



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 17 948 B4 2007.04.05**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **102 17 948.4**
 (22) Anmeldetag: **22.04.2002**
 (43) Offenlegungstag: **06.11.2003**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **05.04.2007**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/65 (2006.01)**
G12B 21/06 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

Kiefer, Wolfgang, Prof. Dr., 97249 Eisingen, DE;
Popp, Jürgen, Dr., 97340 Marktbreit, DE; Geßner,
Ralph, 97082 Würzburg, DE; Rösch, Petra, 97218
Gerbrunn, DE

(74) Vertreter:

Patent- und Rechtsanwälte Böck - Tappe - v.d.
Steinen - Weigand, 97074 Würzburg

(72) Erfinder:

gleich Patentinhaber

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:

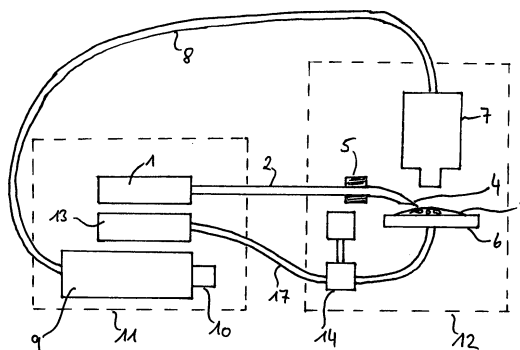
DE 195 22 999 C1
DE 195 22 546 C2
DE 196 36 355 A1
DE 94 14 467 U1
DE 198 82 224 T1
US 60 64 897 A
US 58 64 397 A
US 46 74 878

JP 61-194335 A (englischsprachiges Abstract);
JP 04-36642 A (englischsprachiges Abstract);

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtung zur Erstellung Raman- und SER-spektroskopischer Messungen biologischer und chemischer Proben**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zum Messen biologischer und/oder chemischer Probenparameter mittels spektroskopischer Verfahren, insbesondere mit Hilfe der Ramanspektroskopie, bei welchem

- eine Probe (3) mit Laserlicht (15) beleuchtet wird,
- die Probe (3) durch Wechselwirkung mit dem Laserlicht (15) Streustrahlung (16) emittiert,
- eine spektrale Zerlegung der Streustrahlung (16) erfolgt, und
- die von der Probe 3 emittierte Streustrahlung (16) von einer Detektionseinheit (10) detektiert wird wobei
- zuerst ein als metallisch beschichtete Glasfaser Spitze (4) ausgebildetes Ende einer Glasfaser (2) mittels einer Positioniereinrichtung (5) auf oder in die Probe (3) positioniert wird
- dann mittels eines Anregungslasers (1) eine Beleuchtung der Probe (3) mit Laserlicht (15) durch die erste Glasfaser (2) erfolgt, und
- die von der Probe (3) emittierte Streustrahlung (16) mit Hilfe eines abbildenden optischen Systems (7) fokussiert und in eine zweite Glasfaser (8) eingekoppelt wird dadurch gekennzeichnet, dass die Laserleistung...



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1 und eine Vorrichtung gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 8 zur spektroskopischen Untersuchung biologischer und/oder chemischer Proben, insbesondere mit Hilfe der Ramanspektroskopie.

[0002] Bei der Ramanspektroskopie wird die inelastische Streuung von Photonen an Molekülen beobachtet. Bei der Streuung von Licht an Molekülen werden die meisten Photonen elastisch gestreut. Die gestreuten Photonen haben dann dieselbe Energie wie die eingestrahlten Photonen. Ein kleiner Teil des gestreuten Lichts wird jedoch inelastisch gestreut, so dass das Streulicht auch Frequenzen aufweist, die sich von der des eingestrahlten Lichts unterscheiden. Der Effekt, der zu dieser inelastischen Streuung führt, wird als Ramaneffekt bezeichnet. Die Energieänderungen bei der Ramanstreuung beruhen auf An- und/oder Abregungen von vibronischen Zuständen der bestrahlten Moleküle. Die Energiedifferenz von den eingestrahlten und den gestreuten Photonen ist die Energie die benötigt wird, um einen vibronischen Zustand an- oder abzuregen.

[0003] Die Messung solcher Schwingungszustände durch Ramanspektroskopie erfolgt durch Bestrahlung der zu untersuchenden Probe mit Laserlicht. Das von der Probe gestreute Licht wird durch ein Mikroskopobjektiv gebündelt und anschließend dem Spektrometer zugeführt.

[0004] Bei Mikro-Raman-Messungen erfolgt die Beaufschlagung der Probe mit Laserlicht mit Hilfe eines Raman-Mikroskops. Das gestreute Licht wird in 180°-Reflexion über das Mikroskop zum Spektrometer geleitet. Im Spektrometer findet eine spektrale Zerlegung der gestreuten Photonen statt. Die Auftragung der Intensität des Streulichtes gegen die Energiedifferenz zwischen eingestrahltem und gestreutem Licht bezeichnet man als Ramanspektrum.

[0005] Da jedoch nur ein kleiner Anteil der eingestrahlten Photonen inelastisch gestreut wird, ist die Intensität der Ramansignale sehr klein. Daher kommt es oft vor, dass die natürlich auftretende Fluoreszenz vieler Materialien die Ramansignale überdecken. Die Unterdrückung der Fluoreszenz wird im Allgemeinen durch Verwendung von SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) -Substraten realisiert, welche ein SERS-aktives Material (z.B. Silber, Gold oder Kupfer) beinhalten. Durch die Bestrahlung des SERS-Substrats mit Licht einer Wellenlänge nahe der Plasmonwellenlänge des Metalls wird an der Metalloberfläche ein erhöhtes lokales elektrisches Feld ausgelöst. Dies beruht auf dem höheren elektromagnetischen Feld, welches sich an Spitzen einer rauen Oberfläche bildet und auf der Anregung einer kollektiven Schwin-

gung der Leitungselektronen (Oberflächenplasmonen). Moleküle der zu untersuchenden Probe, die sich in der Nähe der Oberfläche befinden, erfahren daher ein starkes elektromagnetisches Feld, was wiederum eine Verstärkung der Ramansignale zur Folge hat. Diese Verstärkung kann einen Faktor von 10^3 – 10^6 betragen. Somit können mit dieser Methode kleinste Mengen adsorbierter Teilchen nachgewiesen werden.

[0006] Als SERS-Substrat werden üblicherweise Metallkolloidlösungen verwendet, mit denen die zu untersuchenden Proben getränkt werden. Allerdings wird bei dieser Methode eine erhebliche Menge an Schwermetall irreversibel in die Probe eingebracht.

Stand der Technik

[0007] Aus DE 196 36 355 A1 ist ein Verfahren zur Erhöhung der Intensität Raman-gestreuten Lichts mittels flächenhafter SERS-Substrate bekannt. Die Erhöhung der Intensität wird hier dadurch realisiert, dass dem Medium, in dem die Messung durchgeführt werden soll, Halogenide zugesetzt werden.

[0008] Sowohl bei kolloidalen als auch bei flächenhaften SERS-Substraten besteht eine große Kontaktfläche zwischen dem SERS-aktiven Metall und der Probe. Dies kann zu Veränderungen in der Probe durch elektrochemische Reaktionen an der Metalloberfläche führen, welche besonders bei biologischen Proben zu großen Problemen führen. Oftmals sind solche Proben für weitere Messungen unbrauchbar.

[0009] Ein weiteres Problem der konventionellen Ramanspektroskopie stellt die globale Bestrahlung der Probe dar, durch die lediglich über einen großen Bereich (einige mm^2) gemittelte spektroskopische Daten ermittelt werden können. Bei Mikro-Raman-Messungen wird der Durchmesser des Messspots durch ein Raman-Mikroskop verringert. Die laterale Auflösung bei einer solchen Messung beträgt jedoch immer noch 1 μm bis 5 μm . Lokale Veränderungen, welche sich im Submikrometerbereich abspielen, können mit dieser Methode nicht detektiert werden. Dieses Problem ist aus anderen spektroskopischen Bereichen bekannt, und wird beispielsweise in der optischen Nahfeldmikroskopie (SNOM) dadurch gelöst, dass das anregende Licht durch eine Glasfaser, welche an dem der Probe zugewandten Ende als Spitze ausgebildet ist, auf die Probe geleitet wird.

[0010] Faseroptiken sind in der Ramanspektroskopie zum Beispiel für Wasseranalytik-Messungen bekannt. Bei dieser Methode wird eine Glasfaser, welche das Laserlicht des Anregungslasers leitet, in das zu untersuchende Medium getaucht. Damit wird zwar eine aufwendige Justage eines optischen Systems umgangen, welches Laserstrahlung auf die Probe

lenkt, lokale Informationen mit einer Ortsauflösung im Submikrometerbereich können jedoch mit dieser Methode nicht erzielt werden.

[0011] Eine ungewollte Beeinflussung beziehungsweise Zerstörung der Probe kann auch aus der Bestrahlung der Probe durch das Laserlicht resultieren. Das Problem ist hierbei die hohe Leistung des Anregungslasers, welche notwendig ist, um eine brauchbare Intensität der Ramansignale zu erreichen.

[0012] Aus US 5 864 397 A ist ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur Durchführung von spektralen Ramanuntersuchungen mit metallbeschichtetem Lichtleiter bekannt, wobei bei der in diesem Dokument offenbarten Vorrichtung ein Anregungslaser mit einer Laserleistung von 25 mW zum Einsatz kommt. Insbesondere durch die Metallbeschichtung des Lichtleiters kann zwar eine Kontamination der Probe, beispielsweise durch eine vollständige Metallbeschichtung der Probe, vermieden werden und somit zwar teilweise eine Beschädigung der Probe abgewandt werden, jedoch weist diese Vorrichtung den Nachteil auf, dass die verwendete Laserleistung insbesondere empfindliche Proben schädigen kann.

[0013] Aus dem englischsprachigen Abstract der JP 61-194335 A ist eine Einrichtung zur Generierung und Detektion eines ortsaufgelösten Ramanspektrums bekannt. Dazu weist die Einrichtung einen schrittmotorgesteuerten Verschiebemechanismus auf.

[0014] Die US 4 674 878 A, DE 198 82 224 T1 und DE 195 22 999 C1 beschreiben Vorrichtungen zur Aufnahme von Streuspektren, wobei jeweils leistungsstärkere Anregungslaser zum Einsatz kommen. So wird in US 4,674,878 A ein Laser mit einer Leistung von 50 mW, in DE 198 82 224 T1 ein Laser mit einer Leistung von 700 mW bis 1,2 W und in DE 195 22 999 C1 ein Laser mit einer Leistung von 0,5 W bis 1,0 W vorgeschlagen.

[0015] Zudem ist es bislang notwendig, die Proben zur spektroskopischen Untersuchung in ein Labor zu transportieren. Dies hat den Nachteil, dass es bereits beim Transport der Proben vom ursprünglichen Standort zum Labor zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Probe kommen kann, da sich die Umgebungsbedingungen ändern beziehungsweise die am Ort der Probensammlung gegebenen Bedingungen nicht aufrecht erhalten werden können.

Aufgabenstellung

[0016] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur spektroskopischen Untersuchung biologischer und chemischer Proben, insbesondere mit Hilfe der Ramanspektroskopie, vorzuschlagen, bei dem bzw. der es möglich

ist, eine Beschädigung der zu untersuchenden Probe, insbesondere durch das verwendete Laserlicht, zu minimieren.

[0017] Die Lösung der Aufgabe erfolgt erfindungsgemäß durch das Verfahren gemäß Patentanspruch 1 beziehungsweise durch die Vorrichtung gemäß Patentanspruch 9.

[0018] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Zerstörung der zu untersuchenden Proben durch die Verwendung einer Glasfaser Spitze einer ersten Glasfaser als Sonde, welche mit einem SERS-aktiven Material (z.B. Silber, Gold oder Kupfer) beschichtet ist, minimiert. Diese Glasfaser Spitze wird durch ein Positionierungssystem auf oder in die Probe positioniert. Das Licht eines Anregungslasers wird nun in die erste Glasfaser eingekoppelt, welche an ihrem der Probe zugewandten Ende mit der Glasfaser Spitze versehen ist. Durch Austritt aus der Glasfaser Spitze trifft der Laserstrahl auf eine Probenoberfläche. Dort finden elastische und inelastische Streuprozesse statt, das heißt, Strahlung verschiedener Wellenlänge wird von der Probe emittiert (Streustrahlung). Ein abbildendes optisches System, zum Beispiel ein Mikroskopobjektiv, fokussiert diese Streustrahlung, welche anschließend in eine zweite Glasfaser eingekoppelt werden kann. Für diese Fokussierung kann auch ein Linsensystem verwendet werden. Die Glasfaser leitet die Streustrahlung in ein Spektrometer, in dem eine spektrale Zerlegung der Streustrahlung erfolgt. Die so nach Wellenlängen sortierten Signale werden anschließend von einer Detektionseinheit detektiert und können nun mit Hilfe eines Rechners verarbeitet und ausgewertet werden.

[0019] Durch die Verwendung einer metallbeschichteten Glasfaser Spitze als SERS-Sonde findet eine Verstärkung der Ramansignale aufgrund des SERS-Effekts statt, ohne dass die Proben mit einer Metallkolloidlösung getränkt werden müssen. Das heißt, die Probe kommt lediglich an der Kontaktstelle von Spitze und Probe mit dem Metall in Berührung. Eventuelle Kontamination durch die Diffusion der Metallatome in die Probe sind somit lokal beschränkt. Die Probe kann daher für weitere Messungen verwendet werden.

[0020] Vorteilhaft ist es, wenn die Detektion der Streustrahlung ortsaufgelöst erfolgt. Die Verstärkung der Ramansignale beschränkt sich bei Verwendung einer metallbeschichteten Glasfaser Spitze auf die Moleküle, welche sich in der Nähe der Spitze befinden. Nur diese Signale werden also durch den SERS-Effekt verstärkt, wodurch die Signale einem bestimmten Ort auf der Probe zugeordnet werden können. Raman-Messungen können daher mit dieser Anordnung ortsaufgelöst erfolgen.

[0021] Dabei erweist es sich als besonders vorteil-

haft, wenn die von dem Laserlicht bestrahlte Fläche der Probe weniger als $1 \mu\text{m}^2$ beträgt. Eine Aufweitung des Laserstrahls, und damit eine unnötig ausgedehnte Bestrahlung der Probe, wird vermieden, indem die Glasfaser Spitze sehr nahe an die Probenoberfläche gebracht werden kann, so dass das anregende Laserlicht einen minimalen Weg zwischen dem Glasfaserende und der Probenoberfläche zurücklegen muss. Vorzugsweise berührt die Glasfaser Spitze die Probe, wodurch eine direkte Einleitung des anregenden Laserlichts in die Probe möglich ist. Die laterale Ortsauflösung ist im Falle eines unmittelbaren Kontakts zwischen der Glasfaser Spitze und der Probenoberfläche lediglich durch den Durchmesser der Spitze bestimmt.

[0022] Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einer Laserleistung des Anregungslasers von 0,2–1,2mW ermöglicht eine besonders schonende Untersuchung der Proben. Durch die Ausnutzung des signalverstärkenden SERS-Effekts und die gleichzeitige Fokussierung des Laserlichts aufgrund der spitz zulaufenden Glasfaser sind für die Beobachtung der gewünschten Signale bereits wesentlich kleinere Laserleistungen ausreichend als bei den bisher bekannten Raman-spektroskopischen Verfahren. Dies ist besonders bei empfindlichen biologischen Proben wichtig, da an diesen oft schon während der Messung Strahlenschäden entstehen, welche die Zustände der Probe verändern und die Proben für weitere Messungen unbrauchbar machen. Dadurch wird die Reproduktion eines einmal gemessenen Ergebnisses erheblich erschwert. Durch die Reduzierung der Laserleistung um ca. zwei Größenordnungen wird die Möglichkeit geschaffen, empfindlichere Proben zu vermessen, die Messzeit zu verlängern, um eine Verbesserung der Mess-Statistik zu erreichen und wiederholte Messungen an ein und derselben Probe durchzuführen.

[0023] Die Verwendung einer zweiten Glasfaser zur Leitung der Streustrahlung ermöglicht eine variable Einstellung der einzelnen Komponenten zueinander. Die Streustrahlung kann somit unter verschiedenen Winkeln detektiert werden. Wählt man den Winkel zwischen den beiden Glasfasern so, dass er 90° beträgt, wird verhindert, dass die reflektierte und/oder die um 180° gestreute Laserstrahlung detektiert wird, was sich durch die hohe Intensität der Laserstrahlung störend auf die eigentlich zu beobachtenden Signale auswirken kann. Auch hinsichtlich der Verwendung verschiedener Probenaufnahmen ist die Flexibilität in der Anordnung der beiden Glasfasern zueinander von Vorteil.

[0024] Eine besonders vorteilhafte Variante des Verfahrens sieht vor, die Detektion der Streustrahlung winkelaufgelöst vorzunehmen, so dass das gestreute Licht unter vorher festgelegten Winkeln detektiert wird. Die Winkel sind dabei durch Variation

der Lage der Probenaufnahme und der Glasfasern zueinander einstellbar.

[0025] Die Positionierung der Glasfaser Spitze erfolgt vorzugsweise durch einen Mikromanipulator, welcher eine genaue Positionierung der Spitze gewährleistet.

[0026] Bei einer weiteren Variante des Verfahrens kann zur Überwachung der Spitzenpositionierung ein Mikroskop oder eine CCD-Kamera verwendet werden.

[0027] Die erfindungsgemäße Vorrichtung zum Messen biologischer und/oder chemischer Probenparameter mittels Ramanspektroskopie nach Anspruch 9 umfasst einen Anregungslaser, eine Positioniereinrichtung, eine optische Koppereinheit zur Beleuchtung der Probe mit Laserlicht und zur Fokussierung und Leitung des von der Probe emittierten Streulichts, ein optisches Spektrometer zur spektralen Zerlegung der Streustrahlung und eine lichtempfindliche Detektoreinrichtung.

[0028] Die optische Koppereinheit weist eine Probenaufnahme, zwei Glasfasern und ein abbildendes optisches System auf und ermöglicht mittels dem als Spitze ausgebildeten Ende der ersten Glasfaser, aus der das Laserlicht ausgekoppelt wird, um auf die zu untersuchende Probe zu treffen, ortsaufgelöste Raman-Messungen. Da die Spitze mittels der Positioniereinrichtung direkt auf, beziehungsweise in die Probe positionierbar ist, kann die bestrahlte Fläche der Probe auf die Querschnittsfläche der Austrittsöffnung der Glasfaser Spitze beschränkt werden. Damit wird also eine lediglich lokale Beleuchtung der Probe mit Laserlicht ermöglicht.

[0029] Die verwendete Glasfaser Spitze ist mit einer Metallbeschichtung versehen. Als Metalle kommen SERS-aktive Materialien (z.B. Silber, Gold, Kupfer) in Frage. Durch die Metallbeschichtung kommt es durch den SERS-Effekt in der Nähe der Spitze zur Ausbildung eines erhöhten elektrischen Feldes, wodurch die Intensität der Ramansignale verstärkt wird. Des Weiteren wird die natürlich auftretende Fluoreszenz welche bei vielen biologischen Proben auftritt gequencht, das heißt statt der austretenden Fluoreszenzstrahlung findet nun ein strahlungsloser Übergang statt. Diese durch die Metallbeschichtung der Spitze hervorgerufene Verstärkung der Ramansignale kombiniert mit der fokussierenden Wirkung der Glasfaser Spitze ermöglicht es, die Leistung der anregenden Laserstrahlung um zwei Größenordnungen zu reduzieren und ermöglicht die zerstörungsfreie Vermessung empfindlicher biologischer Proben.

[0030] Durch die Verwendung einer metallbeschichteten Glasfaser Spitze als SERS-Sonde wird die Metallkontamination stark verringert und erlaubt die Be-

obachtung von Schwingungsmoden, die bei Proben mit Kolloidlösung als SERS-Substrat auftreten. Diese Zustände könnten durch die Behandlung der Probe mit Kolloidlösung nicht angeregt werden.

[0031] Zum Sammeln des Streulichts ist ein abbildendes optisches System vorgesehen, wobei als abbildendes optisches System vorzugsweise ein Mikroskopobjektiv verwendet wird. Es sind aber auch andere abbildende optische Systeme denkbar. Die zweite Glasfaser der optischen Kuppereinheit sorgt für die Leitung des so gebündelten Lichts zum Spektrometer in dem die spektrale Aufspaltung des Streulichts erfolgt, welches mit Hilfe einer Detektoreinrichtung detektiert wird.

[0032] In einer bevorzugten Ausführung der Vorrichtung wird als Detektoreinrichtung eine CCD-Kamera verwendet. Es können aber auch andere lichtempfindliche Detektoren, wie z.B. Photomultiplier oder Photodiodenarrays verwendet werden.

[0033] Beim Auskoppeln des Lichts auf die Probenoberfläche ist die Verwendung möglichst kleiner Glasfaserspitzen von Vorteil, um eine hohe Ortsauflösung zu erreichen. Die Spitze weist daher gemäß einer bevorzugten Ausführung einen Durchmesser nicht größer als 1 µm auf.

[0034] In einer besonders bevorzugten Ausführung der Vorrichtung weist die Oberflächenbeschichtung der Glasfaser Metallcluster mit Durchmesser < 100 nm auf, da in diesem Bereich eine optimale Anregung der Oberflächenplasmonen-Resonanzen gegeben ist.

[0035] In einer weiteren bevorzugten Ausführung der Vorrichtung ist für die optische Kuppereinheit zur Positionierung zumindest einer Glasfaser bzw. der Glasfaserspitze ein Mikromanipulator vorgesehen. Somit kann beispielsweise eine genaue Positionierung der Glasfaserspitze auf oder innerhalb der Probe erfolgen. In Kombination mit dem kleinen Durchmesser der Glasfaserspitze ist somit ein Abrastern der Probe mit kleinen Rastabständen möglich.

[0036] Vorteilhaft ist es die Position zumindest einer Glasfaser durch ein geeignetes Positionierungssystem relativ zur Probenaufnahme variabel zu gestalten.

[0037] In einer besonderen Ausgestaltung der Vorrichtung wird die zweite Glasfaser derart gelagert, dass eine Winkelvariation zwischen der Längsachse der zweiten Glasfaser und der Probenaufnahme möglich ist. Wird als Positionierungssystem für die zweite Glasfaser beispielsweise ein Goniometer verwendet, ist eine genaue Einstellung dieses Winkels möglich. So können auch winkelaufgelöste Messungen realisiert werden.

[0038] Zusätzlich zur Glasfaser kann auch die Probenaufnahme verfahrbar ausgestaltet sein, damit der auf der Probe befindliche Laserspot in die Brennebene des abbildenden optischen Systems beziehungsweise des Mikroskopobjektivs gebracht werden kann.

[0039] Gemäß einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der Vorrichtung weist die Vorrichtung einen modularen Aufbau auf. Dabei bilden der Anregungslaser, das Spektrometer und die Detektoreinrichtung Komponenten eines separat handhabbaren Messmoduls, während die optische Kuppereinheit ein separat handhabbares optisches Koppelmodul bildet, wobei zumindest das Messmodul über eine Datenschnittstelleneinrichtung mit einer Computereinrichtung verfügt, und das Messmodul mit dem optischen Koppelmodul über eine optische Schnittstelleneinrichtung verbunden ist. Vorzugsweise haben die Module eine Größe, die es erlaubt die Module ohne großen Aufwand zu transportieren. Dieser modulare Aufbau ermöglicht es, die Messungen direkt am Probenfundort vorzunehmen.

[0040] Zusätzlich kann für die Datenaufnahme und -verarbeitung ein Computer, sowie für die Ansteuerung elektronischer Geräte eine Steuerungselektronik vorgesehen sein, welche mit den Geräten der einzelnen Module verbunden werden können.

[0041] In einer bevorzugten Ausführung sind für die Verbindungen der einzelnen Module Glasfaserkabel vorgesehen, wodurch der Justieraufwand nach dem Zerlegen und Transport der Vorrichtung auf ein Minimum beschränkt wird.

[0042] In einer weiteren Ausführung umfasst das Messmodul einen zusätzlichen Laser (Fallenlaser) und das optische Koppelmodul einen Piezokristall zur Ansteuerung für eine Partikelfalle. Mit dieser Vorrichtung ist es möglich Mikropartikel durch ein elektromagnetisches Muldenpotential lokal zu stabilisieren so dass die Mikropartikel in der Probe unabhängig vom Anregungslaser manipuliert werden können (Fallenmodus). Dazu wird das Licht des Fallenlasers von der Unterseite der Probe in die Objektivebene gestrahlt, so dass die Mikropartikel unabhängig vom Anregungslaser manipuliert werden können. Der Piezokristall des Koppelmoduls sorgt dabei für die Ansteuerung des Lasers.

[0043] In einer weiteren Ausführung umfasst das optische Koppelmodul ein optisches Schnittstellenelement zur Verbindung mit dem Anregungslaser und ein weiteres Schnittstellenelement zur Verbindung mit dem Spektrometer.

[0044] Nachfolgend werden Varianten des Verfahrens sowie eine zur Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung anhand der Figuren beispielhaft

erläutert.

[0045] Es zeigen:

[0046] [Fig. 1](#) eine Ausführungsform der Vorrichtung zur Durchführung Raman-spektroskopischer Messungen an biologischen und/oder chemischen Proben in schematischer Darstellung;

[0047] [Fig. 2](#) eine Ausführungsform einer optischen Kuppeleinheit für konventionelle Mikro-Raman-Messungen in schematischer Darstellung;

[0048] [Fig. 3](#) eine Ausführungsform einer optischen Kuppeleinheit für Messungen im Faser-Sonden-Modus in schematischer Darstellung;

[0049] [Fig. 4](#) ein SER-Spektrum eines ätherischen Öls in einer *Mentha x piperita* L. nm. citrata

[0050] [Fig. 5](#) eine schematische Darstellung einer Kuppeleinheit für Messungen im Fallenmodus

Ausführungsbeispiel

[0051] [Fig. 1](#) zeigt einen schematischen Aufbau für eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. Eine Glasfaser **2** leitet Laserlicht **15** eines Anregungslasers **1** auf eine Probe **3**. Das Auskoppeln des anregenden Laserlichts **15** aus der Glasfaser **2** erfolgt über eine metallbeschichtete Glasfaserspitze **4**. Diese Glasfaserspitze **4** kann durch eine Positioniereinrichtung **5**, vorzugsweise ein Mikromanipulator, auf der Probe **3** justiert werden.

[0052] Die Probe **3** befindet sich auf einer Probenaufnahme **6**, welche verfahrbar ausgestaltet sein kann. Das von der Probe **3** emittierte Streulicht (hier nicht dargestellt) wird durch ein abbildendes optisches System **7**, z.B. eine Sammellinse, ein Mikroskop oder ähnliches, gebündelt und in eine zweite Glasfaser **8** eingekoppelt. Diese leitet das Streulicht zu einem Spektrometer **9**, in dem eine spektrale Zerlegung des Streulichts stattfindet. Die Streusignale werden dann mit Hilfe einer Detektionseinheit, vorzugsweise einer CCD-Kamera detektiert. Zur weiteren Verarbeitung können diese Streusignale einem Computer zugeführt werden.

[0053] In [Fig. 1](#) ist auch die Möglichkeit einer modularen Ausbildung der Vorrichtung angedeutet. Dabei bilden der Anregungslaser **1**, das Spektrometer **9** und die Detektionseinheit **10** ein Messmodul **11**, während die Probenaufnahme **6** und das abbildende optische System **7** zu einem optischen Koppelmodul **12** zusammengefasst sind, das über die Glasfasern **2** und **8** mit dem Messmodul **11** verbunden ist. Die Module sind in [Fig. 1](#) gestrichelt gekennzeichnet. Die einzelnen Komponenten der Module können jeweils auf einer Modulgrundplatte montiert sein. Bei Verwendung

eines Festkörperlasers als Anregungslaser **1** und einer CCD-Kamera als Detektionseinheit **10** können die Abmessungen des Messmoduls **11** beispielsweise in der Größenordnung von 53cm × 47cm × 30cm, die des optischen Koppelmoduls **12** in der Größenordnung von 100cm × 60cm × 30cm liegen. Die einzelnen Module sind daher gut handhabbar und ohne großen Aufwand transportabel. Durch die Verbindung der einander zugeordneten Komponenten mit Glasfasern ist eine Remontage ohne großen Justieraufwand möglich.

[0054] Zusätzlich zu den bisher aufgeführten Komponenten kann das Messmodul **11** einen Fallenlaser **13** aufweisen. Dieser kann über einen im optischen Koppelmodul **12** befindlichen Piezokristall **14** angesteuert werden und ermöglicht somit Messungen im Fallenmodus. Bei weiteren möglichen Komponenten der Vorrichtung, welche in der schematischen Darstellung nicht aufgeführt sind, handelt es sich beispielsweise um einen Computer für die Datenaufnahme und -verarbeitung sowie eine Elektronik für die Ansteuerung der CCD-Kamera am Spektrometer. Mit dieser modularen Vorrichtung können SERS-Messungen in den in [Fig. 2](#), [Fig. 3](#) und [Fig. 5](#) beschriebenen Messmodi vor Ort, also direkt am Ort der Probenentnahme durchgeführt werden.

[0055] [Fig. 2](#) zeigt eine schematische Darstellung einer optischen Kuppeleinheit **19** für konventionelle Mikro-Raman-Messungen. Das anregende Laserlicht **15** wird durch die Glasfaser **8** auf das abbildende optische System **7**, zum Beispiel ein Raman-Mikroskop, welches hier schematisch als Sammellinse dargestellt ist, geleitet. Durch das abbildende optische System **7** wird das anregende Laserlicht **15** auf die Probe **3** fokussiert. Eine von der Probe **3** emittierte Streustrahlung **16** wird durch das abbildende optische System **7** in die Glasfaser **8** eingekoppelt und zum Spektrometer geführt. In diesem Messmodus wird das anregende Laserlicht **15** in derselben Glasfaser **8** geführt wie die von der Probe emittierte Streustrahlung **16**. Die Glasfaser **2** gemäß der in [Fig. 1](#) dargestellten Ausführungsform des Koppelmoduls **12** kann entfallen oder lediglich außer Funktion sein, oder sich in einer zurückgefahrenen Position befinden, so dass die Mikro-Raman-Messungen durch die Glasfaserspitze **4** ([Fig. 1](#)) nicht beeinflusst werden.

[0056] [Fig. 3](#) zeigt eine schematische Darstellung einer optischen Kuppeleinheit **20** zur Durchführung des Verfahrens im Fasersonden-Modus. Das anregende Laserlicht **15** wird hierbei durch die Glasfaser **2** auf die Probe **3** geleitet. Die Auskopplung des anregenden Laserlichts **15** auf die Probe **3** erfolgt über die Glasfaserspitze **4**, welche mit einem SERS-aktiven Material beschichtet ist. Die Einkopplung der von der Probe **3** emittierten Streustrahlung **16** in die Glasfaser **8** erfolgt auch hier über ein abbildendes optisches System **7**. Die Glasfaserspitze der Glasfaser **2**

und das Glasfaserende der Glasfaser **8** sind als Glasfaserteilstücke ausgebildet, die über Schnittstelleneinrichtungen **22** mit der Glasfaser **2** bzw. der Glasfaser **8** verbindbar sind. Schnittstelleneinrichtungen der gleichen Art können auch am Messmodul **11** ausgebildet sein. Die Positionierung der Glasfaserspitze **4** und der Glasfaser **8** kann jeweils über eine Positioniereinrichtung **5** erfolgen. Für die Positionierung der Glasfaserspitze **4** wird vorzugsweise ein Mikromanipulator verwendet, der elektronisch angesteuert werden kann. Um die vom anregenden Laserlicht **15** bestrahlte Fläche der Probe **3** in die Brennebene des abbildenden optischen Systems **7** zu bringen ist es vorteilhaft, wenn die Probenaufnahme **6** verfahrbar ausgestaltet ist. Auch hierfür kann eine Positionierungseinrichtung vorgesehen sein, die in der schematischen Darstellung allerdings nicht dargestellt ist. Durch den direkten Kontakt der Glasfaserspitze **4** mit der Probe **3** trifft das aus der Glasfaserspitze **4** austretende Laserlicht **15** unmittelbar auf die Probe **3**, so dass keine Gefahr besteht, dass sich der Laserstrahl auf dem Weg zur Probe **3** aufweitet. Dies ermöglicht es, eine lediglich durch die Ausmaße der Glasfaserspitze **4** definierte Fläche der Probe **3** zu bestrahlen. Bei dem unter Bezugnahme auf [Fig. 3](#) erläuterte Verfahren dient die Glasfaser **2** mit ihrer Glasfaserspitze **4** als Fasersonde (Fasersondenmodus) und ermöglicht eine lokale Beleuchtung der Probe mit Laserlicht und somit die Durchführung von orts aufgelösten Raman-Messungen ohne Beeinflussung des umgebenden Gewebes. Gleichzeitig kann in diesem Modus die Leistung des Anregungslasers stark reduziert werden, so dass Veränderungen der Probe durch zu hohe Laserintensitäten vermieden werden. In Kombination mit der stark reduzierten Kontamination aufgrund der beschichteten als SERS-Substrat dienenden Glasfaserspitze, sind sowohl die Untersuchung von Proben mit sehr kleinem Probenvolumen als auch wiederholte Untersuchungen an ein und derselben Probe möglich. Des Weiteren können mit dem Verfahren Zustände beobachtet werden, welche mit herkömmlichen Methoden nicht zugänglich sind.

[0057] [Fig. 4](#) zeigt beispielhaft SERS-Spektren von einem ätherischen Öl einer *Mentha X piperita L. nm. citrata*. Spektrum A wurde mittels eines konventionellen Mikro-Raman-Aufbaus aufgenommen. Als SERS-Substrat diente dabei entsprechend dem Stand der Technik eine Silberkolloidlösung. Die Spektren B bis C wurden im Fasersondenmodus entsprechend der [Fig. 3](#) aufgenommen. Hierfür wurde die Probe nicht mit einer Kolloidlösung behandelt, da die metallbeschichtete Glasfaserspitze als SERS-Substrat diente. Die unterschiedlichen Spektren B und C ergeben sich als Folge unterschiedlicher Eindringtiefe der Glasfaserspitze in die Probe. Obwohl die Laserleistung für die Messungen der Spektren B und C nur 0,2 mW betragen, im Vergleich zu 60 mW bei der Messung des Spektrums A, sind die Spektren B und C von einer besseren Qualität als das

Spektrum A. Zusätzlich zu der verbesserten Qualität der Spektren kann man bei den im Fasersondenmodus gemessenen Spektren B und C zwei Banden erkennen, welche im Spektrum A nicht vorhanden sind. Die beiden Banden sind in der [Fig. 4](#) mit jeweils einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Das Fehlen dieser beiden Banden im Spektrum A kann auf die Kontamination der Probe durch die Silberkolloidlösung zurückgeführt werden, mit der die Probe anfangs behandelt wurde. Durch Messungen im Fasersondenmodus bei dem eine metallbeschichtete Glasfaserspitze als SERS-Sonde verwendet wird, können solche Kontaminationen durch Schwermetalle stark reduziert werden.

[0058] [Fig. 5](#) zeigt eine Koppereinheit **21** für Raman-spektroskopische Messungen im Fallenmodus. Im Fallenmodus wird das Laserlicht **15** des Anregungslasers **1** in ein abbildendes optisches System **7**, vorzugsweise ein Raman-Mikroskop, eingekoppelt, welches das Laserlicht **15** des Anregungslasers **1** auf die Probe **3** fokussiert. Die Beleuchtung der Probe kann jedoch auch, wie im Fasersonden-Modus entsprechend [Fig. 3](#), über eine Glasfaserspitze erfolgen. Das Laserlicht **18** eines weiteren Lasers (Fallenlaser **13**, [Fig. 1](#)) wird durch eine weitere Glasfaser **17** von unterhalb der Probe **3** in die Objektivenebene des abbildenden optischen Systems **7** gestrahlt, so dass die Mikropartikel in der Probe **3** unabhängig vom Anregungslaser **1** manipuliert werden können. Die Leitung des anregenden Laserlichts **15** und der Streustrahlung **16** kann wie bei Mikro-Raman-Messungen in einer gemeinsamen Glasfaser **8** realisiert werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, das anregende Laserlicht **15** und die Streustrahlung **16** entsprechend [Fig. 3](#) in voneinander unabhängigen Glasfasern zu führen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Messen biologischer und/oder chemischer Probenparameter mittels spektroskopischer Verfahren, insbesondere mit Hilfe der Raman-spektroskopie, bei welchem
 - eine Probe (**3**) mit Laserlicht (**15**) beleuchtet wird,
 - die Probe (**3**) durch Wechselwirkung mit dem Laserlicht (**15**) Streustrahlung (**16**) emittiert,
 - eine spektrale Zerlegung der Streustrahlung (**16**) erfolgt, und
 - die von der Probe **3** emittierte Streustrahlung (**16**) von einer Detektionseinheit (**10**) detektiert wird wobei
 - zuerst ein als metallisch beschichtete Glasfaserspitze (**4**) ausgebildetes Ende einer Glasfaser (**2**) mittels einer Positioniereinrichtung (**5**) auf oder in die Probe (**3**) positioniert wird
 - dann mittels eines Anregungslasers (**1**) eine Beleuchtung der Probe (**3**) mit Laserlicht (**15**) durch die erste Glasfaser (**2**) erfolgt, und
 - die von der Probe (**3**) emittierte Streustrahlung (**16**)

mit Hilfe eines abbildenden optischen Systems (7) fokussiert und in eine zweite Glasfaser (8) eingekoppelt wird

dadurch gekennzeichnet, dass die Laserleistung des Anregungslasers (1) 0,2–1,2 mW beträgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der Streustrahlung (16) orts aufgelöst erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die von dem Laserlicht (15) bestrahlte Fläche der Probe (3) weniger als $1 \mu\text{m}^2$ beträgt.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der Streustrahlung (16) winkelaufgelöst erfolgt.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Positionierung der Glasfaserspitze (4) mit Hilfe eines Mikromanipulators erfolgt.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Überwachung der Positionierung der Glasfaserspitze (4) mit Hilfe eines Mikroskops erfolgt.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Überwachung der Positionierung der Glasfaserspitze (4) mit Hilfe einer CCD-Kamera erfolgt.

8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorangehenden Ansprüche umfassend

- einen Anregungslaser (1) zur Anregung vibronischer Zustände in der Probe (3),
- eine Positioniereinrichtung (5)
- eine optische Kuppeleinheit zur Beleuchtung der Probe (3) mit Laserlicht (15) und zur Fokussierung und Leitung der von der Probe (3) emittierten Streustrahlung (16) zur weiteren Verarbeitung
- ein optisches Spektrometer (9), zur spektralen Zerlegung der Streustrahlung (16), und
- eine mindestens einen lichtempfindlichen Detektor aufweisenden Detektionseinheit (10) zur Detektion der von der Probe 3 emittierten Streustrahlung (16) wobei

die optische Kuppeleinheit eine Probenaufnahme (6), zwei Glasfasern (2) und (8) und ein abbildendes optisches System (7) umfasst, wobei die erste Glasfaser (2) mit einer metallisch beschichteten Glasfaserspitze (4) versehen ist und das anregende Laserlicht (15) auf die Probe (3) leitet, und das abbildende optische System (7) die von der Probe (3) emittierte Streustrahlung (16) fokussiert und durch Einkopplung in eine zweite Glasfaser (8) zum Spektrometer

(9) leitet dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung einen Anregungslasers (1) mit einer Leistung im Bereich von 0,2 bis 1,2 mW aufweist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Detektionseinheit (10) eine CCD-Kamera verwendet wird.

10. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Glasfaserspitze (4) einen Radius $< 1 \mu\text{m}$ aufweist.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberflächenbeschichtung der Glasfaserspitze (4) Metallcluster mit Durchmesser $< 100\text{nm}$ aufweist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Kuppeleinheit zur Positionierung zumindest einer Glasfaser mit einem Mikromanipulator versehen ist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Relativposition zumindest einer Glasfaser gegenüber der Probenaufnahme (6) veränderbar ist.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Positionierung der zweiten Glasfaser (8) derart erfolgt, dass der Winkel zwischen der Längsachse der zweiten Glasfaser (8) und der Probenaufnahme (6) variabel ist.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Kuppeleinheit mit einer verfahrbaren Probenaufnahme (6) versehen ist.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslaser (1), das Spektrometer (9) und die Detektionseinheit (10) Komponenten eines separat handhabbaren Messmoduls (11) bilden, und die optische Kuppeleinheit ein separat handhabbares optisches Koppelmodul (12) bildet, wobei zumindest das Messmodul (11) über eine Datenschnittstelleneinrichtung mit einer Computereinrichtung und das Messmodul (11) und das optische Koppelmodul (12) über eine optische Schnittstelleneinrichtung (22) miteinander verbunden sind.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16 dadurch gekennzeichnet, dass zur Verbindungen der einzelnen Module Glasfaserkabel vorgesehen sind.

18. Vorrichtung nach Anspruch 16 oder 17 dadurch gekennzeichnet, dass das Messmodul (11) zusätzlich einen zweiten Laser (13) und das optische

Koppelmodul (12) einen Piezokristall (14) zur Ansteuerung für eine Partikelfalle und eine Schnittstelleneinrichtung (22) zur Verbindung der Partikelfallenansteuerung mit dem zweiten Laser (13) umfasst.

19. Optisches Koppelmodul für eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 18 dadurch gekennzeichnet, dass das optische Koppelmodul (12) eine optische Schnittstelleneinrichtung (22) zur Verbindung mit dem Anregungslaser (1) und eine weitere Schnittstelleneinrichtung (22) zur Verbindung mit dem Spektrometer (9) umfasst.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

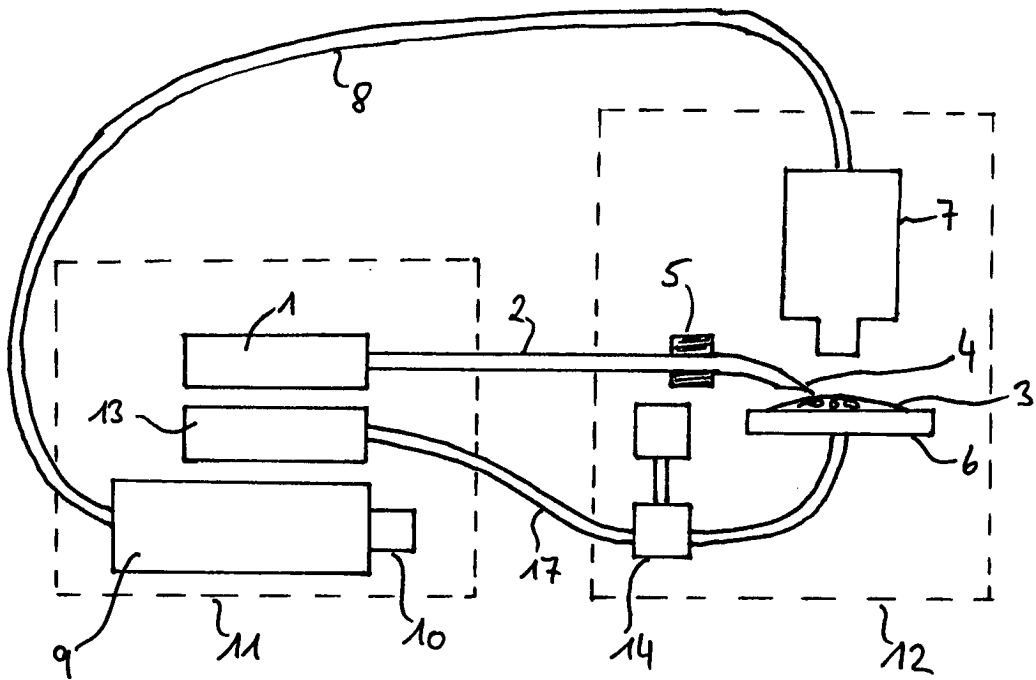


Fig. 1

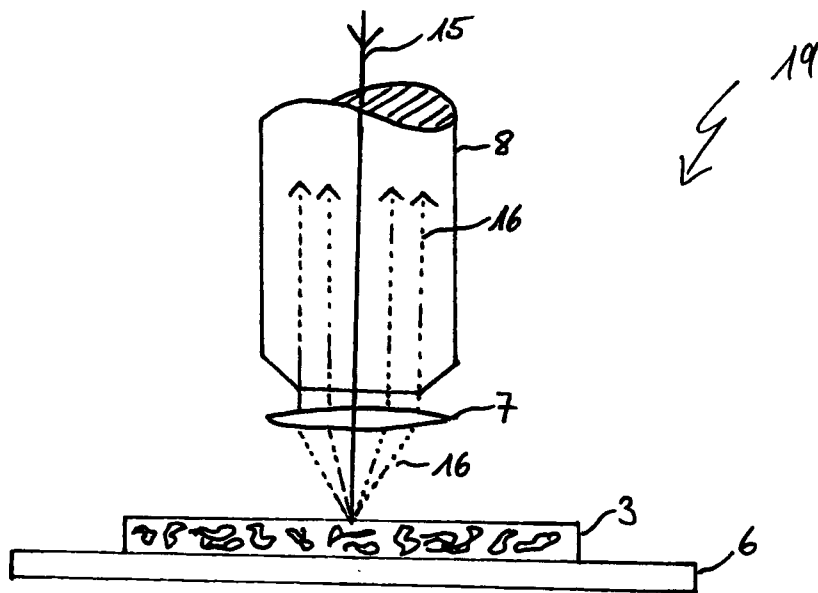


Fig. 2

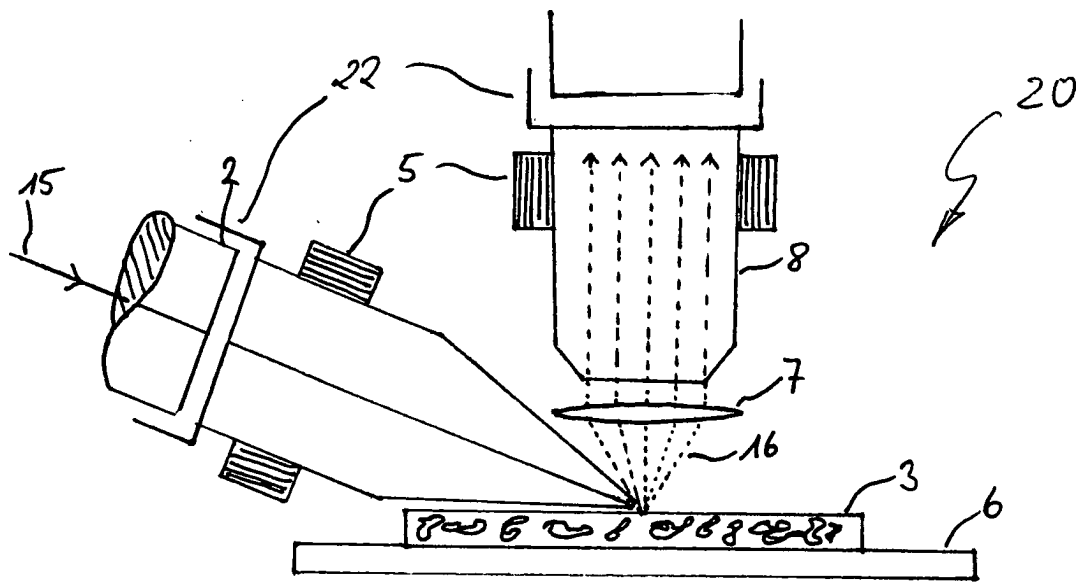


Fig. 3

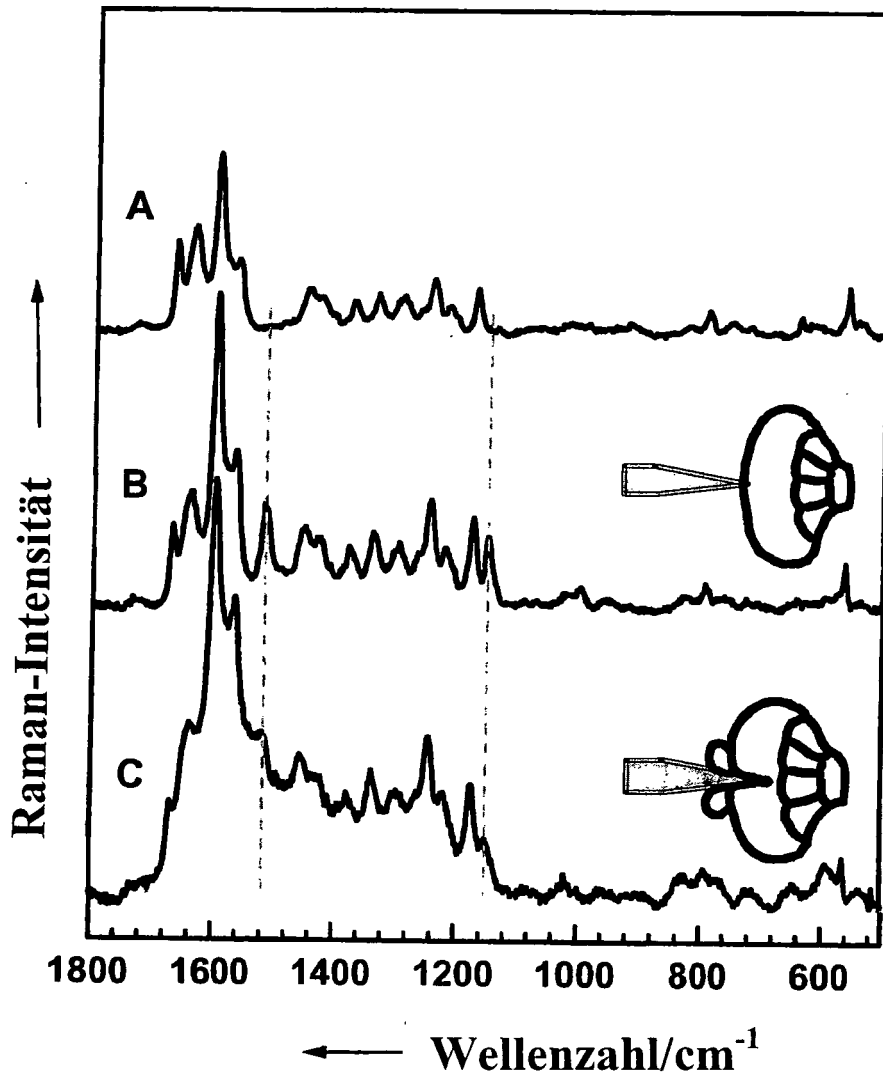


Fig. 4

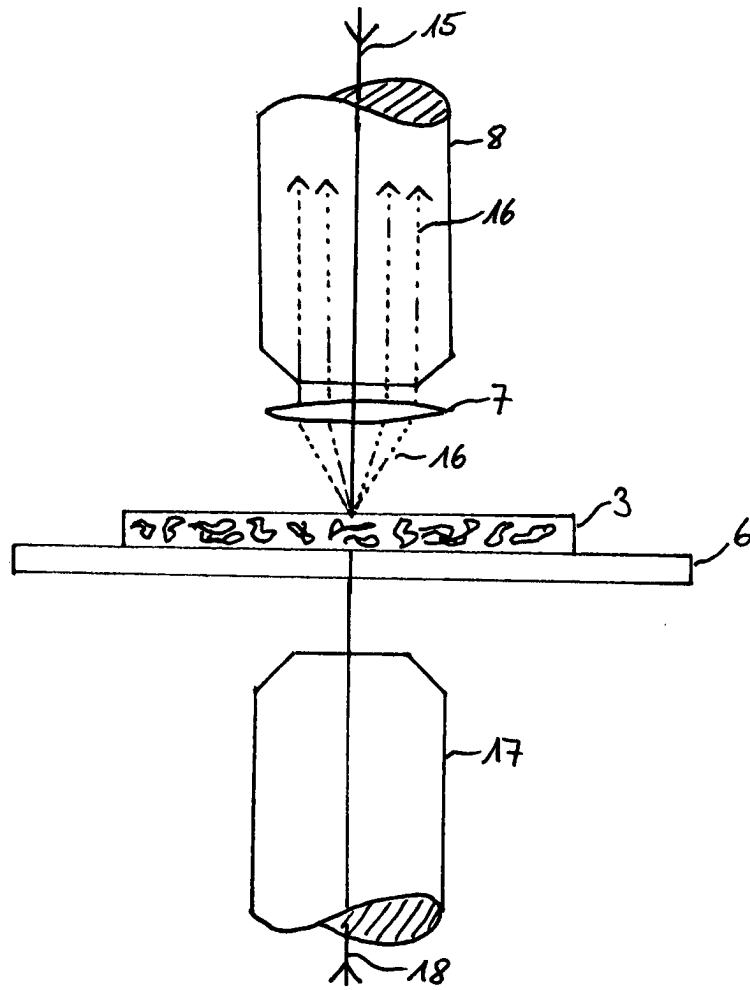


Fig. 5