



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 54 787 B4** 2008.01.03

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **103 54 787.8**
 (22) Anmeldetag: **21.11.2003**
 (43) Offenlegungstag: **30.06.2005**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **03.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 27/62** (2006.01)
G01N 13/14 (2006.01)
H01J 49/04 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)

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

(66) Innere Priorität:
103 53 218.8 **13.11.2003**

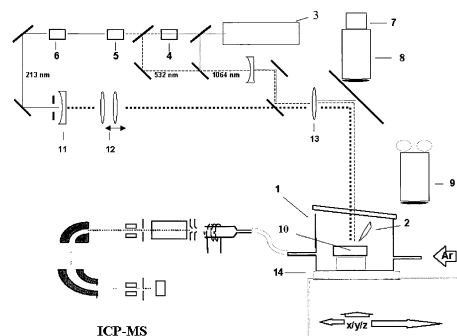
(73) Patentinhaber:
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE; Przybylski, Michael, Prof.Dr. Dr. h.c., 65468 Trebur, DE; Technische Universität Dresden, 01069 Dresden, DE

(72) Erfinder:
Becker, Sabine, Dr., 52391 Vettweiß, DE; Kayser, Markus, 10829 Berlin, DE; Gorbunoff, Andre, Dr., 01189 Dresden, DE; Pompe, Wolfgang, Prof. Dr., 01737 Kurort Hartha, DE; Rödel, Gerhard, Prof. Dr., 85757 Karlsfeld, DE; Krause-Buchholz, Udo, Dr., 01129 Dresden, DE; Przybylski, Michael, Prof. Dr., 65468 Trebur, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
DE 199 34 561 A1
US2002/01 63 735 A1
US 64 82 199 B1
STÖCKLE, Raoul, u.a.: Nanoscale Atmospheric Pressure Laser Ablation-Mass Spectrometry. In: Analytical Chemistry 2001, Vol. 73, No. 7, S. 1399-1402;

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung einer orts aufgelösten Lokal- und Verteilungsanalyse und zur quantitativen Bestimmung von Elementkonzentrationen**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Analyse von Elementkonzentrationen einer Probe mit Hilfe der Laserablation-induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (LA-ICP-MS), dadurch gekennzeichnet,
 – dass die eingestrahlte Laserleistungsdichte des Lasers (3) wenigstens 10^9 W/cm^2 beträgt,
 – dass der Laserstrahl in der Nähe der vom Laser (3) bestrahlten Oberfläche der Probe (10) an einer metallischen Spitze (2) im Nahfeld verstärkt wird, wozu die metallische Spitze (2) in der Nähe des Spots des auf die Oberfläche der Probe (10) fokussierten Laserstrahls positioniert wird, und
 – dass der Laserstrahl auf der Oberfläche der Probe (10) auf einen Spotdurchmesser von weniger als $100 \mu\text{m}$ fokussiert wird.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft einerseits ein Verfahren zur Lokalanalyse und Verteilungsanalyse und gleichzeitig ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Elementkonzentrationen. Ferner betrifft die Erfindung eine zur Durchführung der vorgenannten Verfahren geeignete Vorrichtung.

Stand der Technik

[0002] Als Analysenmethode zur Messung von lateralen Elementverteilungen im μm Bereich und zur Bestimmung von Spurenelementen bis in den ng/g und sub-ng/g – Konzentrationsbereich werden derzeit in der Massenspektrometrie zur direkten Ablation des zu untersuchenden festen Probenmaterials verschiedene Verfahren z. B. unter Verwendung von fokussierten Laserstrahlen angewandt. Bekannt ist beispielsweise das Verfahren der Laserablation – induktiv gekoppelten Plasmamassenspektrometrie (LA-ICP-MS) in der Spuren- und Mikrolokanalyse. Dieses Verfahren ist nachteilig jedoch nicht in der Lage, Elementverteilungen und -konzentrationen im nanoskaligen Maßstab, insbesondere unterhalb von 100 nm zu bestimmen, wie sie beispielsweise bei der Analyse an Zellorganellen gefordert wird.

[0003] Andere Analysenverfahren mit einem lateralen Auflösungsvermögen von 50–100 nm, wie beispielsweise die Rasterelektronenmikroskopie (SEM-EDX), die Augeremissionsspektroskopie (AES) oder die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS), sind regelmäßig nicht empfindlich genug oder sogar ungeeignet, quantitative Analysendaten von Spurenelementen in untersuchten Probenmaterialien zu liefern. Zudem sind diese Analysenverfahren in der Regel nicht für Verteilungsanalysen nicht leitender Probenmaterialien infolge von Aufladungseffekten auf der Probenoberfläche geeignet und machen dementsprechend speziell zu entwickelnde Techniken erforderlich.

[0004] In zunehmenden Maße werden in der Analytik Laser, wie beispielsweise der Nd-YAG-Laser mit einer Wellenlänge im UV-Bereich (λ -266 nm oder 213 nm), eingesetzt. Diese Laser werden häufig für den Probeneintrag in nachweisstarke ICP-Massenspektrometer (LA-ICP-MS: laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry) verwendet. Zurzeit sind Nd-YAG-Lasersysteme mit einem Laserspottedurchmesser von einigen μm bis zu einigen hundert μm zur Mikrolokanalyse kommerziell verfügbar (z. B. LSX 200, CETAC Technologies, Omaha, USA oder UP 213, New WAVE Research, Fremont, USA).

[0005] Nachteilig reicht die Leistungsdichte solcher Lasersysteme in der Regel nicht aus, um bei einem lateralen Auflösungsvermögen der LA-ICP-MS im unteren μm -Bereich, biologische Matrices direkt mit

hoher Effizienz zu ablatieren. Der begrenzende Faktor ist dabei die Beugungsgrenze, die ein Laser regelmäßig nicht unterschreiten kann. Dies bedeutet, dass die mögliche minimale Auflösungsgrenze im Bereich einer Wellenlänge des Lasers liegt. Ortsaufgelöste Analysen unterhalb von 1 μm sind daher regelmäßig gar nicht möglich.

[0006] In US 2002/0163735 A1 wird beispielsweise ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Erzeugung einer radial homogenisierten, hoch energetischen Laserstrahlung für die Probenablation und weiteren Analyse durch ICP-MS beschrieben, bei der die Laserstrahlung mit einer Leistung von mindestens 30 J/cm^2 über ein Mittel zur Homogenisierung auf eine Fläche mit einem Durchmesser von wenigstens 40 μm auf die Oberfläche der Probe geleitet wird.

[0007] Ferner wird in DE 199 34 561 A1 ein Elementaranalyseverfahren zur Detektion von Spurenelementen aus Eisproben offenbart, bei der durch ein Laserablations-ICP-MS-Verfahren gefrorene Materialproben untersucht werden. Dabei wird ein Nd:YAG-Laserstrahl über eine Transfer- und Fokussierungsoptik auf die Eisprobe geleitet.

[0008] US 6,482,199 B1 beschreibt ein Verfahren und eine Vorrichtung zur schnellen, hochpräzisen und variablen Materialmodifikation. Dabei wird eine gepulste elektromagnetische Strahlung auf ein Target geleitet, um unterschiedliche Materialmodifikationen zu erzielen, unter anderem auch die Schmelz- oder Verdampfungsablation des Materials. Die Steuerung des Energieeintages erfolgt dazu neben der Variation der Einstrahldauer u. a. auch durch Variation des Strahlungsdurchmessers auf dem Target.

[0009] Für viele medizinisch-molekularbiologische Fragestellungen wird jedoch ein laterales Auflösungsvermögen des zu verwendenden Analysenverfahrens von einigen hundert nm bis in den unteren nm-Bereich gefordert. Eine solche Ortsauflösung könnte dazu führen, dass eine direkte Nanolokalanalytik an einzelnen Zellorganellen durchführbar wäre, und gleichzeitig eine ortsaufgelöste Verteilungsanalytik im Nanometerbereich der interessierenden Elemente, wie beispielsweise Cu, Zn, S, Fe und P ermöglicht würde.

[0010] Nahfeld-optische Techniken werden derzeit intensiv erforscht und verbessert, um beispielsweise eine wesentlich höhere Ortsauflösung in der optischen Mikroskopie zu erhalten. Eine extrem hohe Auflösung kann erreicht werden, wenn Licht im Nahfeld gestreut oder detektiert wird. Dies ist beispielsweise das Prinzip eines nahfeldoptischen Mikroskops. Anwendungen der Nahfeldoptischen Mikroskopie reichen von festkörperphysikalischen Problemen bei tiefen Temperaturen über Untersuchungen an Halbleiterproben bis zu biologischen Fragestellungen.

gen.

[0011] In dem Aufsatz "Nanoscale Atmospheric Pressure Laser Ablation Mass Spectrometry" von R. Stöckle et al. (Anal. Chem. 73, 2001, 1399–1402) wird ein Verfahren beschrieben, das die Nahfeld-Laserablation zur Erzeugung neutraler Moleküle aus einer Antracen-Kristalloberfläche nutzt. Diese wurden über ein Interface (suction tube: 20 µm Stahlkapillare) in eine Elektronenstoßionenquelle eines Quadrupol-Massenspektrometers extrahiert. Die Laserablation des organischen Materials wurde mit Hilfe eines frequenzverdreifachenden Nd-YAG-Lasers mit einer Wellenlänge von 355 nm und mit 250 µJ Energie pro Puls durchgeführt, dessen Laserstrahl in eine speziell präparierte optische Faser mit ausgezogener Spitze für die Nahfeldoptik eingekoppelt wurde. Diese Spitze hatte eine 170 nm Apertur. Die mit Hilfe der Laserablation erzeugten Krater auf der Antracen-Kristalloberfläche wiesen dabei etwa denselben Durchmesser auf. Heutzutage lassen sich mit der Nahfeldoptik Aperturen mit einigen wenigen Nanometern Durchmesser erzeugen. Der Durchlässigkeitsgrad solcher Aperturen liegt aber deutlich unterhalb von 10^{-8} .

[0012] Die physikalischen Grundlagen der Nahfeldverstärkung sind der Funktionsweise eines Blitzableiters im elektrostatischen Feld ähnlich. Ein leitendes Objekt in einem quasistatischen elektrischen Feld ruft eine lokale Feldintensitätsüberhöhung in der Nähe seiner Oberfläche hervor, die umso stärker ist, je ausgedehnter das Objekt ist. Eine ähnliche Situation kann auch in Feldern optischer Frequenz realisiert werden. Eine Voraussetzung dafür ist, dass der Krümmungsradius des leitenden Objekts viel kleiner als die Wellenlänge der optischen Strahlung ist. Die tatsächliche Feldverstärkung bei realen Metallen durch die Anregung der sogenannten Plasmonresonanzen (Eigenschwingungen des Elektronengases an der Metalloberfläche) kann aber deutlich höher als die rein statische sein.

[0013] Genaue Berechnungen auf der Basis der Maxwell-Gleichungen in der so genannten Nahfeldzone ergeben, dass es je nach der Form und den optischen Eigenschaften des Objektes eine optimale Objektgröße und eine Strahlungswellenlänge gibt, bei der der Feldverstärkungsfaktor am größten ist. Beispielsweise weist ein sphärisches Teilchen aus Silber einen maximalen Feldverstärkungsfaktor von ca. 40 an seiner Oberfläche auf, wenn es mit Licht mit einer Wellenlänge von 400 nm bestrahlt wird. Streckt man dieses Teilchen bis auf ein Achsenverhältnis von 1:4, so erhöht sich der Feldverstärkungsfaktor auf 500, wobei sich die Resonanzwellenlänge auf 575 nm verschiebt. Dabei wird vorausgesetzt, dass der elektrische Vektor der einfallenden Lichtwelle entlang der großen Hauptachse des Teilchens liegt. Einen ähnlichen Feldverstärkungseffekt kann man nicht nur

bei isolierten Teilchen beobachten, sondern auch an der nm-scharfen Spitze einer Metallnadel, die mit Licht aus rotem oder infrarotem Spektralbereich bestrahlt wird, und bei der der elektrische Vektor der einfallenden Lichtwelle entlang der Spitzachse angeordnet ist.

[0014] Beträgt die eingestrahlte Laserleistungsdichte mehr als 10^9 W/cm², so wird das Probenmaterial nahezu stöchiometrisch ablatiert. Unter einer stöchiometrischen Ablation im Sinne dieser Erfindung wird verstanden, dass die atomare Zusammensetzung des durch die Laser-Festkörperwechselwirkung entstandenen Dampfes identisch der des Laser bestrahlten Festkörpers ist. Dies ermöglicht vorteilhaft eine einfache semiquantitative Analyse des Probenmaterials, wobei die Elementkonzentrationen in beliebigen Probenmaterialien mit einem Fehlerfaktor von 2 bis 3 bestimmbar sind. Bei dieser eingestrahlten Laserleistungsdichte wird die Quantifizierung der massenspektrometrischen Analysendaten wesentlich vereinfacht, da Fraktionierungseffekte in der Regel minimiert werden.

Aufgabe und Lösung

[0015] Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zu Verfügung zu stellen, welches einerseits eine qualitative Lokal- und Verteilungsanalyse im Nanometerbereich und gleichzeitig die quantitative Bestimmung von Elementkonzentrationen in verschiedenen Probenmaterialien ermöglicht.

[0016] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine zur Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung zu schaffen.

[0017] Die Aufgaben der Erfindung werden gelöst durch ein Verfahren mit der Gesamtheit an Merkmalen gemäß Hauptanspruch 1, sowie durch eine Vorrichtung mit der Gesamtheit an Merkmalen gemäß Nebenanspruch 4. Vorteilhafte Ausführungen des Verfahrens und der Vorrichtung finden sich in den jeweils darauf rückbezogenen Ansprüchen.

Gegenstand der Erfindung

[0018] Die Erfindung betrifft ein Verfahren, bei dem ein Laser induziertes Nanoplasma zur stöchiometrischen Laserablation des untersuchten Materials eingesetzt wird. Dabei können neben beliebigen Festkörperproben auch vorteilhaft biologische Materialien untersucht werden.

[0019] Unter biologischen Materialien sind dabei insbesondere Materialien in Zellorganellen (z. B. Mitochondrien) in isolierten Proteinspots in zweidimensionalen Gelen, biologische Gewebeschnitte oder biologische Nanostrukturen zu verstehen. Die Laserablation des biologischen Materials erfolgt in der Regel

in einer Laserablationskammer mit einem gekühlten Targethalter. Die Laserablationskammer ist vorteilhaft mit einem ICP-MS oder auch weniger empfindlichen ICP-OES (OES-optical emission spectrometry) gekoppelt. Der Beschuss der Probenoberfläche erfolgt mit Photonen eines Lasers, wobei eine Ortsauflösung (Laserspotdurchmesser) auf der Oberfläche der Probe von weniger als 1 μm , insbesondere unterhalb von 0,5 μm und vorteilhaft sogar unterhalb von 0,1 μm realisierbar ist. Besonders vorteilhaft wird eine Ortsauflösung sogar bis in den Bereich von 20 bis 30 nm erreicht. Zusätzlich können aber mit diesem Laser ebenso Bulkanalysen, das bedeutet Multielementanalysen am Probenmaterial mit einem Laserspotdurchmesser im unteren μm bis zu 300 μm Bereich, durchgeführt werden.

[0020] Während der Messung wird auf die Probenoberfläche ein gepulster Laserstrahl der Leistungsdichte von wenigstens 10^9 W/cm², vorteilhaft sogar bis 10^{10} W/cm² mit einem Spotdurchmesser in einem weiten Bereich von einerseits 20–30 μm bis andererseits unterhalb von 100 nm fokussiert. Die Ortsauflösung bis in den Nanometerbereich wird erfindungsgemäß durch die Anwendung der Nahfeldtechnik ermöglicht. Dabei wird der Laserstrahl in der Nähe der vom Laser bestrahlten Oberfläche an einer Metallspitze im Nahfeld verstärkt, die in der Nähe des auf die Oberfläche der Probe strahlenden Lasers angeordnet werden kann. Dazu ist beispielsweise eine ultrafeine ganzmetallische Spitze geeignet, die aus Gold oder Silber besteht. Durch eine solche metallische Spitze können regelmäßig Zerstörungen aufgrund der sehr hohen Laserleistung verhindert werden.

[0021] Bei einer Leistungsdichte des Lasers von wenigstens 10^9 W/cm², vorteilhaft sogar bis 10^{10} W/cm² auf der Oberfläche der Probe, erfolgt die Ablation des Probenmaterials in der Laserablationskammer in der Regel stöchiometrisch. Das so ablatierte Probenmaterial wird anschließend mit einem Trägergas, beispielsweise einem Argon-Strom, in das induktiv gekoppelte Plasma (inductively coupled plasma ICP) eines hochselektiven ICP-Massenspektrometers transportiert und ionisiert. Anschließend werden die Ionen nach ihrem Maße- zu- Ladungsverhältnis separiert und empfindlich detektiert. Eine Bestimmung der elementaren Zusammensetzung bis in den Ultraspurenbereich und eine Verteilungsanalyse des untersuchten Probenmaterials sind dabei mit diesem erfindungsgemäßen Verfahren möglich. Als alternatives Analysengerät kommt beispielsweise auch die ICP-OES in Betracht.

[0022] Die Erfindung betrifft ferner eine Vorrichtung, die zur Durchführung des vorgenannten Verfahrens geeignet ist. Die Vorrichtung umfasst dabei einen Laser mit einer Leistungsdichte von wenigstens 10^9 W/cm² auf der Oberfläche einer zu analysierenden

Probe, eine Laserablationskammer, sowie ein nachgeschaltetes Massenspektrometer. Zur Anwendung der Nahfeldtechnik weist die Laserablationskammer eine Metall aufweisende Spitze auf, die in der Nähe des auf die Oberfläche der Probe strahlenden Lasers angeordnet werden kann. Dazu ist beispielsweise eine ultrafeine ganzmetallische Spitze geeignet. Diese besteht vorteilhaft aus Gold oder Silber. Die Spitze bewirkt vorteilhaft eine Verstärkung der elektrischen Feldes des Laserlichtes.

[0023] Die Spitze ist auf einer Vorrichtung zur Positionierung der Spitze in der Nähe der Probe angeordnet. Diese Positionierungsvorrichtung lässt sich vorteilhaft in allen drei Raumrichtungen verschieben. Die Schrittweite sollte insbesondere bei wenigstens 2 μm liegen.

[0024] Auch der gesamte Probentisch mit der Laserablationskammer und der Positioniervorrichtung für die Spitze sind vorteilhaft auf einer 3-dimensionale Verschiebeeinheit angeordnet, die ebenfalls eine Verschiebeaufblösung von wenigstens 2 μm aufweisen sollte.

[0025] Optional ist zusätzlich ein hochauflösendes Mikroskop vorgesehen, so dass neben der spektroskopischen Analyse auch eine mikroskopische Untersuchung an der Probe vorgenommen werden kann.

[0026] Ein erfindungsgemäßes Laserablationssystem unter Anwendung der nanoskaligen Nahfeldoptik, das mit einem hochempfindlichen ICP-Massenspektrometer gekoppelt ist, ist insbesondere dazu geeignet, molekularbiologische Untersuchungen mit einem Auflösungsvermögen von einigen hundert nm durchzuführen, um beispielweise Akkumulationen oder Defizite von Metallen (Cu, Fe u. a.) in situ in fixierten Zellen zu erfassen, die Ursachen schwerer Erkrankungen des Menschen sind.

[0027] Mittels der erfindungsgemäßen Nahfeld-Laserablations-ICP-Massenspektrometrie (NF-LA-ICP-MS) kann über ein schnelles Scanningverfahren zur simultanen und direkten Elementanalyse eine einfache Diagnose von mitochondrialen Speichererkrankungen beim Menschen ermöglicht werden. Für die Laserablation ICP-MS von Proteinspots in 2D-Gelen reicht oft ein Spotdurchmesser im Laserfokus von einigen μm bei entsprechender Leistungsdichte von 10^9 W/cm² aus. Es ist jedoch zur Analyse überlappender Proteinspots eine Fokussierung des Laserstrahls auf die Probenoberfläche im nm Bereich wünschenswert, so wie es vorteilhaft durch die vorgenannte Vorrichtung realisiert werden kann. Darüber hinaus wird mit der nanoskaligen NF-LA-ICP-MS die direkte Verteilungsanalyse an biologischen Proben (Gewebeschnitten, Zellorganellen, Mitochondrien) ermöglicht. Dies stellt dem medizinischen Bereich eine Methode zur Verfügung, die beispielsweise eine

routinemäßige Kontrolle und Analyse des Elementgehaltes von distinkten, mit humanen Erkrankungen korrelierten Proteinen zur Diagnose von Erkrankungen erlaubt.

Spezieller Beschreibungsteil

[0028] Nachfolgend wird der Gegenstand der Erfindung anhand von zwei Figuren näher erläutert, ohne dass der Gegenstand der Erfindung dadurch eingeschränkt werden soll.

[0029] Dabei zeigen die

[0030] **Fig. 1:** Experimentelle Anordnung des erfindungsgemäßen Analysenverfahrens.

[0031] **Fig. 2:** Detaillierte Anordnung der Laserablationskammer mit Nahfeldverstärkung durch eine verstellbare metallische Spitze.

[0032] Dabei bedeuten in den Figuren:

Bezugszeichenliste

- | | |
|----|--|
| 1 | Laserablationskammer |
| 2 | metallische Spitze aus Gold oder Silber zur Erzielung der Nahfeldverstärkung |
| 3 | Festkörperlaser (Nd-YAG-Laser) |
| 4 | Frequenzverdoppler (Second Harmonic Generation = SHG) |
| 5 | Frequenzverdreifacher (Third Harmonic Generation = THG) |
| 6 | Frequenzverfünffacher (Quintuple Harmonic Generation = QHG) |
| 7 | CCD-Kamera |
| 8 | Zoom Mikroskop |
| 9 | Hochauflösendes Mikroskop |
| 10 | Probe |
| 11 | Blende |
| 12 | Zoom System |
| 13 | Fokussierlinse |
| 14 | Peltier Kühlelement |
| 15 | Mikromanipulatorversteller (x/y/z: 2 µm Auflösung) |
| 16 | Positioniervorrichtung für metallische Spitze |
| 17 | Dichtung, beispielsweise einen Wellenbalg |

[0033] Als Ausführungsbeispiel wird eine erfindungsgemäße Vorrichtung vorgestellt, die den folgenden Anforderungen an ein hochauflösendes Analysenverfahren genügt:

- Entwicklung eines bis in den nm Bereich fokussierbarer Laser mit einer Laserleistungsdichte von wenigstens 10^9 W/cm² für Laserablation biologischer oder anderer Festkörperproben bei einer Wellenlänge im infraroten Bereich. Bei Ausnutzung der Nahfeldverstärkung mit Silberspitze sollte die Wellenlänge zwischen 500 und 600 nm liegen. Zusätzlich ist der Aufbau eines Mikromanipulators

und eine stärkere Vergrößerung zur Beobachtung der Oberfläche mit einem leistungsfähigen Mikroskop erforderlich.

- Entwicklung einer speziellen Ablationskammer (kühlbar) für die direkte Analyse von Gewebeschnitten oder einzelnen Zellen.

[0034] Um biologische Proben, wie Gewebeschnitte oder Zellorganellen direkt zu analysieren, sollte der Probenhalter in der Laserablationskammer (z. B. mit einem Peltierelement) gekühlt werden.

[0035] Das erfindungsgemäße Analysensystem ist insbesondere gekennzeichnet durch ein Laserablationssystem mit folgenden Elementen und Eigenschaften:

- Ag-Nadel (metallische Spitze) und Mikromanipulator
- Blitzlampengepumpter Nd-YAG Festkörperlaser in MOPA (Oszillator-Verstärker Anordnung)
- Emission gepulster Strahlung mit Pulsbreite < 5 ns, Wiederholraten von bis zu 20 Hz und gaußförmigen transversalen Strahlenprofil.
- Frequenzkonversion durch harmonische Vervielfachung unter Ausnutzung nicht linearer Effekte in doppelbrechenden Kristallen
- Gleichzeitige Generierung von gepulster Laserstrahlung der Wellenlänge 1064 nm, 532 nm und 213 nm. Je nach Applikation kann die jeweilige Strahlung entsprechender Wellenlängen mittels Kippspiegel zu- oder abgeschaltet werden.
- Nachgeschalteter Strahlengang bestehend aus Abschwächer, Energiemessung, Strahlmanipulator, Wellenlängenseparatoren und Fokussieroptik.
- Fokussieroptik bestehend aus Zoomteleskop und Objektivlinse, Strahlung der Wellenlänge 213 nm kann kleiner als 10 µm auf Probenoberfläche fokussiert werden.
- Fokussieroptik für gleichzeitige Fokussierung der Strahlungen der Wellenlängen 1064 und 532 nm auf Nanospitze.
- Echtzeit Probenbeobachtung mit Hilfe eines Zoommikroskops, einer CCD Kamera und einer Bildbearbeitungssoftware während des Ablationsprozesses (erforderliche Auflösung <2 µm).
- 3 dimensionale Probenpositionierung mit einer Auflösung von < 2 µm.
- Einsatz eines zusätzlichen, stark vergrößernden optischen Mikroskops (< 500×) außerhalb der Strahlachse zur Feinpositionierung der Nanospitze.
- Ablationskammer mit Eintrittsfenster für Laserstrahlung, Beobachtung und Mikromanipulatorversteller. Alle Eintrittsfenster sind abgedichtet

[0036] Die Quantifizierung der Analysenresultate der erfindungsgemäßen NF-LA-ICP-MS kann, wie nachfolgend aufgeführt, über verschiedene Quantifizierungsstrategien erfolgen.

1. Wurde die Struktur des zu untersuchten Prote-

ins z. B. mit MALDI-FTICR-MS aufgeklärt und ist die Zahl der S-Atome (z. B. in Cystein) bekannt, so kann über das gemessene X/S Ionenintensitätsverhältnis ($X = S, Fe, Si, Cu, Zn \dots$) unter Berücksichtigung der Untergrundkonzentrationen von X und S und wenn S als Interstandardelement verwendet wird, alle beliebigen Elementkonzentrationen im Protein bestimmt werden.

2. Korrektur mit relativen Elementempfindlichkeitsfaktoren, die an einem Matrix-angepassten Standardreferenzmaterial (oder einem zu präparierenden Laborstandard) mit dem erarbeiteten Analysenverfahren unter optimierten experimentellen Parameter bestimmt werden.

3. Lösungskalibration der LA-ICP-MS unter Verwendung von Standardlösungen (s. J.S. Becker, Spectrochim. Acta B57 (2002) 1805)

4. Entwicklung eines neuartigen Verfahrens zur Isotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung der Lösungskalibration: Hierbei erfolgt die Quantifizierung des S, Cu, Zn, Fe, Si oder anderer Elemente mit mindestens zwei Isotopen über die Zugabe des hochangereicherten Isotops in der Lösung nach Zerstäubung mit einem mikrozentrischen Zerstäuber mit Desolvator durch Transport des trockenen Aerosols in die Laserablationskammer und anschließend in das ICP-MS. Man erhält zunächst ein konstantes Signal des zu messenden Isotopenverhältnisses. Anschließend wird der Proteinspot ablatiert und die Isotopenmischung analysiert. Aus der Änderung des Isotopenverhältnisses in der Mischung kann man über die Formel der Isotopenverdünnungsanalyse die Elementkonzentration bestimmen.

5. Isotopenmarkierung eines Farbstoffes (z. B. Coomassie) oder anderer stöchiometrisch proteinbindenden Agenzien mit hochangereichertem Nichtmetall- oder Metallisotopen wie z. B. S-33 oder S-44 für Coomassie. Da Coomassie weitestgehend massenproportional an Proteine bindet, kann somit S als Internstandardelement verwendet werden und eine Quantifizierung wäre unter Verwendung des isotopenmarkierten Farbstoffes mittels Isotopenverdünnungsanalyse möglich, d. h. über die Formel der Isotopenverdünnung wäre die Elementkonzentrationen bestimmbar. Treten Abweichungen in der Stöchiometrie der Bindung von Coomassie und Protein, wie z. B. bei stark hydrophoben Proteinen auf, müssen andere Verbindungen, die stöchiometrische Bindungen mit Proteinen ermöglichen, ausgewählt werden. Zur Erarbeitung eines Quantifizierungsverfahrens müssen Kalibrierkurven erstellt werden, d. h. Proteine mit bekannter abgestufter Konzentration werden mit 2D-Gel-elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Mit Hilfe der LA-ICP-MS können nun über die Isotopenverdünnungsanalyse (d. h. die Bestimmung des $^{34}S/^{32}S$ bzw. $^{33}S/^{32}S$ Isotopenverhältnisses) die Elementkonzentrationen wie S, P und Metalle bestimmt

werden. Aus dem Anstieg der Kalibriergeraden lassen sich Aussagen zur Stöchiometrie der Bindung des Farbstoffes an ein definiertes Protein oder möglichen stöchiometrischen Abweichungen machen.

[0037] Ein wesentlicher Vorteil der erfindungsgemäßen NF-LA-ICP-MS gegenüber der Sekundärionen-Massenspektrometrie SIMS sind die um Größenordnungen geringeren Matrixeffekte. Diese erlauben vor allem eine quantitative intra- und extrazelluläre Elementverteilung in gesunden und pathologischen Zellen und Geweben. Andererseits sind dadurch aber auch Nanolokalanalyse an beliebigen Festkörperproben mit hoher Ortauflösung, wie beispielsweise in der Mikroelektronik, der Werkstoffforschung, der Geologie oder auch der Umweltanalytik möglich.

[0038] Die erfindungsgemäße Analysenmethode eignet sich vorteilhaft insbesondere für folgende Anwendungsbeispiele:

- Nanolokal- und ortsaufgelöste Verteilungsanalyse an Gewebeschnitten und Zellorganellen (z. B. Mitochondrien) mittels NF-LA-ICP-MS.
- Nanolokalanalyse an Proteinspots in 2D Gelen.
- Nanolokal- oder Verteilungsanalyse an Festkörperoberflächen (z. B. S-Layer, Nanocluster, Nanostrühte, Mikro- und Nanoarrays) an Interfaces oder an dünnen Schichten (Mikro- und Nanoelektronik, Materialforschung).
- Nanolokal- oder Verteilungsanalyse an biologischen (z. B. Baumringen), medizinischen Proben (Zähnen, Knochen, Haare u. ä.) oder an geologischen Proben (Einschlüsse, Inhomogenitäten).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Elementkonzentrationen einer Probe mit Hilfe der Laserablation-induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (LA-ICP-MS), **dadurch gekennzeichnet**,
 – dass die eingestrahelte Laserleistungsdichte des Lasers (**3**) wenigstens 10^9 W/cm^2 beträgt,
 – dass der Laserstrahl in der Nähe der vom Laser (**3**) bestrahlten Oberfläche der Probe (**10**) an einer metallischen Spitze (**2**) im Nahfeld verstärkt wird, wozu die metallische Spitze (**2**) in der Nähe des Spots des auf die Oberfläche der Probe (**10**) fokussierten Laserstrahls positioniert wird, und
 – dass der Laserstrahl auf der Oberfläche der Probe (**10**) auf einen Spotdurchmesser von weniger als 100 μm fokussiert wird.

2. Verfahren nach vorhergehendem Anspruch 1, bei dem der Laserstrahl auf einen Spotdurchmesser von weniger als 10 μm , insbesondere von weniger als 1 μm und vorteilhaft von weniger als 100 nm fokussiert wird.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, bei dem zur Verstärkung des Laserstrahls eine Silberspitze eingesetzt wird.

4. Vorrichtung zur Analyse von Elementkonzentrationen einer Probe (**10**) mit Hilfe der Laserablation-induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (LA-ICP-MS), umfassend einen gepulsten Nd-YAG-Laser (**3**), eine Laserablationskammer (**1**) sowie eine ICP-MS Analyseeinrichtung, dadurch gekennzeichnet,

– dass die Vorrichtung des Weiteren eine metallische Spitze (**2**) und eine Positioniervorrichtung (**16**) zur Positionierung dieser Spitze (**2**) aufweist, wobei die metallische Spitze (**2**) in der Laserablationskammer (**1**) angeordnet ist und mittels der Positioniervorrichtung (**16**) während des Betriebs der Vorrichtung zur Nahfeldverstärkung des Laserstrahls in der Nähe des Spots des auf die Oberfläche der Probe (**10**) fokussierten Laserstrahls positioniert werden kann.

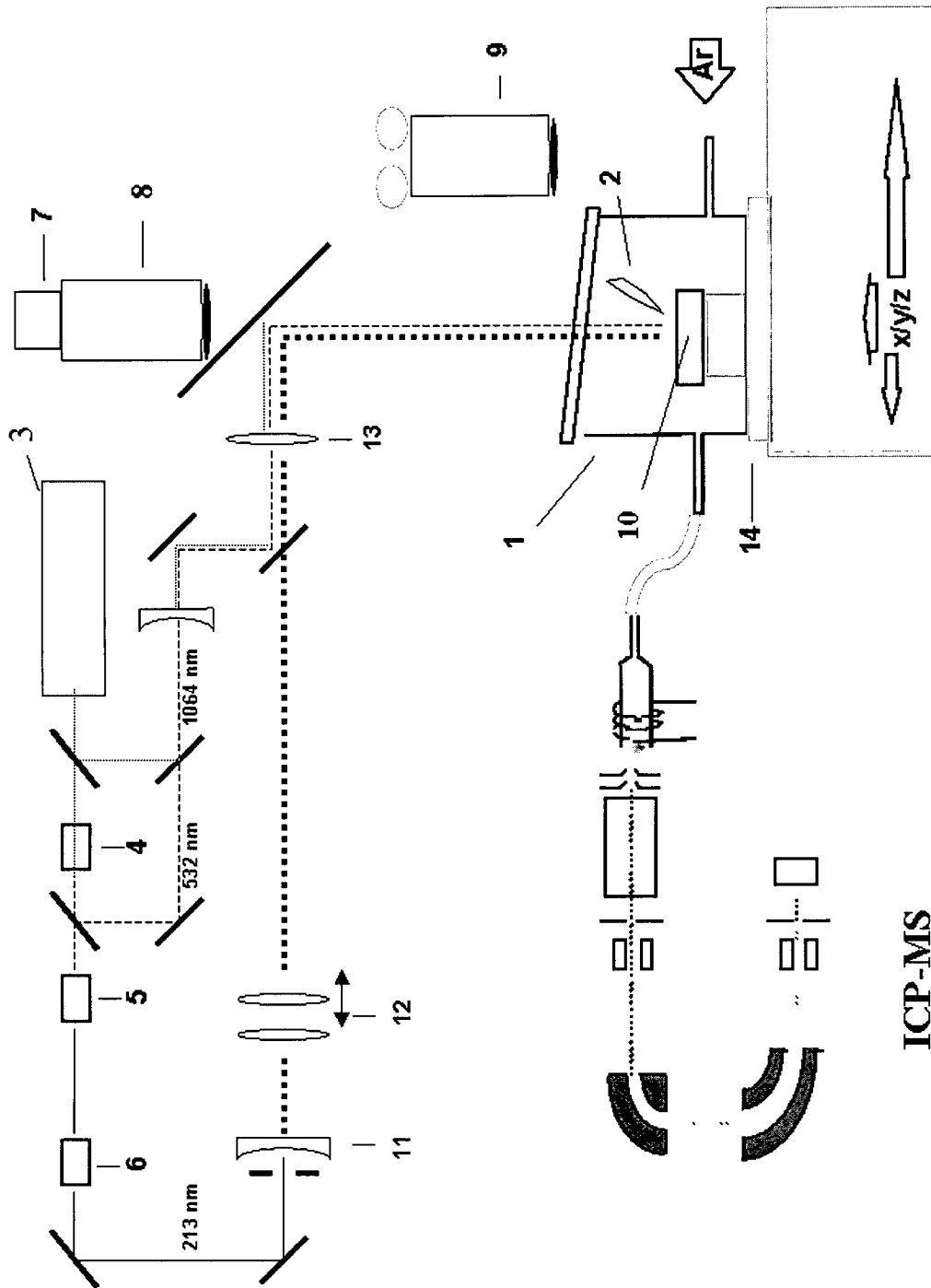
5. Vorrichtung nach Anspruch 4, mit einer Gold- oder Silberspitze als metallische Spitze (**2**).

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 bis 5, mit einem Frequenzverdoppler (**4**), Frequenzverdreifacher (**5**) oder einem Frequenzverfünffacher (**6**).

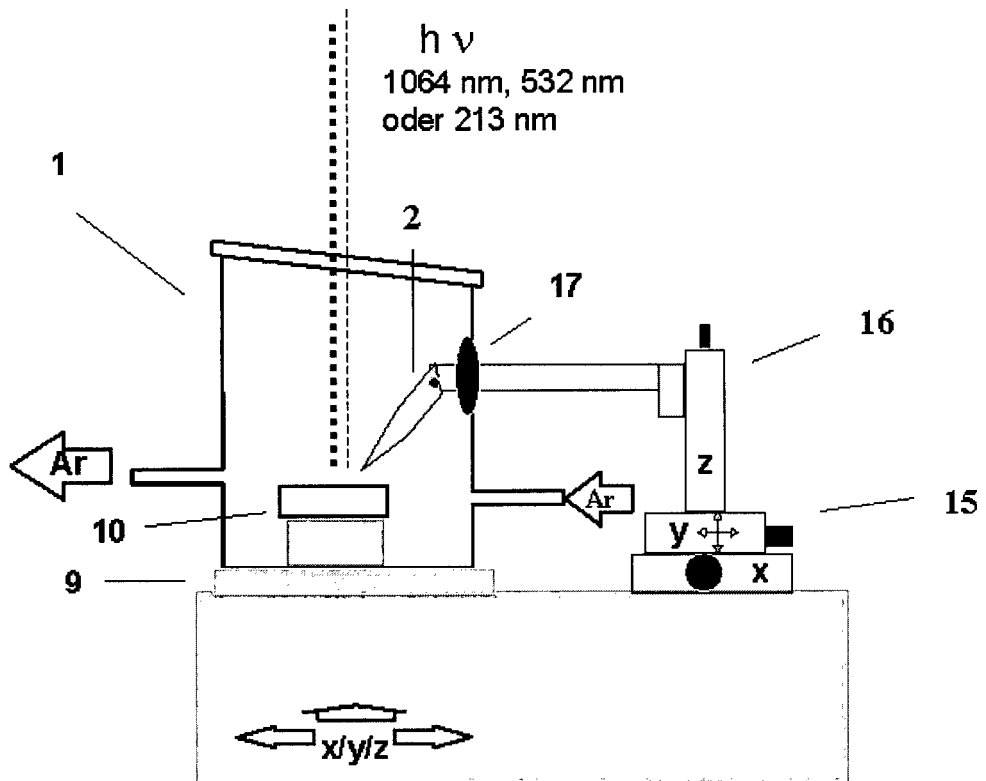
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 bis 6, bei der die metallische Spitze (**2**) auf einer Positioniervorrichtung (**16**) angeordnet ist, die in allen drei Raumrichtungen eine Verschiebeaufblösung von weniger als 2 μm aufweist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1



Figur 2