

**Signalverstärkende Methoden der Raman-Mikrospektroskopie
für die Analytik
niedermolekularer Naturstoffe**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Dr. rer. nat.
von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
M.Sc. Paul Ebersbach
aus
Braunschweig

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2022
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Oliver Kayser
2. Gutachter: PD Dr. Joachim Franzke

Dortmund 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen optischer Methoden	7
2.1	Grundlegendes zu Licht und verwendete Einheiten	7
2.2	Transmission, Absorption, Resonanz und Streuung	9
2.3	(Zwei-Photonen)-Fluoreszenz	11
2.4	Spontane Raman-Streuung	12
2.5	Kohärente anti-Stokes Raman-Streuung (CARS)	15
2.5.1	Die Suszeptibilität dritter Ordnung und der nichtresonante Hintergrund	17
2.6	Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)	21
2.6.1	Sensitivität versus Reproduzierbarkeit von SERS-Substraten	22
2.6.2	Methoden zur Charakterisierung von SERS-Substraten und Durchführung von SERS-Experimenten	23
2.6.3	Der SERS-Hintergrund	24
2.6.4	Die Karbonisierung	26
3	Das Leica TCS SP8 CARS	29
3.1	Der Aufbau	29
3.2	Der Konfokal- und Multiphotonen-Modus	32
3.3	Laser	34
3.4	Objektive	35
3.5	Detektoren	37
4	Chemometrische Methoden	41
4.1	Datenvorverarbeitung	41

4.1.1	Eignung von Methoden zur Eliminierung des nichtresonanten Hintergrundes bei CARS	42
4.2	Datenauswertung	44
4.2.1	Gegenüberstellung multivariater Methoden	44
4.2.2	Hierarchische Clusteranalyse	46
4.2.3	Hauptkomponentenanalyse	46
4.2.4	Endmember-Extraktion und spektrales Entmischen	49
4.3	Statistische Versuchsplanung	57
5	Anwendungen	58
5.1	Chemisches Fingerprinting glandulärer Trichome von <i>Cannabis sativa</i> L. mittels CARS Mikroskopie	58
5.1.1	Einleitung	58
5.1.2	Methoden	60
5.1.3	Morphologie mittels Fluoreszenz und Transmission	60
5.1.4	Morphologie mittels Forward- und EPI-CARS Mikroskopie bei Einzelwellenlängenanregung	60
5.1.5	Chemisches Fingerprinting mittels entmischter hyperspektraler CARS-Aufnahmen	63
5.1.6	Diskussion	64
5.1.7	Schlussfolgerungen	69
5.2	Multivariate Auswertung von hyperspektralen CARS-Aufnahmen	70
5.2.1	Einleitung	70
5.2.2	Vergleich multivariater Methoden zur Entmischung und Klassifizierung hyperspektraler CARS-Aufnahmen	71
5.2.3	Abundanzen, Modellfehler, Performance und Wiederholbarkeit der Endmember-Extraktions-Entmischungsalgorithmen	76
5.2.4	Schlussfolgerungen	84
5.3	Laser-Scanning SERS-Hintergrund Mikroskopie – Ein vielseitiges Werkzeug zu einer zuverlässigeren SERS-Analytik	87
5.3.1	Einleitung	87
5.3.2	Methoden	88

5.3.3	Zusammenhang zwischen Analyt-Signalverstärkung, spektralem und bildgebendem SERS-Hintergrund	91
5.3.4	Variationsanalyse in Hot Spots mittels multimodaler SERS-Hintergrund Bildung	92
5.3.5	Multimodale Charakterisierung eines SERS-Substrates mittels Reflexion, SERS-Hintergrund und Transmission	94
5.3.6	Vergleich optischer Eigenschaften mit der Mikro- und Nanostruktur eines SERS-Substrates	97
5.3.7	Schlussfolgerungen	99
5.4	Laserinduziert immobilisierte SERS-Substrate in mikrofluidischen Systemen für die In-Chip-Analytik niedermolekularer Verbindungen	103
5.4.1	Einleitung	103
5.4.2	Methoden	106
5.4.3	Vorversuche zur Interaktion, Sensitivität und Selektivität der Analyten mit Silber- und Goldnanopartikeln	109
5.4.4	Mikrostrukturierung und analytische Anwendungen laserinduziert hergestellter SERS-Substrate	111
5.4.5	Charakterisierung der laserinduzierten SERS-Substrat Herstellung mittels SERS-Hintergrund Mikroskopie und REM	117
5.4.6	Screening und Optimierung der In-Chip-Detektion von ATP mittels laserinduziert hergestellter SERS-Substrate	120
5.4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	130
6	Zusammenfassung und Ausblick	132
A	Anhang	155
A.1	Grundlagen optischer Methoden	155
A.1.1	Die Bandenform der CARS-Signale	155
A.1.2	Der lineare Zusammenhang von CARS-Intensität und Konzentration bei niedriger Konzentration des Analyten	157
A.2	Multivariate Auswertung von hyperspektralen CARS-Aufnahmen	157
A.3	Laser-Scanning SERS-Hintergrund Mikroskopie: Eine schnelles Werkzeug zur Lokalisation von Hot Spots	162
A.4	Laserinduziert immobilisierte SERS-Substrate in mikrofluidischen Systemen .	163

A.5 Erklärung zur Reproduktion vorab veröffentlichter Inhalte	169
Abkürzungsverzeichnis	i

Kapitel 1

Einleitung

Die Wirkung niedermolekularer Naturstoffe macht sich der Mensch seit Jahrtausenden zu Nutze [1, 2]. So basiert die gesundheitsfördernde Wirkung der Ingwerwurzel, die stimulierende Wirkung von Kaffee, die toxische Wirkung der Tollkirsche, die antikarzinogene Wirkung der Rinde der Pazifischen Eibe oder die von Alexander Fleming nachgewiesene antibiotische Wirkung von Schimmelpilzen auf den Substanzen Shogaol, Koffein, Atropin, Paclitaxel und Penicillin. Diese sekundären Metabolite sind in Pflanzen, Mikroorganismen und Pilzen in Millionen von Jahren Evolution auf biologische Aktivität optimiert worden und sind daher oftmals der Startpunkt und Inspirationsquelle für die Medikamentenentwicklung in der Pharmaindustrie. Nach erfolgreicher Zulassung erfolgt die großtechnische Herstellung einfacher Moleküle meist auf klassisch chemisch-synthetischem Wege z. B. Acetylsalicylsäure (Aspirin®). Komplexere Moleküle erfordern dagegen häufig eine Pflanzenextraktion (z. B. das Antimalariamittel Artemisin) oder biotechnologische Fermentation (z. B. das Krebsmedikament Paclitaxel aus Eibenzellkulturen). Auch kombinierte Verfahren, bei denen z. B. eine Vorstufe aus einem biosynthetisch modifizierten Bakterium gewonnen wird und anschließend photooxidativ zum Wirkstoff umgewandelt wird (Artemisin) oder die Vorstufe aus Pflanzenmaterial extrahiert wird und anschließend chemisch-synthetisch modifiziert wird (Paclitaxel), werden genutzt [3].

Der Weg eines Naturstoffes zum Medikament ausgehend von der Wirkstofffindung, Produktion und schließlich Qualitätskontrolle des fertigen Produkts erfordert den Einsatz zahlreicher analytischer Methoden. Anforderungen an die klassische, probenverbrauchende, molekulare Offline-Analyse von Flüssigkeiten oder Extrakten eines Organismus z. B. mittels chromatografischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion [4] sind eine hohe Selektivität, Sensitivität und Quantifizierbarkeit, also wie gut Substanzen in einem Gemisch voneinander differenziert werden können (**Was?**), in welcher Menge ein Analyt nachgewiesen werden kann (**Wie wenig?**) und wie genau eine Analytkonzentration, Produktausbeute oder Reinheit bestimmt werden kann (**Wie viel?**). In der Online-Analytik z. B. zur Prozessanalyse, für ein Hochdurchsatz-Screening bei der Wirkstoffsuche, oder Kontrolle und Steuerung eines Herstellungsprozesses ist zudem oftmals eine hohe Zeitauflösung (**Wann?**) wichtig. Kriterien

für die Anwendbarkeit einer Methode sind zudem die Robustheit, Zuverlässigkeit, Automatisierbarkeit und letztendlich einfache Handhabbarkeit. Für einen direkten Nachweis eines niedermolekularen Naturstoffes in einem biologischen System ist zudem die Ortsauflösung (**Wo?**) der Methode entscheidend. Biologische Systeme weisen eine hohe Heterogenität auf mikroskopischer Ebene auf. Die klassische optische Mikroskopie oder Hellfeldmikroskopie ist daher eine der ältesten und nach wie vor wichtigsten Methoden für die Biowissenschaften und liefert Einblick in die räumliche Verteilung und Morphologie zellulärer Bestandteile eines Organismus oder einzelner Mikroorganismen, jedoch keine molekulare Information. Eine Lokalisierung eines Metaboliten in einem Organismus, also die Verknüpfung der morphologischen Welt (**Wo?**) mit der chemischen Welt (**Was?**) oftmals auch in Zeitauflösung (**Wann?**) ist somit nicht möglich. Diese ist z. B. von Interesse um die Produktion eines Metaboliten in einem biologischen System besser verstehen, kontrollieren oder um die Wirkung des Stoffes auf mikroskopische Ebene untersuchen zu können. Die weitverbreiteste Methode ist hierbei die Fluoreszenzmikroskopie, die durch Verwendung sogenannter „Labels“ eine selektive Bindung eines Fluorophors an bestimmte Strukturen und damit eine selektive Lokalisierung dieser Struktur in der Probe ermöglicht. Die Fluoreszenzmarkierung hat jedoch den Nachteil, dass die empfindliche biologische Probe verändert wird und somit möglicherweise nicht mehr das reale System widerspiegelt. Insbesondere eine Fluoreszenzmarkierung niedermolekularer Verbindungen mit einem vergleichsweise großen Fluoreszenzfarbstoff würde deren molekulare Eigenschaften so weit verändern, dass deren Verhalten in einem biologischen System nicht mehr genau bestimmbar wäre.

Die Raman-Mikrospektroskopie liefert dagegen als spektroskopisch-bildgebende Methode einen „natürlichen“ Kontrast der chemischen Zusammensetzung ohne die Verwendung von Labels. Sie wird der Vibrationsspektroskopie zugeordnet, in der im Unterschied zur Fluoreszenz selektivere schwingungsspezifische Fingerprint-Spektren von Molekülen erfasst werden. Ein Nachteil ist jedoch, dass der Raman-Effekt ein sehr schwacher Prozess ist und somit auf lange Laserbestrahlung pro Pixel angewiesen ist, um Spektren mit ausreichender Intensität zu generieren. Aus der klassischen Raman-Spektroskopie entwickelten sich daher eine Reihe signalverstärkender Raman-Methoden.

Abbildung 1.1 stellt die Vor- und Nachteile der in dieser Arbeit verwendeten signalverstärkenden Raman-Methoden der klassischen Raman-Spektroskopie schematisch gegenüber. Die kohärente anti-Stokes Raman-Streuung (engl. coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) ist ein nichtlinear optischer Prozess und ermöglicht prinzipiell eine zeitaufgelöste chemische Lokalisierung mit hoher Ortsauflösung. Wie das Schema in Abbildung 1.1 a verdeutlicht beschränkt sich die hierfür erforderliche Signalverstärkung jedoch aufgrund eines quadratischen Zusammenhangs ausschließlich auf Bereiche hoher Konzentration von Molekülschwingungen und hierbei vor allem auf CH-Streckschwingungen, weshalb die Methode meist zur Lokalisierung angereicherter Lipide z. B. in Geweben genutzt wird. Die Methode versagt bei Substanzen mit geringer Konzentration und/oder einer geringen Anzahl an CH-Bindungen. Aufgrund

der Beschränkung auf den CH-Streckschwingungsbereich, dem nichtlinearen Zusammenhang und einer Überlagerung mit einem nichtresonanten Hintergrund ist die Selektivität und Quantifizierbarkeit mittels CARS gegenüber Raman reduziert (siehe Einstufung in Abbildung 1.1 b).

Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (engl.: surface-enhanced Raman scattering, SERS) kann ähnlich Raman mittels der Fingerprint-Region einen selektiven Nachweis eines Analyten jedoch auch bei extrem niedrigen Konzentrationen ermöglichen. Nachteilig ist, dass die Methode auf einer Wechselwirkung des anregenden Lichtes und des Analyten mit einem nanostrukturierten Material meist aus Silber oder Gold, einem SERS-Substrat angewiesen ist, was deren Anwendbarkeit erschwert. Wie in Abbildung 1.1 a durch den Fehlerbalken angedeutet wird, ist die enorme Sensitivität zudem unzuverlässig und oftmals wenig reproduzierbar, da sie von zahlreichen Faktoren wie z. B. der Art des Analyten, des SERS-Substrates und deren Interaktion abhängig ist und somit insbesondere quantitative Messungen erschwert. Die Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit und damit Anwendbarkeit der SERS-Analytik sind daher ein wichtiges Forschungsfeld in Richtung einer SERS-Routineanalytik.

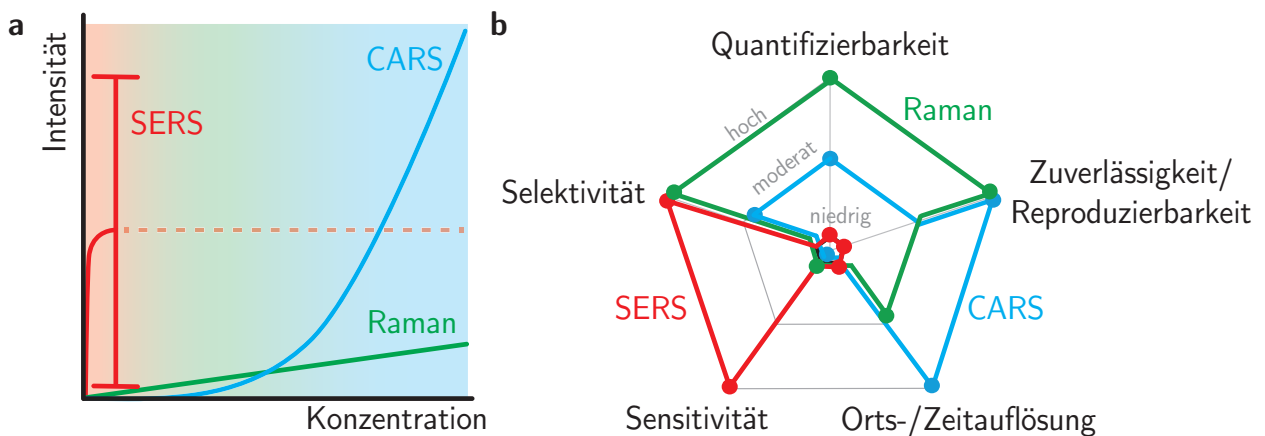


Abbildung 1.1: **Gegenüberstellung der Raman-Streuung, kohärenten anti-Stokes Raman-Streuung (CARS) und der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS).** (a) Schematische Darstellung der Signalintensität in Abhängigkeit der Konzentration. Während die Signalintensität der Raman-Streuung linear mit der Konzentration zunimmt, nehmen CARS-Signale quadratisch mit der Konzentration zu. Eine Signalverstärkung durch CARS erfordert somit eine hohe Dichte eines Analyten und/oder einer hohen Anzahl von z. B. CH-Streckschwingungen (blauer Bereich). Bei niedrigen Konzentrationen ist die Signalintensität der Raman-Streuung höher (grüner Bereich). Intensive SERS-Signale können prinzipiell bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen bis hin zu Einzelmolekülkonzentrationen generiert werden (roter Bereich). Wie durch den Fehlerbalken verdeutlicht wird, ist die enorme Sensitivität jedoch von zahlreichen Faktoren abhängig und somit unzuverlässig und oftmals wenig reproduzierbar. Da die SERS-Signalgenerierung auf der Adsorption eines Analyten auf ein SERS-Substrat basiert, erreicht das SERS-Signal ab einer bestimmten Analytkonzentration eine Sättigung (gestrichelte Linie). (b) Einstufung von Raman, CARS und SERS hinsichtlich der Quantifizierbarkeit, Zuverlässigkeit/Reproduzierbarkeit, Orts- und Zeitauflösung, Sensitivität und Selektivität.

In der vorliegenden Arbeit wird die CARS- und SERS-Mikrospektroskopie für die Identifizierung von Metaboliten in einer pflanzlichen Probe und einem technischen System, einem Mikrofluidiksystem angewandt. Hintergrund beider Anwendungen ist die Biosynthese von Metaboliten einer pharmakologisch hoch interessanten Naturstoffklasse, den Polyketiden und daraus abgeleiteter Substanzen. Abbildung 1.2 b zeigt eine allgemeine Darstellung der Polyketidsynthese. Die Synthese basiert auf einer schrittweisen bausteinartigen Kettenverlängerung Coenzym A aktivierter Acyl-Grundbausteine, wobei meist Acetyl-CoA als Starter-Einheit und Malonyl-CoA als Extender-Einheit dient. Der fließbandähnliche Aufbau erfolgt mittels multimodaler Enzymkomplexe, den Polyketidsynthasen. Durch weitere Reaktionsschritte wie Ringbildung entstehen dann ein Vielzahl komplexer Moleküle unterschiedlichster Struktur wie das Antibiotikum Erythromycin A, das Krebsmedikament Epothilon A oder der marinen Giftstoff Maitotoxin-1, dem abgesehen von Proteinen und Polymeren größten bekannten Naturstoff.

In der ersten Anwendung geht es um Identifizierung und Lokalisierung der Biosynthese der Cannabinoide in Trichomen, Pflanzenhaaren des *Cannabis sativa* L.. Wie Abbildung 1.2 a zeigt, leiten sich diese ebenfalls pharmakologisch relevanten Substanzen vom Polyketid Olivetolsäure ab und werden nach der Folgereaktion entsprechend auch als prenylierte Polyketide bezeichnet. Bei den Trichomen handelt es sich um ein pflanzliches Organ komplexer morphologischer Struktur und molekularer Zusammensetzung. Zielstellung der analytischen Methode ist die chemische Bildgebung. Um die Heterogenität auf mikroskopischer und molekularer Ebene zu erfassen, muss die analytische Methode sowohl eine hohe Ortsauflösung als auch Selektivität aufweisen. Als Methode wird die hyperspektrale CARS-Bildgebung mit hoher Ortsauflösung und moderater Selektivität gewählt. Die Herausforderung liegt hier insbesondere in der Ausreizung der begrenzten Selektivität von CARS-Signalen zur Metabolitidentifikation durch die Entwicklung geeigneter Auswertestrategien.

Die zweite Anwendung befasst sich mit der Identifizierung der Grundbausteine der Polyketidsynthese wie CoA und ATP als Energiequelle in einem mikrofluidischen System (siehe Abbildung 1.2 b). Hintergrund dieser Anwendung ist der Aufbau von mikrofluidischen Produktionseinheiten zur enzymatischen Synthese von Polyketiden, wobei die Synthese zellfrei, also nur unter Verwendung der wesentlichen Komponenten, den Grundbausteinen und Enzymen, erfolgen soll. Damit soll ein neuer Weg für die Wirkstoffherstellung aufgezeigt werden. Das Projekt fokussiert sich zunächst auf die Herstellung und Rückgewinnung der Grundbausteine, Acetyl-CoA und Malonyl-CoA. In dieser Arbeit wird der Aufbau einer in-Chip Online-Analytik beschrieben, um die biochemischen Reaktionen oder Trennprozesse nicht umgesetzter Edukte und Produkte an Anschluss an eine Reaktion im Mikrofluidiksystem zu verfolgen. Als vielversprechende Methode wird SERS genutzt, da die Methode sensitiv genug sein sollte, um Reaktanten noch im mikromolaren Bereich selektiv zu detektieren. Wie in Abbildung 1.1 dargelegt wird, besteht die größte Herausforderung der SERS-Analytik in der Implementierung eines SERS-Substrates in das Mikrofluidiksystem zur Generierung einer

hohen Ort- und Zeitauflösung und Optimierung der Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und damit Anwendbarkeit der SERS-Messung.

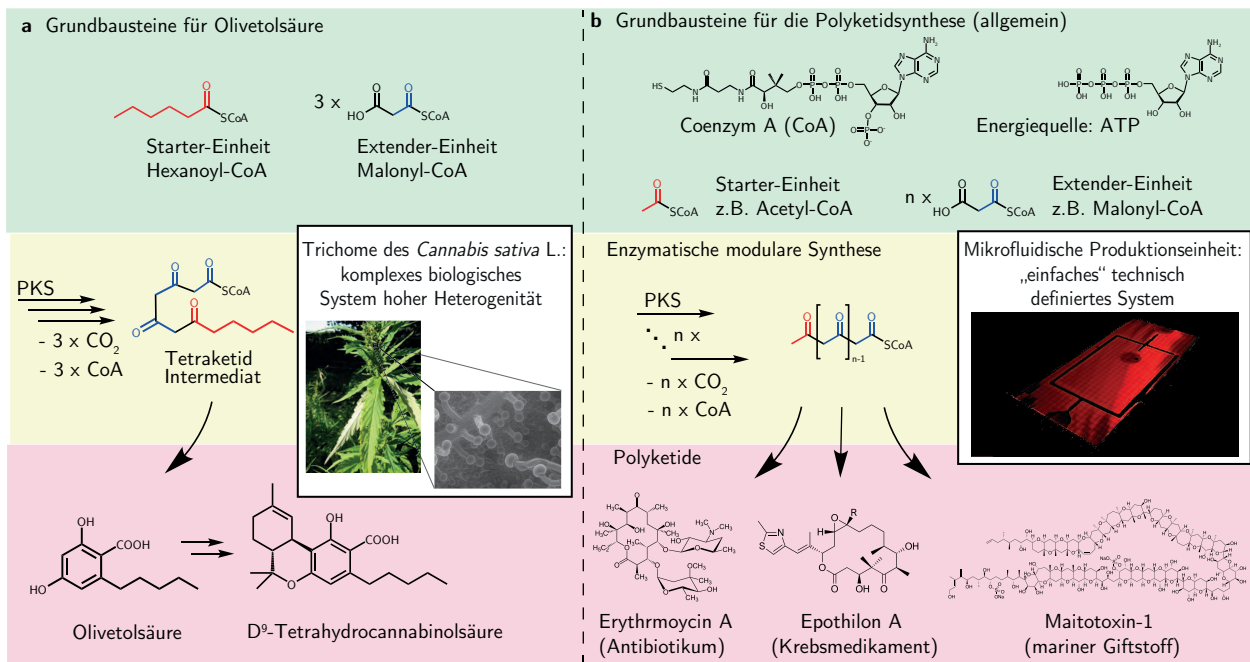


Abbildung 1.2: **Gegenüberstellung des Polyketidsyntheseansatzes im Mikrosystem und der Synthese des Polyketids Olivetolsäure in den Trichomen von *Cannabis sativa* L.** (a) Biosynthese des Polyketids Olivetolsäure als Vorstufe für Cannabinoide in *Cannabis sativa* L. [5]. Als Grundbausteine werden Hexanoyl-CoA und dreimal Malonyl-CoA verwendet. Die Cyclisierung des Tetraketid-Intermediates (vier Carbonyleinheiten) liefert Olivetolsäure und durch Folgereaktionen die bioaktiven Cannabinoide, sogenannte prenylierte Polyketide. Im Unterschied zur Polyketid-Synthese im Mikrosystem finden die biochemischen *In vivo*-Reaktionen innerhalb einer nicht genau definierbaren zellulären Umgebung komplexer Zusammensetzung statt. Abbildung der Pflanze aus [6]. (b) Allgemeine Darstellung der Polyketidsynthese zur Synthese bioaktive Substanzen. Polyketide werden durch Polyketidsynthasen (PKSs) schrittweise bausteinartig mittels nur weniger Grundbausteine aufgebaut, meist mittels Acetyl-CoA als Starter-Einheit und Malonyl-CoA als Extender-Einheit der Anzahl n. Als Energiequelle wird wie in vielen biochemischen Reaktionen ATP eingesetzt. Durch weitere enzymatisch gesteuerte Reaktionen wie Ringbildung der Poly-beta-ketoester- Kette bilden sich dann unterschiedliche komplexe Strukturen wie das Antibiotikum Erythromycin A, das Krebsmedikament Epothilon A oder der marine Giftstoff Maitotoxin-1 . Diese für gewöhnlich in Mikroorganismen, Pflanzen oder Pilzen stattfindenden biochemischen Reaktionen sollen im Mikrofluidiksystem unter kontrollierten, vereinfachten „zellfreien“ Bedingungen durch ausschließliche Verwendung der Enzyme im wässrigen Puffersystem ähnlich einer klassisch chemischen Synthese erfolgen.

Eine Besonderheit der Arbeit ist die durchgängige Anwendung multimodaler Konzepte. Eine Modalität bedeutet so viel wie Möglichkeit, Ausführung oder Art und Weise. Multimodale Konzepte auf eine Probe angewendet, nutzen somit gleichzeitig unterschiedliche Methoden an ein und derselben Probe, schauen bildlich gesprochen aus verschiedenen Blickwinkeln auf eine Probe. Diese Zusatzinformation einer Probe kann dabei ohne weitere experimentelle

Aufwände durch Zuschaltung weiterer Detektoren generiert werden. In den CARS-Aufnahmen wird beispielsweise zusätzliche morphologische Information durch Transmissionsbilder und die Autofluoreszenz der Probe mittels (Zweiphotonen-)Fluoreszenz erfasst. Bezüglich der SERS-Analytik wird eine neue Bildgebungsmethode unter Nutzung des zugrundeliegenden SERS-Hintergrundes vorgestellt.

Der Grundlagenteil der Arbeit baut sich wie folgt auf: **Kapitel 2** führt die zum Verständnis notwendigen Grundlagen der optischen Methoden ein. Darauf aufbauend werden im **Kapitel 3** die wesentlichen Komponenten des experimentellen Aufbaus, dem Leica TCS SP8 CARS-System, beschrieben. Die generierten spektralen und orts aufgelösten Daten erfordern aufgrund der Mehrdimensionalität den Einsatz multivariater oder chemometrischer Methoden. Die Grundlagen hierzu werden in **Kapitel 4** erörtert. Kurz wird auf Konzepte der statistischen Versuchsplanung eingegangen, die für die Entwicklung einer In-Chip SERS-Analytik angewandt werden.

Der Anwendungsteil in **Kapitel 5** unterteilt sich in vier Abschnitte: In **Abschnitt 5.1** wird die CARS-Mikroskopie für eine Einzeltrichom-Analytik des *Cannabis sativa* L. angewandt. Die hyperspektralen CARS Bilder werden zur Identifizierung chemischer Fingerprints unter Nutzung eines neuartigen Entmischungsalgorithmus in einzelne Komponenten zerlegt. Dieser Algorithmus berücksichtigt möglichen Nichtlinearitäten von CARS-Daten. Da Entmischungs-algorithmen bisher kaum im CARS-Bereich eingesetzt wurden, erfolgt in **Abschnitt 5.2** ein Vergleich dieses neuartigen Algorithmus zu anderen konventionellen Algorithmen. In **Abschnitt 5.3** wird die Laser-Scanning SERS-Hintergrund Mikroskopie als analytisches Werkzeug für eine zuverlässigere, anwenderfreundlichere SERS-Analytik eingeführt. Die Evaluierung der Methode erfolgt mittels eines kommerziellen SERS-Substrates und wird in Kombination mit weiteren optischen Modalitäten (Reflexion und Transmission) und der Rasterelektronenmikroskopie zur Charakterisierung von SERS-Substraten angewandt. In **Abschnitt 5.4** wird diese neue Technik auf laserinduziert hergestellte SERS-Substrate innerhalb von Mikrofluidiksystemen angewandt. Die Laser des Leica-Systems werden multimodal sowohl zur Messung als auch vorab zur Herstellung genutzt. Aufgrund der universellen biochemischen Relevanz wird die In-Chip-Analytik insbesondere auf ATP hin optimiert, aber auch AMP und der wichtige Cofaktor, Coenzym A (CoA), werden berücksichtigt (siehe Abbildung 1.2).

Kapitel 2

Grundlagen optischer Methoden

2.1 Grundlegendes zu Licht und verwendete Einheiten

In der Arbeit werden unterschiedliche optische Methoden zur Bilderzeugung und Spektroskopie beziehungsweise in Kombination angewandt. Gemeinsam ist, dass sie auf der Wechselwirkung von Licht mit Materie basieren. Nach dem Welle-Teilchen-Dualismus kann Licht als Welle in Form von elektromagnetischer Strahlung oder als einen Strom von Energiepaketen, den Photonen, aufgefasst werden, die sich mit Lichtgeschwindigkeit c (im Vakuum $c = 2,998 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$) fortbewegen. Die Energie elektromagnetischer Strahlung ist über das Plancksche Wirkungsquantum $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$ gequantelt und kann nur ganzzahlige Vielfache der Energie eines Photons annehmen. Der Wellencharakter des Lichts kommt über die Wellenlänge λ [m], die Frequenz ν [s^{-1}] oder die Wellenzahl $\bar{\nu}$ [m^{-1}] zum Ausdruck. Sie stehen in folgendem Zusammenhang zur Energie eines Photons [7]:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu} \quad (2.1)$$

Der Energiebereich elektromagnetischer Strahlung kann somit über jede dieser drei Größen dargestellt werden. In Abbildung 2.1 wird der Bereich des elektromagnetischen Spektrums der hier verwendeten optischen Methoden visualisiert.

Als Lichtquelle kommen vor allem Laser zum Einsatz. Im Unterschied zu alltäglichen Lichtquellen emittieren sie kohärentes¹, monochromatisches Licht mit hoher Strahlungsleistung.

¹ Kohärenz beschreibt in der Optik eine „zusammenhängende“ (lat.: cohaerere) zeitliche Auslenkung des Lichts mit fester Phasenbeziehung bei der es zu Interferenzeffekten kommen kann [8]. Während Laserlicht durch die stimulierte Emission einen sehr hohen örtlichen und zeitlichen Ordnungsgrad und damit hohe Kohärenz aufweist, wird thermisches Licht z. B. einer Glühlampe durch eine „nicht zusammenhängende“ spontane Emission vieler unabhängiger Atome gebildet und ist somit inkohärent. Die hier angewandte kohärente anti-Stokes Raman-Streuung (CARS) ist ein stimulierter Raman-Streuprozess und basiert auf einer gezielten Anregung einer Molekülschwingungsmode eines Ensembles von Molekülen, mit der Folge dass hier ebenfalls „zusammenhängendes“ kohärentes Licht erzeugt wird (siehe auch Abschnitt 2.5).

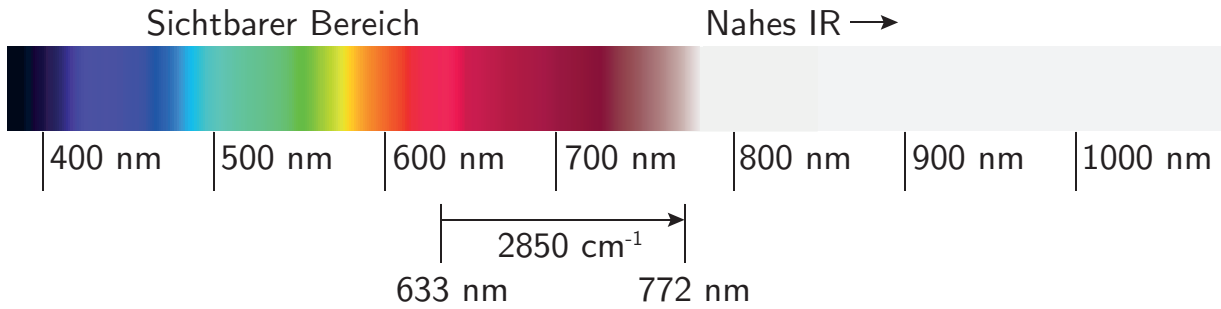


Abbildung 2.1: **Bereich des elektromagnetischen Spektrums der hier verwendeten optischen Methoden.** Der Energiebereich wird hier in Wellenlängen angegeben. Diese Angabe ist in der UV-VIS-Absorption- und Fluoreszenzspektroskopie üblich. In der Raman-spektroskopie und hierauf basierender Methoden (CARS, SERS) erfolgt die Angabe üblicherweise als Energiedifferenz zur Anregung in relativen Wellenzahlen in der Einheit [cm⁻¹]. Als Beispiel wird hier die Lage einer typischen Raman-Bande bei 2850 cm⁻¹, einer CH-Streckschwingung, im elektromagnetischen Spektrum bei einer Anregung von 633 nm gezeigt (Helium-Neon-Laser). In Wellenlängen ausgedrückt erscheint diese Bande gerundet bei 772 nm.

Die Strahlungsleistung P [W] (engl.: Power) berechnet sich über den Photonenstrom $\frac{dN_{\text{Photon}}}{dt}$ und der Energie eines Photons E :

$$P = \frac{dN_{\text{Photon}}}{dt} E \quad (2.2)$$

Wechselwirkungen von Licht mit Materie werden in der optischen Spektroskopie anhand von optischen Spektren untersucht, in denen Strahlungsintensitäten, im Folgenden nur noch Intensitäten genannt, in Abhängigkeit des Energiebereichs aufgetragen werden. In Bildern werden Intensitäten einzelner Pixel in Abhängigkeit der Raumkoordinaten dargestellt. Die Intensität I [W/m²] gibt die Strahlungsleistung auf einer bestimmten Fläche A an:

$$I = \frac{P}{A} \quad (2.3)$$

Die Intensität wird häufig, wie auch in dieser Arbeit, in willkürlichen Einheiten (engl.: arbitrary units, a.u.) angegeben. In der UV-VIS-Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie wird die Intensität meist in Abhängigkeit der Wellenlänge λ [nm] aufgetragen. In der Vibrationspektroskopie, zu der neben Raman- die IR-Spektroskopie gezählt wird, sind dagegen relative Wellenzahlen in Abhängigkeit des angeregten Lichtes $\Delta\bar{\nu}$ [cm⁻¹] üblich. Abbildung 2.1 zeigt beispielhaft den Zusammenhang der Angabe in (absoluten) Wellenlängen und relativen Wellenzahlen anhand einer typischen Raman-Bande bei 2850 cm⁻¹ und einer Anregung von 633 nm im elektromagnetischen Spektrum auf. Die Angabe in relativen Wellenzahlen hat den Vorteil, dass sie direkt proportional zur Energie der Molekülschwingung ist.

Im Folgenden werden die, in dieser Arbeit, angewandten Wechselwirkungsprozesse von Licht und Materie genauer erläutert. Die Theorie wird nur soweit erklärt, dass sie eine Interpretation der in dieser Arbeit dargestellten Spektren und Bilder ermöglicht. So wird z. B. nicht näher auf die Polarisation des Lichtes eingegangen, da diese in den Anwendungen nicht untersucht wurde. Insbesondere der CARS und SERS Prozess für sich genommen weist eine so hohe Komplexität auf, dass eine umfassende Erklärung der Theorie, siehe z. B. [9] und [7], den Rahmen dieser auf Anwendung fokussierten Arbeit sprengen würde. Auf eine Herleitung der dargestellten Gleichungen wird daher verzichtet. Es werden nur Gleichungen gezeigt, die zum Verständnis beitragen und insbesondere die Beziehung der einzelnen optischen Prozesse zueinander aufzeigen. Die unterschiedlichen Interaktionen eines Moleküls mit Licht werden zudem über vereinfachte Jablonski-Diagramme illustriert.

2.2 Transmission, Absorption, Resonanz und Streuung

Eine Probe wird mit Licht der Intensität I_0 bestrahlt. Ein Teil der Photonen wird „ausgelöscht“. Dieser Prozess wird als Extinktion bezeichnet. Dies kann durch eine Energieumwandlung durch Absorption (I_{Abs}) oder durch eine Richtungsänderung des Lichtes durch Streuung (I_{Streu}), Reflexion (I_{Ref}) oder Beugung (I_{Beug}) hervorgerufen werden. Transmission (I_{Trans}) beschreibt den Prozess bei dem Photonen ohne Wechselwirkung die Probe passieren. Aus dem Energieerhaltungsgesetz ergibt sich [7]:¹

$$I_0 = I_{Abs} + I_{Streu} + I_{Ref} + I_{Beug} + I_{Trans} \quad (2.4)$$

Abbildung 2.2 stellt die Wechselwirkungsprozesse Absorption und Streuung für zwei Fälle gegenüber. Im ersten Fall, dem Resonanz-Fall, entspricht die Energie eines Photons einem elektronischen Übergang des Moleküls. Es findet eine Absorption statt, bei der Elektronen von einem Grundzustand in einen angeregten Zustand übergehen. Diese Übergänge finden typischerweise im UV Bereich ($\approx 200\text{ nm} - 400\text{ nm}$) für kleine Moleküle oder im sichtbaren Bereich für Farbstoffe ($\approx 400\text{ nm} - 800\text{ nm}$) statt [7]. Im zweiten Fall weicht die Energie des Lichtes deutlich von der Energie des elektronischen Überganges ab (keine Resonanz). Es findet keine Absorption statt. Das Molekül ist in dem Bereich transparent (hohe Transmission). Bei kleinen „farblosen“ Molekülen wäre dies beispielsweise im sichtbaren Bereich der Fall.

Streuprozesse finden in beiden Fällen statt. Hierbei wird Licht aus der ursprünglichen Ausbreitungsrichtung herausgestreut, was zu einer Intensitätsabnahme in Transmissionsrichtung führt. Streuprozesse finden an Molekülen oder Partikeln statt. Entspricht die Energie des

¹ Die Beugungsphänomene spielen in dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle und werden daher im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Die Reflexion, also gleichgerichtete, kohärente Streuung, wird ausschließlich in Abschnitt 5.3 für die Charakterisierung eines SERS-Substrates genutzt und hier daher auch nicht weiter behandelt.

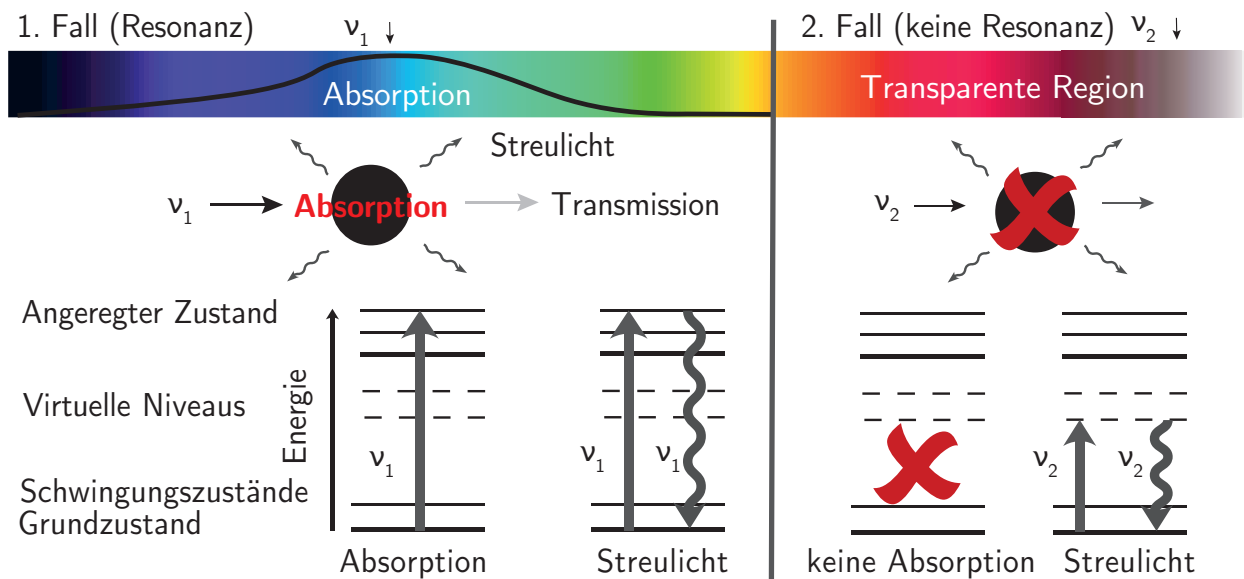


Abbildung 2.2: **Energieschema des Absorptions- und Streu-Prozesses im Resonanz- und Nichtresonanz-Fall.** Im Resonanz-Fall findet die Absorption eines Photons statt. Ein Elektron wird von einem Grundzustand (unterster Schwingungszustand bei Raumtemperatur) in einen angeregten Zustand angeregt. Im Nichtresonanz-Fall findet keine Absorption statt. Streulicht-Prozesse finden in beiden Fällen statt. Sie erfordern keinen elektronischen Übergang, sondern finden über virtuelle Niveaus statt. Die Transmission kann sich sowohl durch Absorption (Energieumwandlung) als auch durch Streuprozesse (Richtungsänderung des Lichtes) verringern.

gestreuten Lichtes, der Energie des einfallenden Lichtes wird von elastischer Streuung gesprochen. Findet bei dem Streuprozess eine Energieänderung des Lichtes statt, handelt es sich um eine inelastische Streuung. In der Abbildung wird die elastische Streuung an einem Molekül verdeutlicht. Dieser Prozess wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet und findet durch Anhebung des Moleküls auf ein virtuelles Niveau statt. Aus dieser Darstellung wird ein fundamentaler Unterschied zur Absorption bzw. darauf aufbauende Prozesse deutlich (siehe Fluoreszenz, Abschnitt 2.3), welcher auch für den inelastischen Fall der Raman-Streuung Gültigkeit hat (siehe Abschnitt 2.4): Während Absorption bzw. darauf aufbauende Prozesse Resonanzphänomene sind und für den elektronischen Übergang Licht definierter Wellenlänge erfordern, sind Rayleigh- bzw. Raman-Streuung nicht auf einen elektronischen Übergang angewiesen (siehe Fall 2). Ein virtuelles Niveau kann bei beliebiger Strahlung erreicht werden. Die Raman-Spektroskopie kann somit auch bei einer Laseranregung im transparenten Regionen durchgeführt werden, bei denen keine Absorption oder Fluoreszenz auftritt. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Intensität der Rayleigh- bzw. Raman-Streuung mit der Energie des einfallenden Lichtes deutlich zunimmt. Es gilt folgende Beziehung:

$$I_{\text{Streu}} \sim \frac{1}{\lambda^4} \quad (2.5)$$

2.3 (Zwei-Photonen)-Fluoreszenz

In Abbildung 2.3 wird die Fluoreszenz und Zwei-Photonen-Fluoreszenz in einem Molekül visualisiert. Fluoreszenz-Erscheinungen erfordern zunächst die Anregung des Moleküls durch Lichtabsorption. Namensgebend für die Zwei-Photonen-Fluoreszenz ist die gleichzeitige Absorption zweier Photonen. Diese Zwei-Photonen-Absorption wird den nicht-linearen optischen Prozessen zugeordnet, die nur mit Hilfe von hochenergetisch gepulster Laser auftreten (siehe auch CARS, Abschnitt 2.5). Die hohe Photonendichte gewährleistet die gleichzeitige Wechselwirkung des Moleküls mit zwei Photonen. Die Energie der beiden Photonen entspricht der halben Energie des Photons der Ein-Photonen Absorption [10]. Nach erfolgter Anregung des Moleküls und strahlungsloser Energieabgabe durch Stoßprozesse als Wärme an die Umgebung, geht das Elektron in den untersten Schwingungszustand des elektrisch angeregten Zustandes über. Das Molekül verbleibt für eine gewisse Zeit in diesem Zustand und gibt dann weitere Energie in Form eines Photons ab, wobei es in einen beliebigen Schwingungszustand des Grundzustandes übergeht. Fluoreszenz ist eine spontane Emission, die nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auftritt und zu einer Emission in jeder Richtung führen kann [7].

Im Ein-Photonen-Fluoreszenz Fall weist die Energie des emittierten Photons eine geringere Energie als die des einfallenden Photons auf. Fluoreszenz ist gegenüber dem angeregten Licht zu längeren Wellenlängen (in Richtung rot) verschoben. Nach dem Entdecker wird eine solche Rotlichtverschiebung auch als Stokes-Verschiebung bezeichnet [10]. Im Zwei-Photonen Fluoreszenz-Fall ist das emittierte Licht zu höheren Energien verschoben, also blaulichtverschoben. Man spricht von einer anti-Stokes-Verschiebung. Fluoreszenzspektren spiegeln ähnlich den Absorptionsspektren die elektronischen und Schwingungsniveaus des Moleküls wider [7]. In Fluorophoren erfolgt der Fluoreszenzübergang in einer sehr dichten Folge von Energieniveaus [10]. Daher sind Fluoreszenzspektren sehr breitbandig. Die Effizienz der Anregung bei der Zwei-Photonenfluoreszenz hängt aufgrund der Zwei-Photonenwechselwirkung quadratisch von der Intensität des Lichtes ab [10]. Die Anregung ist in der Mikroskopie daher auf eine extrem kleine Umgebung des Fokuspunktes beschränkt, was eine Aufnahme von scharfen Bildern bei gleichzeitiger reduzierter Probenschädigung durch Anregungslicht, sogenanntes Photobleaching, ermöglicht (siehe auch Abschnitt 3.2). Zusätzlich nimmt aufgrund der Anregung bei längeren Wellenlängen nach Gleichung 2.5 die Lichtstreuung deutlich ab, sodass auch dickere Objekte untersucht werden können.

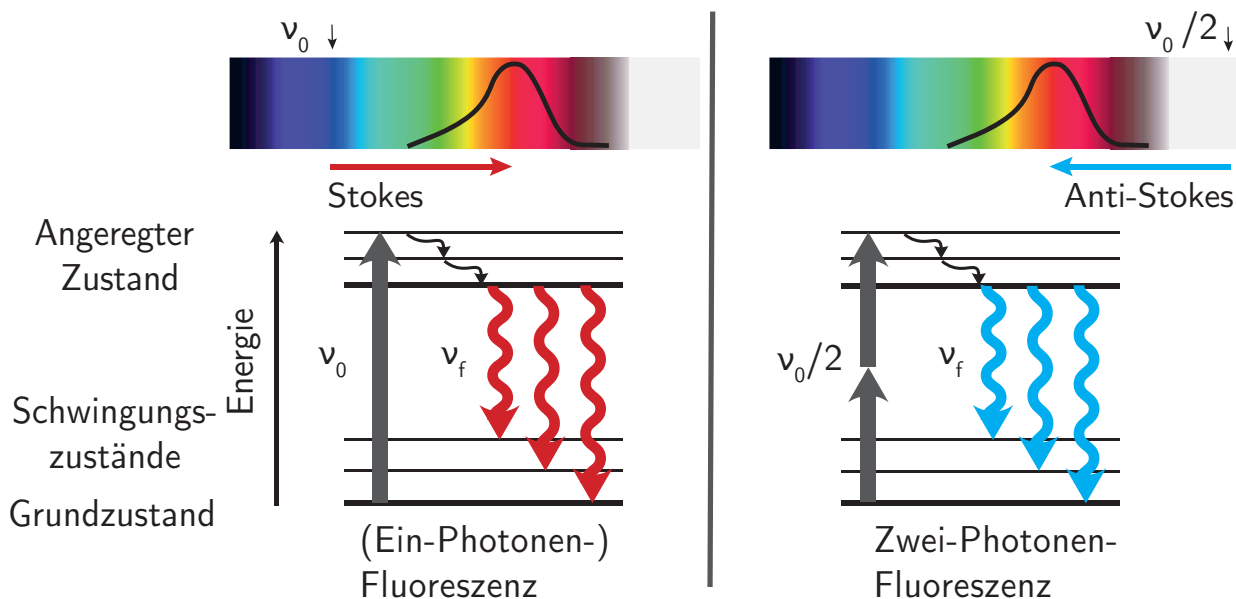


Abbildung 2.3: **Energieschema der (Zwei-Photonen-)Fluoreszenz.** Im ersten Schritt erfolgt Anregung des Moleküls durch (Zwei-Photonen-)Absorption. Das angeregte Elektron relaxiert in den untersten Schwingungszustand des angeregten Zustands unter Wärmeabgabe. Fluoreszenzemission führt zu Relaxation in die Schwingungszustände des Grundzustandes. Dies führt zur Emission von Stokes verschobener breitbandiger (Ein-Photonen-) Fluoreszenz bzw. anti-Stokes verschobener breitbandiger Zwei-Photonen-Fluoreszenz.

2.4 Spontane Raman-Streuung

Ein Molekül wird einem oszillierenden elektrischen Feld \vec{E} monochromatischem Lichtes der Frequenz ν_0 ausgesetzt:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.6)$$

Durch das äußere elektrische Feld wird ein oszillierendes elektrisches Dipolmoment \vec{p} im Molekül induziert. Die Schwingungsfrequenz des elektrischen Dipolmoments entspricht dabei vornehmlich der des eingestrahelten Lichts ν_0 . Rayleigh-Streuung tritt auf. Das Ausmaß des elektrischen Dipolmoments ist bei moderater Bestrahlung linear zum äußeren elektrischen Feld \vec{E} :

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} \quad (2.7)$$

Die Polarisierbarkeit α ist ein Maß für die Verschiebbarkeit der Ladungen im Molekül durch ein äußeres elektrisches Feld. Farbstoffe gehören z. B. aufgrund der delokalisierten, also leicht verschiebbaren π -Elektronen, zu den leicht polarisierbaren Molekülen und haben ein großes α [7]. Etwa eins von 10^6 gestreuter Photonen erfährt durch einen Störprozess eine Energieabnahme bzw. Energiezunahme, was als Stokes bzw. anti-Stokes Raman-Streuung bezeichnet

wird. Ursache für diese Störung sind Bewegungen der Atome im Molekül, die z. B. durch molekulare Schwingungen hervorgerufen werden. Diese verändern die Ladungsverteilung und somit die Polarisierbarkeit des Moleküls. Eine einzelne Molekülschwingung k mit der Frequenz ν_k bewirkt vom statischen Fall α_0 ausgehend somit eine Änderung der Polarisierbarkeit bezüglich einer bestimmten Verschiebung der Atome innerhalb des Moleküls, beschrieben über die Normalkoordinaten q_k^0 [11]:

$$\alpha_k = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_k} \right)_0 q_k^0 \cos(2\pi\nu_k t) \quad (2.8)$$

Einsetzen von Gleichung 2.6 und 2.8 in Gleichung 2.7 ergibt dann:

$$\vec{p}_k = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_k} \right)_0 q_k^0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cdot \cos(2\pi\nu_k t) \quad (2.9)$$

Durch Umformen ergeben sich dann drei Terme, die die Rayleigh-, Stokes Raman- bzw. anti-Stokes Raman-Streuung beschreiben:

$$\vec{p}_k = \underbrace{\alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)}_{\text{Rayleigh}} + \frac{1}{2} \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_k} \right)_0 q_k^0 \vec{E}_0 \left[\underbrace{\cos(2\pi(\nu_0 - \nu_k)t)}_{\text{Stokes Raman}} + \underbrace{\cos(2\pi(\nu_0 + \nu_k)t)}_{\text{anti-Stokes Raman}} \right] \quad (2.10)$$

Hieraus ergibt sich der typische Aufbau eines Raman-Spektrums (siehe Abbildung 2.4 b): Im Zentrum erscheint ein Rayleigh-Signal bei ν_0 , rotlichtverschoben bei $\nu_s = \nu_0 - \nu_k$ das Stokes Raman-Signal der Molekülschwingung k und blaulichtverschoben das entsprechende anti-Stokes Raman-Signal $\nu_{as} = \nu_0 + \nu_k$. Die Intensitäten einzelner Raman-Banden in einem Spektrum werden durch diesen klassischen elektrodynamischen Ansatz jedoch nicht erklärt [7]. Dies und insbesondere das Auftreten von Resonanz-Raman erfordert einen quantenmechanischen Ansatz. Die Kernaussagen dieses Ansatzes werden in Abbildung 2.4 visualisiert. Übergänge erfolgen über virtuelle Niveaus. Anti-Stokes Raman-Signale treten nur bei vorab schwingungsangeregten Molekülen auf. Die meisten Moleküle befinden sich bei Raumtemperatur jedoch im nicht schwingungsangeregten Grundzustand. Stokes-Banden sind daher viel intensiver als die anti-Stokes-Banden [7]. Raman-Banden werden daher gewöhnlich auf der Stokes-Seite detektiert. Auf Stokes-Seite können jedoch je nach Anregung und chemischer Zusammensetzung störende Fluoreszenzbanden auftreten. Erfolgt bei Anregung ein elektronischer Übergang, so kommt es zum Resonanz-Raman-Effekt (vergl. Abschnitt 2.2). Durch die erhöhte Energieaufnahme des Moleküls sind Resonanz-Raman-Signale intensiver. Die Intensitätszunahme beschränkt sich aber nur auf die chromophoren Gruppen des Moleküls.¹

¹ Resonanz-Raman-Spektren von Olivenölen zeigen beispielsweise intensive Raman-Banden des II -Systems von Carotinoiden. Die Hauptbestandteile des Olivenöls, die Fettsäuren, zeigen dagegen nur schwache Signale (siehe Abbildung A.1).

Die schwache Signalausbeute des Raman-Effekts schränkt den Einsatz sowohl als bildgebendes Verfahren als auch als sensitive Spektroskopie-Methode ein. Einen Ausweg bilden die auf den Raman-Effekt basierende signalverstärkenden Methoden wie CARS und SERS, auf die in den folgenden beiden Abschnitten näher eingegangen wird.

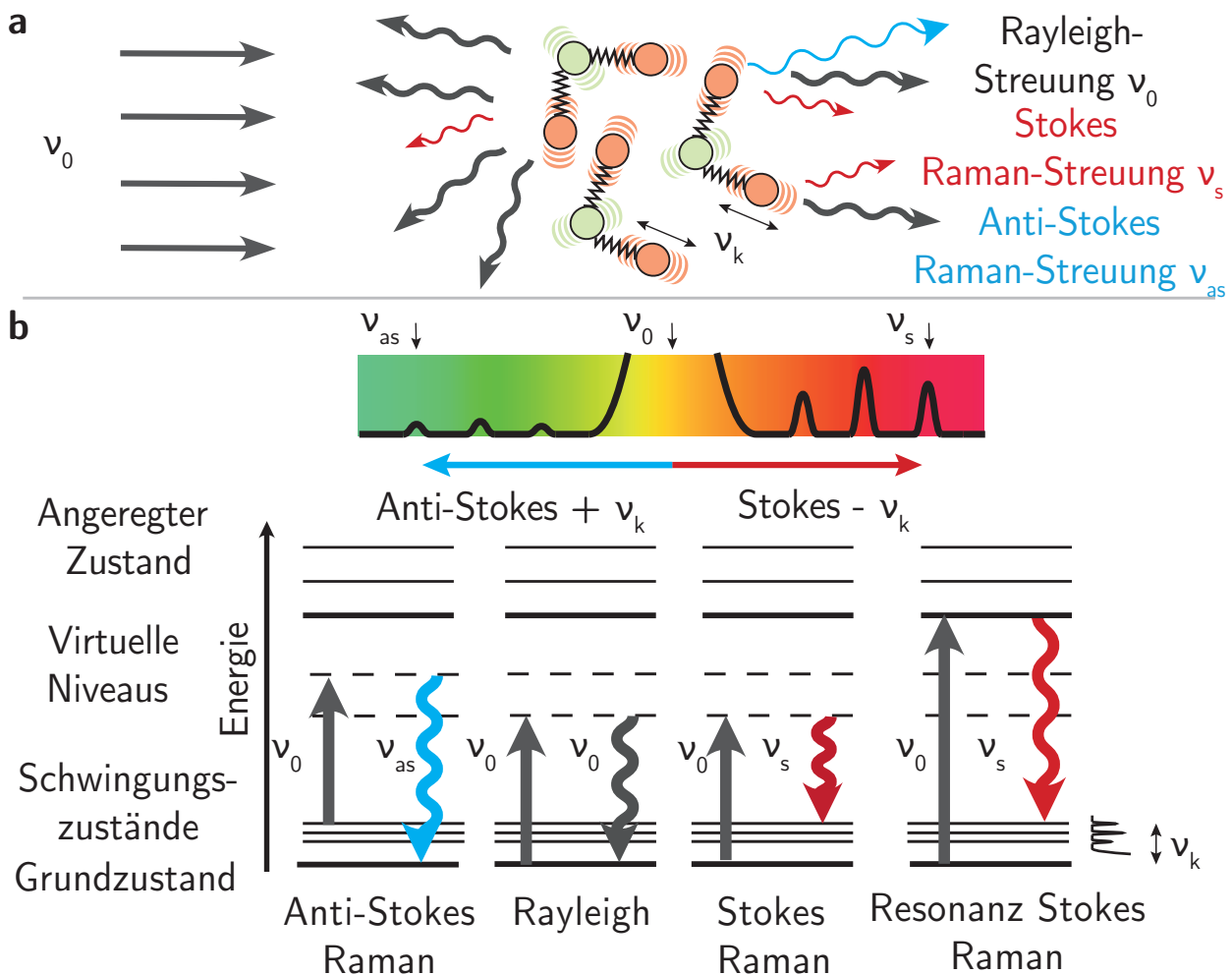


Abbildung 2.4: **Visualisierung der Rayleigh- und spontanen Raman-Streuung.** (a) Der Raman-Effekt basiert auf molekularen Schwingungen und induziert eine Energieänderung bei einem von etwa 10^6 gestreuter Photonen (Illustration angelehnt an [12]). (b) Übergänge erfolgen über virtuelle Niveaus. Entspricht die Energie des gestreuten Lichts der Energie des Anregungslichts, so spricht man von Rayleigh-Streuung. Bei der Stokes-Raman-Streuung geht Energie auf das Molekül über. Es erfolgt ein Übergang vom untersten Schwingungszustand des Grundzustands in einen höheren Schwingungszustand des Grundzustands. Die Raman-Bande des entsprechenden Schwingungsniveaus ist rotlichtverschoben. Bei der anti-Stokes Raman-Streuung befindet sich das Molekül bereits in einem höheren Schwingungszustand. Die Energie geht auf das Streulicht über. Die Raman-Bande des entsprechenden Schwingungsniveaus ist blaulichtverschoben. Im Resonanz-Raman-Fall erfolgt Raman-Streuung über einen elektrischer Übergang (hier nur für Stokes-Raman-Streuung gezeigt).

2.5 Kohärente anti-Stokes Raman-Streuung (CARS)

Die kohärente anti-Stokes Raman-Streuung (engl.: coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) erfordert wie die Zwei-Photonen-Fluoreszenz eine gleichzeitige Wechselwirkung mehrerer Photonen mit der Probe und wird entsprechend den nichtlinearen optischen Prozessen zugeordnet (vergl. Abschnitt 2.3, Zwei-Photonen-Fluoreszenz) [9]. Übergeordnet werden diese Prozesse daher auch als Multi-Photonen-Prozesse bezeichnet und erfordern den Einsatz gepulster Laser. Bei hohen Feldstärken ist der lineare Zusammenhang eines induzierten Dipolmoments in einem Molekül und einem äußeren elektrischen Feld (siehe Gleichung 2.9) nicht mehr gegeben und erfordert eine Erweiterung der Gleichung 2.9 um nichtlineare Terme. Diese sind viel kleiner und machen sich daher nur bei hohen Feldstärken bemerkbar [13]. Makroskopisch betrachtet, also bei Betrachtung eines mittleren elektrischen Dipolmoments mehrerer Moleküle, ergibt sich dann folgende Gleichung für die Polarisation¹ [13]:

$$\vec{P} = \chi^{(1)}\vec{E} + \underbrace{\chi^{(2)}\vec{E}\vec{E} + \chi^{(3)}\vec{E}\vec{E}\vec{E}}_{\text{nichtlineare Terme}} \quad \text{mit } \chi^{(1)} \gg \chi^{(2)} \gg \chi^{(3)} \quad (2.11)$$

Die Proportionalitätskonstante $\chi^{(1-3)}$ ist die elektrische Suszeptibilität erster, zweiter und dritter Ordnung. Der CARS-Prozess ist ein $\chi^{(3)}$ -Prozess, da die Anregung auf drei elektrischen Feldern beruht (siehe Abbildung 2.5 a)². In Abbildung 2.5 b wird der sogenannte Vier-Wellen-Misch-Prozess visualisiert. Den CARS-Prozess kann man sich als eine Kombination eines Schwingungsanregungsprozesses und einer anti-Stokes-Streuung vorstellen. Im ersten Schritt bringen ein Pump- und Stokes-Laser die Moleküle auf ein angeregtes Schwingungsniveau. Die Wellenlänge des Pump-Lasers ist durchstimmbare und wird so eingestellt, dass die Differenz der Energien beider Laser genau dem Schwingungsniveau entsprechen. Im zweiten Schritt hebt ein Probe-Laser, meist identisch dem Pump-Laser, das schwingungsangeregte Elektron auf ein höheres virtuelles Niveau gefolgt von der Emission des CARS-Signals. Die Prozesse erfolgen zeitgleich. Im Unterschied zur Raman-Spektroskopie wird bei dieser Art von (Narrowband-)CARS pro Messung nur eine einzige Raman-Bande erfasst. Um eine spektrale Auflösung zu erhalten, müssen mehrere Messungen bei schrittweiser Veränderung der Pump-Laserwellenlänge erfolgen. Die Intensität des CARS-Signals ist mit $I_{CARS}(\nu_{as}) = |\vec{P}^{(3)}(\nu_{as})|^2$ von unterschiedlichen Faktoren abhängig [14]:

¹ Mikroskopische Betrachtung für einen einzelnen molekularen Dipol: $\vec{p} = \alpha\vec{E} + \frac{1}{2}\beta\vec{E}\vec{E} + \frac{1}{6}\gamma\vec{E}\vec{E}\vec{E}$ mit Polarisierbarkeit α , Hyperpolarisierbarkeit β und zweite Hyperpolarisierbarkeit γ

² Absorption, Fluoreszenz und Rayleigh- bzw. Raman-Streuung sind entsprechend $\chi^{(1)}$ -Prozesse und die Zwei-Photonen-Fluoreszenz ein $\chi^{(2)}$ -Prozess

$$I_{CARS}(\nu_{as}) \sim \underbrace{\left| \sum_M N_M \chi_M^{(3)} \right|^2}_{\substack{\text{Wechselwirkung} \\ \text{Molekültyp M}}} I_P^2 I_S \underbrace{\left[\frac{\sin(\Delta \vec{k} l / 2\pi)}{\Delta \vec{k} l / 2\pi} \right]^2}_{\text{sinc}^2(\Delta \vec{k} l / 2\pi)} \quad (2.12)$$

Aus der Gleichung ist zunächst zu erkennen, dass die CARS-Signalintensität quadratisch mit der Signalintensität des Pump-Lasers I_P und linear mit der Signalintensität des Stokes-Lasers I_S ansteigt. Um ein maximales CARS-Signal zu generieren, müssen weiterhin der Pump und Stokes unter einem bestimmten Winkel eingestrahlt werden, um über einen bestimmten räumlichen Bereich konstruktiv zu interferieren. Dies ist auf eine wellenlängenabhängige Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes in einer Probe zurückzuführen und kommt in Gleichung 2.12 im Phasenanpassungsterm $\text{sinc}^2(\Delta \vec{k} l / 2\pi)$ mit der Phasenfehlpassung $\Delta \vec{k}$ und Wechselwirkungslänge l zum Ausdruck. Der Term wird maximal, wenn die Phasenanpassungsbedingung zwischen den Wellenvektoren des Pump \vec{k}_P , Stokes \vec{k}_S und CARS-Signals \vec{k}_{as} erfüllt ist [13, 15–17]:

$$\Delta \vec{k} = 2\vec{k}_P - \vec{k}_S - \vec{k}_{as} = 0 \quad (2.13)$$

Abbildung 2.5 c verdeutlicht die Beziehung in einer vektoriellen Skizze und zeigt den Zusammenhang der Phasenfehlpassung $\Delta \vec{k}$ zum CARS-Signal nach Gleichung 2.12 auf. Das CARS-Signal fällt mit zunehmender Phasenfehlpassung $\Delta \vec{k}$ mit dem Quadrat der sinc-Funktion steil ab. Ein ausgeprägtes CARS-Signal wird somit nur in Vorwärtsrichtung generiert (engl.: Forward-CARS, F-CARS). In der CARS-Mikroskopie wird die Phasenanpassungsbedingung basierend auf der Arbeit von Zumbusch et al. [15] im Jahre 1999 meist durch eine kollineare Anregungsgeometrie mit anschließender Lichtfokussierung realisiert. Die starke Fokussierung des kollinearen Lichts mittels eines Mikroskopobjektivs hoher numerischer Apertur hat zur Folge, dass der Pump- und Stokes-Laserstrahl in alle möglichen Winkeln auf den fokussierten Bereich trifft (siehe Abbildung 2.5 a). Gleichung 2.13 ist erfüllt, da es somit zu jedem Winkel des Pump-Laser einen passenden Winkel des Stokes-Laser gibt [13]. Aufgrund der Fokussierung wird zudem die im Term $\text{sinc}^2(\Delta \vec{k} l / 2\pi)$ enthaltene Wechselwirkungslänge l als Maß für das Streuvolumen so klein, dass sich geringfügige Phasenfehlpassungen bei der Signalgenerierung nur wenig zu tragen kommen [13, 16]. Aus Gleichung 2.12 ist weiterhin ersichtlich, dass das CARS-Signal quadratisch von der Anzahl der Moleküle N bzw. der Molekülkonzentration abhängt. Dies ist mit der Kohärenz des anti-Stokes-Signals begründet¹. Die Amplitude des CARS-Signals muss man sich dafür als Summe der Amplituden aller kohärenten Wellen einzelner Moleküle vorstellen (konstruktive Interferenz) [12]. Da die Intensität quadratisch zur Amplitude ist, steigt somit die CARS-Intensität quadratisch mit der

¹ inkohärenter Prozess (z. B. Absorption, Fluoreszenz, Raman): $I_{ges} = N \vec{E}^2 = NI$
kohärenter Prozess (z. B. CARS): $I_{ges} = (N \vec{E})^2 = N^2 I$
(Definition der Kohärenz, siehe Fussnote auf Seite 7) [16]

Molekülkonzentration an. Der Nachweis niedriger Konzentrationen ist erschwert [13]. Durch die Quadrierung des Wechselwirkungsterms aus Gleichung 2.12 wird zudem die Bestimmung der Zusammensetzung einzelner Bestandteile eines Gemisches ($M > 1$) erschwert. Für ein Gemisch aus zwei Molekülen ergibt sich z. B. folgender Zusammenhang:

$$I_{CARS}(\nu_{as}) \sim |N_1\chi_1^{(3)} + N_2\chi_2^{(3)}|^2 = |N_1\chi_1^{(3)}|^2 + 2N_1\chi_1^{(3)}N_2\chi_2^{(3)} + |N_2\chi_2^{(3)}|^2 \quad (2.14)$$

Durch Anwendung der binomischen Formel ergeben sich Mischterme. Die Identifizierung beispielsweise der relativen Anteile der beiden Moleküle ist mittels linearer Auswertemethoden nicht mehr direkt zugänglich.

Ein zentraler Begriff der CARS-Literatur ist der nichtresonante Hintergrund, der sich aus der Suszeptibilität dritter Ordnung $\chi^{(3)}$ ergibt. Dieser bestimmt die Bandenform eines CARS-Spektrums und ist letztendlich der entscheidende Faktor für die Sensitivität des CARS-Prozesses wie im Folgenden näher erläutert wird [13].

2.5.1 Die Suszeptibilität dritter Ordnung und der nichtresonante Hintergrund

Die Suszeptibilität $\chi_M^{(3)}$ quantifiziert die Effizienz nichtlinearer Vier-Wellen-Mischprozesse eines Moleküls des Typs M. Neben dem schwingungsresonanten Fall (R), dem eigentlichen CARS-Prozess, kommen noch nichtresonante (NR) und elektronisch resonante Vier-Wellen-Misch-Prozesse (EL) hinzu. Die Effizienz der einzelnen Prozesse wird über die Suszeptibilität des resonanten Teils $\chi_{M,R}^{(3)}$, des nichtresonanten Teils $\chi_{M,NR}^{(3)}$ und des elektronischen Teils $\chi_{M,EL}^{(3)}$ bestimmt:

$$\chi_M^{(3)} = \chi_{M,R}^{(3)} + \chi_{M,NR}^{(3)} + \chi_{M,EL}^{(3)} \quad (2.15)$$

In Abbildung 2.5d wird ein nichtresonanter Vier-Wellen-Mischprozess gezeigt. Der Prozess erfolgt ohne Beteiligung einer molekularen Schwingungsresonanz oder elektrischen Resonanz [17, 18] (siehe Abbildung 2.5d). Es wird somit ein anregungsunabhängiges Signal generiert, welches den schwingungsresonanten Teil überlagert. In komplexen biologischen Proben kann dieser nichtresonante Hintergrund, aufgrund der Fülle unterschiedlicher molekularer Spezies deutlich zum CARS-Signal beitragen und das schwingungsresonante Signal ganz überdecken [14]. Letztendlich ist er daher der limitierende Faktor für die Sensitivität des CARS-Prozesses [13]. Weiterhin schränkt er die meisten CARS Anwendungen auf den CH- und OH-Streckschwingungsbereich ein, da die intensiven Signale dort weniger vom nichtresonanten Hintergrund überdeckt werden als in der Fingerprint-Region [19].¹ Ein wichtiges Forschungs-

¹ Die CH-Streckschwingungen zeigen meist eine Überlagerung von vier Hauptpeaks im Bereich 2850 cm^{-1} ($\nu_{CH_2,sym}$), 2880 cm^{-1} ($\nu_{CH_2,asym}$), 2920 cm^{-1} ($\nu_{CH_3,sym}$) und 2960 cm^{-1} ($\nu_{CH_3,asym}$). Weniger intensive

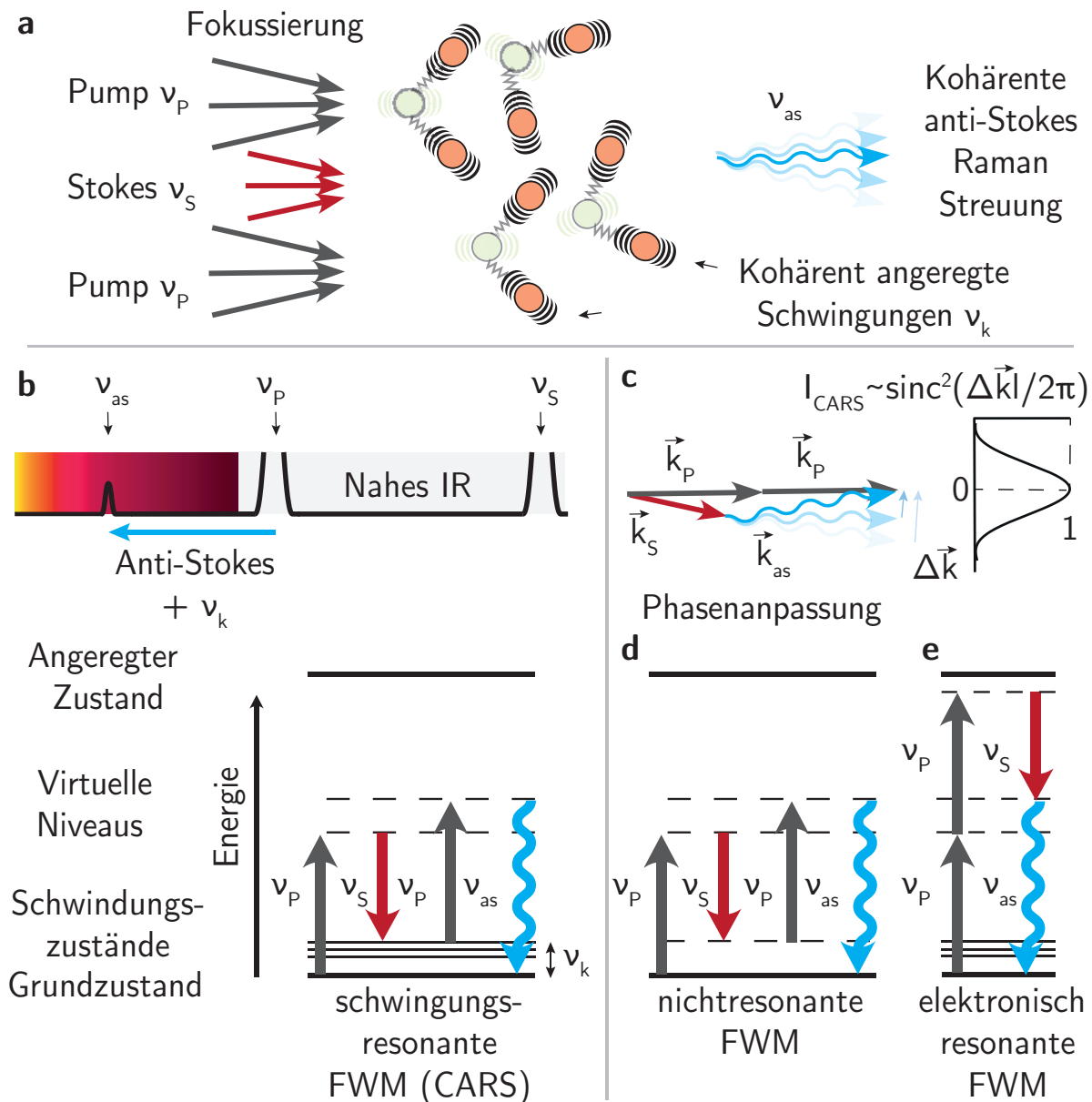


Abbildung 2.5: **Visualisierung der kohärenten anti-Stokes Raman-Streuung (CARS).** (a) Beim CARS-Prozess erfolgt anti-Stokes Raman-Streuung einer kohärent angeregten Schwingung eines Ensembles von Molekülen. Zur Anregung werden ein fokussierter Pump ν_P , Stokes ν_S und Probe (hier: Pump ν_P) kohärent überlagert. Der Energieunterschied zwischen Pump und Stokes entspricht dabei der angeregten Molekülschwingung $\nu_P - \nu_S = \nu_k$ (Illustration angelehnt an [12]). (b) Der CARS-Prozess ist eine schwingungsresonante Vier-Wellen-Mischung (Four-Wave-Mixing, FWM). Die spezifische Schwingungsanregung eines Moleküls erfolgt durch Überlagerung eines Pump und Stokes-Photons (hier im Nahen-IR Bereich). Anregung durch ein weiteres Photon des Pump-Lasers führt zur Generierung des blauverschobenen CARS-Signals (hier im roten VIS-Bereich). (c) Ein maximales CARS-Signal wird nur durch die Phasenanpassungsbedingung der Wellenvektoren mit $2\vec{k}_P - \vec{k}_S - \vec{k}_{as} = \Delta\vec{k} = 0$ erreicht [13, 15–17]. Bei zunehmender Phasenfehlanpassung $\Delta\vec{k}$ fällt die Signalintensität mit dem Quadrat der sinc-Funktion steil ab, woraus ein gerichtetes CARS-Signal resultiert. (d) Nichtresonante Vier-Wellen-Mischung. (e) Elektronisch resonante Vier-Wellen-Mischung.

feld im CARS-Bereich stellt daher die Unterdrückung des nichtresonanten Hintergrundes dar [14]. In früheren CARS-Systemen bei der die Anregung im VIS-Bereich erfolgte, führte zudem der nichtresonante Hintergrund, der durch einen elektronisch resonanten Vier-Wellen-Mischungsprozess generiert wird, zu erheblichen Problemen [13, 17] (siehe Abbildung 2.5e). Durch Anregung im IR-Bereich kann dieser Beitrag jedoch vernachlässigt werden [21], sodass nur noch der nichtresonante Mischungsprozess zum nichtresonanten Hintergrund beiträgt. Auf die dadurch hervorgerufene Verzerrung des CARS-Spektrums wird im folgenden näher eingegangen. Der resonante Teil ist im Unterschied zu dem nichtresonanten Teil eine komplexe Größe und setzt sich aus einem Realteil $Re(\chi_{M,R}^{(3)})$ und Imaginärteil $Im(\chi_{M,R}^{(3)})$ zusammen. Durch Einfügen und Quadrieren des Suszeptibilitäts-Terms aus Gleichung 2.15 in Gleichung 2.12 wird folgende Wechselwirkungsbeziehung zwischen dem resonanten und nichtresonanten Teil ersichtlich [13, 22]:

$$I_{CARS} \sim |\chi_{M,R}^{(3)}|^2 + 2Re(\chi_{M,R}^{(3)})\chi_{M,NR}^{(3)} + |\chi_{M,NR}^{(3)}|^2 \quad (2.16)$$

Die CARS-Signalintensität setzt sich additiv aus einem resonanten Teil, einem nichtresonanten Teil und einem Mischterm zusammen, der sich aus der binomischen Formel ergibt [17]. Abbildung 2.6a veranschaulicht die Beiträge der einzelnen Terme aus Gleichung 2.16 für ein simuliertes CARS-Signal bei 3000 cm^{-1} . Die zugrundeliegenden Gleichungen können dem Anhang entnommen werden (siehe Abschnitt A.1.1 [17]). Aus der Separierung in die einzelnen Beiträge wird ersichtlich, dass der Mischterm $2Re(\chi_R^{(3)})\chi_{NR}^{(3)}$ für die verzerrte Linienform eines CARS-Signals verantwortlich ist [13]. Die eigentliche molekülschwingungsspezifische Information ist in dem Term $|\chi_R^{(3)}|^2$ enthalten. Der Intensitätsverlauf folgt einer Lorentzkurve und entspricht dem des spontanem Raman Spektrums, während der Mischterm und nichtresonante Anteil ein dispersives bzw. konstanten Verlauf im Spektrum zeigt. Das CARS-Spektrum ist gegenüber einem Raman-Signal aufgrund der Überlagerung einer Lorentzkurve mit der dispersiven Kurve rotlichtverschoben und fällt zu größeren relativen Wellenzahlen stärker ab, was als „Dip“ bezeichnet wird [15, 17]. Da der Imaginärteil des resonanten Anteils nicht mit dem nichtresonanten Anteil überlagert, werden Algorithmen angewandt, die den imaginären Anteil aus einem Spektrum extrahieren können, was als „Phase Retrieval“ bezeichnet wird (siehe Abschnitt 4.1.1). Abbildung 2.6b stellt ein CARS-Spektrum und Raman-Spektrum der Ölsäure gegenüber. Der Vergleich verdeutlicht den Einfluss des „Dips“ auf ein reales CARS-Spektrum. Die Intensitäten der vom Hauptpeak blaulichtverschobenen CARS-Signale bei 2914 cm^{-1} , 2946 cm^{-1} und 3021 cm^{-1} sind gegenüber den entsprechenden Raman-Banden deutlich reduziert. Das Hauptsignal bei 2861 cm^{-1} ist gegenüber dem entsprechenden Raman-Signal jedoch entgegen der Theorie blaulichtverschoben. Kombiniert man Gleichung 2.14 und

Banden treten bei 3008 cm^{-1} (ν_{CH}) und 3060 cm^{-1} ($\nu_{CH,Aromat}$) auf. Die breite Resonanz zwischen 3000 cm^{-1} und 3600 cm^{-1} ist auf ν_{OH} von Wasser zurückzuführen [20]. In dieser Arbeit werden CARS-Spektren in erster Linie als Fingerprints angesehen. Auf eine Interpretation und Benennung einzelner Signale wird daher weitestgehend verzichtet.

2.15 für ein Gemisch aus einem Analyten und Lösungsmittel, so kann unter der Annahme, dass ausschließlich der Analyt ein resonantes CARS-Signal generiert und das Lösungsmittel ausschließlich für den nichtresonanten Hintergrund verantwortlich ist, gezeigt werden, dass bei niedrigen Analytkonzentrationen eine lineare Abhängigkeit zwischen CARS-Signalintensität und Analytkonzentration besteht (siehe Abschnitt A.1.2) [13, 23].

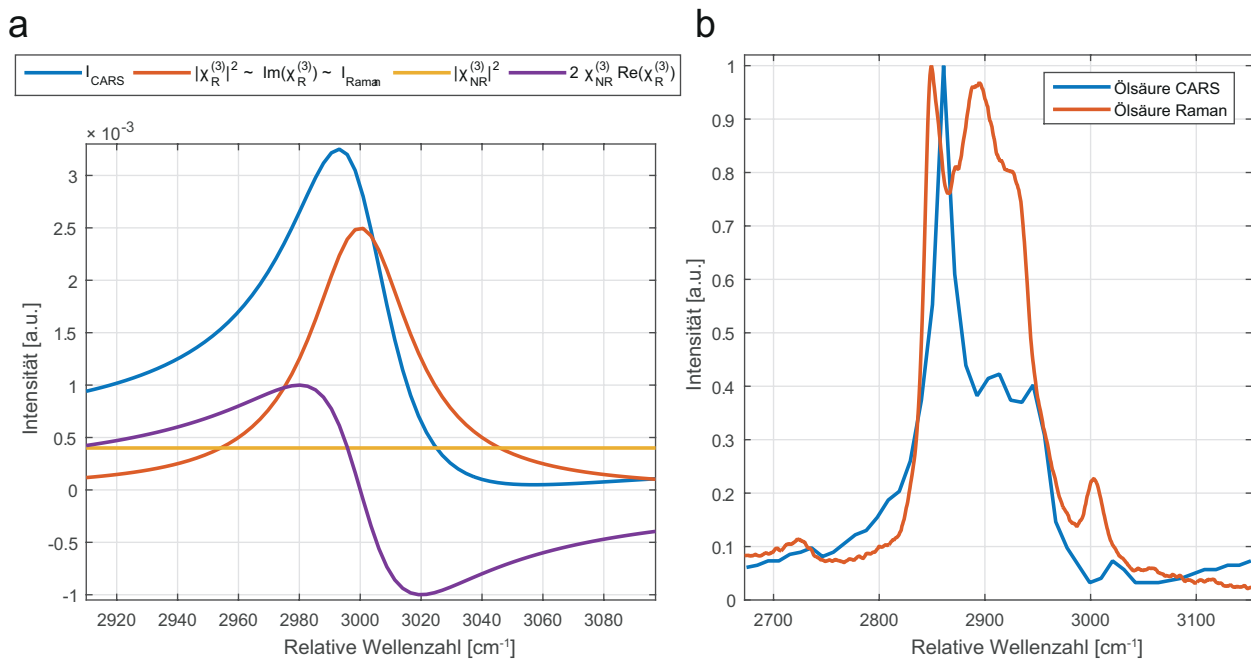


Abbildung 2.6: **Die Bandenform von CARS-Spektren.** (a) Bandenform einer simulierten CARS-Linie der CARS-Signale $I_{CARS}^{(3)}$ und der zugehörigen Beiträge des resonanten Teils $|\chi_R^{(3)}|^2$ und nicht resonanten Teils $|\chi_{NR}^{(3)}|^2$ und des Mischterms $2\text{Re}(\chi_R^{(3)})\chi_{NR}^{(3)}$. Die Bandenformen wurde nach Gleichung A.3 berechnet mit Amplitude $A_k=1$, Wellenzahl $\bar{\nu}_k = 3000 \text{ cm}^{-1}$ und Halbwertsbreite $\Gamma_k = 20 \text{ cm}^{-1}$. (b) Vergleich eines CARS und Raman-Spektrums von Ölsäure mit Maxima bei 2861 cm^{-1} und 2849 cm^{-1} . Die CARS-Spektrallinien zeigen gegenüber den Raman-Spektrallinien auf der blau verschobenen Seite eine reduzierte Signalintensität, was als „Dip“ bezeichnet wird und auf die destruktive Interferenz des resonanten CARS-Signals mit dem nichtresonanten Hintergrund zurückzuführen ist [15, 17] (Raman-Spektrum ist vergleichbar mit [24]).

2.6 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)

Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (engl.: surface-enhanced Raman scattering, SERS) beruht vorwiegend auf der elektromagnetischen Verstärkung eines elektrischen Feldes an der Oberfläche nanostrukturierter Silber- oder Goldmaterialien, im folgenden SERS-Substrat genannt [7, 25]. Die Nanostrukturen verhalten sich bei Einstrahlung von elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge in der Größe der Struktur wie optische Nanoantennen [26]. Die freien äußeren Elektronen des Metalls werden dabei lokal kollektiv zum Oszillieren gebracht, sogenannte lokalisierte Oberflächenplasmonen, was zu einer Verstärkung des eingestrahnten Lichts führt, sofern die Oszillation senkrecht zur Oberfläche des Materials stattfindet.¹ Dies ist bei rauen Oberflächen der Fall, weshalb diese bei SERS-Experimenten eingesetzt werden. Im Resonanzfall ist diese Verstärkung am größten, da die Frequenz des eingestrahnten Lichts dann mit der Plasmonenfrequenz übereinstimmt (engl.: localised surface plasmon resonance, LSPR, siehe Abbildung 2.7 a). Voraussetzung für die Verstärkung des Raman-Signals des Analyten ist, dass dieser adsorbiert oder sich zumindest in der Nähe der Oberfläche aufhält, da die elektromagnetische Verstärkung exponentiell zur Distanz vom Substrat abnimmt [25]. Die enorme Signalverstärkung bei SERS beruht auf einer doppelten Verstärkung des Signals (siehe Abbildung 2.7 b). Zunächst wird das eingestrahlte Laserlicht durch Plasmonenanregung verstärkt, welches dann auf den in der Nähe befindlichen Analyt trifft und zu einer ersten Erhöhung der Raman-Signalintensität führt. Dieses verstärkte Raman-Signal trifft dann wiederum auf die Oberfläche und wird so erneut verstärkt, was in der Literatur auch als E^4 -Verstärkung bezeichnet wird. Eine maximale elektromagnetische Verstärkung wird in der Regel bestimmt, wenn sich der Analyt in sehr kleinen Nanolücken < 10 nm, sogenannten Hot Spots, befindet. Diese Hot Spots führen zu einer enormen Sensitivität bis hin zu einer Einzelmoleküldetektion, haben jedoch auch eine schlechte Reproduzierbarkeit des SERS-Experimentes zu Folge, was zu einer Reihe von unterschiedlichen Strategien in der SERS-Substratentwicklung geführt hat (siehe Abschnitt 2.6.1).

Eine weitere Verstärkung von Raman-Signalen tritt aufgrund einer sogenannten chemischen Verstärkung auf. Sie beruht auf einer Bildung von Charge-Transfer-Komplexen zwischen dem adsorbierten Analyten und dem SERS-Substrat und hat eine Erhöhung der Polarisierbarkeit α einzelner Bindungen und damit Verstärkung der entsprechenden Raman-Banden zur Folge (siehe Gleichung 2.7 und Abbildung 2.7 c).

Die Einzelmoleküldetektierbarkeit wird im Bereich der SERS-Substratentwicklung meist mittels Farbstoffe z. B. Rhodamin 6G [27] oder Kristallviolett [28] als Modellanalyt aufgezeigt [29]. Die Laseranregung wird dabei so gewählt, dass es zu einer hohen Absorption des Lichts im Chromophor kommt, was zum Resonanz-Raman-Effekt (siehe Abschnitt

¹ Strenggenommen basiert die elektromagnetische Verstärkung auf lokalisierten Oberflächenplasmon-Polaritonen [7]. In der SERS-Literatur wird jedoch meist vereinfacht von lokalisierten Oberflächenplasmonen gesprochen.

2.2) und in Kombination mit SERS zu einer zusätzlichen Verstärkung führt. Dies wird als oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Streuung bezeichnet (engl.: surface-enhanced resonance Raman scattering, SERRS). Die Sensitivität ist letztendlich immer auf einem Zusammenspiel von Analyt, der chemischen Umgebung, dem SERS-Substrat und der Art des Lichts abhängig. Eine zentrale Rolle hat das SERS-Substrat, auf das im folgendem Abschnitt näher eingegangen wird. Darauf folgt eine Beschreibung zweier störender Phänomene, die immer bzw. oftmals ein SERS-Spektrum bestimmen, jedoch meist nie weiter eingehend betrachtet werden: Der SERS-Hintergrund und die Karbonisierung.

2.6.1 Sensitivität versus Reproduzierbarkeit von SERS-Substraten

Das Potential zum Einzelmolekülnachweis mittels SERS wurde erstmals mittels herkömmlicher Silbernanopartikelaggregate aufgezeigt [27, 28]. Die Einbettung des Analyten innerhalb der Nanolücken zweier agglomerierter Nanopartikel, dem Hot Spot, führt dabei zu der extremen Verstärkung. Aufgrund der Erschwinglichkeit und einfachen Herstellung¹ sind diese „Bottom-Up“ SERS-Substrate in der Analytik bis hin zur Anwendung als gelabelte und ungelabelte Biosensoren (in der nicht agglomerierten Form) innerhalb biologischer Systeme weit verbreitet [32] und können sogar, wie in dieser Arbeit innerhalb von Mikrofluidiksystemen optimiert und angewandt, gezielt lokal im Mikrometermaßstab laserinduziert hergestellt und immobilisiert werden [33–38] (siehe Abschnitt 5.4).

Diese zufällig strukturierten SERS-Substrate zeigen jedoch eine geringe Signalreproduzierbarkeit aufgrund morphologischer Variationen in der Größe, Form und Lückendistanz der Hot Spots [39, 40] und einer nichteinheitlichen Verteilung des Analyten innerhalb dieser Lücken [39]. Dies führte zur Entwicklung homogenerer „Nahfeld“-Substrate basierend auf lithografisch „Top-Down“ hergestellten periodischen Nanostrukturen, die eine reproduzierbare Detektion ermöglichen sollten [39, 41, 42]. Die breiteren Hot Spots innerhalb dieser Substrate liefern in den meisten Fällen jedoch nur moderate Signalintensitäten [41].² Entsprechend einer „SERS-Unbestimmtheitsrelation“ kann ein SERS-Substrat entweder über eine hohe Sensitivität oder über eine hohe Reproduzierbarkeit verfügen, jedoch nicht über beides [44]. In der angewandten Forschung sind jedoch beide Faktoren wichtig. Reproduzierbarkeit ist insbesondere in der quantitativen und Multiplexing-Komponenten-Analyse ein wichtiger Faktor, da fluktuierende Signale eine Bestimmung des Molekültyps und deren Menge erschweren. Eine hohe Sensitivität ist in der Spurenstoffanalytik erforderlich, z. B. in der Forensik, und

¹ Die Herstellung von Silber- bzw. Goldnanopartikeln erfolgt meist mittels der Methode nach Lee und Meisel [30] bzw. nach Turkevich [31] mittels Citrat als Reduktionsmittel und Stabilisator. Die anschließende Aggregation erfolgt meist mittels einer salzhaltigen Analyt-Lösung (z. B. NaCl).

² „Top-Down“ hergestellte SERS-Substrate gehören nicht zwangsläufig zu den homogenen SERS-Substraten mit moderater Signalintensität. Je nach Herstellungsverfahren können auch eher randomisierte Strukturen erzeugt werden, die von den Eigenschaften eher den „Bottom-Up“ SERS-Substraten ähneln. In dieser Arbeit wird beispielsweise ein kommerzielles „High Performance“ Gold Substrat, laut Herstellerangaben hoher Sensitivität aber geringer Reproduzierbarkeit untersucht [43] (siehe Abschnitt 5.3).

letztendlich entscheidend, um auch eine Detektion von Analyten geringer Streuquerschnitte oder schlecht absorbierende Spezies mit signifikanter Sensitivität zu ermöglichen. Tatsächlich ist die molekulare Universalität - also die Detektierbarkeit einer Vielzahl unterschiedlichster Moleküle, eines der herausforderndsten „Bottlenecks“ der SERS-Analytik, aufgrund geringer Streuquerschnitte und/oder SERS-Substrat-Affinitäten vieler Moleküle [25]. Ein großes Thema in der Forschung und Entwicklung von SERS-Substraten ist es daher, eine Balance zwischen Reproduzierbarkeit und Sensitivität zu finden.

2.6.2 Methoden zur Charakterisierung von SERS-Substraten und Durchführung von SERS-Experimenten

Die Optimierung von SERS-Substraten hinsichtlich Sensitivität und Reproduzierbarkeit ist auf hoch entwickelte Bildgebungsmethoden angewiesen. In der Grundlagenforschung ist die Charakterisierung eines SERS-Substrates der erste wichtige Schritt zum Verständnis der SERS-Signale in diesen Systemen [7]. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) gibt direkten Einblick in die Form und Größe der Nanostruktur [7], liefert jedoch keine spatiale Information der optischen Eigenschaften z. B. der Hot-Spot Verteilung im Substrat. Da die Größe eines Hot Spots (1 nm–10 nm) weit unterhalb des optischen Diffraktionslimits liegt [45], werden optische Charakterisierungsmethoden von SERS-Substraten strikt in Nah- und Fernfeld-optische Methoden unterteilt. Nahfeld-optische Methoden ermöglichen die elektromagnetische Feldverstärkung oder einzelner verstärkter Raman-Banden eines einzigen Hot Spots im Nanomaßstab abzubilden und sind in der Grundlagenforschung daher wichtige Werkzeuge, um beispielsweise den Ursprung des SERS-Effektes zu untersuchen [46–50]. Aufgrund des hohen Geräteaufwands und geringen Vielseitigkeit finden diese Methoden jedoch wenig Anwendung in der angewandten analytischen SERS-Forschung.

Konventionelle SERS-Experimente werden meist mittels Fernfeld-optischer Methoden durchgeführt. Ein Sub-Wellenlängen Hot Spot erscheint hier als ein diffraktionslimitierter Punkt im Bild. In der Raman-Mirospektroskopie werden gemittelte diffraktionslimitierte hyperspektrale Bilder der verstärkten Signale erfasst. Diese Methode ist grundsätzlich dazu geeignet, die Reproduzierbarkeit der spektralen Intensität und Form eines SERS-Substrates zu charakterisieren. Aufgrund der erforderlichen langen Aufnahmezeiten erfolgt der Scanvorgang dabei für gewöhnlich durch langsames, aber präzises Stage-Scanning. Die Methode ist daher jedoch eher ungeeignet große Bereiche des Substrates abzuscannen. Super-Resolution Imaging stellt eine Methode dar, das Diffraktionslimit mittels herkömmlicher Fernfeld-Optiken zu umgehen [45]. Einzelne Moleküle können in einem Hot Spot mit einer Auflösung < 5 nm aufgelöst werden. Jedoch basiert die Methode auf dem sogenannten „Blinking“-Effekt, nimmt eine Einzelmolekülaufenthalt im Hot Spot an und ist daher wenig praxistauglich.

2.6.3 Der SERS-Hintergrund

Abbildung 2.7d zeigt schematisch ein SERS-Spektrum, welches sich im wesentlichen durch einen breitbandigen Hintergrund von einem Raman-Spektrum unterscheidet. Seit den Anfängen der SERS-Forschung ist dieser SERS Kontinuum-Hintergrund, im Folgenden nur noch SERS-Hintergrund (engl.: SERS-Background, SERS-BG) genannt, ein bekanntes Phänomen, das immer in Verbindung mit dem SERS-Effekt auftritt [51], jedoch in den meisten Fällen ignoriert und durch Baseline-Fitting entfernt wird [52]. Der Ursprung des SERS-BG ist nach wie vor umstritten und vermutlich das Resultat verschiedener Beiträge wie Photolumineszenz durch Interband-Übergänge [53–56], Intraband-Übergänge [55, 57, 58] oder Raman-Streuung [59, 60] des Metalls, Molekülkontaminationen oder Kopplung gespiegelter Moleküle innerhalb des Metalls zum Realmolekül [61, 62]. Beiträge chemischer Verstärkung des SERS-BG durch Charge-Transfer Resonanzen an der Metall-Molekül Grenzfläche werden ebenfalls diskutiert [51]. Umstritten ist insbesondere der Einfluss adsorbierter Moleküle auf die SERS-Hintergrund Generierung. Im Folgenden werden zunächst die wesentlichen Mechanismen der SERS-Hintergrund Generierung beschrieben, die ausschließlich aus dem SERS-Substrat herrühren und ohne eine Wechselwirkung mit einem Adsorbaten vorliegen können, z. B. im Hochvakuum. Da der SERS-Hintergrund wie auch die SERS Signalgenerierung selber auf einer LSPR-Verstärkung basiert, wird im Anschluss noch kurz auf spezifische Effekte durch LSPR-modulierte Verstärkung eingegangen. Darauf aufbauend wird auf die Literatur eingegangen, die einen Einfluss adsorbierter Moleküle auf die SERS-Hintergrund Generierung beobachten konnten und daraus Modelle ableiteten.

2.6.3.1 Mechanismen der SERS-Hintergrund Generierung im SERS-Substrat

Abbildung 2.7e stellt die drei wesentlichen in der Literatur diskutierten Mechanismen für die SERS-BG Generierung eines SERS-Substrates in einer vereinfachten Bandstruktur eines Substrates gegenüber [58].¹ Bei einer Anregung im sichtbaren Bereich kann es zu einem Interband-Übergang eines Elektrons vom d-Band in das sp-Band und Bildung eines Loches im d-Band und anschließender (strahlungsloser) Relaxation des Elektrons zurück in das d-Band kommen. Ein Teil der Energie wird dabei in Form von Photolumineszenz abgegeben. In glatten Metalloberflächen wurde diese Phänomen erstmals 1969 jedoch mit geringer Photonen ausbeute nachgewiesen, da ein Großteil der Energie strahlungslos abgegeben wird [64]. Sehr viel höhere Photonen ausbeuten wurden dagegen von Boyd et al. [65] mittels nanostruk-

¹ Während die elektronischen Zustände in einem einzelnen Molekül mittels des Jablonski-Diagramms dargestellt werden, werden die elektronischen Eigenschaften von Festkörpern periodischer Struktur aus Atomrümpfen und Elektronen meist mittels eines Bändermodells beschrieben. Dieses fasst geringe Energieunterschiede von Elektronen als Kontinuum zu einem Band zusammen und verdeutlicht beispielsweise den Unterschied zwischen Metallen, Isolatoren und Halbleitern [63]. Die Bandstruktur wird in einem Diagramm der Energie der Elektronen in Abhängigkeit des Wellenvektor k dargestellt und verdeutlicht beispielsweise einen Übergang eines Elektrons von einem Band in ein anderes (Interband-Übergang) oder innerhalb eines Bandes (Intraband-Übergang) durch z. B. Absorption eines Photons.

turierter Metalloberflächen erzielt, welche ähnlich dem SERS-Effekt auf eine Verstärkung der Photolumineszenz durch lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz zurückgeführt wird und als Ursache für die Generierung des SERS-Hintergrunds bei Anregung im sichtbaren Bereich angesehen wird. Interband-Übergänge in Goldsubstraten bzw. Silbersubstraten erfordern eine Anregung bei mindestens 689 nm (1,8 eV) [54, 55] bzw. 318 nm (3,9 eV) [58]. Das Auftreten von SERS-Hintergrund bei Anregungen kleiner dieser Energien beispielsweise bei Anregung eines Goldsubstrates im IR-Bereich kann dadurch somit nicht erklärt werden [55, 58]. Die Photolumineszenz wird hier auf Intraband-Übergänge von Elektronen im sp-Band mit anschließender Rekombination des Elektronen-Loch-Paares zurückgeführt. Der dritte Mechanismus bestreitet das Vorliegen einer echten „Photolumineszenz“ (sowohl durch Interband- als auch Intraband-Übergänge) und geht von einer plasmonen-verstärkenden elektronischen Raman-Streuung (ERS) im sp-Band aus. Im Unterschied zur Photolumineszenz ist die Anregung der Elektronen des Bandes unabhängig von der gewählten Wellenlänge und erfolgt über virtuelle Niveaus, gefolgt von einer unmittelbaren Emission des breitbandigen SERS-Hintergrundes. Mit Erhöhung der Temperatur konnten erhöhte SERS-Hintergrund Signale auf der Anti-Stokes-Seite nachgewiesen werden, was für einen Raman-Streuprozess spricht [59]. Der Prozess ähnelt damit dem SERS-Prozess eines Analyten mit dem Unterschied, dass hier eine plasmonen-verstärkte Anregung eines elektronischen Kontinuums im Metall erfolgt und nicht eine Anregung einzelner diskreter Schwingungsbanden des Analyten [60]. Wie in Abbildung 2.7 f dargestellt, erfordert die Relaxation angeregter Elektronen auf ein niedrigeres Energielevel im Band eine Änderung des Wellenvektors $\Delta \vec{k}$ [59, 60]. Beim ERS-Mechanismus wird davon ausgegangen, dass diese Richtungsänderung der Elektronen durch Plasmonen induziert wird und als inverse Bremsstrahlungskollision zwischen Elektronen und Plasmonen bezeichnet wird [60]. Bei der Intraband-Photolumineszenz muss diese Richtungsänderung hingegen durch das Anregungslicht vorgegeben werden, sodass der Prozess als unwahrscheinlicher angesehen wird [59, 60].

2.6.3.2 LSPR-Verstärkung des SERS-Hintergrundes

Akzeptiert ist unabhängig von der Natur des SERS-BG, dass der LSPR in SERS-Substraten eine zentrale Rolle bei der SERS-BG Generierung zukommt [66, 67]. Cai et al. beschreiben die Kopplung des zugrundeliegenden Mechanismus für die SERS-Hintergrund Generierung in Gold Nanorods und der LSPR-basierten Verstärkung beispielsweise mittels des Purcell Effektes [55, 56]. Die Plasmonenresonanz stellt hierbei eine Art Resonator dar, in der sich die Emissionsquelle befindet und erhöht somit die Photonenabgabe und bestimmt somit letztendlich die Form des Emissionsspektrums. Da die Streulichteeffizienz ebenfalls durch die LSPR Verstärkung moduliert wird, zeigen Streulichtspektren bei Dunkelfeldbeleuchtung mit einer Lampe, und die SERS-Hintergrund Spektren, ermittelt durch Laser-Einzelwellenanregung eine Korrelation wie in mehreren Publikationen aufgezeigt wurde, [52, 58, 60, 68]. Wie in Abbildung 2.8 a gezeigt wird, kann eine Variation des SERS-Hintergrundes aufgrund der

LSPR-Modulation auch Einfluss auf die Intensitätsverhältnisse von Spektralbanden eines Analyten nehmen, was als plasmonischer Spektralform-Effekt bezeichnet wird [52].

2.6.3.3 Einfluss adsorbierter Moleküle auf den SERS-Hintergrund

Ein wichtiges und in dieser Arbeit angewandtes Phänomen des SERS-Hintergrundes ist eine oftmals festgestellte Korrelation zwischen Analytbandenintensität und der Intensität des zugrundeliegenden SERS-Hintergrundes in einem Spektrum [61, 69–71]. Eine solche Korrelation, ermittelt beispielsweise durch Mehrfachmessungen an unterschiedlichen Orten eines heterogenen SERS-Substrates [70, 71], kann durch die in gleicherweise LSPR-modulierte Verstärkung der Analytbanden und des SERS-Hintergrundes erklärt werden [61]. Eine Erhöhung des SERS-Hintergrundes mit zunehmender Bedeckung des SERS-Substrates bei konstanter LSPR-Verstärkung ist dadurch jedoch nicht erklärbar. Das Molekül selber muss somit ebenfalls Einfluss auf den SERS-Hintergrund nehmen, woraus ein Reihe weiterer Modelle entwickelt wurden. Mahajan et al. [61] untersuchten den SERS-Hintergrund in Abhängigkeit des Bedeckungsgrades unterschiedlicher para-substituierter Benzenethiole. Adsorption eines Thiols mit elektronenziehenden Gruppen (p-Nitrobenzenethiol) führte zu einer monotonen Zunahme der Analytbandenintensität und des SERS-Hintergrundes. Eine anschließende Verdrängung durch ein Thiol mit elektronenschiebender Gruppe (p-Methoxybenzenethiol) führte dagegen zu einer monotonen Abnahme des SERS-Hintergrundes. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der SERS-Hintergrund sowohl von der elektronischen Struktur des Moleküls, der sich daraus ergebenden Interaktion mit dem Metall und dem Bedeckungsgrad abhängt [61]. Aus diesen Beobachtungen wurde ein Modell basierend auf der Kopplung eines gespiegelten Moleküls mit dem elektronischen Kontinuum des Metalls abgeleitet [61, 62]. Cheng et al. [72] leiteten aus Blinking-Experimenten, also den enormen Signalfuktuationen von Analytbanden und damit einhergehenden Fluktuationen des SERS-Hintergrundes in Hot Spots, ein Modell ab, was ebenfalls die Wechselwirkung adsorbierter Moleküle und dem SERS-Substrat auf die SERS-Hintergrund Generierung im Hot Spot berücksichtigt. Eine wesentliche Schlussfolgerung ist, dass das Molekül aufgrund der enormen Signalverstärkung in Hot Spots selber ein ausgeprägtes elektrisches Feld induziert, welches das lokale elektrische Feld im Hot Spot bestimmt und somit einen bedeutenden Einfluss auf das Ausmaß der SERS-Hintergrund Generierung im Hot Spot hat [72].

2.6.4 Die Karbonisierung

Ein häufiges Phänomen in SERS-Experimenten ist ein plötzlicher extremer Intensitätsanstieg zweier spektraler breiter Bänder um 1350 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} [73] (siehe Abbildung 2.8b). Tsang et al. beobachteten dieses Phänomen auf Silberelektroden und wiesen als erster nach, dass es sich um amorphen Kohlenstoff handelt [73]. Dieses D- und G-Band des amorphen Kohlenstoffs wird meist mit Verunreinigungen [74] und/oder photophysikalischen

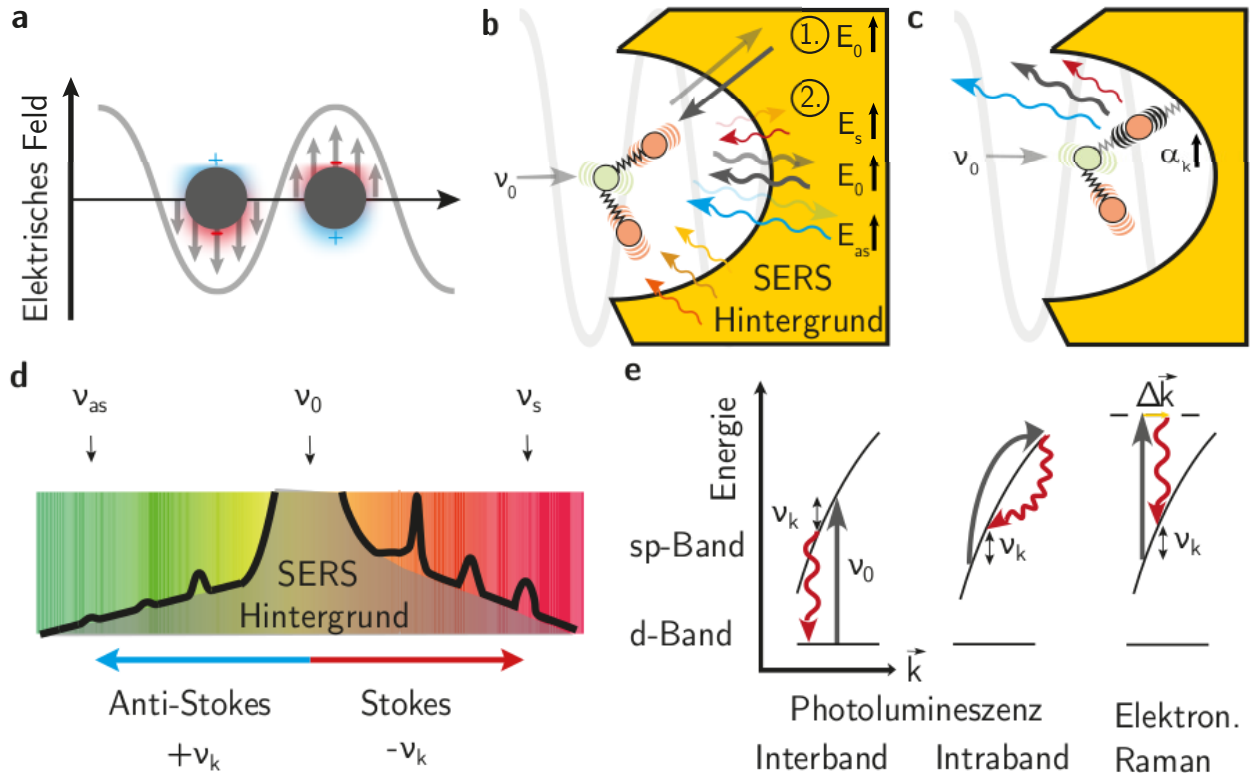


Abbildung 2.7: **Visualisierung der Oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS)**. (a) Lokalierte Oberflächenplasmonenresonanz in einem Nanopartikel. (b) Elektromagnetische Verstärkung. Der Analyt befindet sich in Nähe einer Silber- oder Gold-Nanolücke. Oberflächenverstärkung eingestrahlichten Lichtes einer Wellenlänge größer der Nanostruktur führt zu einer Zunahme des elektrischen Feldes E_0 . Ein Teil dieses elektrischen Feldes wird entsprechend dem Raman-Effekt in Stokes- und anti-Stokes-Signale umgewandelt. Die emittierte Stokes Raman-, Rayleigh- und anti-Stokes Raman-Streuung mit einem elektrischen Feld E_s , E_0 , E_{as} wird wiederrum oberflächenverstärkt. Zusätzlich tritt breitbandiger SERS-Hintergrund auf. (c) Chemische Verstärkung. Adsorption des Analyten an der Metalloberfläche führt zu einer Zunahme der Polarisierbarkeit α_k der entsprechenden Bande k und damit zu einer Zunahme des Ramanstreuquerschnittes. (d) SERS-Spektrum mit SERS-Hintergrund. (e) Mögliche Mechanismen zur SERS-Hintergrund-Generierung in SERS-Substraten. Photolumineszenz erfordert eine Inter- oder Intraband-Übergang von d- zum sp-Band bzw. innerhalb des sp-Bandes des Gold- oder Silbersubstrates. Ein dritter Mechanismus geht von einer inelastischen Lichtstreuung von Elektronen des sp-Bandes bzw. elektronischen Raman-Streuung (ERS) im Metall aus [60]. In allen Mechanismen ist zu der vertikalen Anregung ein Richtungsänderung des Wellenvektors $\Delta \vec{k}$ erforderlich [60].

Reaktionen des Analyten [75–79] in Verbindung gebracht. Bei sehr kurzen Aufnahmezeiten können anstelle der breiten Bänder auch sehr schmale, stark fluktuierende Bänder im Bereich 1000 cm^{-1} – 1700 cm^{-1} auftreten. Diese wurden bei Behandlung des SERS-Substrates mit CO [74], Tyrosin [76], 10,12-Pentacosadiynoicssäure [77] und Rhodamin 6G [79] beobachtet. Die spektralen Fluktuationen werden auf eine kontinuierlich fortgesetzte Oberflächenchemie von Kohlenstoffketten in Kombination mit einer extremen Verstärkung einzelner Kohlenstoffgruppen innerhalb von Hot Spots zurückgeführt [74]. Als möglicher Reaktionsmechanismus nichtresonanter aromatischer Moleküle wie Tyrosin wird die Bildung resonanter Metall-Molekül-Komplexe und anschließender Bildung einzelner, aber extrem SERRS-verstärkter chromophorer Gruppen vorgeschlagen [76]. Durch zwischenzeitliches Photobleaching unter Bildung nichtresonanter Gruppen sinkt das Signal wieder ab. Dies hat temporale und spektrale Fluktuationen zur Folge. Itoh et al. schlagen bezüglich der Konversion von 10,12-Pentacosadiynoicssäure zu amorphem Kohlenstoff die Bildung von Polyenen, Graphitplatten unterschiedlicher Größe und reorganisierter Strukturen wie Kohlenstoffnanotubes oder Fullere als Zwischenprodukt vor [77]. Ein karbonisierunginduziertes spektrales „Blinking“ kann insbesondere bei der Einzelmoleküldetektion mittels SERS oder TERS Probleme bereiten, da diese oftmals fälschlicherweise als Indikator für den Einzelmolekülnachweis angesehen werden [80, 81]. Um photoinduzierte Reaktionen zu vermeiden wird „Off-Resonanz“ SERS im nahen Infrarot, Kühlung durch Wasser oder Oberflächenbeschichtung vorgeschlagen [76].

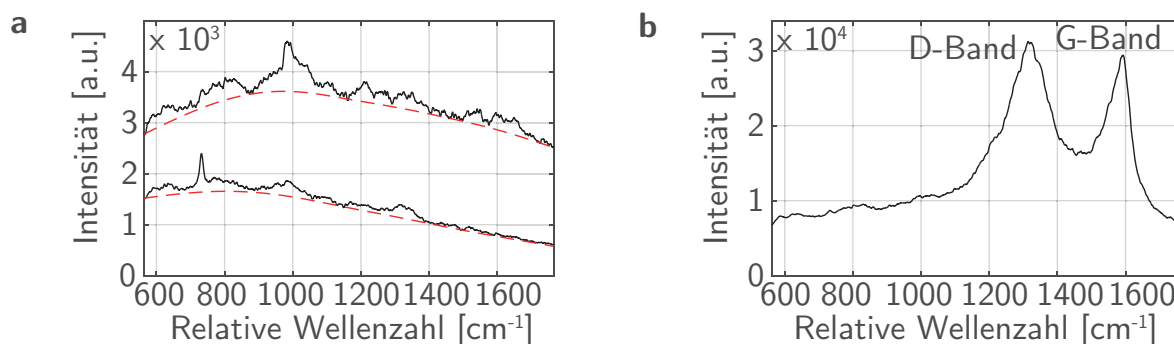


Abbildung 2.8: **Störende Phänomene in SERS-Spektren.** (a) Der plasmonische Spektralform-Effekt. Unterschiedliche lokalisierte Oberflächenresonanzen auf einem SERS-Substrat führen zu Variationen der Spektralform des SERS-Hintergrundes (rot gestrichelte Linien) und Anhebung von Banden im Bereich maximalen SERS-Hintergrundes. (b) Photoinduzierte Karbonisierung.

Kapitel 3

Das Leica TCS SP8 CARS

Dieses Kapitel liefert zunächst einen Überblick über den Aufbau des Leica TCS SP8 CARS. Darauf aufbauend werden in Abschnitt 3.2 die Unterschiede des Konfokal- und Multiphotonen-Modus erläutert. Im Anschluss wird ein allgemeiner Überblick über die wesentlichen Komponenten des Systems, also den Lasern als Lichtquelle, Objektiven zur Vergrößerung der Objektes und Detektoren zur Signalerfassung geliefert. Da in einer Anwendung dieser Arbeit hochauflösende Bilder im Bereich der Auflösungsgrenze des Lichts analysiert werden, die insbesondere durch das Objektiv bestimmt wird, erfolgt im Objektiv-Abschnitt 3.4 noch eine kurze Erläuterung wichtiger Gleichungen zu dem Thema. Insbesondere wird dabei auf den Einfluss der numerischen Apertur eingegangen, da diese zudem eine entscheidene Rolle bei der laserinduzierten Herstellung von SERS-Substraten spielt. Weitere Informationen zu spezifischeren Messeinstellungen z. B. von Filtereinstellungen werden in Fussnoten erläutert. Anwendungsspezifischere Informationen werden im Kapitel 5 in jeweiligen Methodenteil vertieft. Für eine ausführlichere Darstellung der wesentlichen Komponenten eines Konfokalmikroskops sei auf das hier vorwiegend zitierte Buch von Borlinghaus (Senior Scientist bei Leica Microsystems CMS) verwiesen [10].

3.1 Der Aufbau

Abbildung 3.1 a zeigt den Aufbau des Leica TCS SP8 CARS Mikroskops. Das inverse Mikroskop ist aus Laserschutzgründen und Aufrechterhaltung einer konstanten Umgebung in eine schwarzen Box eingebaut („The Box“ von Life Imaging Services GmbH).¹ Weiterhin befinden sich auf dem optischen Tisch der Scankopf, das CARS-Lasersystem picoEMERALD™ von APE und ein gekoppelter Spektrograph IsoPlane SCT-320 von Princeton Instruments. Unterhalb des Rechners, zur Steuerung des Mikroskops bzw. des Spektrographen, befinden sich Dauerstrich-VIS-Laser. Wie in Abbildung 3.1 b verdeutlicht wird, fokussiert der Laser

¹ Die Temperaturregulierung erfolgt mittels „The Cube“ und CO₂-Regulierung (für lebende Zellen) mittels „The Brick“, jeweils von Life Imaging Services GmbH.

von unten an die Probe. Die Detektion erfolgt auf Seiten der Probe in Reflektionsrichtung (EPI) oder Transmissionsrichtung (Forward, F). Abbildung 3.1 c zeigt das Innenleben des Scankopfes. Nach Einkopplung des CARS- bzw. der Dauerstrichlasers erfolgt eine Fokussierung des Laserstrahls mittels Objektiv auf die Probe. Reflektiertes Licht gelangt auf gleichem Wege wieder zurück in den Scankopf. Im Konfokal-Modus blockiert eine Lochblende emittiertes Licht außerhalb der Fokusebene. Es wird nur das Licht der Fokusebene durchgelassen (konfokal = den gleichen Fokus habend). Die Generierung konfokaler Fluoreszenzbilder erfolgt mittels der internen Fluoreszenzdetektoren. Weiterhin kann eine Auskopplung des Lichts in den Spektrographen zur Aufnahme einzelner Fluoreszenz- oder Raman-Spektren erfolgen. Multiphotonenaufnahmen erfolgen mittels der externen Non-Scanned Detektoren mit jeweils zwei Detektoren in EPI- und Forward-Richtung.

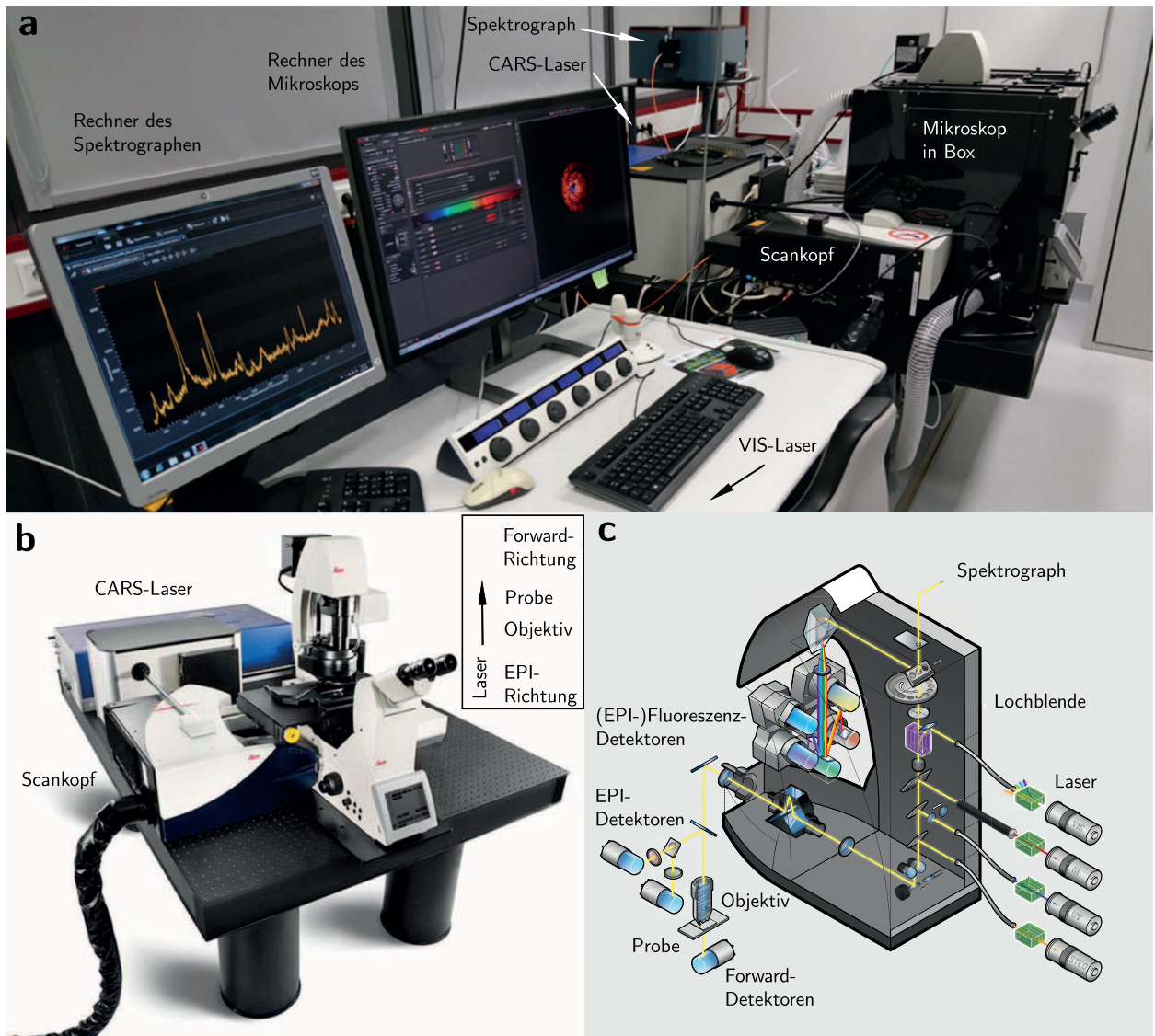


Abbildung 3.1: **Aufbau des Leica TCS SP8 CARS.** (a) Übersichtsbild des Aufbaus. Das Mikroskop befindet sich unter einer temperierbaren Box auf einem optischen Tisch. Links davon hochgebockt befindet sich der Spektrograph zur Aufnahme von Fluoreszenz-, Raman- oder SERS-Spektren. Da drunter befinden sich in der blauen Box die CARS-Laser. Vorn sind die Bildschirme zweier Rechner zu Steuerung des Mikroskops mit Bedienkonsole bzw. des Spektrographen zu sehen. Unterhalb des Tisches befinden sich die VIS-Laser. (b) Das Leica TCS SP8 CARS als inverses Mikroskop mit Scankopf und CARS-Laser. Laserlicht kommt von unten durch das Objektiv an die Probe. Abbildung aus [82]. (c) Aufbau des Scankopfes. Im Scankopf erfolgt die Einkopplung und Führung des Laserstrahls zur Probe. Reflektiertes Licht (EPI-Richtung) gelangt zurück in den Scankopf wird durch eine Lochblende von Licht außerhalb der Fokusebene bereinigt und mittels der internen Descanned-Fluoreszenzdetektoren (4 PMTs, 2 HyDs) oder des Spektrographen durch Lichtauskopplung detektiert. Außerhalb des Scankopfes nahe der Probe befinden sich weiterhin jeweils zwei externe Non-Descanned PMT-Detektoren in EPI- und Forward-Richtung für Multiphotonen- oder Transmissionsmessungen (Forward, nur einer eingezeichnet). Abbildung nach [83].

3.2 Der Konfokal- und Multiphotonen-Modus

In Abbildung 3.2 wird das Prinzip des Konfokal- und Multiphotonen-Modus visualisiert. Beide Prinzipien ermöglichen im Unterschied zur gewöhnlichen Weitfeld-Mikroskopie eine Generierung scharfer 2D- und 3D-Bilder durch xy- bzw. xyz-Laserscanning. Im Konfokal-Modus erfolgt sowohl eine Fokussierung des Beleuchtungspunktes als auch des Beobachtungspunktes [10]. Die Fokussierung des Beleuchtungspunktes wird durch eine Fokussierung des zuvor aufgeweiteten Laserstrahls mittels eines Objektivs realisiert. Mit zunehmendem Abstand zur Fokusebene nimmt die Intensität des Lichts innerhalb des erzeugten doppelkegelförmigen Gebietes aufgrund der Flächenzunahme in beide Richtungen quadratisch ab. Eine Bestrahlung und Lichtemission der Probe erfolgt somit, wenn auch mit niedrigerer Intensität auch außerhalb der Fokusebene. Um scharfe Bilder einer Ebene zu generieren muss daher zudem eine Fokussierung des Beobachtungspunktes erfolgen. Dies wird mittels einer Lochblende realisiert, die nur Licht des Brennpunktes nicht aber ober- und unterhalb davon durchlässt.¹ Im Leica Mikroskop ist die Lochblende den internen Detektoren und dem externen Spektrographen in EPI-Richtung vorgeschaltet.² Den Detektoren in Forward-Richtung ist dagegen keine Lochblende vorgeschaltet, da sie für den Multiphotonen-Modus konzipiert wurden. Im Konfokal-Modus werden sie bei EPI-Fluoreszenzmessungen als Beiwerk zugeschaltet, um so weniger scharfe, jedoch zur EPI-Fluoreszenz komplementäre Weitfeld-optische Transmissionsbilder zu generieren.

Im Multiphotonen-Modus wird die Generierung scharfer Bilder einer Ebene ausschließlich durch die Anregungsseite realisiert. Multi-Photonenprozesse wie die Zwei-Photonenfluoreszenz und CARS erfordern das gleichzeitige Auftreffen mehrerer Photonen und damit eine hohe Photonendichte an der interessierenden Stelle. Durch Fokussierung eines gepulsten Laser mittels Objektivs werden somit nur im stark fokussierten Bereich ausreichend hohe Photonendichten zur Generierung von Multiphotonenprozessen bereitgestellt. Da das Anregungslicht mit dem Quadrat vom Abstand der Fokusebene abnimmt und die Zweiphotonenfluoreszenz bzw. CARS (bzgl. des Pump) wiederum mit dem Quadrat des Anregungslicht einhergehen, nimmt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieser Prozesse mit der vierten Potenz vom

¹ Durchmesser der Lochblende: Der Durchmesser der Lochblende ist variabel in der Einheit „Airy Unit, AU“ meist jedoch auf 1 AU gesetzt. Die Einheit bezieht sich auf die sogenannte „Airy Disc“, den inneren Kreis eines diffraktionslimitierten Punktes und ist abhängig von der Wellenlänge und numerischen Apertur und/oder Vergrößerung des Objektivs [10]. Zur Generierung möglichst signalintensiver Raman- bzw. SERS-Spektren, jedoch geringerer Ortsauflösung, wird die Lochblende hier in einigen Anwendungen vollständig aufgedreht, sodass Licht aus einem größeren Bereich in z-Richtung erfasst wird (siehe auch Abschnitt 3.4).

² Die Strahlungsteilung: Da in EPI-Richtung Anregung und Messung auf der gleichen Seite der Probe realisiert werden (sogenanntes Auflichtmikroskop) müssen Anregungslicht und das rotlichtverschobene Emissionslicht (Fluoreszenz, Stokes-Raman) voneinander getrennt werden. Dies wird durch dichroitische Strahlungsteiler realisiert (in Abbildung 3.2 nicht dargestellt). Das Anregungslicht wird hierbei reflektiert und gelangt zur Probe. Rotlichtverschobenes Emissionslicht wird transmittiert. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit reflektiertes Laserlicht durch Verwendung eines „RT 15/85“ Strahlungsteiler direkt zu messen. 15% des Laserlichts gelangen dabei durch Reflexion „R“ an dem Strahlungsteiler auf die Probe und 85% des reflektierten Lichts transmittieren „T“ durch den Strahlungsteiler auf den Detektor.

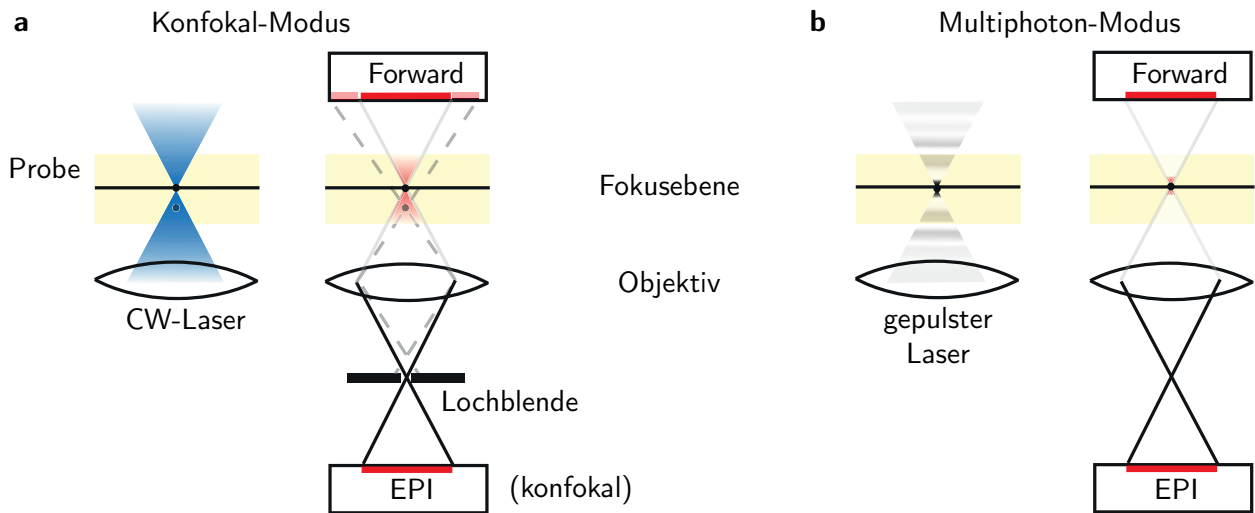


Abbildung 3.2: **Prinzip der Konfokal- versus Multiphotonen-Modus im Leica TCS SP8 CARS.** (a) Im Konfokal-Modus findet sowohl die Anregung als auch die Detektion fokussiert statt. Die punktförmige Beleuchtung (schwarzer Punkt) einer Probe (gelb) erfolgt durch Fokussierung des Laserlichts mittels eines Objektivs unter Bildung eines doppelkegelförmigen Gebietes (blau) mit höchster Lichtintensität im Brennpunkt und quadratischen Abfall mit zunehmendem Abstand. Probenmaterial außerhalb des Fokuspunktes wird somit ebenfalls eine gewissen Lichtintensität ausgesetzt (grauer Punkt). Eine Lochblende ermöglicht die Detektion des Lichts ausschließlich der fokussierten Ebene in EPI-Richtung. In Forward-Richtung wird dagegen keine Lochblende verwendet und somit Licht zusätzlich außerhalb der Fokusebene erfasst (grauer Punkt und Strahlengang als gestrichelte Linie), was zu unschärferen Bildern führt (beim Einsatz von CW-Lasern). (b) Im Multiphotonen-Modus erfolgt die Fokussierung nur auf Seiten der Anregung. Durch die Kombination von Lichtfokussierung durch das Objektiv und der quadratischen Abhängigkeit der Signalgenerierung von Multi-Photonenprozessen vom Anregungslicht wird nur Licht eines sehr kleinen Volumens des Fokuspunktes emittiert. Eine Filterung unscharfer Bildbeiträge außerhalb der Fokusebene mittels Lochblende entfällt somit.

Abstand der Fokusebene ab. Multiphotonenprozesse sind daher intrinsisch fokussiert, sodass auf den Einsatz einer Lochblende auf Detektionsseite verzichtet werden kann. Die Verwendung von Non-Descanned Detektoren erfordert lediglich eine Filterung unerwünschten Laserlichts. Der optische Weg ist auf Detektionsseite gegenüber dem Konfokal-Modus sehr viel kürzer und simpler aufgebaut und erzeugt somit weniger Lichtverluste.¹ In Bezug auf die bioanalytische Anwendung bringt der Multiphotonen-Modus gegenüber dem konfokalen Modus aufgrund der Anregung eines kleinen Volumens den großen Vorteil einer geringeren Belastung der Probe durch Photobleaching mit sich. Zudem ermöglicht die Anregung im IR-Bereich aufgrund eines geringeren Streulichtverlusts ein Durchleuchten von Proben größerer Schichtdicke (siehe Gleichung 2.5). Dem gegenüber stehen aber die nach wie vor hohen Anschaffungskosten gepulster Laser.

3.3 Laser

Abbildung 3.3 zeigt die Laser des Systems angeordnet nach Wellenlängen im elektromagnetischen Spektrum. Zur Anregung von Einzelphotonenprozessen stehen sechs Laserlinien zur Verfügung. Die Dauerstrichlaser decken den gesamten sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums ab. Dies ist erforderlich um eine Anregung unterschiedlichster Fluorophore zu ermöglichen. Aber auch Raman- bzw. SERS-Experimente profitieren von der Vielzahl unterschiedlicher Lasertypen. Die Wahl ist dabei in hohem Maß von der Art der Probe, dem Analyten, der umgebenen Matrix und der Fragestellung abhängig und richtet sich nach wellenlängenabhängigen Parametern wie Streulichteffizienz (Gleichung 2.5), Vermeidung störender Fluoreszenzen, (pre-)resonante Anregung und unerwünschter Photoreaktionen wie Karbonisierung (siehe Abschnitt 2.6.4). In SERS-Experimenten muss zudem die Laseranregung auf die plasmonischen Eigenschaften des SERS-Substrates angepasst werden, um eine maximale Signalverstärkung zu ermöglichen.² Für Multiphotonenprozesse wird ein Laserkomplettsystem von APE (picoEMERALD™) mit einem gepulsten Pump- und Stokes-Laser verwendet. Während die Laserlinie des Stokes fest bei 1064 nm liegt ist die Wellenlänge des Pump-Lasers im Bereich von 780 nm–940 nm frei justierbar und wird für CARS-Anwendungen auf die interessierte Raman-Bande abgestimmt (siehe Abschnitt 2.5) oder für die hyperspektrale CARS-Bildgebung Schritt-für-Schritt unter Aufnahme eines Bildes durchgeföhren. Ähnlich dem Aufbau eines 3D-Bildes werden hierbei 3D Stacks generiert,

¹ Die CARS-Filtercubes: Für Multiphoton-Messungen stehen zwei Filtercubes zur Filterung des Laserlichts und spektraler Auftrennung auf die jeweils zwei Detektoren in EPI- bzw. Forward-Richtung zur Verfügung. Der „CARS 2000“-Cube ist für Untersuchungen $> 2000 \text{ cm}^{-1}$ relativen Wellenzahlen geeignet. Der „CARS 1200“-Cube ist für Messungen im Fingerprintbereich gedacht, wurde hier aufgrund der schwachen Signalgenerierung in dem Bereich in keiner Anwendung verwendet.

² Da Raman-Messungen sehr „reine“ Laserlinien erfordern stehen für die 488 nm, 514 nm und 633 nm Laserlinien entsprechende Laserlinienfilter zur Verfügung, die jedoch einen manuellen Einbau erfordern. Auf Emissionsseite wird das sehr viel intensivere reflektierte Laserlicht durch interne Filter bzw. manuell einbaubare Filter (für 405 nm und 633 nm Laserlinien) vor der Auskopplung zum Spektrographen geblockt.

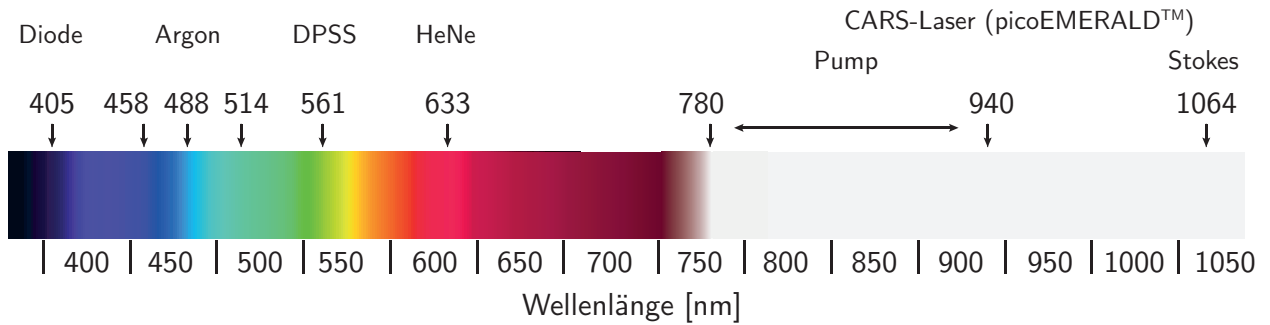


Abbildung 3.3: **Lasertypen im Leica TCS SP8 CARS-System.** Für Einphotonenprozesse (Fluoreszenz, Raman, SERS) stehen sechs Dauerstrichlaserlinien (engl. continuous wave, cw) zur Verfügung. Ein Diodenlaser mit einer Anregung bei 405 nm, ein Argonlaser mit den Laserlinien 458 nm, 488 nm und 514 nm, einen DPSS-Laser mit einer Anregung von 561 nm (diode pumped solid state) und ein HeNe-Laser mit einer Anregung von 633 nm. Für Multiphotonenprozesse (CARS, Zweiphotonen-Fluoreszenz, SHG) wird das Laserkomplettsystem picoEMERALD™ von APE verwendet. Die Anregung des Pump-Lasers ist im Bereich von 780 nm–940 nm wählbar. Der Stokes-Laser regt bei einer Wellenlänge von 1064 nm an.

wobei die dritte Dimension die spektrale Information enthält. Da der CARS-Prozess im Unterschied zu der Zweiphotonenfluoreszenz eine Anregung mittels Pump und Stokes erfordert, kann der Ursprung eines Signals, meist im signalintensiven CH-Streckschwingungsbereich zwischen 2850 cm^{-1} – 2950 cm^{-1} , relativ einfach durch Ausschalten einer der Laser überprüft werden. Ein „echtes“ CARS-Signal sollte ausschließlich beim Anregen mittels beider Laser auftreten. Die Wellenlänge nimmt letztendlich auch Einfluss auf das Auflösungsvermögen wie im folgenden Abschnitt erläutert wird.

3.4 Objektive

Herzstück eines jeden Mikroskopes ist das Objektiv zur Vergrößerung eines Objektes. Im Konfokal- bzw. Multiphotonensystemen wird das Objektiv zusätzlich zur Fokussierung des Laserstrahls (Kondensator) verwendet (siehe Abbildung 3.2) [10]. Abbildung 3.4 zeigt einen Vergleich der Kennzahlen der im System verbauten Objektive. Ähnlich den Lasern unterscheiden sie sich deutlich in den Eigenschaften und haben alle Vor- und Nachteile. Entsprechend müssen sie auf die Anwendung angepasst werden, wie im Folgenden verdeutlicht werden soll. Die Objektive werden meist nach dem Vergrößerungsvermögen unterschieden und umgangssprachlich z. B. als „40er“ Objektiv bezeichnet. Die eigentlich entscheidene Kennzahl eines Objektivs ist jedoch die numerische Apertur NA. Diese berechnet sich aus dem Brechungsindex und dem halben Öffnungswinkel und spiegelt somit die Geometrie des erzeugten kegelförmigen Gebietes wieder.

$$NA = n \cdot \sin(\alpha) \quad (3.1)$$

Die numerische Apertur des Objektivs bestimmt das Auflösungsvermögen, und sollte in jedem guten Objektiv entsprechend dem Vergrößerungsvermögen angepasst sein, um Bilder mit ausreichendem Detailreichtum zu generieren. Wie Abbildung 3.4 zeigt, ist ein solcher Zusammenhang zwischen numerischer Apertur und Auflösungsvermögen für die im Leica-System verbauten Objektive zu erkennen. Hochauflösende Objektive zeigen eine entsprechend höhere numerische Apertur. Das Auflösungsvermögen ist aufgrund der Beugungsgrenze des Lichts limitiert und neben NA abhängig von der Wellenlänge des Lichts. Zur Berechnung gibt es in der Literatur drei Herangehensweisen, die jedoch alle zu sehr ähnlichen Ergebnissen führen [10].¹ Experimentell am einfachsten zugänglich ist die Bestimmung des Auflösungslimits über die Halbwertsbreite eines beugungslimitierten selbstleuchtenden Punktes in einem Bild (z. B. durch Fluoreszenz, Raman) als Maß für die Breite einer Punktspreizfunktion, der Intensitätsverteilung eines beugungslimitierten selbstleuchtenden Punktes im Bild. Der entsprechende theoretisch erreichbare Wert in x-y-Richtung steht im folgenden Zusammenhang zur Wellenlänge (Mittelwert von Anregung und Emission) und NA des Objektivs[10]:²

$$d_{x,y} = \frac{\lambda}{1.94 \cdot NA} \quad (3.2)$$

In z-Richtung kann das maximal mögliche (beugungsbegrenzte) Auflösungsvermögen über folgende Gleichung abgeschätzt werden [10]:

$$d_z = \frac{n \cdot \lambda}{NA^2} \quad (3.3)$$

Die numerische Apertur des Objektivs geht hier quadratisch ein und hat somit deutlichen Einfluss auf die Schichtdicke von x-y-Ebenen. Anzumerken ist, dass dieses maximal erreichbare Auflösungsvermögen im Konfokal-Modus nur bei ausreichend kleiner Lochblende (≤ 1 A.U.) erzielt wird [10]. Wie Abbildung 3.4 verdeutlicht, zeigen Objektive hoher numerischer Apertur jedoch einen geringeren Arbeitsabstand, sind auf eine Immersionslösung angewiesen und daher weniger leicht handhabbar und schränken die Anwendung ein. So ist für die Verwendung von Objektiven geringen Arbeitsabstandes die Wahl einer geeigneten Probenhalterung (Probe auf dünne Deckgläsern) und Positionierung der Probe entscheidend (möglichst mittig). Bei zu geringem Arbeitsabstand zwischen Objektiv und Probe kann es bei Langzeitmessungen (z. B. Hyperspektrale CARS Bildgebung) zu unerwünschten Verschiebungen der Probe und damit in den hochauflösenden Bildern kommen, die zum Teil jedoch durch eine Auto-

¹ Am bekanntesten ist aus historischer Sicht sicherlich das Abbe-Limit, welches sich Abbe anhand des Beugungsverhalten von Licht an Strichgittern überlegt hat ($d = \lambda / (2 \cdot NA)$). Die Auflösung selbstleuchtender Strukturen (z. B. aufgrund von Fluoreszenz) kann weiterhin durch bestimmte Abstandsmaße der Punktspreizfunktionen zweier Punkte bestimmt werden z. B. Rayleigh-Kriterium ($d = \lambda / (1.64 \cdot NA)$) [10].

² Bei einer Multiphotonenanregung wird die Fokussierung und damit die Auflösung durch die Anregung bestimmt (siehe Abbildung 3.2). Das Auflösungslimit von Zweiphotonenprozessen berechnet sich demnach aus der Halbwertsbreite der zweifachen Punktspreizfunktion der Anregung. Die Auflösung verbessert sich um einen Faktor $1/\sqrt{2}$ gegenüber Gleichung 3.2. Aufgrund der Anregung im IR-Bereich (großes λ) ist die Auflösung in x-y-Richtung jedoch nicht besser als mittels der konfokalen Mikroskopie.

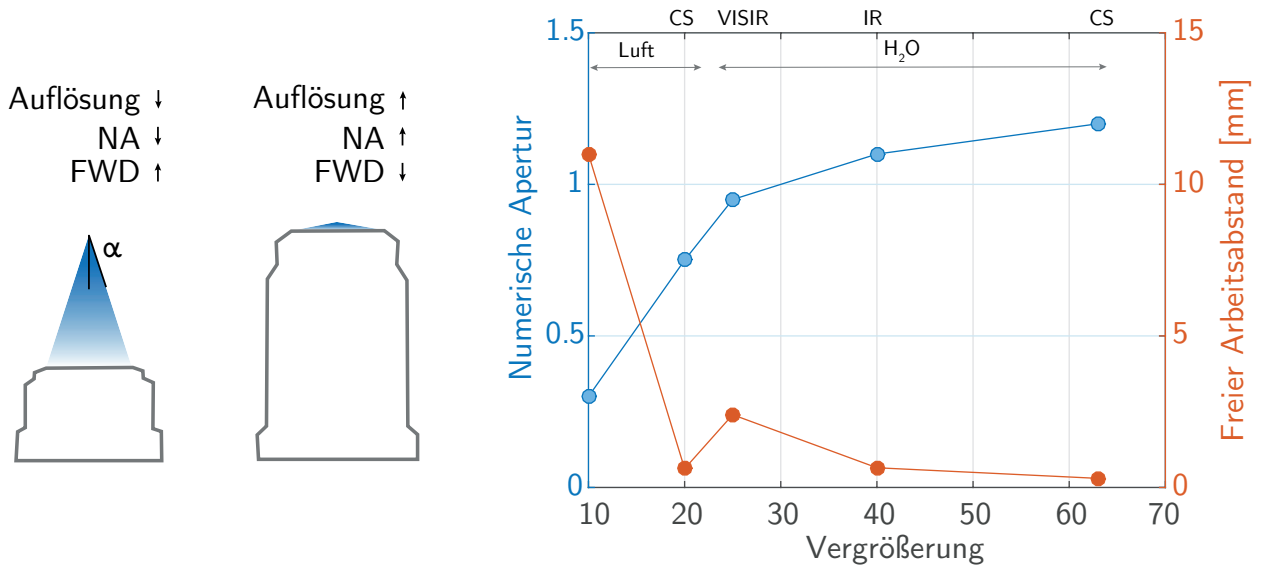


Abbildung 3.4: **Vergleich von Kennzahlen der Leica-Objektive im Leica TCS SP8 CARS-System.** Die hochauflösenden Objektive haben eine höhere numerische Apertur NA, erschweren oder schränken jedoch die Anwendung aufgrund eines geringeren freien Arbeitsabstands (FWD) und Wasser als Immersionslösung ein. Objektive mit der Abkürzung „CS“ sind für konfokale Messungen (confocal scanning), „IR“ für den IR-Bereich, also für Multiphoton-Messungen und „VISIR“ für den sichtbaren und IR-Bereich, also für konfokale und Multiphoton-Messungen optimiert [84]. Bezeichnung der einzelnen Objektive: HCX PL Fluotar 10x/0,30; HC PL APO 20x/0,75 CS2; HC FLUOTAR L 25x/0,95 W 0,17 VISIR; HC PL IRAPO 40x/1,10 W CORR; HC PL APO 63x/1,20 W motCORR CS2

Fokus-Kontrolle minimiert werden können (siehe Abschnitt 5.3.2.2) oder sich nachträglich korrigieren lassen (siehe Abbildung A.5). Zu erwähnen ist letztendlich noch der Einfluss des Objektivs auf der Anregungsseite: Mit zunehmender numerischer Apertur wird das Laserlicht zunehmend stark fokussiert, sodass die Laserintensität gegebenenfalls angepasst werden muss, um z. B. Photoreaktionen zu vermeiden. Bei SERS-Messungen wird oftmals ein „schlechtes“ Objektiv niedriger numerischer Apertur gewählt, um so reproduzierbarere gemittelte Signale zu generieren (siehe auch Abschnitt 5.3.2).

3.5 Detektoren

Nachdem das emittierte (bzw. durchgelassene) Licht der Probe durch das Objektiv aufgeweitet, durch zahlreiche Spiegel umgelenkt, gefiltert und spektral zerlegt wurde (siehe Abbildung 3.1 c), landet das optische Signal am Ende bei den Detektoren, um es in ein elektrisches Signal umzuwandeln. Abbildung 3.5 verdeutlicht die im Leica-System verbauten Detektoren. Die im Bereich der Konfokal- bzw. Multiphotonenmikroskopie verbauten Detektoren sind in den meisten Fällen Photoelektronenvervielfacher-Röhren (engl. Photomultiplier tubes, PMTs). Auch hier sind drei der fünf internen Detektoren und die vier Non-Descanned-Detektoren für Multiphotonanwendungen PMTs. PMTs beruhen auf dem äußeren Photoeffekt, also dem

Herauslösen eines Elektrons aus einem Metall durch ein eingestrahktes Photon. Durch Anlegen einer Spannung in einer Vakuumröhre wird ein solches Photoelektron aus einer negativ geladenen Photokathode zur nächsten positiv geladenen Elektrode, einer Dynode beschleunigt. Das beschleunigte Elektron erzeugt durch Auftreffen auf die Dynode weitere Sekundärelektronen, welche durch Beschleunigung und Auftreffen auf eine nächste Dynode weitere Elektronen herauslösen. Dieser Prozess wird in einer Art Kettenreaktion fortgesetzt und führt zur einer deutlichen Vervielfachung der Elektronen am Ende der Anode. Die Verstärkung („Gain“) eines PMTs wird über die angelegte Hochspannung und damit Erzeugung sekundärer Elektronen reguliert. Das PMT-Signal wird mittels eines Analog-Digital-Wandlers nach Verstreichen der Pixelaufnahmezeit als gemittelttes Signal dem entsprechenden Pixel als Grauwert zugewiesen. Der Hybrid-Detektor (HyD) ist im Leica-System zweimal als interner Detektor verbaut und ermöglicht ein „Photonen zählen“. Der Detektor ist ein „Hybrid“ eines PMTs und einer Lawinen-Photodiode. Ähnlich dem PMT erfolgt zunächst eine photoinduziertes Herauslösen eines Elektrons aus einer Photokathode mit anschließender Beschleunigung des Elektrons in einer Vakuumröhre unter Hochspannung. Im Unterschied zum PMT wird das Elektron jedoch mit 8000 V gegenüber 100 V pro Dynode (8-12) sehr viel stärker beschleunigt und gibt die kinetische Energie am Ende an ein Halbleitermaterial innerhalb der Röhre ohne Zwischenschritte ab. Das Halbleitermaterial setzt daraufhin etwa 1500 Elektronen frei und wird durch einen Lawineneffekt in einer Multiplikationsschicht nochmals um einen Faktor 100 verstärkt. Da die Signalgenerierung im Unterschied zu PMTs nur zwei Schritte gegenüber 8-12 Schritten benötigt, sind statistische Signalschwankungen weitaus weniger ausgeprägt. Aufgrund einer kleineren Fläche der Photokathode und der Abwesenheit der Dynoden, ist zudem dass spontane Freisetzen von Elektronen und damit Dunkelrauschen reduziert. Schmalere Pulsbreiten erlauben auch eine Trennbarkeit der Signale bei hohen Intensitäten. Aufgrund geringerer Signalschwankungen, geringerem Dunkelrauschen und einer weniger ausgeprägten Übersättigung korreliert das Messsignal von HyD-Detekoren daher besser zu der tatsächlichen Photonenzahl.

Ein CCD-Sensor (ladungsgekoppeltes Bauelement, engl.: charge-coupled device) ist in der Kamera (Princeton Instruments, Pixis 100B) des Spektrographen (Princeton Instruments, Isoplane 320) eingebaut. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt, kann ein solcher aus zweidimensional angeordneten „Arrays“ bestehender Sensor zeitgleich mehrere räumlich voneinander getrennte Lichtsignale verarbeiten und ist daher vor allem für die 2D-Bildgenerierung in z. B. Digitalkameras, aber auch zur Bildaufnahme in Weitfeld-Mikroskopen weit verbreitet (in Smartphones sind die ähnlichen CMOS-Sensoren verbaut). Hier wird der lichtempfindliche Sensor dagegen zur Erfassung des spektral zerlegten Lichtes des Spektrographen und Generierung von Spektren genutzt. Das räumlich eindimensional aufgetrennte Licht wird dazu pro Wellenlänge spaltenweise auf die Arrays verteilt. Um die Sensitivität zu steigern werden entlang der Spalten mehrere Arrays zusammengefasst, was als Binning bezeichnet wird. Die Signalverarbeitung eines Arrays beruht auf dem inneren Photoeffekt, also dem

photoinduzierten Übergang von Elektronen eines Halbleiters (p-Si) von einem Valenzband in ein Leitungsband unter Entstehung eines Elektron-Lochpaares. Die angehobenen Elektronen im Leitungsband akkumulieren an der Grenzfläche zu einem Isolator (SiO_2) und werden in einem Potentialtopf gespeichert. Mittels Elektroden oberhalb des Isolators können die akkumulierten Oberflächenladungen dann durch Variation der Spannungen zwischen den einzelnen Arraygebieten des Halbleiters verschoben werden. Nach und nach werden dies Ladungspakete dann über einen Verstärker ausgelesen. Während ein CCD-Sensor aufgrund der parallelen Informationsverarbeitung prädestiniert ist für eine zeitgleiche Bilderfassung z. B. in einem Weitfeldmikroskop bzw. zur Spektrenerfassung einzelner Bildpunkte, ist er für eine extrem schnelle punktweise Detektion eines sequentiell durch Laser-Scanning aufbauenden Bildes gegenüber PMTs bzw. HyD-Detektoren ungeeignet. Diese zeigen zwar im Unterschied zu CCD-Sensoren eine geringere Quantenausbeute, kompensieren dies jedoch durch die höhere Signalverstärkung, geringeres Untergrundrauschen und extrem schnelles Antwortverhalten. Wie Sanderson in einem Lehrbuch anschaulich bzgl. der PMTs beschreibt, erfassen diese (und damit auch HyDs) Information eher wie beim „Speed-Reading“ eines Textes, also mit extrem hoher Geschwindigkeit jedoch mit Überlesen einzelner Wörter (wobei der HyD insgesamt weniger Wörter überliest) [85]. Ein CCD-Sensor kann dagegen sehr schnell einen bereits fertig geschriebenen Text in einem Rutsch verarbeiten, ist jedoch weniger in der Lage einen während des Schreibprozesses aufbauenden Text mitzulesen.

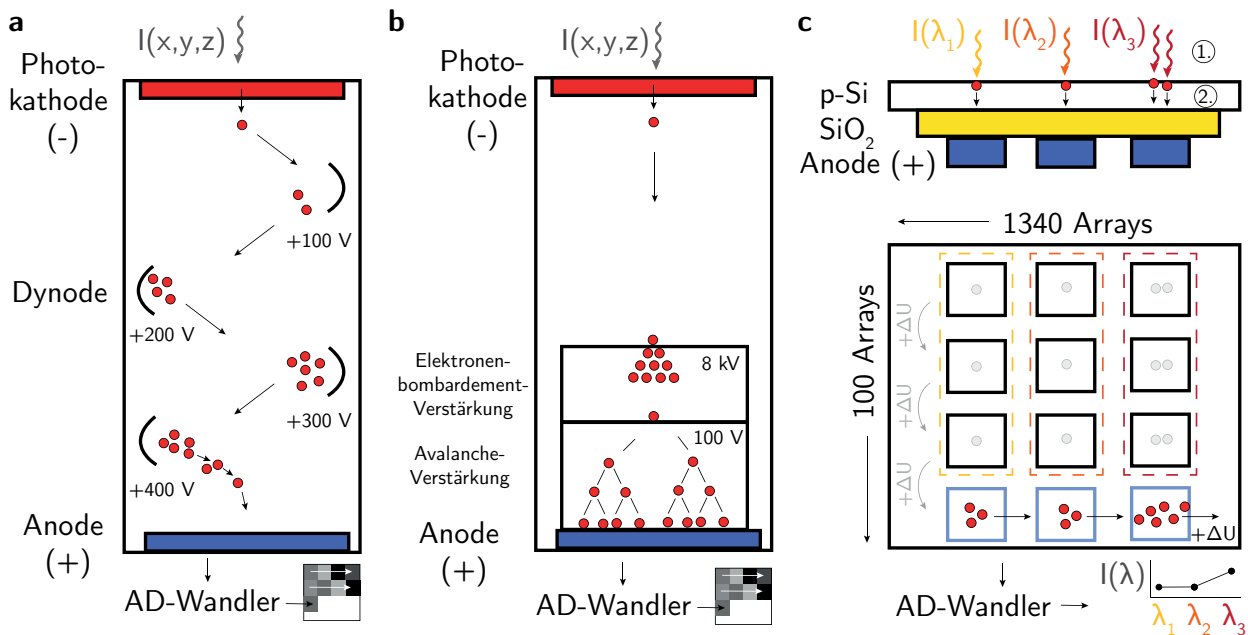


Abbildung 3.5: **Detektoren für das Leica TCS SP8 CARS-System.** (a) Photoelektronenvervielfacher-Röhre (engl. photomultiplier tube, PMT): Ein optisches Signal einer definierten Position im Bild der Intensität $I(x,y,z)$ trifft auf eine Photokathode und löst ein Elektron heraus. In einer Vakuumröhre wird dieses Elektron beschleunigt und zunehmend durch Interaktion mit 8 – 12 Dynoden (hier vier eingezeichnet) vervielfacht. Aufgrund der vielen Wechselwirkungsschritte treten relativ große Schwankungen in Anzahl und Geschwindigkeit der Sekundärelektronen auf. Am Ende treffen die erzeugten Elektronen somit mit einer gewissen Unsicherheit in der Elektronenanzahl und etwas zeitverzögert auf die Anode und erzeugen ein relativ breiten Puls. Das über die Pixeldauer gemittelte Signal wird über einen AD-Wandler in einen Pixelgrauwert transformiert. (b) Hybriddetektor (HyD): Das optische Signal generiert wie im PMT mittels Photokathode ein Elektron, was innerhalb einer Vakuumröhre beschleunigt wird. Im Unterschied trifft das beschleunigte Elektron jedoch direkt ohne Zwischenschritte auf ein Halbleitermaterial und wird durch eine Elektronenbombardement- und anschließender Avalanche-Verstärkung vervielfacht. Es entstehen schmalere, weniger statistisch verteilte Pulse mit geringerem Dunkelrauschen. (c) Ladungsgekoppeltes Bauteil (engl. charge-coupled device, CCD) des externen Spektrographen: Spektral zerlegtes Licht der Intensitäten $I(\lambda_1), I(\lambda_2)$ und $I(\lambda_3)$ trifft spaltenweise auf die lichtempfindliche „Rückseite“ eines CCD-Sensors (back-side-illuminated) und induziert in einem p-dotierten Halbleiter (p-Si) eine Anhebung von Elektronen des Valenzbandes in ein Leitungsband. Diese freien Elektronen akkumulieren in einem Potentialtopf an der Grenzfläche zu einem Isolator (SiO₂) und sind durch eine Spannungsänderung der Elektroden auf dem Sensor entlang der Array-Strukturen frei beweglich. Es erfolgt eine zeilenweise Akkumulation der Ladungen in die äußersten Arrays (hellblau) und anschließende spaltenweise, also wellenlängenspezifische Auslesung und AD-Umwandlung der elektrischen Spannungssignale in ein Spektrum.

Kapitel 4

Chemometrische Methoden

Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit sind komplexe mehrdimensionale Daten unterschiedlichster Art: Das Leica Mikroskop ermöglicht aufgrund der Vielzahl von Detektoren eine zeitgleiche Aufnahme multimodaler Bilder in x-y-Richtung bzw. dreidimensional in x-y-z-Richtung. Weiterhin können zeit oder spektral aufgelöste Daten generiert werden. Alle Messmodi können prinzipiell kombiniert werden, woraus sich eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten aber auch Anforderungen an die Datenverarbeitung ergibt. Die Mehrdimensionalität der Daten führt gezwungenermaßen zu unübersichtlich großen Datenmengen, die nur mithilfe computergestützter Methoden verarbeitet und ausgewertet werden können. Die Datenaufbereitung und Anwendung von Auswertemethoden hat in dieser Arbeit einen entsprechend großen Stellenwert und konzentriert sich vor allem auf die Verarbeitung spektraler Daten, insbesondere hyperspektrale Bilder im Bereich CARS aber auch Einzelspektren im Bereich SERS. Entscheidend für den Erfolg einer Auswertemethode ist zunächst eine adäquate Datenvorverarbeitung. Einen Überblick über die angewandten Datenvorverarbeitungsschritte spektraler Daten gibt Abschnitt 4.1. Darauf aufbauend werden in Abschnitt 4.2 die verwendeten Auswertemethoden mit einem Fokus auf multivariate Auswertemethoden von hyperspektralen CARS-Bildern vorgestellt. Sämtliche Vorprozessierungs- und Auswertungsschritte der Bild- und Spektraldaten erfolgten in Matlab R2015a. Ebenfalls zu der Chemometrie mitgezählt wird die statistische Versuchsplanung (engl. design of experiments, DOE). In Abschnitt 4.3 werden kurz einige Konzepte dieses Feldes eingeführt, die in dieser Arbeit im Bereich der SERS-Analytik angewandt werden. Ziel dieses Ansatzes ist es mit möglichst geringem experimentellem Aufwand einen Überblick über ein komplexes System zu erlangen und letztendlich eine optimale Lösung für das Problem zu finden.

4.1 Datenvorverarbeitung

Hyperspektrale Bilder können aufgrund ihrer Bild- und Spektralinformation als Bilddaten oder Spektraldaten prozessiert werden. Je nach Anwendung erfolgt daher zunächst eine

Umformung des Datensatzes, wie Abbildung 4.1 anhand eines hyperspektralen Bildes eines Modelldatensatzes veranschaulicht. Ein hyperspektrales Bild wird gewöhnlich als Hypercube mit der Bildinformation in x - y - Richtung und λ als dritte Dimension gespeichert. In dieser Form können bildverarbeitende Methoden erfolgen. Zur Anwendung spektraler Methoden wird der Hypercube in eine zweidimensionale Form umgeformt, sodass alle Pixelspektren untereinander angeordnet sind. Der Datensatz entspricht in dieser Form dem eines klassisch rein-spektralen Datensatzes und kann entsprechend analysiert werden. Zur Regenerierung der Bildinformation wird der spektral ausgewertete Datensatz dann wieder in die ursprüngliche Form umgewandelt. Als weitere hier in der Arbeit verwendete Umformoperationen sind das Eliminieren einzelner Bereiche im Bild (croppen) oder spektraler Bänder zu nennen.

Als bildverarbeitende Vorverarbeitungsschritte werden die 2D-Filterung, Bildregistrierung und die Bildsegmentierung eingesetzt. Die 2D-Filterung erhöht das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in Bildern. Es wurde ein 2D-Median-Filter verwendet. Die Bildregistrierung korrigiert mögliche Bewegungen aufeinanderfolgender Bildaufnahmen, die z. B. bei hyperspektralen CARS-Messungen auftreten. Die Registrierung erfolgt durch Minimierung des Unterschieds zweier aufeinanderfolgender hyperspektraler Bilder mittels der Nelder-Mead Simplex Methode [86] (`fminsearch.m` in Matlab, siehe auch Abbildung A.5). Bildsegmentierungen werden durchgeführt, um einzelne Bereiche eines Bildes zu analysieren. Als spektrale Vorverarbeitungsschritte werden in dieser Arbeit die Normierung, Filterung und Integration einzelner Peakbanden eingesetzt. Sie werden hier für CARS- und SERS-Spektren angewandt. Die Normierung ist eine wichtige Prozedur um Spektralformen von Spektren unterschiedlicher Signalintensität zu vergleichen. Sie erfolgt hier durch Vektornormierung. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wird ein Savitzky-Golay-Filter eingesetzt. Zur Quantifizierung von Signalintensitäten erfolgt die Integration einzelner Peakbanden im Spektrum. Auf das geläufige Baseline-Fitting wurde in dieser Arbeit als Vorverarbeitungsschritt verzichtet, da diese nicht-triviale Prozedur die Gefahr von Artefaktbildung erhöht.¹ Sie wird in der Arbeit nur für eine bessere visuelle Vergleichbarkeit von SERS-Spektren angewandt (siehe Abschnitt 5.4.4) [87]. Ein ebenso nicht-trivialer Vorverarbeitungsschritt ist die Eliminierung des nichtresonanten Hintergrundes in CARS-Spektren. Im folgenden Abschnitt 4.1.1 wird kurz erläutert warum die Korrekturen der CARS-Spektren für die hier untersuchten Daten ungeeignet sind.

4.1.1 Eignung von Methoden zur Eliminierung des nichtresonanten Hintergrundes bei CARS

Die Maximum Entropie Methode (MEM) und die Zeit Domänen Kramers-Kronig Transformation werden derzeit in der Forschung zur Rekonstruktion von Raman-Spektren aus

¹ Anstelle einer bloßen Eliminierung der Baseline wird die zusätzliche Information der „Baseline“ von SERS-Spektren in dieser Arbeit vielmehr genutzt (siehe Abschnitt 5.3 und 5.4, SERS-Hintergrund Mikroskopie).

CARS Daten diskutiert [17]. Pohling hat in seiner Doktorarbeit beide Verfahren zur Ramanrekonstruktion von komplexen Daten biologischer Proben angewandt und in ihrer Eignung verglichen [17]. Er kommt zum Schluss, dass beide Methoden nur bei starkem nichtresonanten Hintergrund und schwacher molekularer Schwingungsresonanz geeignet sind, sodass das entstehende CARS-Signal überwiegend durch den Mischterm des Realteils des resonanten Anteils und dem nichtresonanten Hintergrund bestimmt wird (siehe Gleichung 2.16) [17]. Dies gilt für Resonanzen im Fingerprintbereich und biologische Proben geringer Dichte mit gleichzeitig hohem Wasseranteil. Bei starken Resonanzen und schwachem Untergrund führen beide Algorithmen zu einer Art Überkompensation, die sich auf der rot verschobenen Seite der Signale zeigt [17]. Erste Versuche zur Korrektur von intensiver CH-Streckschwingungssignalen von Ölsäure aus Abbildung 2.6 mittels MEM zeigten in der Tat keine vielversprechenden Ergebnisse. Eine solche Korrektur ist daher generell eher im Bereich der Fingerprint-Region üblich [20]. Im CH-Streckschwingungsbereich konnte ein quantitatives Signal bereits durch einfache Hintergrund-Subtraktion generiert werden [88] [20]. Dies ist jedoch nur bei sehr hohen resonanten Signalen der Fall ($\chi_{M,R}^{(3)} \geq 10\chi_{NR}^{(3)}$). Anwendungen wie die Klassifikation von Pixelspektren im CH-Streckschwingungsbereich z. B. mittels multivariater Methoden führen oftmals auch unter Vernachlässigung des nichtresonanten Hintergrundes zu guten Ergebnissen [89–93]. Zum Umgang unkorrigierter CARS-Datensätze in dieser Arbeit sei auf Abschnitt 4.2.4 verwiesen.

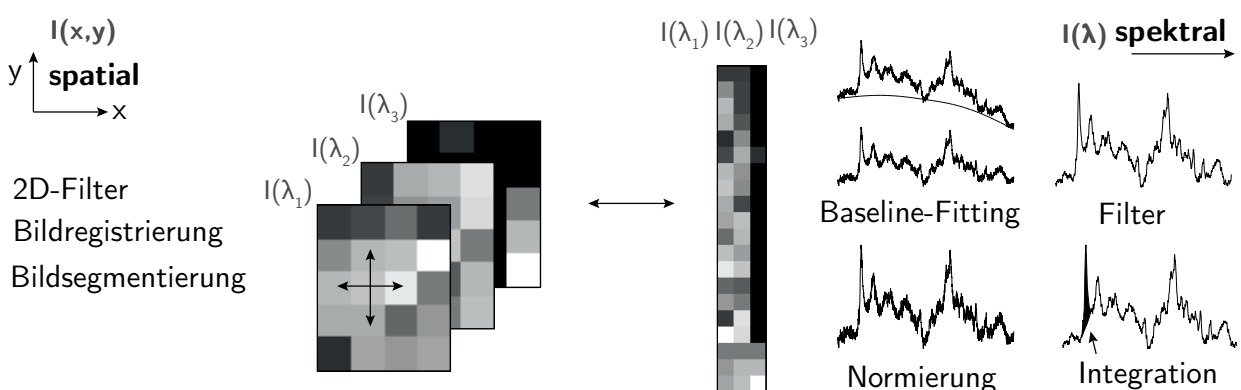


Abbildung 4.1: **Übersicht spatialer und spektraler Methoden zur Datenvorverarbeitung.** Ein hyperspektrales Bild kann als Hypercube oder zweidimensionale Matrix ausgedrückt werden, wie am Beispiel eines Modelldatensatzes gezeigt wird. Spatiale Methoden erfordern die Darstellung als Hypercube (hier mit der Dimension: $4x \times 5y \times 3\lambda$). Spektrale Methoden werden in der zweidimensionalen Form durchgeführt (hier: $20\text{Pixel} \times 3\lambda$). Die spektralen Vorverarbeitungsmethoden werden hier anhand eines SERS-Spektrums von ATP verdeutlicht (siehe auch Abschnitt 5.4).

4.2 Datenauswertung

In der Datenauswertung kommen univariate und multivariate Methoden zum Einsatz. Von einer univariaten Analyse spricht man, wenn die Abhängigkeit einer einzelnen Messgröße z. B. einer einzelnen Spektralbande untersucht wird. Hier verwendete univariaten Methoden sind die Bestimmung von Lagemaßen (Mittelwert, Median) und Streuungsmaßen (Standardabweichung, Percentile) und die Korrelationsanalyse einer Messgröße. Multivariate Methoden werden in dieser Arbeit ausschließlich zur Untersuchung spektraler Daten angewandt, da diese von Natur aus mehrdimensional sind. Im Unterschied zu univariaten Methoden werden hier mehrere Messgrößen zusammen analysiert. Es wird nicht eine einzelne spektrale Bande, sondern das gesamte Spektrum als Fingerprint untersucht. Hierzu muss man sich die spektralen Daten in einem mehrdimensionalen Raum vorstellen, welcher durch die spektralen Bänder aufgespannt wird. Ein einzelnes Spektrum entspricht einem Punkt in dem mehrdimensionalen Raum. In der klassischen angewandten Spektroskopie werden multivariate Methoden eingesetzt um z. B. Spektren von unterschiedlichen Proben zu vergleichen. In der hier eingesetzten hyperspektralen Bildgebung, welche auch als bildgebende Spektroskopie bezeichnet wird, entstammen die Spektren einzelnen Pixeln des hyperspektralen Bildes. Anstelle von Spektren unterschiedlicher Proben werden hier somit Spektren einzelner Pixel verglichen. In der oben beschriebenen zweidimensionalen Anordnung des hyperspektralen Bildes sieht der Datensatz X dann folgendermaßen aus:

$$X = \begin{matrix} & \lambda_1 & \lambda_2 & \dots & \lambda_p \\ \text{Pixel 1} & \left(I_{1,\lambda_2} & I_{1,\lambda_1} & \dots & I_{1,\lambda_p} \right) \\ \text{Pixel 2} & \left(I_{2,\lambda_2} & I_{2,\lambda_1} & \dots & I_{2,\lambda_p} \right) \\ \dots & \left(\dots & \dots & \dots & \dots \right) \\ \text{Pixel n} & \left(I_{n,\lambda_2} & I_{n,\lambda_1} & \dots & I_{n,\lambda_p} \right) \end{matrix} \quad (4.1)$$

4.2.1 Gegenüberstellung multivariater Methoden

Abbildung 4.2 stellt die Prinzipien der in dieser Arbeit verwendeten multivariaten Methoden anhand des Modelldatensatzes aus Abbildung 4.1 im dreidimensionalen Spektralraum gegenüber (für eine ausführliche Beschreibung der Algorithmen, siehe Abschnitt 4.2.2 bis 4.2.4.4). Eine der geläufigsten multivariaten Auswertemethoden von Spektren, die hierarchische Clusteranalyse (engl. hierarchical cluster analysis, HCA), fasst nahe beieinander liegende Punkte zu „Clustern“ zusammen und gibt Information über die Ähnlichkeit von Spektren. Die Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA) [94, 95] ist eine Dimensionsreduzierungsmethode und ermöglicht die z. B. zweidimensionale Darstellung mehrdimensionaler Daten. Durch die Dimensionsreduzierung können hiermit ähnlich der Clusteranalyse wichtige Zusammenhänge der multidimensionalen Datenstruktur sichtbar gemacht werden. In der hyperspektralen Bildverarbeitung ist das Entmischen (engl. unmixing) der Spektren eine

geläufige Methode. In Kombination mit einem Endmember-Extraktionsalgorithmus (EEA) ist das Entmischen, ähnlich der HCA und PCA, eine unüberwachte Auswertemethode, erfordert somit kein Vorwissen über die untersuchte Probe.¹ Die EEA sucht meist nach möglichst unähnlichen Spektren innerhalb des Datensatzes selber, die möglichst gut den gesamten Datensatz abbilden können. Im Unterschied zu den Hauptkomponenten einer PCA sind diese Endmemberspektren daher keine rein mathematischen Konstrukte und spiegeln somit direkt die spektralen Signaturen des Datensatzes wieder. Das eigentliche Entmischen liefert Information über die Konzentrationsverteilung der einzelnen Endmember in dem ursprünglich hyperspektralen Bild.

Tabelle 4.1 fasst die wesentlichen Unterschiede und Gemeinsamkeiten der in dieser Arbeit verwendeten Methoden zusammen. Während die hierarchische Clusteranalyse, als „harte“

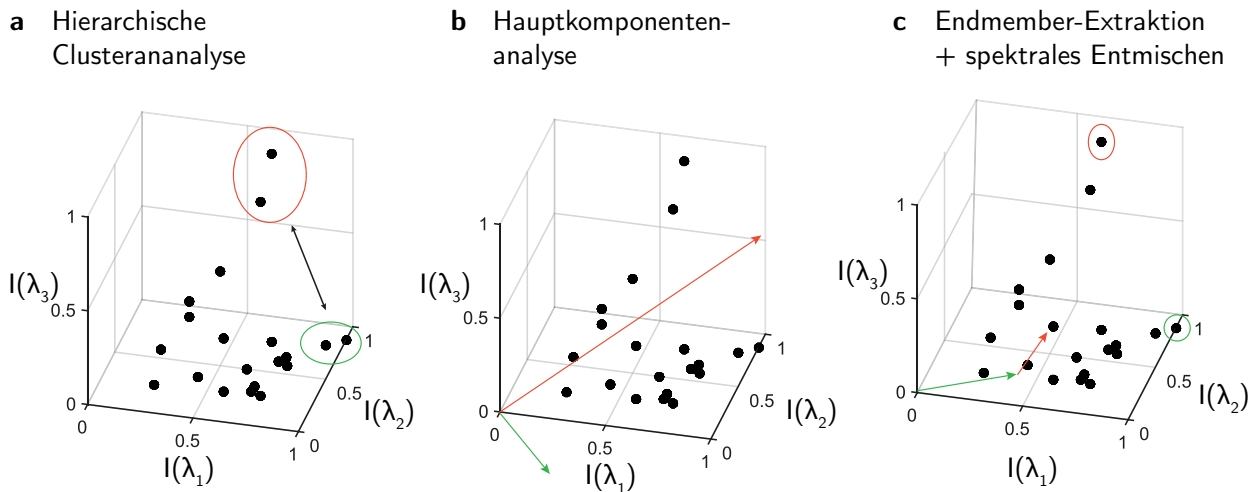


Abbildung 4.2: **Gegenüberstellung der Prinzipien multivariater Auswertemethoden im spektralen Raum anhand des Modelldatensatzes aus Abbildung 4.1.** (a) Hierarchische Clusteranalyse: Die Kreise verdeutlichen die Clusterbildung einzelner Datenpunkte. Der Pfeil deutet die Bestimmung von Distanzmaßen als Kriterium für die Clusterbildung an. (b) Die Hauptkomponentenanalyse führt eine Dimensionsreduzierung durch Koordinatentransformation im spektralen Raum durch. Das Koordinatensystem wird dabei so gedreht, dass die höchste Varianz durch die erste Hauptkomponente (roter Pfeil), die zweithöchste Varianz durch die zweite Hauptkomponente (grüner Pfeil) usw. beschrieben wird. Die Hauptkomponentenanalyse wird hier als unzentrierte Variante dargestellt (siehe auch Abschnitt 4.2.3). (c) Die Endmember Extraktion sucht nach möglichst unähnlichen Pixelspektren - Endmembers- im Datensatz (Kreise). Das spektrale Entmischen bestimmt die relativen Anteile der Endmember in jedem Punkt (Pfeile).

¹ Multivariate Methoden werden in überwachte und unüberwachte Methoden unterteilt. Überwachte Methoden erfordern ein Vorwissen über die Probe beispielsweise eine Unterteilung in „Drogen-Typ“ und „Faser-Typ“ Trichomen. Der Algorithmus lernt dann anhand bestimmter Merkmale z. B. spektraler Fingerprints zwischen „Drogen-Typ“ und „Faser-Typ“ Trichomen zu unterscheiden (zu Trichomtyp, siehe Abschnitt 5.1). Unüberwachte Methoden erfordern dagegen kein Vorwissen über die Proben und dienen einer explorativen Datenanalyse, also dem Aufdecken von Merkmalen z. B. spektraler Unterschiede in einem hyperspektralem Bild.

Methode Pixel einem bestimmten Cluster zuordnet und als cluster-spezifische Farbe in einem Falschfarbenbild visualisiert, wird ein Pixel bei Entmischungsalgorithmen und der PCA anteilig mehreren Gruppen Endmitgliedern bzw. Hauptkomponenten zugeordnet und somit ein durch Anteilsunterschiede hervorgerufener Kontrast im Bild erzeugt. Bei diesen Methoden erfolgt eine „weiche“ Klassifikation. Ein weiterer wesentlicher Unterschied ist die Berücksichtigung von Nichtlinearitäten des Datensatzes. Während die PCA, HCA und ein in dieser Arbeit verwendete EEA-Entmischungsalgorithmus VCA-NNLS eine lineare Struktur des Datensatzes annehmen, berücksichtigt der EEA-Entmischungsalgorithmus DMAXD-DSPU mögliche Nichtlinearitäten.

Tabelle 4.1: **Einteilung der verwendeten multivariaten Methoden.**

Methoden	Typ	Klassifikation
HCA	Clusterverfahren	hart
PCA	Dimensionsreduzierung	linear
VCA-NNLS	EEA-Entmischung	weich
DMAXD-DSPU		nicht-linear

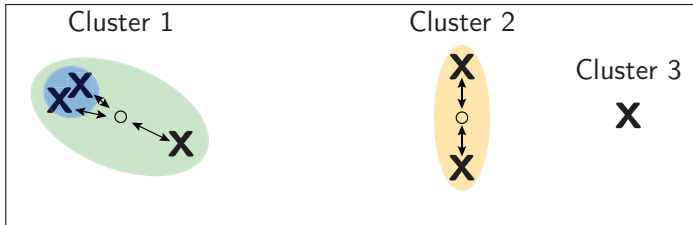
4.2.2 Hierarchische Clusteranalyse

Zentraler Begriff von Clusterverfahren ist die Ähnlichkeit. In der klassischen Spektroskopie ist sie ein weitverbreitetes Verfahren um z. B. unterschiedliche Proben bezüglich der Ähnlichkeit ihrer spektralen Fingerprints zu klassifizieren. In der hyperspektralen Bildgebung wird sie eingesetzt um Pixelspektren untereinander auf Ähnlichkeit zu vergleichen [96, 97]. Als Maß für die Ähnlichkeit wird die Distanz der Objekte (Probe, Pixel) auf Basis ihrer Merkmale (den Intensitätswerten im Spektrum) im spektralen Raum bestimmt. Meist wird hierfür die euklidische Distanz bestimmt. In dieser Arbeit erfolgt eine agglomerative hierarchische Clusteranalyse bei der die Clusterbildung von unten nach oben erfolgt, also zunächst jedes Objekt einen Cluster darstellt und darauf aufbauend immer größere Cluster gebildet werden. Die Fusionierung zu größeren Clustern erfolgt mittels Agglomerationsalgorithmus. Abbildung 4.3 verdeutlicht die in dieser Arbeit verwendete Minimum-Varianz-Methode nach Ward [98]. Die Clusterbildung basiert hierbei auf der Minimierung der Varianz innerhalb des neu gebildeten Clusters. Wie in der Abbildung veranschaulicht wird, neigt der Algorithmus zur Bildung gleichgroßer Cluster. Eine sogenannte Kettenbildung wird unterbunden. Die Distanzen zwischen den einzelnen Clustern werden für gewöhnlich in Dendrogrammen visualisiert.

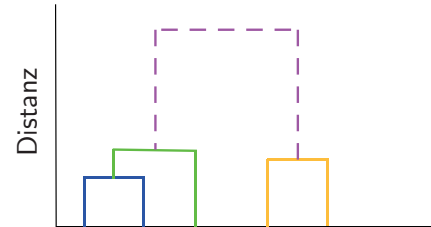
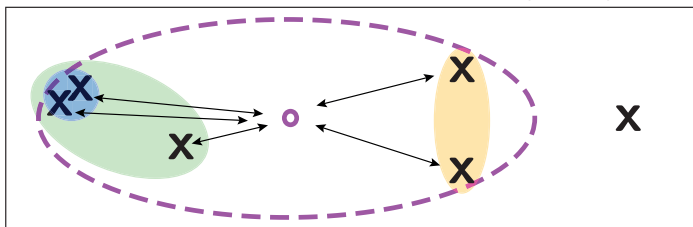
4.2.3 Hauptkomponentenanalyse

Ziel der Hauptkomponentenanalyse ist es die Dimension eines Datensatzes zu reduzieren und dabei möglichst viel Information (Variabilität) zu erhalten [95]. Der Datensatz X wird dazu in

a Varianzen innerhalb der existierenden Cluster



b Varianzen nach möglicher Fusionierung (1. Fall)



c Varianzen nach möglicher Fusionierung (2. Fall)

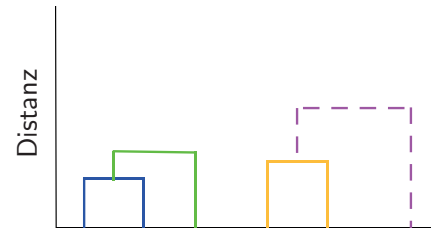
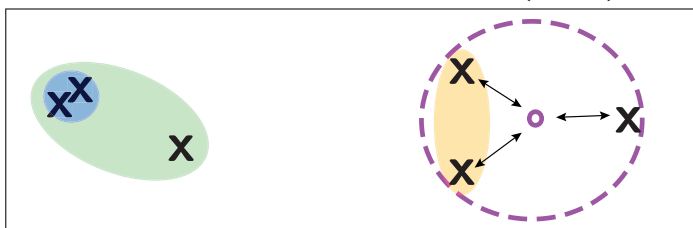


Abbildung 4.3: **Prinzip des Agglomerationsalgorithmus nach Ward [98].** (a) Zunächst wird die Varianz innerhalb der bereits existierenden Cluster bestimmt. Diese berechnet sich aus der Summe der quadratischen Abweichungen zum Zentrum eines Clusters. Cluster 1 setzt sich hier aus einem bereits zuvor fusionierten Cluster (blauer Kreis) und einem weiteren Objekt zusammen. Cluster 2 besteht aus zwei fusionierten Objekten. Das noch nicht fusionierte Objekt wird als eigener Cluster 3 behandelt. Im Dendrogramm sind die existierenden Cluster 1 und 2 dargestellt. Im nächsten Schritt wird eine Varianzanalyse für aller möglichen Fusionierungen durchgeführt. Der Fall mit der geringsten Zunahme der Varianz wird als neuer Cluster gewählt. (b) Darstellung einer ungünstigen Clusterbildung durch Fusionierung von Cluster 1 und Cluster 2. Die Varianz steigt gegenüber der zuvor bestimmten Varianzen der beiden Cluster in (a) deutlich an. (c) Darstellung einer günstigen Clusterbildung durch Fusionierung von Cluster 2 mit Cluster 3. Die Varianz steigt nur geringfügig an. Es erfolgt eine Fusionierung von Cluster 2 mit 3.

Scores S und Loadings L linear unabhängiger Variablen, den so genannten Hauptkomponenten (engl. principal components, PC) zerlegt:

$$\begin{array}{c} \text{Datenmatrix X} \\ \lambda_1 \quad \lambda_2 \quad \dots \\ \text{Pixel 1} \begin{bmatrix} I_{1,1} & I_{1,2} & \dots \end{bmatrix} \\ \text{Pixel 2} \begin{bmatrix} I_{2,1} & \ddots & \ddots \end{bmatrix} \\ \vdots \\ \text{Pixel n} \begin{bmatrix} I_{n,1} & \dots & \dots \end{bmatrix} \end{array} = \begin{array}{c} \text{Scores} \\ \text{PC 1} \quad \text{PC 2} \quad \dots \\ \text{Pixel 1} \begin{bmatrix} S_{1,1} & S_{1,2} & \dots \end{bmatrix} \\ \text{Pixel 2} \begin{bmatrix} S_{2,1} & \ddots & \ddots \end{bmatrix} \\ \vdots \\ \text{Pixel n} \begin{bmatrix} S_{n,1} & \dots & \dots \end{bmatrix} \end{array} \cdot \begin{array}{c} \text{Loadings} \\ \lambda_1 \quad \lambda_2 \quad \dots \\ \text{PC 1} \begin{bmatrix} L_{1,1} & L_{1,2} & \dots \end{bmatrix} \\ \text{PC 2} \begin{bmatrix} L_{2,1} & \ddots & \ddots \end{bmatrix} \\ \vdots \\ \begin{bmatrix} \vdots & \ddots & \ddots \end{bmatrix} \end{array} \quad (4.2)$$

Die Loadings L zeigen in welchem Maße die einzelnen spektralen Bänder zu den einzelnen Hauptkomponenten beitragen. Damit liefern sie die spektrale Information. Diese kann sowohl positive als auch negative Werte annehmen. Sie geben die Richtung der Hauptkomponente im N -dimensionalen Raum vor (siehe Abbildung 4.2, roter und grüner Pfeil). Die erste Hauptkomponente zeigt dabei in Richtung der höchsten Variabilität und beschreibt somit die meiste Information im Datensatz. Die zweite Hauptkomponente steht orthogonal zu der ersten Hauptkomponente im N -dimensionalen Raum und beschreibt die zweithöchste Variabilität im Datensatz. Für die darauffolgenden Hauptkomponenten setzt sich das entsprechend fort. Die Scores geben Aufschluss über die Beiträge der einzelnen Hauptkomponenten in jedem Pixel. Sie werden durch Projektion auf den jeweilige Hauptkomponente bestimmt. Aus den Scores kann zu jeder Hauptkomponente ein Bild generiert werden. Da sie ebenfalls sowohl positive als auch negative Werte annehmen können, erfolgt zur Bildgenerierung eine Normierung der Scores als Graustufenbild.

Anstelle der PCA findet sich in der Literatur auch häufig der Begriff der Singulärwertzerlegung (engl. Singular Value Decomposition, SVD). In den meisten Fällen basiert die PCA auf einer solchen Zerlegung, wobei die Daten zuvor entlang der Spalten, zentriert werden [94].¹ Die PCA ist somit prinzipiell eine SVD einer spalten-zentrierten Datenmatrix [99]. Wird dagegen allgemein von SVD gesprochen, so sind die Daten in der Regel nicht zentriert. Dies wird dann auch als unzentrierte PCA bezeichnet [99]. Eine zur PCA verwandte Klasse von Methoden sind die Nichtnegativen Matrixfaktorisierungs-Algorithmen (engl. Non-negative Matrix Factorization, NMF). Sie wurde bereits zur Zerlegung hyperspektraler Raman- und CARS-Bilder angewandt [100–103].

¹ Bei einer spaltenweise Zentrierung eines hyperspektralen Bild wird für alle Pixel einer Spektralbande, also entlang der Spalten der Datenmatrix X , der Mittelwert bestimmt und von der entsprechenden Spalte abgezogen. Diese Operation ist nicht zu verwechseln mit einer Normierung oder Standardisierung des hyperspektralen Bildes. Diese erfolgen spektrenweise, also entlang der Reihen.

4.2.4 Endmember-Extraktion und spektrales Entmischen

Spektrales Entmischen (engl. spectral unmixing) ist weit verbreitet in der Analyse hyperspektraler Bilder, wie sie beispielsweise in der Fernerkundung oder Mikroskopie vorkommen [104]. Ein Hyperspektrales Bild wird zunächst mittels eines Endmember-Extraktionsalgorithmus (EEA) in einzelne spektrale Signaturen, den Endmembern (EM), zerlegt. Einige EEA suchen die Endmember innerhalb des Datensatzes selber mit der Annahme, dass es in den hyperspektralen Bildern sogenannte reine Pixel gibt, die also im Idealfall die spektrale Signatur oder chemischen Fingerprint einer einzelnen Reinsubstanz repräsentieren [105]. Die Bestimmung der Anzahl der erforderlichen Endmember ist ein nicht triviales Problem und erfolgt gewöhnlich mittels Trial-and-Error [106]. In der eigentlichen Entmischung werden dann zu jedem Pixelspektrum des hyperspektralen Bildes die relativen Anteile der Endmember bestimmt [107]. Dargestellt als Abundanzkarte (engl. abundance map) liefern sie eine räumliche Verteilung der spektralen Signaturen. Neben der unüberwachten Entmischung mit vorangehender EEA kann die Entmischung auch überwacht erfolgen [107]. Anstelle von Endmemberspektren erfolgt dann z. B. die Entmischung auf Basis von Reinsubstanzspektren.

Das geläufigste Entmischungsmodell nimmt an, dass sich die gemischten Spektren linear aus den Endmemberspektren zusammensetzen (lineares Mischungsmodell, LMM) [108]:

$$\mathbf{x}_n = \sum_{m=1}^M a_{n,m} \mathbf{e}_m + \boldsymbol{\eta}_n \text{ mit } \mathbf{x}_n \in \mathbb{R}^D \quad (4.3)$$

wobei D die Anzahl der spektralen Bänder, M die Anzahl der Endmember, \mathbf{e}_m die spektrale Signatur des m -ten Endmembers und $a_{n,m}$ der Anteil des m -ten Endmembers im n -ten Pixel ist. Der Additive Term $\boldsymbol{\eta}_n$ beschreibt residuales Messrauschen und den Modellfehler. Für die relativen Anteile $a_{n,m}$ wird festgelegt, dass sie nur positive Werte annehmen $a_{n,m} \geq 0$ und in Summe Eins ergeben $\sum_m a_{n,m} = 1$.

Aus der Differenz der Eingangsgrößen \mathbf{x}_n und dem Modell $\sum_{m=1}^M a_{n,m} \mathbf{e}_m$ kann nach Gleichung 4.2.4 der Fehler $\boldsymbol{\eta}_n$ bestimmt werden. Die Fehlanpassung (engl. lack of fit, LOF [%]) berechnet sich dann folgendermaßen [109, 110]:

$$LOF [\%] = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N_{\text{Pix}}} \boldsymbol{\eta}_n^2}{\sum_{n=1}^{N_{\text{Pix}}} \mathbf{x}_n^2}} \cdot 100 \quad (4.4)$$

Der Anteil der erklärten Varianz des Modells berechnet sich mit [109, 110]:

$$R^2 [\%] = \left(1 - \frac{\sum_{n=1}^{N_{\text{Pix}}} \boldsymbol{\eta}_n^2}{\sum_{n=1}^{N_{\text{Pix}}} \mathbf{x}_n^2} \right) \cdot 100 \quad (4.5)$$

Beim LMM wird angenommen, dass die Endmemberspektren ungestört überlagern, also nicht miteinander wechselwirken [111]. Bezüglich der in dieser Arbeit untersuchten hyperspektralen CARS-Bilder ist diese Annahme jedoch in mehrfacher Hinsicht nicht gegeben: In CARS-Aufnahmen von komplexen Gemischen ergeben sich aufgrund der Nichtlinearität des CARS-Prozesses Mischterme wie anhand von Gleichung 2.14 bei Anregung eines Zweikomponenten-Gemisch gezeigt wird. Die spezifischen CARS-Signale eines Moleküls wechselwirken mit den spezifischen CARS-Signalen des anderen Moleküls. Weitere Mischterme ergeben sich aus der Überlagerung des resonanten CARS-Signals mit nichtresonanten Hintergrund (siehe Gleichung 2.16). Je nach Molekülkonzentration und Anteil zum nichtresonanten Untergrund können dabei lineare oder quadratische Beiträge des resonanten CARS-Signals überwiegen (siehe auch Abschnitt A.1.2) [112]. Betrachtet man die Signalintensitäten der Pixel des Bildes in Abhängigkeit der Anregung zueinander, ergibt sich so letztendlich eine komplexe nichtlineare Struktur im Spektralraum. So wurde z. B. in [112] ein nichtlinearer Zusammenhang durch Auftragung der Signalintensitäten bei 2844 cm^{-1} und 2942 cm^{-1} zueinander festgestellt und auf die nichtlineare Konzentrationsabhängigkeit zurückgeführt. Zusätzlich kann die Komplexität durch weitere Beiträge von (Mehr-)Photonen-Prozessen wie Zwei-Photonen-Fluoreszenz ansteigen. Durch eine spektrale Zerlegung auf Basis des linearen Mischungsmodells in die einzelnen Bestandteile und Bestimmung der relativen Anteile wird der ursprüngliche Datensatz somit möglicherweise nicht ausreichend vom Modell widerspiegelt. Um dennoch das lineare Mischungsmodell anwenden zu können, wird in dieser Arbeit ein von Heylen et al. [105] entwickeltes EEA- und Entmischungsmodell angewandt. Der Distanz-Maximum-Distanz-Extraktionsalgorithmus (engl. distance maximum distance, DMAXD) und der Distanz-Simplexprojektion-Entmischungsalgorithmus (engl. distance simplex projection unmixing, DSPU) basieren auf Distanzmaßen, welche frei wählbar sind. In dieser Arbeit werden interne Distanzen der Pixelspektren entlang eines K-Nächste-Nachbarn-Graphen verwendet (engl. K-nearest-neighbour graph, KNN). Solche Graph-Distanzen erfassen bereits intern die nichtlineare Struktur eines Datensatzes und ermöglichen somit die Verwendung linearer Endmember-Extraktions- und Entmischungsalgorithmen ohne mögliche Nichtlinearitäten zu vernachlässigen. Um den Einfluss des KKN-Graphen zu untersuchen, wird der DMAXD-DSPU-Algorithmus zudem als lineare Version mit euklidischen Distanzmaßen ausgeführt. Zum Vergleich wird weiterhin die populäre Vertexkomponentenanalyse (engl. Vertex component analyse, VCA) zur Endmemberextraktion mit anschließender linearer Entmischung durch Fehlerquadratminimierung angewandt [113] (siehe Abschnitt 5.2).

Wie in den folgenden Abschnitten verdeutlicht wird, basiert die Endmembersuche des DMAXD (unabhängig vom Distanzmaß) und des VCA auf einem sehr ähnlichen geometrischen Ansatz. Sie zielen, wie auch viele andere geometrische EEAs, auf eine Maximierung des Volumens eines Simplex ab, welcher durch die Endmember aufgespannt wird [105]. In der Geometrie ist ein Simplex in Abhängigkeit der Dimension ein Punkt (nulldimensional), eine Strecke (eindimensional), Dreieck (zweidimensional), Tetraeder (dreidimensional) usw. [96]. Die Idee

hinter der Volumenmaximierung ist, dass nur Punkte innerhalb des Simplexvolumens durch Linearkombinationen der Endmember beschrieben werden können. Punkte die außerhalb des Volumens liegen können nicht ohne weiteres durch die Endmember dargestellt werden. Das generelle Ziel von EEM-Algorithmen, ist es somit möglichst viele Punkte innerhalb des Volumens einzuschließen. Die Endmember sollten somit möglichst am Rand des Simplexes liegen. Die Endmemberfindung erfolgt bei beiden Algorithmen dabei auf Basis orthogonaler Projektionen und Bestimmung der maximalen Distanz zu diesen Unterräumen [105]. Sie machen sich zu Nutze, dass die Maximierung des Simplexvolumens einer Maximierung der orthogonalen Distanz gleichkommt [105]. Im folgenden Abschnitt wird zunächst kurz die lineare EEA-Entmischungskette VCA-NNLS beschrieben. Darauf aufbauend erfolgt in den Abschnitten 4.2.4.3 und 4.2.4.4 separiert eine mit Hilfe des Modelldatensatzes eine Schritt-für-Schritt-Beschreibung des KNN-Graphen, des EEA-Algorithmus DMAXD und des Entmischungsalgorithmus DSPU. Es wird insbesondere auf Unterschiede der beiden Algorithmen eingegangen.

4.2.4.1 Endmember-Extraktion und Entmischung mittels VCA-NNLS

Die Vertexkomponentenanalyse (VCA) [113] wurde bereits in zahlreichen Publikationen zur Endmember-Extraktion hyperspektraler Raman-Aufnahmen eingesetzt. Eine Auflistung befindet sich im Review [100]. Tabarangao et al. nutzten die Methode zur Kontrastgenerierung von hyperspektralen CARS-Aufnahmen [93].

Als Vertex werden die Eckpunkte eines Simplexes bezeichnet. Diese entsprechen den am stärksten ausgeprägten Spektren des Datensatzes und repräsentieren daher die „reinsten“ Spektren. Die Endmembersuche erfolgt dabei durch Projektion der Daten in orthogonaler Richtung zu dem Unterraum, der durch die zuvor gebildet Endmember aufgespannt wird. In diesem Unterraum wird dann ein Vektor mit beliebiger Richtung (randomisiert) generiert. Die Daten werden dann wiederum auf diesen Vektor projiziert. Der neue Endmember entspricht dabei dem Pixel mit maximaler Distanz zu dieser Projektion. Der VCA-Algorithmus ist somit eine Kombination einer orthogonalen Projektion eines Unterraums und einer randomisierten Projektion [114]. Der randomisierte Schritt ist ein wesentlicher Unterschied zum DMAXD-Algorithmus.

Eine Besonderheit und weiterer Unterschied zum DMAXD-Algorithmus ist, dass vor der eigentlichen EEA eine Dimensionsreduzierung des Datensatzes mittels PCA oder SVD erfolgt. In Abhängigkeit der gewählten Endmemberanzahl M werden nur die ersten M Scores einer PCA bzw. SVD bei der Endmembersuche berücksichtigt. Die Wahl zwischen PCA und SVD erfolgt in Abhängigkeit des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses des Datensatzes. Ab einem gewissen Schwellwert wird die SVD anstelle der PCA verwendet. Die Dimensionsreduzierung verringert den Rechenaufwand und führt zu verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen. In einer älteren Version war dieser Schritt noch nicht implementiert [115]. Das Entmischen

der Pixelspektren \mathbf{x}_n der Anzahl N_{Pix} in die Anteile $a_{n,m}$ der Endmemberspektren \mathbf{e}_m erfolgt meist durch Minimierung der Summe der Fehlerquadrate zwischen Modell- und Messdaten unter Berücksichtigung der Nichtnegativität und Summe-zu-Eins Bedingung (engl. fully constrained least squares, FCLS)[107, 116]:

$$\min_a \sum_{n=1}^{N_{\text{Pix}}} \left(\sum_{m=1}^M a_{n,m} \mathbf{e}_m - \mathbf{x}_n \right)^2 \quad (4.6)$$

Alternativ kann ein Kleinstfehlerquadrat-Algorithmus unter Berücksichtigung von Nichtnegativität der Abundanzen, jedoch ohne der Summe-zu-Eins Bedingung angewendet werden (engl. non-negative least squares algorithm, NNLS) [117].

4.2.4.2 Der K-Nächste-Nachbarn-Graphen

Abbildung 4.4a zeigt einen K-Nächste-Nachbarn-Graphen des Modelldatensatzes aus Abbildung 4.2 und 4.2. Der K-Nächste-Nachbarn-Graphen verknüpft die in Nachbarschaft liegenden Pixelspektren miteinander. Der Parameter K entspricht der Anzahl der Verknüpfungen, die hier mit $K = 5$ gewählt wurde. Anstelle des euklidischen Abstandes, kann die Distanz zwischen zwei Punkten entlang des Graphen bestimmt werden. In Analogie kann man sich die Streckenbestimmung in einem Routenplaner vorstellen. Der Abstand zwischen zwei Orten wird nicht über die Luftlinie (euklidische Distanz) sondern entlang des Straßennetzes ermittelt. Es sei angemerkt, dass reale hyperspektrale Datensätze aus sehr viel mehr Spektralbändern bestehen. Die im folgenden gezeigten Operationen im dreidimensionalen Raum muss man sich bei realen Daten somit im mehrdimensionalen oder D -dimensionalen Raum „vorstellen“ (siehe Gleichung 4.2.4). Zur Veranschaulichung der Komplexität realer Datensätze zeigt Abbildung 4.4b die Intensitätsverteilung entlang zweier Spektralbänder einer hyperspektralen CARS-Aufnahme eines Trichomes von *Cannabis sativa* L.. Zu erkennen ist eine nichttriviale Form der Datenwolke welche unter anderem aus Überlagerung der CARS-Signale mit Zwei-Photonen-Fluoreszenz resultiert. Aufgrund der Anwendung interner Distanzen entlang des KKN-Graphen kann eine solche Struktur jedoch erfasst werden, sodass keine Information verloren geht.

4.2.4.3 Der Endmember-Extraktionsalgorithmus DMAXD

Der Distanz-MAXD-Algorithmus (DMAXD) [105] ist eine auf Distanzmaße angepasste Variante des Maximum-Distanz-Algorithmus (MAXD) [118, 119]. Das Distanzmaß ist frei wählbar. Wie bereits oben beschrieben, werden in dieser Arbeit die internen Distanzen der Pixelspektren entlang eines K-Nächste-Nachbarn-Graphen als Distanzmaß zur Berücksichtigung möglicher Nichtlinearitäten verwendet (KKN-DMAXD) [105]. Zum Vergleich wird der DMAXD-Algorithmus als lineare Version mittels euklidischer Distanzen ausgeführt (Euklid-

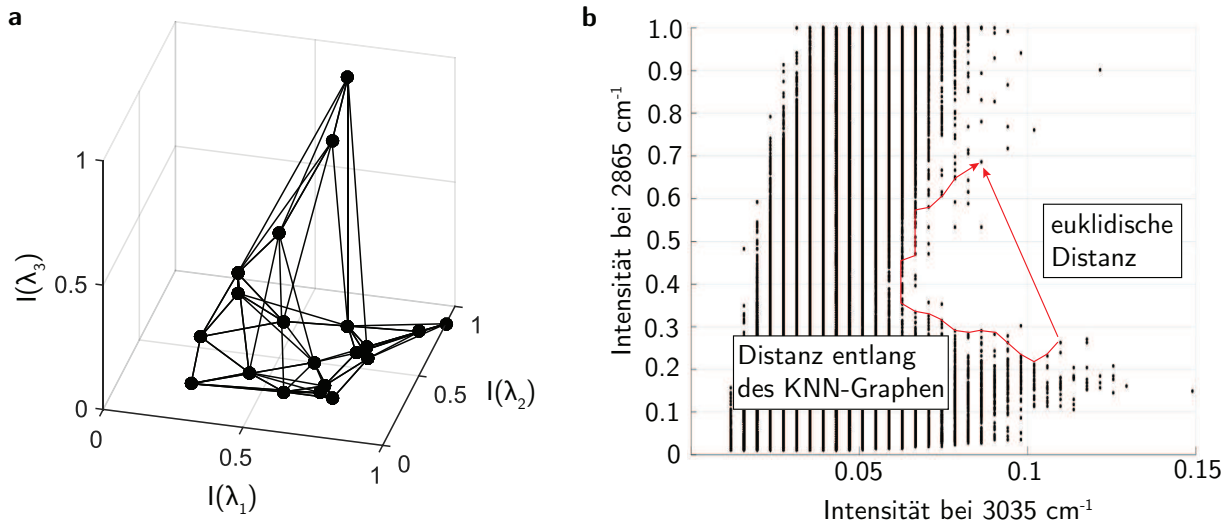


Abbildung 4.4: **Anwendung des K-Nächste-Nachbarn-Graphen auf hyperspektrale Bilder.** (a) Darstellung der Modelldatensatzes aus Abbildung 4.1 im dreidimensionalen Spektralraum mit Nächste-Nachbarn-Graphen ($K = 5$). (c) Auftragung der Pixelintensitäten zweier Spektralbänder eines hyperspektralen CARS Bildes einer komplexen biologischen Probe (Dimension: x: 1024, y: 1024, λ : 76; Trichom von *Cannabis sativa* L.). Im Spektralraum ist eine nichtlineare Intensitätsverteilung zu erkennen. Euklidische Distanzen und Distanzen entlang eines KNN-Graphen können stark voneinander abweichen. Die diskreten Intensitätsabstände kommen durch die Speicherung von Bildintensitäten im 8 Bit-Format zustande (256 Intensitätsstufen mit Werten 0 – 255).

DMAXD). In Abbildung 4.5a wird das Prinzip des DMAXD- Extraktions-Algorithmus anhand des Modelldatensatzes aus Abbildung 4.4 mittels KNN-Distanzen visualisiert. Die Intensitätswerte der Pixelspektren werden in Abbildung 4.5b in Abhängigkeit von I_{λ_1} , I_{λ_2} und I_{λ_3} im dreidimensionalen Raum darstellt. Als erster Endmember wird beim DMaxD-Algorithmus das Pixelspektrum mit dem größten Abstand zum Ursprung, also mit der größten Vektorlänge gewählt (Abbildung 4.5a). In einem hyperspektralen CARS-Datensatz könnte die maximale Vektorlänge beispielsweise in Bildbereichen maximaler CH-Streckschwingungsintensität auftreten, die beispielsweise von einer CH-bindungsreichen Substanz hoher Konzentration in dem Bereich resultiert.¹ Als zweiter Endmember wird das Pixelspektrum mit der maximalen Distanz zum ersten Endmember gewählt. Dies ist meist der Endmember mit der kleinsten Vektorlänge (Abbildung 4.5b). An dieser Stelle wird zum ersten Mal der zuvor generierte KNN-Graph des Datensatzes genutzt. Mittels des Dijkstra-Algorithmus werden hierbei die minimalen Distanzen entlang des KNN-Graphen von jedem Punkt zu EM1 ermittelt. Der Punkt mit maximalem Wert dieser minimalen Distanz entspricht dem zweiten Endmember.²

¹ In fluoreszenzdominierenden Aufnahmen wäre eine maximale Vektorlänge auch in einem Pixelspektrum mit maximaler Zwei-Photonenfluoreszenz denkbar, wenn diese die maximalen mittleren CARS-Signale in der Aufnahme übertreffen.

² Eine minimale Vektorlänge d. h. minimale mittlere Intensität ist in CARS-Daten beispielsweise in Randbereichen einer Aufnahme abseits der Probe denkbar, an denen z. B. nur nichtresonanter Hintergrund des Deckglases erfasst wird.

Die Endmemberfindung erfolgt generell über die maximale orthogonale Distanz zu einem Simplex, welchen von den Endmembers aufgespannt wird. Dies wird damit begründet, dass der Punkt mit maximaler orthogonaler Distanz zu der Hyperebene der zuvor ermittelten Endmember, dem Punkt entspricht, der auch das Simplexvolumen maximiert. Im ersten Fall mit einem Endmember ist der Simplex ein Punkt. Kommt ein zweiter Endmember hinzu wird der Simplex zu eine Linie. Das Volumen der Linie entspricht hierbei der Länge des Simplex, die wie in Abbildung 4.5b dargestellt wird, maximiert wird. Mit maximaler orthogonaler Distanz zu der von EM1 und EM2 aufspannten Simplex-Linie wird der dritte Endmember gewählt. Dieser befindet sich am Rand der Datenwolke in Richtung λ_1 und λ_2 . EM3. Der Simplex aus EM1, EM2 und EM3 bildet nur eine Fläche wie in Abbildung 4.5c zu erkennen ist. Wiederum orthogonal mit maximaler Distanz zu dieser Simplex-Fläche wird der vierte Endmember generiert. Der Simplex entspricht dann einem Tetraeder. An dieser Stelle wird die Endmembersuche abgebrochen. Output der Endmember-Extraktion sind die in Abbildung 4.5e dargestellten Endmember-Spektren.¹

4.2.4.4 Der Entmischungsalgorithmus DSPU

Eine Entmischung auf des Basis eines KNN-Graphen (bzw. euklidischer Distanz als lineare Version) erfolgt über den Distanz-Simplex-Projektion-Entmischungsalgorithmus (engl. distance simplex projection unmixing, DSPU). Der DSPU-Algorithmus ist eine auf Distanzmaße modifizierte Version des Simplex-Projektion-Entmischungsalgorithmus. Dieser basiert auf der Gleichheit eines kleinsten Fehlerquadrate Problems und dem Problem der Projektion eines Punktes auf einen Simplex, wie im Folgenden anhand des Bespiels näher erklärt wird [107]. Als Spektrum-Input wurden die zuvor bestimmten Endmemberspektren des DMAXD verwendet, welche den in Abbildung 4.6a grau hinterlegten Simplex aufspannen. In Abbildung 4.6a wird zunächst die Ermittlung der Anteile eines Pixelspektrums erklärt, deren Punkte sich innerhalb des Volumens des Endmember-Simplices befinden (blau umkreist). Um den Anteil eines Endmembers am Spektrum des Pixels zu bestimmen, wird das Volumen eines Simplexes bestimmt, der durch den Punkt und die restlichen Endmember, also ohne den besagten Endmember aufgespannt wird. Aus dem Verhältnis des Endmember-Simplex-Volumens (grau) und Punkt-Endmember-Simplex-Volumens (hellblau) berechnet sich dann der Anteil zum entsprechenden Endmember. Das Spektrum des hier gezeigten Punktes setzt sich beispielsweise zu 75 % aus dem ersten Endmemberspektrum zusammen, wie an der deutlichen Überlappung des grauen und hellblauen Simplexes zu erkennen ist. Die Volumina der anderen drei Endmember sind gegenüber dem Endmembersimplex sehr viel kleiner, woraus sich kleinere Anteile von 4 % bis 11 % ergeben. Abbildung 4.6b zeigt das Vorgehen, wenn ein Punkt außerhalb des Endmember-Simplex-Volumens liegt. Eine direkte Bestimmung der Anteile ist nicht mehr

¹ Aufgrund der geringen Anzahl an spektralen Bändern ($D = 3$) und einer im Vergleich hohen Zahl an extrahierten Endmembers ($M = 4$) müsste der Modelldatensatz nach einer Definition von Chang [106] strenggenommen als multispektral bezeichnet werden (multispektral: $D < M$, hyperspektral: $D \geq M$).

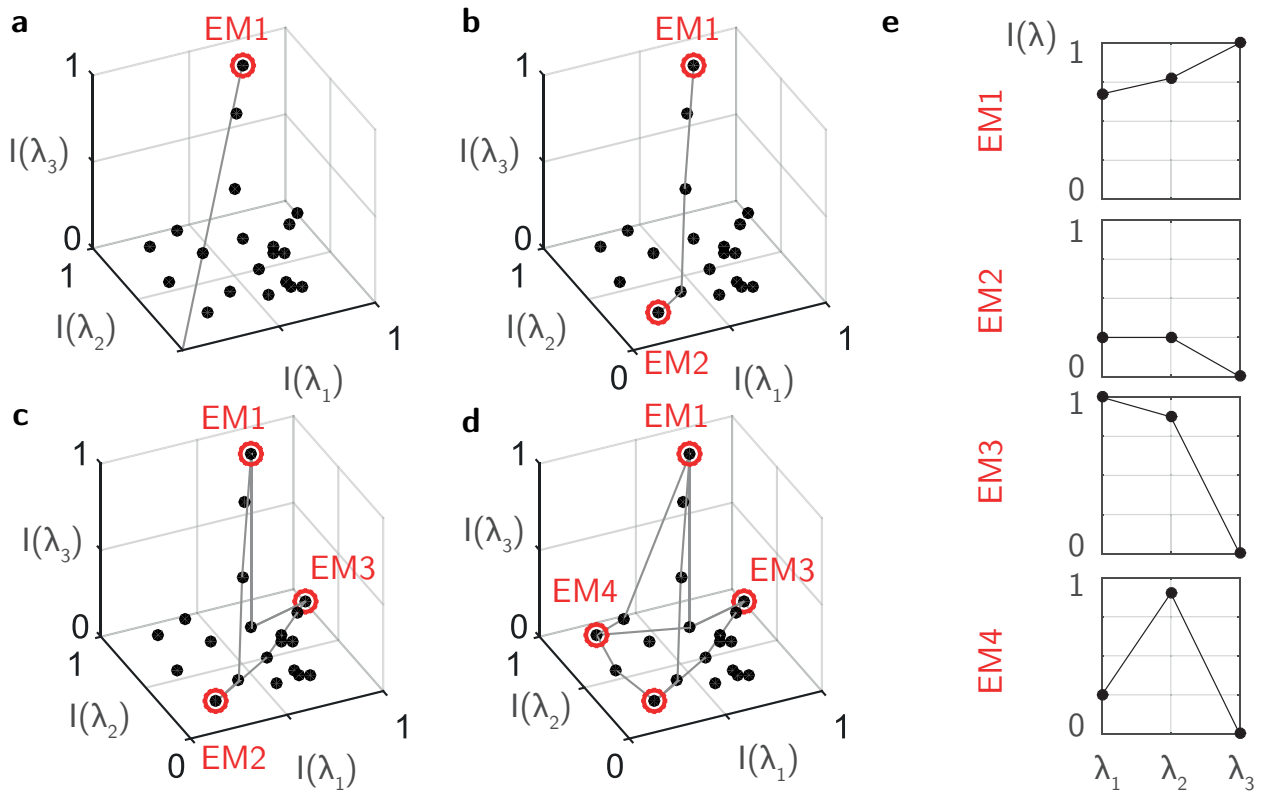


Abbildung 4.5: **Prinzip des Endmember-Extraktionsalgorithmus DMAXD visualisiert anhand eines Modelldatensatzes.** (a) Der erste Endmember (EM1) entspricht dem Endmemberspektrum der größten Norm (Vektorlänge). (a-c) Alle darauffolgenden Endmember werden durch maximale orthogonale Distanz des Endmember-Simplices entlang des zuvor ermittelten KNN-Graphen ermittelt (grau hinterlegt). (e) Der Output des Endmember-Extraktionsalgorithmus ist ein Spektrum jedes Endmembers.

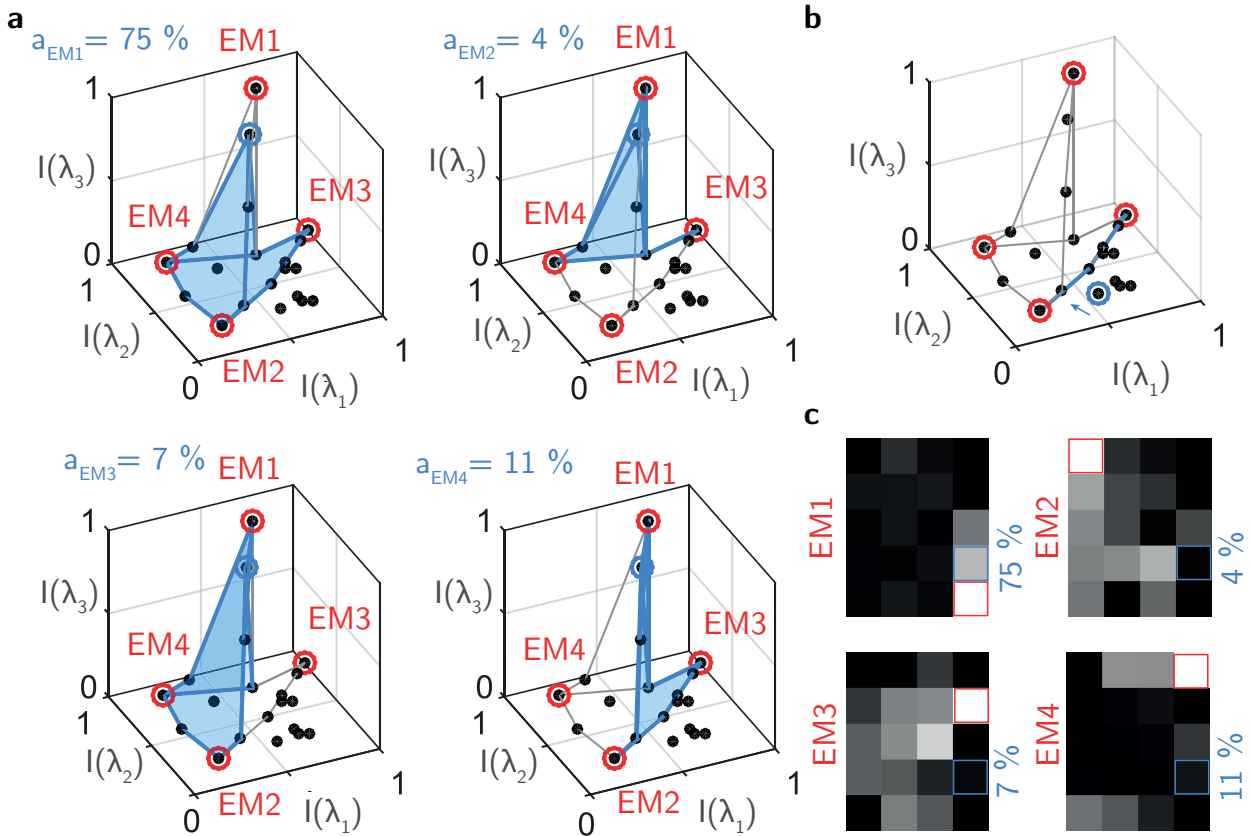


Abbildung 4.6: **Prinzip des Entmischungsalgorithmus DSPU.** (a) Entmischung eines Pixelspektrums das sich innerhalb des Endmember-Simplex-Volumens befindet. Die Anteile zu jedem Endmember können anhand des Verhältnisses des Endmember-Simplex-Volumens (grau umrandet) und des Punkt-Endmember-Volumens (hellblau ausgefüllt) exakt bestimmt werden. Jedoch tritt dieser Fall in realen Daten selten oder nie auf, da sich die meisten Punkte mit zunehmender Anzahl spektraler Bänder außerhalb des Volumens befinden (sogenannter Fluch der Dimensionalität [108]). (b) Projektion eines Pixelspektrums auf den Endmember-Simplex. Der projizierte Punkt entspricht der Lösung eines vollständig eingeschränkten Kleinste-Fehlerquadrat-Entmischungsalgorithmus. (c) Output des Entmischungsalgorithmus sind die Abundanzkarten der Endmember dargestellt in Grauwerten (schwarz: $a = 0\%$ bis weiß: $a = 100\%$). Rot umrandet sind die „reinen“ Endmemberpixel bei $a = 100\%$ (weiße Pixel). Blau umrandet ist der Pixel aus (a).

möglich. Der Punkt muss daher auf den Simplex projiziert werden. Von dem projizierten Punkt können dann entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen die Anteile bestimmt werden. Der projizierte Punkt entspricht der FCLS-Lösung (siehe Abschnitt 4.2.4.1). Der Algorithmus wird für jeden Pixel im hyperspektralen Bild ausgeführt, sodass sich am Ende die in Abbildung 4.6c dargestellten Abundanzkarten der vier Endmember ergeben.

4.3 Statistische Versuchsplanung

Komplexe Systeme sind von einer Vielzahl von Eingangsgrößen abhängig. Um in einem Experiment den Einfluss eines Parameters auf eine Zielgröße zu untersuchen, wird dieser für gewöhnlich variiert, während alle anderen Einflussgrößen konstant gehalten werden, was als „Ein Faktor nach dem anderen“-Methode (one factor at a time, OFAT) bezeichnet wird. Ist man eher an einem optimalen Ergebnis als an bestimmten Abhängigkeiten eines einzelnen Parameters interessiert, erfolgt oftmals auch eine eher intuitive „Trial and Error“-Vorgehensweise, bei der mehrere Parameter zur selben Zeit variiert werden. Bei beiden Methoden wird jedoch nur durch Zufall ein optimales Versuchsergebnis hervorgebracht, da Einzelwirkungen (Trial and Error) oder Wechselwirkungen (OFAT) der Einflussfaktoren nicht erfasst werden. Die statistische Versuchsplanung liefert im Gegensatz dazu systematische Methodiken, die mit möglichst geringem Aufwand eine maximale Information über das System liefern. Dabei werden sowohl Einzelwirkungen als auch Wechselwirkungen der Parameter auf eine Zielgröße berücksichtigt [120].

Die Versuchsplanung wird für gewöhnlich in fünf Stufen unterteilt. An erster Stelle steht die eigentliche „Planung“ des Versuchs. Hier erfolgt eine Definition des betrachteten Systems mit seinen Systemgrenzen, möglichen Einflussgrößen (Parametern) und der Zielgröße, auch Qualitätsmerkmal genannt, aber auch möglichen Störgrößen. Dies erfolgt meist in einem Parameter-Diagramm. Darauf folgt eine Auswahl von Parametern, den Faktoren, deren Einzel- und Wechselwirkungen auf das Qualitätsmerkmal systematisch mittels eines Versuchsplans untersucht werden. Jeder Faktor wird dabei in mindestens zwei Einstellungen, den Stufen variiert. Entscheidend ist hierbei der Stufenabstand, da dieser den Effekt des Faktors bestimmt. Neben der richtigen Faktorwahl loten erste Experimente daher zunächst auch die richtigen Stufenabstände dieser Faktoren aus. Diese Stufe wird auch als „Screening“ bezeichnet. Nach Auffindung der richtigen Faktoren und Stufenabstände erfolgt dann eine detailliertere quantitative Analyse. In dieser „Optimierungs“-Stufe wird der optimale Bereich der einzelnen Faktoren bestimmt. Darauf folgt dann eine „Testung auf Robustheit“. Hierbei wird untersucht welchen Einfluss kleine Veränderungen der Parameter auf die Zielgröße haben. Je nach Komplexität des System und der betrachteten Stufe stehen unterschiedliche Versuchsplankonzepte zur Verfügung. Generelle Kriterien für Versuchspläne sind Orthogonalität, Ausgewogenheit und Randomisierbarkeit [120]. Einen detaillierten, anwendungsnahen Einblick in die Materie liefert das Buch von Siebertz [120]. In dieser Arbeit werden einige DOE-Konzepte für die Detektion von ATP innerhalb von Mikrofluidiksystemen mittels SERS angewandt. Die Anwendung bewegt sich dabei meist auf der ersten „Versuchsplan“-Stufe (Systemdefinition) und „Screening“-Stufe (Auffindung relevanter Parameter). Aber auch erste Optimierungsschritte werden durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4.6).

Kapitel 5

Anwendungen

5.1 Chemisches Fingerprinting glandulärer Trichome von *Cannabis sativa* L. mittels CARS Mikroskopie

5.1.1 Einleitung

Cannabis sativa L. und seine Inhaltsstoffe erfahren seit der Entdeckung des Endocannabinoid-Systems ein zunehmendes Interesse in der Pharmaforschung [121]. Das wohl bekannteste Cannbinoid, Tetrahydrocannabinol (THC) wird beispielsweise zur Behandlung der Symptome neurologischer Erkrankungen [122], multiple Sklerose [123] oder Krebs [124] eingesetzt. Andere Cannabinoide wie Cannabidiol (CBD), Terpene und phenolische Verbindungen zeigen weitere interessante pharmazeutische Eigenschaften [125]. Die Biosynthese der Metabolite erfolgt für gewöhnlich innerhalb spezialisierter Organe, haarähnlicher Strukturen an der Oberfläche der Pflanze, den glandulären Trichomen. Trichome sind in Pflanzen weitverbreitete epidemische Organe unterschiedlicher Funktion. Neben den glandulären Trichomen gibt es drüsenfreie, nicht-glanduläre Trichome [126–128]. In *Cannabis sativa* L. kommen jeweils zwei Formen der glandulären und nicht-glandulären Trichome vor. Die glandulären Trichome unterteilen sich in kurzstielige Trichome mit kleinem Kopf und in langstielte Trichome mit großem kugelförmigen Kopf und bilden sich an Brakteen weiblicher Blüten oder an Staubbeuteln männlicher Blüten aus. Es wird vermutet, dass sie der Hauptaustragungsort der Cannbinoid-Biosynthese und -Speicherung sind [129, 130], weshalb nur diese weiter untersucht wurden. Die Synthese und Akkumulation der Metabolite erfolgt in den Scheibenzellen (engl. disk cells) bzw. in dem anliegenden sekretorischen Hohlraum (engl. secretory cavity) [131]. Abbildung 5.1 zeigt den Biosyntheseweg der Cannbinoide auf. Cannabigerolsäure (CBGA), die zentrale Vorläuferstruktur der Cannabinoide, bildet sich aus Geranyldiphosphat (GPP) und Olivetolsäure (OA), die sich jeweils aus dem DOXP/MEP-Weg und der Fettsäurebiosynthese ableiten [5] (zu Olivetolsäure, siehe auch Abbildung 1.2). Ausgehend von CBGA werden

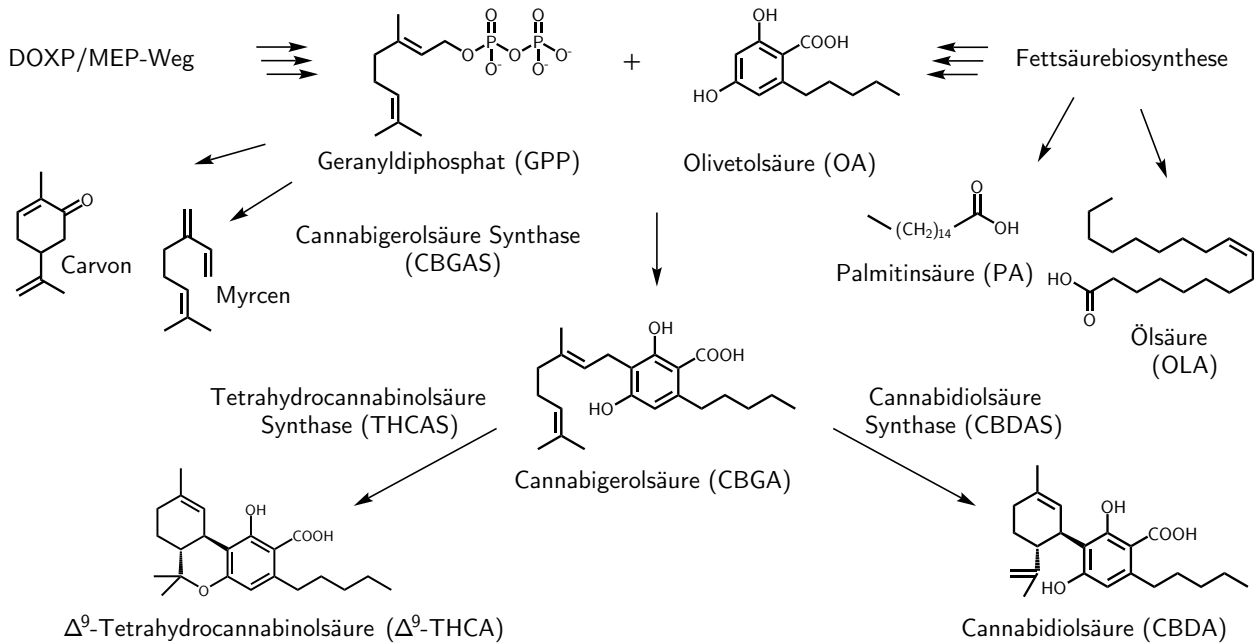


Abbildung 5.1: **Biochemischer Reaktionsweg der Cannabinoidsynthese in *C. sativa*.** CBGA, die zentrale Zwischenstufe des Cannabinoid-Syntheseweges wird aus GPP und OA gebildet. Anschließend wird CBGA in die Säuren von THC und CBD mittels der Oxidoreduktasen THCAS und CBDAS umgewandelt. Zusätzlich gezeigt werden häufig vorkommende Monoterpene und Fettsäuren des ätherischen Öls der glandulären Trichome [142, 143].

zahlreiche Cannabinoide synthestisiert. Gezeigt werden hier die am häufigsten vorkommenden, Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure (THCA) und Cannabidiolsäure (CBDA) [5, 132–135]. Entsprechend des THCA und CBDA Gehaltes werden *Cannabis*-Pflanzen als Drogen-Typ (THCA-reich, CBDA-arm), Intermediat-Typ (THCA-Medium /-arm, CBDA-reich) oder Faser-Typ (THCA-arm, CBDA-reich) klassifiziert [5, 136].

Die Genom-Analyse glandulärer Trichome zeigte, dass nahezu alle Genkandidaten des Cannabinoid-Syntheseweges bevorzugt in glandulären Trichomen exprimiert werden [137]. Die Bestimmung der Zusammensetzung des ätherischen Öls erfolgte bisher mittels GC/MS [138], LC/MS [139] oder NMR Analyse [140]. Die THCA Konzentration in *Cannabis* Extrakten wurde zudem mittels Fluoroimmunoassays vorhergesagt [141]. Diese Techniken arbeiten jedoch nicht-zerstörungsfrei und erfordern eine hohe Anzahl an Trichomen. Für eine Einzel-Trichom-Analytik oder Lokalisierung der Metabolite innerhalb eines Trichomes sind sie daher ungeeignet. Ziel dieser Studie ist eine räumlich hochauflösende Analyse sekundärer Metabolite in glandulären Trichomen von *Cannabis sativa* L.. Dies wird mittels hyperspektraler CARS Bildgebung in Kombination mit einer nichtlinearen Entmischungsmethode erreicht (siehe Abschnitt 2.5 und 4.2.4). Weitere morphologische Information wird durch eine Kombination von Transmission sowie Ein- und Zwei-Photonenfluoreszenz-Aufnahmen erhalten (siehe Abschnitt 2.2, und 2.3). Dieser multimodale Ansatz ermöglicht sowohl morphologische als auch spezifische chemisch-analytische Untersuchungen einzelner sekundärer Metabolite wie THCA und CBDA einer Probe ohne Extraktion des ätherischen Öls.

5.1.2 Methoden

5.1.3 Morphologie mittels Fluoreszenz und Transmission

Um die Morphologie der Probe zu untersuchen wurden Transmissions-, Einzel-Photon-Fluoreszenz und Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM) glandulärer Trichome von *Cannabis sativa* L. aufgenommen. Abbildung 5.2 zeigt die Ergebnisse von *C. sativa* Bedrobinol. Die Anregung der Fluoreszenz bei 561 nm generiert zwei Arten von Fluoreszenz, eine grüne Fluoreszenz und eine rote Fluoreszenz (Abbildung 5.2 a). Die Herkunft der grünen Fluoreszenz ist vermutlich auf ein Gemisch unterschiedlicher organischer Fluorophore zurückzuführen, die im Folgenden nur noch als organische Fluoreszenz bezeichnet wird. Die rote Fluoreszenz stammt vermutlich von Chlorophyll a. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzphänomene mit Transmission ermöglicht eine Unterscheidung unterschiedlicher Komponenten des glandulären Trichomes (Abbildung 5.2 a, b), die ebenso mittels REM aufgelöst werden (Abbildung 5.2 c). Das Transmissionbild gibt eine Übersicht über die Gesamtstruktur des glandulären Trichomes. Es besteht aus einem kugelförmigen Kopf, der auf dem Stiel angebracht ist. Der Kopf unterteilt sich in einen zellulären Teil ausgeprägter organischer Fluoreszenz, den Scheibenzellen und dem sekretorischen Hohlraum. Die hohe Lichttransparenz und verminderte Fluoreszenz weist auf die Anwesenheit eines ätherischen Öl im sekretorischen Hohlraum hin. Der Stiel zeigt organische Fluoreszenz und rote Fluoreszenz des Chlorophyll a, die eine Lokalisierung der Chloroplasten ermöglicht. Die Verknüpfung zwischen dem Stiel und dem Kopf wird durch die Stielzellen ermöglicht, die sich durch eine ausgeprägte rote Fluoreszenz des Chlorophyll a deutlich vom Rest unterscheiden, wie insbesondere von der Ansicht von unten zu erkennen ist (Abbildung 5.2 b). Die Verknüpfung der Stielzellen zum Stiel und Kopf wird durch REM-Aufnahme verdeutlicht. Da glanduläre Trichome oftmals in einem trockenen und rehydrierten Zustand untersucht werden, wurde der Einfluss eines solchen Trocknungsprozesses untersucht. Abbildung 5.2 d-f zeigt den Einfluss nach zwei Tagen Trocknung. Während des Trocknungsprozesses entstehen zusätzliche morphologische Strukturen, was auf eine Bildung von Artefakten hinweist und vermutlich nicht die native Struktur repräsentieren.

5.1.4 Morphologie mittels Forward- und EPI-CARS Mikroskopie bei Einzelwellenlängenanregung

Die Morphologie wurde weiterhin mittels CARS Mikroskopie mit Einzelwellenlängenanregung in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung untersucht. Um einen Bildkontrast aliphatischer CH-reicher Substanzen zu erzeugen, wurden der Pump Laser in den Resonanz-Bereich aliphatischer CH-Streckschwingungen gestimmt (Pump: 812,6 nm, Stokes: 1064 nm; $\nu_{CH} = 2861 \text{ cm}^{-1}$, siehe Abschnitt 2.5). Zusätzlich auftretende TPF-Signale liefern weitere morphologische Information. Abbildung 5.3 zeigt die Multi-Photon-Bilder eines sekretorischen Hohlraums von *C. sativa* Bedrobinol und *C. sativa* Fedora aufgenommen mit vier Detektorkanälen,

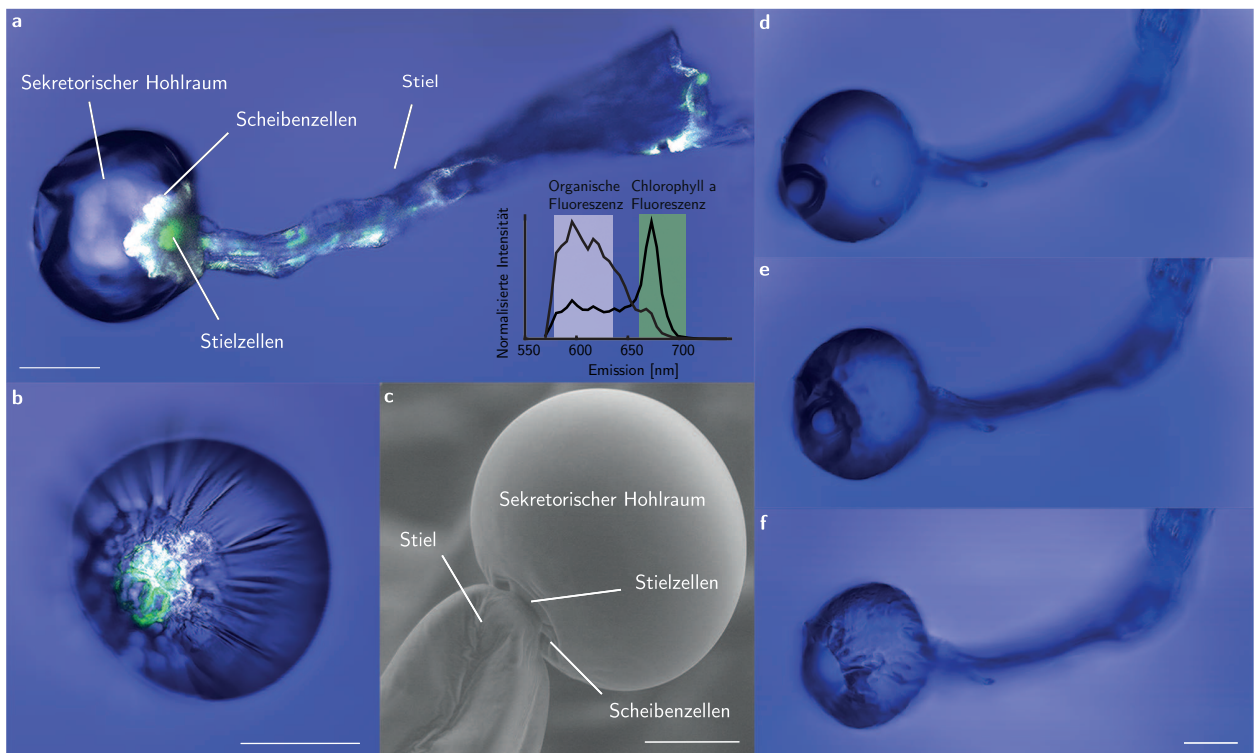


Abbildung 5.2: **Transmission und Einzel-Photonen Fluoreszenz und REM Bilder eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol.** (a) Gesamtansicht eines glandulären Trichomes mit Fluoreszenzspektren (Anregung bei 561 nm) (b) isolierter Kopf (Anregung bei 561 nm) (c) REM-Aufnahme eines Kopfes und der Verknüpfung zum Stiel (d-f) Zeitabhängige Degradation eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol (frisch, nach einem und zweiten Tagen bei 27 °C). Blau: Transmission; Weiß: Fluoreszenz organischer Substanzen (Emission 580 nm–630 nm); Grün: Fluoreszenz von Chlorophyll a (Emission 660 nm–700 nm). Maßstab (a, b, d-f) 50 µm, (c) 25 µm.

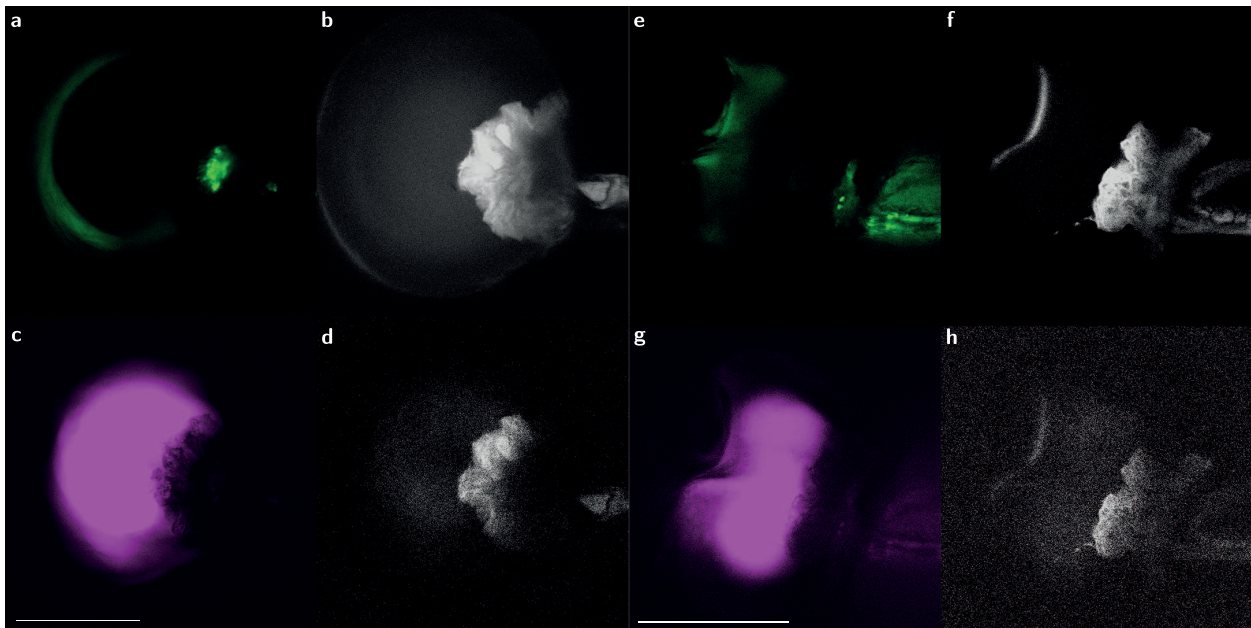


Abbildung 5.3: CARS- und Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Aufnahmen (TPF) in Rückwärts- und Vorwärtsrichtung eines sekretorischen Hohlraums von *C. sativa* Bedrobinol (a-d) und *C. sativa* Fedora (e-h). Anregung bei Pump 812,6 nm und Stokes 1064 nm (2861 cm^{-1}). (a,e) Grün: TPF von Chlorophyll a in Rückwärtsrichtung (Emission 560 nm–750 nm); (b,f) Weiß: TPF organischer Substanzen in Rückwärtsrichtung (Emission 380 nm–560 nm); (c,g) Magenta: CARS-Signal des ätherischen Öls in Vorwärtsrichtung; (d,h) Weiß: TPF organischer Substanzen in Vorwärtsrichtung. Maßstab: 50 μm .

zwei in Vorwärtsrichtung (engl. Forward, F) und zwei in Rückwärtsrichtung (EPI), jeweils von kürzeren und längeren Wellenlängen. Die rückwärtsgerichteten Signale werden von TPF dominiert (EPI-TPF): Langwellige Signale zeigen die rote Fluoreszenz von Chlorophyll a in den Chloroplasten des Stiels und der Stielzellen und kurzwellige Signale zeigen die organische Fluoreszenz in den Scheiben- und Stielzellen. Diese Beobachtung sind in Übereinstimmung mit den Einphoton-Fluoreszenz Phänomenen allerdings mit dem Unterschied, dass TPF eine höhere Auflösung ermöglicht, was insbesondere anhand der besseren Lokalisierung der Chloroplasten in den Scheibenzellen zu erkennen ist. In Vorwärtsrichtung werden langwellige Signale vornehmlich aus dem sekretorischen Hohlraum emittiert und auf CARS-Signale zurückgeführt (F-CARS): Diese Signale werden durch die aliphatischen CH-reichen Substanzen des ätherischen Öls im sekretorischen Hohlraum verursacht und sind in Übereinstimmung mit der hohen Lichttransparenz. Die vorwärtsgerichteten kurzwelligen Signale sind auf die organische Fluoreszenz zurückzuführen und vergleichbar zu den rückwärtsgerichteten Signalen jedoch mit geringer Intensität. Aus diesem Grund wurde dieser Kanal nicht weiter berücksichtigt.

5.1.5 Chemisches Fingerprinting mittels entmischter hyperspektraler CARS-Aufnahmen

Die Verteilung einzelner Metabolite innerhalb des glandulären Trichomes wird mittels hyperspektraler CARS-Bildgebung (HCARS) untersucht. Mittels eines spektralen EEA-Entmischungsalgorithmus und anschließender hierarchischer Clusteranalyse (HCA) extrahierter Probenspektren und Referenzsubstanzspektren (Endmember) erfolgt eine Spektrenzuordnung. Als EEA-Entmischungsalgorithmus wird der KNN-DMAXD-DSPU-Algorithmus verwendet, da dieser mögliche Nichtlinearitäten im Datensatz erfasst. Für einen tiefergehenden Einblick in die verwendeten Methoden sei auf Abschnitt 5.2 verwiesen. Die spektrale Entmischung der HCARS-Daten aufgenommen in Vorwärtsrichtung (F-HCARS) erfolgt mit Hilfe eines Vier-Endmember-Modells. Der chemische Fingerabdruck wird mittels der Endmemberspektren erfasst, die entsprechenden Abundanzkarten liefern die räumliche Verteilung. Für die Drogen-Typ Proben beschreiben zwei Endmember CH-Streckschwingungen, ein Endmember Fluoreszenz und ein Endmember residuales Rauschen. Für die Faser-Typ Proben beschreibt ein Endmember CH-Streckschwingungen, ein Endmember Fluoreszenz und zwei Endmember residuales Rauschen. Die F-HCARS-Spektren der Referenzsubstanzen werden in gleicher Weise entmischt. Aufgrund der reduzierten Komplexizität erfolgt die Entmischung jedoch auf Basis eines Zwei-Endmember-Modells (CH-Streckschwingungen, residuales Rauschen). Neben den Cannabinoiden, werden die am häufigst vorkommenden Monoterpene und Fettsäuren in die Analyse einbezogen (siehe Abbildung 5.1, [142, 143]).

5.1.5.1 Ähnlichkeitsanalyse von Endmemberspektren der Trichome von *C. sativa* Bedrobinol, *C. sativa* Fedora und Reinsubstanzen

Spektrale Ähnlichkeiten zwischen den Endmemberspektren der Trichome und den Endmemberspektren der Referenzsubstanzen werden mittels HCA erfasst. Abbildung 5.4 zeigt die Endmemberspektren, die CH-Streckschwingungen beschreiben und entsprechenden Abundanzkarten sortiert nach den Ergebnisse der HCA. Das Dendrogramm der HCA illustriert die spektralen Ähnlichkeiten. Für die Trichome des Drogen-Typs offenbart die HCA eine Ähnlichkeit der Endmember mit hoher Abundanz in dem sekretorischen Hohlraum (BCav) mit dem Spektrum reinen THCA, was auf eine Akkumulation von THCA innerhalb des sekretorischen Hohlraums hinweist. Die Spektren der Scheibenzellen (Bdisk) unterscheiden sich deutlich von den Spektren innerhalb des sekretorischen Hohlraums (BCav). Sie zeigen eine Ähnlichkeit zu CBGA, was auf eine Akkumulation dieses Cannabinoids innerhalb der Scheibenzellen der Trichome des Drogen-Typs schließen lässt. Das breite undefinierte CH-Signal kann auch auf ein komplexes Gemisch unterschiedlicher CH-reicher Substanzen in den Scheibenzellen hinweisen. Im Unterschied zu den Trichomen des Drogen-Typs zeigen die Endmember des sekretorischen Hohlraums der Trichome des Faser-Typs einen spektralen Fingerabdruck der laut HCA am ähnlichstem CBDA/Myrcen ist. Trichome des Faser- und Drogen-Typs können

somit offenbar anhand des spektralen Fingerabdrucks des ätherischen Öls im sekretorischen Hohlraum unterschieden werden. Im Unterschied zu den Scheibenzellen des Drogen-Typs zeigen die Scheibenzellen des Faser-Typs keine CH-Streckschwingungen, die sich deutlich von der Umgebung unterscheiden. Die EEA findet daher keine scheibenzellen-spezifische Endmember und somit keinen charakteristischen chemischen Fingerabdruck. Die Ähnlichkeit von CBDA und Myrcen im untersuchten spektralen Bereich verhindert eine Unterscheidung dieser Substanzen mit der derzeitigen Methode. Eine separate Lokalisierung innerhalb der Proben war daher nicht möglich. Dies zeigt deutlich die Grenzen der derzeitigen Methode auf. Im Gegensatz dazu zeigt THCA ausgeprägte spektrale Features, die eine Identifizierung und Lokalisierung mittels des Endmember Ansatzes ermöglicht.

5.1.5.2 Überlagerung von entmischten CARS und Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Aufnahmen

Ein Gesamtbild aus Metabolitverteilung und morphologischer Struktur wird durch Kombination der entmischten F-HCARS Daten und entsprechenden entmischten Daten in Rückwärtsrichtung erhalten, welche von Zwei-Photonen-Fluoreszenz dominiert werden (EPI-HTPF, Abbildung 5.5). Die ausgeprägte organische Fluoreszenz in den Scheibenzellen der Trichome des Drogen-Typs ermöglicht die Unterscheidung dieser Zellen vom sekretorischen Hohlraum. Bereiche hoher Abundanzen der CH-Streckschwingungen mit Ähnlichkeit zu CBGA und/oder eines komplexen Gemisches überlagern mit der Region organischer Fluoreszenz, was darauf hinweist, dass die entsprechenden Substanzen nahezu nur innerhalb der Scheibenzellen in hoher Konzentration vorliegen.

5.1.6 Diskussion

Chemisches Fingerprinting sekundärer Metabolite in biologischen Proben erfordert eine hohe spektrale Selektivität und anspruchsvolle Datenevaluierung. In komplexen biologischem Material ist dies zusätzlich durch die Autofluoreszenz der Probenmatrix erschwert, die aber auch genutzt werden kann um ein besseres Gesamtbild der Probe zu erhalten. Anregung der hier untersuchten glandulären Trichome des Drogen- und Faser-Typs von *Cannabis sativa* L. bei 561 nm zeigt die Pflanzen-typische grüne Fluoreszenz und zusätzlich (dunkel-)rote Fluoreszenz, welche vom Chlorophyll a herrührt [144–147]. Die grüne Fluoreszenz ist vermutlich in erster Linie auf hoch fluoreszente Substanzen in den Zellwänden zurückzuführen (z. B. Ferulasäure) [145]. In einer Publikation von Talamond et al. [144] wurde gezeigt, dass die hyperspektrale Bildgebung der grünen Fluoreszenz mit anschließender multivariater Separierung der Spektren prinzipiell zur Bildgebung einzelner phenolischer Metabolite in Pflanzenmaterial geeignet ist (z. B. Koffein in Kaffeeblättern). Cannabinoidsäuren zeigen jedoch nur bei Anregung im UV Bereich eine deutliche Fluoreszenz [139], während hier nur eine Anregung im sichtbaren Bereich erfolgte. Weiterhin zeigen sie aufgrund ihrer ähnlichen Struktur eine sehr ähnliche

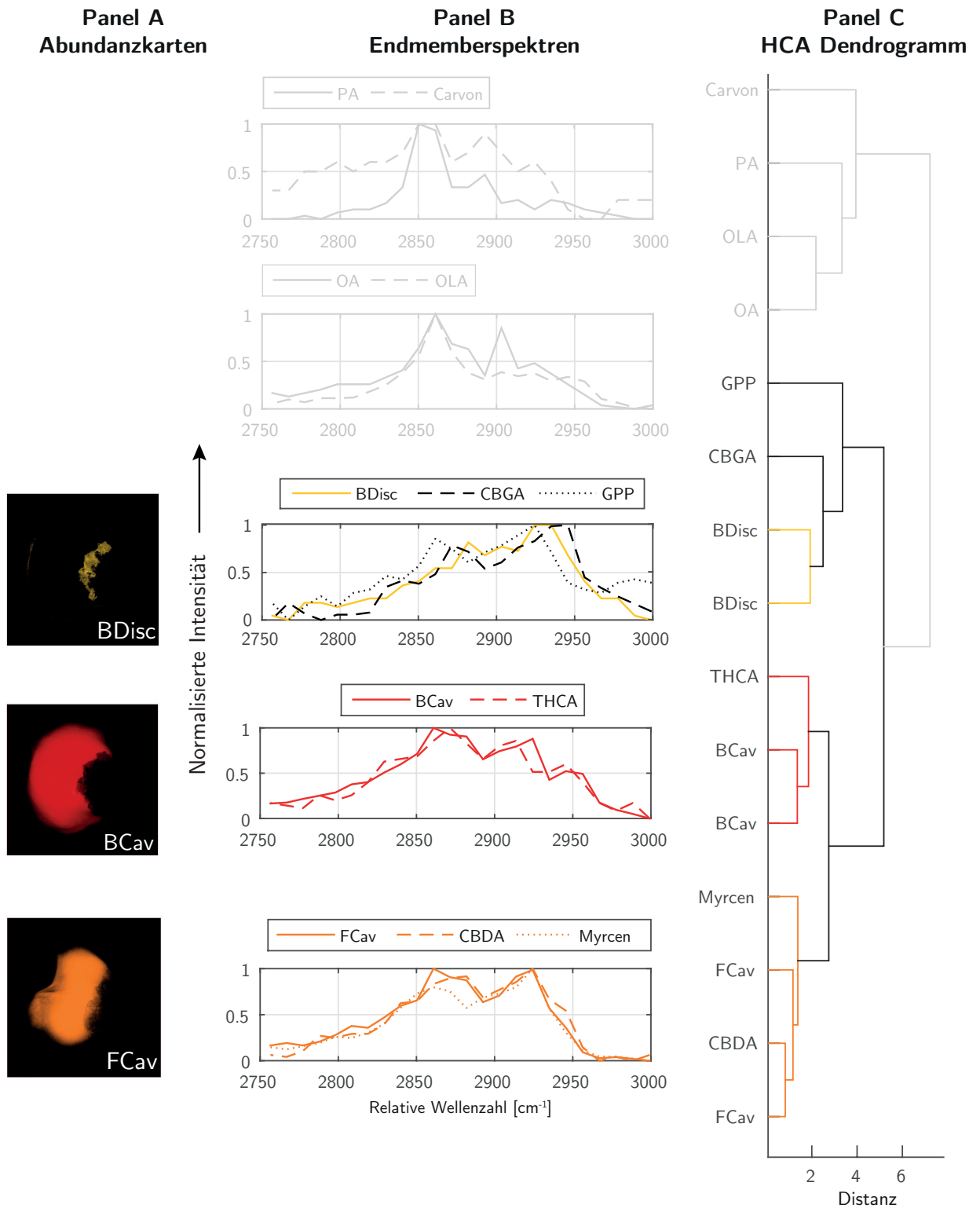


Abbildung 5.4: **Hierarchische Clusteranalyse von F-HCARS-Endmemberspektren von Referenzsubstanzen und glandulärer Trichome von *C. sativa* Bedrobinol (zwei Proben) und *C. sativa* Fedora (zwei Proben).** (Panel C) Visualisierung der spektralen Ähnlichkeit der HCA im Dendrogramm. Clustergruppen hoher Ähnlichkeit werden durch die gefärbte Verknüpfungen gekennzeichnet. Verknüpfungen ohne genaue Zuordnung werden grau dargestellt. (Panel B) Überlagerung ähnlicher Endmemberspektren. (Panel A) Entsprechende Abundanzkarten der gezeigten Endmemberspektren. Bezeichnungen erfolgten entsprechend dem Probenotyp (B = Bedrobinol; F = Fedora) und der Lokalisierung (Cav = sekretorischer Hohlraum; disk = Scheibenzellen). Die Abkürzungen der Referenzsubstanzen sind entsprechend Abbildung 5.1.

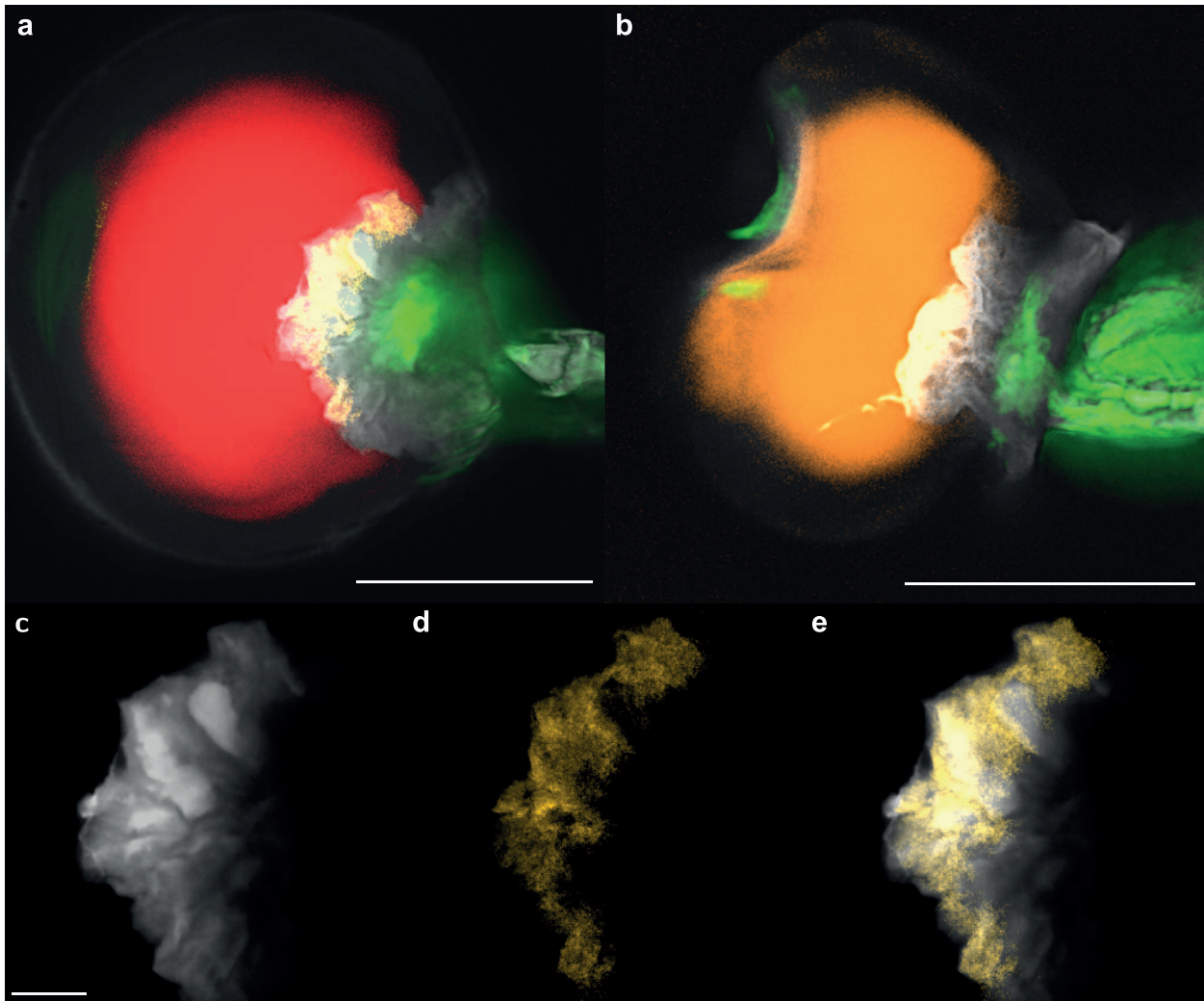


Abbildung 5.5: Überlagerung von F-HCARS Abundanzkarten und EPI-HTPF Abundanzkarten von (a) *C. sativa* Bedrobinol und (b) *C. sativa* Fedora. Rot: CH-Streckschwingungen ähnlich THCA; Geld: CH-Streckschwingungen am ähnlichsten zu CBGA; Orange: CH-Streckschwingungen ähnlich CBDA/Myrcen; Weiß: TPF organischer Substanzen (Emission 380 nm–560 nm); Grün: TPF von Chlorophyll a (Emission 560 nm–750 nm); (c-e) Detaillierte Ansicht der Scheibenzellen von Bedrobinol. (c) TPF organischer Substanzen heben die Morphologie der Scheibenzellen hervor. (d) F-HCARS Signale machen die Verteilung von CBGA und/oder einem komplexen Gemisch unterschiedlicher aliphatischer CH-reicher Substanzen kenntlich. (e) F-HCARS Signale decken sich mit Bereich organischer Fluoreszenz, was auf eine nahezu ausschließliche Verteilung von CBGA und/oder eines komplexen Gemisches unterschiedlicher aliphatischer CH-reicher Substanzen in den Scheibenzellen hinweist. Maßstab: (a, b) 50 µm; (c-e) 10 µm.

Fluoreszenz, was eine deutliche Differenzierung verhindert [139]. Eine selektive chemische Identifizierung des ätherischen Öls in den glandulären Trichomen auf Basis von Fluoreszenz ist daher auch mit ausgeklügelten Entmischungsmethoden schwierig. Aus diesem Grund wird die grüne Fluoreszenz hier nur genutzt, um eine generelle Verteilung organischer Fluorophore in den glandulären Trichomen zu erhalten. Diese organische Fluoreszenz ermöglicht in Kombination mit der Fluoreszenz von Chlorophyll a und den Transmissionsbildern eine eindeutige Differenzierung zwischen zellulären Komponenten (Stiel, Stiel- und Scheibenzellen) und den nichtzellulären Komponenten (sekretorischer Hohlraum) [148–150]. Die Lokalisierung sekundärer Metabolite in den glandulären Trichomen erfolgt mittels HCARS Bildgebung. Im Unterschied zu den breitbandigen Fluoreszenzspektren werden schärfere Banden generiert, die eine selektivere chemische Identifizierung ermöglichen. Die Anwendung der HCARS Bildgebung zur Detektion von THCA in glandulären Trichomen wurde bereits von Garbacik et al. [151] aufgezeigt. Die Untersuchung beschränkte sich jedoch auf getrocknetes und rehydriertes Pflanzenmaterial und verhinderte eine genaue Lokalisierung des THCA. Weitere Metabolite wurden gar nicht untersucht. Ein detaillierteres Bild hinsichtlich Morphologie und chemischer Information wird hier mittels der HCARS Bildgebung erzielt, zu einem weil eine strukturerhaltende Probenahmestrategie genutzt wird und zum anderen weil eine Entmischungsmethode zur Datenanalyse angewandt wird. Um die native Struktur zu erhalten, wurden intakte Trichome vorsichtig von in Flüssigstickstoff gefrorenen Cannabisblüten geklopft. Eine Trocknung der Trichome führt hingegen zu pseudo-morphologischen Strukturen wie die Aufnahmen während eines Trocknungsprozesses in Abbildung 5.2 d-f zeigen. Ein Bildung von Cryo-Artefakten z. B. die Zerstörung zellulärer Organellen oder subzellulärer Strukturen wie die sekretorischen Vesikel im Hohlraum kann nichtsdestotrotz auch nicht ausgeschlossen werden [149]. Die hier genannten Ergebnisse würde dies jedoch nicht beeinflussen. Die Entmischung der Daten erfolgt mittels eines Algorithmus der ursprünglich im Bereich der Fernerkundung genutzt wurde und die nichtlineare Natur von HCARS Daten erfasst und damit potentiell besser spektrale Variationen und Abundanzen in den Daten erkennt. Mit diesem Ansatz werden fein-spektrale Differenzen der CH-Streckschwingungen erfasst und von Fluoreszenz und residualen Rauschen getrennt. Es ist zu betonen, dass eine solche geometrisch basierte Methode nicht unbedingt die wirkliche Konzentration eines Analyten, sondern eher spektrale Differenzen in einem Bild erfasst. Um dies kenntlich zu machen, werden hier Begriffe aus dem Entmischungsbereich (z. B. Endmember, Abundanz) anstelle eher chemisch bezogener Terminologien verwendet (z. B. Konzentration). Nach dem Stand des Wissens wurde hier zum ersten mal eine nichtlineare Entmischungsmethode zur Evaluierung nichtlinearer CARS Daten biologischen Proben angewandt. Bisherige Publikationen im Bereich der Raman Mikro-Spektroskopie nutzten lineare Entmischungsmodelle wie den populären VCA Algorithmus [112, 152, 153]. Dieser wurde auch schon auf CARS-Daten angewandt [93]. Die Entmischung des F-HCARS Datensatzes erfolgte zunächst ohne Vektornormierung entlang der Spektren. Hierbei zeigt sich jedoch, dass die Entmischung zumeist nur Variationen der absoluten Intensitäten erfasst, was zu einer höhenprofilähnlichen Aufteilung des sekretorischen Hohlraum von innen nach außen führt. Um

eine Entmischung entsprechend der spektralen Differenzen zu erzielen, wurden die Spektren daher normiert. Dies bringt alle Spektren auf ein Intensitätslevel, sodass keine absoluten Intensitätsunterschiede mehr auftreten. Zur Entmischung der EPI-HTPF wurde dagegen auf eine solche Normierung verzichtet, da hier die Entmischung nur zur Entrauschung genutzt wurde. Die Ergebnisse zeigen auf, dass der neue Ansatz zur Bildgebung des chemischen Fingerabdruckes geeignet ist. Im Unterschied zu einer früheren Publikation wird nur eins der zwei gezeigten CARS Spektren detektiert (THC1) [151]. THCA kann aufgrund des einzigartigen Spektrums in den Trichomen identifiziert werden. Die Kombination der Ergebnisse der HCA und der Abundanzkarten zeigen, dass die sekretorischen Hohlräume der Trichome des Drogen-Typs zum Großteil THCA enthalten. Weniger klar ist die Zuordnung der spektralen Fingerabdrücke der sekretorischen Hohlräume des Faser-Typs und der Scheibenzellen des Drogen-Typs. Die Spektren der sekretorischen Hohlräume des Faser-Typs ähneln sowohl CBDA als auch Myrcen. Eine spektrale Unterscheidung der beiden Substanzen und damit individuelle Lokalisierung ist nicht möglich. Ebenso, sind die Spektren der Scheibenzellen des Drogen-Typs ähnlich dem Spektrum von CBGA, zeigen aber auch geringfügige Unterschiede, die auch auf die Präsenz eines komplexen Gemisches unterschiedlicher aliphatischer CH-reicher Substanzen schließen lassen. Nichtsdestotrotz, ist der Nachweis von THCA bzw. CBDA/Myrcen in den sekretorischen Hohlräumen des Drogen- bzw. Faser-Typs in Entsprechung mit dem Chemotyp [138, 154–156]: Während der Drogen-Typ vornehmlich THCA akkumuliert, ist bekannt, dass der Faser-Typ CBDA als Hauptcannabinoid in dem sekretorischem Hohlraum akkumuliert. Zudem ist die Verteilung der Cannabinnoide im Drogen-Typ im Einklang mit Untersuchungen zu der Biosynthese: Während die CBGA Produktion in den Scheibenzellen vermutet wird, ist der Produktionsort von THCA vermutlich innerhalb des sekretorischen Hohlraums lokalisiert [157]. Neben den aufgezeigten Limitierungen in der chemischen Selektivität chemisch ähnlicher Verbindungen (z. B. CBDA and Myrcen), ist die geringe Sensitivität von CARS eine der Hauptnachteile. Der nichtresonante Hintergrund und nichtlineare Charakter von CARS ermöglichen nur die Bildgebung und chemische Identifizierung der hochkonzentrierten Substanzen [12]. Ein detaillierteres Bild der Verteilung unterschiedlichster Metabolite ist daher nicht möglich. Einen Ausweg könnte die Kombination der HCARS Bildgebung mit anschließender Raman-Mikrospektroskopie in interessierten Regionen darstellen (z. B. sekretorischer Hohlraum, Scheiben- und Stielzellen). Dies könnte, sowohl die chemische Selektivität als auch die Sensitivität steigern. Im Unterschied zu HCARS ermöglicht die Raman-Mikrospektroskopie die Erfassung der selektiveren Fingerprint-Region unter 2000 cm^{-1} (siehe auch Abbildung 1.1). Die langen Aufnahmezeiten während einer Ramanmessung könnten durch Messung einzelner Regionen anstelle der ganzen Proben auf ein Minimum reduziert werden. Da die Raman-Streuung ein linearer Effekt ist, zeigt es im Unterschied zu CARS eine höhere Sensitivität gegenüber weniger häufigen Substanzen und kann möglicherweise sogar die Quantifizierung von Substanzen ermöglichen.

5.1.7 Schlussfolgerungen

In diesem Abschnitt wurde die CARS Mikroskopie in Kombination mit (Zwei-Photonen)-Fluoreszenz und Transmission zur Visualisierung der Hauptcannabinoide in intakten glandulären Trichomen von *Cannabis sativa* L. und Unterscheidung von unterschiedlichen Zelltypen angewandt. Die Transmissions- und (Zwei-Photonen) Fluoreszenz- Mikroskopie liefert strukturelle Information und ermöglicht die Differenzierung unterschiedlicher Kompartimente und Zelltypen. Die HCARS Bildgebung ermöglicht in Kombination mit einer nichtlinearen Entmischungsmethode die Unterscheidung THCA- und CBDA-reicher Cannabispflanzen als label-freie Methode auf Einzel-Trichom Level mit chemischer Selektivität und hoher spatialer Auflösung. Die Verteilung des ätherischen Öls und die Morphologie des Trichomes kann in einer Kombination aus CARS und TPF in 3D visualisiert werden. Da diese Art der Visualisierung ein Screening von Unterschieden in der chemischen Zusammensetzung einzelner Trichome ermöglicht, können Variationen innerhalb einer einzelnen Pflanze oder innerhalb desselben Genotypes untersucht werden. Zusätzlich kann die Methode zur Untersuchung des Einflusses abiotischer Einflussfaktoren wie Temperatur und Licht auf die Zusammensetzung des ätherischen Öls zur Bestimmung optimaler Erntezeiten eingesetzt werden.

5.2 Multivariate Auswertung von hyperspektralen CARS-Aufnahmen

5.2.1 Einleitung

Im Laufe der Arbeit wurden unterschiedliche multivariate Methoden zur Entmischung und Klassifizierung hyperspektraler CARS-Aufnahmen (HCARS) getestet. In diesem Abschnitt sollen Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden systematisch anhand einer HCARS-Aufnahme eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol untersucht werden. Ziel ist letztendlich die sogenannte chemische Bildgebung, also eine Substanz anhand eines spektralen Fingerprints in der Bildaufnahme zu lokalisieren. Neben einer hohen Genauigkeit sollte die Methode möglichst reproduzierbare, schnelle (z. B. für eine Online-Analytik) und einfach interpretierbare Ergebnisse liefern. Als zukünftiges Ziel ist zudem die relative und schließlich absolute Quantifizierung einer Substanz in einzelnen Bildbereichen zu nennen. Weiterhin sollen mögliche Anwendungsgebiete in der Vorprozessierung wie die Rauschunterdrückung aufgezeigt werden. Für nähere Informationen zu der Probe sei auf Abschnitt 5.1 verwiesen. Im Folgenden erfolgt ein kurzer Überblick bisheriger Publikationen zur multivariaten Auswertung von hyperspektralen Raman- und insbesondere CARS-Aufnahmen.

Die multivariate Auswertung von Raman-Spektren ist ein weitverbreitetes Tool zur automatisierten Prozesskontrolle in der Pharmaindustrie [158], Klassifizierung hyperspektraler Bilder in der Bioanalytik [100, 159] oder forensischen Analytik [160]. In der hyperspektralen Bildgebung mittels Raman (HRaman) wurden solche Methoden bereits in der Auswertung von HeLa-Zellen [96, 97], Pflanzenzellwänden [110] oder Arzneimittel-Tabletten [161] auf deren Eignung verglichen. In der Kohärenten Raman-Bildgebung sind die Anwendungen dagegen bisher übersichtlich (siehe z. B. Review im Bereich Histologie [20]). Ein Vergleich von Methoden ist in diesem Bereich nach dem Stand des Wissen noch nicht durchgeführt worden. Bisherige Anwendungen werden in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Am häufigsten kamen bisher die PCA [23, 89, 90, 162], SVD [163] oder Clusterverfahren [91, 163] zum Einsatz. Hauptanwendungsgebiet war dabei meist die Untersuchung der Verteilung von Fetten oder fettähnlicher Substanzen wie Cholesterol, aber auch Verteilung von Proteinen und Wasser in Geweben oder Zelllinien, da diese intensive CH/OH-Streckschwingungssignale generieren. Als weitere Anwendung ist die Differenzierung einzelner Strukturen zu nennen. Ist der Anspruch der multivariaten Methode eine Quantifizierung einzelner Substanzen so ist im CARS-Bereich eine Eliminierung des nichtresonanten Anteils durch Extraktion des Imaginärteils der resonanten Anteils üblich. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, beschränkt sich dieser Vorprozessierungsschritt bisher auf Untersuchungen mittels Broadband-CARS (BCARS) bei denen neben dem CH-Streckschwingungsbereich meist die Fingerprint-Region miterfasst wird, welche deutlich stärker von nichtresonanten Anteil überlagert wird (siehe Abschnitt 4.1.1). In diesem Zusammenhang ist insbesondere die sogenannte FSC3-Methode, eine

Variante der Nicht-negativen Matrixfaktorisierung (NMF) von Masia et al. [101] zu nennen. Sie wurde bereits zur quantitativen Bildgebung von gesättigten und ungesättigten Fetten in Adipozyten aus humanen Stammzellen [102] und zur Charakterisierung fixierter U2OS Zelllinien sowie embryonaler Stammzellen von Mäusen von BCARS-Aufnahmen angewandt [103]. Neben einer Phasenkorrektur wurde dabei eine SVD zur Rauschkorrektur vorgeschaltet. Zudem wurde die SVD zur Eliminierung von Rauschen, Ausreißern und Artefakten verwendet [101–103]. Untersuchungen im CH-Streckschwingungsbereich mittels Narrowband-CARS, deren Ziel primär einer Klassifizierung der Daten mittels multivariater Methoden ist, verzichten meist auf eine Phasenkorrektur, da der resonante Anteil in diesem Bereich genügend intensive Signale liefert, um sich von dem nichtresonanten Anteil abzusetzen und spezifische Fingerprints zu generieren. Hier ist insbesondere die Publikation von El-Mashtoly et al. [92] zu nennen, in der eine HCA zur Klassifizierung subzellulärer Strukturen im HCARS-Datensatz genutzt wurde, um letztendlich einen Random-Forest-Algorithmus mit CARS-Aufnahmen auf Strukturerkennung zu trainieren. Als Referenz wurden dabei gelabelte Immunofluoreszenzaufnahmen verwendet. EEA-Entmischungsalgorithmen, ursprünglich für den Bereich der hyperspektralen Bildgebung von Satellitenaufnahmen entwickelt, haben insbesondere mit dem populären VCA-Algorithmus mittlerweile auch Einzug in die mikrospektroskopische HRaman-Bildgebung gefunden [96, 97, 100, 110, 159]. Im HCARS-Bereich ist dagegen bisher nur eine Arbeit bekannt [93]. Tabarangao et al. nutzten die VCA zur multimodalen Kontrasterzeugung im Gewebe einer atherosklerotischen Kaninchenaorta.

Abbildung 5.6 zeigt das hier zu untersuchende hyperspektrale Bild eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol. Es hat eine Dimension von 801 Pixel in x-Richtung und 801 Pixel in y-Richtung bei 24 spektralen Bändern. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurde ein Medianfilter eingesetzt. Zudem erfolgte eine Vektornormierung entlang der Spektren.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse von HCA, PCA, SVD und EEA-Entmischungsalgorithmen diskutiert. Im Anschluss erfolgt ein vertiefter Vergleich der EEA-Entmischungsalgorithmen hinsichtlich Abundanzen, Modellfehler, Performance und Wiederholbarkeit. Neben dem populären VCA-Algorithmus wird ein neuartiger EEA-Entmischungs-Algorithmus auf Basis von Distanzmaßen getestet, welche frei wählbar sind. Als Distanzmaß werden Distanzen entlang eines sogenannten KNN-Graphen genutzt. Im Unterschied zu den anderen Methoden erfassen diese eine nichtlineare Struktur im spektralen Raum. Zum Vergleich wird der Algorithmus als lineare Version mittels euklidischer Distanzen ausgeführt.

5.2.2 Vergleich multivariater Methoden zur Entmischung und Klassifizierung hyperspektraler CARS-Aufnahmen

Abbildung 5.7 stellt die generierten Bilder und Spektren in Abhängigkeit des Algorithmus gegenüber. Im Folgenden sollen Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede und die sich daraus ergebenden Vor- und Nachteile sowie Anwendungsmöglichkeiten der jeweiligen Methode

Tabelle 5.1: **Übersicht bisheriger Anwendungen multivariater Methoden in der HCARS Bildgebung.** Die Anwendungen sind nach CARS-Typ sortiert [12]. Beim konventionellen (narrowband) CARS wird das hyperspektrale Bild durch schrittweise Aufnahme schmalbandiger Einzelbilder generiert. Anwendungen beschränken sich auf die intensiven Signale im CH-Streckschwingungsbereich (CH). In der Gruppe von Bocklitz erfolgt kmeans aus Performance-Gründen anhand der Scores der ersten acht Hauptkomponenten einer PCA [91]. Beim Broadband-CARS (BCARS oder Multiplex-CARS) erfolgt eine zeitgleiche Aufnahme der Spektren im Fingerprint-Bereich (FP) oder CH-Streckschwingungsbereich (CH). Als Vorprozessierungsschritt ist eine Phasenkorrektur (PK) zur Eliminierung des nichtresonanten Hintergrundes üblich. Beim Spectral-Focusing-CARS (Chirp-CARS) erfolgt die spektrale Aufnahme durch Überlagerung zeitlich versetzter Frequenzen.

	Methoden	Spektralbereich	Anwendung
CARS	PCA	CH/OH	Cholesterin im Plaque von Atherosklerose erkrankten Mäusen [89]
	PCA	CH	Fettverteilung in Meibom-Drüsen von Mäusen [90]
	8 PC-Scores-Kmeans	CH	Vergleich Clusterung einer Mundbodenbiopsie mittels HCARS und HSRS [91]
	HCA-Random-Forest	CH	automatisierte Erkennung subzellulärer Organellen [92]
BCARS	PK-SVD, PK-Kmeans	CH	Fettverteilung in Adipozyten [163]
	PK-PCA	FP, CH	Lokalisation von Zellorganellen im Moos <i>Plagiomnium rostratum</i> [162]
	SVD-PK-FSC3 [101]	FP, CH	Fettverteilung in Adipozyten aus humanen Stammzellen [102]
		CH	Verteilung von Lipiden, Cytosol-Protein, Wasser und Chromatin in fixierten U2OS Zelllinien [103]; SVD: Eliminierung von Rauschen, Ausreißern und Artefakten verwendet [101–103]
Chirp-CARS	PCA, VCA	CH	Erzeugung von multimodalem Kontrast im Gewebe einer atherosklerotischen Kaninchenaorta [23, 93]

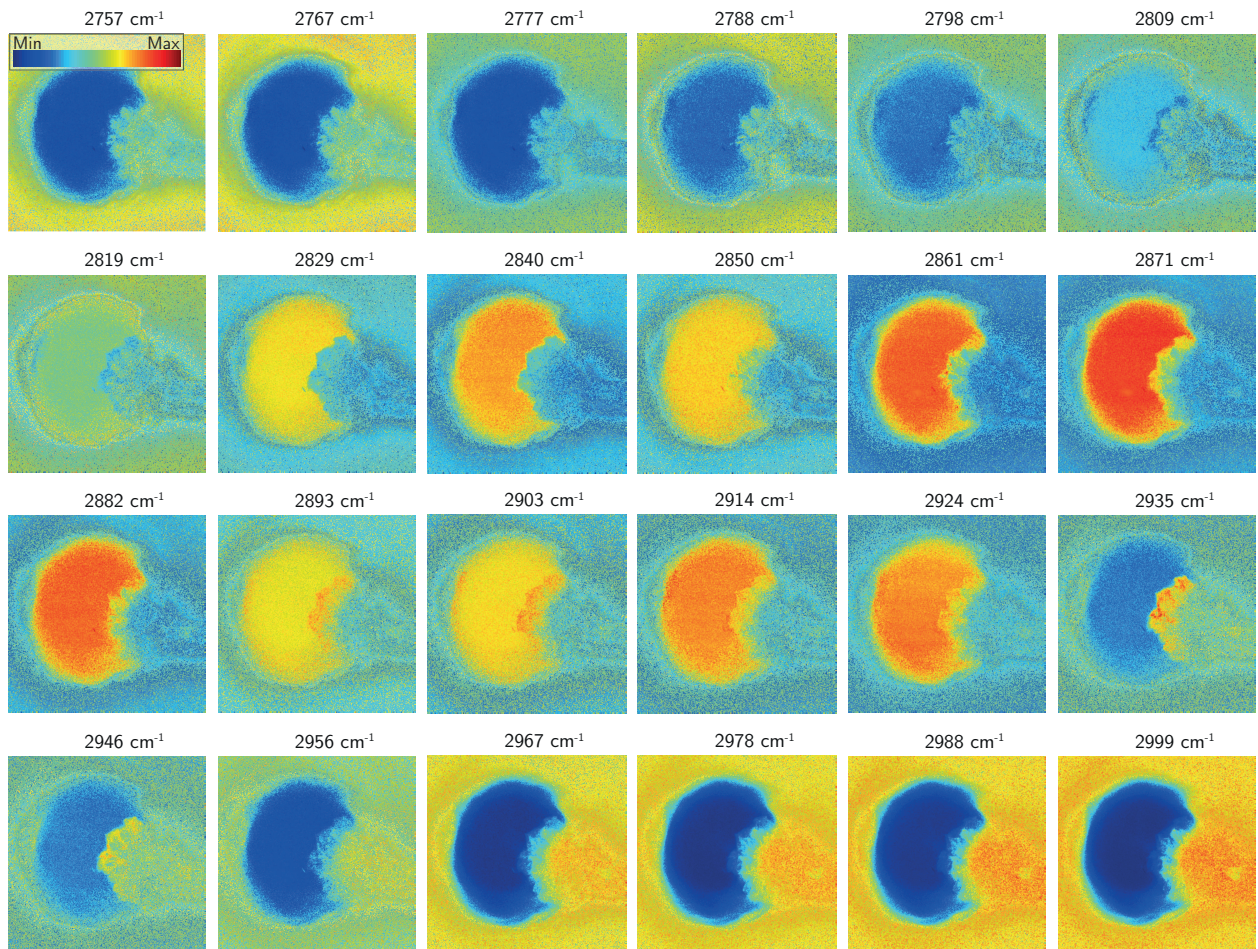


Abbildung 5.6: Vorprozessierte hyperspektrale HCARS-Aufnahme eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol. Zur Reduzierung der Signal-zu-Rauschverhältnisse erfolgte eine Medianfilterung im Bild. Entlang der Spektren erfolgte eine Vektornormierung.

verdeutlicht werden.

5.2.2.1 HCA

Die HCA ordnet jedem Pixelspektrum des hyperspektralen Datensatzes einem bestimmten Cluster zu, der hier als spezifische Farbe in einem Falschfarbenbild dargestellt wird. Hier erfolgt eine Unterteilung in sieben Cluster, was eine grobe aber übersichtliche Ähnlichkeitsanalyse ermöglicht. Die spektralen Merkmale eines Clusters werden über gemittelte Spektren dargestellt. Es erfolgt eine Trennung in CH-Streckschwingungen im Ölkörper (Cluster 1 und 2), den Randbereich des Ölkörpers und der Scheibenzellen (Cluster 3-4) und der Scheibenzellen (Cluster 5). Cluster 6 und 7 spiegeln die etwas steilere durch Zweiphotonen-Fluoreszenz überlagerte Basislinie und die weniger steile Basislinie des Hintergrundes wider. Die Änderung der Spektren zum Rand hin (Cluster 1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4) kommt durch eine allmähliche Abnahme der CH-Streckschwingungen und Zunahme von Fluoreszenz- und Hintergrundsignalen zum Rand hin zustande. Es entsteht ein einem Höhenprofil ähnelndes Bild. Beim Auftreten kontinuierlicher Spektralformänderungen ist eine solche „harte“ Clusterung eher ungeeignet da ein Großteil der Cluster zur Beschreibung dieser Änderung verwendet wird. Erst ab einer Clusteranzahl von sieben wird die spezifische CH-Streckschwingung der Scheibenzellen erkannt, deren Spektrum gegenüber den CH-Streckschwingungen im Ölkörper durch eine fehlende Bande bei 2840 cm^{-1} und 2946 cm^{-1} und leichte Rotlichtverschiebung charakterisiert wird. Eine harte Trennung zwischen einzelnen Regionen oder Kompartementen einer biologischen Probe tritt generell nahezu nie auf [97]. Aus diesem Grund sind harte Clusterverfahren oftmals weniger zur Klassifizierung hyperspektraler Bildaufnahmen dieser Proben geeignet. Dies wurde bereits in der Klassifizierung von HRaman-Bildern festgestellt [97].

5.2.2.2 PCA und SVD

Bei der Hauptkomponentenanalyse erfolgt eine Auftrennung des Datensatzes in Scores und Loadings zueinander unabhängiger Hauptkomponenten und Sortierung nach Informationsgehalt in Form der Variabilität. Die hier gezeigten ersten drei Hauptkomponenten beschreiben 85 % , 1.7 % und 1.1 % der Gesamtvariabilität des Datensatzes. Die Scores der Hauptkomponenten liefern im Unterschied zur Clusteranalyse ein Kontrastbild. Zusätzlich wird noch die letzte Hauptkomponente PC 24 gezeigt, deren Score-Bild ebenfalls einen Bildkontrast erzeugt jedoch nur 0.2 % der Variabilität beschreibt. Die restlichen Hauptkomponenten beschreiben vornehmlich unspezifische Variabilitäten im Bild, sodass ein Bildkontrast nur in geringem Maße erzeugt wird (siehe Abbildung A.2). Da die Hauptkomponenten mathematische Konstrukte sind, sind die Score-Bilder und Loading-Spektren oftmals schwer interpretierbar [97]. Die Intensitäten der Bilder und Spektren können sowohl positive als auch negative Werte annehmen. Anstelle von spektraler Signatur einzelner Substanzen, werden vielmehr Korrelationen einzelner Bänder zueinander sichtbar. Das Spektrum der ersten Hauptkomponente

zeigt beispielsweise positive Loadings im CH-Streckschwingungsbereich und negative Loadings im streckschwingungsfreien „Baseline“-Bereich. Die beiden Bereiche korrelieren negativ zueinander. Eine Zunahme der Scores in Richtung Mitte des Ölkörper beschreibt eine Zunahme der CH-Streckschwingungen jedoch eine Abnahme der baselinespezifischen Signale zur Mitte hin. Die Loadings zu höheren relativen Wellenzahlen nehmen dabei im stärkeren Maße ab als die Loadings bei niedrigeren Wellenzahlen, was auf abnehmende Steilheit der Baseline in Richtung Mitte zurückzuführen ist. Geringfügige Änderungen am Rand des Ölkörper werden zusätzlich durch PC 24 beschrieben. Im Unterschied zu PC 1 sind diese Variationen über das gesamte Spektrum zueinander positiv korreliert. PC 1 und PC 24 beschreiben somit zusammen vornehmlich den allmählichen Gradienten der CH-Streckschwingungen im Ölkörper zu den CH-Streckschwingungsfreien „Baseline“-Spektren außerhalb des Ölkörper, der bei der HCA durch die Cluster 1-4 und Cluster 7 beschrieben wird. PC 2 und 3 beschreiben hingegen Variationen die durch die spezifischen CH-Streckschwingungen in den Scheibenzellen und der Zwei-Photonen-Fluoreszenz im Stiel hervorgerufen werden und somit der Information der Cluster 5 und 6 der HCA entsprechen.

Die Ergebnisse einer SVD werden im Anhang in Abbildung A.2 darstellt. Aufgrund der fehlenden Spaltenzentrierung gegenüber einer PCA wird sie auch als unzentrierte PCA bezeichnet. Wie der direkte Vergleich von Abbildung A.3 und A.2 zeigt, sind die Scorebilder und Loadingspektren Ergebnisse der PCA und SVD nahezu identisch zueinander. Die Hauptkomponente der PCA entspricht dabei jeweils der nächsthöheren der unzentrierten Variante (PC 1 von PCA = PC 2 von SVD usw.). Somit fallen nur PC 1 der SVD und PC 24 der PCA aus dem System. Eine Trennung des durch PC 24 der PCA beschriebenen Randeffekts ist bei der SVD nicht in dem Maße ersichtlich. Die SVD spezifische Komponente PC 1 beschreibt ebenfalls diese allmähliche Änderung zum Rand hin, zusätzlich wird aber aufgrund der fehlenden Zentrierung noch der mittlere Abstand der Scores zum Koordinatenursprung mit eingerechnet. Da dieser mittlere Abstand offenbar gegenüber der inneren Variation relativ groß ist, wird die innere Variation im Score-Bild von PC 1 der SVD weniger ersichtlich. Die zentrierte Version ist somit offenbar etwas besser zur Trennung von Signal und Rauschen geeignet. Insgesamt sind die Ergebnisse der beiden Methoden jedoch erstaunlich ähnlich zueinander. Die Beziehungen zwischen einer normalen (spalten-zentrierten) PCA und SVD wurde bereits in [99] untersucht. Auch hier wurden ähnlichere Ergebnisse festgestellt als man erwarten würde.

5.2.2.3 EEA-Entmischen

Als EEA mit anschließender Entmischung wurden der bekannte VCA-NNLS Algorithmus [23, 93, 164] und der DMAXD-DSPU-Algorithmus getestet. Um den Einfluss des Distanzmaßes zu untersuchen wurde der Algorithmus mittels euklidischer Distanzen und Distanzen entlang eines KNN-Graphen durchgeführt. Abbildung 5.7 zeigt, dass alle drei Algorithmen das

hyperspektrale Bild in ähnlicher Weise separieren: Die Endmember beschreiben vornehmlich CH-Streckschwingungen im Ölkörper (EM 1), CH-Streckschwingungen in den Scheibenzellen (EM 2), Zwei-Photonenfluoreszenz im Stiel (EM 3) und residuales Rauschen (EM 4). Im Unterschied zur SVD zeigen die Endmemberspektren keine negativen Werte, was eine Interpretation erleichtert. Gegenüber der HCA liefert das Entmischen, Bilder mit graduellem Kontrast. Eine Intensitätsinformation bleibt daher erhalten.

5.2.3 Abundanzen, Modellfehler, Performance und Wiederholbarkeit der Endmember-Extraktions-Entmischungsalgorithmen

Die Abundanzen einer Entmischung können zur Kontrasterzeugung in einem Bild genutzt werden, um beispielsweise die Verteilung einer einzelnen Substanz in der Probe zu lokalisieren (siehe Abschnitt 5.1). Der ätherischen Öls im Ölkörper eines Trichomes eine interessante Fragestellung. Um ein solches Ziel in Zukunft zu erreichen, erfolgt daher im Folgenden eine tiefergehende Diskussion der Abundanzwerte im Ölkörper in Abhängigkeit der EEA-Entmischungsmethode. Wie sich zeigen wird, ergibt sich daraus auch direkt eine Diskussion des Modellfehlers. Neben der Richtigkeit des Modells ist die Performance ein nicht zu vernachlässigendes Kriterium, insbesondere wenn das bildgebende Verfahren als Online-Analytik z. B. für ein Hochdurchsatz-Screening angewendet werden soll. Die Reproduzierbarkeit oder Wiederholbarkeit eines Versuchsergebnisses ist in der Wissenschaft und insbesondere der Analytik ein weiteres wichtiges Kriterium. Wie sich zeigen wird, ist das Ergebnis eines „Computorexperimentes“ nicht so eindeutig wie es im ersten Moment vielleicht scheint.

5.2.3.1 Abundanzen im Ölkörper

Abbildung 5.8a stellt die Abundanzen der Endmember im Ölkörper gegenüber. Während EM 1 mittels VCA-NNLS (90 %) und Euklid-DMAXD-DPSU (95 %) ein Großteil der Abundanzen im Ölkörper ausmacht, ermittelt der KNN-DMAXD-DSPU eine Überlagerung der Ölkörper-spezifischen CH-Streckschwingungen EM 1 (73 %) mit den Scheibenzellen-spezifischen CH-Streckschwingungen EM 2 (19 %) im Ölkörper. Ursache dieses für eine Interpretation nicht unerheblichen Unterschiedes ist die Wahl des „reinsten Pixel“ von KNN-DMAXD-DSPU innerhalb eines speziellen Bereichs des Ölkörpers (siehe Abbildung 5.7e, Pfeil in EM 1). Dieser Bereich macht mit etwa 50 Pixeln gegenüber 10^5 Pixeln nur 0,05 % der Pixelanzahl im gesamten Ölkörper aus, zeigt jedoch eine, in dem hier betrachteten spektralen Bereich, geringfügige Abweichung vom Rest des Ölkörpers, insbesondere durch eine fehlende Bande bei 2840 cm^{-1} .¹ Wie die Spektren in Abbildung 5.8a zeigen macht eine Endmemberwahl

¹ In dem speziellen Bereich tritt auch eine Bande bei 3047 cm^{-1} auf, was auf CH-Streckschwingungen am Aromaten oder einer Alkengruppe hinweist jedoch hier nicht weiter analysiert wurde. Zusätzlich wird bei 561 nm Anregung eine deutlich erhöhte Transmission im Bereich 560 nm – 750 nm und erniedrigte Transmission im Bereich 380 nm – 560 nm gegenüber dem Rest des Ölkörpers festgestellt. Zudem ist die Zwei-Photonen-

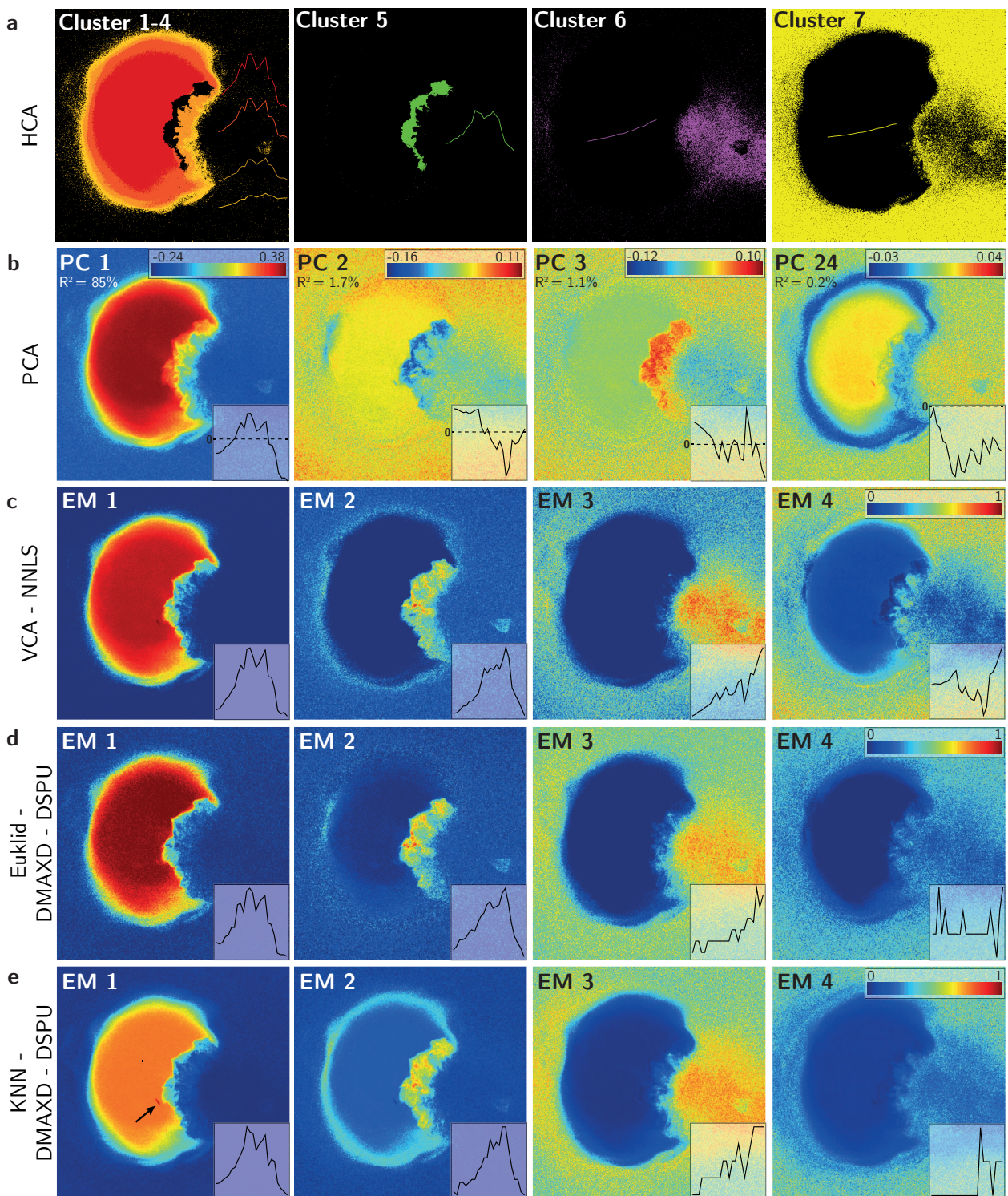


Abbildung 5.7: Vergleich der Entmischung einer hyperspektralen CARS-Aufnahme eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol mittels unterschiedlicher Algorithmen. (a) Die hierarchische Clusteranalyse (HCA) gruppiert die Spektren nach Ähnlichkeiten in CH-Stretching im Ölkörper (Cluster 1-2), Randbereiche (Cluster 3-4) und Scheibenzellen (Cluster 5). Cluster 6 und 7 beschreiben Zwei-Photonenfluoreszenz im Stiel und Hintergrund-Signale. (b) Die PCA gibt erste Hinweise auf die Komplexität des Datensatzes. Die dargestellten ersten drei Hauptkomponenten beschreiben 88% der Variabilität des Datensatzes. PC 24 beschreibt Rauschen im Randbereich des Ölkörpers. (c-e) Die EEA-Entmischungsalgorithmen separieren die HCARS-Aufnahme in vergleichbarer Weise in CH-Streckschwingungen im Ölkörper (EM 1), CH-Streckschwingungen in den Scheibenzellen (EM 2), Zwei-Photonenfluoreszenz im Stiel (EM 3) und residuales Rauschen (EM 4).

innerhalb dieses Bereichs insofern Sinn, als dass die CH-Streckschwingungen im Rest des Ölkörpers durch Überlagerung dieses Endmembers mit den Scheibenzellen-spezifischen CH-Streckschwingungen von EM 2 angenähert werden können. Die in EM 1 fehlende Bande bei 2840 cm^{-1} wird jedoch auch in Kombination mit EM 2 nicht beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass die nichtlineare Erfassung der internen Struktur des Datensatz offensichtlich Einfluss auf die Endmemberwahl hat, was zu nicht unerheblichen Unterschieden in Abundanzwerten führen kann.

5.2.3.2 Modellfehler

Abbildung 5.8b stellt den Modellfehler der drei Algorithmen gegenüber (Lack of fit, LOF, siehe Gleichung 4.2.4). Gezeigt werden die mittleren LOF-Werte über alle drei Dimensionen und in Abhängigkeit der x-,y-Position im Bild beziehungsweise der spektralen Bänder. Zudem wurde der Anteil der erklärten Varianz der Modelle nach Gleichung 4.2.4 berechnet, welche jedoch sehr ähnliche Ergebnisse liefern. Geringe Unterschiede zeigen jedoch die mittleren LOF-Werte. Der Datensatz wird im Mittel am besten durch den NNLS-VCA mit einem LOF von 8,88% gegenüber DMAXD-DSPU 9,47% und KNN-DMAXD-DSPU 10,87% beschrieben. Die Ursache der schlechteren mittleren Modellgüte wird durch Betrachtung der LOFs in Abhängigkeit von x, y und der Spektralbanden sichtbar. Aus der spektralen Abhängigkeit wird deutlich, dass der erhöhte Messfehler von KNN-DMAXD-DSPU aus Abweichungen im Bereich von 2967 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} und insbesondere 2840 cm^{-1} resultiert. Wie bereits oben beschrieben, wird die CH-Streckschwingungsbande bei 2840 cm^{-1} im Ölkörper durch eine Kombination von EM 1 und EM 2 mittels dem KNN-DMAXD-DSPU nicht beschrieben. Dieser Fehler macht sich bis auf die spezielle Region (ohne 2840 cm^{-1} -Bande) über den gesamten Bereich des Ölkörpers bemerkbar wie das LOF-Bild zeigt. Aufgrund der anteilig hohen Anzahl an Pixel im Ölkörper ergibt sich ein entsprechend großer Fehler. Die spezifische Region wird dagegen durch das Modell gut erfasst da hier EM 1 nahe 100% ist, hat jedoch aufgrund der geringen Pixelzahl nur geringen Einfluss auf die Gesamtgüte des Modells. Interessanterweise sind die Verhältnisse der Messfehler bei der euklidischen Distanz-Version des DMAXD-DSPU genau andersherum. Die CH-Streckschwingungen im Ölkörper werden bis auf die spezielle Region durch das Modell gut beschrieben, während die spezielle Region schlecht modelliert wird. Da sich die Modellgüte über eine größere Anzahl von Pixeln erstreckt ergibt sich somit insgesamt eine bessere Modellgüte mittels der euklidischen Distanz-Version gegenüber der KNN-Graphen-Distanz-Version. Die beiden Modelle verhalten sich komplementär zueinander. Ein Entmischungsmodell auf Basis von EM 1 beider Distanzmaße wäre somit eine Möglichkeit eine hohe Modellgüte sowohl im Ölkörper als auch in der spezifischen Region zu erzielen. Eine EEA sehr ähnlicher CH-Streckschwingungen wird weder

Fluoreszenz in Rückwärtsrichtung bei Anregung im IR-Bereich leicht erniedrigt (Emission: 560 nm–750 nm). Diese deutlich veränderten optischen Eigenschaften deuten auf eine andere chemische Zusammensetzung als im Rest des Ölkörpers. Auf eine tiefere Diskussion soll an dieser Stelle jedoch verzichtet werden.

als reine KNN-Version noch als Euklid-Version durch Erhöhung der Endmemberzahl erzielt. Offenbar sind EM 1 der euklidischen Version und EM 1 der KKN-Version spektral zu ähnlich, als dass sie mittels sequentieller orthogonaler Projektion, als einzelne Endmember erkannt werden. Eine kombinierte EEA wäre dagegen eine Möglichkeit auch sehr ähnliche Spektren, was oftmals bei CH-Streckschwingungen der Fall ist, als mögliche Endmember zu identifizieren. Um mögliche Nichtlinearitäten zu erfassen, sollte die darauffolgende Entmischung auf Basis des KNN-Graphen erfolgen.¹

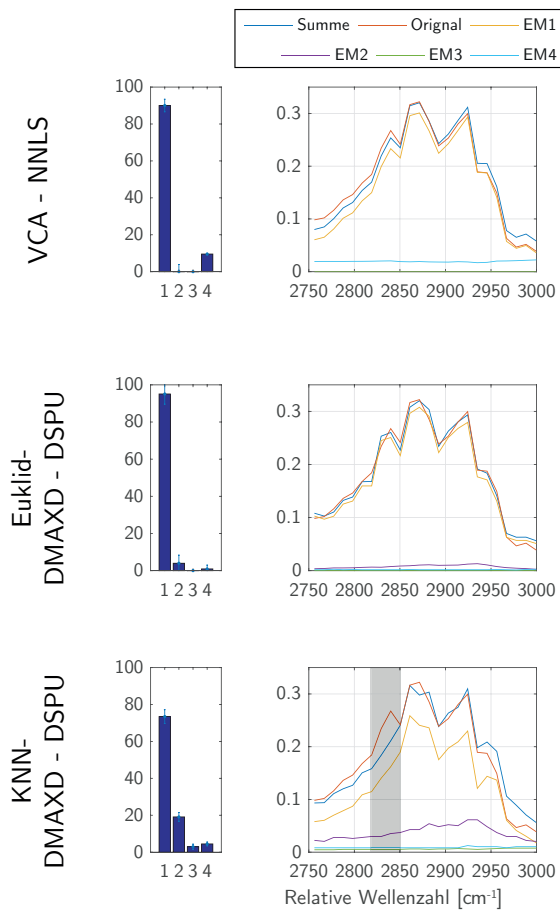
Die bessere Modellgüte des VCA-NNLS-Algorithmus gegenüber dem euklidischen DMAXD-DSPU-Algorithmus erklärt sich durch die kleineren Messfehler zur Beschreibung von Fluoreszenz und residualem Rauschen. Innerhalb des Ölkörpers ist der Modellfehler jedoch etwas schlechter. Der VCA-NNLS zeigt zwar im Mittel eine besser Modellanpassung, einzelne Bereich im Bild werden jedoch durch die DMAXD-DSPU-Algorithmen besser erfasst. Dies kann durch die im VCA-Algorithmus implementierte PCA Entrauschung erklärt werden, welche noch vor der Endmember-Extraktion durchgeführt wird. Bei einem Vier-Endmember-Modell werden nur die Spektralinformationen der ersten vier Hauptkomponenten zur Endmembersuche berücksichtigt. Dies reduziert die Rauschsensitivität und den Rechenaufwand, kann jedoch auch zur Folge haben, dass feine spektrale Unterschiede bei der Endmembersuche unterdrückt werden [165]. So kann anhand der Score-Bilder und Loading-Spektren der Hauptkomponenten in Abbildung A.2 nachvollzogen werden, dass ein Großteil der spektralen Variabilität bei 2850 cm^{-1} im Ölkörper durch die Hauptkomponenten PC 15, PC 16 und PC 24 beschrieben wird. Bei der VCA EEA geht diese Information aufgrund der PCA somit verloren. Die „geglätteten“ Endmemberspektren der VCA spiegeln zwar besser die Hauptvariation des Datensatzes wider und ermöglichen so eine insgesamt bessere Modellanpassung, feine spektrale Signaturen, welche beispielsweise für einen Spektralvergleich mit Reinsubstanzen entscheidend sein können, werden mittels der VCA-Endmemberspektren jedoch weniger erfasst. So ermittelten Heylen et al. eine weniger eindeutige Zuordnung von Endmemberspektren der VCA zu Reinsubstanzspektren gegenüber Endmemberspektren einer SGA, einer sehr ähnlichen Variante des MaxD-Algorithmus [114]. Chang et al. machten ähnliche Beobachtungen beim Vergleich der Spektrenzuordnung von EEAs mit und ohne vorhergehende PCA und empfahl auf eine vorhergehende PCA-Glättung zu verzichten, um die spektrale Information in den Endmembers zu erhalten [165].

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Der VCA-NNLS hat im Mittel die beste Modellanpassung, beschreibt aber aufgrund „geglätteter“ Endmemberspektren „endmemberspezifische“ Regionen mit hoher lokaler Abundanz schlechter. Diese werden mittels des Euklid- und KNN-

¹ Häckcheneffekt: Grafisch kann man sich eine solche Kombination von Endmemberspektren am Besten anhand einer Häckchen-Struktur \surd erklären: Wenn ein erster Endmember oben rechts vom Häckchen gegeben ist, würde der nächste Endmember mit maximaler euklidischer Distanz am unteren Bogen des Häckchens gewählt werden. Der KKN-Graph würde dagegen die nichtlineare Struktur des Häckchens erkennen und den nächsten Endmember am Ende des Bogens wählen. Die drei Endmember in Kombination würden somit sämtliche Eckpunkte der Struktur des Häckchens abstecken.

DMAXD-DSPU-Algorithmus besser beschrieben. Die Euklidische und KKN-Version sind dabei komplementär zueinander. Eine Region die von der einen Version gut beschrieben wird, wird von der anderen schlecht beschrieben. Eine Kombination der Endmember beider Versionen wäre eventuell eine Option, eine Modell mit sowohl guter mittlerer Modellanpassung als auch Erfassung von spektraler Feinheiten in den Endmembers zu generieren.

a Abundanzen im Ölkörper



b Modellfehler

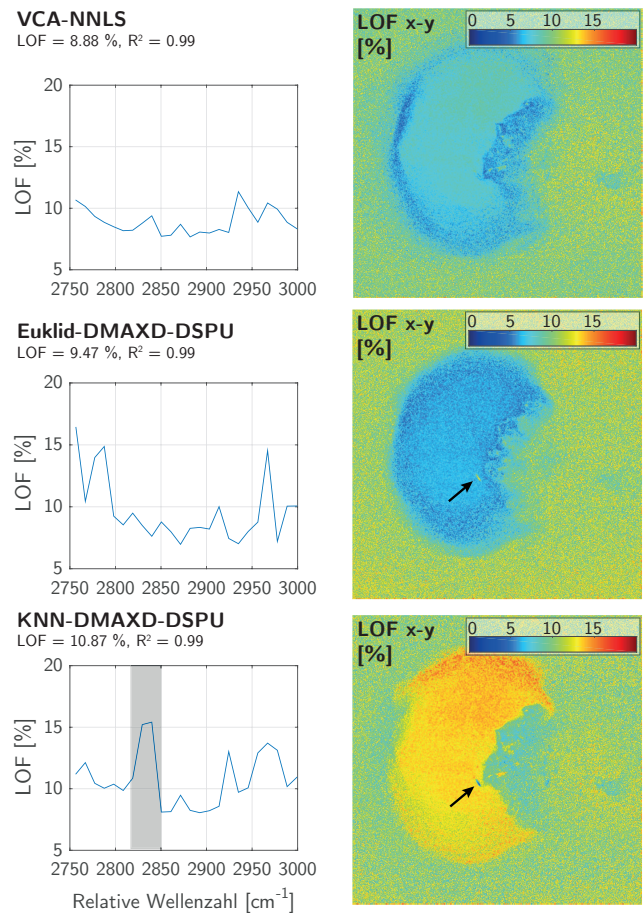


Abbildung 5.8: Abundanzen und Modellfehler der EEA-Entmischung einer HCARS-Aufnahme eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol mittels VCA-NNLS, Euklid-, und KNN-DMAXD-DSPU. (a) Mittlere Abundanzen im Ölkörper: Die CH-Streckschwingungen im Ölkörper werden mittels VCA-NNLS und Euklid-DMAXD-DSPU zum Großteil durch EM 1 beschrieben und mittels KNN-DMAXD-DSPU als Mischung von EM 1 und EM 2. Die dargestellten Spektren der Endmember wurden über die mittleren Abundanzen skaliert. Die Bande bei 2840 cm^{-1} wird mittels des KNN-DMAXD-DSPU-Modells nicht erfasst (grau hinterlegt). (b) Modellfehler: Vergleich der Modellfehler (engl. lack of fit, LOF) in Abhängigkeit von x,y und der Spektralbanden. VCA-NNLS hat im Mittel den kleinsten LOF und beschreibt am besten den Datensatz. Der hohe LOF von KNN-DMAXD-DSPU resultiert aus der Endmemberwahl von EM 1 in einem speziellen Bereich des Ölkörpers (siehe Pfeil). Die fehlenden Bande bei 2840 cm^{-1} führt zu einem hohen Fehler zur Beschreibung der Spektren innerhalb des Ölkörpers. Der VCC-NNLS zeigt zwar im Mittel die beste Modellanpassung, einzelne Bereiche werden jedoch besser durch die DMAXD-DSPU-Algorithmen beschrieben (Euklidische Variante: Ölkörper, KNN-Variante: spezieller Bereich im Ölkörper).

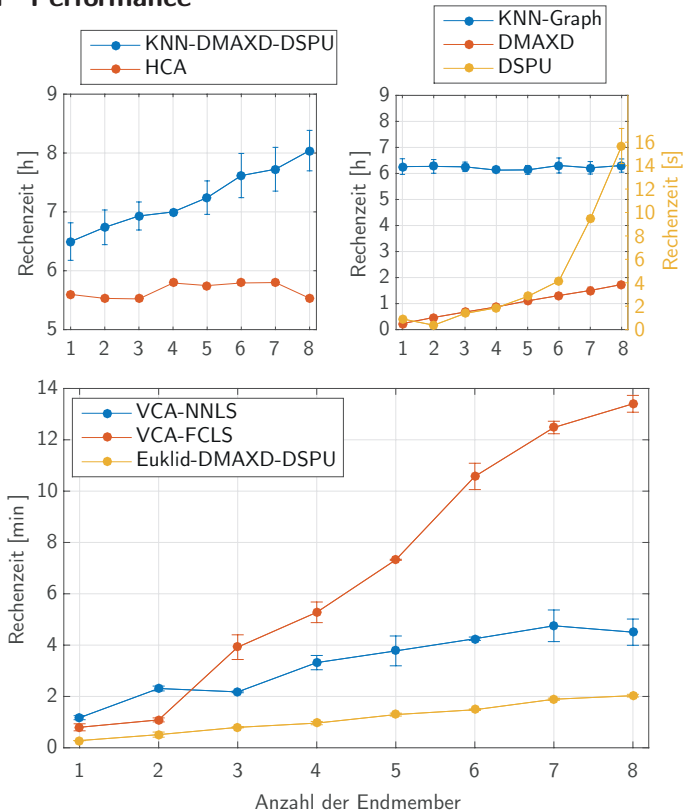
5.2.3.3 Performance

Die Performance wurde an einem Server in Abhängigkeit der Komplexizität des Modells, also der Endmemberanzahl ermittelt. Der KNN-DMAXD-DSPU-Algorithmus benötigt für die EEA-Entmischung 6,5 h für einen Endmember bis 8 h für ein acht Endmember-Modell und liegt damit noch höher als die rechenaufwendige HCA, welche zum Vergleich gezeigt wird. Die Rechenzeit steigt dabei in etwa linear mit der Endmemberzahl an. Eine Separierung in die einzelnen Rechenschritte zeigt, dass der hohe Rechenaufwand vor allem aus der Berechnung des KNN-Graphen zur Erfassung möglicher Nichtlinearitäten (hier mit $K = 10$) resultiert. Die Rechenzeit beträgt mit 6,2 h 78 % (acht Endmember) bis 95 % (ein Endmember) der Gesamtzeit. Die restliche Zeit wird für die Endmember-Extraktion mittels DMAXD benötigt. Der DSPU ist vernachlässigbar und läuft innerhalb von Sekunden durch. Eine sehr viel schnellere EEA-Entmischung innerhalb von Minuten wird durch die linearen Algorithmen erzielt. Die Entmischung der VCA-Endmember erfolgte mittels des NNLS- und FCLS-Algorithmus (siehe Abschnitt 4.2.4.1). Beide Algorithmen berechneten nahezu identische Abundanzkarten (siehe Abbildung A.4). Der NNLS zeigt aufgrund der fehlenden Summe-zu-Eins-Bedingung jedoch eine sehr viel bessere Performance, sodass dieser bevorzugt eingesetzt werden sollte. Interessanterweise schlägt die lineare euklidische Version des DMAXD-DSPU den für seine Rechenpower bekannten VCA-Algorithmus mit NNLS. Der Euklid-DMAXD-DSPU ist für eine „Online-Analytik“ im Anschluss an eine Messung somit eine gute Alternative zum dem populären VCA-Algorithmus. Die nichtlineare Version KNN-DMAXD-DSPU ist aufgrund der hohen Rechenzeit dagegen nicht für Sofortauswertungen geeignet. Die Berechnung sollte z. B. über Nacht stattfinden. Zu betonen sei hierbei jedoch noch, dass die zeitaufwendige Berechnung des KNN-Graphen nur einmal durchgeführt werden muss und z. B. für unterschiedliche Endmemberzahlmodelle oder andere KNN-Graph basierende Algorithmen wiederholt eingesetzt werden kann.

5.2.3.4 Wiederholbarkeit

Die drei Algorithmen wurden über den Server als Vier-Endmember-Modell fünfmal hintereinander ausgeführt. In Abbildung 5.9 sind zur Veranschaulichung die Abundanzkarten des Endmembers EM 2 dargestellt (Abundanzkarten aller Endmember in Abbildung A.4). Der VCA-NNLS-Algorithmus liefert nach jedem Durchlauf geringfügig andere Ergebnisse. Der Euklid-DMAXD-DSPU und KNN-DMAXD-DSPU liefern dagegen jedes mal das gleiche Ergebnis. Die abweichenden Ergebnisse mittels VCA-NNLS sind auf die VCA EEA zurückzuführen (siehe Abschnitt 4.2.4.1). Die Randomisierung des VCA wurde bereits ausführlich im Bereich der hyperspektralen Fernerkundung untersucht und diskutiert [114, 165, 166]. In der Literatur zur Entmischung hyperspektraler Raman- oder CARS-Aufnahmen wurde dieser Nachteil trotz der hohen Popularität des Algorithmus nach aktuellem Stand des Wissens bisher jedoch nicht berücksichtigt [93, 96, 97, 100, 110, 159]. An dieser Stelle soll

a Performance



b Wiederholbarkeit

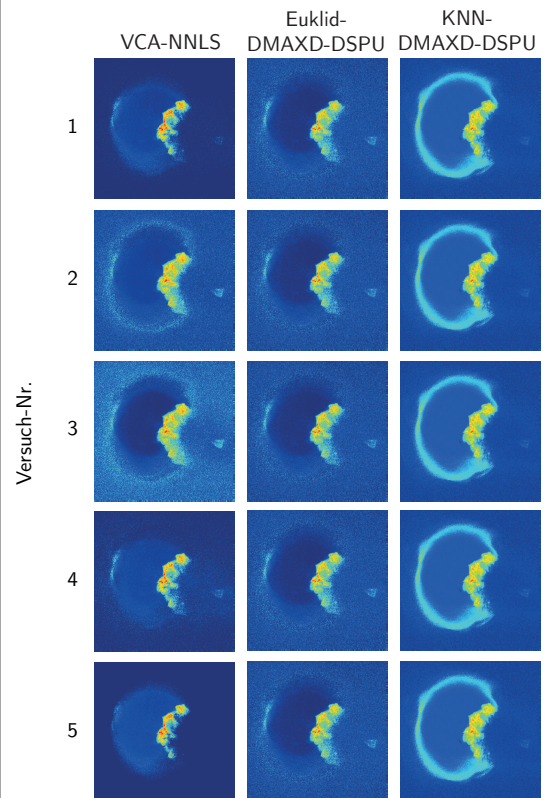


Abbildung 5.9: **Performance und Wiederholbarkeit der EEA-Entmischung einer HCARS-Aufnahme eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol mittels VCA-NNLS, Euklid-, und KNN-DMAXD-DSPU.** (a) Rechenzeit in Abhängigkeit der Anzahl der Endmember: Der KNN-DMAXD-DSPU-Algorithmus erfordert eine Rechenzeit im Stundenbereich (Vier-EM-Modell: 7 h), was vor allem auf die Berechnung des KNN-Graphen zurückzuführen ist. Schnellere EEA-Entmischungen im Minutenbereich sind mittels des linearen Euklid-DMAXD-DSPU (Vier-EM-Modell: 1 min) oder VCA-NNLS (Vier-EM-Modell: 3,3 min, VCA-FCLS 5,3 min) möglich. (b) Wiederholbarkeit: Fünfmaliges Ausführen der Algorithmen zeigt die Randomisierung des VCA-Algorithmus auf. Diese liefert mit jedem Versuch ein etwas anderes Ergebnis wie beispielhaft anhand der Abundanzkarten von EM2 gezeigt wird. Euklid- und KNN-DMAXD-DSPU liefern dagegen aufgrund der Determiniertheit des DMAXD immer das gleiche Ergebnis.

nur auf dieses Problem aufmerksam gemacht werden. Welchen Einfluss die geringfügigen Variabilitäten der Endmemberspektren und daraus generierten Abundanzkarten auf z. B. eine Spektrenzuordnung, Quantifizierung mittels Abundanzen oder als Input für ein Datentraining [167] haben sollte gerade wegen der Popularität des Algorithmus in jedem Fall systematisch untersucht werden. Festzuhalten ist, dass die Determiniertheit des DMAXD ein klarer Vorteil gegenüber dem randomisierten VCA ist.

5.2.4 Schlussfolgerungen

Die Vor- und Nachteile und mögliche Anwendungen der unüberwachten multivariaten Methoden zur Auswertung von HCARS-Aufnahmen werden in Tabelle 5.2 aufgezeigt. Die Hierarchische Clusteranalyse (HCA) liefert aufgrund der harten Clusterung eine übersichtliche Klassifizierung der Pixel als Falschfarbenbild, erzeugt jedoch keine graduellen Kontrastbilder und ist eher ungeeignet beim Vorliegen von Übergangsbereichen, wie sie in der Regel bei biologischen Proben auftreten. Feinere spektrale Unterschiede werden dann nur durch eine hohe Clusterzahl erzielt. Da sie sehr rechenaufwendig ist, ist sie eher zur Ähnlichkeitsanalyse einzelner Spektren z. B. von Endmitgliedern einer EEA geeignet. Eine schnellere Alternative zur harten Clusteranalyse von HCARS-Bildern wäre Kmeans [91].

Die Hauptkomponentenanalyse wurde in bisherigen Publikationen entweder als normale spaltenzentrierte Version (PCA) oder als unzentrierte Version (SVD) zur Separierung hyperspektraler Bilder eingesetzt. Der direkte Vergleich zeigt, dass die PCA eine etwas bessere Trennung von Signal und Rauschen ermöglicht. Ansonsten zeigen beide Varianten aber eine ähnliche Auftrennung und Sortierung nach Informationsgehalt (Varibilität). Beide Varianten sind damit prinzipiell geeignet, die Komplexität des Datensatzes abzuschätzen, z. B. um die Anzahl der benötigten Endmitglieder einer EEA abzuschätzen oder um Rauschen, Ausreißer oder Artefakte aus dem Datensatz zu entfernen. Die Spektren zeigen Korrelationen zwischen einzelnen Spektralbändern auf, sind jedoch als mathematisches Konstrukt schwer interpretierbar. Welche der Varianten die bessere ist, muss im Zweifel der direkte Vergleich zeigen.

Die EEA-Entmischung-Algorithmen liefern eine ähnliche Separierung der HCARS-Daten nach Endmitgliedern. Die erzeugten Endmemberspektren und Abundanzkarten sind im Unterschied zur PCA leicht interpretierbar. Die erzeugten Abundanzkarten sind jedoch in hohem Maße von einzelnen Pixeln im Bild den Endmitgliedern abhängig. Die EEA-Wahl sollte daher insbesondere mit Hinblick auf eine Quantifizierung mittels der Abundanzen kritisch betrachtet werden. Der populäre VCA-Algorithmus mit anschließender NNLS-Entmischung liefert die beste mittlere Modellanpassung aufgrund „geglätteter“ Endmitglieder. Einzelne Bereiche im Bild und feine spektrale Unterschiede können dadurch jedoch schlechter beschrieben werden. Weiterhin ist der VCA-Algorithmus randomisiert und liefert somit nicht immer die gleichen Endmemberspektren und Abundanzkarten. Der DMAXD-DSPU wurde hier als Alternative zur populären VCA-basierten Entmischung getestet. Er ist ein sehr vielseitig einsetzbarer EEA-Entmischungsalgorithmus, da unterschiedliche Distanzmaße verwendet werden können. Hier wurde die lineare euklidische Version und KNN-Graph-Version getestet, welche nichtlineare Strukturen im Datensatz erfasst. Unterschiede wurden hier in der Endmemberextraktion festgestellt, welche sich auf die Abundanzkarten auswirken und durch die Modellfehleranalyse verdeutlicht werden. Im Unterschied zur VCA, erfassen die Endmemberspektren feinere spektrale Unterschiede und ermöglichen daher eine bessere Modellanpassung in den

jeweiligen Bereich des Endmembers mit hoher lokaler Abundanz, jedoch eine schlechtere Gesamtmodellanpassung. Der Vergleich der Modellanpassung beider Versionen zeigt, dass beide Versionen komplementär zueinander sind. Eine Kombination von Endmembers beider Modelle wäre daher eine Möglichkeit ein Modell mit sowohl hoher statistischer Güte als auch zur Erfassung feiner spektraler Unterschiede zu generieren. Die KNN-Graph-Version ist insbesondere aufgrund der KNN-Graph Berechnung ähnlich einer HCA sehr rechenaufwendig und sollte z. B. über Nacht erfolgen. Die euklidische Version ist dagegen sogar schneller als die VCA. Ein großer Vorteil des DMAXD gegenüber der VCA ist die Determiniertheit der EEA. Im Unterschied zur VCA liefern die die DMAXD basierten Algorithmen immer das gleiche Ergebnis. Eine Alternative zur EEA-Entmischung, insbesondere bei stark vermischten HCARS Daten, kann die Nicht-negative Matrixfaktorisierung (MCR-ALS [109], FSC3 [101]) darstellen, da sie keiner Reinen Pixel Annahme zugrundeliegt.

Tabelle 5.2: **Vor- und Nachteile und Anwendungsmöglichkeiten der multivariaten Methoden zur Auswertung von HCARS-Aufnahmen.**

	Vorteile	Nachteile	Anwendung
HCA	übersichtlich	kein gradueller Kontrast rechenaufwendig Übergangsbereiche: feine Unterschiede nur mit hoher Clusteranzahl [97]	Ähnlichkeitsanalyse einzelner Spektren z.B. Endmember
PCA/SVD	Sortierung nach Informationsgehalt Trennung von Signal und Rauschen	schwer interpretierbar: Korrelationen anstelle chemischer Signaturen	Abschätzung der Komplexität Sichtbarmachung von Korrelationen Filtern von Rauschen , Ausreißen und Artefakten [101–103]
EEA-Entmischen	Spektren als chemische Signaturen leicht interpretierbar	Reine Pixel Annahme, fehleranfällig: Basiert auf einzelne Pixel	chemische Kontrastbilder (Quantifizierung)
VCA-NNLS	gute Modellanpassung schnell	spektrale Feinheiten gehen unter nur linear randomisiert	chemische Kontrastbilder (linear) (Quantifizierung)
DMAXD-DSPU	Vielseitigkeit spektrale Feinheiten linear+nichtlinear (KNN) schnell (Euklid) Komplementarität: Euklid + KNN deterministisch	schlechtere Modellanpassung rechenaufwändig (KNN) nur linear (Euklid)	chemische Kontrastbilder (linear und nichtlinear) (Quantifizierung)

5.3 Laser-Scanning SERS-Hintergrund Mikroskopie – Ein vielseitiges Werkzeug zu einer zuverlässigeren SERS-Analytik

5.3.1 Einleitung

Der SERS-Effekt ist ein schwer zu kontrollierender komplexer Prozess, der auf einer Drei-Körper-Wechselwirkung zwischen Photonen, Molekülen und Nanostrukturen basiert [25]. Höchste Sensitivität bis hin zu einer Einzelmoleküldetektion wird in kleinen Nanolücken des Substrates erzielt, den Hot Spots. Diese machen oftmals jedoch nur einen kleinen Bereich des Substrates aus und sind daher schwer auffindbar [168]. Weiterhin liefern sie zwar eine extreme Verstärkung eines Raman-Signals eines Analyten innerhalb diesen Spots und sind damit Hauptverursacher für den SERS-Effekt [168], sind dadurch aber gleichzeitig für die Unzuverlässigkeit einer SERS-Messung aufgrund von Signalfuktuationen verantwortlich [39, 40]. Aufgrund der extremen Verstärkung können sich schnell Photoreaktionen durch eine Karbonisierung bemerkbar machen. Da die Verstärkungseffizienz von der Wellenlänge abhängt, kommt es außerdem zu einem störenden plasmonischen Spektralform-Effekt [32, 52]. Eine Strategie ist daher die Entwicklung sogenannter lückenfreier SERS-Substrate („Hot surface“ anstelle von „Hot Spots“ [32]) [39, 41, 42]. Diese haben besser kontrollierbare optische Eigenschaften, zeigen bisher jedoch nur eine moderate Sensitivität [41]. Für hochsensitive SERS-Messungen ist nach wie vor die Messung direkt im Hot Spot unabdingbar. Diese ist nicht nur für Einzelmoleküldetektion erforderlich, sondern auch um die molekulare Universalität zu steigern, also um eine Detektion von Analyten mit schlechtem Steuquerschnitt und/oder Adsorption am SERS-Substrat mit ausreichender Sensitivität zu ermöglichen [25].

Um die Reproduzierbarkeit sowohl auf Seiten eines SERS-Substrates als auch bei der SERS-Messung selber zu verbessern wird hier ein Hilfsmittel vorgestellt, die Laser-Scanning SERS-Hintergrund Mikroskopie (SERS-BG). Die Methode macht sich zu Nutze, dass SERS-Spektren ein, ähnlich dem Fluoreszenzphänomen, rotlichtverschobenes breitbandiges Hintergrundsignal zeigen, deren Ursprung jedoch nicht genau geklärt ist (siehe Abschnitt 2.6.3). Der SERS-BG wird für die analytische Praxis insofern interessant, als dass sich eine Korrelation zwischen Analyt-Bandenintensität und der SERS-BG-Signale von SERS-Spektren eines SERS-Substrates nachweisen lässt [70, 71]. Da die SERS-BG Bildgebung diese Signale in Summe erfasst, sollte dieser Zusammenhang auch auf die SERS-BG Bildgebung übertragbar sein. Diese bildet die Basis für die angewandte SERS-BG Mikroskopie, da so schnell analytsensitive Regionen auf einem SERS-Substrat ausfindig gemacht werden könnten. Die SERS-BG Bildgebung wurde bereits zur Untersuchung des Einflusses von Halogeniden auf immobilisierten Silber NPs [169], Ursprung des SERS-BG in silbernanostrukturiertem Film [66] und zur Bildgebung von plasmonischen Nanoaggregaten [170] angewandt. Die Bilderzeugung erfolgte

durch Stage-Scanning [66, 170] oder Weitfeld-Belichtung [169]. Im Unterschied zu diesen Untersuchungen werden hier mehr die Anwendungsmöglichkeiten für die analytische Praxis und die Vielseitigkeit der Methode insbesondere in Kombination mit anderen Methoden herausgestellt. Weithin werden hier nach Stand des Wissens erstmals die Zusammenhänge zwischen bildgebendem SERS-BG und SERS-BG- und Analyt-Signalen eines Spektrums beleuchtet. Als weiterer Unterschied erfolgt hier die SERS-BG Bildgebung mittels eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops und Erfassung der Summe des Signals mittels empfindlicher HyD-Fluoreszenzdetektoren (siehe Abschnitt 3.5). Dadurch kann ein für die Bildgebung ausreichend hohes Signal erzielt werden, um ein sehr schnelles Abscannen großer Flächen des SERS-Substrates zu ermöglichen. Das schnelle Abscannen großer Flächen reduziert die Wahrscheinlichkeit von Photoreaktionen und macht es für die Qualitätskontrolle von SERS-Substraten und zur Auffindung potentieller Hot Spots vor der eigentlichen SERS-Messung interessant. Zu erwähnen ist, dass die SERS-BG Bildgebung alle rotlichverschobenen Signale erfasst, also sowohl den eigentlichen SERS-BG als auch mögliche Analytsignale. Da die Fläche unter den Analytbanden im Normalfall gegenüber der Fläche des SERS-BG vernachlässigbar klein sein sollte, wird aber allgemein von SERS-BG gesprochen.¹

Die Vielseitigkeit der Methode wird anhand eines kommerziellen „High Performance“ Goldsubstrates, dem „Mato“ SERS-Substrate von ATO ID exemplarisch vorgestellt [43]. Adenosintriphosphat (ATP) wird aufgrund der Relevanz als universeller Energieträger in vielen biochemischen Prozessen als Analyt ausgewählt. Zunächst wird die zugrundeliegende Idee zur Lokalisierung von Hot Spots und deren Beziehung zu den spektralen Information des SERS-Spektrums experimentell aufgezeigt. Anschließend wird gezeigt, wie zusätzliche Information durch Verwendung mehrerer Detektoren generiert werden kann, um damit mögliche Störquellen (Karbonisierung und plasmonischer Spektralform Effekt) zu identifizieren oder weitere optische Eigenschaften (Reflexion, Transmission, Absorption) für eine besser Charakterisierung des SERS-Substrates zu ermöglichen. Zudem wird der Zusammenhang dieser optischen Eigenschaften zur Mikro- und Nanostruktur mittels REM aufgezeigt.

5.3.2 Methoden

Das Mato SERS-Substrate wird mittels eines patentierten Femtosekunden-Laser-Verfahrens nanostrukturiert [43]. Laut Herstellerangaben ist es ein stochastisch nanostrukturiertes Substrat und enthält Features von ein paar Nanometern bis nahezu einem Mikrometer in Größe und ist eher für eine Spurenstoffdetektion als für quantitative Messungen geeignet. Aufgrund der heterogenen Nanostruktur ist es für einen breiten Anregungsbereich einsetzbar. Um quantitative Messungen zu ermöglichen wird eine Mehrfachmessung gemittelter SERS-

¹ Wie sich herausstellen wird, ist diese Annahme beim Vorliegen extrem verstärkten amorphem Kohlenstoffs nicht ganz richtig. Hier können die Integrale der breitbandigen Signale in der Größenordnung des SERS-BG liegen. Von dieser Eigenschaft wird hier ebenfalls Gebrauch gemacht.

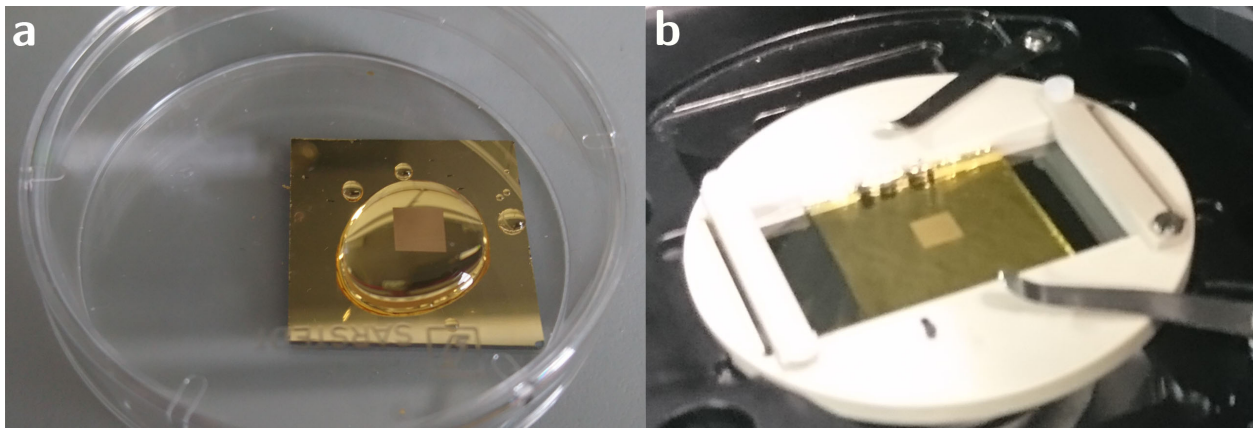


Abbildung 5.10: **Probenpräparation des Mato Substrates.** (a) Versetzung mit 500 μL einer 100 μM ATP-Lösung. (b) Aufbau unter Mikroskop mit Probenhalterung.

Signale durch Fokussierung eines Laserspots mit einer Mindestgröße von 20 μm empfohlen. Eine solche Signalmittelung führt zu einer besseren Spot zu Spot Reproduzierbarkeit [171] und kann zu einer Verringerung des plasmonischen Spektralform-Effekts führen [32], erfordert jedoch eine Aufweitung des Laserstrahls, wie sie nur mit apparativen Änderungen oder Defokussierung des Laserstrahl und dadurch möglicherweise erhöhten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen mit dem hier verwendeten Laser-Scanning Mikroskop realisierbar ist [171]. Um die Vielseitigkeit der SERS-BG Bildgebung-Methode in hoher Auflösung aufzuzeigen, erfolgt hier entgegen der Herstellerangaben eine starke Fokussierung des Laserstrahls. Aufgrund der heterogenen Struktur ist das Substrat der ideale Kandidat, um die Einsatzmöglichkeiten insbesondere in der Charakterisierung von SERS-Substraten zu demonstrieren.

5.3.2.1 Probenpräparation

Für die Adsorption des Analyten auf das Mato Substrat werden ein Aliquot von 500 μL Volumen 100 μM ATP gelöst in Gefi-Puffer mit einer Pipette auf dem Zentrum gebracht (pH 8, 20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 ; Abbildung 5.10 a). Nach 10 Minuten Imprägnierzeit wird der Großteil des Tropfens vorsichtig mit der Pipette ohne direkten Kontakt zur nanostrukturierten Fläche aufgezogen und entfernt. Restbeständen wird eine Eintrocknung ermöglicht. Das präparierte Substrat wird zwischen zwei Deckgläser (Menzel-Gläser 25 mm \times 50 mm, # 1) platziert und mit einem selbsthergestellten Probenhalter fixiert (Abbildung 5.10 b).

5.3.2.2 Messungen

Die SERS-BG Bildung erfolgt bei einer Anregung von 633 nm mit 60 % Laserintensität und Detektion mittels eines HyD-Detektors im Photonenzähl-Modus in EPI-Richtung im konfokalen Modus des Leica TCS SP8 CARS (Emission von 640 nm–720 nm, 512x512 Pixel,

Geschwindigkeit 10 Zeilen/s, Zoomfaktor 2,5, 73,8 μm physikalische Länge, 63-faches Objektiv). Der Photonenzähl-Modus soll ein lineares Ansprechverhalten für eine quantitative Korrelationsanalyse gewährleisten (siehe Abschnitt 3.5). Die Auto-Fokus-Kontrolle wurde zur Stabilisierung der Bildposition eingesetzt. Zusätzlich spektral getrennte SERS-Hintergrund Bilder wurden auf die gleiche Weise durch Verwendung zweier HyD-Detektoren bestimmt (Emission von 640 nm–675 nm und 680 nm–720 nm). Transmissionsbilder wurden zeitgleich mittels des CARS PMT-Detektors in Vorwärtsrichtung aufgenommen (Emission von 560 nm–750 nm). Reflexionsbilder werden zuvor bei 1 % Laserintensität mittels eines PMT-Detektor in Rückwärtsrichtung unter Verwendung des „RT 15/85“ Strahlungsteilers mit ansonsten identischer Messeinstellung aufgenommen (Emission von 630 nm–636 nm, siehe auch Fussnote 2 auf Seite 32). Das ankommende Laserlicht wird zuvor durch einen Laserlinienfilter bereinigt und entspricht etwa 1,8 mW bei 60 % bzw. 0,03 mW bei 1 % Ausgangsleistung an der Probe. Für eine Korrelation zu REM Bildern wurden xyz-Bilder an der zuvor mittels REM untersuchten Stelle aufgenommen und mittels einer Maximum Intensität Projektion in ein 2D-Bild umgewandelt.

Die SERS-Spektren wurden mit identischen optischen Einstellungen unter Verwendung des „Bleach Point“-Modus in der Leica Software generiert. Dieser ermöglicht eine punktweise Laserbestrahlung (Anregung bei 633 nm mit 20 % Laserintensität und 12 s Beleuchtungszeit). Pixel-für-Pixel Spektren wurden durch manuelles Verschieben des „Bleach Point“-Cursors von Pixel zu Pixel der zuvor aufgenommenen SERS-BG Bilder aufgenommen (physikalische Pixelgröße 144 nm). Die Spektren wurden mit einem Spektrographen mit CCD Kamera gekoppelt über eine optische Faser am Lichtausgang des Leica Detektor Systems im Bereich von 565 cm^{-1} – 1765 cm^{-1} aufgenommen (Princeton Instruments, 10 s Aufnahmezeit, Gitter mit 1200 Strichen/mm auf 1200 cm^{-1} zentriert). Die Laserleistung war etwa 0,6 mW auf der Probe. Für die Korrelationsanalyse von Spektren und Bilddaten wurden die SERS-BG Bildgebung vor und nach der Aufnahme von bis zu 11 Spektren aufgenommen und diese Prozedur zweimal wiederholt.

5.3.2.3 Datenprozessierung

Die Datenvorprozessierung und Auswertung erfolgte in Matlab R2015a. Die SERS-BG und Banden-Intensitäten der spektralen Daten wurden mittels trapezförmiger numerischer Integration bestimmt (trapz). Während der SERS-BG Bildgebung und pixelweisen Spektralaufnahme kam es zu einer ungeklärten Verschiebung in x- und y-Richtung trotz der Auto-Fokus-Kontrolle. Die optimale Verschiebungskorrektur wurde durch eine pixelweise Korrelationsanalyse der Intensitäten der SERS-BG im Spektrum und der Intensitäten der SERS-BG ermittelt (siehe Abbildung A.6).

5.3.3 Zusammenhang zwischen Analyt-Signalverstärkung, spektralem und bildgebendem SERS-Hintergrund

Abbildung 5.11 zeigt den Zusammenhang zwischen Analyt-Signalverstärkung, dem spektralem und bildgebendem SERS-Hintergrund (SERS-BG) eines Mato SERS-Substrates versetzt mit einer 100 μM ATP-Lösung auf. Das SERS-Hintergrund-Bild in Abbildung 5.11a wurde bei einer Anregung von 633 nm und Messung des rotlichtverschobenen Lichtes im Bereich 640 nm–720 nm generiert. Lokal hohe Intensitäten werden in einzelnen Punkten mit einem Durchmesser von bis zu 1 μm festgestellt. Die Intensitäten steigen in den Punkten kontinuierlich zu Mitte an und deuten auf das Vorhandensein diffraktionslimitierter Nanostrukturen, den Hot Spots im Zentrum maximaler Intensität hin (siehe auch Abschnitt 3.4). Um eine echte SERS Signalverstärkung einzelner spektraler Banden nachzuweisen, wurden zwei Hot Spot-Regionen hoher Signalverstärkung entlang der x-Richtung pixelweise spektral charakterisiert (Abbildung 5.11 d). Hot Spot 1 zeigt eine Verstärkung von Analyt-Banden des ATP bei 731 cm^{-1} , 1006 cm^{-1} und 1334 cm^{-1} . Diese sind auf die Ringatmung des Adeninrings [172–175], Phosphatschwingungen [176] bzw. C5-N7- und C=N-Streckschwingungen im Adeninring [172] zurückzuführen. In Hot Spot 2 wird dagegen ein Verstärkung zweier breitbandiger Signale bei 1313 cm^{-1} und 1592 cm^{-1} , dem D- und G-Band von amorphem Kohlenstoff (AC) festgestellt (siehe auch Abschnitt 2.6.4). In Entsprechung zu den SERS-BG-Bildintensitäten wird eine gradueller Signalanstieg des spektralen SERS-Hintergrundes und der ATP- bzw. AC-Banden in Richtung Hot Spot Zentrum festgestellt. Weiterhin konnte ein zeitlich abhängiger Anstieg des AC-Verstärkung festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass es sich um eine Photoprodukt handelt. Zur Quantifizierung des spektralen SERS-Hintergrundes, der ATP- bzw. AC-Verstärkung wird das Integral des gesamten Spektrum, der Bande bei 732 cm^{-1} bzw. 1592 cm^{-1} bestimmt (Abbildung 5.11 b).

In Abbildung 5.11 c werden die Pixelintensitäten von Hot Spot 1 und 2 aus Abbildung 5.11 a mit den nach Abbildung 5.11 b extrahierten spektralen Intensitäten pixelweise in x-Richtung verglichen. In Hot Spot 1 stimmt der Verlauf der ATP Signalverstärkung sowohl mit dem Verlauf des spektralen SERS-Hintergrundes ($R^2 = 0,97$) als auch mit dem bildgebendem SERS-Hintergrund ($R^2 = 0,93$) überein. Die ATP-Signal steigt von $0,3 \cdot 10^4$ an den Hot Spot-Rändern zu $3,4 \cdot 10^4$ im Hot Spot Zentrum, was einer 11-fachen Signalverstärkung vom Rand zur Mitte entspricht. Im Hot Spot 2 wird ebenso ein ähnlicher Intensitätsverlauf zwischen der AC-Bande bei 1592 cm^{-1} und dem spektralem bzw. bildegebendem SERS-Hintergrund festgestellt. Eine lineare Beziehung konnte jedoch nur zwischen der AC-Bande und dem spektralem SERS-Hintergrund bestimmt werden ($R^2 = 1$). Aufgrund der Übersättigung des HyD-Detektors in drei zentralen Pixel ergibt sich eine Sättigungskurve in der $I_{\text{AC}} \propto I_{\text{img}}$ und $I_{\text{BG}} \propto I_{\text{img}}$ Abhängigkeit und ein Plateau in den Distanzprofilen. Die Übersättigung des Detektorsignals in diesen Pixeln ist auf die ausgesprochen hohe SERS-Verstärkung zurückzuführen. So ist der spektrale SERS-Hintergrund der AC-signalverstärkten Spektren in

Hot Spot 2 im Schnitt vier mal größer als der spektrale Hintergrund der ATP-Signalverstärkten Spektren in Hot Spot 1.

Die Beobachtungen zeigen, dass die mittels Laser-Scanning Mikroskopie generierten Bilder rotlichtverschobenen Lichtes eine Lokalisierung der Hot Spot-Regionen des SERS-Substrates ermöglichen. Der exakte Ort des Hot Spots befindet sich im Zentrum des diffraktionslimitierten Punktes. Hier wird sowohl eine maximale Bildintensität als auch maximale Signalverstärkung einzelner Banden festgestellt. Wie gezeigt wurde, liegt diesem Zusammenhang eine lineare Abhängigkeit der Signalverstärkung einzelner Banden und der Signalverstärkung des Hintergrundes zugrunde. Da die Bildintensitäten diesen Hintergrund, als aufsummiertes Signal eines SERS-Spektrums erfassen, spiegeln die Bildintensitäten diesen linearen Zusammenhang wider. Eine Unterscheidung der Signalverstärkungsart z. B. zwischen Analytbandenverstärkung und ungewollter AC-Bandenverstärkung ist mittels dieser SERS-Hintergrund Bildgebungsmethode jedoch nicht vorhersagbar.

5.3.4 Variationsanalyse in Hot Spots mittels multimodaler SERS-Hintergrund Bildgebung

Um Variationen entlang des SERS-Spektrums erfassen zu können, kann die SERS-Hintergrund Bildgebung auf mehrere Kanäle entlang des Spektrums aufgeteilt werden. Um weiterhin schnelle Messungen mit ausreichender Signalintensität zu ermöglichen, können die Bereiche jedoch nicht beliebig klein gewählt werden. Im Folgenden wird dieser multimodale Ansatz zur Unterscheidung von Analyt-Banden verstärkter und störender amorpher Kohlenstoff verstärkter Hot Spots aufgezeigt. Die Messung erfolgt mittels zweier HyD-Detektoren: Der SERS-BG-Kanal erfasst den SERS-Hintergrund des gesamten Fingerprint-Bereiches von 640 nm–720 nm. Der SERS-BG-AC-Kanal beschränkt sich auf den Bereich der D- und G-Bande des amorphen Kohlenstoffs von 680 nm–720 nm.

Abbildung 5.12 zeigt einen exemplarischen Vergleich der SERS-BG und SERS-BG-AC Bildgebung zweier Hot Spots. Die Nahaufnahmen offenbaren eine höhere Intensität im SERS-BG-Kanal gegenüber dem SERS-BG-AC-Kanal in Hot Spot 3. In Hot Spot 4 werden in beiden Kanälen hohe Intensitätswerte bestimmt. Die spektrale Auswertung zeigt, dass die hohen Intensitätswerte im SERS-BG-AC-Kanal des Hot Spot 4 auf amorphe Kohlenstoff-Banden zurückzuführen ist. Das Spektrum von Hot Spot 3 zeigt dagegen ausschließlich eine Verstärkung der ATP-Banden. Die geringe Intensität im SERS-BG-AC-Kanal macht sich durch einen ungewöhnlich starken Abfall des SERS-BG zu höheren relativen Wellenzahlen im Spektrum bemerkbar. In ähnlicher Weise ist eine deutliche Abnahme der Bandenintensitäten des ATP zu höheren relativen Wellenzahlen zu beobachten, was auf die gleiche Ursache hindeutet: Spektrale Variationen des SERS-BG und Analytbanden sind auf Variationen der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanzen im SERS-Substrat zurückzuführen, welche sowohl die Verstärkung SERS-Hintergrundes- als auch die der SERS-Analyt-Signale modulieren

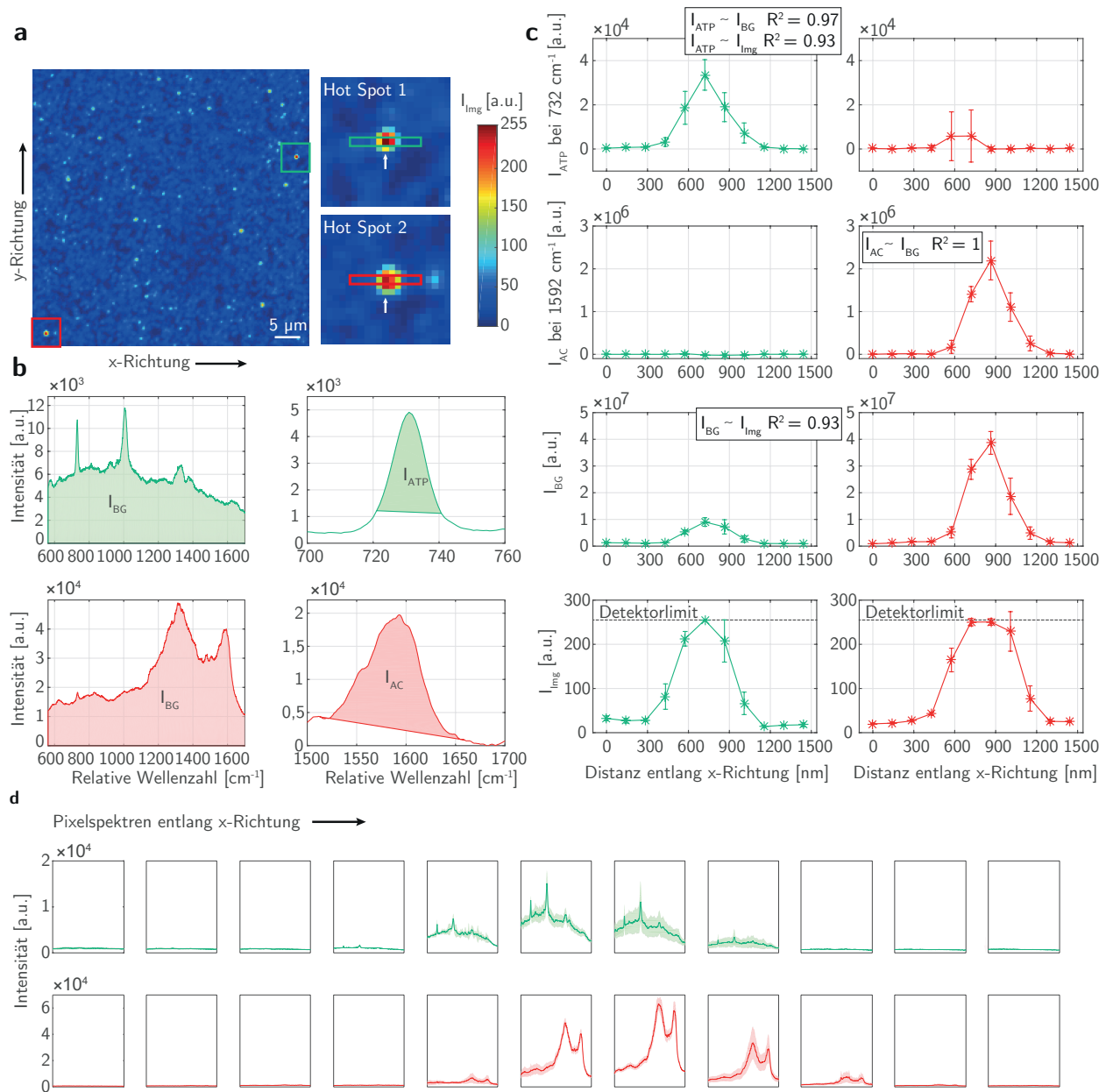


Abbildung 5.11: Zusammenhang zwischen Analyt-Signalverstärkung, spektralem und bildgebendem SERS-Hintergrund eines kommerziellen SERS-Substrates versetzt mit einer ATP-Lösung. Zudem wird der Zusammenhang zu „störendem“ verstärktem amorphem Kohlenstoff aufgezeigt. (a) SERS-Hintergrund Bild eines Mato-Substrates versetzt mit einer 100 μM -Lösung von ATP (Anregung bei 633 nm, Emission 640 nm–720 nm). Zwei Hot Spots wurden entlang der x-Richtung pixelweise spektral untersucht. Die Bildintensitäten (I_{img}) werden als Heatmap visualisiert. (b) Pixelweise spektrale Bestimmung der Intensität des SERS-Hintergrundes (I_{BG}), der Intensität der ATP Bande bei 723 cm^{-1} (I_{ATP}) und der Intensität des G-Bandes von amorphem Kohlenstoff bei 1592 cm^{-1} (I_{AC}). Gezeigt wird ein Spektrum eines Pixels von Hot Spot 1 (grün) und Hot Spot 2 (rot) markiert mittels des weißen Pfeils in (a). (c) Vergleich der Bildintensität I_{img} mit den spektralen Daten I_{BF} , I_{AC} und I_{ATP} entlang der x-Richtung von Hot Spot 1 (grün) und Hot Spot 2 (rot). (d) Pixelspektren entlang der x-Richtung von Hot Spot 1 (grün) und Hot Spot 2 (rot). Gezeigt werden der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Spektren pro Pixel.

[52] (siehe auch Abschnitt 2.6.3.2). Eine Anhebung des SERS-BG in bestimmten spektralen Bereich führt entsprechend zu einer Anhebung der spektralen Banden in diesem Bereich, was zu nicht zu vernachlässigenden Problemen bei der Spektralanalyse führen kann und als plasmonischer Spektralform-Effekt bezeichnet wird. Eine Abschätzung des plasmonischen Spektralform-Effekts mittels der hier aufgezeigten multimodalen SERS-BG Bildgebung könnte daher auch eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle von SERS-Substraten spielen.

Um allgemeinere Schlüsse auf die gesamte Aufnahme zu ziehen, werden die Pixelintensitäten in Hot Spot 3 und 4 des SERS-BG- und SERS-BG-AC-Kanals den Pixelintensitäten aller Hot Spots gegenübergestellt. Der Vergleich der SERS-BG-Intensitätsverteilung im Box-Plot in Abbildung 5.12 i zeigt, dass Hot Spot 4 die höchsten Pixelintensitätswerte enthält. Auf den ersten Blick scheint eine ungewöhnlich hohe Intensität des SERS-BG daher eine gutes Indiz für eine Karbonisierung innerhalb diesen Hot Spots zu sein. In Mittel sind die Intensitätswerte von Hot Spot 4 jedoch nicht signifikant unterschiedlich von den anderen Hot Spots. Geringere Überlagerungen werden bei den SERS-BG-AC-Intensitätsverteilungen in Abbildung 5.12 j ermittelt, was auf eine bessere Unterscheidung der Analyt-Banden verstärkter und amorphem Kohlenstoff verstärkter Hot Spots hinweist. Neben den Absolutintensitätswerten können Intensitätsverhältnisse des SERS-BG und SERS-BG-AC ein geeignetes Unterscheidungsmaß darstellen (Abbildung 5.12 k). Diese sollten im Unterschied zu den Absolutwerten ausschließlich die Spektralform des entsprechenden SERS-BG Spektrums widerspiegeln und wäre somit beispielsweise geeignet Variationen aufgrund des plasmonischen Spektralform-Effektes zu untersuchen. Hot Spot 3 und 4 werden hier jeweils dem oberen bzw. unteren Bereich der Verteilung aller Hot Spots zugeordnet (P75 und P25 Wert). Offenbar zeigt ein Viertel der Pixelspektren einen Hot Spot 3 ähnlichen oder steileren Abfall des SERS-BG zu höheren relativen Wellenzahlen und ein anderes Viertel eine zu Hot Spot 4 ähnliche oder ausgeprägtere Erhöhung der Signalintensitäten zu relativen absoluten Wellenzahlen.

Neben der schnellen Auffindung potentiell geeigneter analytsensitiver Hot Spots ist diese Methode aufgrund der hohen Geschwindigkeit interessant für die Qualitätskontrolle von SERS-Substraten. Diese erfordert an erster Stelle eine schnelle Bestimmung von Qualitätsmaßen z. B. Intensitäts- bzw. Spektralformvariationen. An zweiter Stelle kann dann eine Ursachenbestimmung der Variationen durch Spektralanalyse signifikant unterschiedlicher Bereiche erfolgen, um z. B. zwischen der Karbonisierung und einem plasmonischen Spektralform-Effekt zu unterscheiden. Dieser Ansatz stellt somit immer dann eine Alternative zu einer herkömmlichen hyperspektralen Bildanalyse dar, wenn eine hohe Geschwindigkeit erforderlich ist.

5.3.5 Multimodale Charakterisierung eines SERS-Substrates mittels Reflexion, SERS-Hintergrund und Transmission

Um zusätzliche optische Eigenschaften des SERS-Substrates zu erfassen, wird die SERS-Hintergrund Mikroskopie mit Reflexions- und Transmissionsmessungen kombiniert. Die

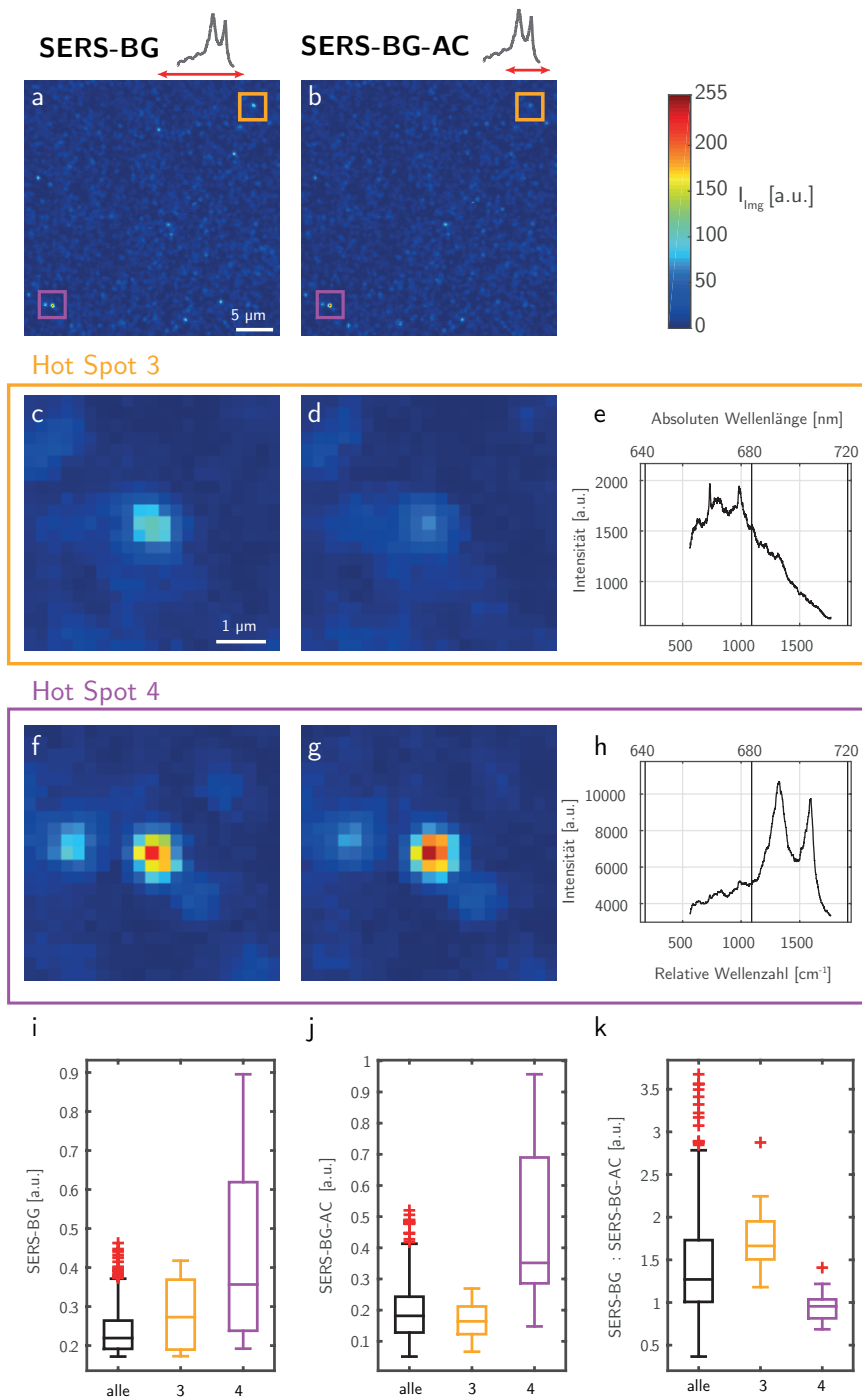


Abbildung 5.12: Multimodale SERS-Hintergrund Bildgebung zur Unterscheidung Analyt-Banden verstärkter und amorpher Kohlenstoff verstärkter Hot Spots eines kommerziellen SERS-Substrates versetzt mit einer ATP-Lösung. (a) SERS-Hintergrund Bildgebung im gesamten Fingerprint-Bereich (Anregung bei 633 nm, Emission von 640 nm–720 nm). (b) SERS-Hintergrund Bildgebung im Bereich der G- und D-Bande amorpher Kohlenstoff (Anregung bei 633 nm, Emission 680 nm–720 nm). (c-e) SERS-BG, SERS-BG-AC und SERS-Spektrum in Hot Spot 3. (f-h) SERS-BG, SERS-BG-AC und SERS-Spektrum in Hot Spot 4. (i-h) Intensitätsverteilung des SERS-BG und SERS-BG-AC und deren Verhältnis in Pixeln von Hot Spot 3, 4 und aller Hot Spots. Als Hot Spot-Bereiche werden SERS-BG Pixelgrauwerte mit ≥ 0.17 und eine Objektgröße zusammenhängender Pixel ≥ 4 angenommen.

Transmissionsmessungen werden parallel zu dem SERS-Hintergrund mittels des Forward-CARS-Detektors bei hoher Laserintensität aufgenommen (Intensität 60%). Die Detektion transmittierten Lichtes im Bereich 560 nm–750 nm erfasst vor allem durchgelassenes Laserlicht. Zusätzlich können auch rotlichtverschobene Signale des SERS-BG erfasst werden. Reflexionsbilder werden bei geringer Laserintensität (1%) im Bereich der Laserlinie von 630 nm–636 nm aufgenommen.¹

Abbildung 5.13 zeigt diesen Ansatz für das Mato Substrat versetzt mit einer 100 μ M-Lösung von ATP auf. Die Bildaufnahmen des SERS-Substrates offenbaren lokal erhöhte Intensitäten in allen drei optischen Kanälen. Auftragung der Intensitätswerte der Bildpixel in Abhängigkeit der drei Kanäle im multimodalem Raum zeigt die Beziehungen der optischen Eigenschaften zueinander auf und gibt Aufschluss über die beobachteten lokal erhöhten Intensitäten. Das SERS-Substrat weist über modalitätsspezifische „Features“ auf. Diese zeigen über hohe Intensitäten einer Modalität jedoch niedrige in den anderen Modalitäten. Pixel mit hohen Intensitätswerten in mehr als einer Modalität werden nicht bestimmt. Im multimodalem Raum zeigt sich dies durch eine deutliche Begrenzung der äußersten Pixel in Form einer Abklingkurve. Oberhalb diesen Bereichs gibt es keine Pixel. Erklärt werden kann dieses Phänomen durch einfache Bilanzierung der Photonenprozesse. Auf das SERS-Substrat einfallende Photonen können entweder reflektiert, transmittiert oder absorbiert werden. In Pixeln hoher Reflexion tritt entsprechend eine niedrige Transmission und Absorption auf. Eine hohe Absorption hat entsprechend eine niedrige Reflexion und Transmission zur Folge.² Eine Absorption von Photonen erfolgt in einem SERS-Substrat aufgrund der Anregung gekoppelter lokalisierter Plasmonen und ist Ursache für die SERS-BG-Signale. Hohe SERS-BG-Signale treten somit nur in Pixeln niedriger Reflexion und Transmission auf.

Eine genauere Charakterisierung der Abklingkurvenform sollte prinzipiell eine Abschätzung der Abhängigkeiten der optischen Prozesse zu einander aufzeigen.³ In diesem Fall wird die

¹ Signale in diesem Kanal können durch gespiegeltes Laserlicht an ebenen Flächen (Reflexion) oder durch diffuse Streuung an rauen Oberflächen des SERS-Substrates hervorgerufen werden. Aufgrund der Nanostrukturierung kommt zusätzlich oberflächenverstärkte Rayleigh-Streuung am Analyten in Frage. Im Unterschied zu dem SERS-Effekt ist die oberflächenverstärkte Rayleigh-Streuung nicht auf eine plasmonische Kopplung zwischen plasmonischen Elementen (z. B. durch Lücken, Ecken und Krümmungen im SERS-Substrat) angewiesen sondern liefert bereits bei einzelnen plasmonischen Elementen ausreichend Signal [177]. Demnach sollte die oberflächenverstärkte Rayleigh-Streuung mit dem SERS-Hintergrund überlagern und weitere zusätzliche Signale auf dem Substrat liefern. Da keine genaueren Aussagen über die Herkunft gemacht werden können wird im Folgenden allgemein von Reflexion gesprochen.

² Die inverse Relation der Reflexion zum SERS-Hintergrund lässt darauf schließen, dass diese Signale zum Großteil gespiegeltes oder diffus gestreutes Laserlicht sind. Ein deutlicher Beitrag oberflächenverstärkter Rayleigh-Streuung kann ausgeschlossen werden, da hierbei ein positive Korrelation zum SERS-Hintergrund zu erwarten wäre.

³ Die hier bestimmten SERS-BG-Signale setzen sich beispielsweise aus dem eigentlichen Hintergrund und SERS-Signalen bzw. SERRS-Signalen zusammen. Das SERS-Signale ist unter Idealbedingungen proportional zum Quadrat des absorbierten Lichts, da sowohl das einfallende Licht als auch das vom Molekül generierte Raman-Signal verstärkt wird. Zusätzliche kann die Effizienz der Verstärkung durch Resonanz-Raman z. B. bei amorphem Kohlenstoff gesteigert werden. Bezüglich der Intensität der SERS-BG-Signale ist die Abhängigkeit zu den absorbierten Licht unter Idealbedingungen nicht genau klar, das die Ursache dieses Prozesses noch nicht genau geklärt ist. Aufgrund der Nichtlinearität des SERS-Signals-Generierung ist jedoch anzunehmen

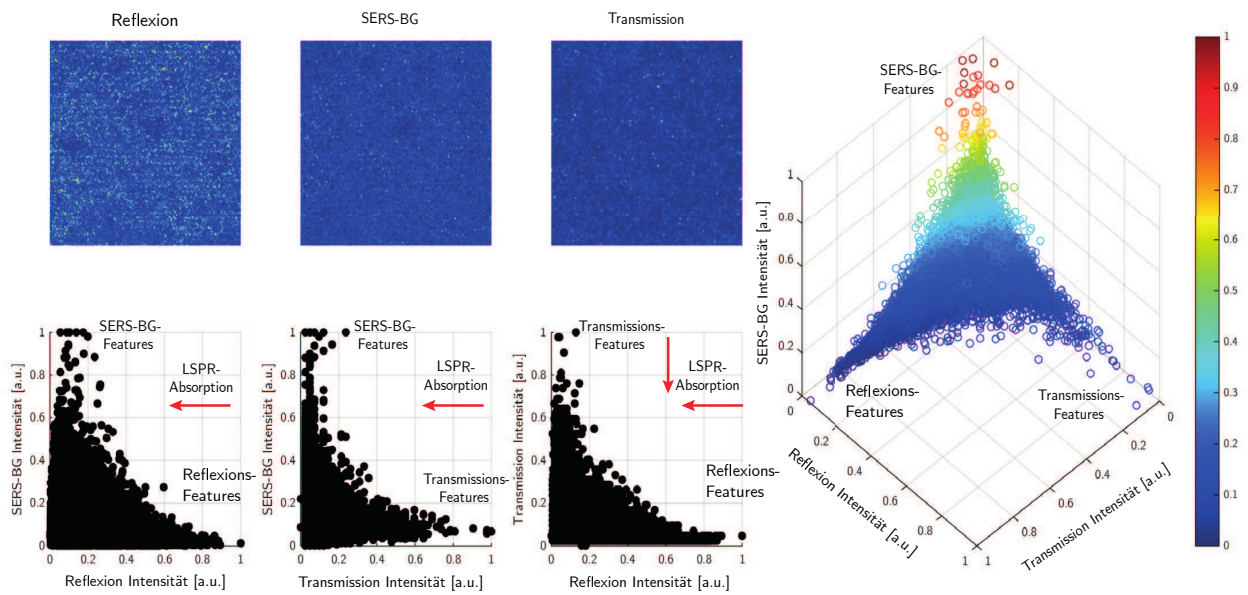


Abbildung 5.13: **Multimodale Charakterisierung eines SERS-Substrates mittels Reflexion, SERS-Hintergrund und Transmission.** Auftragung der Pixelintensitätswerte der optischen Parameter im multimodalem Raum offenbart die Beziehungen der optischen Eigenschaften zueinander. „Feature“-Pixel hoher Intensität der einen Modalität zeigen geringe Intensitäten in den beiden anderen Modalitäten. Erklärt werden kann dieses Phänomen durch Bilanzierung eingestrahelter Photonen: Trifft ein Photon auf ein SERS-Substrat so kann es entweder reflektiert, absorbiert oder transmittiert werden. In Bereichen niedriger Reflexion und Transmission von Photonen stehen daher potentiell mehr Photonen für eine LSPR-Absorption und damit Generierung von SERS-BG zur Verfügung. Reflexion: Anregung 633 nm mit 1 % Laserintensität, Emission 630 nm–636 nm; SERS-BG: Anregung 633 nm mit 60 % Laserintensität, Emission 640 nm–720 nm; Transmission: Anregung 633 nm mit 60 % Laserintensität, Emission 560 nm–750 nm

Kurve aber vermutlich in erster Linie durch das unterschiedliche Ansprechverhalten der Detektoren bestimmt. Eine Quantifizierung der Prozesse zueinander würde eine Kalibration nach Photonenzahl der einzelnen Detektoren erfordern. Die Absorption könnte indirekt aus der Differenz der Intensität eingestrahlichten Lichts und der Summe der Intensitäten in Reflexion und Transmission bestimmt werden. Da mit dem derzeitigen Transmissionskanal ein breiter Spektralbereich und potentiell auch SERS-BG-Signale in Transmissionsrichtung erfasst werden, müsste ein Laserlinienfilter vorgeschaltet werden.

5.3.6 Vergleich optischer Eigenschaften mit der Mikro- und Nanostruktur eines SERS-Substrates

Um den Ursprung der SERS-Verstärkung zu untersuchen, wurde die zugrundeliegende Mikro- und Nanostruktur des Mato-Substrates mittels Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert.

dass der Anstieg in Abhängigkeit der Reflexion oder Transmission steiler sein sollte als die Reflexion und Transmission zueinander, da diese direktproportional zu Absorption stehen sollten.

Im Anschluss erfolgte die multimodale optische Charakterisierung des entsprechenden Bereiches entsprechend Abschnitt 5.3.5 (Reflexion, SERS-BG, Transmission). Das Reflexionsbild ermöglichte hierbei insbesondere eine Überlagerung der optischen Bilder mit der REM-Aufnahme anhand von Strukturelementen im Randbereich des Substrates, welche sowohl mittels REM als auch Reflexion gut zu erkennen sind (Gesamtbild, siehe Abbildung A.7). Zur Sichtbarmachung der Nanostruktur in hoher Auflösung wurden einzelne Bereiche mittels REM stärker fokussiert, was jedoch eine REM-induzierte Karbonisierung in dem Bereich zufolge hatte wie die anschließende SERS-Hintergrund-Aufnahmen zeigen [178]. Wie im folgenden gezeigt wird, liefern diese „Messartefakte“ dennoch brauchbare Information.¹

In Abbildung 5.14 werden die REM-Aufnahmen den entsprechenden optischen Bildern in dem Bereich gegenübergestellt. Die REM-Übersichtsaufnahme gibt eine Übersicht über eine mögliche strukturelle Herkunft der unterschiedlichen optischen Eigenschaften. Das Substrat hat eine hochporöse chaotische Struktur und besteht aus helleren hervorstehenden hügelähnlichen Regionen und dunkleren tälerrähnlichen Regionen, die zur Mitte hin in Löcherstrukturen enden. Die entsprechenden optischen Übersichtsbilder offenbaren die lokal intensiven modalitätsspezifischen „Feature“-Bereiche in allen drei optischen Kanälen (siehe Abschnitt 5.3.5). Eine statistische Auswertung der intensivsten Features wird in Abbildung 5.14 e gezeigt: Der Durchmesser der Features liegt im Nanometerbereich. Die meisten Features zeigen eine erhöhte Reflexion ($N = 354$), gefolgt von Transmission ($N = 114$) und dem SERS-Hintergrund ($N = 44$), wobei die Transmissions-Features etwas großflächiger sind.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Mikro- und Nanostruktur des REM-Bildes und den optischen Eigenschaften kann anhand der Intensitätswerte nicht ermittelt werden. Weder eine spezifische Zuordnung der „Feature“-Bereiche zu den hellen oder dunklen Regionen der REM-Aufnahme ist möglich, noch eine Zuordnung bestimmter Helligkeitsbereiche des REM-Bildes (z. B. Löcherstrukturen niedriger Intensität in Abbildung 5.14 b) zu den drei optischen Modalitäten konnte ermittelt werden. Wie das REM-Bild zeigt, weist das SERS-Substrat über eine sehr heterogene Zusammensetzung unterschiedlichster Mikro- und Nanostrukturen auf. Eine Unterteilung in grobe Intensitätsbereiche des Bildes ist daher nicht ausreichend um die komplexe Struktur widerzuspiegeln. Zudem bilden die Übersichtsbilder Nanostrukturen nur in begrenztem Maße ab. Da die optischen Phänomene, insbesondere eine ausgeprägte Oberflächenverstärkung, nur in sehr kleinen Strukturen z. B. Nanogaps effektiv sind, wird somit kein Zusammenhang ersichtlich.

Einen bessere Differenzierung der Nanostrukturen ermöglichen die hochauflösten Sub-Mikrometer skalierten REM-Bilder in Abbildung 5.14 c-e. Die hellen Bereiche entsprechen den Peakspitzen der hügelähnlichen übereinandergeschichteten Strukturen, die über eine blumenkohlähnliche nanostrukturierte Oberfläche aufweisen. Die raue Oberfläche führt zur Ausbildung von Lücken, Kanten und Krümmungen im Subnanometer-Bereich. Weitere Lücken

¹ Um REM-induzierte Artefakte in den optischen Aufnahmen zu verhindern, sollten die optischen Messungen in Zukunft vor der REM-Aufnahme erfolgen.

unterschiedlicher Größe und Form wie Spalten und runde Löcher werden in Abhängigkeit zur Distanz der hügelähnlichen Strukturen innerhalb der Talregionen gebildet. Enger Kontakt der Strukturen führt zu Lücken bis in den Nanometerbereich. All diese Strukturelemente aus Lücken, Kanten und Krümmungen unterschiedlichster Form und Größe können potentiell eine plasmonische Kopplung zwischen zwei plasmonischen Elementen und damit den SERS-Effekt hervorrufen.

Um die Ursache des SERS-Effekts besser einzugrenzen, erfolgt eine Überlagerung der optischen Bilder mit den komplexen Strukturen der REM-Bilder. Die vergrößerten optischen Bilder liefern in der Auflösung nahe der Beugungsgrenze nur sehr verschwommenen Kontrast. Dies gilt insbesondere für die Transmission, weshalb diese nicht weiter analysiert wurde. Die Reflexions- und SERS-BG-Bilder zeigen jedoch gewisse Intensitätsunterschiede, aus denen beugungsbegrenzte kreisförmige Strukturen ausgemacht werden können. Eine manuelle Kennzeichnung der Zentren der intensivsten Strukturen durch die Pfeile offenbart, dass die SERS-BG-Signale oftmals in Bereichen nahe oder innerhalb der Lücken zwischen den hervorstehenden Regionen auftreten, was darauf hinweist, dass die Signale nicht bloß Resonant-Raman verstärkter REM-induzierter amorpher Kohlenstoff, sondern tatsächlich oberflächenverstärkte Signale des amorphen Kohlenstoffs sind. Eine plasmonische Kopplung innerhalb der Lückenbereiche wäre eine mögliche Ursache für den SERS-Effekt. Nähere Aussagen können aufgrund der begrenzten Auflösung der SERS-BG Bilder jedoch nicht gemacht werden. Hier wird die Grenze der diffraktionslimitierten Methode ersichtlich. Ein besserer Einblick kann nur durch Super-Resolution Bildgebung oder besser Nahfeldmethoden erzielt werden.

Ebenso ist keine eindeutige Zuordnung der Reflexion durch die Pfeile zu einer bestimmten Mikro- oder Nanostruktur möglich. Intensive Signale treten hier sowohl in den Hügel- als auch in den Talerregionen bis hin zu den Löcherregionen auf. Im Unterschied zu dem SERS-Hintergrund sind Reflexionen an allen möglichen Strukturen denkbar, was die hohe Anzahl an Reflexionsfeatures erklärt. Auffällig ist in den Sub-Mikrometer Bildern die Trennung intensiver SERS-Hintergrund und Reflexionsfeatures, was wie in Abschnitt 5.3.5 bereits diskutiert durch eine Photonenbilanzierung erklärbar ist. In Bereichen hoher Absorption (z. B. aufgrund LSPR) wird weniger Licht reflektiert. In einem der Sub-Mikrometer REM-gescannten Bilder konnte eine im Mittel 26 % verminderte Reflexion festgestellt werden, was auf eine zusätzliche Lichtabsorption hindeutet und vermutlich auf den REM-induzierten amorphen Kohlenstoff zurückzuführen ist (siehe Gesamtbild, Abbildung A.7).

5.3.7 Schlussfolgerungen

In diesem Abschnitt wurde anhand eines mit ATP-Lösung versetzten kommerziellen Gold SERS-Substrates gezeigt, dass der ausgeprägte fluoreszenzähnliche SERS-Hintergrund eines SERS-Spektrums ein vielseitig einsetzbares Werkzeug für die analytische Praxis, aber auch

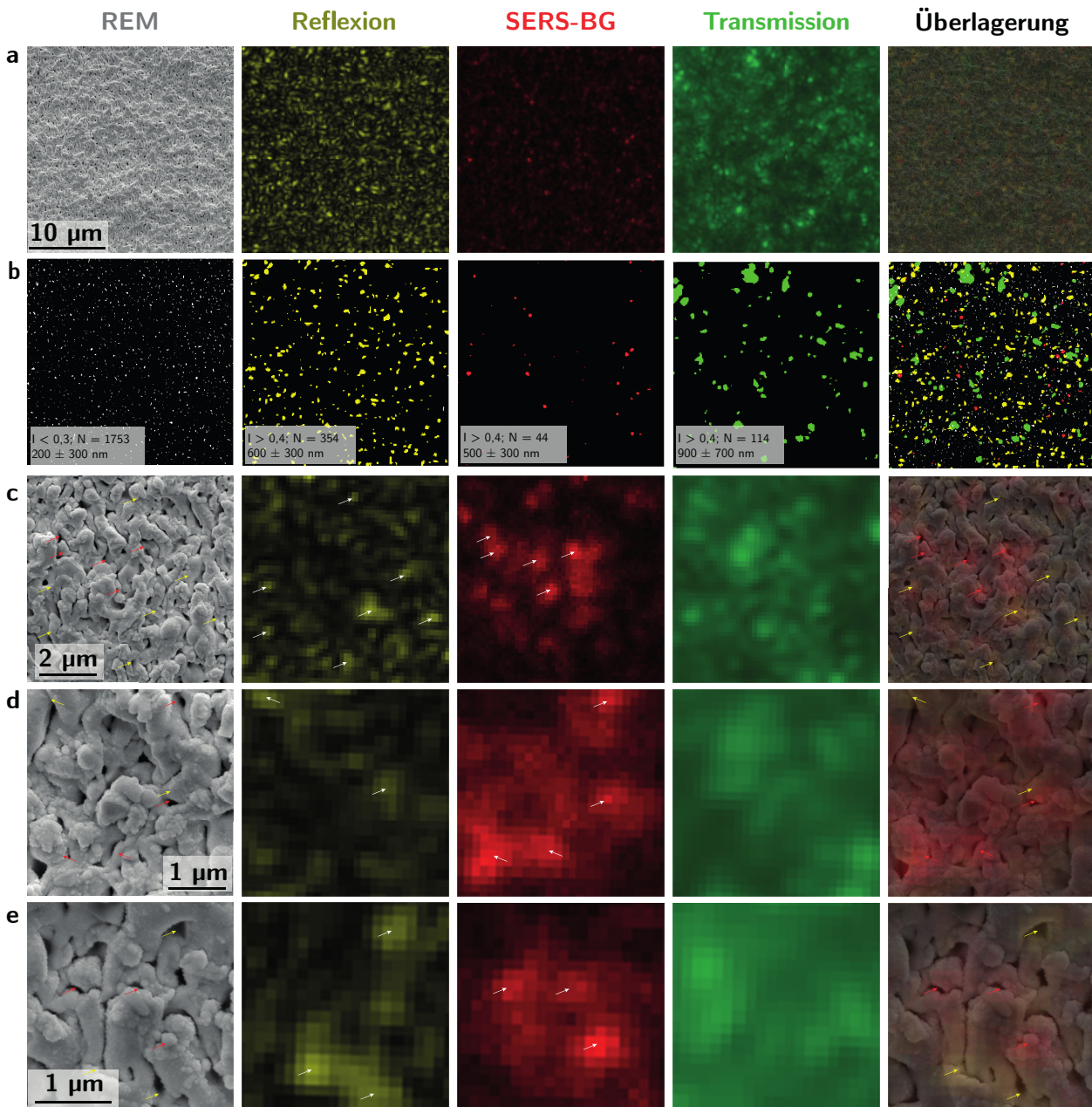


Abbildung 5.14: Multimodale Charakterisierung eines kommerziellen SERS-Substrates mittels REM, Reflexion, SERS-Hintergrund und Transmission. (a) Übersichtsbild ohne ausgeprägter REM-induzierter Karbonisierung. (b) Statistische Auswertung der Features erhöhter Intensität aus (a). Für die REM-Aufnahme werden Features niedriger Intensität (Löcher) dargestellt. (c-e) Nahaufnahmen an der Lichtbeugungsgrenze. Das Zentrum von Bereichen erhöhter Intensität wird mittels Pfeile gekennzeichnet (SERS-BG: rot; Reflexion: gelb). Der ausgeprägte SERS-BG kommt durch eine Karbonisierung aufgrund der REM-Fokussierung zustande. Die nicht homogene Verteilung des SERS-BG deutet dennoch auf echte Verstärkungssignale hin.

für die Qualitätskontrolle von SERS-Substraten darstellen kann. Die aufgezeigte Beziehung zwischen der SERS-BG Bildgebung, dem spektralem SERS-BG und die Analytbanden-Intensität bildet hierbei die Basis für die Methode und ermöglicht eine schnelle Auffindung hochsensitiver Hot Spots auf dem Substrat mittels eines herkömmlichen konfokalen Laser-Scanning Mikroskops unter Verwendung der internen Fluoreszenzdetektoren. Die Methode kann damit die häufige Trial-and-Error-Methode zur Auffindung sensitiver Stellen im SERS-Substrat ersetzen, könnte prinzipiell automatisiert werden und somit in Zukunft einen wichtigen Beitrag in Richtung einer schnelleren, einfacheren und vor allem reproduzierbaren hochsensitiven SERS-Analytik liefern. Hochsensitive SERS-Messungen sind nicht nur für Nachweise geringer Quantitäten („Einzelmoleküldetektion“) interessant, sondern vielmehr ein wichtiger Parameter, um auch die Analyse von schlecht absorbierbaren Analyten bzw. Analyten mit geringem Streuquerschnitt zu ermöglichen. Die hohe Abhängigkeit des Erfolgs einer SERS-Messung vom Analyten ist eines der größten Hindernisse [25].

Die Vielseitigkeit der SERS-BG Bildgebung wurde in Kombination mit anderen Modalitäten herausgestellt. Eine spektrale Auftrennung des bildgebenen SERS-BG ermöglicht es mit geringen Aufwand Informationen zur räumlichen Verteilung von photoinduzierten Karbonisierungen oder spektralen Variabilitäten des SERS-Hintergrundes durch eine plasmonischen spektralen Form-Effekt auf dem SERS-Substrat zu erlangen. In Kombination mit weiteren optischen Modalitäten wie Reflexion und Transmission und REM-Aufnahmen können wichtige Zusammenhänge zwischen den optischen Eigenschaften und der Nano- und Mikrostruktur eines SERS-Substrates aufgedeckt werden. Im Unterschied zu Nahfeld-Methoden erfolgt hier nicht eine Analyse einzelner Hot Spots, sondern vielmehr eine globale großflächige Analyse des SERS-Substrates. Zudem ist die Methode vom Geräteaufwand sehr viel weniger aufwendig, was sie insbesondere für die Routinemessungen wie Qualitätskontrolle von SERS-Substraten interessant macht, um z. B. die Homogenität der Hot Spots Verteilung auf dem Substrat zu überprüfen. Da SERS-Substrate in der Regel sehr dünne Proben sind, könnte prinzipiell auf ein Laser-Scanning-System im Konfokal-Modus verzichtet werden. Eine Hochdurchsatz SERS-Hintergrund Bildgebung wäre mittels Weitfeld/direkter Bildgebung durch gleichzeitige Bestrahlung des gesamten SERS-Substrates mittels eines defokussierten Laser, Filterung des Laserlichts und anschließender globaler Bildaufnahme mittels einer CCD Kamera möglich (für Bildgebung mittels CCD Kamera siehe auch Abschnitt 3.5) [45, 179–181]. Neben einer instantanen Bildgebung würde dies den apparativen Aufwand erheblich reduzieren und so eine kostengünstigere Alternative für die industrielle Anwendung z. B. in der Hochdurchsatz-Qualitätskontrolle von SERS-Substraten darstellen.

Die Limitierungen der Methode sind prinzipiell die gleichen wie bei herkömmlichen Fluoreszenzmessungen. Aufgrund der in der Regel schwächeren Intensität des SERS-Hintergrundes gegenüber z. B. der Fluoreszenz von Farbstoffen machen sich diese jedoch in stärkerem Maße bemerkbar: Ein schnelles Abscannen mit hoher Auflösung ist nur mit entsprechend hoher Laserintensität unter Verwendung der empfindlichen HyD-Detektoren möglich. Das schnelle

Abscannen ist erforderlich, um ähnlich der Fluoreszenz Photoreaktionen zu vermeiden, sofern das SERS-Substrat mit Analyten bedeckt ist. Bei mehrmaligen Abscannen der Probe zeigte sich eine allmähliche Karbonisierung innerhalb einzelner Hot Spots. Ein solcher Prozess ist daher auch bei zu langsamen Drüberfahren des Lasers zu erwarten. Weiterhin kann das spektrale Fenster des SERS-BG nicht beliebig klein gewählt werden. Eine Erfassung schmalbandiger SERS-Bänder eines Analyten sind mit dem derzeitigen Aufbau daher als unrealistisch anzusehen, sodass nur sehr signalintensive bzw. breitbandige Phänomene erfasst werden können.

Die SERS-Hintergrund Bildgebung könnte weiterhin in sogenannten SERS-Labels für die *In-Situ*-Bioanalytik eine schnelle Lokalisierung dieser Labels innerhalb der biologische Proben ermöglichen. Eine interessanten Ansatz zeigten hierbei Carattino et al. [182] auf. Sie nutzten die Eigenschaft, dass SERS-Substrate auch auf der Anti-Stokes Seite einen SERS-Hintergrund, wenn auch mit sehr viel niedriger Intensität, generieren. Messungen auf der Anti-Stokes Seite haben den Vorteil, nicht mit der Fluoreszenz auf der Stokes-Seite z. B. Autofluoreszenz in biologischen Proben zu überlagern (siehe auch CARS). Da die Spektralform des SERS-Hintergrundes durch die plasmonischen Eigenschaften des SERS-Substrates steuerbar sind, wäre es denkbar SERS Labels unterschiedlicher optischer Eigenschaften zu entwickeln. Gegenüber Fluorophor-Labels haben sie den Vorteil, kein Photobleichen zu zeigen. Entscheidend für weitere Anwendungen des SERS-Hintergrundes ist aber letztendlich den Ursprung dieses Phänomens und insbesondere die Rolle des Analyten auf den SERS-Hintergrund genauer zu verstehen. Hat dieser einen signifikanten Einfluss auf die SERS-Hintergrund Generierung, so könnte die SERS-BG Bildgebung (ähnlich den CH-Streckschwingungen in CARS) möglicherweise für eine signalintensive und damit schnelle, zeitaufgelöste Lokalisierung eines Analyten in einer komplexen Probe verwendet werden, welche durch die signalschwächere also langsamere aber spezifischere spektrale SERS-Analytik ergänzt wird. Auf eine weitere Anwendung des SERS-Hintergrundes wird im folgenden Kapitel zur SERS-Analytik im mikrofluidischen Systemen eingegangen.

5.4 Laserinduziert immobilisierte SERS-Substrate in mikrofluidischen Systemen für die In-Chip-Analytik niedermolekularer Verbindungen

5.4.1 Einleitung

Im Rahmen des „Leibniz Research Clusters“ (LRC), einem Kooperationsprojekt zwischen fünf Leibniz-Instituten, sollen neue Wege der Wirkstoffherstellung aufgezeigt werden. Ziel ist eine Mikrofluidikplattform zur zellfreien, enzymatischen Synthese einer großen Klasse von bioaktiven Naturstoffen, im besonderen Polyketiden, aufzubauen. Diese setzen sich „LEGO“-artig aus nur wenigen Grundbausteinen zusammen. Die Synthese dieser Biobricks stellt somit den ersten Schritt zu einer zellfreien Produktion dieser pharmakologisch interessanten Substanzklasse dar. Am ISAS wird die erforderliche Online- und Offline-Analytik entwickelt. Abbildung 5.15a verdeutlicht die Idee des Projektes mittels einer ersten Modellreaktion von freiem CoA, Malonat und Oxalacetat zu Citrat über drei enzymatische Stufen mit anschließender Trennungseinheit. Die Reaktionskaskade läuft zyklisch unter Recycling von freiem CoA ab. Als typische Biobricks werden hierbei CoA-aktivierte Malonyl- und Acetyl-Gruppen in Zwischenstufen gebildet. Die Online-Analyse der (bio-)chemischen Prozesse und anschließenden Trennprozesse soll mittels optisch-spektroskopischer Methoden direkt im Mikrosystem ohne Probenahme erfolgen.¹

Eine Messung der Lichtabsorption oder Fluoreszenz im Mikrokanal z. B. mittels Z-Zelle stellt die einfachste optische Methode für die Online-Prozessanalytik dar. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Analyten sind jedoch nur geringfügige oder keine Unterschiede in den Absorptions- bzw. Fluoreszenzeigenschaften zu erwarten. In (bio-)chemischen Reaktionen erfolgt oftmals nur die Änderung einer einzelnen Bindung im Molekül. Die Vibrationsspektroskopie stellt hier eine geeignetere Methode durch Erfassung einzelner Schwingungsbanden dar. Die IR-Spektroskopie ist aufgrund der ausgeprägten IR-Absorption von Wasser für die Analytik in wässrigen Medien ungeeignet. Aufgrund der Verdünnung der Analyten im wässrigen Medium werden jedoch auch keine intensiven Banden mittels CARS wie es beispielsweise bei nahezu unverdünnten Analyten in Bioproben der Fall ist generiert (siehe Abschnitt 5.1). Mittels CARS aber auch Raman konnten die Analyten nur im mM-Bereich nachgewiesen werden. Die CARS-Mikroskopie kam in Kombination mit der Zweiphotonen-Fluoreszenz vor allem zur Orientierung im Mikrofluidiksystem zum Einsatz, beispielsweise um die Immobilisation von Enzym-Magnetbeads zu erfassen (siehe Abbildung A.8). Um die

¹ Weiterhin werden chromatographiebasierte Methoden angewandt (z. B. Kapillarelektrophorese gekoppelt mit Massenspektrometrie). Diese ermöglichen aufgrund der Trennung von z. B. Produkt- Eduktgemischen eine selektivere Analyse, gehen jedoch mit einem Produktverlust durch erforderliche Probenahmen einher und sind aufgrund höherer Analysezeiten weniger für zeitaufgelöste Screenings (z. B. zur Bestimmung von Kinetiken) oder zur Analyse der räumlichen Verteilung eines Analyten im Mikrokanal geeignet (z. B. bei der Analyttrennung mittels FFE).

Sensitivität des Raman-Effekts zu steigern, wurde auf SERS zurückgegriffen. Diese, auch als „lab-on-a-chip SERS“ oder „nano/micro-optofluidics SERS“ bezeichnete Methode [183], bringt jedoch durch das erforderliche SERS-Substrat eine zusätzliche Komplexität der Analytik mit sich. Um diese auf ein Minimum zu reduzieren, wurde daher eine einfache im Mikrokanal zu implementierende und damit vielseitig einsetzbare SERS-Methode auf Basis laserinduziert hergestellter SERS-Substrate entwickelt. Die laserinduzierte Reduktion eines Silbersalzes mit einem Reduktionsmittel wurden von Bjerneld et al. [33] eingeführt und zur Silbersubstrat-Immobilisierung in Glaskapillaren [34–36] z. B. für SERS-CE [34], in einer Flusszelle [37] oder auf Trägerplatten für die Dünnschichtchromatografie [38] angewandt. Buja et al. [36] stellten ebenso Goldspots durch Laserbehandlung von Goldsalz/Citrat-Gemischen in Mikrofluidiksystemen her. Die genannten Publikationen beschränkten die SERS-Analytik jedoch nur auf den Nachweis von Modellanalyten hoher SERS-Sensitivität. Nur die Publikation von Lieberman et al. [184] zielt mit dem Monitoring des enzymatischen Abbaus von Organophosphaten auf Basis einer laserinduzierten Aggregation von Silbernanopartikeln (AgNPs) im Mikrofluidiksystem auf eine anwendungsnahe SERS-Analytik ab. Zudem erwähnten die Autoren zwar, dass die Herstellungsmethode von der Laserexposition, Konzentration des Reagenz, pH, Laserfokussierung abhängt und sowohl mittels grünem als auch rotem Laserlicht durchführbar ist, eine tiefere Untersuchung des Herstellungsprozesses erfolgte jedoch nicht. Lediglich El-Zahry et al. [37] und Zhang et al. [185] untersuchten den Einfluss der Expositionszeit auf die Nanostrukturbildung mittels REM.

Im Unterschied zu den erwähnten Publikationen wird hier die SERS-Analytik unter anwendungsnahen Bedingungen optimiert. Als Analyten werden die Edukte und Produkte der MatB-Reaktion in Abbildung 5.15 b gelöst in Gefi-Puffer bei pH 8 näher untersucht. Hierbei handelt es sich um eine klassisch biochemische Reaktion bei der ATP als Energielieferant zu AMP umgesetzt wird. Aufgrund dieser Universalität konzentriert sich die Analytik daher insbesondere auf ATP und AMP. Diese wurden bereits mittels SERS in [172, 173, 186] bzw. [187–189] analysiert. CoA wird als wichtiger Cofaktor ebenso berücksichtigt. SERS-Reinsubstanzspektren von CoA wurden nach Stand des Wissens bisher nur in [190] bestimmt. Das Potential der SERS-Analytik wird in ersten Vorversuchen zunächst mittels gewöhnlicher Silber- und Goldnanopartikel (AgNPs, AuNPs) untersucht. Darauf aufbauend erfolgt eine Untersuchung der SERS-Analytik auf Basis laserinduziert hergestellter SERS-Substrate. Es werden Möglichkeiten der Mikrostrukturierung durch Verwendung unterschiedlicher Laserscan-Modi aufgezeigt und die SERS-Spektren der Analyten auf Basis unterschiedlicher SERS-Substrate gegenübergestellt. Um ein tieferes Verständnis in den Herstellungsprozess zu erhalten, erfolgt eine vertiefte Untersuchung der optischen Eigenschaften und Nanostrukturbildung in Abschnitt 5.4.5. Als wichtiges Werkzeug wird die im vorherigen Kapitel eingeführte SERS-BG Bildgebung in Kombination mit REM-Aufnahmen angewandt. Da der Erfolg der SERS-Analytik im Chip von einer Vielzahl von Faktoren abhängt, erfolgt im letzten Abschnitt 5.4.6 eine detaillierte Systembeschreibung, in der alle im Laufe der

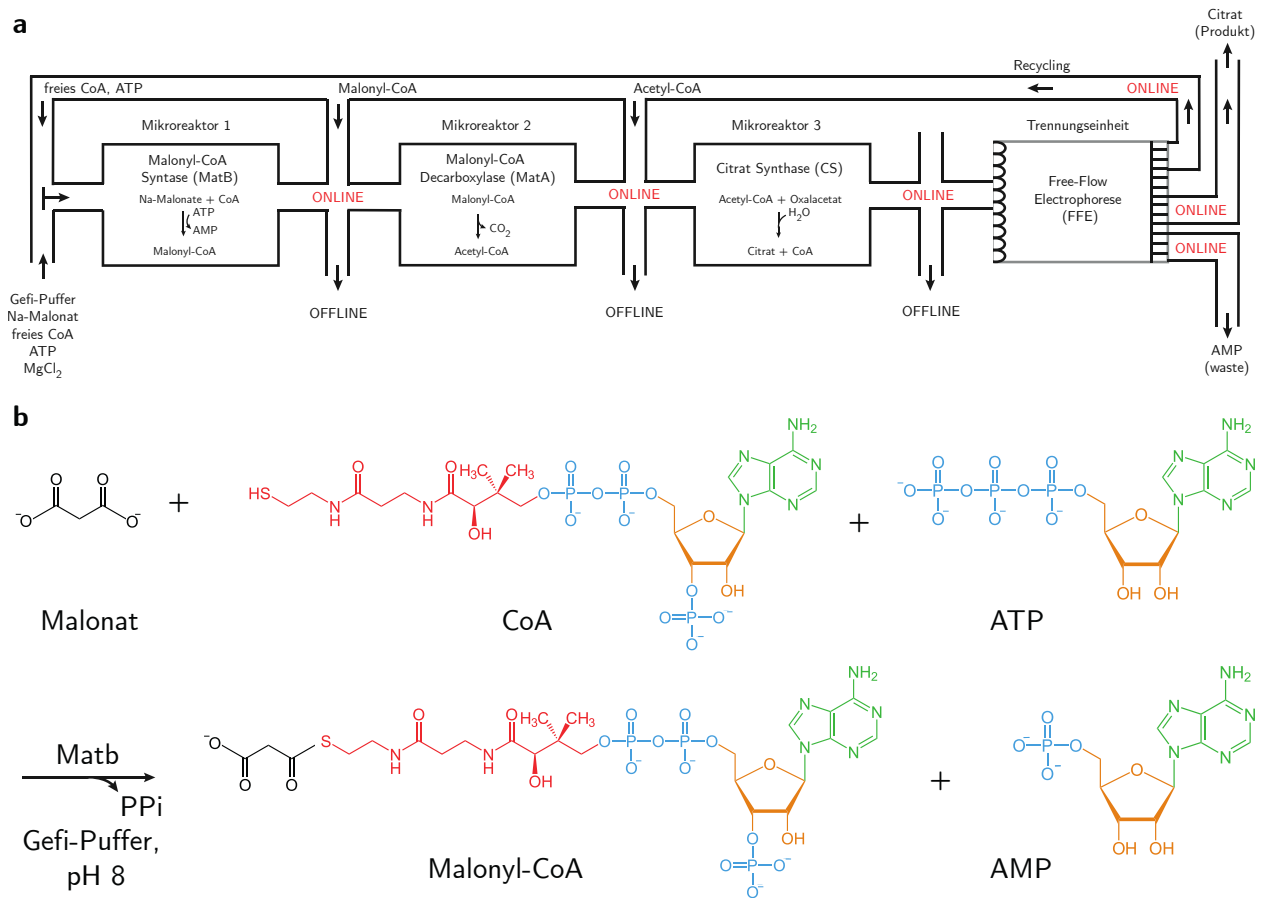


Abbildung 5.15: **Illustration der zellfreien, enzymatischen Wirkstoffherstellung im Mikroreaktorsystemen mittels Biobricks.** (a) Enzymatische Umsetzung von CoA zu Citrat über drei enzymatische Stufen im Mikrosystem. In der anschließenden Trennungseinheit erfolgt eine Trennung von Edukten und Produkten mittels Free-Flow-Elektrophorese. Nicht umgesetzte Edukte werden den Mikroreaktoreinheiten zurückgeführt. Die Analytik erfolgt nach jeder Prozessstufe Online bzw. Offline unter Produktentnahme. (b) Illustration der ersten enzymatischen Umsetzung mittels Malonyl-CoA Synthase (MatB) und der Analyten. Gemeinsamer Grundbaustein der Analyten CoA, Mal-CoA, ATP und AMP ist das Nucleosid Adenosin aufgebaut aus Adenin (grün) und Ribose (orange). Strukturell unterschieden werden die Analyten am 5'-Ende der Ribose durch die Länge des Phosphatgruppenrest (blau, 3x in ATP, 2x in AMP, CoA und Mal-CoA) und einem (maloniertem) Panthethin (rot, CoA, Mal-CoA). Die Ribose ist bei (Mal-)CoA zusätzlich am 3'-Ende phosphoryliert. PPi: Pyrophosphat.

Arbeit gewonnenen Informationen zu dem System systematisch in beeinflussbare und nicht-beinflussbare Faktoren unterteilt und diskutiert werden. Auf Basis dieser eher theoretischen Überlegungen wird dann die experimentelle Herangehensweise zur Optimierung der Detektion von ATP im Chip mittels Konzepten der statistischen Versuchsplanung aufgezeigt. Wie gezeigt werden wird, ist die SERS-BG Bildgebung (Kapitel 5.3) dabei ein entscheidender Faktor für den Erfolg der In-Chip ATP-Analytik.

5.4.2 Methoden

5.4.2.1 Silber- und Goldnanopartikelherstellung

Silber- und Goldnanopartikel wurden mittels der Methode nach Lee und Meisel [30] bzw. nach Turkevich [31] synthetisiert. Alle Synthesen erfolgten in wässriger Umgebung. Für die Herstellung der citratstabilisierten Silbernanopartikel nach Lee und Meisel (AgNO_3 /Trinatriumcitrat, 1 mM/0,67 mM) wurden 48 mL einer AgNO_3 -Lösung (1 mM) im Ölbad unter Rückflusskühlung und Magnetührung zum Kochen gebracht und mit 1,7 mL Trinatriumcitrat-Lösung (19,53 mM) versetzt und für 1 h weiter gekocht. Die Nanopartikelbildung macht sich dabei durch eine Gelb- (nach 6 min) bis trübe Braunfärbung (nach 20 min) bemerkbar. Für eine In-Situ Herstellung im Mikrofluidiksystem wurden zudem bei Raumtemperatur ablaufende Reduktionsmethoden mittels AgNO_3 /Trinatriumcitrat/Ascorbinsäure (1 mM/3 mM/0,6 mM) [191] und AgNO_3 /Hydroxylaminhydrochlorid/NaOH (1 mM/1,5 mM/3 mM) [192] getestet. Goldnanopartikel wurden mittels einer HAuCl_4 /Trinatriumcitrat-Lösung (0,5 mM/1 mM) im Erlenmeyerkolben ohne Rückflusskühlung hergestellt. Hierzu wurden 9,49 mL einer 0,53 mM HAuCl_4 Lösung zum Kochen gebracht und mit 512 μL Trinatriumcitrat-Lösung (19,53 mM) versetzt [31]. Die Nanopartikelbildung macht sich hier durch eine Rotfärbung bemerkbar. Auch hier wurde eine bei Raumtemperatur ablaufende Reaktion mit HAuCl_4 /Ascorbinsäure (0,5 mM/0,25 mM) mit Hinblick auf eine In-Situ-Herstellung im Mikrofluidiksystem getestet [31].

5.4.2.2 Laserinduzierte Herstellung von SERS-Substraten

Die laserinduziert hergestellten SERS-Substrate werden in Silber- und Goldsubstrate unterteilt. Die Silbersubstrate wurden nach Leopold et al. [34] durch Laserbehandlung eines Gemisches aus AgNO_3 /Trinatriumcitrat (0,5 mM/10 mM) auf einem Deckglas erhalten (Menzel-Gläser, # 1, 25 x 25 mm). Die Laserbehandlung erfolgte mit einem Argonlaser mit Anregung bei 514 nm im konfokalen Modus mit 10x Objektiv ($NA = 0,3$). Hierbei wurden unterschiedliche Messmodi getestet. Linienförmigen Substrate wurden durch Verwendung des x-z-Laserscan-Modus erhalten (512x512 Pixel, Scan Speed 100 Hz, Zoomfaktor 2,91, 400 μm physikalische Länge). Der Herstellungsprozess dieser Substrate wurde durch eine zeitaufgelöste Aufnahmen des rotlichtverschobenen Lichtes mit einem HyD-Detektor verfolgt (Emission bei 534 nm–600 nm). Die Laserleistung war dabei etwa 5,1 mW an der Probe. Weiterhin wurden ebene Flächen durch Verwendung des x-y-Laserscan-Modus und punktförmige Mikrostrukturen durch Verwendung des „Bleach-Point“-Modus (Bp-Modus) im Mikrofluidiksystem erzeugt. Durch Kombination mehrerer aneinanderliegender punktförmiger Mikrostrukturen wurden das „Schreiben“ im Bp-Modus getestet. Weiterhin wurde der Einfluss der Laserleistung (2,8 mW und 5,3 mW), Expositionszeit (15 s und 30 s) und des Glasabstandes der Laserfokussierung (0 μm –15 μm auf die Punktstruktur im Bp-Modus untersucht. Laserinduziert

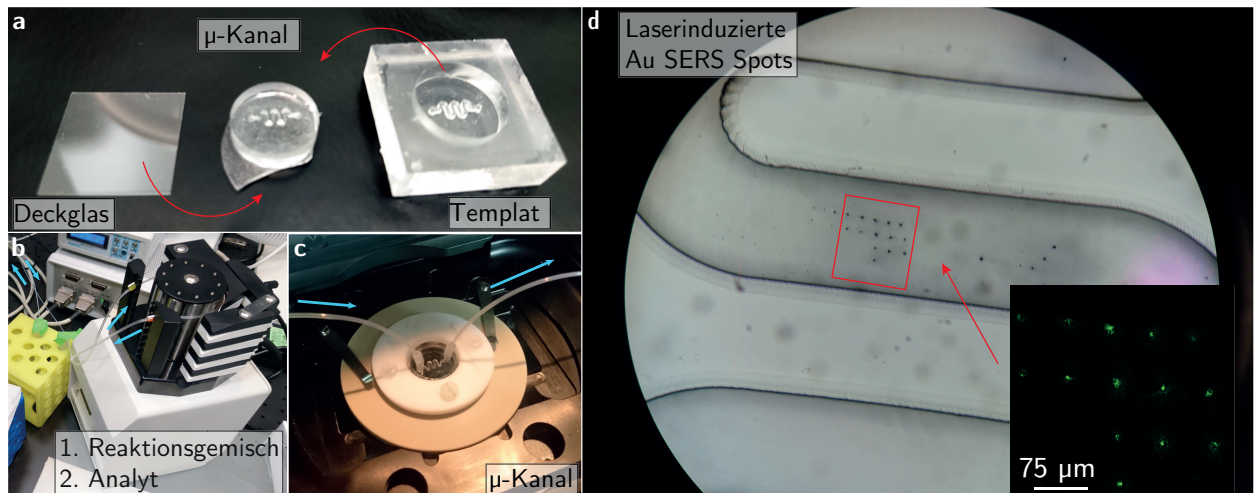


Abbildung 5.16: **Vorgehen zur laserinduzierten Herstellung von SERS-Substraten immobilisiert im Mikrofluidiksystem.** (a) Herstellung des μ -Kanals aus PDMS mittels eines Templats. Die Fixierung des Deckglases erfolgt durch Plasmaaktivierung. (b) Förderung der mobilen Phase mittels Peristaltikpumpe. Zur Herstellung laserinduzierter SERS-Substrate wird zunächst eine Metallsalz/Reduktionsmittelgemisch durch die Pumpe in das Mikrofluidiksystem kontinuierlich gefördert. Nach erfolgter Herstellung und Spülen mit destilliertem Wasser und Gefü-Puffer erfolgt die SERS Analytik durch kontinuierliche Förderung einer Analytlösung. (c) Betrieb des μ -Kanals unter dem Mikroskop. (d) Laserinduzierte SERS-Spots im μ -Kanal.

hergestellte Goldsubstrate wurden zunächst nach Buja et al. [36] mit einem Gemisch aus HAuCl_4 0,35 mM und Trinatriumcitrat-Lösung 1 mM und schließlich mit einem molaren Verhältnis von 0,5/1 mM und 0,75/1 mM getestet. Die Anregung erfolgte bei 514 nm. Getestet wurden ebenfalls 633 nm und der CARS-Laser. Im Unterschied zu den Silbersubstraten war hier eine längere Laserexpositionszeit im unteren Minutenbereich notwendig.

Die laserinduzierte Herstellung von Goldsubstraten im Mikrofluidiksystem erfolgte für eine optimierte ATP Detektion unter Anwendung von Konzepten der statistischen Versuchsplanung folgendermaßen: Das gesamte System mit Schläuchen und Mikrokanal wurde zunächst bei einer Flussrate von $24 \mu\text{L min}^{-1}$ mit destilliertem Wasser gespült um unerwünschte Ionen (Chloride) zu entfernen. Bei einer Flussrate von $97 \mu\text{L min}^{-1}$ erfolgt über 260 s die Beladung des gesamten Systems mit HAuCl_4 /Trinatriumcitrat-Lösung (0,5/1 mM) (Ausgang in Waste, Gesamtvolumen $420 \mu\text{L}$). Schließlich wurde die Lösung bei einer Flussrate von $24 \mu\text{L min}^{-1}$ im Kreis gefördert. Das Gesamtvolumen des Gemisches beträgt $600 \mu\text{L}$ (im Eppi). Die Laserbehandlung erfolgte mittels 514 nm Anregung im konfokalen Modus und 10x Objektiv im „Bleach-Point“-Modus. Zur Optimierung des SERS-Substrates wurde die Laserleistung (50 %–100 %, entspricht etwa 2,8 mW–5,1 mW an der Probe), Expositionszeit (60 s–180 s) und die Eindringtiefe des Laserfokuspunktes zum Abscheidungsort in den Mikrokanal (Glasabstand $0 \mu\text{m}$ – $20 \mu\text{m}$) entsprechend statistischer Versuchspläne variiert.

5.4.2.3 Analytlösungen

Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz Hydrat (ATP, CAS: 34369-07-8), Dinatriummalonat Monohydrat (CAS: 26522-85-0), Coenzym A Trilithiumsalz (CoA, CAS 18439-24-2) und Malonyl-Coenzym A Lithiumsalz (Malonyl-CoA, CAS 108347-84-8) wurden von Sigma Aldrich geliefert (Darmstadt, Deutschland). Adenosin-5'-monophosphat Dinatriumsalz (AMP, CAS: 4578-31-8) wurde von VWR geliefert. Stammlösungen wurden in destilliertem Wasser angesetzt (mM-Bereich). Verdünnungen wurden im Gelfiltrationspuffer mit Magnesiumchlorid zur Aktivierung des ATP hergestellt (Gefi-Puffer: pH 8, 20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂). Die pH-Einstellung erfolgte durch Ansäuerung mit HCl (37%). Die Lösungen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

5.4.2.4 SERS-Analytik und Datenprozessierung

Für die In-Chip-SERS-Analytik erfolgte die Spülung des Mikrosystems mit destilliertem Wasser, Konditionierung mit Gefi-Puffer und schließlich Förderung der Analytlösung im Kreis bei einer Flussrate von $24\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. SERS Spektren werden durch punktweise Bestrahlung durch Verwendung des „Bleach Point“-Modus in der Leica Software generiert. Die Anregung erfolgte meist bei 633 nm mit einer Akkumulationszeit von 10 s. Die Aufnahmen erfolgten mit einer CCD Kamera gekoppelt über eine optische Faser am Lichtausgang des Leica Detektor Systems im Bereich von 565 cm^{-1} – 1765 cm^{-1} (Princeton Instruments, Gitter mit 1200 Strichen/mm auf 1200 cm^{-1} zentriert). Das Pinhole wurde für die SERS-Messungen meist komplett geöffnet ($600\text{ }\mu\text{m}$) und z. B. nur für hochauflösende SERS-Hintergrund-Anwendungen im Konfokal-Modus betrieben (1 a.u. bei 580 nm Emission). Die genauen Messeinstellungen der Aufnahmen der hier gezeigten Spektren können Tabelle A.1 entnommen werden. Die Normierung, Basislinienanpassung und statistische Auswertung der Spektren erfolgte in Matlab R2015a [87].

Die SERS-BG Bildgebung laserinduzierter Au Spots im Mikrokanal erfolgte in xy-Richtung im konfokalen Modus und Anregung bei 633 nm mit 60 % Laserintensität und Detektion mittels eines HyD-Detektors im Counting-Modus in EPI-Richtung (Emission von 640 nm–720 nm, 1024x1024 Pixel, Geschwindigkeit 10 Zeilen/s, Zoomfaktor 5,39, 215,61 μm physikalische Länge, 10-faches Objektiv, bidirektional). Die xy-Bilder wurden in z-Richtung jeweils zweimal bei einem bei einem Glasabstand von $-10\text{ }\mu\text{m}$, $-5\text{ }\mu\text{m}$, $0\text{ }\mu\text{m}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ und $10\text{ }\mu\text{m}$ aufgenommen. Mittlere SERS-Hintergrund-Intensitätswerte wurden aus 7x7 xy-Pixelrastern am Ort der entsprechenden SERS-Spektrums in Abhängigkeit des Glasabstandes in z-Richtung berechnet. Die Bestimmung der Glaskante erfolgte über die Laserreflexionsbilder in xz-Richtung.

5.4.3 Vorversuche zur Interaktion, Sensitivität und Selektivität der Analyten mit Silber- und Goldnanopartikeln

Um das Potential der SERS-Analytik mit den Analyten zu bestimmen, erfolgten zunächst Vorversuche mit Silber- und Goldnanopartikeln. Die Analytlösungen wurden dazu im 1:1 Verhältnis mit den Nanopartikellösungen vermischt. Hierbei zeigte sich sowohl eine hohe Abhängigkeit vom Analyten als auch dem Lösungsmittel. Unterschiede machen sich bereits mit bloßem Auge bemerkbar, wie beispielhaft Abbildung 5.17 a zeigt. Während die Nanopartikel in Wasser (auch mit Analyten) stabil sind und die Gelbfärbung aufgrund der plasmonischen Absorption bei 423 nm erhalten bleibt, führt eine Zugabe von Gefi-Puffer aufgrund des hohen Chloridionengehalts zu Verdrängung der Citrationen, Destabilisierung und schließlich Agglomeration der Nanopartikel, was anhand der Entfärbung der Lösung zu erkennen ist [193]. Ein besonderes Phänomen wurde bei CoA gelöst in Gefi-Puffer festgestellt. Hierbei wurde mit zunehmender Konzentration eine Graufärbung der Lösung beobachtet. Mikroskopaufnahmen zeigen, dass die Graufärbung auf die Aggregation von Silberpartikeln im μm -Bereich zurückzuführen ist, welche das Laserlicht streuen.¹

Fokussierung des Laser auf eines dieser Aggregate ermöglicht eine Detektion von CoA bis in den unteren μM -Bereich wie Abbildung 5.17 b zeigt. Eine absolute Quantifizierung wird jedoch durch deutliche Signalschwankungen erschwert. Die intensiven Banden der CS-Streckschwingung bei 629 cm^{-1} [195], der Ringatmung bei 728 cm^{-1} und der C5-N7-Streckschwingungen bei 1327 cm^{-1} im Adeninring weisen darauf hin, dass CoA über beide Enden mit dem Silber reagiert. Aufgrund der Affinität des Silber zu beiden Enden bildet CoA vermutlich einen Linker zwischen den Nanopartikeln, was die zunehmende Agglomeration erklärt. Einbettung des CoA in potentielle Hot Spot-Lückenbereiche ermöglicht somit eine hohe Sensitivität. Aufgrund der sehr heterogenen Struktur dieser zufällig gebildeten Hot Spots liefern diese Art von SERS-Substrat jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse.

Mit AMP und ATP wurde ein solche Aggregation nicht festgestellt. Die Detektion mittels NPs stellte sich daher schwieriger da. Malonat, AMP und ATP sind anionisch geladen und nicht in der Lage, die Chloridionen von der Oberfläche der NPs zu verdrängen [193]. Ein Nachweis von AMP und ATP konnte nur mittels eines von der Bell-Gruppe entwickelten Ansatzes unter Zuhilfenahme von MgSO_4 als Aggregationsagenz ermöglicht werden [193]. Im Unterschied zu NaCl induziert MgSO_4 eine Aggregation, ohne jedoch die Citrationen zu verdrängen. Da AMP und ATP Citrationen zu verdrängen vermögen, sind sie so nachweisbar. Hierbei darf jedoch kein Gefi-Puffer verwendet werden, was es für den praktischen Einsatz einschränkt.²

¹ Mit citratstabilisierten AuNPs hergestellt nach Turkevich [31], $\text{HAuCl}_4/\text{Trinatriumcitrat}$ 0,5 mM/1 mM wurde dagegen eine Verfärbung der roten AuNPs-Lösung nach dunkelblau/grau mit Gefi-Puffer (auch mit AMP) festgestellt (siehe Abbildung A.9). Dies wird auf eine Zunahme der Partikelgröße [194] und/oder Partikelagglomeration durch Chloridionen zurückgeführt. Mit CoA in Gefi-Puffer wird die Lösung dagegen Magenta-Farben. Eine weiterführende spektrale Untersuchung der Phänomene erfolgte hier jedoch nicht.

² Eine weitere interessante Beobachtung der Bell-Gruppe ist die Bildung von Ag^+ -Komplexen mit dem

Abbildung 5.17 c zeigt einen spektralen Vergleich von Edukt- und Produktmischungen unterschiedlicher Verhältnisse der MatB-Reaktion. Die Spektren zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu CoA bzw. Mal-CoA, was auf die oben genannte Einbettung als Linker innerhalb der Silberaggreagte zurückzuführen ist, sodass nur diese vornehmlich detektiert werden. Die Scores der zweiten Hauptkomponente eine PCA zeigen einen Zusammenhang zur der Produktausbeute auf, welcher jedoch nicht signifikant ist. Das entsprechende Loadingspektrum zeigt positive Werte im Bereich von Adeninbanden bei 728 cm^{-1} und 1327 cm^{-1} , negative Werte im Bereich der Thiolbanden bei 629 cm^{-1} . Während CoA sowohl über die Thiolgruppe als auch die Adeninbande eine hohe Affinität zur Silberoberfläche aufweist, ist bei Mal-CoA die Thiol-Bindung aufgrund des Malonylrestes vermutlich weniger affin, was die spektralen Änderungen mit zunehmendem Mal-CoA-Anteil erklärt.

Diese Vorversuche zeigen anschaulich die hohe Komplexität der SERS-Analytik auf. Der Erfolg einer SERS-Messung ist neben der Art des SERS-Substrates im hohen Maße vom Analyten und sogar von der chemischen Umgebung abhängig, was auf ein Zusammenspiel unterschiedlicher Prozesse zurückzuführen ist. Die Zugabe von Chloridionen in hoher Konzentration induziert zunächst eine Agglomeration der Nanopartikel und ist eine weitverbreitete Methode für eine hochsensitive SERS-Analytik durch Einbettung des Analyten innerhalb der Agglomerate [27, 28]. In diesem Fall ist sie jedoch nicht bewusst eingesetzt worden, sondern vielmehr ein Zufallsprodukt durch die Zugabe von Gefi-Puffer, welcher für die oben gezeigte MatB-Reaktion erforderlich ist. Zusätzlich ist der Erfolg von der Affinität des Analyten abhängig. Während CoA und Mal-CoA als eine Art Linker die Agglomeration weiter fortsetzen und durch Einbettung in Hot Spot-Regionen eine sensitive Detektion ermöglichen, findet keine Wechselwirkung und somit Detektierbarkeit mit Malonat, AMP und ATP statt, da diese von den Chloridionen abgestoßen werden.

Der Vergleich von spektralen Unterschieden von Edukt- und Produktmischungen der MatB-Reaktion zeigt auf, dass eine Charakterisierung der MatB-Reaktion durch weitere Optimierung mittels der Agglomerationsmethode prinzipiell ermöglicht werden könnte. Dieser Ansatz wurde hier jedoch nicht weiter verfolgt, da das Ziel letztendlich eine Online-Analytik in Mikrosystemen ist. Prinzipiell könnten nicht immobilisierte Nanopartikel auch im Mikrosystem eingesetzt werden. Zu einem bestehe die Möglichkeit einer gezielteren Agglomeration der Nanopartikel mit der Analytlösungen im Co-Flow. Zum anderen könnte die Nanopartikelherstellung durch Zusammenbringen einer Metallsalzlösung und einem stärkeren Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure bei Raumtemperatur ohne weitere Energiezufuhr bewerkstelligt werden. Zu Anfang dieser Arbeit war dies die erste Option, um eine SERS-Analytik im Mikrosystem zu bewerkstelligen, weshalb auch bei Raumtemperatur reaktive Reaktionsgemische unter-

negativen geladen Adeninring im alkalischen und neutralem Bereich [196, 197]. Diese bilden sich bei niedriger Konzentration und ermöglichen eine Adsorption des Analyten (5'-dAMP) unter physiologischen Bedingungen [196]. Paradoxe Phänomene wie ein Intensitätsabfall mit zunehmender Konzentration, Bandenverschiebungen und pH-Abhängigkeiten werden durch diese Komplexbildung erklärt. Diese Phänomene wurden hier nicht beobachtet, jedoch auch nicht systematisch untersucht.

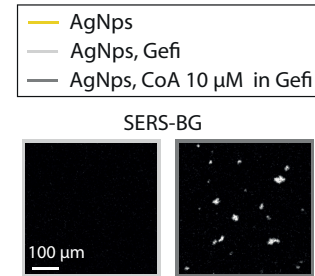
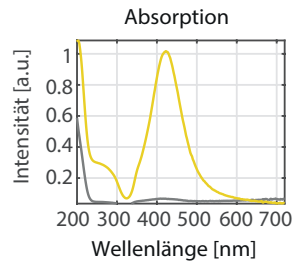
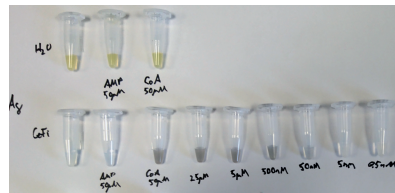
sucht wurden (siehe Methodenteil). Eine auf Nanopartikelagglomeration basierende In-Chip Online-Analytik ist jedoch eher unpraktikabel. So konnte Becker in seiner Dissertation [198] eine Blockade der Kanäle durch Silberagglomerate zur Detektion von Myoglobin bei der Separation in einer Mikro-FEE feststellen. Für eine echte Online-Analytik sollten letztendlich überhaupt keine irreversiblen Wechselwirkungen mit dem SERS-Substrat stattfinden, also der Analyt möglichst nicht verbraucht werden. Eine Immobilisierung des SERS-Substrates ist daher ein erster wichtiger Schritt in Richtung einer solchen echten Online-Analytik.

5.4.4 Mikrostrukturierung und analytische Anwendungen laserinduziert hergestellter SERS-Substrate

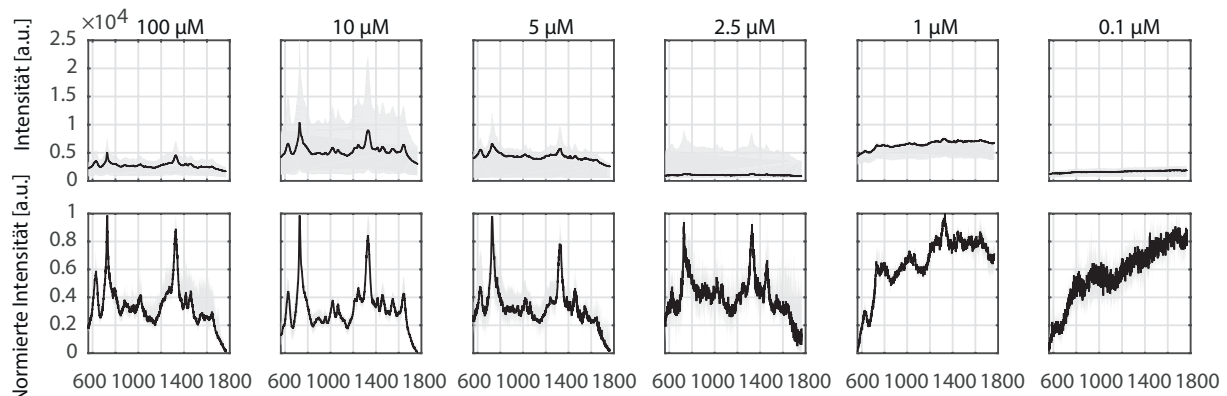
Die Herstellung immobilisierter SERS-Substrate beruht hier wie die Nanopartikelsynthese auf einer Reaktion von einem Metallsalz mit einem Reduktionsmittel. Im Unterschied erfolgt die Energiezufuhr hier laserinduziert durch punktuelle Laserbestrahlung des Metallsalz/Reduktionsmittelgemisches auf einer Glasoberfläche. Während Nanopartikellösungen über eine Wechselwirkung in allen drei Raumrichtungen und komplexe Dynamik aufweisen können und z. B. Agglomerationsprozessen ausgesetzt sind, verfügen immobilisierte „2D-planare“ SERS-Substrate über eine intrinsische 2D-Natur und fixierte Geometrie [7]. Eine SERS-Analytik basierend auf der Einbettung eines Analyten durch Agglomerationsprozesse findet in diesen Substraten somit nicht statt.

Tabelle 5.3 zeigt eine chronologische Übersicht über die in dieser Arbeit laserinduziert hergestellten SERS-Substrate und deren Anwendungen. Die Substrate werden in Silber- und Goldsubstrate unterteilt. Die Machbarkeit einer Immobilisierung und Herstellung unterschiedlicher Mikrostrukturen auf Glasoberflächen wurde zunächst durch Laserbehandlung eines Gemisches aus AgNO_3 /Trinatriumcitrat (0,5 mM/10 mM) auf der Glasoberfläche nach Leopold et al. [34] untersucht. Einleiten der Lösung mittels der Peristaltikpumpe mit anschließender Laserbehandlung ermöglichte eine Immobilisierung am Glasboden des Mikrosystems. Die Mikrostruktur wird durch den Laserscan-Modus bestimmt, wie Abbildung 5.18a zeigt. Linienförmige Substrate wurden durch x-z-Laserscanning, ebene Flächen durch x-y-Laserscanning und punktförmige Substrate durch den Bleach-Point-Modus (Bps) hergestellt. Die Aneinanderreihung mehrerer punktförmiger Bps ermöglicht ein „Schreiben“ im Mikrofluidiksystem im Mikrometermaßstab. Die erzeugten Strukturen war auch nach mehrmaliger Nutzung des Mikrosystems mit hoher Flussrate unverändert. Eine Immobilisierung ist somit unter mikrofluidischen Bedingungen möglich. Im Mikrokanal kommt es jedoch nicht nur zu einer Abscheidung am Glasboden sondern auch zu einer unerwünschten Abscheidung an der PDMS-Wand oberhalb des behandelten Glasbereichs. Dies ist auf den geringen Abstand von 80 μm Kanalhöhe zurückzuführen. Mittels großzügiger Dimensionierung mit einer Kanalhöhe von 1 mm konnte dieser Effekt vermieden werden. Die Durchmessergröße der punktförmigen Strukturen konnte in Abhängigkeit der Laserleistung (2,8 mW und 5,3 mW), Expositionszeit

a Interaktion zwischen Analyt und NPs



b Sensitivität und Quantifizierbarkeit



c Selektivität und relative Quantifizierbarkeit

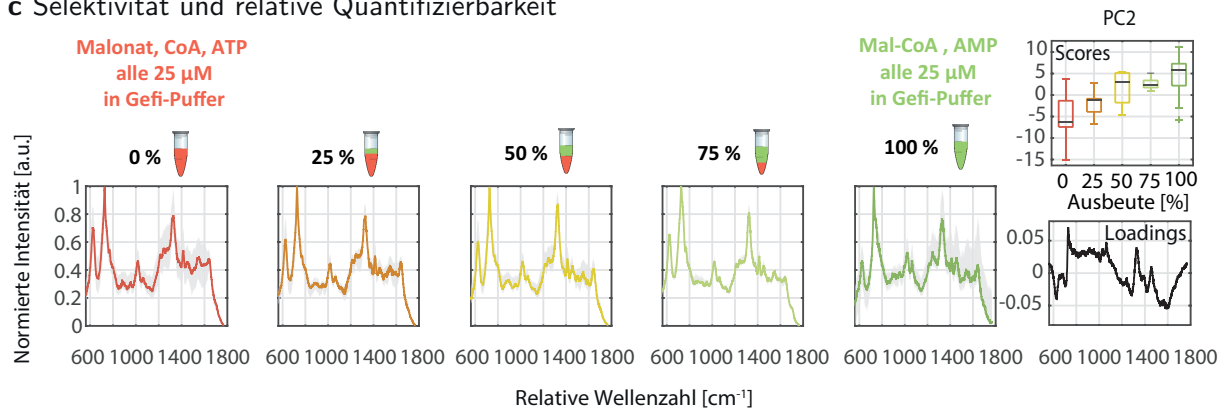


Abbildung 5.17: **Interaktion, Sensitivität und Selektivität der Analyten mit Silbernanopartikeln (AgNPs).** (a) Bereits mit bloßen Auge ist ein Verlust der optischen Eigenschaften der AgNPs durch Zusatz von Gefi-Puffer zu erkennen (1:1 Gemisch Analytlösung : AgNPs). Dies ist auf eine Verdrängung des Citrates durch Chloridionen und damit Destabilisierung und Agglomeration der Nanopartikel zurückzuführen. CoA gelöst in Gefi-Puffer führt zu Bildung größerer μm -Aggregate. CoA bildet hierbei vermutlich eine Art Linker-Molekül. (b) Einbettung von CoA in die AgNPs-Aggregate ermöglicht eine Detektion bis in den unteren μM -Bereich. Aufgrund der immensen absoluten Signalschwankungen ist eine absolute Quantifizierung jedoch nicht möglich. (c) Ein Zusammenhang von Edukt- und Produktmischungen unterschiedlicher Verhältnisse und feiner spektraler Unterschiede ist mittels PCA-Analyse erkennbar, jedoch nicht signifikant.

(15 s und 30 s) und des Glasabstandes des Fokuspunktes ($0\ \mu\text{m}$ – $15\ \mu\text{m}$) kontrolliert werden, wie die Reflexionsaufnahmen in Abbildung 5.18 b zeigen.

Die Spots werden durch eine innere Kreis- und darum liegende Ringstruktur erhöhter Reflexion charakterisiert. Zhang et al. [185] konnten diese konzentrischen Muster bereits mittels REM nachweisen. Die Größe der Spots wurde mittels des Radius der inneren Kreisstruktur und des Innen- und Außenradius des Ringes charakterisiert und nimmt mit dem Leistungs- und Energieeintrag (Leistung mal Expositionszeit) zu. Zudem führt ein zunehmender Abstand des Fokuspunktes vom Abscheidungsort zu größeren Spots, was durch eine Vergrößerung der Kegelschnittebene mit zunehmender Eindringtiefe des Fokuspunktes erklärt wird. Spots mit 30 s Laserbehandlung zeigen einen linearen Verlauf der Spotgröße in Abhängigkeit des Fokuspunktabstandes vom Glas. Der Anstieg liegt im Bereich der numerischen Apertur des Objektivs und verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Spotgröße und Lichtkegelgrundfläche.¹ Bei einer Expositionszeit von 15 s erreicht die Spotgröße ab einer Eindringtiefe von $10\ \mu\text{m}$ Sättigung und wird bei $15\ \mu\text{m}$ Eindringtiefe nur noch geringfügig ($5,2\ \text{mW}$) oder gar nicht größer ($2,8\ \text{mW}$), was durch den geringen Energiedichtebeitrag [$\text{J}/(\text{s cm}^2)$] zu erklären ist. Dieser ist proportional zur Laserleistung P [J/s] und Expositionszeit t [s] und reziprok zur Lichtkegelgrundfläche an der Abscheidungsstelle $r_{\text{Lichtkegel}}$ [cm^2].

Eine erste SERS-Analytik mittels „Bleach Point“ laserinduziert immobilisierter Ag Spots auf Glas erfolgte mit CoA in Gefi-Puffer, da hier gute Erfahrungen mit der Interaktion mit Silbernanopartikeln in Lösung gemacht wurden. In Abbildung 5.19a wird ein gemitteltes CoA SERS Spektrum immobilisierter Silber Spots dem gemittelten SERS Spektrum agglomerierter Silbernanopartikel und einem Ramanspektrum des Feststoffs gegenübergestellt. Die drei Hauptbanden der agglomerierten AgNPs, die Adeninringatmung bei $732\ \text{cm}^{-1}$, C5-N7-Streckschwingung im Adeninring bei $1329\ \text{cm}^{-1}$, die CS-Streckschwingung bei $630\ \text{cm}^{-1}$ und die PO_3^{2-} -Streckschwingung bei $1017\ \text{cm}^{-1}$ sind in den laserinduziert immobilisierten AgNPs ebenfalls auszumachen, jedoch im Mittel sehr viel weniger ausgeprägt, rotlichverschoben (C5-N7-Streckschwingung) und durch weitere intensivere Banden bei $801\ \text{cm}^{-1}$, $929\ \text{cm}^{-1}$ und $1271\ \text{cm}^{-1}$ überlagert. Intensive Signale wurden nur in wenigen Spektren ermittelt und sind nur wenig reproduzierbar. Offenbar ist die Interaktion von CoA auf eine agglomerationsbasierte Einbettung in das SERS-Substrat angewiesen, um reproduzierbare ausgeprägte Signale zu liefern. Ein Wechsel zu auf Glas immobilisierten Goldsubstraten ($\text{HAuCl}_4/\text{Citrat}$, $0,5/1\ \text{mM}$) lieferte noch weniger vielversprechende Ergebnisse, wie beispielhaft eines der wenigen „guten“ Spektren in Abbildung 5.19a zeigt. Die Ringatmung und C5-N7-Streckschwingung des Adeninrings rotlichtverschoben bei $736\ \text{cm}^{-1}$ und $1348\ \text{cm}^{-1}$ bzw. PO_3^{2-} -Streckschwingung blaulichtverschoben bei $1000\ \text{cm}^{-1}$ zeigen nur eine geringfügig höhere Intensität als die Basislinie. Eine CS-Streckschwingung ist gar nicht vorhanden.

¹ Die Lichtkegelgeometrie wurde hier vereinfacht mittels der numerischen Apertur abgeschätzt. Der tatsächliche Lichtkegel wird neben der numerischen Apertur durch die Lichtbrechung in die unterschiedlichen Medien vom Objektiv zum Fokuspunkt bestimmt (Luft nach Glas nach Wasser).

Tabelle 5.3: Übersicht der laserinduziert hergestellten SERS-Substrate immobilisiert auf Glasoberflächen. Die Versuche sind chronologisch angeordnet. Erste Versuche erfolgten mit Silbersubstrat und konzentrierten sich auf die Immobilisierbarkeit auf Glas im Chip, die optische und strukturelle Charakterisierung (SERS-BG, REM) und Untersuchung unterschiedlicher Scan-Modi zur Herstellung des SERS-Substrates. Als Analyt wurde zunächst CoA mit Silbersubstrat und schließlich Goldsubstrat im unteren bis oberen mikromolaren Bereich getestet. Die Versuche lieferten jedoch nur schwer reproduzierbare Ergebnisse. Intensive und reproduzierbare SERS-Signale konnten dagegen mit AMP und ATP bei 100 μm mit Goldsubstrat auf Glas und im Chip generiert werden. Am Ende erfolgte erste Optimierungsschritte für einen ATP Nachweis im Chip mittels Konzepten der statistischen Versuchsplanung (DOE). Bp: „Bleach-Point“.

	Mobile Phase	Optische meter ¹	Para-	Analyt ²	Bemerkungen	
AgNO ₃ /Citrat	0,5/10 mM [34]	xz-Scan		-	auf Glas, REM	
		xy-Scan		-	im Chip ³	
		Bp-„Schreiben“		-	im Chip ³	
		Bp		CoA, 50 μM	im Chip ³	
HAuCl ₄ /Citrat	0,35/1 mM [36] 0,5/1 mM			CoA 0,1-1 mM	auf Glas	
					auf Glas	
	0,5/1 mM	Bp			AMP 100 μM	auf Glas
						ATP 100 μM
0,75/1 mM ⁵				ATP 100 μM	DOE im Chip ⁴	
				-	DOE im Chip ⁴	

¹ Laserinduzierte Herstellung bei 514 nm Anregung.

² SERS-Messung bei 633 nm Anregung. ³ Breite x Höhe: 80 x 80 μm ⁴ 600 x 1000 μm

⁵ Für eine Immobilisierung im Chip ungeeignet aufgrund spontaner Reaktion nach < 1 h.

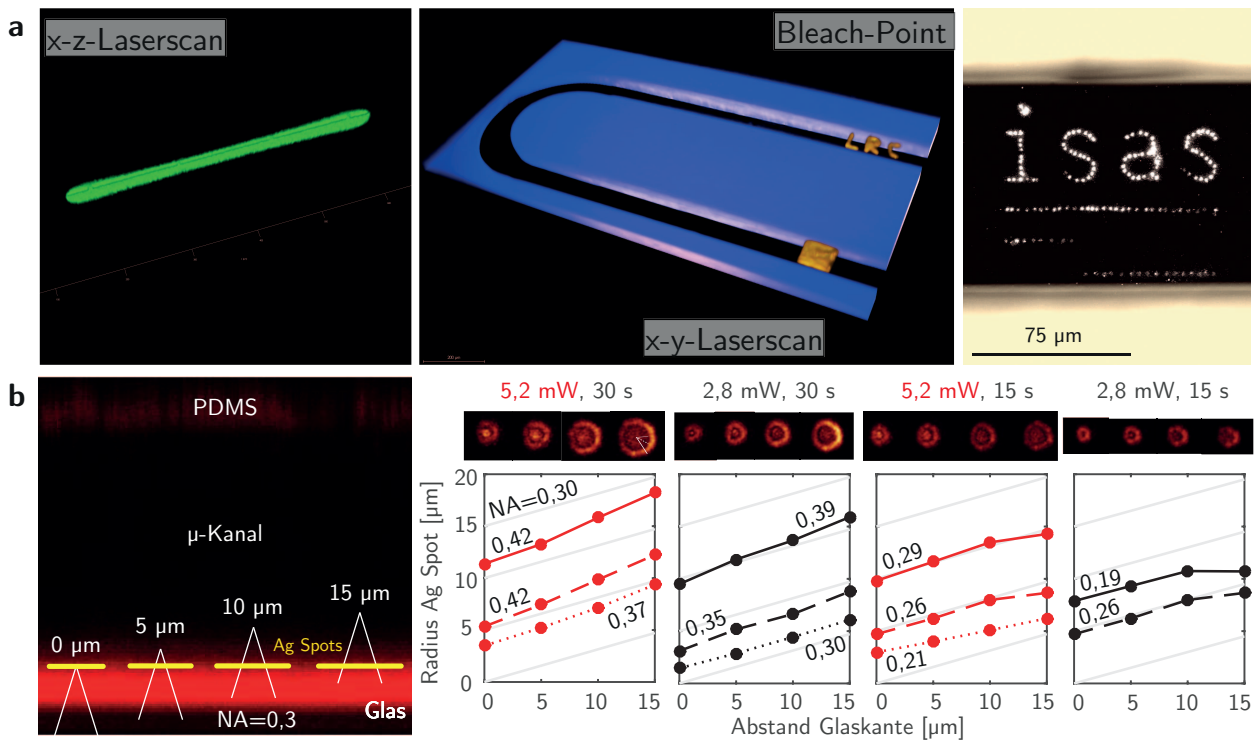


Abbildung 5.18: **Mikrostrukturierung laserinduziert hergestellter SERS-Substrate in Mikrofluidiksystemen.** (a) Mikrostrukturierung von Silbersubstraten mittels unterschiedlicher Scanmodi. Linienförmige Substrate werden mittel x-z-Scanning, Flächenspezifische Substrate mittels x-y-Scanning und kreisförmige „Spots“ mittels des „Bleach-Point“-Modus erzeugt (AgNO_3 / Citrat 0,5 mM/10 mM). Der „Bleach-Point“-Modus ermöglicht „Schreiben“ im Mikrobereich. (b) Einfluss der Laserleistung, Expositionszeit und des Laserfokuspunktes auf den Ag Spot-Größe. Bestimmt wurden der Radius der inneren Kreisstruktur und des Innen- und Außenradius des äußeren Ringes (durchgezogene, gestrichelte und gepunktete Linie). Mit zunehmendem Abstand des Fokuspunktes von der Glaskante, verbreitert sich der Lichtkegel auf Höhe der Glaskante, was zu größeren Spots führt. Nach 30 s Behandlung korreliert die Spotgröße unabhängig von der Laserleistung zur Lichtkegelbreite. Es zeigt sich ein linearer Verlauf deren Anstieg mit $0,3 - 0,42$ im Bereich der numerischen Apertur des Objektivs liegt ($NA = 0,30$). Der Einfluss der Lichtkegelbreite ist weniger ersichtlich bei 15 s Expositionszeit. Die Spotgröße erreicht eine Sättigung bei $10 \mu\text{m}$ bis $15 \mu\text{m}$ Abstand zur Glaskante. 15 s Expositionszeit und $2,8 \text{ mW}$ Laserleistung liefert weniger ausdifferenzierte Strukturen. Der Radius der inneren Kreisstruktur konnte nicht bestimmt werden.

Reproduzierbarere Ergebnisse mit hoher Sensitivität zeigten dagegen abgeschiedene Au Spots in Kombination mit AMP und ATP als Analyt bei 100 μM gelöst in Gefi-Puffer. Abbildung 5.19b zeigt ein gemittelttes ATP SERS Spektrum immobilisierter Au Spots gegenüber dem SERS Spektrum eines kommerziellen Goldsubstrates („Mato“, siehe Kapitel 5.3) und dem Ramanspektrum des Feststoffes. Um den Einfluss des Lösungsmittels zu untersuchen, erfolgten SERS-Messungen mit ATP in destilliertem Wasser (pH 6) und Gefi-Puffer (pH 8). Im Unterschied zur Analytik mittels freischwimmender Nanopartikel, welche eine Agglomeration durch Anionen wie Chloride erfordert, konnten unabhängig von der chemischen Umgebung signalintensive Spektren erhalten werden. Offenbar sind die immobilisierten Substrate robuster gegenüber einer unterschiedlichen chemischen Umgebung (pH, Puffersystem, Salze) und somit vielseitiger einsetzbar. Ähnlich dem Mato Substrat zeigen die SERS Spektren der Au Spots eine intensive Ringatmung und weniger intensive C5-N7-Streckschwingung des Adeninrings bei 733 cm^{-1} und 1334 cm^{-1} . Eine zusätzliche Bande des Adeninrings bei 1459 cm^{-1} lässt auf eine vornehmliche Bindung über den Adeninring schließen. Eine ausgeprägte PO_3^{2-} -Streckschwingung im Spektrum des Mato Substrates bei 1008 cm^{-1} wird hier nicht ermittelt.¹ Jedoch ist die Intensität dieser Bande zu einem gewissen Grad von der Art des Lösungsmittels abhängig, wie der Vergleich der schattierten P90 Spektren von ATP gelöst in destilliertem Wasser und Gefi-Puffer zeigt. In Gefi-Puffer bei pH 8 kann diese Bande intensivere Signale zeigen als in Wasser bei pH 6. Offenbar findet unter alkalischen Bedingungen eine Stabilisierung bzw. erhöhte Wechselwirkung mit den anionischen Phosphatgruppen statt. Möglicherweise hat hier auch die Komplexierung der Phosphatgruppen mit zugesetzten Mg^{2+} -Ionen im Gefi-Puffer Einfluss („aktives ATP“). Aufgrund der gut reproduzierbaren Ergebnisse von ATP in Gefi-Puffer mit Au Spots auf Glas erfolgte eine Überführung des Systems in einen Mikrokanal. Nach Optimierung des Systems wurden hier ebenfalls sehr intensive SERS Spektren mit guter Vergleichbarkeit zu den Spektren außerhalb des Mikrokanals bestimmt. Eine erhöhte PO_3^{2-} -Streckschwingung wurde hier jedoch nicht bestimmt. Abbildung 5.19c zeigt die entsprechenden SERS Spektren für AMP. Zum Vergleich wird neben dem Ramanspektrum des Feststoffs noch ein SERS Spektrum von MgSO_4 induziert agglomerierten AgNPs in Wasser gezeigt. Sowohl das SERS Spektrum von AMP gelöst in Wasser als auch Gefi-Puffer zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu den entsprechenden SERS Spektren von ATP. Ebenfalls ist hier eine erhöhte PO_3^{2-} -Streckschwingung im Gefi-Puffer gegenüber Wasser zu erkennen. Eine Überführung einer SERS-Analytik im Mikrokanal erfolgte hier noch nicht. Aufgrund der ähnlich dem ATP intensiven Signale ist eine Detektion im Mikrokanal von AMP mittels Au Spots jedoch als vielversprechend anzusehen.

Dieser Abschnitt lieferte einen Überblick über die Mikrostrukturierbarkeit und in dieser Arbeit erfolgte SERS Analytik laserinduziert hergestellter Silber- und Goldsubstraten immobilisiert auf Glas. Im Folgenden erfolgt eine detailliertere Charakterisierung der Mikrostruktur und

¹ Eine intensive PO_3^{2-} -Streckschwingung wurde jedoch auch nur in einer Hot Spot Region des Mato Substrates ermittelt. In weniger verstärkten Bereichen des Substrates war das Spektrum durch die Adeninringatmung dominiert.

Herstellungsprozesses eines laserinduziert hergestellten Silbersubstrates. Darauf aufbauend wird näher auf die Vorgehensweise zur Optimierung einer SERS-Analytik im Mikrochip eingegangen, um das in Abbildung 5.19b dargestellte ATP SERS Spektrum zu erhalten. Wie bereits ersichtlich wurde, ist der Erfolg der SERS-Analytik vom SERS-Substrat, dem Analyten, der chemischen Umgebung und der Art der SERS-Messung bestimmt und somit von einer Vielzahl von möglicherweise wechselwirkenden Parametern abhängig. Um sich trotz der hohen Komplexität einen Überblick über das System mit möglichst geringen experimentellen Aufwand zu verschaffen und letztendlich ein optimale SERS-Analytik zu erzielen, wird ein DOE-Ansatz vorgestellt (siehe Abschnitt 4.3, [120]). Wie sich zeigen wird, ist die SERS-Hintergrund (SERS-BG) Bildgebung sowohl zur Charakterisierung des SERS-Substrates als auch für die Optimierung des SERS-Analytik-Prozesses ein wichtiges Hilfsmittel (für SERS-BG Bildgebung, siehe Kapitel 5.3).

5.4.5 Charakterisierung der laserinduzierten SERS-Substrat Herstellung mittels SERS-Hintergrund Mikroskopie und REM

Um den Herstellungsprozess und die optischen Eigenschaften eines laserinduziert hergestellten SERS-Substrates immobilisiert auf Glas zu untersuchen, wurde die SERS-BG Bildgebung angewandt (siehe auch Kapitel 5.3). Nanostrukturelle Information wurde mittels der Raster-elektronenmikroskopie erhalten.

Abbildung 5.20a und d zeigen die SERS-BG Bilder linienförmiger Silbernanopartikel SERS-Substrate immobilisiert auf einem Deckglas (Substrat 1 und 2). Die Herstellung erfolgte durch eine fünfminütige bidirektionale xz-Laserscan-Behandlung einer Silbernitrat/Citrat-Lösung (0,5 mM/10 mM) bei einer Anregung von 514 nm. Der Herstellungsprozess der beiden Substrate unterscheidet sich nur in der gewählten z-Position der xz-Laserscans. Während bei Substrat 1 die Fokussierung innerhalb der Lösung erfolgte, erfolgte bei Substrat 2 der xz-Scan auf Höhe der Glaskante. Entsprechende 3D SERS-BG Bilder sind Abbildung A.10 zu entnehmen.

Substrat 1 zeigt moderate SERS-BG Signale (türkis-grüne Bereich, 100 a.u.) und breitet sich 430 μm in x-Richtung und 35 μm in y-Richtung aus (Schwellwert: 40 a.u.). Die weißen Pfeile kennzeichnen den xz-Scan-Bereich der Laserbehandlung. Eine Intensitätszunahme ist in x-Richtung vom Zentrum zum Rand diesen Scan-Bereichs zu erkennen. Außerhalb des Scan-Bereichs nehmen die SERS-BG-Signale wieder ab. Die diffuse Verteilung der SERS-BG Signale wird auf den großen Abstand der Fokuspunktes von der Glaskante zurückgeführt, was zu einer großen Lichtkegelgröße geringer Photonendichte auf der Höhe der Glaskante führt (vergl. Abschnitt 5.4.4, Einfluss Spotgröße). Die REM Aufnahmen offenbaren, dass der Ursprung der SERS-BG Signale auf Silbernanopartikelbildung (AgNPs) auf dem Deckglas zurückzuführen ist (430 μm x 50 μm) (Abbildung 5.20 b,c). Die SERS-BG und REM Intensitäten zeigen entlang x-Richtung einen identischen Intensitätsverlauf, was auf eine

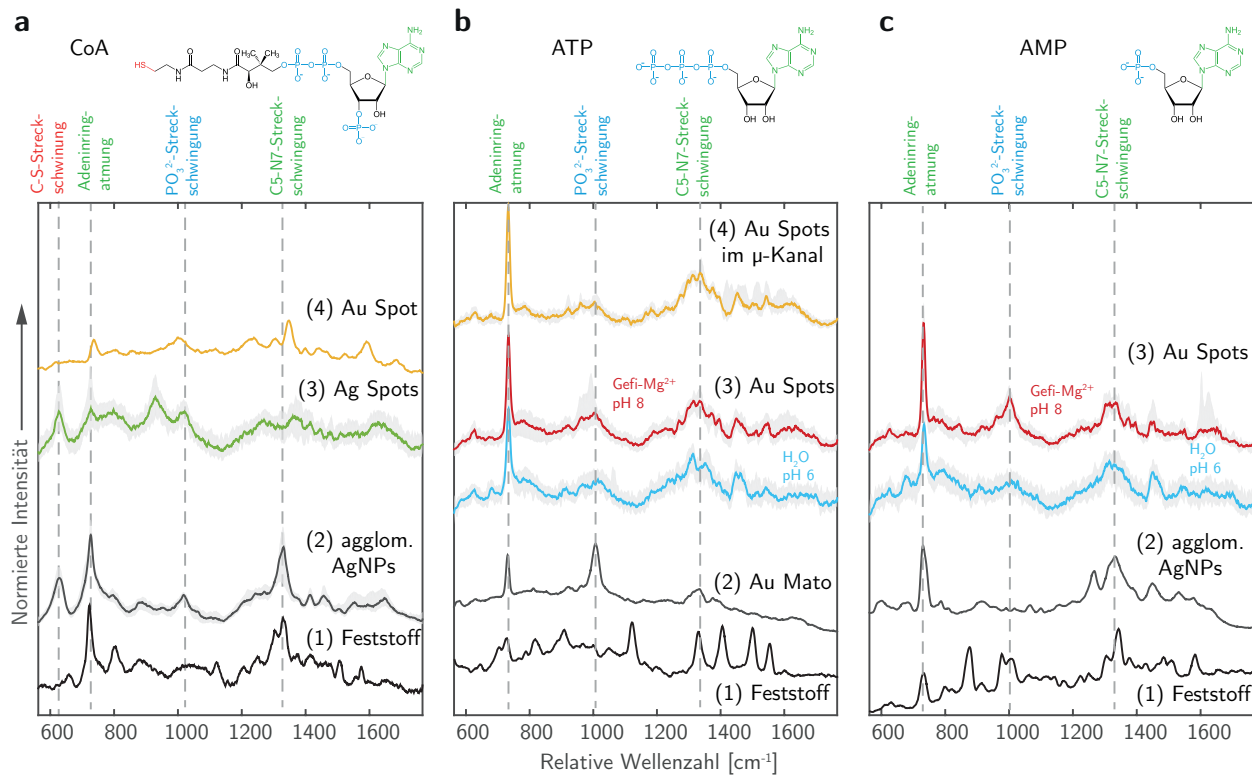


Abbildung 5.19: **Analytische Anwendungen laserinduziert hergestellter SERS-Substrate.** (a) SERS und Raman Spektren von CoA. (1) Ramanspektrum des Feststoffes. (2) 125 μM CoA in Gefi-Puffer mit agglomerierten AgNPs ($N = 17$). (3) 50 μM CoA in Gefi-Puffer mit laserinduziert immobilisierten AgNPs ($N = 10$). (4) 100 μM CoA in Gefi-Puffer mit laserinduziert immobilisierten AuNPs ($N = 1$). (b) SERS und Raman Spektren von ATP. (1) Ramanspektrum des Feststoffes. (2) 100 μM CoA in Gefi-Puffer mit kommerziellen Au-Substrate Mato ($N = 1$). (3) 100 μM ATP in Wasser bzw. Gefi-Puffer mit laserinduziert immobilisierten AuNPs ($N = 9$ bzw. $N = 16$). (4) wie (3) nur im Mikrosystem immobilisiert ($N = 6$, in Gefi-Puffer). (c) SERS Spektren von AMP. (1) Feststoff. (2) 1 mM AMP in Wasser mit MgSO_4 induziert agglomerierten AgNPs ($N = 1$). (3) 100 μM AMP in Wasser bzw. Gefi-Puffer mit laserinduziert immobilisierten AuNPs ($N = 9$ bzw. $N = 6$). Die hier gezeigten gemittelten Spektren entsprechen geglätteten P50-Intensitätswerten (schattierte Spektren zeigen P10 und P90-Werte). Hierbei wurde eine Basislinienanpassung angewandt [87].

Korrelation von Silbernanopartikeldichte und SERS-BG Intensität schließen lässt (Abbildung A.11). Die Intensitätszunahme zum Rand des xz-Scanbereichs kann durch das bidirektionale Laserscanning während der AgNPs-Bildung erklärt werden. Bidirektionales Scannen führt zu einer zunehmenden Verkürzung der Laserbestrahlungs-Zeitintervalle in Richtung des Laserscanrandbereichs. Dies hat eine erhöhte Photonendichte pro Zeit und somit zunehmende AgNP Bildung in Richtung Rand zur Folge. Über diesen Randbereich hinausgehend nimmt die AgNP Bildung bzw. der SERS-BG wieder ab, was auf die verringerte Wirkung des Lasers mit zunehmendem Abstand zum Scan-Bereich zurückzuführen ist.

Substrat 2 zeigt aufgrund der erhöhten Lichtfokussierung und damit Photonendichte am Abscheidungsart sehr viel intensivere und dichter verteilte SERS-BG-Signale gegenüber Substrat 1 (bis in den roten Bereich). Während es sich in x-Richtung ähnlich ausbreitet (450 μm) zeigt es eine geringe Ausbreitung in y-Richtung. Die SERS-BG -Signale breiten sich von 20 μm im Zentrum zu 25 μm am Rand des Scan-Bereichs in y-Richtung aus und nehmen dann sowohl in y-Richtung als auch x-Richtung ab. Diese SERS-BG Verteilung ist wiederum auf den Laserwirkungsgradienten in x-Richtung zu erklären: Aufgrund der kürzeren Zeitintervalle am Rand des bidirektionalen Laserscannings kommt er hier zu einer maximalen Nanopartikelbildung, die sich durch die maximale SERS-BG Signalausbreitung in y-Richtung kenntlich macht. Außerhalb den Scan-Bereichs nimmt die Nanopartikelbildung aufgrund des nicht mehr unmittelbar wirkenden Lasers am Ort wieder ab. Im Zentrum des SERS-Substrates in y-Richtung erscheint eine SERS-BG freie Zone, die sich über das gesamte Substrat in x-Richtung erstreckt. Die y-Position dieser Linie entspricht der Position des xz-Laserscanning also der Region höchster Photonendichte. Die REM Aufnahmen offenbaren, dass diese SERS-BG freie Zone auf ein Zusammenschmelzen der AgNPs zurückzuführen ist (Abbildung 5.20 e-f). Die ausgeprägten SERS-BG Signale in umliegenden Regionen zum xz-Scanbereich sind auf einer hohen Nanopartikeldichte mit einem Erscheinungsbild ähnlich einem Kiesbett zurückzuführen. Die hohe Dichte nahe beieinander und teilweise agglomerierter plasmonischer Nanostrukturen und Ausbildung zahlreicher SERS-sensitiver Lückenbereiche erklärt die erhöhten SERS-BG Signale. Die Abrundungen der SERS-BG freien Linie an den Enden können wiederum auf die abnehmende Photonendichte außerhalb der Scanningzone zurückgeführt werden (Abbildung 5.20 f).

Abbildung 5.20 g-p zeigt zeitaufgelöste SERS-BG Aufnahmen während des fünfminütigen xz-Scan Herstellungsprozesses von Substrat 2. Eine beschleunigte Ausbildung von ersten SERS-BG Signalen ist bereits nach 30 s an den Scanrändern zu erkennen. Dieses Phänomen ist wiederum auf die kürzeren Zeitintervalle der Laserscans, den erhöhten Energieeintrag und damit beschleunigte Nanopartikelbildung zum Rand hin zurückzuführen. Entsprechend beginnt der AgNPs Schmelzprozess, offenbart durch die SERS-BG freie Linie, ebenso zuerst im Randbereich nach 3:30 min. Abbildung 5.20 p zeigt vier gleichmäßig verteilte 6 μm breite Bereiche auf der SERS-BG freien Linie mit nach wie vor ausgeprägten SERS-BG-Signalen. Offenbar findet in diesen Zonen kein AgNP-Schmelzprozess statt, was auf eine geringere

Photonendichte pro Zeit hindeutet. Die REM Aufnahmen lieferten hierzu jedoch keine Hinweise. Die Herkunft dieses Phänomens ist unklar.

5.4.6 Screening und Optimierung der In-Chip-Detektion von ATP mittels laserinduziert hergestellter SERS-Substrate

Der Erfolg der SERS-Analytik ist von zahlreichen Parametern des SERS-Substrates, des Anregungslichts, dem Analyten und seiner chemischen Umgebung abhängig. Da die SERS-Analytik hier unter speziellen Bedingungen im mikrofluidischen System durchgeführt werden soll, kommen weitere mikrosystemspezifische Parameter hinzu. Aufgrund der vielen Einflussfaktoren stellen hier Konzepte der statistischen Versuchsplanung ein hilfreiches Werkzeug dar, um mit möglichst geringem experimentellem Aufwand ein optimales Ergebnis zu erzielen. Den SERS-Prozess muss man sich dazu als ein System mit beeinflussbaren und nicht beeinflussbaren Eingangsgrößen und den Ausgangsgrößen, den zu optimierenden Qualitätsmerkmal(en), vorstellen. Einen Überblick über das System „In-Chip-SERS-Analytik mittels laserinduzierter SERS-Substrate“ verschafft das Parameter-Diagramm in Abbildung 5.21. Entscheidend für den Erfolg ist zunächst eine genaue Definition der Systemgrenzen und letztendlich des zu optimierenden Qualitätsmerkmals: Ziel der Optimierung soll ein möglichst sensitiver Nachweis des Analyten ATP bei einer niedriger Analytkonzentration $100 \mu\text{M}$ gegenüber einer hohen Salzkonzentration im mikrofluidischen Betrieb bei einer Flussrate von $24 \mu\text{L min}^{-1}$ sein. ATP wird aufgrund der biochemischen Relevanz als Analyt ausgewählt. Weiterhin ist dadurch ein Vergleich zu der Performance eines kommerziellen SERS-Substrates möglich, da hier ebenfalls eine $100 \mu\text{M}$ ATP-Lösung im Gefü-Puffer verwendet wurde (siehe Kapitel 5.3). Als Qualitätsmerkmal wird die Intensität der intensiven Adeninringatmung bei 732 cm^{-1} gewählt, da diese, wie in Kapitel 5.3 bereits gezeigt wurde, leicht quantifizierbar ist. Wie die Nanopartikelexperimente in Lösung zeigten, kann die chemische Umgebung, insbesondere die hohe Salzfracht aufgrund einer Konkurrenzadsorption von Chloridionen und Analyt, erheblichen Einfluss auf die SERS-Analytik nehmen. Da das Ziel aber letztendlich eine Monitoring enzymatischer Reaktionen (siehe z. B. MatB-Reaktion in Abbildung 5.15b) oder Separationen ist, erfolgt hier eine Optimierung unter möglichst anwendungsnahen Bedingungen. Die mobile Phase aus Analyt, bestimmter Konzentration, der chemischen Umgebung und der Flussrate sind hier somit fixe Größen und können nicht verändert werden.

Das definierte Qualitätsmerkmal ist zu einem von der Performance des SERS-Substrates und zum anderen von der SERS-Messung selber abhängig. Der SERS-Prozess kann somit durch eine Kopplung des Systems „SERS-Substrat“ und ein darauffolgendes System „SERS-Messung“ beschrieben werden. Eine hohe Signalintensität kann beispielsweise nur durch Abstimmung der Anregungswellenlänge auf die plasmonischen Eigenschaften des SERS-Substrates erzielt werden. Da beide Systeme innerhalb des Mikrokanals stattfinden sollen, können sie von mikrosystemspezifischen kontrollierbaren Parametern wie der Geometrie und

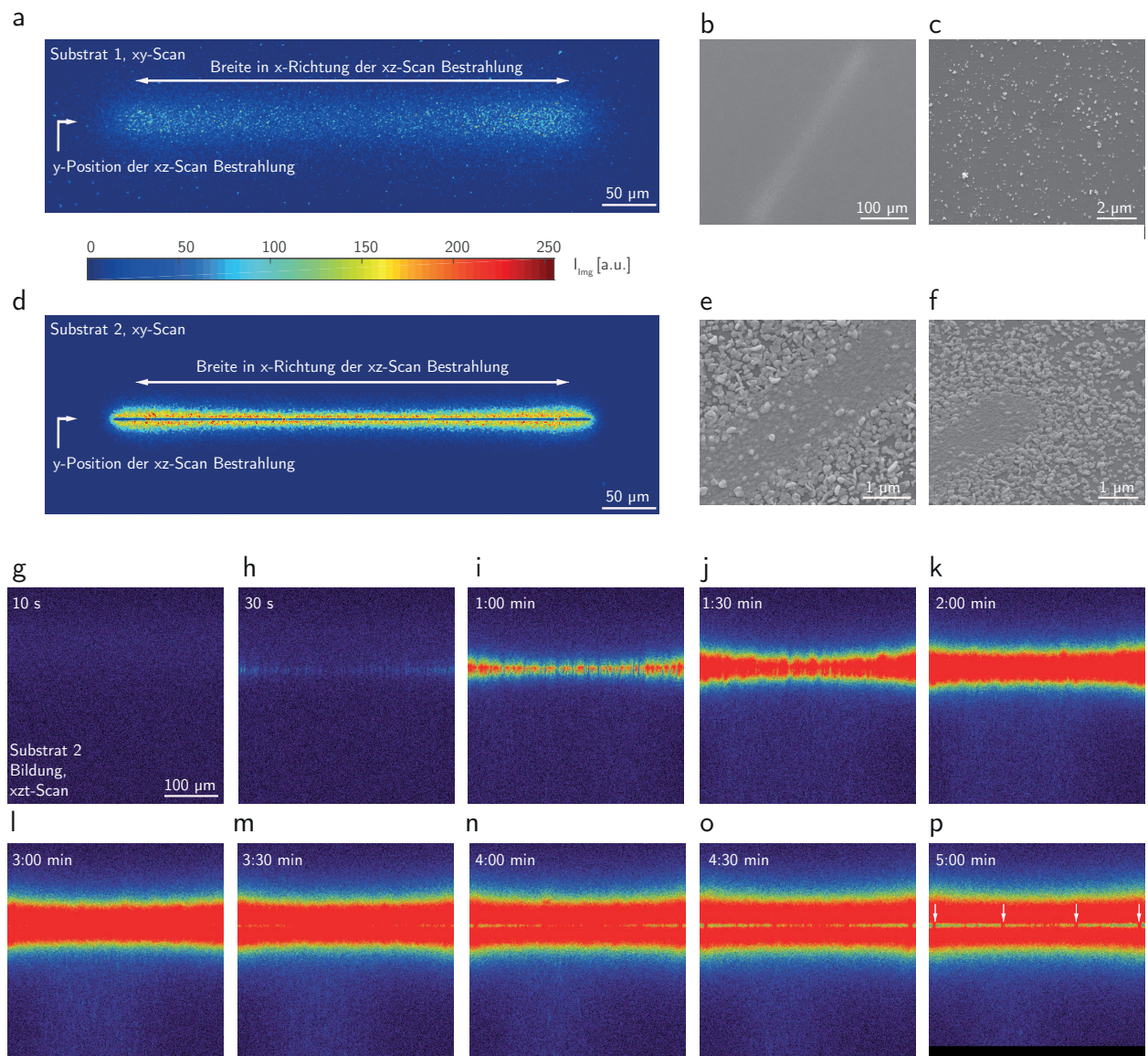


Abbildung 5.20: **Charakterisierung eines laserinduziert hergestellten Silbernanopartikel SERS-Substrates immobilisiert auf Glas.** (a,d) SERS-Hintergrund (SERS-BG) Bilder linienförmiger Silbernanopartikel (AgNPs) SERS-Substrate hergestellt mittels fünfminütiger Laserbehandlung einer Silbernitrat/Citrat-Lösung (0,5 mM/10 mM) auf einem Deckglas (Anregung bei 514 nm und Emission bei 534 nm–600 nm). Die Bildintensität (I_{img}) wird als Heatmap visualisiert. (a) SERS-Substrat hergestellt mittels bidirektionalem xz-Laserscanning innerhalb der Lösung. Der Scan-Bereich wird über die Pfeile verdeutlicht. Die höchsten SERS-BG Intensitäten werden am Rand des Scan-Bereichs bestimmt. (b) Die REM Aufnahme offenbart die Bildung von NPs auf dem Deckglas. (c) Die NPs sind heterogen in Größe und Form und zum Großteil nicht agglomeriert. (d) SERS-Substrat hergestellt mittels bidirektionalem xz-Laserscanning fokussiert auf die Glaskante. Die SERS-BG freie Linie im Zentrum entspricht der y-Position des xz-Laserscanning. (e,d) Die REM Bilder offenbaren einen Zusammenschmelzen der NPs im Zentrum aufgrund einer intensiven Laserbehandlung in dem Bereich. Die hohen SERS-BG Signale im umliegenden Bereich sind auf eine NP-„Kiesbett“-Bildung zurückzuführen. (g-p) SERS-BG Bildgebung während des fünfminütigen xz-Scan Herstellungsprozesses von Substrat 2 (Emission bei 534 nm–600 nm). (h-j) Bildung erster SERS-BG Signale nach 30 s Laserbehandlung. Ausgeprägtere Signale zum Rand hin offenbaren eine zum Rand fortgeschrittene Nanopartikelbildung. (m-p) Beginn des NPs Zusammenschmelzprozesses am Randbereich nach 3:30. (p) Die weißen Pfeile markieren SERS-BG-Signal-Bereiche auf der SERS-BG freien Linie.

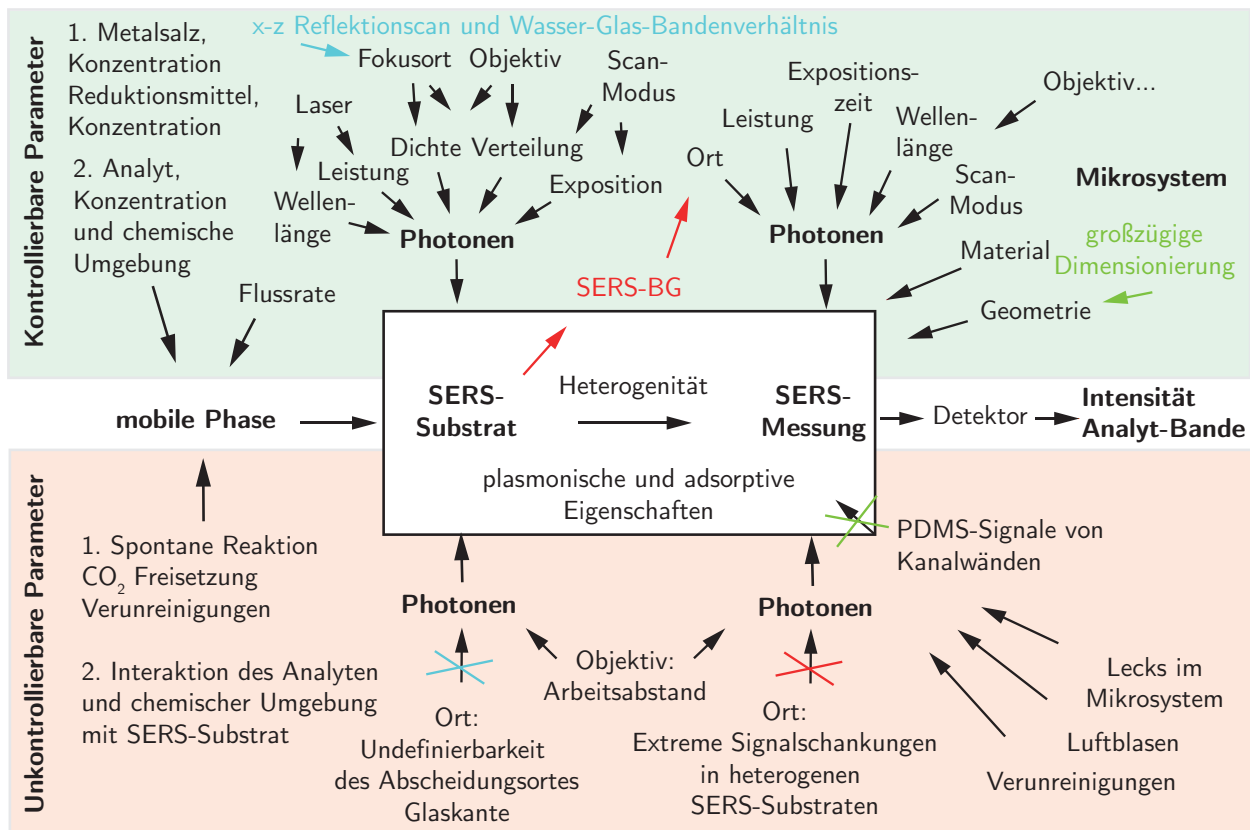


Abbildung 5.21: Mögliche Einflussfaktoren der laserinduzierten Herstellung eines SERS-Substrates und der SERS-Messung in mikrofluidischen Systemen. Das Qualitätsmerkmal „Intensität einer Analyt-Bande“ ist von kontrollierbaren und unkontrollierbaren Parametern abhängig (grüner und roter Bereich). Diese werden in „SERS-Substrat“ (deren Herstellung) und „SERS-Messung“ spezifische Parameter unterteilt und teilen sich jeweils wiederum in Parameter der „mobilen Phase“ und „Photonen“ auf. Übergeordnet können weiterhin Parameter des Systems „Mikrosystem“ Einfluss das System „SERS-Substrat“ und „SERS-Messung“ nehmen. Die unkontrollierbaren Parameter konnten zum Teil durch geeignete Maßnahmen kontrolliert bzw. eliminiert werden (farblich gekennzeichnet).

dem Material des Mikrosystems, aber auch von weniger kontrollierbaren Störgrößen wie Lecks im Mikrosystem, Luftblasenbildung und Verunreinigungen im Mikrosystem beeinflusst werden. Das Mikrosystem bildet anschaulich einen Rahmen um das gekoppelte SERS-Substrat-Messung-System, wie in der Abbildung illustriert wird. Im Folgenden erfolgt eine detailliertere Beschreibung der Systeme „SERS-Substrat“ und „SERS-Messung“ auf Basis der Abbildung 5.21.

5.4.6.1 Das System „SERS-Substrat“

Die Eingangsgrößen des Systems „SERS-Substrat“ werden in die Systeme „mobile Phase“ und „Photonen“ aufgeteilt. Diese beiden Systemen gelangen von außerhalb in das Mikrosystem, liegen also zunächst außerhalb des Rahmens. Kontrollierbare Parameter des Systems „mobile Phase“ sind der Typ des Metallsalzes und Reduktionsmittels und deren Konzentration

bzw. Verhältnisse zueinander. Der Zusammensetzung dieses Reaktionsgemisches werden durch eine zu niedrige Reaktions- aber auch zu hohe Reaktionsfähigkeit Grenzen gesetzt. So zeigte das HAuCl_4 /Trinatriumcitrat-Gemisch mit der Zusammensetzung 0,75 mM/1 mM eine Spontanreaktion nach <1 h bei Raumtemperatur ohne äußere Energiezufuhr und ist daher für eine laserinduzierte In-Situ Herstellung ungeeignet. Das 0,5 mM/1 mM-Gemisch zeigte dagegen Reaktivität nahe dem Optimum. Eine Spontanreaktion machte sich erst am darauffolgenden Tag durch Rotfärbung bemerkbar (ebenso bei 0,35 mM/1 mM-Gemisch). Die Lösung muss daher immer frisch angesetzt werden. Da es sich bei der Spontanreaktion vermutlich um einen kontinuierlich ablaufenden Prozess handelt, ist eine gewisse Spontanreaktion auch nach kürzerer Zeit unvermeidbar. Ein Teil des Reaktionsgemisches kann somit bereits an unerwünschter Stelle abreagieren, was Einfluss auf die Performance des SERS-Substrates oder mikrofluidischen Eigenschaften nehmen kann und somit als unkontrollierbarer Parameter zu kennzeichnen ist. Weitere unkontrollierbare Eingangsgrößen des Systems „mobile Phase“ sind die CO_2 Freisetzung während der laserinduzierten Reaktion, welche sich im Extremfall durch eine Blasenbildung oberhalb der laserbehandelten Stelle bemerkbar macht, was zu einer Verdrängung des Reaktionsgemisches oder später der Analytlösung führen kann und so eine nicht zu vernachlässigende Störgröße darstellen kann (siehe auch Abbildung A.12b). Durch Änderung der Flussrate (Richtung, Geschwindigkeit) können die entstehenden Blasen meist jedoch mit gewissem Aufwand herausbefördert werden.

Das System „Photonen“ wird über die Wellenlänge und Leistung (Photonen pro Zeit) des Lasers, der Photonendichte (Photonen pro Fläche bzw. Volumen), (räumliche) Verteilung und (zeitliche) Exposition definiert. Zunächst einmal ist die Herstellung in hohem Maße von der gewählten Wellenlänge des Lasers abhängig. So wurden sowohl die Silber als auch Goldsubstrate ausschließlich mit einer Anregung bei 514 nm hergestellt. Keine Substratbildung wurde dagegen bei Behandlung einer HAuCl_4 /Trinatriumcitrat-Lösung mit dem 633 nm- und CARS-Laser festgestellt. Da die 514 nm-Anregung gute Ergebnisse lieferte, wurde auf eine Testung weiterer Laser verzichtet. Der Einfluss der Laserleistung wurde bereits hinsichtlich der Mikrostrukturbildung von Ag Spots verdeutlicht. Ebenso wurde der Einfluss des Fokusabstandes vom Glas aufgezeigt. Dieser bestimmt die Lichtfokussierung bzw. Lichtkegelbreite durch das Objektiv am Abscheidungsort und nimmt so mit Einfluss auf die örtliche Verteilung der Photonen und Photonendichte. Das Vermögen Licht zu bündeln bzw. die Lichtkegelspreizung wird durch die numerische Apertur des Objektivs vorgegeben. Für eine maximal hohe Leistungsdichte sollte daher ein Objektiv hoher numerischer Apertur gewählt werden. Limitiert wird deren Einsatz jedoch durch die geringen Arbeitsabstände und der schwierigeren Handhabung. Für die Herstellung im Mikrokanal wird daher ein einfach zu verwendendes Luftobjektiv geringer Fokussierung, aber mit hohem Arbeitsabstand verwendet. Die Photonenverteilung wird zudem durch den Scan-Modus beeinflusst. Der einfachste Scan-Modus ist der „Bleach-Point“-Modus, also die Laserfokussierung auf einen Punkt. Die Photonenverteilung wird hier ausschließlich durch den Grad der Fokussierung bestimmt,

was je nach Fokussierung zu Spots unterschiedlicher Größe führt. Großflächigere Substrate werden durch manuelles Verschieben des Lichtkegels im „Bleach-Point“-Modus oder durch xy- bzw. xz-Laserscanning erreicht. Die Photonerverteilung wird somit durch die Laserverschiebung und durch die Laserfokussierung bestimmt. Laserscanning eines weniger auf dem Glas fokussierten also breiten Lichtkegels führt zu diffusen, großflächigeren Strukturen und Laserscanning eines stark fokussierten, also schmalen Lichtkegels hoher Photonendichte führt zu definierteren, weniger ausgebreiteten Mikrostrukturen. Weiterhin bestimmt der Scan-Modus die Expositionszeit. Während beim Bleach-Point-Modus beliebig lang auf eine Stelle beleuchtet werden kann, ist die Expositionszeit im Scan-Modus durch eine minimale Scanrate limitiert. Eine hohe Expositionszeit wird hier vielmehr über ein wiederholtes Scannen über die selbe bzw. nahezu gleiche Stelle erreicht. Das Zeitintervall hat dabei ebenfalls Einfluss auf die SERS-Substratabscheidung, wie das bidirektionale Scanning in Abschnitt 5.4.5 verdeutlicht.

In Abbildung 5.22a wird der Einfluss von Parametern des Systems „Photonen“ auf die ATP-Banden Intensität anhand der Ergebnisse von vier aufeinander aufbauenden Versuchsplänen aufgezeigt. Der SERS-Substraterzeugung erfolgte mittels des „Bleach-Point“-Modus und orientiert sich an dem Experiment aus Abbildung 5.18 bei dem die Expositionszeit, Leistung und der Glasabstand des Fokuspunktes variiert wurden und ein Effekt aller drei Parameter auf die Mikrostruktur ermittelt wurde. Als Qualitätsmerkmal wird die Intensität der Adeninringbande von ATP bei 732 cm^{-1} bei einer Konzentration von $100\text{ }\mu\text{M}$ in Gefi-Puffer im mikrofluidischen Betrieb untersucht. Aufgrund teils schwer reproduzierbarer Ergebnisse stellt sich die Ermittlung einer optimalen Einstellung als schwierig dar. Wie sich herausstellte, ist sowohl die schlechte Reproduzierbarkeit eines hohen Signals bei gleicher Einstellung zweier Spots als auch die hohe Variabilität innerhalb eines Spots auf eine hohe Heterogenität der Substrate zurückzuführen. Nur in wenigen Bereichen des Spots werden hohe Signale erzielt. Auch bei Mehrfachmessungen spielt somit in hohem Maße der Zufall eine Rolle, ob einer dieser Bereiche getroffen wird oder nicht. Der Parameter „Messort“ des Systems „SERS-Messung“ ist somit als kritischer Parameter anzusehen. Um eine Unabhängigkeit von dieser Störgröße zu ermöglichen, wurde daher im vierten Versuchsplan die SERS-BG Bildgebung zur Auffindung der signalintensiven Bereiche mit anschließender Spektralanalyse ausschließlich dieser Bereiche genutzt. Im folgenden Abschnitt 5.4.6.2 wird näher auf den Zusammenhang zwischen SERS-BG und ATP-Signalbanden eingegangen.

Als weitere Unsicherheit ist die Bestimmung des Glasabstandes bei der laserinduzierten Herstellung zu nennen, da der Bezugspunkt, die Glaskante, nicht exakt definiert werden kann und somit eine gewisse unkontrollierbare Unsicherheit hervorruft. Um den Fehler auf ein Minimum zu reduzieren, erfolgt eine Bestimmung der Glaskante mittels xz-Reflexionsscan bei immer exakt gleicher Messeinstellung. Zusätzlich werden während der Laserbehandlung Spektren im Bereich 600 cm^{-1} – 3500 cm^{-1} zur Erfassung der Glasbande bei 940 cm^{-1} und Wasserbande bei 3460 cm^{-1} aufgenommen. Wie Abbildung A.12 zeigt, korreliert das Verhältnis der beiden Banden zur z-Position im Mikrofluidikkanal. Im interessanten Bereich kurz

oberhalb der Glaskante treten jedoch nur geringfügige spektrale Änderungen auf, sodass diese Information nur der Orientierung des Ist-Werts der z-Position dient.

Aus den Versuchsplänen in Abbildung 5.22 können trotz der Unsicherheiten erste Schlüsse bzgl. einer optimalen Einstellung der optischen Parameter bei der SERS-Substratherstellung für den ATP Nachweis abgeleitet werden. Abbildung 5.22 b und c zeigen die gemittelten Ergebnisse der ersten drei Versuchspläne und des vierten Versuchsplans im Effekt- bzw. Wechselwirkungsdiagramm (siehe Abschnitt 4.3, [120]). Deutliche SERS-Signale werden nur durch eine Fokussierung nahe am Glas (5 μm Abstand) oder auf dem Glas (0 μm im vierten Versuchsplan) erzielt. Offenbar ist eine gewisse Photonendichte erforderlich, um SERS sensitive Nanostrukturen zu erzeugen. Das Wechselwirkungsdiagramm des vierten Versuchsplans in Abbildung 5.22c deutet an, dass sich die Laserleistung und Expositionszeit wechselseitig beeinflussen. Gute Ergebnisse werden bei niedriger Laserleistung mit langer Expositionszeit (60 % und 150 s) oder bei hoher Laserleistung mit kurzer Expositionszeit (100 % und 90 s) ermittelt. Entscheidend ist somit offenbar der Energieeintrag. Ein zu niedrig gewählter Energieeintrag führt zu einer unzureichenden Reaktionsfähigkeit und damit Bildung von Nanostrukturen. Ein zu hoher Energieeintrag kann dagegen zu einem Zusammenschmelzen der Nanostruktur führen, wie bereits in Abschnitt 5.4.5 aufgezeigt wurde. Dies erklärt auch die fehlenden SERS-BG-Signale im Zentrum von Au Spots (siehe nächsten Abschnitt, Abbildung 5.23).

5.4.6.2 Das System „SERS-Messung“

Das System „SERS-Messung“ wird entsprechend dem System „SERS-Substrat“ in die Eingangsgrößen „mobile Phase“ und „Photonen“ aufgeteilt. Prinzipiell kontrollierbare Parameter des Systems „mobile Phase“ sind der Analyttyp, seine Konzentration, die chemische Umgebung (pH-Wert, Puffersystem, Salze) und die Flussrate, mit der die Lösung durch das Mikrosystem gefördert wird. Aufgezeigt wurde bereits die hohe Abhängigkeit des Erfolges der SERS-Messung von sowohl der Wahl des Analyten als auch deren chemischer Umgebung. Während die Adenosinphosphate AMP und ATP ohne Probleme mittels Au Spots nachweisbar waren, war der Nachweis von CoA auch in hoher Konzentration sowohl mit Au als auch Ag Spots nur schwer reproduzierbar. Diese hohe Abhängigkeit kann sowohl auf die Affinität zum SERS-Substrat als auch auf den Streuquerschnitt des Moleküls zurückgeführt werden. Aufgrund einer Konkurrenzsituation der Adsorption von Analyt und chemischer Umgebung (z. B. Chloridionen) und einem chemischen Gleichgewicht des Analyten mit der Umgebung (z. B. aufgrund Basizität/Acidität des Analyten) kann auch die chemische Umgebung die Affinität und den Streuquerschnitt des Moleküls beeinflussen. Um die Performance eines SERS-Substrates zu bewerten, werden daher häufig sehr einfach detektierbare chromophore Moleküle als Modellanalyte verwendet. Da die SERS Analytik aber hier auf eine anwendungsnahe Analytik abzielt, sind sowohl der Analyt als auch die chemische Umgebung keine

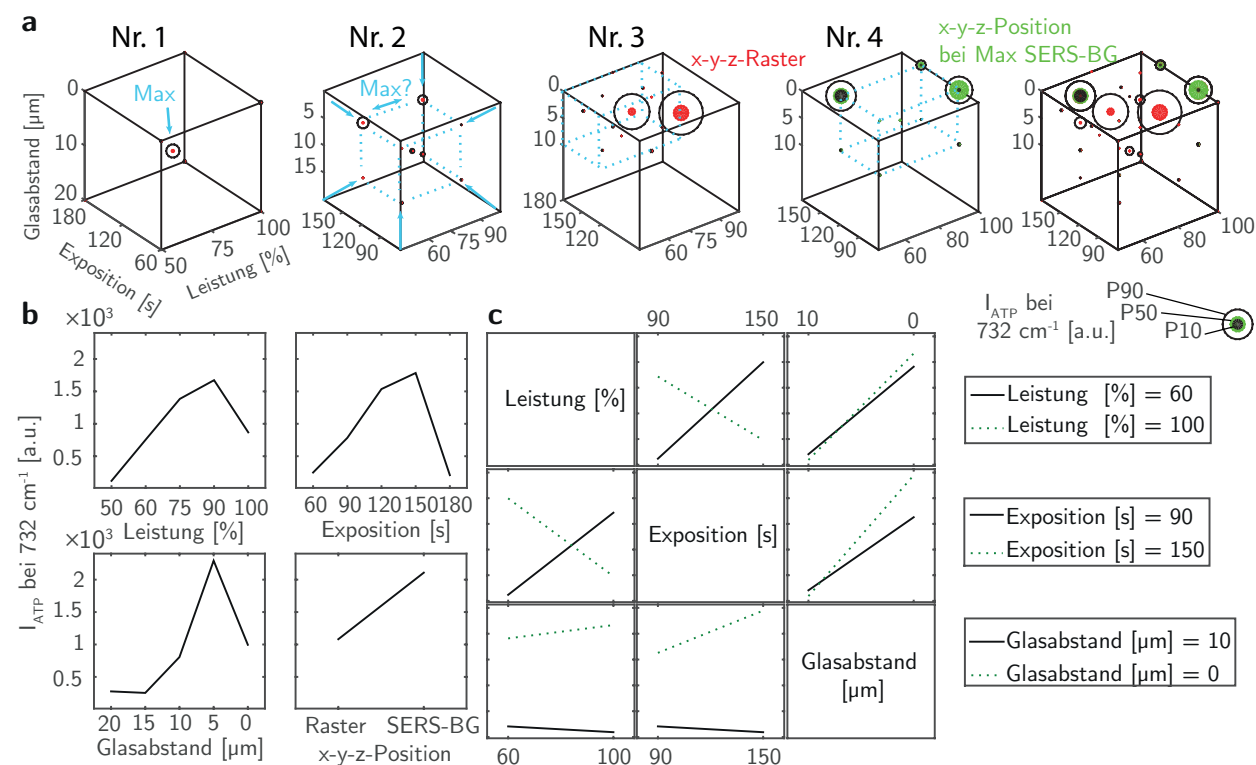


Abbildung 5.22: Bestimmung des Einflusses von Glasabstand, Laserleistung und Expositionszeit bei der Herstellung der Au Spots auf I_{ATP} durch vier aufeinanderfolgende Versuchspläne. (a) Im ersten Versuchsplan erfolgt ein Screening mit großzügigen Stufenabstand im Full Factorial Design mit zentralem Punkt. Die zentrale Einstellung zeigte als einzige deutliche ATP-Signale, sodass im zweiten Versuchsplan eine Verkleinerung der Stufenabstände unter Beibehaltung des zentralen Punktes erfolgte. Im dritten Versuchsplan wurde das aufwendigere Optimierungsdesign, Box-Behnken-Design getestet [120]. Die aufeinanderfolgenden Versuche zeigen, jedoch widersprüchliche Ergebnisse und eine schlechte Reproduzierbarkeit einer optimalen Einstellung. Weiterhin sind erhöhte Signale innerhalb eines Au Spots nur schwer reproduzierbar. Dies ist auf eine hohe Heterogenität der Substrate zurückzuführen. Reproduzierbare Ergebnisse innerhalb eines Spots werden im vierten Versuchsplan mittels SERS-BG Bildgebung erzielt (siehe P10, P50 und P90-Werte). (b) Das Effekt-Diagramm ermittelt aus den gemittelten Werten der Stufen der ersten drei Versuchspläne gibt trotz der Unsicherheiten erste Hinweise auf eine optimale Einstellung. Ein maximales ATP-Signal wird bei einer Laserleistung von 90 %, Expositionszeit von 150 s und einem Glasabstand von 5 μm erzielt. Ebenfalls werden die mittleren Signalintensität der ersten drei Versuchspläne mit dem vierten Versuchsplan verglichen, um den Effekt der Messortsbestimmung (x-y-z-Position, Raster vs. SERS-BG) zu ermitteln. Zu beachten ist, dass die Einstellungen nicht ausgewogen sind und daher nur bedingt vergleichbar sind. (c) Das Wechselwirkungs-Diagramm ermittelt aus dem vierten Versuchsplan offenbart eine Wechselwirkung zwischen Laserleistung und Expositionszeit. Gute Ergebnisse werden bei bei niedriger Laserleistung bei langer Expositionszeit (60 % und 150 s) oder bei hoher Laserleistung und niedriger Expositionszeit (100 % und 90 s) erzielt.

veränderbaren Größen. Eine Erhöhung der Adsorptionseigenschaften oder des Streuquerschnittes des Analyten kann somit nur auf Seiten des SERS-Substrates gesteuert werden. Dies ist jedoch nur mittels hier nicht angewandter spezifisch auf den Analyten angepasster Modifikationen des SERS-Substrates möglich.¹ Die analytspezifischen Eigenschaften werden daher hier den unkontrollierbaren Parametern zugeordnet.

Das System „Photonen“ ist von den kontrollierbaren Parametern prinzipiell mit dem entsprechendem System der laserinduzierten SERS-Substrat Herstellung identisch. Variationsmöglichkeiten bei der SERS-Messung sind die Wellenlänge, der Scan-Modus und der Ort der Messung. Der Einfluss dieser Größen ist in hohem Maße von den Eigenschaften des Systems „SERS-Substrat“ abhängig. Die Wellenlänge muss auf die plasmonischen Eigenschaften des SERS-Substrates angepasst werden.² Der Ort der Messung ist bei heterogenen SERS-Substraten entscheidend, da hier nur intensive Signale in einzelnen Bereichen (Hot Spots) des SERS-Substrates erzielt werden. In homogenen Substraten sollte der Ort der Messung dagegen wenig entscheidend sein. Bezüglich des Scan-Modus kann eine punktweise Messung mittels der Bleach-Point-Modus oder eine Messung über eine größere Fläche durch xy-Scanning erfolgen. Dies führt zu einem sogenannten Averageing-Effekt, um reproduzierbarere Signale auch bei heterogenen Substraten zu erzielen [39, 171]. Eine Messung an mehreren zufällig gewählten Punkten kann ebenfalls die Reproduzierbarkeit steigern [171]. Entscheidend bei der SERS-Messung ist weiterhin die Wahl der Laserleistung. Eine zu hohe Laserleistung kann zu einer Karbonisierung führen (siehe ebenfalls Kapitel 5.3). Andererseits sollte die Laserleistung so hoch gewählt werden, dass auch sensitive Messungen bei kurzer Expositionszeit möglich sind. Kurze Expositionszeiten sind z. B. für eine Online-Monitoring von Reaktionskinetiken erforderlich.

Wie bereits in Abschnitt 5.4.6.1 aufgezeigt wurde, handelt es sich bei den laserinduziert hergestellten Au Spots um sehr heterogene Substrate. Der Messort nimmt somit entscheidenden Einfluss auf die SERS-Messung. Jedoch sollten die messspezifischen Parameter möglichst konstant gehalten werden, um eine Bewertung SERS-Substrat spezifischer Parameter zu ermöglichen. Um den Einfluss des Ortes zu reduzieren und die tatsächliche Performance des Substrates zu erfassen, erfolgten daher zunächst eine Signalmittelung durch wiederholte Messungen an zufällig gewählten Orten des SERS-Substrates. Aufgrund der Mittelung zeigt diese Methode jedoch nicht die maximal mögliche Performance des Substrates an, da hohe Signalintensitäten nur in wenigen Punkten erzielt wurden. Im Extremfall werden die wenigen Bereiche hoher Signalintensität gar nicht erfasst, sodass die Performance des Substrates fälschlicherweise schlechter bewertet wird. Mit Erhöhung der Messpunkte steigt die Wahr-

¹ Die Affinität des Analyten zum SERS-Substrat kann durch gezielte Oberflächenfunktionalisierung des SERS-Substrates bis hin zu einer selektiven Analytadsorption z. B. mittels Aptamere [199, 200] erhöht werden. Der Streuquerschnitt ist im Sinne eine chemischen Verstärkung durch Wechselwirkung des SERS-Substrates mit dem Analyten begrenzt steuerbar.

² Die Wellenlänge kann auch Einfluss auf den Streuquerschnitt des Analyten nehmen. Eine Anregung im UV-Bereich z. B. in Kombination mit einem Aluminium SERS-Substrat könnte bei vielen aromatischen Molekülen sehr viel intensivere Signale aufgrund des SERS-Effekts liefern [201].

scheinlichkeit zur Erfassung dieser Bereiche zwar an, jedoch wird die Methode aufgrund des zunehmenden Zeitaufwands für komplexe Versuchspläne auch nicht mehr praktikabel. Wie sich im Laufe der Optimierung herausstellte können sehr viel gezielter hohe Signalintensitäten durch Anwendung der in Kapitel 5.3 eingeführten SERS-BG Bildgebung erzielt werden. Durch Auffindung und Beschränkung auf potentielle Hot Spot Regionen wird reproduzierbar die maximal mögliche Performance des SERS-Substrates erfasst. Eine fehlerhafte Bewertung des SERS-Substrates durch ausschließliche Messung an signalschwachen Orten wird somit deutlich reduziert.¹

Abbildung 5.23 zeigt den Zusammenhang zwischen spektralem und bildgebenem SERS-BG und der Intensität der Adeninringbande unterschiedlicher Regionen der Au Spots aufgenommen im Mikrokanal auf. Ein linearer Zusammenhang ist zwischen I_{ATP} und I_{BG} zu erkennen, welcher die Basis für die SERS-BG Bildgebung darstellt (siehe Kapitel 5.3). Diese Beziehung ist, wenn auch nicht linear und mit einer höheren Unsicherheit bei hohen Signalintensitäten auf die SERS-BG Bildgebung übertragbar. Die Unsicherheit macht sich dadurch bemerkbar, dass hohe Signalintensitäten im Bild nicht zwangsläufig zu einem hohen spektralen SERS-BG bzw. ATP-Bandensignal im Spektrum führen, wie beispielhaft der blau markierte Punkt zeigt. Das entsprechende Spektrum liefert Aufschluss über die Ursache dieses Phänomens. Während der SERS-BG im roten und orangen Spektrum im mittleren Bereich des Spektrums leicht erhöht ist und zu den Randbereichen abnimmt, zeigt das blaue Spektrum eine ausgeprägte Intensitätszunahme des SERS-BG zu kleinen relativen Wellenzahlen. Der bildgebende SERS-BG erfasst aufgrund des größeren spektralen Fensters im Bereich von 172 cm^{-1} – 1901 cm^{-1} auch Licht mit relativen Wellenzahlen kleiner 600 cm^{-1} . Aufgrund der Spektralform des blauen Spektrums ist anzunehmen, dass die Signalintensitäten im Bereich kleiner 600 cm^{-1} noch deutlich ansteigen, was die erhöhten Signalintensitäten im Bild und Diskrepanz gegenüber dem spektralen SERS-BG erklärt. Das verminderte ATP-Bandensignal im blauen Spektrum kann entsprechend über den plasmonischen Spektralform-Effekt erklärt werden (siehe Abschnitt 2.6.3 [52]). Die Spektralform des SERS-BG lässt darauf schließen, dass nur Banden kleiner 600 cm^{-1} stärker angehoben werden. Zu größeren relativen Wellenlängen nehmen die Bandensignale ab, was sich offenbar bereits bei 732 cm^{-1} bemerkbar macht.² Dennoch wird aus der Abbildung die Leistungsfähigkeit der Methode erkennbar. Nur zwei der 40 bestimmten Spektren zeigt deutlich erhöhte ATP-Bandensignale. Mittels der SERS-BG Bildgebungsmethode können diese Bereiche innerhalb weniger Minuten ausfindig gemacht werden. Aufgrund des Zusammenhangs zur ATP-Bandenverstärkung kann die SERS-BG Bildgebung weiterhin dazu genutzt werden, die Heterogenität der Signalerzeugung mehrerer Spots mit nur einer Aufnahme schnell abzuschätzen und zu vergleichen.

¹ Hier wird die Performance des SERS-Substrates ausschließlich nach Signalintensität bewertet. Ein Gütemaß könnte die Homogenität der Signalgenerierung auf dem SERS-Substrat darstellen. Die SERS-BG Bildgebung könnte hier ebenfalls ein schnelles Werkzeug zu Abschätzung der Homogenität des SERS-Substrates darstellen.

² Das spektrale Fenster wurde für die SERS-BG Bildgebung großzügig eingestellt um hohe Bildintensitäten zu erhalten. Die Ergebnisse legen hier jedoch nahe, dass die SERS-BG Bildgebung möglichst an das spektrale Fenster der Spektrengenerierung angepasst werden sollte.

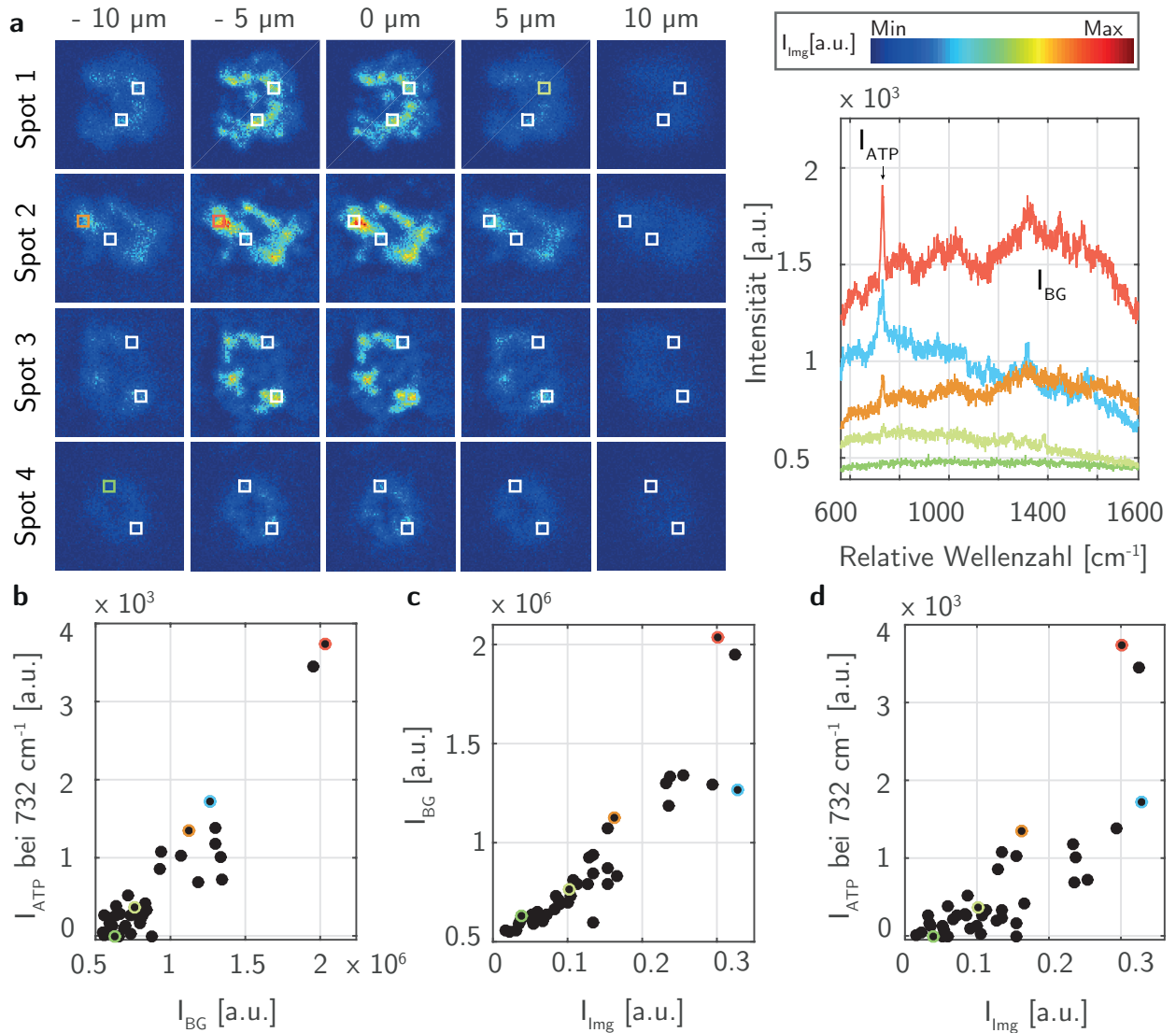


Abbildung 5.23: Einfluss des Messortes und Zusammenhang zum SERS-Hintergrund für die ATP Detektion mittels laserinduziert hergestellter Goldspots im Mikrofluidiksystem. (a) SERS-BG Bildgebung von Au Spots in x-y-z-Richtung und SERS-Spektren ausgewählter Punkte (farblich markiert). Die SERS-BG Bilder entstammen einer x-y-z-Aufnahme von insgesamt 9 Spots (Anregung bei 633 nm, Emission 640 nm–720 nm, Gesamtmessdauer: 4:10 min). Neben Variationen der SERS-BG und Adeninbandenintensitäten zeigen sich Variationen in der Spektralform des SERS-BG (blaues Spektrum). Laserleistung, Expositionszeit und Glasabstand des Fokuspunktes zur Herstellung der Spots: Spot 1 100 %, 150 s, 0 μm ; Spot 2 100 %, 90 s, 0 μm ; Spot 3 60 %, 150 s, 0 μm ; Spot 4 60 %, 90 s, -10 μm . (b-d) Zusammenhang zwischen spektralem und bildgebenem SERS-BG ($I_{\text{BG}}, I_{\text{img}}$) und Intensität der ATP Bande bei 732 cm^{-1} (I_{ATP}) der Ergebnisse aus (a) mit entsprechender Farbcodierung der ausgewählten Punkte. Unsicherheiten resultieren aus Variabilitäten der SERS-BG Spektralform und dem daraus resultierenden plasmonischen Spektralform-Effekt (siehe blaues Spektrum). Dennoch ist ein Zusammenhang erkennbar. Die SERS-BG Bilder in (a) spiegeln somit die Performance der Au Spots wieder.

5.4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die laserinduzierte Reduktion von Silber- und Goldsalzen mittels Trinatriumcitrat ermöglicht eine gezielte Immobilisierung von Nanostrukturen auf der Glasoberfläche innerhalb eines Mikrokanals. Die Methode erfordert nur den Einsatz von Chemikalien der herkömmlichen Nanopartikelsynthese in Lösung und Nutzung des Raman-Messinstruments zur Herstellung und ist damit in jedem Raman-Labor zugänglich und umsetzbar. Der Ort der Abscheidung kann gezielt im Mikrosystem eingestellt werden und ermöglicht so eine ortsabhängige SERS-Analytik. Die Mikro- und Nanostruktur dieser SERS-Substrate und letztendlich deren SERS-Eigenschaften ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig und kann durch Parameter wie Energieeintrag, Scan-Modus oder Lichtfokussierung eingestellt werden. Die Kombination aus SERS-BG Bildgebung und REM zeigte, dass eine maximale Signalverstärkung bei moderaten Energieeinträgen erzielt wird, da die Reaktion einen gewissen Energieeintrag erfordert, zu hohe Energieeinträge jedoch zu einem Zusammenschmelzen der Nanostruktur und damit Verlust der optischen Eigenschaften führen. Der Herstellungsprozess laserinduzierter SERS-Substrate ist somit zwar komplex, liefert jedoch damit auch eine Vielzahl von Stellschrauben, um die In-Chip SERS-Analytik auf eine bestimmte Anwendung hin zu optimieren, welche hier nur im Ansatz aufgezeigt wurden.

In Hinblick auf ein Online-Monitoring enzymatischer Reaktionen und anschließender Trennvorgänge der Reaktanten in Mikrosystemen erfolgten hier mittels Konzepten der statistischen Versuchsplanung ein Screening relevanter Parameter und erste Optimierungsschritte für eine sensitive In-Chip Detektion des biochemischen relevanten ATP Moleküls unter anwendungsnahen Bedingungen. Hierbei stellte sich heraus, dass das SERS-Signal nicht nur vom SERS-Substrat selber, sondern in hohem Maße von der Art des Messvorgangs abhängt. Den analytischen SERS-Prozess muss man sich somit als eine Kopplung zwischen den Systemen „SERS-Substrat“ und „SERS-Messung“ vorstellen. Da die SERS Effizienz auf den laserinduziert hergestellten SERS-Substraten sehr heterogen verteilt ist, war für den Erfolg des ATP Nachweises der Ort der Messung auf dem Substrat entscheidend. Die SERS-BG Bildgebung stellte hierbei ein wichtiges Werkzeug zur Auffindung der signalintensivsten Bereiche dar und könnte ebenso zur Abschätzung der Homogenität des Substrates eingesetzt werden.

Während die Detektion eines Analyten unter anwendungsnahen Bedingungen ein erstes wichtiges Qualitätsmerkmal für die In-Chip SERS-Analytik darstellt, ist die Nicht-Detektierbarkeit des Analyten z. B. nach erfolgtem Spülvorgang ein zweiter wichtiger Schritt in Richtung einer „echten“ zeitaufgelösten Online-Analytik im Fluss. Erste Versuche zeigten jedoch, dass ATP noch nach einstündiger Spülung mittels unterschiedlicher mobiler Phasen und Erhöhung der Flussrate am Substrat nachweisbar war und das Signal nur allmählich abnahm (siehe Anhang, Abbildung A.13). Als Ursache kann die geringe Austauschfähigkeit an der Kanalwand angesehen werden, welcher nur durch Diffusion erfolgt. Zusätzlich deuten die Ergebnisse jedoch darauf hin, dass ATP zu einem gewissen Grade irreversibel am SERS-Substrat gebunden ist.

Die Anforderungen an das SERS-Substrat stellen somit ein gewisses Dilemma dar. Einerseits soll eine möglichst hohe Signalintensität des Analyten und dabei möglichst bestimmter Banden z. B. Phosphatgruppen zur Unterscheidung von AMP und ATP gewährleistet sein, was nur durch eine hohe Affinität des SERS-Substrates zu genau diesen Gruppen ermöglicht werden kann, andererseits soll die Bindung des Analyten reversibel erfolgen, sodass kein Memory-Effekt auftritt. Eine reversible Bindung bestimmter Gruppen des Analyten wäre durch Funktionalisierung des SERS-Substrates denkbar. Da die elektromagnetische Verstärkung exponentiell mit dem Abstand abnimmt, sollte die funktionalisierte Oberfläche nur eine Monolage ausbilden und zudem keine störenden Signale hervorrufen. Im Idealfall sollte die Funktionalisierung entsprechend der SERS-Substrat Herstellung durch Pumpen einer reaktiven Lösung in das Mikrosystem und anschließender laserinduzierter Abscheidung erfolgen. Damit wäre eine vielseitig variable SERS-Sensorplattform für eine In-Chip Online-Analytik geschaffen. Eine multimodale Kombination dieser Sensoren könnte den Informationsgehalt z. B. durch unterschiedliche Edukt- und Produktaffinitäten, pH-Sensitivitäten und Anregungen (z. B. SECARS) zusätzlich steigern.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt Entwicklungen und Anwendungen signalverstärkender Raman-Methoden, der CARS- und der SERS-Mikrospektroskopie für die Analytik niedermolekularer Verbindungen auf. Die Anwendungen konzentrieren sich auf die direkte also Label-freie Identifikation von Metaboliten in Pflanzentrichomen des *Cannabis sativa* L. und in mikrofluidischen Systemen mittels Raman-Spektren als molekulare Fingerprints. Die Analyten reichen von Endprodukten einer enzymatischen Biosynthese – Cannabinoide in Trichomen – bis hin zu den Grundbausteinen der Biochemie – ATP, AMP und CoA in mikrofluidischen Systemen – für den Aufbau dieser komplexen Metabolite. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an die Analytik – hochaufgelöste Bildgebung von Metaboliten in Trichomen bzw. Nachweis der Metabolite im mikromolaren Bereich in Mikrofluidiksystemen werden die zwei komplexeren signalverstärkenden Raman-Methoden, CARS für die chemische Bildgebung und SERS für die hochsensitive In-Chip-Analytik angewandt.

Die CARS-Mikroskopie wurde hier in Kombination mit der (Zwei-Photonen)-Fluoreszenz und Transmission zur Identifikation und Lokalisation von Metaboliten und zellulären Kompartimente eingesetzt. Mittels hyperspektraler Bildgebung war dabei eine Unterscheidung des Chemotypes anhand des spektralen Fingerprints im Ölkörper der Trichome möglich. Zum Einsatz kam dabei ein Entmischungsalgorithmus, der mögliche Nichtlinearitäten im Datensatz berücksichtigt. Mit einer hyperspektralen Aufnahme dieser Probe erfolgte ein Vergleich multivariater Methoden zur Verarbeitung hyperspektraler CARS Daten. Hierbei wurden herkömmliche Methoden (HCA, PCA), der im Raman-Bereich etablierten VCA-Entmischungsalgorithmus und der neuartige Entmischungsalgorithmus als lineare und nichtlineare Version (Euklid- und KNN-DMAXD) hinsichtlich spektraler Zerlegung, Bildkonstrasterzeugung und Interpretierbarkeit der Ergebnisse verglichen. Da alle Algorithmen auf ähnlichen geometrischen Prinzipien den Datensatz widerspiegeln, unterscheiden sie sich generell nur in der Darstellungsform, zerlegen den Datensatz in einer ähnlichen Weise und führen in der groben Interpretation der Daten letztendlich zu ähnlichen qualitativen Ergebnissen. Unterschiede machen sich jedoch bei genauer Interpretation (feine spektrale Unterschiede und quantitativ) bemerkbar. Je nach

Anwendung bzw. Fragestellung ist dabei eine bestimmte Darstellungsform vorteilhaft. Die Entmischungsalgorithmen sind z. B. hinsichtlich der Erzeugung eines graduellen Kontrastes und der Interpretierbarkeit der Ergebnisse der HCA und PCA vorzuziehen. Die stark vereinfachenden, modellfehlerbehafteten (LOF ca. 10 %!) aber dadurch auch leicht interpretierbaren Ergebnisse der Entmischungsalgorithmen auf Basis einer „Reinsten Pixel“-Annahme sollten jedoch kritisch wie bei allen multivariaten Methoden unter Zuhilfenahme der ursprünglichen Rohdaten betrachtet werden, insbesondere bei den CARS-Daten, welche meist eine sehr hohe Pixelanzahl aufweisen (ca. 3 – 5 Endmemberpixel repräsentieren ca. 10^6 Bildpixel!). Mit Hinblick auf eine schnell ausführbare, automatisierte, (semi-)quantitative chemische Bildgebung erfolgte für die Entmischungsalgorithmen eine tiefgehende Analyse hinsichtlich Abundanzen, Modellfehler, Performance und Wiederholbarkeit. Hierbei zeigte sich, dass der VCA-Algorithmus den hyperspektralen Datensatz im Mittel zwar besser widerspiegelt, feine spektrale Merkmale jedoch mittels der DMAXD-Algorithmen besser erkannt werden. Die lineare und nichtlineare Version liefern hierbei unterschiedliche Ergebnisse, die sich dadurch jedoch sehr gut ergänzen und in Kombination somit ein Modell hoher Güte und spektraler Sensitivität liefern können. Ein wesentlicher Vorteil ist zudem, dass die DMAXD-Algorithmen im Unterschied zum etablierten VCA-Algorithmus immer das gleiche Ergebnis liefern. Da die Bioanalytik aufgrund der sehr komplexen Proben bereits mit einer hoher Variabilität zu kämpfen hat, ist eine hohe Zuverlässigkeit der analytischen Methode unabdingbar. Die Anwendung der Methoden ging hier nicht über eine Bildkonstrasterzeugung mittels chemischen Fingerprints hinaus, wobei die Nichtlinearitäten und der nichtresonante Hintergrund offenbar vernachlässigt werden können. Um in Zukunft eine (semi-)quantitative Einzeltrichom-Analytik zu entwickeln, ist eine Validierung der Methoden anhand von CARS-Datensätzen von Reinsubstanzkonzentrationsreihen (quantitativ), Substanzgemischen z. B. unterschiedliche THCA/CBDA-Verhältnisse (semiquantitativ) und schließlich ein Vergleich von untersuchten Realproben mit Referenzmethoden notwendig. Hier wird sich zeigen, inwieweit die Nichtlinearität und der nichtresonante Hintergrund bei einer sehr viel komplexeren quantitativen Auswertung der Daten berücksichtigt werden müssen oder ob ein simple und damit anwendungsfreundlichere Auswertemethode bereits in ausreichendem Maße die quantitative Information erfasst.

Die Anwendung der CARS-Mikroskopie für die Identifikation von Metaboliten in einzelnen Trichomen des *Cannabis* geht hier über die Standardanwendung der Lokalisation von Lipiden als auch Proteinen hinaus und zeigt so eine neuartige Methode für Pflanzenforschung im Allgemeinen auf. Voraussetzung für die Lokalisation eines Metaboliten in einem Pflanzenmaterial ist dabei, dass die Substanz hochkonzentriert vorliegt und möglichst hydrophob ist, also eine hohe Anzahl an CH-Streckschwingungen aufweist. Zudem ist der Metabolit nur detektierbar sofern er nicht mit der intensiven Zweiphotonen-Fluoreszenz von Chlorophyll a überlagert [202]. Um die festgestellte begrenzte spektrale Selektivität der CH-Streckschwingungsbereiches zu umgehen, könnte eine Kombination von CARS Bildge-

bung mit konventioneller Raman-Mikrospektroskopie zur Erfassung von Fingerprintspektren in ausgewählten Bildbereichen ein vielversprechender Ansatz sein. Mittels eines Handheld-Ramanspektrometers wäre eine Vor-Ort-Analytik durch Fokussierung eines IR-Lasers (zur Vermeidung von Chlorophyll a Fluoreszenz) auf die Blüten einer Pflanze im Feld unter Nutzung der hier festgestellten spektralen Unterscheidbarkeit des Chemotyps denkbar. In Hinblick auf die hohe Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung von der Erntezeit und äußeren Bedingungen wie der Lichteinstrahlung, dem derzeitigen Hype um CBD-haltige Produkte und dafür erforderlichen großflächigen Anbau CBDA-reicher Pflanzen, aber auch der zunehmenden Legalisierung THCA-reicher Pflanzen bzw. Produkte hätte ein solches Vor-Ort-Analysegerät großes Marktpotential.

Die SERS-Analytik wurde entwickelt, um sowohl enzymatische Prozesse als auch Trennprozesse in mikrofluidischen System im mikromolarem Bereich online zu erfassen. Aufgrund der biochemischen Relevanz wurde ATP als Analyt ausgewählt, aber auch AMP und in der SERS-Analytik bisher kaum untersuchtes CoA wurden berücksichtigt. Aufgrund einer theoretischen Einzelmoleküldetektierbarkeit ist SERS dabei komplementär zu CARS, welches nur für eine Bildgebung bei hoher CH-Streckschwingungsdichte einsetzbar ist. Neben ersten Versuchen mit herkömmlichen Nanopartikeln in Lösung erfolgte die SERS-Analytik im Chip mittels laserinduziert hergestellter Gold und Silber SERS-Substrate. Die Herstellung basiert ähnlich der Nanopartikelsynthese auf der Reduktion eines Metallsalzes mit Citrat und ist damit in jedem Raman-Labor einfach umsetzbar, wobei der notwendige Energieeintrag laserinduziert erfolgt. Ort und Mikrostruktur dieser Substrate können innerhalb des Mikrofluidiksystems gezielt mittels des Laserscanning-Modus, dem Energieeintrag und der Laserfokussierung eingestellt werden. Da die Detektierbarkeit von ATP von den Eigenschaften des SERS-Substrates und damit von Parametern zur Herstellung aber auch vom Messvorgang selber abhängt, wurden Konzepte der statistischen Versuchsplanung angewandt, um kritische Parameter zu identifizieren und deren Effekte und gegenseitige Wechselwirkungen zu erfassen.

Aufgrund der sehr heterogenen Struktur der laserinduzierten SERS-Substrate ist der Mesort auf dem SERS-Substrat ein entscheidender Faktor für den Nachweis von ATP. Aus diesem Umstand wurde die Laser-Scanning SERS-Hintergrund Mikroskopie zur Detektion der analytsensitiver Hot Spots auf dem SERS-Substrat entwickelt. Diese wurde mittels einer kommerziellen SERS-Substrates evaluiert und schließlich auf laserinduziert erzeugten SERS-Substrate übertragen. Die Methode basiert auf einer in der Literatur bekannten und hier ebenfalls aufgezeigten Korrelation eines Analytbandensignals und dem (hier aufsummierten) SERS-Hintergrund: Wird mittels der SERS-Hintergrund Mikroskopie ein intensives Signal bestimmt, so ist dies ein guter Hinweis darauf, dass in dem Bereich auch ein intensives Signal des Analyten erfasst wird. Aufsummieren der SERS-Hintergrundsignale über einen breiten spektralen Bereich führt zu einem circa 10^3 mal intensiveren Signal gegenüber einzelnen Raman-Banden und ermöglicht so einen großen Bereich eines SERS-Substrates schnell und einfach mittels empfindlicher HyD-Fluoreszenzdetektoren abzuscannen. So können

z. B. signalintensive Bereiche auf einem SERS-Substrat lokalisiert und für eine hochsensitive SERS-Analytik genutzt werden, die Homogenität eines SERS-Substrates bestimmt werden oder der Stichprobenfehler bei der SERS-Analytik an einem zufälligen Ort auf dem SERS-Substrat quantifiziert werden [171]. Aufgrund der hohen Signalintensität ist die Methode für zeitaufgelöste Untersuchungen geeignet, wie in der Arbeit anhand des Monitorings des Herstellungsprozesses laserinduzierter SERS-Substrat gezeigt wurde. Die Kombination von SERS-Hintergrund Mikroskopie und REM stellt zudem ein geeignete Methode zur Bestimmung von Struktur-Eigenschafts-Beziehungen eines SERS-Substrates dar, wie mittels des kommerziellen SERS-Substrates (in Kombination mit weiteren optischen Modalitäten) und der In-Chip laserinduziert hergestellten SERS-Substrate gezeigt wurde. So konnte gezeigt werden, dass eine fehlende Verstärkung des SERS-Hintergrundes auf den laserinduziert hergestellten SERS-Substraten auf ein Zusammenschmelzen der Nanostrukturen bei zu hohem Energieeintrag zurückzuführen ist. Die spektrale Auftrennung des SERS-Hintergrundes auf zwei Kanäle ermöglicht zudem den plasmonischen Spektralform-Effekt oder die Karbonisierung auf einem SERS-Substrat zu charakterisieren. Für eine weitere Anwendung des SERS-Hintergrundes muss die Ursache dieses Phänomens besser aufgeklärt werden. Insbesondere die Rolle des Analyten und der Zusammenhang zwischen Analytsignal und Hintergrundsignal stellen wichtige Fragestellungen für die SERS Grundlagenforschung dar, um die Erkenntnisse letztendlich valide für die Anwendung nutzbar zu machen.

Die hier entwickelte In-Chip-SERS Analytik mittels laserinduziert erzeugter SERS-Substrate ermöglicht durch eine gezielte Abscheidung an mehreren Orten im Mikrofluidiksystem, Prozesse orts aufgelöst zu erfassen. Da in einem Mikrofluidiksystem im Fluss, die Zeit entlang der Flussrichtung in eine Ortskoordinate überführt wird, können SERS-Messungen entlang der Flussrichtung zudem dynamische Prozesse z. B. Reaktionskinetiken [203] in hoher Zeitauflösung erfassen. Das Vermögen einen Prozess in Abhängigkeit des Ortes und der Zeit zu bestimmen, ist neben der Verbesserung der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit entscheidend für einen Durchbruch der SERS-Analytik im Bereich der Mikrofluidik und um sich von etablierten Analytikmethoden auf Basis der Chromatografie abzusetzen (fernab der Vor-Ort-Analytik z. B. in der Kriminalistik [204]). Diese stellen keine direkten In-Chip-Methoden dar, können jedoch als At-Line-Analytik zur Prozesskontrolle genutzt werden und kommen bereits mit sehr geringen Probenmengen aus, was sie auch für mikrofluidische Anwendungen interessant macht. Die Dynamik innerhalb eines Mikrofluidiksystems zu charakterisieren, ist jedoch aufgrund der notwendigen Probenahmen, nicht in dem Maße möglich, wie es für eine In-Chip-Analytik der Fall ist. Ausblickend ist die Funktionalisierung eines SERS-Substrates in Richtung einer multimodal einsetzbaren In-Chip SERS-Analytik zu nennen. Diese kann die Spezifität zu einem bestimmen Analyten steigern und insbesondere den hier ebenfalls festgestellten Memory-Effekt z. B. durch „shell-isolated nanoparticles“ reduzieren [205]. Die Funktionalisierung sollte im Idealfall entsprechend der SERS-Substrat Herstellung durch Pumpen einer reaktiven Lösung in das Mikrosystem und anschließender laserinduzierter

Abscheidung erfolgen. Durch Erzeugung unterschiedlich funktionalisierter Spots wäre so eine vielseitig variable und einfach zu implementierende SERS-Sensorplattform für die In-Chip Online-Analytik geschaffen.

Zusammenfassend ist festzuhalten: Die CARS-Mikroskopie ist die Methode der Wahl um CH-reiche, hoch-konzentrierte niedermolekulare Verbindungen in Pflanzen, Mikroorganismen oder Pilzen mit hoher Zeit und Ortsauflösung zu untersuchen. Unüberwachte multivariate Methoden helfen dabei, die komplexe spektral-spatiale Information eines hyperspektralen CARS Datensatzes in einfacher interpretierbare Spektren und Bilder umzuwandeln. Die SERS-Mikrospektroskopie ermöglicht es, niedermolekulare Verbindungen in verdünnten Proben zu untersuchen. Die In-Chip-SERS-Analytik mittels laserinduziert erzeugter SERS-Substrate ist eine einfach zu implementierende Methode für zeit- und orts aufgelöste Untersuchungen innerhalb eines Mikrofluidiksystems. Die hier eingeführte und vielfältig angewandte SERS-Hintergrund Mikroskopie hat das Potential die bisher ignorierten SERS-Hintergrund Signale aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten und in der angewandten als auch SERS-Grundlagenforschung neue Impulse in Richtung einer SERS-Routineanalytik zu liefern. Die Arbeit zeigt konkret das breite Anwendungsfeld signalverstärkender Raman-Methoden und insbesondere die Komplementarität der CARS- und SERS-Mikrospektroskopie im Bereich der Naturstoffanalytik niedermolekularer Verbindungen auf und befördert somit eine stärkere Verbreitung der Methoden in dem Bereich.

Literaturverzeichnis

- [1] Kreysa, G.; Grabley, S. *Vorbild Natur: Stand und Perspektiven der Naturstoff-Forschung in Deutschland*; 2007.
- [2] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661.
- [3] Kayser, O. Ethnobotany and medicinal plant biotechnology: from tradition to modern aspects of drug development. *Planta medica* **2018**, *84*, 834–838.
- [4] Happyana, N.; Muntendam, R.; Kayser, O. Metabolomics as a bioanalytical tool for characterization of medicinal plants and their phytomedical preparations. *Metabolomics, Proteomics, and Transcriptomics of Cannabis sativa L. Trichomes* **2012**, *5*.
- [5] Degenhardt, F.; Stehle, F.; Kayser, O. In *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*; Preedy, V. R., Ed.; Academic Press: San Diego, 2017; pp 13–23.
- [6] Muntendam, R.; Czepnik, M.; Schütz, V.; Arndt, T.; Quentmeier, A.; Kayser, O. Combinatorial Biosynthesis of Tetrahydrocannabinol: The LEGO-Principle to construct an artificial biosynthetic pathway for THCA. <http://www.tb.bci.tu-dortmund.de/Research/Combinatorial%20biosynthesis%20of%20tetrahydrocannabinol.pdf>.
- [7] Le Ru, E.; Etchegoin, P. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*; Elsevier, 2008.
- [8] Radloff, W. *Laser in Wissenschaft und Technik*; Springer-Verlag, 2010.
- [9] Cheng, J.-X.; Xie, X. S. *Coherent Raman scattering microscopy*; CRC press, 2016.
- [10] Borlinghaus, R. T. *Konfokale Mikroskopie in Weiß: Optische Schnitte in allen Farben*; Springer, 2016.
- [11] Schrader, B. *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*; John Wiley & Sons, 2008.
- [12] Camp Jr, C. H.; Cicerone, M. T. Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering. *Nat Photon.* **2015**, *9*, 295–305.

- [13] Bergner, G. M. Entwicklung und Anwendung der CARS-Mikroskopie zum Nachweis C-deuterierter Wirkstoffe. Ph.D. thesis, Universität Osnabrück, 2013.
- [14] Salzer, R. *Biomedical Imaging: Principles and Applications*; John Wiley & Sons, 2012.
- [15] Zumbusch, A.; Holtom, G. R.; Xie, X. S. Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 4142–4145, PRL.
- [16] Hellerer, T. CARS-Mikroskopie: Entwicklung und Anwendung. Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004.
- [17] Pohling, C. Multiplex-CARS-Mikroskopie zur schnellen und Raman-äquivalenten Charakterisierung biologischer Proben. Ph.D. thesis, Heidelberg, Univ., Diss., 2012, 2012.
- [18] Krabbendam, R.; Pool, M.; de Vries, L. G.; Offerhaus, H. L.; Herek, J. L.; Otto, C. Hybrid imaging of fluorescently labeled cancer drugs and label-free four-wave mixing microscopy of cancer cells and tissues. *Journal of biomedical optics* **2015**, *20*, 086006.
- [19] Camp Jr, C. H.; Lee, Y. J.; Heddleston, J. M.; Hartshorn, C. M.; Walker, A. R. H.; Rich, J. N.; Lathia, J. D.; Cicerone, M. T. High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues. *Nature photonics* **2014**, *8*, 627.
- [20] Cicerone, M. T.; Camp, C. H. Histological coherent Raman imaging: a prognostic review. *Analyst* **2018**, *143*, 33–59.
- [21] Cheng, J.-X.; Volkmer, A.; Xie, X. S. Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *JOSA B* **2002**, *19*, 1363–1375.
- [22] Winterhalder, M. J. Hochempfindliche Schwingungsmikrospektroskopie : Aufbau eines anwendungsorientierten CARS Experiments und Entwicklung eines Ansatzes zum Erreichen der Einzelmolekülsensitivität. Ph.D. thesis, Universität Konstanz, Konstanz, 2013.
- [23] Tabarangao, J. T. "Multimodal Contrast" from the Multivariate Analysis of Hyperspectral CARS Images. M.Sc. thesis, Trent University (Canada), 2014.
- [24] Suga, K.; Kondo, D.; Otsuka, Y.; Okamoto, Y.; Umakoshi, H. Characterization of Aqueous Oleic Acid/Oleate Dispersions by Fluorescent Probes and Raman Spectroscopy. *Langmuir* **2016**, *32*, 7606–7612, PMID: 27404017.
- [25] Panneerselvam, R.; Liu, G.-K.; Wang, Y.-H.; Liu, J.-Y.; Ding, S.-Y.; Li, J.-F.; Wu, D.-Y.; Tian, Z.-Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: bottlenecks and future directions. *Chemical Communications* **2018**, *54*, 10–25.
- [26] Li, Z.; Xu, H. Nanoantenna effect of surface-enhanced Raman scattering: managing light with plasmons at the nanometer scale. *Advances in Physics: X* **2016**, *1*, 492–521.

- [27] Nie, S.; Emory, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **1997**, *275*, 1102–6, Nie Emory United States Science. 1997 Feb 21;275(5303):1102-6.
- [28] Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Physical Review Letters* **1997**, *78*, 1667–1670, PRL.
- [29] Graham, D.; Goodacre, R.; Arnolds, H.; Masson, J.-F.; Schatz, G.; Baumberg, J.; Kim, D.-H.; Aizpurua, J.; Lum, W.; Silvestri, A., et al. Theory of SERS enhancement: general discussion. *Faraday discussions* **2017**, *205*, 173–211.
- [30] Lee, P.; Meisel, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry* **1982**, *86*, 3391–3395.
- [31] Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 15700–15707.
- [32] Zong, C.; Xu, M.; Xu, L.-J.; Wei, T.; Ma, X.; Zheng, X.-S.; Hu, R.; Ren, B. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges. *Chemical reviews* **2018**, *118*, 4946–4980.
- [33] Bjerneld, E. J.; Murty, K.; Prikulis, J.; Käll, M. Laser-Induced Growth of Ag Nanoparticles from Aqueous Solutions. *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 116–119.
- [34] Leopold, N.; Lendl, B. On-column silver substrate synthesis and surface-enhanced Raman detection in capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *396*, 2341–8, Leopold, Nicolae Lendl, Bernhard Research Support, Non-U.S. Gov't Germany Anal Bioanal Chem. 2010 Mar;396(6):2341-8. doi: 10.1007/s00216-010-3468-3. Epub 2010 Feb 3.
- [35] Herman, K.; Szabo, L.; Leopold, L. F.; Chis, V.; Leopold, N. In situ laser-induced photochemical silver substrate synthesis and sequential SERS detection in a flow cell. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *400*, 815–20, Herman, Krisztian Szabo, Laszlo Leopold, Loredana F Chis, Vasile Leopold, Nicolae Germany Anal Bioanal Chem. 2011 May;400(3):815-20. doi: 10.1007/s00216-011-4798-5. Epub 2011 Feb 26.
- [36] Buja, O. M.; Gordan, O. D.; Leopold, N.; Morschhauser, A.; Nestler, J.; Zahn, D. R. Microfluidic setup for on-line SERS monitoring using laser induced nanoparticle spots as SERS active substrate. *Beilstein J Nanotechnol* **2017**, *8*, 237–243, Buja, Oana-M Gordan, Ovidiu D Leopold, Nicolae Morschhauser, Andreas Nestler, Jorg Zahn, Dietrich R T Germany Beilstein J Nanotechnol. 2017 Jan 24;8:237-243. doi: 10.3762/bjnano.8.26. eCollection 2017.

- [37] El-Zahry, M. R.; Genner, A.; Refaat, I. H.; Mohamed, H. A.; Lendl, B. Highly reproducible SERS detection in sequential injection analysis: Real time preparation and application of photo-reduced silver substrate in a moving flow-cell. *Talanta* **2013**, *116*, 972–977.
- [38] Herman, K.; Mircescu, N. E.; Szabo, L.; Leopold, L. F.; Chiş, V.; Leopold, N. In situ Silver Spot Preparation and on-Plate Surface-Enhanced Raman Scattering Detection in Thin Layer Chromatography Separation. *Journal of Applied Spectroscopy* **2013**, *80*, 311–314.
- [39] Huang, J.-A.; Zhao, Y.; Zhu, X.; Zhang, W. Averaging effect on improving signal reproducibility of gap-based and gap-free SERS substrates based on ordered Si nanowire arrays. *RSC Advances* **2017**, *7*, 5297–5305.
- [40] Huang, Y.; Chen, Y.; Wang, L.-L.; Ringe, E. Small morphology variations effects on plasmonic nanoparticle dimer hotspots. *Journal of Materials Chemistry C* **2018**, *6*, 9607–9614.
- [41] Caridad, J. M.; Winters, S.; McCloskey, D.; Duesberg, G. S.; Donegan, J. F.; Krstić, V. Hot-Volumes as Uniform and Reproducible SERS-Detection Enhancers in Weakly-Coupled Metallic Nanohelices. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 45548.
- [42] Hatab, N. A.; Hsueh, C.-H.; Gaddis, A. L.; Retterer, S. T.; Li, J.-H.; Eres, G.; Zhang, Z.; Gu, B. Free-Standing Optical Gold Bowtie Nanoantenna with Variable Gap Size for Enhanced Raman Spectroscopy. *Nano Letters* **2010**, *10*, 4952–4955.
- [43] ID, A. Gold SERS substrate 'Mato'. 2019; <http://atoid.com/shop/sersgold/>.
- [44] Brown, R. J. C.; Milton, M. J. T. Nanostructures and nanostructured substrates for surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Journal of Raman Spectroscopy* **2008**, *39*, 1313–1326.
- [45] Willets, K. A. Super-resolution imaging of SERS hot spots. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 3854–3864.
- [46] Kusch, P.; Mastel, S.; Mueller, N. S.; Morquillas Azpiazu, N.; Heeg, S.; Gorbachev, R.; Schedin, F.; Hübner, U.; Pascual, J. I.; Reich, S.; Hillenbrand, R. Dual-Scattering Near-Field Microscope for Correlative Nanoimaging of SERS and Electromagnetic Hotspots. *Nano Letters* **2017**, *17*, 2667–2673.
- [47] Dab, C.; Awada, C.; Merlen, A.; Ruediger, A. Near-field chemical mapping of gold nanostructures using a functionalized scanning probe. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19*, 31063–31071.

- [48] Awada, C.; Plathier, J.; Dab, C.; Charra, F.; Douillard, L.; Ruediger, A. High resolution scanning near field mapping of enhancement on SERS substrates: comparison with photoemission electron microscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18*, 9405–9411.
- [49] El-Khoury, P. Z.; Gong, Y.; Abellan, P.; Arey, B. W.; Joly, A. G.; Hu, D.; Evans, J. E.; Browning, N. D.; Hess, W. P. Tip-enhanced Raman nanographs: Mapping topography and local electric fields. *Nano letters* **2015**, *15*, 2385–2390.
- [50] Xiao, L.; Schultz, Z. D. Spectroscopic imaging at the nanoscale: technologies and recent applications. *Analytical chemistry* **2017**, *90*, 440–458.
- [51] Ikeda, K.; Suzuki, S.; Uosaki, K. Enhancement of SERS Background through Charge Transfer Resonances on Single Crystal Gold Surfaces of Various Orientations. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 17387–17392.
- [52] Lin, K.-Q.; Yi, J.; Zhong, J.-H.; Hu, S.; Liu, B.-J.; Liu, J.-Y.; Zong, C.; Lei, Z.-C.; Wang, X.; Aizpurua, J.; Esteban, R.; Ren, B. Plasmonic photoluminescence for recovering native chemical information from surface-enhanced Raman scattering. *Nature Communications* **2017**, *8*, 14891.
- [53] Zhang, T.; Lu, G.; Shen, H.; Shi, K.; Jiang, Y.; Xu, D.; Gong, Q. Photoluminescence of a single complex plasmonic nanoparticle. *Sci Rep* **2014**, *4*, 3867, Zhang, Tianyue Lu, Guowei Shen, Hongming Shi, Kebin Jiang, Yuanyuan Xu, Dongsheng Gong, Qihuang England Sci Rep. 2014 Jan 27;4:3867. doi: 10.1038/srep03867.
- [54] Ngoc, L. L. T.; Wiedemair, J.; van den Berg, A.; Carlen, E. T. Plasmon-modulated photoluminescence from gold nanostructures and its dependence on plasmon resonance, excitation energy, and band structure. *Optics express* **2015**, *23*, 5547–5564.
- [55] Cai, Y.-Y.; Liu, J. G.; Tauzin, L. J.; Huang, D.; Sung, E.; Zhang, H.; Joplin, A.; Chang, W.-S.; Nordlander, P.; Link, S. Photoluminescence of gold nanorods: Purcell effect enhanced emission from hot carriers. *Acs Nano* **2018**, *12*, 976–985.
- [56] Cai, Y.-Y.; Sung, E.; Zhang, R.; Tauzin, L. J.; Liu, J.; Ostovar, B.; Zhang, Y.; Chang, W.-S.; Nordlander, P.; Link, S. Anti-Stokes Emission from Hot Carriers in Gold Nanorods. *Nano letters* **2019**,
- [57] Beversluis, M. R.; Bouhelier, A.; Novotny, L. Continuum generation from single gold nanostructures through near-field mediated intraband transitions. *Physical Review B* **2003**, *68*, 115433, PRB.
- [58] Lin, K.-Q.; Yi, J.; Hu, S.; Sun, J.-J.; Zheng, J.-T.; Wang, X.; Ren, B. Intraband hot-electron photoluminescence from single silver nanorods. *ACS Photonics* **2016**, *3*, 1248–1255.

- [59] Hugall, J. T.; Baumberg, J. J. Demonstrating Photoluminescence from Au is Electronic Inelastic Light Scattering of a Plasmonic Metal: The Origin of SERS Backgrounds. *Nano Letters* **2015**, *15*, 2600–2604.
- [60] Mertens, J.; Kleemann, M.-E.; Chikkaraddy, R.; Narang, P.; Baumberg, J. J. How Light Is Emitted by Plasmonic Metals. *Nano Letters* **2017**, *17*, 2568–2574.
- [61] Mahajan, S.; Cole, R. M.; Speed, J. D.; Pelfrey, S. H.; Russell, A. E.; Bartlett, P. N.; Barnett, S. M.; Baumberg, J. J. Understanding the surface-enhanced Raman spectroscopy “background”. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *114*, 7242–7250.
- [62] Barnett, S. M.; Harris, N.; Baumberg, J. J. Molecules in the mirror: how SERS backgrounds arise from the quantum method of images. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*, 6544–6549.
- [63] Wagner, J.; Tipler, P.; Mosca, G.; Basler, M.; Kommer, C. Physik für Wissenschaftler und Ingenieure, 7. dt. Aufl. 2015.
- [64] Mooradian, A. Photoluminescence of Metals. *Phys. Rev. Lett.* **1969**, *22*, 185–187.
- [65] Boyd, G.; Yu, Z.; Shen, Y. Photoinduced luminescence from the noble metals and its enhancement on roughened surfaces. *Physical Review B* **1986**, *33*, 7923.
- [66] Farcau, C.; Astilean, S. Evidence of a surface plasmon-mediated mechanism in the generation of the SERS background. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 3861–3863.
- [67] Park, J.-E.; Kim, J.; Nam, J.-M. Emerging plasmonic nanostructures for controlling and enhancing photoluminescence. *Chemical science* **2017**, *8*, 4696–4704.
- [68] Fang, Y.; Chang, W.-S.; Willingham, B.; Swanglap, P.; Dominguez-Medina, S.; Link, S. Plasmon emission quantum yield of single gold nanorods as a function of aspect ratio. *Acs Nano* **2012**, *6*, 7177–7184.
- [69] Moore, A. A.; Jacobson, M. L.; Belabas, N.; Rowlen, K. L.; Jonas, D. M. 2D correlation analysis of the continuum in single molecule surface enhanced Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 7292–7293.
- [70] Aitchison, H. et al. Analytical SERS: general discussion. *Faraday Discussions* **2017**, *205*, 561–600.
- [71] Wattanavichean, N.; Casey, E.; Nichols, R. J.; Arnolds, H. Discrimination between hydrogen bonding and protonation in the spectra of a surface-enhanced Raman sensor. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20*, 866–871.

- [72] Cheng, Y.; Zhao, J.; Wen, T.; Li, G.; Xu, J.; Hu, A.; Gong, Q.; Lu, G. Enhanced light emission from plasmonic nanostructures by molecules. *The Journal of Physical Chemistry C* **2017**, *121*, 23626–23632.
- [73] Tsang, J. C.; Demuth, J. E.; Sanda, P. N.; Kirtley, J. R. Enhanced raman scattering from carbon layers on silver. *Chemical Physics Letters* **1980**, *76*, 54–57.
- [74] Kudelski, A.; Pettinger, B. SERS on carbon chain segments: monitoring locally surface chemistry. *Chemical Physics Letters* **2000**, *321*, 356–362.
- [75] Otto, A. What is observed in single molecule SERS, and why? *Journal of Raman Spectroscopy* **2002**, *33*, 593–598.
- [76] Bjerneld, E. J.; Svedberg, F.; Johansson, P.; Käll, M. Direct Observation of Heterogeneous Photochemistry on Aggregated Ag Nanocrystals Using Raman Spectroscopy: The Case of Photoinduced Degradation of Aromatic Amino Acids. *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108*, 4187–4193.
- [77] Itoh, K.; Kudryashov, I.; Yamagata, J.; Nishizawa, T.; Fujii, M.; Osaka, N. Raman Microspectroscopic Study on Polymerization and Degradation Processes of a Diacetylene Derivative at Surface Enhanced Raman Scattering Active Substrates. 2. Confocal Raman Microscopic Observation of Polydiacetylene Adsorbed on Active Sites. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 271–276.
- [78] Kudelski, A. Raman studies on the coverage integrity of monolayers formed on silver from various -functionalised alkanethiols. *Vibrational Spectroscopy* **2006**, *41*, 83–89.
- [79] Itoh, T.; Yamamoto, Y. S.; Biju, V.; Tamaru, H.; Wakida, S.-i. Fluctuating single sp² carbon clusters at single hotspots of silver nanoparticle dimers investigated by surface-enhanced resonance Raman scattering. *AIP Advances* **2015**, *5*, 127113.
- [80] Domke, K. F.; Zhang, D.; Pettinger, B. Enhanced Raman Spectroscopy: Single Molecules or Carbon? *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 8611–8616.
- [81] Itoh, T.; Yamamoto, Y. S. Recent topics on single-molecule fluctuation analysis using blinking in surface-enhanced resonance Raman scattering: clarification by the electromagnetic mechanism. *Analyst* **2016**, *141*, 5000–5009.
- [82] Microsystems CMS GmbH, L. Leica TCS SP8 Labormikroskop. 2015; <http://www.medicaexpo.de/prod/leica-microsystems/product-70745-548625.html>.
- [83] Microsystems CMS GmbH, L. Leica TCS SP8 Scan Head. 2015; https://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20TCS%20SP8/Brochures/Leica%20TCS%20SP8%20Scan%20Head-Flyer_EN.pdf.

- [84] Microsystems CMS GmbH, L. Leica Objectives. 2014; https://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20TCS%20SP8%20STED%203X/Brochures/Leica%20TCS%20SP8%20Objective-Brochure_EN.pdf.
- [85] Sanderson, J. Understanding Light Microscopy. **2019**,
- [86] Lagarias, J. C.; Reeds, J. A.; Wright, M. H.; Wright, P. E. Convergence properties of the Nelder–Mead simplex method in low dimensions. *SIAM Journal on optimization* **1998**, *9*, 112–147.
- [87] H C Eilers, P.; Boelens, H. Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing. *Unpubl. Manuscr* **2005**,
- [88] Meyer, T.; Chemnitz, M.; Baumgartl, M.; Gottschall, T.; Pascher, T.; Matthaus, C.; Romeike, B. F.; Brehm, B. R.; Limpert, J.; Tunnermann, A., et al. Expanding multimodal microscopy by high spectral resolution coherent anti-Stokes Raman scattering imaging for clinical disease diagnostics. *Analytical chemistry* **2013**, *85*, 6703–6715.
- [89] Lim, R. S.; Suhaim, J. L.; Miyazaki-Anzai, S.; Miyazaki, M.; Levi, M.; Potma, E. O.; Tromberg, B. J. Identification of cholesterol crystals in plaques of atherosclerotic mice using hyperspectral CARS imaging. *Journal of lipid research* **2011**, jlr-M018077.
- [90] Lin, C.-Y.; Potma, E. O.; Suhaim, J. L.; Nien, C. L.; Jester, J. V.; Miljkovic, M. D.; Diem, M. Picosecond spectral coherent anti-Stokes Raman scattering imaging with principal component analysis of meibomian glands. *Journal of biomedical optics* **2011**, *16*, 021104.
- [91] Bocklitz, T.; Meyer, T.; Schmitt, M.; Rimke, I.; Hoffmann, F.; von Eggeling, F.; Ernst, G.; Guntinas-Lichius, O.; Popp, J. Invited Article: Comparison of hyperspectral coherent Raman scattering microscopies for biomedical applications. *APL Photonics* **2018**, *3*, 092404.
- [92] El-Mashtoly, S. F.; Niedieker, D.; Petersen, D.; Krauss, S. D.; Freier, E.; Maghnouj, A.; Mosig, A.; Hahn, S.; Kotting, C.; Gerwert, K. Automated identification of subcellular organelles by coherent anti-stokes Raman scattering. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 1910–20, El-Mashtoly, Samir F Niedieker, Daniel Petersen, Dennis Krauss, Sascha D Freier, Erik Maghnouj, Abdelouahid Mosig, Axel Hahn, Stephan Kotting, Carsten Gerwert, Klaus Research Support, Non-U.S. Gov't United States Biophys J. 2014 May 6;106(9):1910-20. doi: 10.1016/j.bpj.2014.03.025.
- [93] Tabarangao, J. T.; Slepko, A. D. Mimicking Multimodal Contrast with Vertex Component Analysis of Hyperspectral CARS Images. 2015.
- [94] Shlens, J. A Tutorial on Principal Component Analysis. *CoRR* **2014**, *abs/1404.1100*.

- [95] Jolliffe, I. T.; Cadima, J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2016**, *374*, 20150202.
- [96] Miljković, M.; Chernenko, T.; Romeo, M. J.; Bird, B.; Matthäus, C.; Diem, M. Label-free imaging of human cells: algorithms for image reconstruction of Raman hyperspectral datasets. *Analyst* **2010**, *135*, 2002–2013.
- [97] Hedegaard, M.; Matthäus, C.; Hassing, S.; Krafft, C.; Diem, M.; Popp, J. Spectral unmixing and clustering algorithms for assessment of single cells by Raman microscopic imaging. *Theoretical Chemistry Accounts* **2011**, *130*, 1249–1260.
- [98] Ward Jr, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* **1963**, *58*, 236–244.
- [99] Cadima, J.; Jolliffe, I. On Relationships between uncentred and column-centred Principal Component Analysis. *Pakistan Journal of Statistics* **2009**, *25*.
- [100] Li, X.; Zhou, R.; Xu, Y.; Wei, X.; He, Y. Spectral unmixing combined with Raman imaging, a preferable analytic technique for molecule visualization. *Applied Spectroscopy Reviews* **2017**, *52*, 417–438.
- [101] Masia, F.; Glen, A.; Stephens, P.; Borri, P.; Langbein, W. Quantitative Chemical Imaging and Unsupervised Analysis Using Hyperspectral Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 10820–10828, PMID: 24099603.
- [102] Di Napoli, C.; Pope, I.; Masia, F.; Watson, P.; Langbein, W.; Borri, P. Hyperspectral and differential CARS microscopy for quantitative chemical imaging in human adipocytes. *Biomedical optics express* **2014**, *5*, 1378–1390.
- [103] Masia, F.; Karuna, A.; Borri, P.; Langbein, W. Hyperspectral image analysis for CARS, SRS, and Raman data. *Journal of Raman Spectroscopy* **2015**, *46*, 727–734.
- [104] Dobigeon, N.; Tourneret, J.-Y.; Richard, C.; Bermudez, J. C. M.; McLaughlin, S.; Hero, A. O. Nonlinear unmixing of hyperspectral images: Models and algorithms. *IEEE Signal Processing Magazine* **2014**, *31*, 82–94.
- [105] Heylen, R.; Scheunders, P.; Rangarajan, A.; Gader, P. Nonlinear Unmixing by Using Different Metrics in a Linear Unmixing Chain. *IEEE J Sel Top Appl Earth Obs Remote Sens* **2015**, *8*, 2655–2664.
- [106] Chang, C.-I. *Hyperspectral data processing: algorithm design and analysis*; John Wiley & Sons, 2013.

- [107] Heylen, R.; Burazerovic, D.; Scheunders, P. Fully Constrained Least Squares Spectral Unmixing by Simplex Projection. *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* **2011**, *49*, 4112–4122.
- [108] Heylen, R.; Scheunders, P. A Distance Geometric Framework for Nonlinear Hyperspectral Unmixing. *IEEE J Sel Top Appl Earth Obs Remote Sens* **2014**, *7*, 1879–1888.
- [109] Jaumot, J.; Gargallo, R.; de Juan, A.; Tauler, R. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* **2005**, *76*, 101–110.
- [110] Prats-Mateu, B.; Felhofer, M.; de Juan, A.; Gierlinger, N. Multivariate unmixing approaches on Raman images of plant cell walls: new insights or overinterpretation of results? *Plant methods* **2018**, *14*, 52.
- [111] Bioucas-Dias, J. M.; Plaza, A.; Dobigeon, N.; Parente, M.; Du, Q.; Gader, P.; Chanussot, J. Hyperspectral unmixing overview: Geometrical, statistical, and sparse regression-based approaches. *IEEE journal of selected topics in applied earth observations and remote sensing* **2012**, *5*, 354–379.
- [112] Meyer, T.; Bergner, N.; Medyukhina, A.; Dietzek, B.; Krafft, C.; Romeike, B. F. M.; Reichart, R.; Kalff, R.; Popp, J. Interpreting CARS images of tissue within the C–H stretching region. *J. Biophotonics* **2012**, *5*, 729–733.
- [113] Nascimento, J. M. P.; Dias, J. M. B. Vertex component analysis: a fast algorithm to unmix hyperspectral data. *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* **2005**, *43*, 898–910.
- [114] Heylen, R.; Parente, M.; Scheunders, P. Pixel purity vertex component analysis. *Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS), 2017 IEEE International*. 2017; pp 213–216.
- [115] Nascimento, J. M. P.; Dias, J. M. B. Vertex Component Analysis: A Fast Algorithm to Extract Endmembers Spectra from Hyperspectral Data. *Pattern Recognition and Image Analysis*. Berlin, Heidelberg, 2003; pp 626–635.
- [116] Heinz, D.; Chang, C.-I.; Althouse, M. L. Fully constrained least-squares based linear unmixing [hyperspectral image classification]. *Geoscience and Remote Sensing Symposium, 1999. IGARSS'99 Proceedings. IEEE 1999 International*. 1999; pp 1401–1403.
- [117] Bro, R.; De Jong, S. A fast non-negativity-constrained least squares algorithm. *J. Chemometrics* **1997**, *11*, 393–401.
- [118] Lee, K. A subpixel target detection algorithm for hyperspectral imagery. Ph.D. thesis, Rochester Institute of Technology, 2003.

- [119] Schott, J. R.; Lee, K.; Raqueno, R.; Hoffmann, G.; Healey, G. A subpixel target detection technique based on the invariance approach. AVIRIS Airborne Geoscience workshop Proceedings. 2003.
- [120] Siebertz, K.; Van Bebber, D.; Hochkirchen, T. *Statistische Versuchsplanung*; 2010.
- [121] Marzo, V. D.; Bifulco, M.; Petrocellis, L. D. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 771–784, 10.1038/nrd1495.
- [122] Katona, I.; Freund, T. F. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 923–930, 10.1038/nm.f.1869.
- [123] Baker, D.; Pryce, G.; Croxford, J. L.; Brown, P.; Pertwee, R. G.; Huffman, J. W.; Layward, L. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* **2000**, *404*, 84–87, 10.1038/35003583.
- [124] Hall, W.; Christie, M.; Currow, D. Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation. *Lancet Oncol.* **2005**, *6*, 35–42.
- [125] Andre, C. M.; Hausman, J.-F.; Guerriero, G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. 2016; 26870049[pmid] Front Plant Sci.
- [126] Wagner, G. J. Secreting Glandular Trichomes: More than Just Hairs. *Plant Physiol.* **1991**, *96*, 675–679, 16668241[pmid] Plant Physiol.
- [127] Spring, O.; Bienert, U. Capitulate Glandular Hairs from Sunflower Leaves: Development, Distribution and Sesquiterpene Lactone Content. *J. Plant Physiol.* **1987**, *130*, 441–448.
- [128] Werker, E. Trichome diversity and development. *Adv. Bot. Res.* **2000**, *31*, 1–35.
- [129] Dayanandan, P.; Kaufman, P. B. Trichomes of Cannabis sativa L. (Cannabaceae). *Am. J. Bot.* **1976**, *63*, 578–591.
- [130] Wang, G. Recent progress in secondary metabolism of plant glandular trichomes. *Plant Biotechnol. (Tsukuba)* **2014**, *31*, 353–361.
- [131] Hammond, C. T.; Mahlberg, P. G. Morphology of Glandular Hairs of Cannabis sativa from Scanning Electron Microscopy. *Am. J. Bot.* **1973**, *60*, 524–528.
- [132] Onofri, C.; de Meijer, E. P. M.; Mandolino, G. Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in Cannabis sativa L. and its relationship with chemical phenotype. *Phytochemistry* **2015**, *116*, 57–68.
- [133] Weiblen, G. D.; Wenger, J. P.; Craft, K. J.; ElSohly, M. A.; Mehmedic, Z.; Treiber, E. L.; Marks, M. D. Gene duplication and divergence affecting drug content in Cannabis sativa. *New Phytol.* **2015**, *208*, 1241–1250.

- [134] Page, J. E.; Boubakir, Z. Aromatic prenyltransferase from Cannabis. 2014.
- [135] van Bakel, H.; Stout, J. M.; Cote, A. G.; Tallon, C. M.; Sharpe, A. G.; Hughes, T. R.; Page, J. E. The draft genome and transcriptome of Cannabis sativa. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R102, van Bakel, Harm Stout, Jake M Cote, Atina G Tallon, Carling M Sharpe, Andrew G Hughes, Timothy R Page, Jonathan E Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't England Genome Biol. 2011 Oct 20;12(10):R102. doi: 10.1186/gb-2011-12-10-r102.
- [136] Aizpurua-Olaizola, O.; Soydaner, U.; Öztürk, E.; Schibano, D.; Simsir, Y.; Navarro, P.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 324–331.
- [137] Marks, M. D.; Tian, L.; Wenger, J. P.; Omburo, S. N.; Soto-Fuentes, W.; He, J.; Gang, D. R.; Weiblen, G. D.; Dixon, R. A. Identification of candidate genes affecting 9-tetrahydrocannabinol biosynthesis in Cannabis sativa. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 3715–3726, 10.1093/jxb/erp210.
- [138] de Meijer, E. P. M.; van der Kamp, H. J.; van Eeuwijk, F. A. Characterisation of Cannabis accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica* **1992**, *62*, 187–200.
- [139] Hazekamp, A.; Peltenburg, A.; Verpoorte, R.; Giroud, C. Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from Cannabis sativa L. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28*, 2361–2382.
- [140] Happyana, N.; Agnolet, S.; Muntendam, R.; Van Dam, A.; Schneider, B.; Kayser, O. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal Cannabis sativa using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry* **2013**, *87*, 51–9, Happyana, Nizar Agnolet, Sara Muntendam, Remco Van Dam, Annie Schneider, Bernd Kayser, Oliver Research Support, Non-U.S. Gov't England Phytochemistry. 2013 Mar;87:51-9. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.11.001. Epub 2012 Dec 29.
- [141] Bacigalupo, M. A.; Ius, A.; Meroni, G.; Grassi, G.; Moschella, A. Time-Resolved Fluoroimmunoassay for 9-Tetrahydrocannabinol As Applied to Early Discrimination of Cannabis sativa Plants. *J. Agr. Food Chem.* **1999**, *47*, 2743–2745.
- [142] Mediavilla, V.; Steinemann, S. Essential oil of Cannabis sativa L. strains. *J. Int. Hemp Assoc.* **1997**, *4*, 80–82.
- [143] Nissen, L.; Zatta, A.; Stefanini, I.; Grandi, S.; Sgorbati, B.; Biavati, B.; Monti, A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (Cannabis sativa L.). *Fitoterapia* **2010**, *81*, 413–419.

- [144] Talamond, P.; Verdeil, J. L.; Conejero, G. Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules* **2015**, *20*, 5024–37, Talamond, Pascale Verdeil, Jean-Luc Conejero, Genevieve Research Support, Non-U.S. Gov't Switzerland Molecules. 2015 Mar 19;20(3):5024-37. doi: 10.3390/molecules20035024.
- [145] Buschmann, C.; Lichtenthaler, H. K. Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* **1998**, *152*, 297–314.
- [146] García-Plazaola, J. I.; Fernández-Marín, B.; Duke, S. O.; Hernández, A.; López-Arbeloa, F.; Becerril, J. M. Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Science* **2015**, *236*, 136–145.
- [147] Roshchina, V. V. Vital autofluorescence: application to the study of plant living cells. *Int J Spectrosc* **2012**, *2012*.
- [148] Dayanandan, P.; Kaufman, P. B. Trichomes of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *Am. J. Bot.* **1976**, *63*, 578–591.
- [149] Kim, E.; Mahlberg, P. Immunochemical localization of tetrahydrocannabinol (THC) in cryofixed glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae). *Am. J. Bot.* **1997**, *84*, 336, Kim, E Mahlberg, P United States Am J Bot. 1997 Mar;84(3):336.
- [150] Kim, E. S.; Mahlberg, P. G. Secretory vesicle formation in the secretory cavity of glandular trichomes of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *Mol. Cells* **2003**, *15*, 387–95, Kim, Eun Soo Mahlberg, Paul G RR 00570/RR/NCRR NIH HHS/United States Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Korea (South) Mol Cells. 2003 Jun 30;15(3):387-95.
- [151] Garbacik, E. T.; Korai, R. P.; Frater, E. H.; Korterik, J. P.; Otto, C.; Offerhaus, H. L. In planta imaging of 9-tetrahydrocannabinolic acid in *Cannabis sativa* L. with hyperspectral coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 046009–046009, 10.1117/1.JBO.18.4.046009.
- [152] Chernenko, T.; Buyukozturk, F.; Miljkovic, M.; Carrier, R.; Diem, M.; Amiji, M. Label-Free Raman Microspectral Analysis for Comparison of Cellular Uptake and Distribution between Non-Targeted and EGFR-Targeted Biodegradable Polymeric Nanoparticles. 2013; 24298430[pmid] Drug Deliv Transl Res.
- [153] Krafft, C.; Belay, B.; Bergner, N.; Romeike, B. F. M.; Reichart, R.; Kalff, R.; Popp, J. Advances in optical biopsy - correlation of malignancy and cell density of primary brain tumors using Raman microspectroscopic imaging. *Analyst* **2012**, *137*, 5533–5537.
- [154] Rustichelli, C.; Ferioli, V.; Baraldi, M.; Zanolli, P.; Gamberini, G. Analysis of cannabinoids in fiber hemp plant varieties (*Cannabis sativa* L.) by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* **1998**, *48*, 215–222.

- [155] Mechtler, K.; Bailer, J.; de Hueber, K. Variations of 9-THC content in single plants of hemp varieties. *Ind. Crops Prod.* **2004**, *19*, 19–24.
- [156] Datwyler, S. L.; Weiblen, G. D. Genetic variation in hemp and marijuana (*Cannabis sativa* L.) according to amplified fragment length polymorphisms. *J. Forensic Sci.* **2006**, *51*, 371–375.
- [157] Lynch, R. C.; Vergara, D.; Tittes, S.; White, K.; Schwartz, C. J.; Gibbs, M. J.; Ruthenburg, T. C.; deCesare, K.; Land, D. P.; Kane, N. C. Genomic and Chemical Diversity in *Cannabis*. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2016**, *35*, 349–363.
- [158] Nagy, B.; Farkas, A.; Borbás, E.; Vass, P.; Nagy, Z. K.; Marosi, G. Raman Spectroscopy for Process Analytical Technologies of Pharmaceutical Secondary Manufacturing. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 1.
- [159] Byrne, H. J.; Knief, P.; Keating, M. E.; Bonnier, F. Spectral pre and post processing for infrared and Raman spectroscopy of biological tissues and cells. *Chemical Society Reviews* **2016**, *45*, 1865–1878.
- [160] Khandasammy, S. R.; Fikiet, M. A.; Mistek, E.; Ahmed, Y.; Halamkova, L.; Bueno, J.; Lednev, I. K. Bloodstains, paintings, and drugs: Raman spectroscopy applications in forensic science. *Forensic Chemistry* **2018**,
- [161] Vajna, B.; Patyi, G.; Nagy, Z.; Bódis, A.; Farkas, A.; Marosi, G. Comparison of chemometric methods in the analysis of pharmaceuticals with hyperspectral Raman imaging. *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42*, 1977–1986.
- [162] Pohling, C.; Buckup, T.; Motzkus, M. Hyperspectral data processing for chemoselective multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy of unknown samples. *Journal of biomedical optics* **2011**, *16*, 021105.
- [163] Khmaladze, A.; Jasensky, J.; Price, E.; Zhang, C.; Boughton, A.; Han, X.; Seeley, E.; Liu, X.; Holl, M. M. B.; Chen, Z. Hyperspectral Imaging and Characterization of Live Cells by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microscopy with Singular Value Decomposition (SVD) Analysis. *Applied Spectroscopy* **2014**, *68*, 1116–1122, PMID: 25198903.
- [164] El-Mashtoly, S. F.; Niedieker, D.; Petersen, D.; Krauss, S. D.; Freier, E.; Maghnouj, A.; Mosig, A.; Hahn, S.; Kotting, C.; Gerwert, K. Automated identification of subcellular organelles by coherent anti-stokes Raman scattering. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 1910–20, El-Mashtoly, Samir F Niedieker, Daniel Petersen, Dennis Krauss, Sascha D Freier, Erik Maghnouj, Abdelouahid Mosig, Axel Hahn, Stephan Kotting, Carsten Gerwert, Klaus Research Support, Non-U.S. Gov't United States Biophys J. 2014 May 6;106(9):1910-20. doi: 10.1016/j.bpj.2014.03.025.

- [165] Chang, C.-I.; Chen, S.-Y.; Li, H.-C.; Chen, H.-M.; Wen, C.-H. Comparative study and analysis among ATGP, VCA, and SGA for finding endmembers in hyperspectral imagery. *IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing* **2016**, *9*, 4280–4306.
- [166] Chang, C.-I.; Wen, C.-H.; Wu, C.-C. Relationship exploration among PPI, ATGP and VCA via theoretical analysis. *International Journal of Computational Science and Engineering* **2013**, *8*, 361–367.
- [167] Alfonso-García, A.; Paugh, J.; Farid, M.; Garg, S.; Jester, J.; Potma, E. A machine learning framework to analyze hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy images of expressed human meibum. *Journal of Raman Spectroscopy* **2017**, *48*, 803–812.
- [168] Fang, Y.; Seong, N.-H.; Dlott, D. D. Measurement of the distribution of site enhancements in surface-enhanced Raman scattering. *Science* **2008**, *321*, 388–392.
- [169] Doering, W. E.; Nie, S. Single-Molecule and Single-Nanoparticle SERS: Examining the Roles of Surface Active Sites and Chemical Enhancement. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 311–317.
- [170] Carnegie, C.; Chikkaraddy, R.; Benz, F.; de Nijs, B.; Deacon, W. M.; Horton, M.; Wang, W.; Readman, C.; Barrow, S. J.; Scherman, O. A.; Baumberg, J. J. Mapping SERS in CB: Au Plasmonic Nanoaggregates. *ACS Photonics* **2017**, *4*, 2681–2686.
- [171] Crawford, A. C.; Skuratovsky, A.; Porter, M. D. Sampling error: Impact on the quantitative analysis of nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering immunoassays. *Analytical chemistry* **2016**, *88*, 6515–6522.
- [172] Fang, H.; Yin, H. J.; Lv, M. Y.; Xu, H. J.; Zhao, Y. M.; Zhang, X.; Wu, Z. L.; Liu, L.; Tan, T. W. Approach for determination of ATP:ADP molar ratio in mixed solution by surface-enhanced Raman scattering. *Biosens Bioelectron* **2015**, *69*, 71–6, Fang, Hui Yin, Hong Jun Lv, Ming Yang Xu, Hai Jun Zhao, Yong Mei Zhang, Xin Wu, Zheng Long Liu, Luo Tan, Tian Wei Research Support, Non-U.S. Gov't England Biosens Bioelectron. 2015 Jul 15;69:71-6. doi: 10.1016/j.bios.2015.02.023. Epub 2015 Feb 14.
- [173] Chen, T.; Kuo, C.; Chou, Y.; Liang, N. Surface-enhanced Raman scattering of adenosine triphosphate molecules. *Langmuir* **1989**, *5*, 887–891.
- [174] Lanir, A.; Yu, N. T. A Raman spectroscopic study of the interaction of divalent metal ions with adenine moiety of adenosine 5'-triphosphate. *J Biol Chem* **1979**, *254*, 5882–7, Lanir, A Yu, N T Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. United States J Biol Chem. 1979 Jul 10;254(13):5882-7.
- [175] Zhelyaskov, V.; Yue, K. T. A Raman study of the binding of Fe(III) to ATP and AMP. *Biochemical Journal* **1992**, *287*, 561–566, 1445215[pmid] Biochem J.

- [176] Rimai, L.; Cole, T.; Parsons, J. L.; Hickmott, J. T.; Carew, E. B. Studies of Raman Spectra of Water Solutions of Adenosine Tri-, Di-, and Monophosphate and Some Related Compounds. *Biophysical Journal* **1969**, *9*, 320–329.
- [177] Wang, W. Imaging the chemical activity of single nanoparticles with optical microscopy. *Chemical Society Reviews* **2018**, *47*, 2485–2508.
- [178] Moran, C. H.; Xia, X.; Xia, Y. Improving correlated SERS measurements with scanning electron microscopy: an assessment of the problem arising from the deposition of amorphous carbon. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 5400–5406.
- [179] Havener, R. W.; Ju, S.-Y.; Brown, L.; Wang, Z.; Wojcik, M.; Ruiz-Vargas, C. S.; Park, J. High-throughput graphene imaging on arbitrary substrates with widefield Raman spectroscopy. *Acs Nano* **2011**, *6*, 373–380.
- [180] Schlücker, S.; Schaeberle, M. D.; Huffman, S. W.; Levin, I. W. Raman microspectroscopy: a comparison of point, line, and wide-field imaging methodologies. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 4312–4318.
- [181] Willets, K. A. Super-resolution imaging of interactions between molecules and plasmonic nanostructures. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 5345–5354.
- [182] Carattino, A.; Keizer, V. I.; Schaaf, M. J.; Orrit, M. Background suppression in imaging gold nanorods through detection of anti-stokes emission. *Biophysical journal* **2016**, *111*, 2492–2499.
- [183] Jahn, I.; Žukovskaja, O.; Zheng, X.-S.; Weber, K.; Bocklitz, T.; Cialla-May, D.; Popp, J. Surface-enhanced Raman spectroscopy and microfluidic platforms: challenges, solutions and potential applications. *Analyst* **2017**, *142*, 1022–1047.
- [184] Liberman, V.; Hamad-Schifferli, K.; Thorsen, T. A.; Wick, S. T.; Carr, P. A. In situ microfluidic SERS assay for monitoring enzymatic breakdown of organophosphates. *Nanoscale* **2015**, *7*, 11013–23, Liberman, Vladimir Hamad-Schifferli, Kimberly Thorsen, Todd A Wick, Scott T Carr, Peter A Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. England Nanoscale. 2015 Jul 7;7(25):11013-23. doi: 10.1039/c5nr01974e.
- [185] Zhonghuan, Z.; Xiao, X.; Yang, C. Laser-induced patterned deposition of silver nanoparticles on glass. International Conference on Advanced Infocom Technology 2011 (ICAIT 2011). pp 1–3.
- [186] Xu, L.; Xu, Q.; Guo, X.; Ying, Y.; Wu, Y.; Wen, Y.; Yang, H. Facile synthesis of Au/Al₂O₃ nanocomposites for improving the detection sensitivity of adenosine triphosphate. *RSC Advances* **2017**, *7*, 25746–25752.

- [187] Sánchez-Cortés, S.; García-Ramos, J. V. SERS of AMP on different silver colloids. *Journal of molecular structure* **1992**, *274*, 33–45.
- [188] Kundu, J.; Neumann, O.; Janesko, B.; Zhang, D.; Lal, S.; Barhoumi, A.; Scuseria, G.; Halas, N. Adenine- and adenosine monophosphate (AMP)- gold binding interactions studied by surface-enhanced Raman and infrared spectroscopies. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 14390–14397.
- [189] Miljanić, S.; Dijanošić, A.; Matic, I. Adsorption mechanisms of RNA mononucleotides on silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *137*, 1357–1362.
- [190] Dong, O.; Lam, D. C. Silver nanoparticles as surface-enhanced Raman substrate for quantitative identification of label-free proteins. *Materials Chemistry and Physics* **2011**, *126*, 91–96.
- [191] Qin, Y.; Ji, X.; Jing, J.; Liu, H.; Wu, H.; Yang, W. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, *372*, 172–176.
- [192] Leopold, N.; Lendl, B. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 5723–5727.
- [193] Bell, S. E.; Sirimuthu, N. M. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for sub-micromolar detection of DNA/RNA mononucleotides. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 15580–15581.
- [194] Zhao, L.; Jiang, D.; Cai, Y.; Ji, X.; Xie, R.; Yang, W. Tuning the size of gold nanoparticles in the citrate reduction by chloride ions. *Nanoscale* **2012**, *4*, 5071–5076.
- [195] De Gelder, J.; De Gussem, K.; Vandenabeele, P.; Moens, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering* **2007**, *38*, 1133–1147.
- [196] Papadopoulou, E.; Bell, S. E. Surface enhanced Raman evidence for Ag⁺ complexes of adenine, deoxyadenosine and 5-dAMP formed in silver colloids. *Analyst* **2010**, *135*, 3034–3037.
- [197] Papadopoulou, E.; Bell, S. E. Structure of adenine on metal nanoparticles: pH equilibria and formation of Ag⁺ complexes detected by surface-enhanced Raman spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 22644–22651.

- [198] Becker, M. Die miniaturisierte Free-Flow-Elektrophorese - Herstellung, Anwendung und Optimierung. Ph.D. thesis, TU Dortmund, 2010.
- [199] Ilgu, M.; Nilsen-Hamilton, M. Aptamers in analytics. *Analyst* **2016**, *141*, 1551–1568.
- [200] Tian, Y.-F.; Zhou, W.; Yin, B.-C.; Ye, B.-C. Highly sensitive surface-enhanced Raman scattering detection of adenosine triphosphate based on core–satellite assemblies. *Analytical Methods* **2017**, *9*, 6038–6043.
- [201] Cardinal, M. F.; Vander Ende, E.; Hackler, R. A.; McAnally, M. O.; Stair, P. C.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. Expanding applications of SERS through versatile nanomaterials engineering. *Chemical Society Reviews* **2017**, *46*, 3886–3903.
- [202] Mansfield, J. C.; Littlejohn, G. R.; Seymour, M. P.; Lind, R. J.; Perfect, S.; Moger, J. Label-free chemically specific imaging in planta with stimulated Raman scattering microscopy. *Analytical chemistry* **2013**, *85*, 5055–5063.
- [203] Ristenpart, W. D.; Wan, J.; Stone, H. A. Enzymatic Reactions in Microfluidic Devices: Michaelis- Menten Kinetics. *Analytical chemistry* **2008**, *80*, 3270–3276.
- [204] White, I. M. Re-thinking surface enhance Raman spectroscopy (SERS) sensors with a systems perspective. *Frontiers in Biological Detection: From Nanosensors to Systems IX*. 2017; p 1008102.
- [205] Li, J.-F.; Zhang, Y.-J.; Ding, S.-Y.; Panneerselvam, R.; Tian, Z.-Q. Core–shell nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Chemical reviews* **2017**, *117*, 5002–5069.

Anhang A

Anhang

A.1 Grundlagen optischer Methoden

A.1.1 Die Bandenform der CARS-Signale

Die Bandenform des CARS-Spektrums wird durch die Suszeptibilität dritter Ordnung bestimmt $\chi^{(3)}$. Sie setzt sich aus einem resonanten Teil $\chi_R^{(3)}$ und nichtresonanten Teil $\chi_{NR}^{(3)}$ zusammen [17]:

$$\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)}(\bar{\nu}_k) + \chi_{NR}^{(3)} \quad (\text{A.1})$$

Der nichtresonante Teil ist frequenzunabhängig und real. Dagegen ist der resonante Teil abhängig von der Molekülschwingung $\bar{\nu}_k$ und komplex [17]:

$$\chi_R^{(3)} = \sum_k \frac{A_k}{\bar{\nu}_k - \Delta\bar{\nu} + i\Gamma_k} \quad (\text{A.2})$$

Durch Separierung des Real- und Imaginärteil ([Im]) ergibt sich dann [17]:

$$\chi_R^{(3)} = \sum_k \left(\underbrace{\frac{A_k(\bar{\nu}_k - \Delta\bar{\nu})}{(\bar{\nu}_k - \Delta\bar{\nu})^2 + \Gamma_k^2}}_{\text{Re}(\chi_R^{(3)})} - i \underbrace{\frac{A_k\Gamma_k}{(\bar{\nu}_k - \Delta\bar{\nu})^2 + \Gamma_k^2}}_{\text{Im}(\chi_R^{(3)})} \right) \quad (\text{A.3})$$

A_k , $\bar{\nu}_k$ und Γ_k^2 sind die Amplitude, Wellenzahl und Halbwertbreite der Raman-Linie k . $\Delta\bar{\nu}$ ist die relative Wellenzahl im CARS-Spektrum. Ein Beispielspektrum basierend auf dieser Gleichung ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

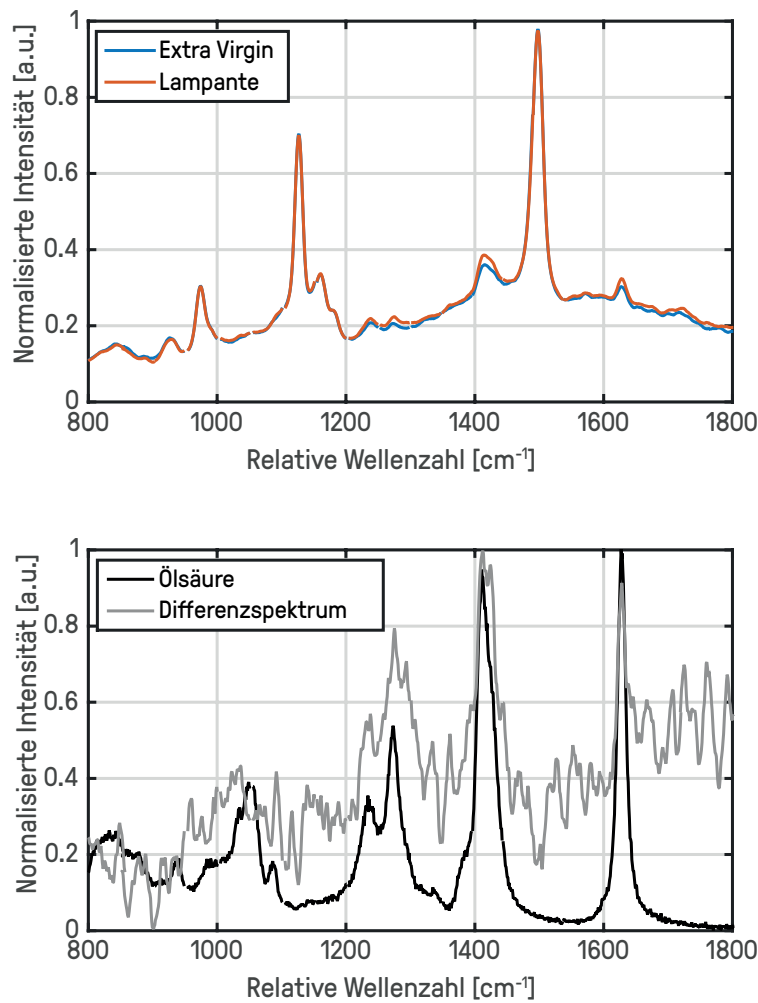


Abbildung A.1: Die **Resonanz-Raman-Verstärkung chromophorer Gruppen in Olivenölen (Anregung bei 488 nm)**. Ein hochwertiges Olivenöl (Extra Virgin) und minderwertiges Olivenöl (Lampante) zeigen intensive Resonanz-Raman verstärkte Signale chromophorer Gruppen der Carotenoide. Fettsäuren liefern dagegen nur schwache Signale. Eine Zuordnung erfolgt über die Banden von Ölsäure. Das Differenzspektrum der beiden Olivenöle offenbart Unterschiede im Fettsäure-Gehalt relativ zum Carotenoid-Gehalt.

A.1.2 Der lineare Zusammenhang von CARS-Intensität und Konzentration bei niedriger Konzentration des Analyten

Ein Analyt A wird in einem Lösungsmittel LSM gelöst. Nach Gleichung 2.14 ergibt sich dann folgender Wechselwirkungsterm für die CARS-Intensität:

$$I_{CARS}(\nu_{as}) \sim |N_A \chi_A^{(3)}|^2 + 2N_A \chi_A^{(3)} N_{LSM} \chi_{LSM}^{(3)} + |N_{LSM} \chi_{LSM}^{(3)}|^2 \quad (\text{A.4})$$

Unter der Annahme, dass ausschließlich der Analyt ein resonantes CARS-Signal generiert und das Lösungsmittel ausschließlich für den nichtresonanten Hintergrund verantwortlich ist ergibt sich dann für die Suszeptibilitäten nach Gleichung 2.15 $\chi_A^{(3)} = \chi_{A,R}^{(3)}$ und $\chi_{LSM}^{(3)} = \chi_{LSM,NR}^{(3)}$ und einsetzen in Gleichung A.4:

$$I_{CARS}(\nu_{as}) \sim |N_A \chi_{A,R}^{(3)}|^2 + 2N_A \chi_{A,R}^{(3)} N_{LSM} \chi_{LSM,NR}^{(3)} + |N_{LSM} \chi_{LSM,NR}^{(3)}|^2 \quad (\text{A.5})$$

Wenn die Analytkonzentration sehr niedrig ist, also $N_A \ll N_{LSM}$ dann ist der erste Term gegenüber dem zweiten Term sehr klein. Die lineare Abhängigkeit im zweiten Term $I_{CARS}(\nu_{as}) \sim N_A$ überwiegt somit [13] [23].

A.2 Multivariate Auswertung von hyperspektralen CARS-Aufnahmen

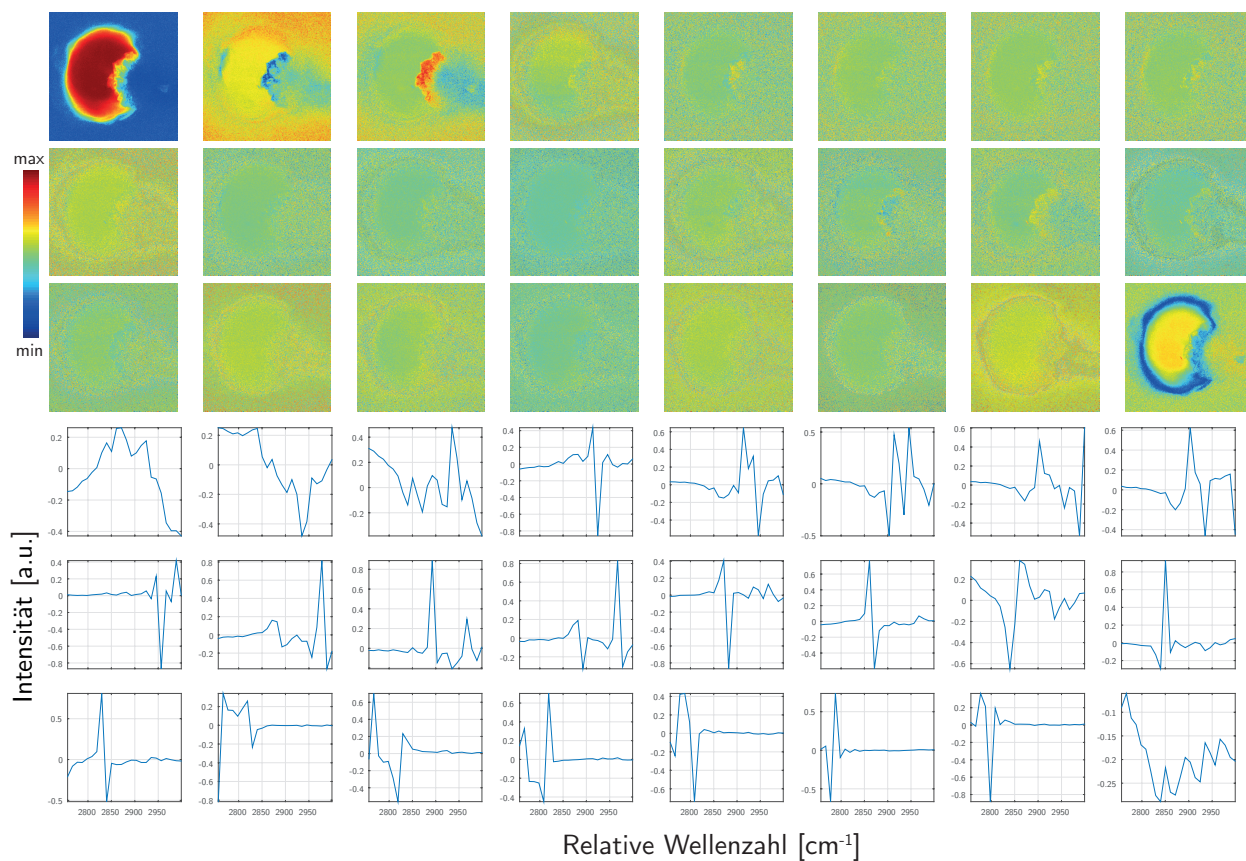


Abbildung A.2: Hauptkomponentenanalyse (PCA) einer HCARS-Aufnahme eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol. Die PCA erfolgte durch Singulärwertzerlegung der spalten-zentrierten HCARS-Daten. Die ersten drei Hauptkomponenten beschreiben 85 %, 1.7 %, 1.1 % der Gesamtvarianz des spalten-zentrierten Datensatzes. Die Varianz der darauffolgenden Hauptkomponenten ist < 1 %.

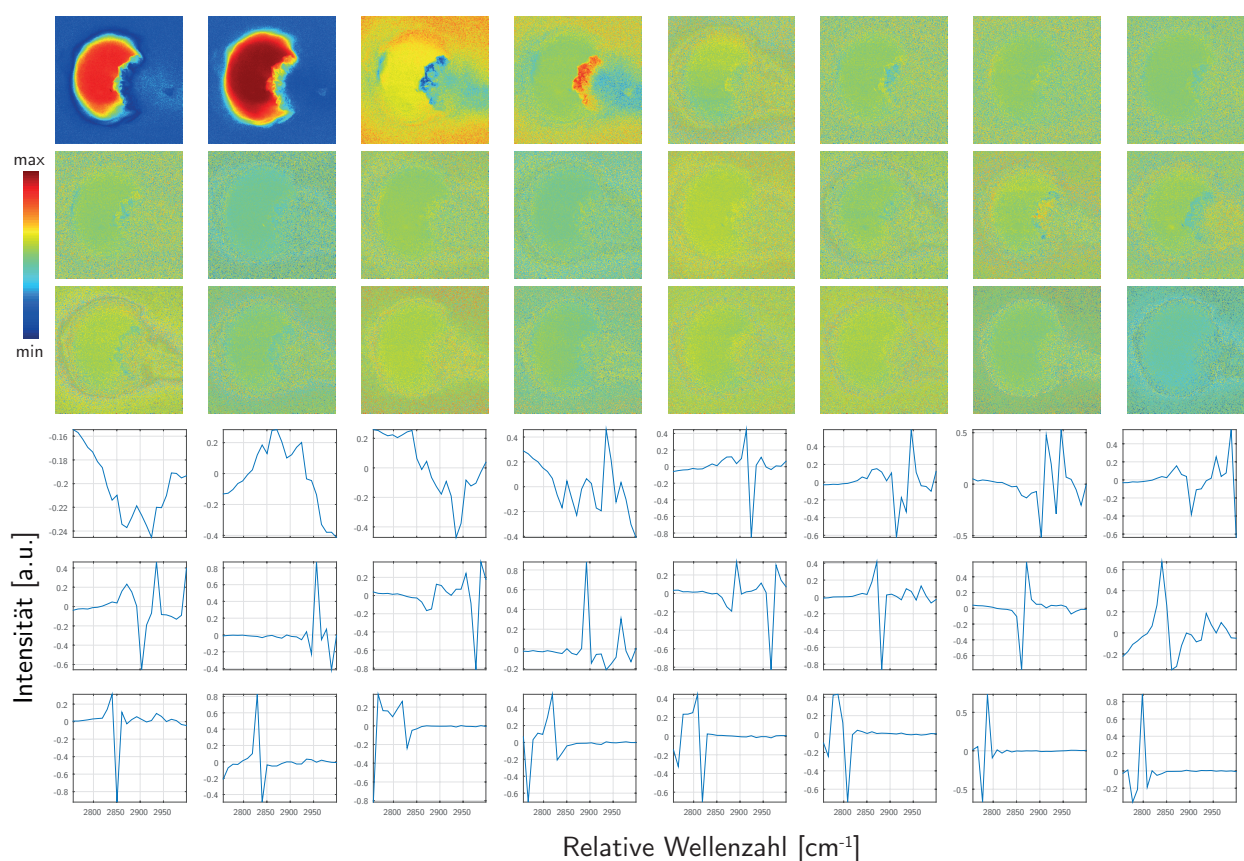


Abbildung A.3: **Singulärwertzerlegung (SVD) einer HCARS-Aufnahme eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol.** Die SVD entspricht einer unzentrierten PCA. Die ersten zwei unzentrierten Hauptkomponenten beschreiben 95 % und 3.8 % der Gesamtvarianz des Datensatzes. Die Varianz der darauffolgenden unzentrierten Hauptkomponenten ist < 0.1 %.

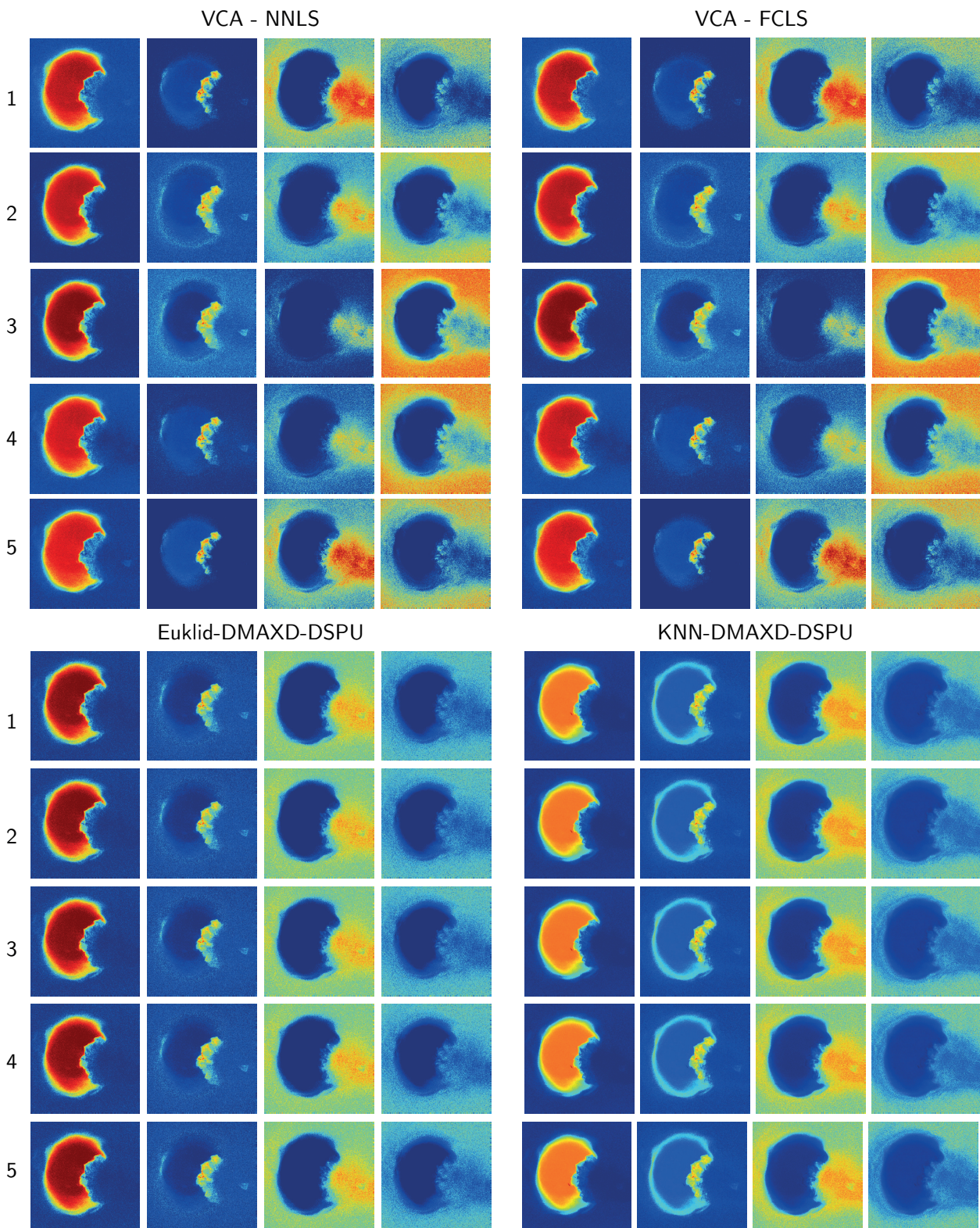


Abbildung A.4: **Fünfmaliges Durchlaufen von EEA-Entmischungsalgorithmen als Vier-Endmember-Modell einer HCARS-Aufnahme eines glandulären Trichomes von *C. sativa* Bedrobinol.** Der VCA-NNLS und VCA-FCLS liefern die gleichen Ergebnisse. Aufgrund der Randomisierung der Endmemberwahl mittels VCA werden jedoch bei jedem Durchlauf geringfügig andere Endmember gewählt und somit abweichende Abundanzkarten generiert. Der Euklid- bzw. KNN-DMAXD-DSPU-Algorithmus liefert dagegen immer exakt das gleiche Ergebnis. Die Endmemberextraktion ist beim DMAXD im Unterschied zur VCA determiniert.

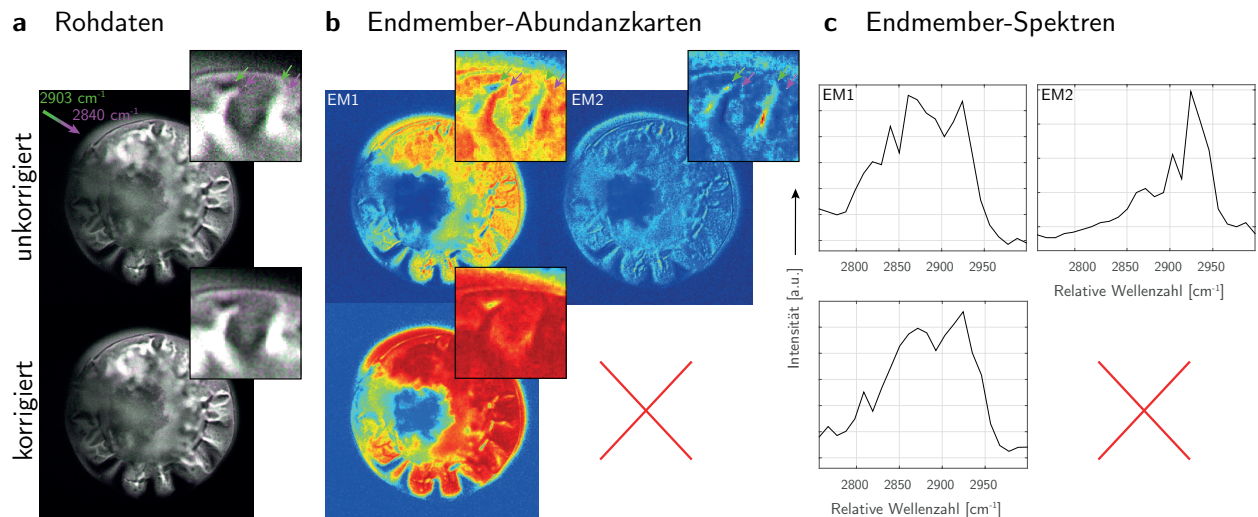


Abbildung A.5: **Verschiebungskorrektur hyperspektraler Bilder von Scheibenzellen eines Trichomes von *C. sativa* Fedora.** Die Korrektur erfolgt durch Minimierung des Unterschieds zweier aufeinanderfolgender hyperspektraler Bilder mittels der Nelder-Mead Simplex Methode [86]. (a) Überlagerung der CARS-Aufnahme bei 2903 cm^{-1} und 2840 cm^{-1} . Grün: hoher Intensität bei 2903 cm^{-1} . Weiß: hohe Intensität bei 2903 cm^{-1} und 2840 cm^{-1} . Magenta: hohe Intensität bei 2840 cm^{-1} . Die gerichtete Verschiebung des Signals resultiert aus einer Verschiebung in der x-y-Ebene (gekennzeichnet durch die Pfeile). In den korrigierten Aufnahme ist diese Verschiebung nahezu verschwunden. (b) Endmember-Abundanzkarten der CH-Streckschwingungen. Aufgrund der Verschiebung werden die CH-Streckschwingungssignale in den unkorrigierten Daten auf zwei Endmember EM 1 und EM 2 aufgeteilt. Die Intensitätsverteilung von EM 1 bzw. EM 2 überlagert stärker mit dem grünen Bereich bzw. Magenta Bereich in (a) (siehe Pfeile in gezoomten Bildern). In den korrigierten Daten wird nur ein Endmember ermittelt, was auf eine erfolgreiche Korrektur hinweist. (c) Aufgrund der Verschiebung teilen sich die CH-Streckschwingungen in den Endmember-Spektren der unkorrigierten Daten in eher niedrige und hohen Wellenzahlen auf (EM 1 und EM 2). In den korrigierten Daten enthält das Endmember-Spektrum sowohl Anteile von EM 1 als auch EM 2 der unkorrigierten Daten.

A.3 Laser-Scanning SERS-Hintergrund Mikroskopie: Eine schnelles Werkzeug zur Lokalisation von Hot Spots

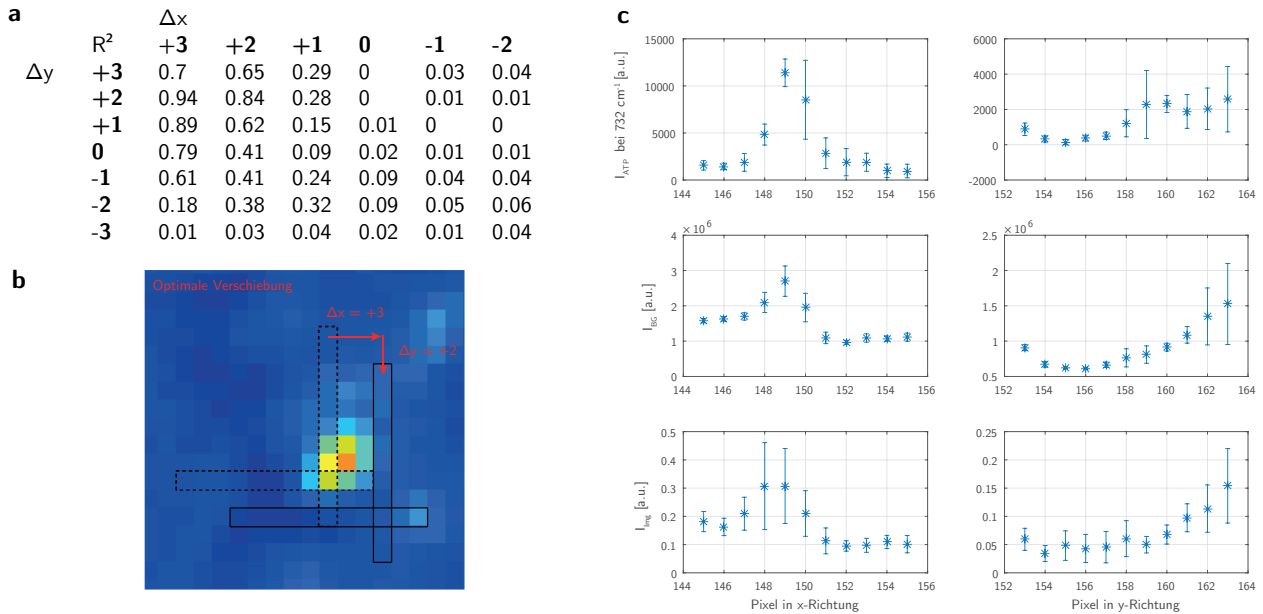


Abbildung A.6: Korrelationsanalyse des bildgebenen und spektralen SERS-Hintergrund zur Verschiebungskorrektur. (a) Korrelationsanalyse in Abhängigkeit der Verschiebung entlang x- und y-Richtung des SERS-BG Bildes in (b). (b) SERS-BG Bild mit optimaler Verschiebung (c) Ergebnisse nach optimaler Verschiebung.

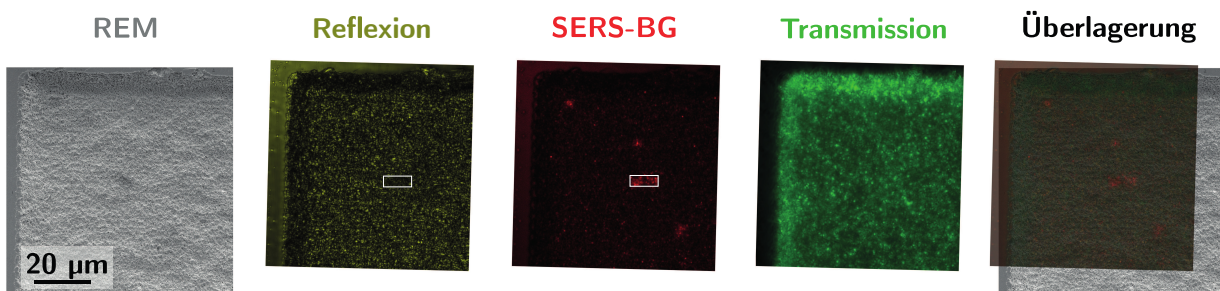


Abbildung A.7: Überlagerung einer REM-Übersichtsaufnahme mit optischen Bildern am Randbereich eines kommerziellen SERS-Substrates. Der SERS-Hintergrund (SERS-BG, Anregung 633 nm mit 60 % Laserintensität, Emission 640 nm–720 nm) zeigt über ausgeprägte Signale in einigen rechteckförmigen Bereichen, was auf eine REM-induzierte Karbonisierung durch REM-Nahaufnahmen in diesen Bereich schließen lässt [178]. Die Reflexion (Anregung 633 nm mit 1 % Laserintensität, Emission 630 nm–636 nm) Laser ist in dem größten mittels REM fokussierten Bereich um im Mittel 26 % vermindert (weiße Umrandung). Dies ist vermutlich ebenfalls auf eine REM-induzierte Karbonisierung zurückzuführen. Der amorphe Kohlenstoff absorbiert ein Großteil des wenig intensiven Laserlichts.

A.4 Laserinduziert immobilisierte SERS-Substrate in mikrofluidischen Systemen

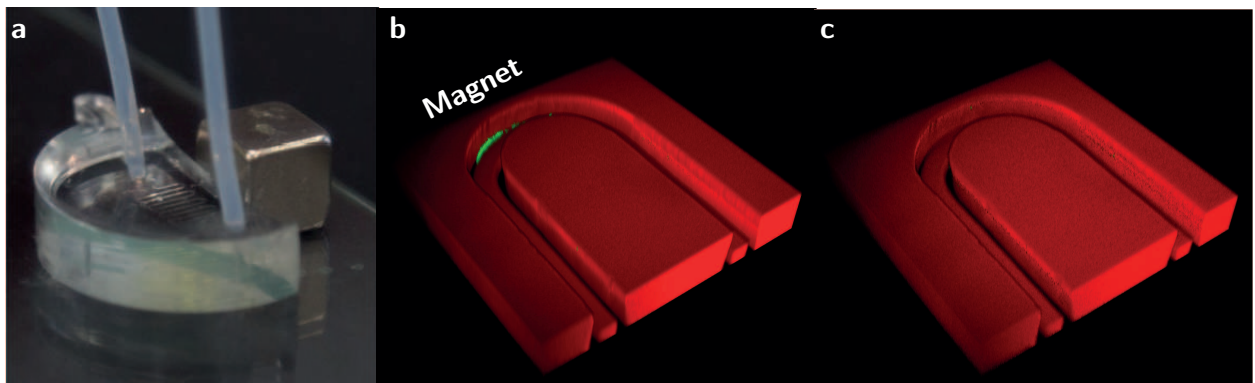


Abbildung A.8: Nachweis der reversiblen Immobilisation von Enzym-Magnetbeads im Mikrofluidiksystem mittels CARS und Zweiphotonenfluoreszenz-Mikroskopie. (a) Meanderstrukturiertes Mikrofluidiksystem mit Neodym-Magnet. (b) Nachweis und Lokalisation der Akkumulation GFP-markierter Enzym-Magnetbeads im Mikromeander nach Platzieren des Neodym-Magneten. (c) Entfernen des Magneten führt zum Eluieren der Magnetbeads. Rot: CH-Streckschwingungssignal von PDMS; grün: GFP-Fluoreszenz.

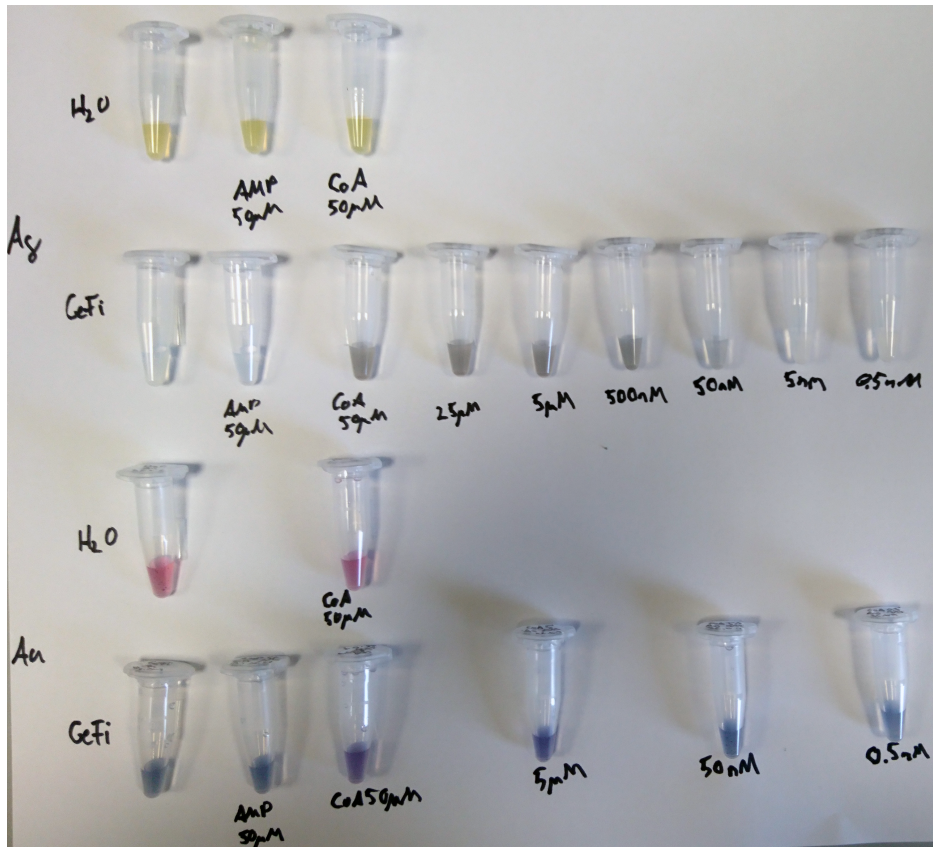


Abbildung A.9: **Interaktion von Analyt und chemischer Umgebung mit Silber- und Goldnanopartikeln.** Die Silber- bzw. Goldnanopartikel (AgNPs, AuNPs) wurden mittels der Methode nach Lee und Meisel [30], AgNO_3 /Citrat 1 mM/0,67 mM bzw. nach Turkevich[31], HAuCl_4 /Citrat 0,5 mM/1 mM hergestellt. Der Gefi-Puffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , pH 8) führt zu einer Verfärbung der AgNPs von gelb nach transparent. Dies ist auf eine Aggregation der AgNPs durch Chloridionen zurückzuführen. Mit CoA in Gefi-Puffer kommt es zu einer Graufärbung durch Bildung größerer Aggregate. Die AuNPs verfärben sich von rot nach dunkelblau/grau. Dies wird auf die Bildung größerer Nanopartikel zurückgeführt. Mit CoA verfärbt sich die Lösung Magenta.

Tabelle A.1: Parameter der SERS-Substratherstellung und SERS-Messung der Spektren aus Abbildung 5.17 und 5.19.

av2 = Mittelwert von zwei Messungen; N = Anzahl der Spektren

	Mobile Phase	SERS-Substrat (-Herstellung)	Messung					
			λ [nm]	Zeit [s]	I [%]	$d_{P_{inh}}$ [μm]	Obj.	N
MatB-Mixe	jeweils 25 μM Malonat, ATP, CoA (Edukte) bzw. Mal-CoA, AMP (Produkte), Gefi	AgNPs, AgNO ₃ /Citrat, 1 mM/0,67 mM, 100 °C ¹	633	10	100	600	10	6-12
	CoA	AgNPs, AgNO ₃ /Citrat, 1 mM/0,67 mM, 100 °C ¹	633	10	100	600	10	4-10
			633	60, av2	100	600	10	1
ATP	Feststoff 100 μM , Gefi ⁴ 100 μM , H ₂ O 100 μM , Gefi, 100 μM , Gefi im μ -Kanal mit Flussrate 24 $\mu L min^{-1}$	Mato Gold-Substrat, Hot Spot Region 10 μL Tropfen auf #1 Deckglas, laserind. AuNPs, HAuCl ₄ /Citrat 0,5 mM/1 mM ⁵ 10 μL Tropfen auf #1 Deckglas, laserind. AuNPs, HAuCl ₄ /Citrat 0,5 mM/1 mM ⁵ 600 μL im μ -Kanal mit Flussrate 24 $\mu L min^{-1}$, HAuCl ₄ /Citrat 0,5 mM/1 mM ⁶	633	10	100	600	10	17
			633	5 bis 30	100	600	10	10
			633	60	5	600	63	1
			488	60, av2	100	70,72	10	1
			633	10	20	111,45	63	1
AMP	Feststoff 1 mM, H ₂ O 100 μM , H ₂ O 100 μM , Gefi	AgNPs, AgNO ₃ /Citrat, 1 mM/0,67 mM, 100 °C, Agglom. mit MgSO ₄ 100 mM ¹ 10 μL Tropfen auf #1 Deckglas, laserind. AuNPs, HAuCl ₄ /Citrat 0,5 mM/1 mM ⁵ 10 μL Tropfen auf #1 Deckglas, laserind. AuNPs, HAuCl ₄ /Citrat 0,5 mM/1 mM ⁵	633	10 / 60	20 / 60	600	63	9
			633	10 / 60	20 / 60	600	63	9
			633	10	20	70,72	10	6
			633	10 / 60	20 / 60	600	63	6

¹ 1:1 Gemisch von NPs- und Analytlösung ² Anregung 514 nm, 100 %, 30 s, Glaskante, 10-fach Obj.

³ Anregung 514 nm, 50 %, 180 s, 10 μm Abstand Glaskante, 63-fach Obj.

⁴ 10 Minuten Einwirken von 500 μL Analytlsg. auf Mato Substrat und mit Pipette vorsichtig entfernen

⁵ Anregung 514 nm, 50 %/100 %, 180 s, 10 μm Abstand Glaskante, 63-fach Obj.

⁶ DOE-Optima: Anregung 514 nm, 10-fach Obj, 3 x 90 %, 120 s, 5 μm Abstand; 1 x 75 %, 150 s, 5 μm ; SERS-BG-Maxima: 1 x 60 %, 150 s, 0 μm ; 1 x 100 %, 90 s, 0 μm

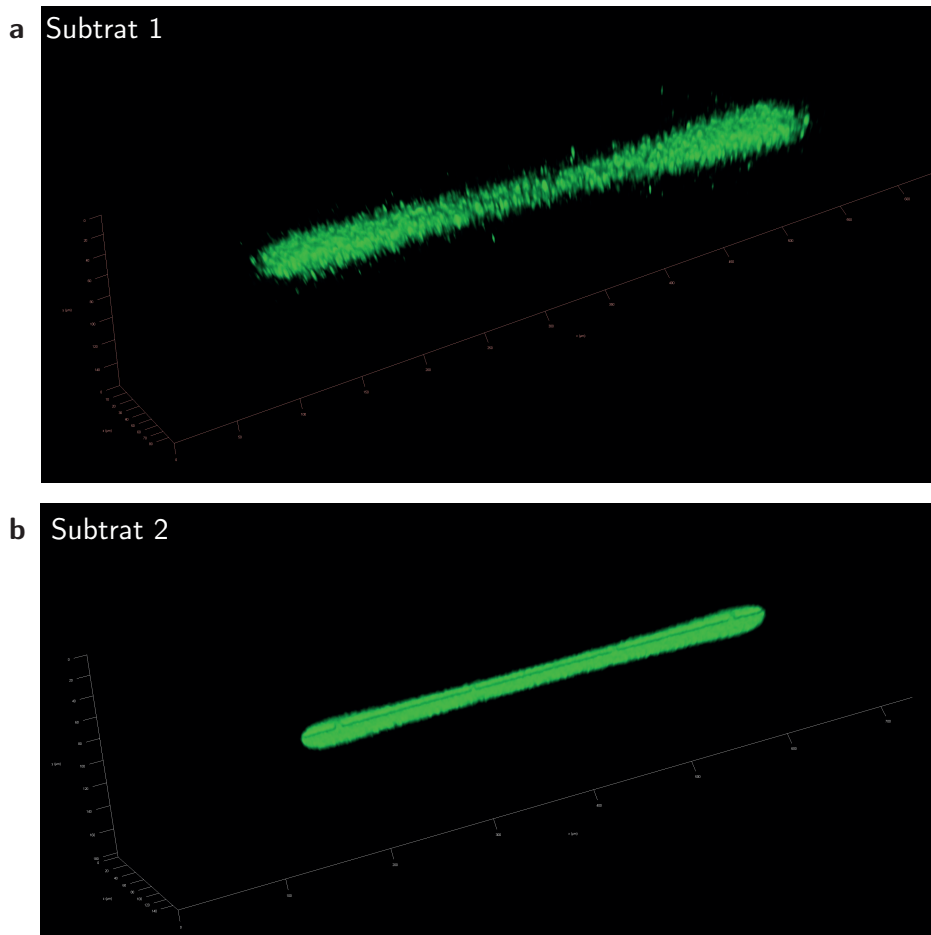


Abbildung A.10: **3D-SERS-Hintergrund Bildgebung von laserinduziert hergestellten Silbernanopartikel SERS-Substraten immobilisiert auf Glas.** 3D-SERS-Hintergrund (SERS-BG) Bilder linienförmiger Silbernanopartikel (AgNPs) SERS-Substrate hergestellt mittels fünfminütiger Laserbehandlung einer Silbernitrat/Citrat-Lösung (0,5 mM/10 mM) auf einem Deckglas (Anregung bei 514 nm und Emission bei 534 nm–600 nm). (a) SERS-Substrat hergestellt mittels bidirektionalem xz-Laser-Scanning innerhalb der Lösung. (b) SERS-Substrat hergestellt mittels bidirektionalem xz-Laser-Scanning fokussiert auf die Glaskante.

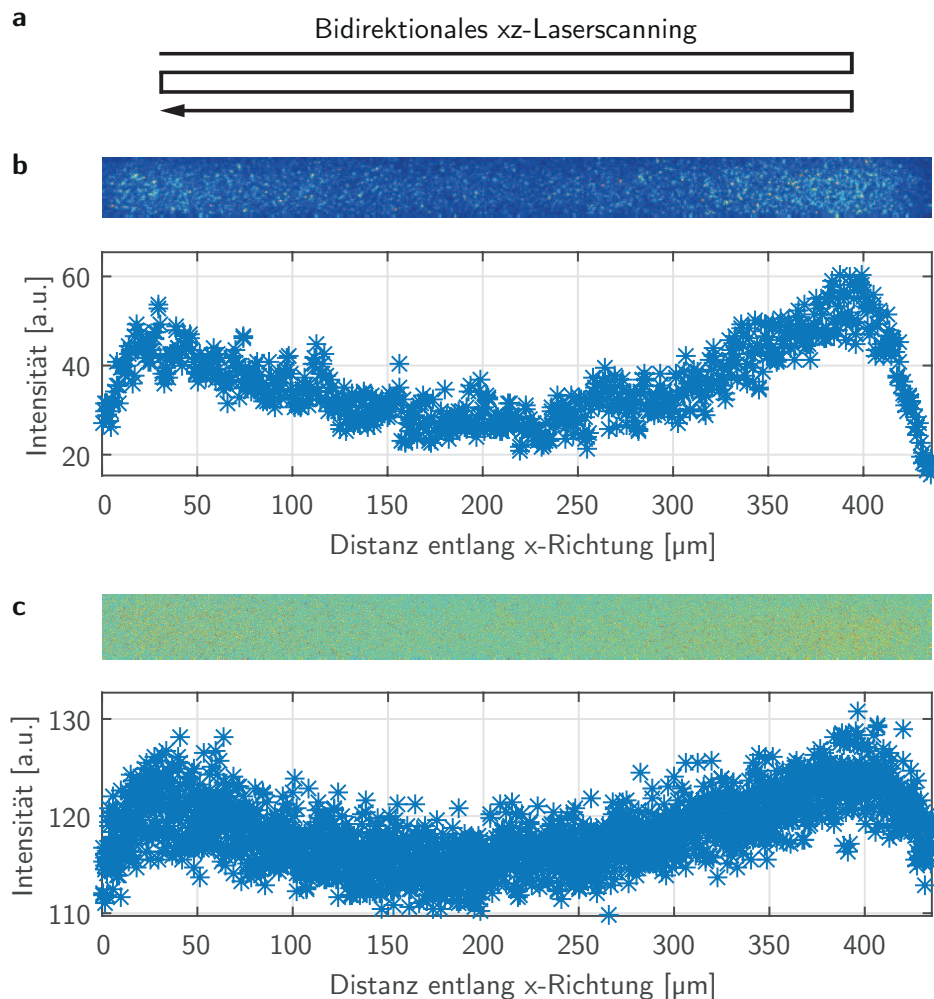


Abbildung A.11: **Einfluss der bidirektionalen xz-Laserscanning auf die Nanostrukturierung einer Silbernitrat/Citrat-Lösung auf Glas.** (a) Illustration des bidirektionalen xz-Laserscannings. (b) Profil gemittelter SERS-Hintergrund (SERS-BG) Intensitäten entlang der x-Richtung. Die zugrundeliegenden Pixelintensitäten sind im Bild dargestellt. (c) Profil gemittelter Rasterelektronenmikroskop (REM) Intensitäten entlang der x-Richtung. Die zugrundeliegenden Pixelintensitäten sind im Bild dargestellt. Gemittelte SERS-BG und REM Intensitäten folgen dem gleichem Intensitätsprofil, was auf eine gleiche Herkunft schließen lässt: Bidirektionales Laserscanning führt zu abnehmenden Zeitintervallen und damit erhöhten Laserleistung (Energie/Zeit) zum Rand des xz-Scanbereichs hin. Die höhere Laserleistung am Rand führt zu einer erhöhten Silbernanopartikel-dichte und SERS-BG Intensität am Rand. Die abnehmende Laserleistung außerhalb des xz-Scanbereichs führt zu einer Abnahme der Silbernanopartikel-dichte und SERS-BG dort.

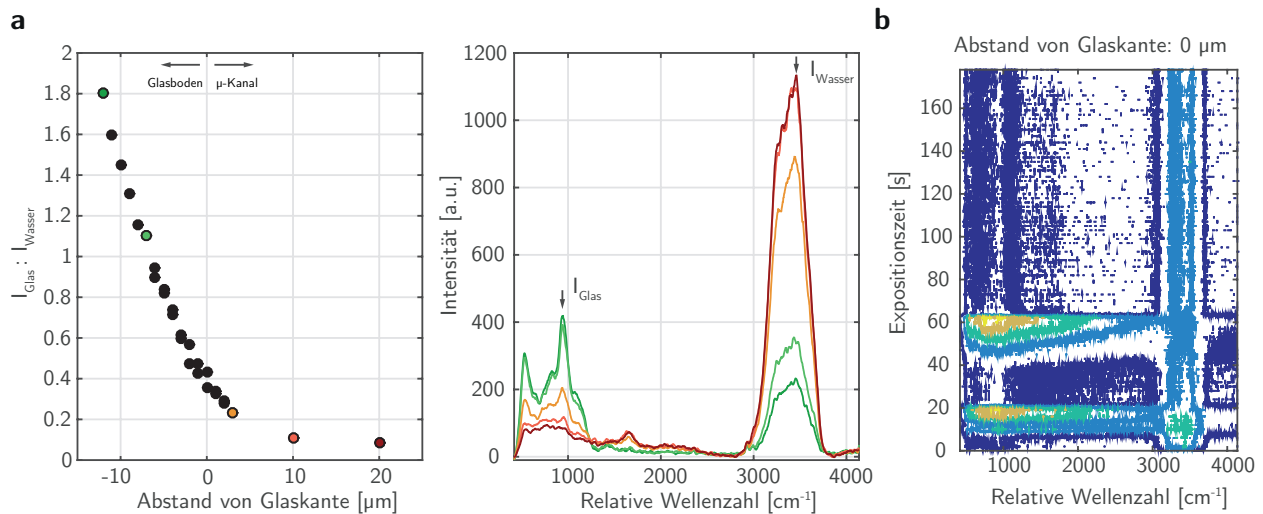


Abbildung A.12: **Abschätzung des Glasabstandes im Mikrokanal über das Glas-Wasser-Banden-Verhältnis im Raman-Spektrum.** (a) Zusammenhang zwischen Glas-Wasser-Banden-Verhältnis und Abstand von der Glaskante (Anregung bei 514 nm, Pinhole 1, Akkumulationszeit 10 s). Die Glaskante bei 0 μm wurde über einen x-z-Reflektionscan ermittelt. (b) Spektrale Aufnahmen während einer dreiminütigen laserinduzierten Herstellung eines Gold-Substrates auf Glas im Mikrokanal. Die Gasbildung während der laserinduzierten Goldreduktion macht sich durch Streukurven bemerkbar.

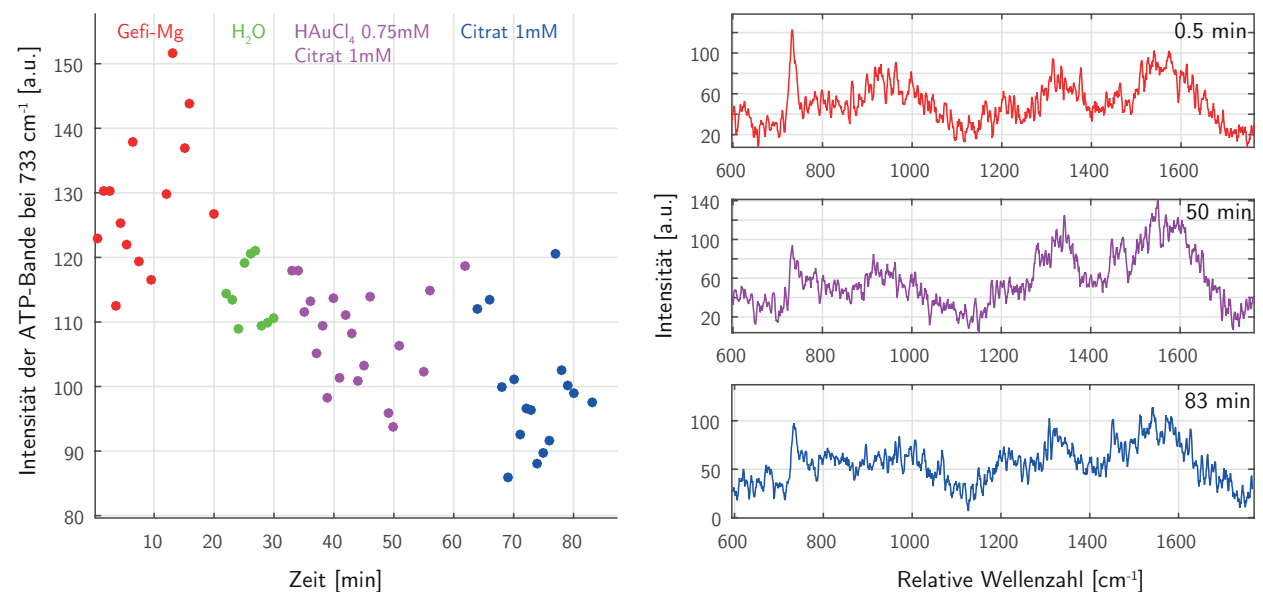


Abbildung A.13: **Desorption und Memory-Effekt von ATP adsorbiert auf einem laserinduziert hergestellten Au Spot im Mikrokanal.** Das Überströmen unterschiedlicher mobiler Phasen führt zu einer allmählichen aber nicht vollständigen Abnahme der ATP-Bande bei 732 cm^{-1} . Die Flussrate wurde von anfangs 24 $\mu\text{L min}^{-1}$ innerhalb der ersten 10 min Spülphase auf 48 $\mu\text{L min}^{-1}$ verdoppelt. Das Überströmen mit der Metallsalz/Reduktionsmittel-Lösung erfolgte in Anlehnung an [36].

A.5 Erklärung zur Reproduktion vorab veröffentlichter Inhalte

Die Inhalte dieser Forschungsarbeit sind in Rahmen des Leibniz-Research-Clusters (Kennzeichen: 031A360E) entstanden. Kapitel 5.1 wurde bereits in [A] veröffentlicht. Kapitel 5.3 wurde in Teilen modifiziert in [B] veröffentlicht.

[A] Ebersbach, P.; Stehle, F.; Kayser, O.; Freier, E. Chemical fingerprinting of single glandular trichomes of *Cannabis sativa* by Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *BMC plant biology* **2018**, *18*(1), 1-12.

[B] Ebersbach, P.; Münchberg U.; Freier E. SERS background imaging – A versatile tool towards more reliable SERS analytics. *Research Square* **2021**.

Danksagung

Zunächst möchte ich Professor Dr. Dr. Oliver Kayser für die Übernahme des ersten Gutachtens und Bereitstellung von Pflanzenproben danken. Die Zusammenarbeit war der Initiator unser „CARS Auge“ auf die Welt der Pflanzen zu richten.

Am ISAS gilt mein besonderer Dank PD Dr. Joachim Franzke als Zweitgutachter und der CARS-Mikroskopie-Gruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre unter Leitung von Dr. Erik Freier: Erik danke ich für die Einarbeitung in die Welt der Optik und CARS-Mikroskopie. Pia, Ute und Dominic danke ich für Ratschläge von chemisch-analytischer Seite und Dirk, Matthias und Pedro für die mikrofluidische Expertise und Einarbeitung in die Mikrofluidik-Chip-Fabrikation. Pia, Ute und Erik danke ich zudem für das konstruktive Korrekturlesen. Weiterhin möchte ich all unseren Studenten danken – ihr wart eine Bereicherung für die Gruppe. Betonen möchte ich die spontanen Flurgespräche, welche Dank der Aufgeschlossenheit und Interdisziplinarität in der Gruppe, oftmals maßgeblich zu einer Problemlösung und Ideenfindung beigetragen haben.

Am ISAS Campus danke ich weiterhin den Proteomikern und Lipidomikern für die anregenden Kaffeepausen. Den „Berlinern“ danke ich für weitere Spektroskopiker Expertise. Professor Dr. Kristina Lorenz und Elena aus der biomedizinischen Forschung danke ich für die Zusammenarbeit und Unterstützung. Maria Becker danke ich für die REM Aufnahmen. Der IT danke ich für die bereitgestellte Rechenpower und Versorgung mit aktuellen MATLAB-Toolboxen.

Eine einzigartige Erfahrung war der wissenschaftliche Austausch im Leibniz Research Cluster. Insbesondere die alljährlichen Summer Schools, stärkten den Zusammenhalt für das Projekt, ermöglichten einen Blick über den Tellerrand und waren letztendlich der Impulsgeber für die In-Chip-Analytik und SERS-Experimente dieser Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Bleach-Point
CARS	kohärente anti-Stokes Raman-Streuung (engl.: coherent anti-Stokes Raman scattering)
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement (engl.: charge-coupled device)
DMAXD	Distanz-Maximum-Distanz-Extraktionsalgorithmus
DSPU	Distanz-Simplexprojektion-Entmischungsalgorithmus (engl.: distance simplex projection unmixing)
EEA	Endmember-Extraktionsalgorithmus
EM	Endmember
EPI	Detektion in Rückwärtsrichtung
ERS	elektronische Raman-Streuung
F	Detektion in Vorwärtsrichtung (engl.: Forward)
FCLS	Vollständig eingeschränkter Kleinstfehlerquadrat-Algorithmus (engl.: fully constrained least squares algorithm)
FWM	Vier-Wellen-Mischung (engl.: Four-Wave-Mixing)
HCA	hierarchische Clusteranalyse
HyD	Hybrid-Detektor
LMM	Lineares Mischungsmodell
LSPR	lokalisierte Oberflächenplasmonresonanz (engl.: localised surface plasmon resonance)
NMF	Nichtnegativer Matrixfaktorisierungs-Algorithmus
NNLS	Nichtnegativer Kleinstfehlerquadrat-Algorithmus (engl.: non-negative least squares algorithm)
NP	Nanopartikel

PC	Hauptkomponente (engl.: principal component)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl.: principal component analysis)
PMT	Photoelektronenvervielfacher-Röhre (engl.: Photomultiplier tube)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SERRS	oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Streuung bezeichnet (engl.: surface-enhanced resonance Raman scattering)
SERS	oberflächenverstärkte Raman-Streuung (engl.: surface-enhanced Raman scattering)
SERS-BG	SERS-Hintergrund (engl.: SERS-Background)
SVD	Singulärwertzerlegung (engl.: Singular Value Decomposition)
VCA	Vertexkomponentenanalyse (engl.: vertex component analysis)