

Vielfältige Raman-Mikroskopie

Die Raman-Mikroskopie hat sich von der Außenseiter-Technologie zur etablierten Analyse-Methode entwickelt.

Sonja Breuninger, Karin Hollricher, Harald Fischer, Andrea Richter, Ute Schmidt und Olaf Hollricher

Vor 90 Jahren dokumentierten Chandrasekhara Venkata Raman und Kariamanickam Srinivasa Krishnan erstmals „A New Type of Secondary Radiation“, der als Raman-Effekt bekannt wurde [1, 2]. Die darauf beruhende Raman-Spektroskopie dient zur qualitativen und quantitativen Analyse der chemischen Bestandteile und Moleküle einer Probe und ist eine nicht-invasive Methode, die wenig bis keine Probenpräparation benötigt. Dennoch wurde sie lange Zeit nur in Spezial-Laboren durchgeführt. Ihre Außenseiterrolle verlor sie jedoch in den letzten Jahren.

Der Grund für den wachsenden Erfolg der Raman-Spektroskopie liegt an der Entwicklung des konfokalen Raman-Mikroskops, mit dem sich nicht nur die Aufnahmen einzelner Raman-Spektren, sondern auch komplette Bilder aus tausenden von Spektren erstellen lassen. Die laterale Auflösung liegt, abhängig von der verwendeten Anregungswellenlänge, bei etwa 200 nm. Durch ständige Weiterentwicklungen werden die kommerziell angebotenen Raman-Mikroskope immer anwen-

derfreundlicher. Während früher Belichtungszeiten von Minuten bis Stunden für einzelne Raman-Spektren üblich waren, liegen sie heute bei Sekundenbruchteilen bis zu unter einer Millisekunde. Außerdem führen moderne Software-Oberflächen den Anwender durch die Raman-Messung und die Er-

gebnisanalyse.

Auch das breite Anwendungsspektrum der Raman-Mikroskopie sorgt dafür, dass sich die Methode immer mehr etabliert: Flüssigkeiten, Feststoffe, Gase und organische Materialien lassen sich damit analysieren. Der Einsatzbereich reicht von atomar-dünnen (2D) Materialien über Kristalle, Gestein, Polymere oder Medikamente bis hin zu lebenden Organismen.

Modular und erweiterbar

Der breite Einsatz der Raman-Mikroskopie in zahlreichen Laboren stellt neue Anforderungen an die kommerziell angebotenen Systeme, die sich teilweise widersprechen: einfache Bedienbarkeit bei hohem Funktionsumfang, breiter Einsatzbereich bei optimierter Empfindlichkeit, geringe Kosten bei bester



Abb. 1 Das konfokale Raman Imaging Mikroskop alpha300 R von WITec bietet dem Kunden ein breites Anwendungspotenzial.

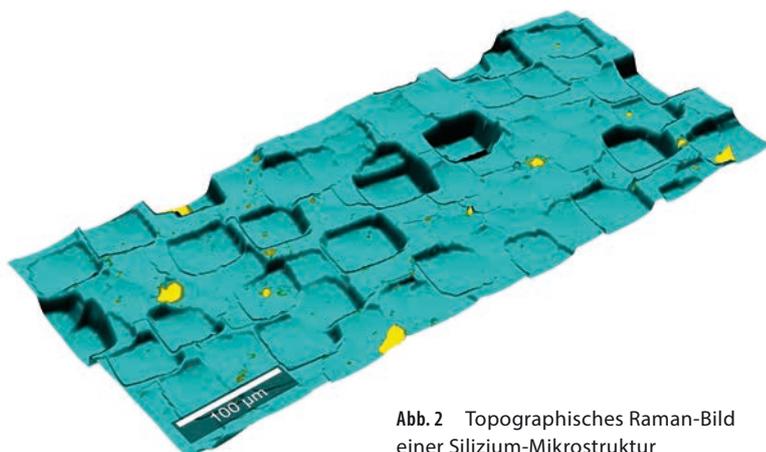


Abb. 2 Topographisches Raman-Bild einer Silizium-Mikrostruktur

Dr. Sonja Breuninger, Dr. Karin Hollricher, Harald Fischer, Andrea Richter, Dr. Ute Schmidt und Dr. Olaf Hollricher, WITec GmbH, Lise-Meitner-Str. 6, 89081 Ulm

Best of

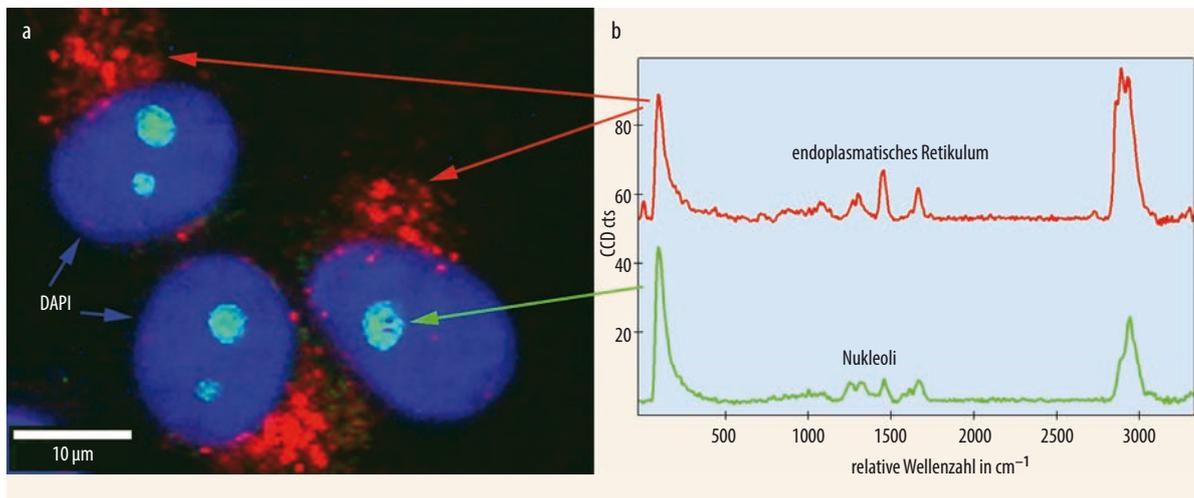


Abb. 3 Korrelatives Raman-Fluoreszenzbild von Primaten-Zellen in Zellkultur (a). Blau: Zellkerne, aufgenommen mit Fluoreszenzmikroskopie; Rot: Endoplasmatische Retikula, Grün: Nukle-

oli, beides aufgenommen mit Raman-Mikroskopie. Dazugehörige Raman-Spektren (b).

Leistung. Um den Nutzern ein individuell zugeschnittenes Raman-System anbieten zu können, eignen sich deshalb Mikroskope, die modular aufgebaut sind und sich durch spätere Erweiterungen an neue Gegebenheiten anpassen lassen. Ein solches Gerät ist das konfokale Raman-Mikroskop alpha300 R des deutschen Herstellers WITec (Abb. 1). Durch die individuelle Zusammenstellung passender Laser, Spektrometer und Detektoren ist das System für spezifische Anforderungen konfiguriert. Zusätzliche Mikroskopie-Techniken und korrelative Verfahren sind zudem kombinierbar. Durch diesen flexiblen Aufbau und die verlässliche Leistungsfähigkeit hinsichtlich Geschwindigkeit, spektraler und räumlicher Auflösung und Signal-Empfindlichkeit ist das alpha300 R ein häufig anzutreffendes Raman-System, sowohl in spezialisierten

Raman-Laboren als auch in Service- und Multi-User-Laboren.

Vielfältige Anwendungen

Die konfokale Raman-Mikroskopie ermöglicht es, zahlreiche weitere Mikroskopietechniken zu kombinieren. Gängige Beispiele korrelativer Mikroskopietechniken sind Raman-AFM, Raman-SNOM und Raman-Lumineszenz-Mikroskopie. Im Folgenden werden weitere korrelative Raman-Mikroskopietechniken vorgestellt.

Raman und Profilometrie

Für die Raman-Mikroskopie ist es meist nicht erforderlich, die Proben vor der Untersuchung zu behandeln, anzufärben oder anderweitig zu präparieren. Die Kombination aus konfokalem Raman-Mikroskop alpha300 R und TrueSurface-

Profilometer mit Fokusstabilisierung erlaubt es, selbst unebene oder raue Oberflächen zu untersuchen [3, 4]. Der Untersuchungsbereich wird dabei während der Analyse durch eine zeitgleiche profilometrische Messung konstant im Fokus gehalten. So werden auch thermische Verschiebungen ausgeglichen und Langzeit-Messungen ermöglicht. Das Anwendungsbeispiel in Abb. 2 zeigt die Analyse einer mikrostrukturierten Silizium-Probe. Das chemische Bild der Raman-Messung liegt hierbei über dem Bild mit den topographischen Informationen aus der TrueSurface-Messung.

Raman und Fluoreszenz

Die Fluoreszenz-Mikroskopie ist seit Jahrzehnten ein weitverbreitetes, bildgebendes Verfahren zur Analyse biologischer Zellen und Organismen. Dafür werden Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen

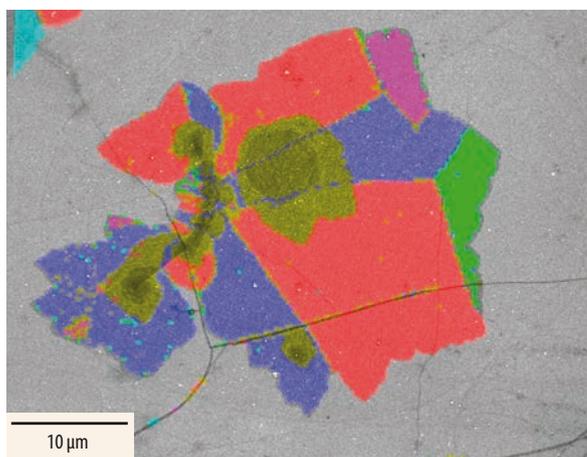


Abb. 4 Korrelatives RISE (Raman-SEM) Mikroskopie-Bild einer mehrlagigen Graphen-Flocke. Die unterschiedlichen Farben zeigen Faltungen und Rotationen im Graphen und ließen sich anhand der Ergebnisse aus der Raman-Analyse identifizieren.

Best of

angefärbt oder Organismen gentechnisch zur Expression fluoreszierender Proteine veranlasst. Das Fluoreszenzsignal ist meist sehr viel stärker als das Raman-Signal. Trotzdem sind korrelative Raman-Fluoreszenz-Messungen mit dem geeigneten System möglich. **Abb. 3** zeigt das Raman-Fluoreszenz-Bild einer Lebezell-Kultur eukaryotischer Zellen. Um die Zellen in ihrem wässrigen Medium in der Petrischale untersuchen zu können, kam das inverse Mikroskop alpha300 Ri von WITec zur Anwendung. Die Zellkerne waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Für die Raman-Messung betrug die Anregungswellenlänge 532 nm. Aufgenommen wurde ein Bild mit $50 \times 40 \mu\text{m}^2$ und 150×120 Bildpunkten. An jedem Bildpunkt wurde ein Raman-Spektrum aufgenommen. Die Aufnahmezeit betrug 0,2 Sekunden pro Spektrum. Im korrelativen Raman-Fluoreszenz-Bild sind die Zellkerne in Blau (aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie), die Nukleoli in Grün und die endoplasmatischen Retikula in Rot dargestellt (aufgenommen mit Raman-Mikroskopie). Die dazugehörigen Raman-Spektren sind in den gleichen Farben gehalten.

Raman und SEM

Eine klassische Methode zur strukturellen Oberflächenanalyse ist die Rasterelektronenmikroskopie (Scanning Electron Microscopy, SEM). Durch die Kombination von Raman Imaging mit SEM im RISE-Mikroskop ist es möglich, Ergebnisse der SEM-Strukturanalyse mit chemischen und molekularen Informationen der konfokalen Raman-Mikroskopie zu kombinieren [5]. Die Probe wird dazu in die Vakuumkammer des Elektronenmikroskops eingebracht. Beide Analyseverfahren erfolgen anschließend automatisiert an derselben Probenstelle. Die erhaltenen SEM- und Raman-Bilder lassen sich dann überlagern. In **Abb. 4** wurde eine mehrlagige Graphen-Flocke mittels RISE-Mikroskopie analysiert. Das Raman-Bild besteht aus 22 500 Spektren mit 50 ms Aufnahmezeit

pro Spektrum. Während im SEM-Bild der Kontrast zwischen Substrat und Graphen-Flocke erkennbar ist, können im Raman-Bild die Anzahl der Graphen-Lagen sowie deren unterschiedliche Verdrehungen zueinander analysiert werden. Dies ist durch die Untersuchung mit dem SEM alleine nicht möglich.

Literatur

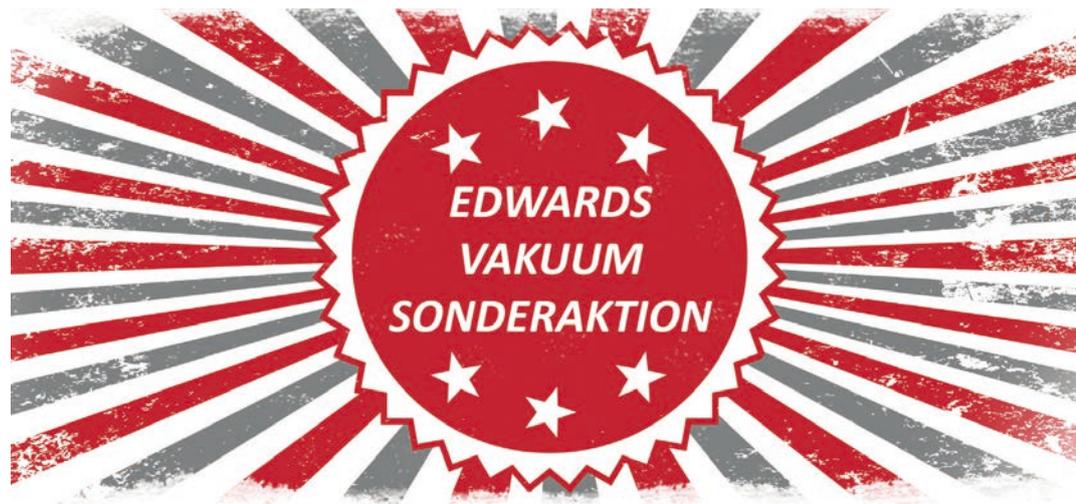
[1] C.V. Raman und K.S. Krishnan, Nature **121**, 501 (1928)

[2] J. Toporski, T. Dieing und O. Holtricher (Hrsg.), Confocal Raman Microscopy, 2nd Edition, Springer Series in Surface Sciences (66), Springer International Publishing (2018)

[3] A. Masic und J. C. Weaver, Journal of structural biology **189**, 269 (2015)

[4] B. Kann und M. Windbergs, The AAPS Journal **15**, 505 (2013)

[5] G. Wille, C. Lerouge und U. Schmidt, Journal of Microscopy **270**, 309 (2018)



SPEKTAKULÄRE SONDERANGEBOTE!

- Turbomolekularpumpen
- Turbomolekularpumpstationen
- Scrollpumpen
- Drehschieberpumpen
- Gamma UHV-Pumpen
- Messung und Steuerung
- Leckdetektoren



KONTAKTIEREN SIE UNS JETZT!

Aktionscode: **VS18**

Telefon: **0800 000 1456**

E-Mail: DEvertrieb@edwardsvacuum.com

Dieses spektakuläre Angebot gilt nur für eine begrenzte Zeit. Beeilen Sie sich also, kontaktieren Sie uns noch heute für detaillierte Preisinformationen, Produktspezifikationen und um sich Ihr Angebot zu sichern.