. Chang, T. E. Furtak), Plenum Press, New York, **1982** S. 89–107.
- [93] A. Otto, I. Pockrand, J. Billmann, C. Pettenkofer, in *Surface Enhanced Raman Scattering* (Hg. R. K. Chang, T. E. Furtak), Plenum Press, New York, **1982** S. 147–172.
- [94] A. Otto, *J. Raman Spectrosc.* **1991**, *22*, 743–752.
- [95] J. A. Creighton, *Surf. Sci.* **1983**, *124*, 209–219.
- [96] E. S. Brandt, T. M. Cotton, in *Physical Methods of Chemistry* (Hg. B. W. Rossiter, R. C. Baetzold), John Wiley & Sons, New York, **1986** S. 633–718.
- [97] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Curr. Sci.* **1999**, *77*, 915–924.
- [98] D. Zeisel, V. Deckert, R. Zenobi, T. Vo-Dinh, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *283*, 381–385.
- [99] D. Zeisel, B. Dutoit, V. Deckert, T. Roth, R. Zenobi, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 749–754.
- [100] M. Kerker, D. S. Wang, H. Chew, *Appl. Opt.* **1980**, *19*, 4159–4174.
- [101] W. E. Smith, C. Rodger, in *Theory and Instrumentation* (Hg. J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), John Wiley & Sons, New York, Bd. 1 von *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, **2002** S. 775–784.
- [102] M. Kerker, D. S. Wang, H. Chew, O. Siiman, L. A. Bumm, in *Surface Enhanced Raman Scattering* (Hg. R. K. Chang, T. E. Furtak), Plenum Press, New York, **1982** S. 109–128.
- [103] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, W. Akemann, *J. Phys.: Condens. Matter* **1992**, *4*, 1143–1212.
- [104] D. A. Weitz, M. Moskovits, J. A. Creighton, in *Chemistry and Structure at*

- Interfaces, New Laser and Optical Techniques* (Hg. R. B. Hall, A. B. Ellis), VCH, Florida, Bd. 2, **1986** S. 197–235.
- [105] A. Campion, P. Kambhampati, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 241–250.
- [106] S. Gresillon, J. C. Rivoal, P. Gadenne, X. Quelin, V. Shalaev, A. Sarychev, *Phys. Status Solidi A-Appl. Res.* **1999**, *175*, 337–343.
- [107] V. A. Markel, V. M. Shalaev, P. Zhang, W. Huynh, L. Tay, T. L. Haslett, M. Moskovits, *Phys. Rev. B* **1999**, *59*, 10903–10909.
- [108] P. Gadenne, X. Quelin, S. Ducourtieux, S. Gresillon, L. Aigouy, J. C. Rivoal, V. Shalaev, A. Sarychev, *Physica B* **2000**, *279*, 52–55.
- [109] J. P. Kottmann, O. J. F. Martin, D. R. Smith, S. Schultz, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *341*, 1–6.
- [110] G. C. Schatz, R. P. van Duyne, in *Theory and Instrumentation* (Hg. J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), John Wiley & Sons, New York, Bd. 1 von *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, **2002** S. 759–774.
- [111] P. Hildebrandt, S. Keller, A. Hoffmann, F. Vanhecke, B. Schrader, *J. Raman Spectrosc.* **1993**, *24*, 791–796.
- [112] A. Otto, J. Billmann, J. Eickmans, U. Erturk, C. Pettenkofer, *Surf. Sci.* **1984**, *138*, 319–338.
- [113] I. R. Nabiev, K. V. Sokolov, M. Manfait, in *Advances in Spectroscopy* (Hg. R. J. H. Clark, R. E. Hester), John Wiley & Sons, Chichester, Bd. 20 von *Biomolecular Spectroscopy, Part A.*, **1993** S. 267–338.
- [114] K. Kneipp, H. Kneipp, R. Manoharan, E. B. Hanlon, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52*, 1493–1497.
- [115] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 230–238.
- [116] E. J. Zeman, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 634–643.

- [117] A. Otto, J. Timper, J. Billmann, G. Kovacs, I. Pockrand, *Surf. Sci.* **1980**, *92*, L55–L57.
- [118] W. Kiefer, in *Infrared and Raman Spectroscopy – Methods and Applications* (Hg. B. Schrader), VCH, Weinheim, Bd. 21, **1995** S. 465–517.
- [119] H. Wetzal, H. Gerischer, B. Pettinger, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *85*, 187–189.
- [120] E. A. Todd, M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 855–857.
- [121] M. K. Weldon, V. R. Zhelyaskov, M. D. Morris, *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52*, 265–269.
- [122] K. L. Norrod, L. M. Sudnik, D. Rousell, K. L. Rowlen, *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 994–1001.
- [123] G. D. Sockalingum, A. Beljebbar, H. Morjani, J. F. Angiboust, M. Manfait, *Biospectroscopy* **1998**, *4*, S71–S78.
- [124] C. G. Blatchford, O. Siiman, M. Kerker, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2503–2508.
- [125] P. Hildebrandt, M. Stockburger, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5935–5944.
- [126] E. Wentrup-Byrne, S. Sarinas, P. M. Fredericks, *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 1192–1197.
- [127] C. H. Munro, W. E. Smith, P. C. White, *Analyst* **1995**, *120*, 993–1003.
- [128] L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, *Langmuir* **2000**, *16*, 9722–9728.
- [129] L. Rivas, A. Murza, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Vib. Spectrosc.* **2001**, *25*, 19–28.
- [130] Y. Wang, Y. S. Li, J. Wu, Z. X. Zhang, D. Q. An, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* **2000**, *56*, 2637–2644.
- [131] E. Vogel, *Untersuchungen von Molekülen auf Metalloberflächen mittels*

- Oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie*, Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **1999**.
- [132] G. Smulevich, T. G. Spiro, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 5168–5173.
- [133] T. Vo-Dinh, *Sens. Actuators, B* **1995**, *B29*, 183–189.
- [134] E. Polwart, R. L. Keir, C. M. Davidson, W. E. Smith, D. A. Sadler, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 522–527.
- [135] W. Hill, V. Petrou, *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 795–799.
- [136] R. Geßner, *Ortsaufgelöste SERS-Spektroskopie an Mikropartikeln und Spitzen*, Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2000**.
- [137] R. Geßner, P. Rösch, W. Kiefer, J. Popp, *Biopolymers* **2002**, *67*, 327–330.
- [138] T. G. Brown, in *Fiber Optics and Nonlinear Optics* (Hg. C. DeCusatis, G. Li), McGraw-Hill, New York, Bd. 4 von *Handbook of Optics*, 2 Aufl., **2001** S. Getr. Zählung.
- [139] F. L. Pedrotti, L. S. Pedrotti, W. Bausch, H. Schmidt, *Optik : eine Einführung*, Prentice Hall, München, 1. Aufl. Aufl., **1996**.
- [140] G. Roosen, *Opt. Commun.* **1977**, *21*, 189–194.
- [141] J. P. Gordon, *Phys. Rev. A* **1973**, *8*, 14–21.
- [142] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem. Chem. Phys.* **1989**, *93*, 254–260.
- [143] M. Lankers, *Charakterisierung optisch gefangener Mikropartikel durch elastische und inelastische Lichtstreuung*, Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, **1995**.
- [144] M. Lankers, J. Popp, G. Rossling, W. Kiefer, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *277*, 331–334.

- [145] K. C. Grabar, R. G. Freeman, M. B. Hommer, M. J. Natan, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 735–743.
- [146] E. Vogel, R. Gessner, M. H. B. Hayes, W. Kiefer, *J. Mol. Struct.* **1999**, *483*, 195–199.
- [147] L. Angeloni, G. Smulevich, M. P. Marzocchi, *J. Raman Spectrosc.* **1979**, *8*, 305–310.
- [148] J. Gicquel, M. Carles, H. Bodot, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 699–706.
- [149] P. Rösch, *Raman-spektroskopische Untersuchungen an Pflanzen und Mikroorganismen*, Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2002**.
- [150] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7. überarbeitete auflage Aufl., **1992**.
- [151] B. AG, <http://www.pflanzenschutz.com/produkte/2313.htm>, **2003**.
- [152] F. R. Dollish, W. G. Fateley, F. F. Bentley, *Characteristic Raman Frequencies Of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1974**.
- [153] E. Hiller, M. Heim, R. Munker, *Klinische Hämatologie : ein Leitfaden für Studierende und Ärzte*, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, **1994**.
- [154] I. Hertle,
<http://www.netdokter.de/laborwerte/fakten/blutbild/erythrozyten.htm>, **2003**.
- [155] K. Ramser, E. J. Bjerneld, C. Fant, M. Kall, *J. Biomed. Opt.* **2003**, *8*, 173–178.
- [156] K. Ramser, E. J. Bjerneld, C. Fant, M. Kaell, *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering* **2002**, *4614*, 20–27.
- [157] B. R. Wood, B. Tait, D. McNaughton, *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2001**, *1539*, 58–70.

- [158] B. R. Wood, D. McNaughton, *Biopolymers* **2002**, *67*, 259–262.
- [159] S. Hirota, T. Ogura, K. ShinzawaItoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 15274–15279.
- [160] A. Boffi, E. Chiancone, S. Takahashi, D. L. Rousseau, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4505–4509.
- [161] C. W. Ong, Z. X. Shen, K. K. H. Ang, U. A. K. Kara, S. H. Tang, *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53*, 1097–1101.
- [162] C. W. Ong, Z. X. Shen, K. K. H. Ang, U. A. K. Kara, S. H. Tang, *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1126–1131.
- [163] S. C. Goheen, L. J. Lis, O. Kucuk, M. P. Westerman, J. W. Kauffman, *J. Raman Spectrosc.* **1993**, *24*, 599–602.
- [164] Y. Huang, X. Yu, H. Zhao, J. Guo, S. Sun, Y. Gong, Y. Li, *Zhongguo Shengwu Yixue Gongcheng Xuebao* **1999**, *18*, 49–57.
- [165] X. Li, J. Ni, J. Chen, F. Huang, *Zhongguo Xitu Xuebao* **1995**, *13*, 259–262.
- [166] X. Li, J. Ni, *Shengwu Wuli Xuebao* **1994**, *10*, 393–398.
- [167] Y. Xu, H. Yang, Z. Zhang, *Sci. China, Ser. C* **1998**, *41*, 608–616.
- [168] G. V. Maximov, A. A. Churin, T. N. Sokolova, V. Z. Pashchenko, *Biol. Nauki (Moscow)* **1992**, S. 22–26.
- [169] B. R. Wood, D. McNaughton, *J. Raman Spectrosc.* **2002**, *33*, 517–523.
- [170] M. Abe, T. Kitagawa, Y. Kyogoku, *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 4526–4534.
- [171] S. Z. Hu, K. M. Smith, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12638–12646.
- [172] J. J. Weiss, *Nature* **1964**, *202*, 83–84.

Danksagung

Zum Schluß möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kiefer sei gedankt für die Vergabe des Forschungsthemas. Er ließ mir allen nur erdenklichen Freiraum bei der Durchführung und ermöglichte mir die Teilnahme an zahlreichen Tagungen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Jürgen Popp, vor allem für die intensive Betreuung und die vielen kreativen Ideen, die mich, trotz erster Schrecksekunden, sehr viel weitergebracht haben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Petra Rösch, die mich über die Jahre und auch schon während meiner Diplomarbeit betreut hat. Sie hat mir nicht nur aus etlichen Sackgassen herausgeholfen, sondern ist auch meistens verantwortlich für die Erstkorrekturen meiner oft wüsten Manuskripte, einschließlich dieser Arbeit. Nein, Du bist mir nicht zu sehr auf die Füße getreten.

Meinen Kolleginnen auf dem Zimmer, Dr. Petra Rösch, Dr. Petra Meuer und Dr. Marion Strehle sei für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die nette Atmosphäre gedankt. Auch wenn es nicht immer einfach für mich war, habe ich es genossen, Hahn im Korb zu sein. Ich musste nie hungern.

Dr. Michael Schmitt möchte ich ebenfalls für das Korrekturlesen danken.

Meinen F-Praktikanten Bertil Hanke, Nele Buggisch, Melanie Lang und Christian Winter möchte ich jeweils für die Zeit der Zusammenarbeit danken. Die Arbeit mit euch hat bisweilen neue und interessante Aspekte im Labor erzeugen können.

Unserer Sekretärin Frau Müller sei für die 1a-Verwaltungsarbeit gedankt. Ohne sie hätte manche Projekt-Abrechnung im Chaos geendet.

Einen nicht unerheblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit haben die Elektronik- und Feinmechanikwerkstatt leisten können, nicht zu vergessen Belinda Leimeister, Melanie Grom und Peter Popp. Herzlichen Dank Euch allen.

Weiterer Dank geht an PD Dr. Volker Deckert für lehrreiche und interessante Gespräche über der Herstellung der Faserspitzen, an Michael Hofmann, für die AFM-Messungen und an Dr. Uwe Gbureck für die Elektronenmikroskop-Aufnahmen. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Susanne Böll und Heinrich Hofmann von der LWG in Veitshöchheim für die Bereitstellung der Pestizid-behandelten Reb-Pflanzen bedanken

Helga Schwark u. Monika Seifer vom Institut für Physik möchte ich für die Bedampfung meiner Glasfaserspitzen und Dr. Petra Hess und Christa Albert vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie für die Anzucht der in den Messungen verwendeten Mikroorganismen danken.

Weiterer Dank geht an die Mitarbeiter des Botanischen Gartens und hier besonders an Andreas Kreiner für die Bereitstellung der pflanzlichen Proben und die Hilfsbereitschaft bei meinen Messungen „vor Ort“.

Schließlich möchte ich mich bei allen nicht genannten Mitgliedern des AKK für die nette Atmosphäre und gegenseitige Unterstützung während meiner Promotionszeit bedanken.

Meine Freunde Jan Steinmetzer und Thomas Reinhardt sollen nicht unerwähnt bleiben. Sie haben sich, obwohl Nicht-Chemiker, auf der Suche nach Fehlern durch diese Arbeit gequält. Vielen Dank!

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meine Eltern, die mich meinen Weg gehen ließen.

Last but not least möchte ich meiner Frau Kirsten danken. Ohne sie hätte ich es nicht geschafft.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ralph Geßner
geboren am: 25. August 1971 in Bad Neustadt a. d. Saale

Schulbildung:

1978 - 1979 Grundschule in Roding
1979 - 1982 Grundschule in Wollbach
1982 - 1991 Rhön-Gymnasium in Bad Neustadt a. d. Saale
1991 Allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst:

07/1991 - 06/1992

Studium:

WS 1992 - WS 2000 Studium der Chemie (Diplom)
an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/1996 Diplom-Vorprüfung
02/1999 Diplom-Hauptprüfung
04/1999 - 03/2000 Diplomarbeit:
„Entwicklung und Erprobung neuer SERS-Substrate“
im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. Kiefer,
Lehrstuhl II für Physikalische Chemie
seit 04/2000 Promotion am Lehrstuhl von Prof. Dr. W. Kiefer

Tätigkeiten:

05/1998 - 07/1998 Studentische Hilfskraft, Institut für Organische Chemie
04/1999 - 03/2000 Studentische Hilfskraft, Institut für Physikalische Chemie
04/2000 - 02/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis

09/2003 - 12/2003

von Prof. Dr. W. Kiefer

06/2001 - 05/2002

Nebenberufliche wissenschaftliche Hilfskraft,

Lehrstuhl für Silikatchemie