

(12)

## Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 50157/2022 (51) Int. Cl.: **G01N 21/19** (2006.01)  
(22) Anmeldetag: 11.03.2022 G01J 3/02 (2006.01)  
(45) Veröffentlicht am: 15.10.2024 G01J 3/45 (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:  
EP 3865852 A1  
US 2022018759 A1  
EP 3940368 A1  
WO 2007109344 A2  
JP 2009109439 A

(73) Patentinhaber:  
TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN  
1040 Wien (AT)

(72) Erfinder:  
Lendl Bernhard  
1160 Wien (AT)  
Ramer Georg  
2345 Brunn am Gebirge (AT)  
Hermann Daniel-Ralph  
1090 Wien (AT)

(74) Vertreter:  
SONN Patentanwälte GmbH & Co KG  
1010 Wien (AT)

### (54) Verfahren und Vorrichtung zur VCD-Analyse eines Analyten

(57) Vorrichtung (1) zur Vibrationszirkulardichroismusanalyse eines Analyten, die umfasst:

- eine Laserlichtquelle (2) zum Bereitstellen eines Laserstrahls (3);
- einen Strahlenteiler (5) zum Teilen des Laserstrahls (3) in einen Probenstrahl (6a) und einen Referenzstrahl (6b);
- einen Modulator (11) zum Modulieren der Polarisation des Probenstrahls (6a) und wahlweise des Referenzstrahls (6b);
- eine Probenzelle (14a) und eine Referenzzelle (14b);
- einen Probendetektor (15a) zum Detektieren des Probenstrahls (6a) und Erhalten eines Probenstrahlsignals, das einer Intensität des Probenstrahls (6a) entspricht;
- einen Referenzdetektor (15b) zum Detektieren des Referenzstrahls (6b) und Erhalten eines Referenzsignals, das einer Intensität des Referenzstrahls (6b) entspricht;
- einen Subtrahierer (16) zum Bilden eines Differenzsignals des Probensignals und des Referenzsignals. Darüber hinaus ein entsprechendes Verfahren.

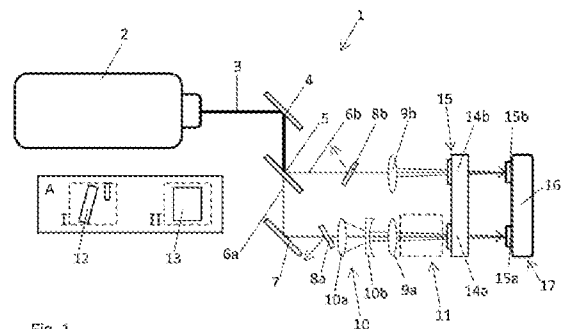


Fig. 1

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Vibrationszirkulardichroismusanalyse eines Analyten.

**[0002]** Die Zirkulardichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie) bezieht sich auf die differentielle Absorbanz von Licht und rechtszirkularem polarisiertem Licht durch eine Probe. Daher kann sie bei der Untersuchung von stereochemisch relevanten Molekülen in Lösung verwendet werden. Ein Teilgebiet dieses Forschungsbereichs ist der Vibrationszirkulardichroismus (VCD), der sich mit Vibrationsübergängen befasst, größtenteils im Mittelinfrarotbereich (MIR). Dieser Bereich umfasst viele Bänder, die für organische molekulare Bindungen charakteristisch sind, wodurch er sich für eine breite Anwendung in stereochemischen und biologischen Studien eignet. Im IR-Bereich liegen die beobachteten Absorptionsdifferenzen in der Regel zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-6}$ . Darüber hinaus sind viele Lösungsmittel in dem Bereich von Interesse stark absorbierend, wodurch der spektrale Durchsatz verringert und die Verwendung von sehr kurzen Strahlengänglängen in der herkömmlichen MIR-Absorptionsspektroskopie bedingt wird. Diese Charakteristika stellen erhebliche Nachteile dar, da schwache Signale unter vergleichsweise hohen Rauschpegeln zu detektieren sind. Kommerzielle Instrumente, die hauptsächlich auf Fourier-Transformations-Infrarotspektrometern (FT-IR) basieren, arbeiten mit der Mittelung wiederholter Abtastungen, um in VCD-Messungen annehmbare Signal-Rausch-Verhältnisse zu erzielen, die eine angemessene Auslegung der Spektren ermöglichen, wobei diese häufig zu Messzeiten von mehreren Stunden pro Probe führen.

**[0003]** Durch diesen Nachteil gibt es stetige Bemühungen, sowohl das Interferometerdesign als auch die allgemeine VCD-Gerätschaft zu verbessern, um Rauschpegel zu senken und Artefakte zu verringern. Bei der VCD-Gerätschaft konnten Artefakte durch sorgfältiges optisches Design und Polarisationsmodulationsschemata unterdrückt werden (siehe Nafie, L. A. Dual Polarization Modulation: A Real-Time, Spectral-Multiplex Separation of Circular Dichroism from Linear Birefringence Spectral Intensities. Appl. Spectrosc. 2000, 54 (11), 1634-1645).

**[0004]** Gleichzeitig wurde die Mittel-IR-Spektroskopie in Bezug auf die Empfindlichkeit durch die Verwendung neuartiger abstimmbarer Lichtquellen im Allgemeinen stark verbessert. Insbesondere ermöglichte hier die Einführung von brillanten Quanten-Kaskaden-Lasern mit externem Resonator die Verwendung längerer Strahlengänglängen und führte zu einer höheren Empfindlichkeit und geringeren Nachweisgrenzen (siehe: Akhgar, C. K.; Ramer, G.; Žbik, M.; Trajnerowicz, A.; Pawluczyk, J.; Schwaighofer, A.; Lendl, B. The Next Generation of IR Spectroscopy: EC-QCL-Based Mid-IR Transmission Spectroscopy of Proteins with Balanced Detection. Anal. Chem. 2020, 92 (14), 9901-9907). Ein logischer Schritt bestand darin, Quanten-Kaskaden-Laser (QCL) mit einem VCD-Aufbau zu kombinieren. S. Lüdeke, M. Pfeifer und P. Fischer, J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 5704-5707, stellten einen Vergleich zwischen einem spezifischen QCL-basierten Aufbau und einem kommerziellen FTIR-VCD-Instrument an, wobei sie die Eignung von QCLs für einen VCD aufzeigten.

**[0005]** Mittelinfrarotlaser, wie z. B. QCLs, bieten eine hochbrillante und polarisierte Strahlung, wodurch sogar bei stark absorbierenden Lösungsmitteln, wie Wasser, längere Weglängen möglich sind, wodurch die Probenabsorbanz erhöht und die Handhabung von Proben vereinfacht wird. Sie bringen jedoch zusätzliches Rauschen in das System ein, das bei klassischen Quellen thermischen Lichts nicht vorhanden ist. Rauschen in Laserquellen kann die Form von Schwankungen von Impuls zu Impuls, Intensitätsabwanderungen, spektralem Fehlabbgleich durch fehlerhafte Gitterbewegungen und niederfrequentem Rauschen annehmen, wodurch die Ergebnisse eines VCD negativ beeinflusst werden. Aus diesem Grund ist es bislang nicht gelungen, die Messzeit im Vergleich zu FTIR-Systemen mit unveränderten Rauschpegeln zufriedenstellend zu verkürzen.

**[0006]** Ferner zeigen M. Bonmarin und J. Helbinj, "A picosecond time-resolved vibrational circular dichroism spectrometer", Opt. Lett. 33, 2086-2088 (2008), ein VCD-System, bei dem ein Infrarotlaserimpuls durch einen Strahlenteiler geteilt wird. Ein Strahl wird durch einen spannungsopti-

schen Modulator moduliert und durch eine Probe geleitet. Beide Strahlen werden detektiert. Da der Referenzstrahl jedoch keine Referenz durchläuft, ist mit diesem Schema keine exakte Beseitigung von Rauschen möglich. Auf diese Weise werden die Absorbanzeffekte, die sich aus dem Lösungsmittel sowie aus polarisationsabhängigen Strahlenteilungsartefakten ergeben, nicht korrigiert. Darüber hinaus wird nur jeder 50. Zyklus des spannungsoptischen Modulators verwendet. Ein weiteres VCD-Verfahren zeigt die EP 38653852 A1. Dabei wird ein Doppelkamm durch Überlagerung der Ausgänge von zwei Quantenkaskadenlaserquellen erzeugt. Jedoch wird auch bei diesem Verfahren keine Referenz durchlaufen.

**[0007]** Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, einen oder mehrere der Nachteile im Stand der Technik zu mindern bzw. zu beseitigen. Insbesondere liegt eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein VCD-Verfahren und eine VCD-Vorrichtung mit verringertem Rauschen und/oder höherer Zeitauflösung (d. h. mehr Messungen pro Zeiteinheit) bereitzustellen.

**[0008]** Dies wird durch ein Verfahren zur Vibrationszirkulardichroismusanalyse eines Analyten erzielt, das die Schritte umfasst:

- a) Erzeugen eines Laserstrahls in einer Wellenlänge, vorzugsweise im Infrarotbereich;
- b) Teilen des Laserstrahls in einen Probenstrahl und einen Referenzstrahl;
- c) Modulieren der Polarisation des Probenstrahls;
- d) Wechselwirkenlassen des Probenstrahls mit einer Probe;
- e) Wechselwirkenlassen des Referenzstrahls mit einer Referenz;
- f) Messen der Intensität des Probenstrahls, um ein Probensignal zu erhalten;
- g) Messen der Intensität des Referenzstrahls, um ein Referenzsignal zu erhalten;
- h) Subtrahieren des Probensignals und des Referenzsignals, um ein Differenzsignal zu erhalten
- i) Zurückgewinnen einer polarisationsabhängigen Intensitätsveränderung, die durch den Analyten eingebracht wird, aus dem Differenzsignal.

**[0009]** Darüber hinaus wird dies durch eine Vorrichtung zur Vibrationszirkulardichroismusanalyse eines Analyten erzielt, die umfasst:

- eine Laserlichtquelle zum Bereitstellen eines Laserstrahls;
- einen Strahlenteiler zum Teilen des Laserstrahls in einen Probenstrahl und einen Referenzstrahl;
- einen Modulator zum Modulieren der Polarisation des Probenstrahls;
- eine Probenzelle, um den Probenstrahl mit einer Probe wechselwirken zu lassen, die den Analyten umfasst;
- eine Referenzzelle, um den Referenzstrahl mit einer Referenz wechselwirken zu lassen;
- einen Probendetektor zum Detektieren des Probenstrahls und Erhalten eines Probenstrahlsignals, das einer Intensität des Probenstrahls entspricht;
- einen Referenzdetektor zum Detektieren des Referenzstrahls und Erhalten eines Referenzsignals, das einer Intensität des Referenzstrahls entspricht;
- einen Subtrahierer zum Bilden eines Differenzsignals des Probensignals und des Referenzsignals.

**[0010]** Durch Implementieren einer Laserlichtquelle in Verbindung mit einem symmetrischen Detektionsschema (d. h. Teilen des Laserstrahls in einen Probenstrahl und einen Referenzstrahl und Messen dieser sowie Bestimmen deren Differenz) kann die hohe Brillanz von Laserquellen genutzt werden, ohne zusätzliches Rauschen in das System einzubringen, da Schwankungen durch Messen des Referenzstrahls und Subtrahieren des Signals des Probenstrahls und des Referenzstrahls (d. h. des Probensignals und des Referenzsignals) ausgeglichen werden können. Dadurch sind Messungen mit geringem Rauschpegel und signifikant höherer Zeitauflösung möglich und es werden potenziell neue Anwendungsmöglichkeiten der VCD-Spektroskopie geschaffen, insbesondere bei biopharmazeutischen Anwendungen.

**[0011]** Die Laserlichtquelle umfasst vorzugsweise einen (insbesondere abstimmbaren) Halbleiterlaser. Die Laserlichtquelle umfasst vorzugsweise einen Quanten-Kaskaden-Laser (QCL), insbesondere einen QCL mit externem Resonator. Wahlweise umfasst die Laserlichtquelle einen

Interband-Kaskaden-Laser (ICL). Der Laserstrahl wird vorzugsweise gepulst. Der Probedetektor und der Referenzdetektor umfassen jeweils einen HgCdTe-Detektor (d. h. einen MCT-Detektor). Wahlweise umfasst die Vorrichtung einen symmetrischen Detektor, wobei der symmetrische Detektor den Probedetektor, den Referenzdetektor und den Subtrahierer umfasst. Wahlweise weist das symmetrische Modul einen ersten Ausgang für das Referenzsignal, einen zweiten Ausgang für das Probensignal und einen dritten Ausgang für das Differenzsignal (das auch als symmetrisches Signal bezeichnet werden kann) auf. Wahlweise sind der Probedetektor und/oder der Referenzdetektor mit einer Dunkelstromkompensation versehen.

**[0012]** Der Probenstrahl wird insbesondere derart moduliert, dass der Probenstrahl eine Veränderung dessen Grad der zirkularen Polarisation umfasst. Der Probenstrahl wird insbesondere derart moduliert, dass er Zustände von linearer, elliptischer und/oder zirkularer Polarisation aufweist. Wahlweise wird der Probenstrahl gemäß einem Modulationszyklus moduliert, wobei der Probenstrahl derart moduliert wird, dass er an einem Maximum und einem Minimum des Modulationszyklus eine zirkulare Polarisation aufweist. Der Modulator kann so eingestellt sein, dass er eine Viertelwellenverzögerung bei einer spezifischen Wellenzahl (z. B. bei  $1666,67 \text{ cm}^{-1}$ , d. h.  $6 \mu\text{m}$ ), insbesondere bei der Wellenzahl des Laserstrahls und insbesondere bei einem Maximum und einem Minimum des Modulationszyklus des Modulators, erreicht. Wahlweise wird der Modulator während der Messung angepasst (z. B. um eine Viertelwellenverzögerung bei diversen verschiedenen Wellenlängen zu erzielen, insbesondere bei einem Maximum und einem Minimum in dem Modulationszyklus). Wahlweise umfasst die Probe ein Lösungsmittel. Wahlweise umfasst die Referenz ein Lösungsmittel. Vorzugsweise umfassen die Probe und die Referenz das gleiche Lösungsmittel. Wahlweise umfassen sowohl die Probe als auch die Referenz eine Feststoffprobe (d. h. eine reine Feststoffsubstanz oder eine Mischung von Feststoffen, wie z. B. ein Pellet von KBr und einem Analyten). Wahlweise umfassen die Probe und die Referenz ein Gas (d. h. ein reines Gas oder ein Gemisch von Gasen, das einen Analyten in einem Matrixgas umfasst). Wahlweise umfasst nur die Probe den Analyten (d. h., wahlweise umfasst die Referenz den Analyten nicht). Dieser Aufbau kann von einem Gehäuse umschlossen sein und/oder kann (konstant) mit trockener Luft gespült werden, um eine Interferenz durch Wasserdampf während der Spektrumerfassung zu verhindern. Insbesondere sind das Verfahren und die Vorrichtung für eine Vibrationszirkulardichroismusspektroskopie eines Analyten vorgesehen.

**[0013]** Der Infrarotbereich ist als Wellenlänge zwischen  $0,75 \mu\text{m}$  und  $1.000 \mu\text{m}$  definiert. Wahlweise wird der Laserstrahl in Schritt a) bei einer Wellenlänge im Mittelinfrarotbereich erzeugt, der als Wellenlänge zwischen  $2,5 \mu\text{m}$  und  $50 \mu\text{m}$  definiert ist. Der Strahlenteiler stellt einen übertragenen Strahl und einen reflektierten Strahl bereit, wobei einer davon als Probenstrahl und der andere als Referenzstrahl verwendet wird. Der Strahlenteiler ist vorzugsweise ein 50/50-Strahlenteiler. Der Probenstrahl wird insbesondere auf die Probenzelle, oder spezifischer durch den Modulator und die Probenzelle, auf den Probedetektor gerichtet, und der Referenzstrahl wird insbesondere auf die Referenzzelle, oder spezifischer, durch die Referenzzelle auf den Referenzdetektor gerichtet. Die Probenzelle und/oder die Referenzzelle sind vorzugsweise temperaturstabilisiert. Der Subtrahierer kann ein analoger Subtrahierer sein.

**[0014]** Wahlweise umfasst das Verfahren vorzugsweise darüber hinaus den Schritt:  
c1) Modulieren der Polarisation des Referenzstrahls (6b).

**[0015]** Wahlweise wird Schritt c1) im Wesentlichen gleichzeitig mit Schritt c) durchgeführt.

**[0016]** Wahlweise ist die polarisationsabhängige Intensitätsveränderung auf eine Differenz in der Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht in der Probe oder in dem Analyten zurückzuführen.

**[0017]** Wahlweise wird ein Intensitätssignal aus dem Differenzsignal und dem Referenzsignal und/oder dem Probensignal berechnet.

**[0018]** Wahlweise umfasst das Verfahren das Verwenden des Intensitätssignals zum Skalieren der polarisationsabhängigen Intensitätsveränderung.

**[0019]** Mehr als einer der Schritte kann gleichzeitig durchgeführt werden. Vorzugsweise wird

Schritt c) vor Schritt d) durchgeführt.

**[0020]** Wahlweise wird der Laserstrahl in Impulsen mit einer Laserfolgefrequenz (d. h. Laserpulsfrequenz) erzeugt und wobei der Probenstrahl durch einen Modulator moduliert wird, der eine Veränderung der Polarisierung bewirkt, die gemäß einer Modulatorfrequenz periodisch oszilliert, wobei die Laserfolgefrequenz wahlweise gleich oder größer als die Modulatorfrequenz ist. Die Veränderung der Polarisierung (d. h. die optische Verzögerung), die der Modulator bei einem Strahl bewirkt, der diesen durchläuft, oszilliert mit der Modulatorfrequenz. Darin umfasst jede Periode der periodisch oszillierenden Veränderung der Polarisierung ein Maximum und ein Minimum (d. h. ein Maximum einer negativen Verzögerung) einer Veränderung der Polarisierung (d. h. bewirkte Verzögerung). Wahlweise umfassen die Maximalwerte und Minimalwerte eine links- bzw. rechtszirkuläre Polarisierung. Der Probenstrahl wird demnach durch einen Modulator moduliert, der in Modulationszyklen arbeitet, die eine periodisch oszillierende Veränderung der Polarisierung (d. h. optische Verzögerung) bewirken, wobei jeder Modulationszyklus ein Maximum und ein Minimum beinhaltet, wobei zumindest ein Impuls des Laserstrahls in jedem der Modulationszyklen erzeugt wird. Die Laserfolgefrequenz ist die Frequenz der Impulserzeugung durch die Laserlichtquelle. Wahlweise ist die Laserfolgefrequenz zumindest das Zweifache der Modulatorfrequenz. Somit kann ein Laserimpuls für jedes Minimum und jedes Maximum einer Veränderung der Polarisierung (d. h. Verzögerung), die durch den Modulator bewirkt wird, erzeugt werden. Wahlweise werden Impulse zu spezifischen Zeitpunkten während des Modulatorzyklus erzeugt, damit sie mit spezifizierten Veränderungen der Polarisierung (d. h. Verzögerungen) zusammenfallen. Wahlweise sind die spezifizierten Veränderungen der Polarisierung (d. h. Verzögerungen) die Maximum- und Minimumveränderung der Polarisierung (d. h. Verzögerung). Wahlweise entsprechen diese spezifizierten Veränderungen der Polarisierung (d. h. Verzögerungen) spezifischen resultierenden Polarisationszuständen, z. B. maximal links- und rechtszirkular polarisierten und/oder linear polarisierten Zuständen.

**[0021]** Wahlweise ist die Laserfolgefrequenz zumindest viermal höher als die Modulatorfrequenz. Wahlweise weist der Laser einen hohen Tastgrad (z. B.  $> 10\%$ ) auf, um ein hohes Signal bereitzustellen, insbesondere wenn er in Verbindung mit einem Lock-in-Verstärker verwendet wird. Der Wert der bewirkten Verzögerung definiert die Veränderung der Polarisierung des Laserstrahls.

**[0022]** Wahlweise werden das Referenzsignal und das Differenzsignal (auch als symmetrisches Signal bezeichnet) bei der Laserfolgefrequenz und/oder der Modulatorfrequenz erfasst. Die für die VCD-Messungen verwendeten Informationen sind insbesondere in der Modulatorfrequenzkomponente enthalten. Insbesondere enthält das Differenzsignal alle Informationen, die in dem Probensignal vorhanden sind, ohne dass das Rauschen vorhanden ist. Das Referenzsignal wird insbesondere erfasst, um als Versatz für das bei der Laserfrequenz erfasste Differenzsignal verwendet zu werden. Dadurch ist gewährleistet, dass das einzelne Kanalintensitätssignal korrekt gewonnen wird. Alternativ werden das Referenzsignal und das Differenzsignal bei einer entsprechenden Auflösung und Geschwindigkeit erfasst (und insbesondere digitalisiert), insbesondere wobei zumindest ein Abtastpunkt für jeden Laserimpuls erfasst wird, wobei vorzugsweise zumindest 3 oder zumindest 5 Abtastpunkte für jeden Laserimpuls erfasst werden. Wahlweise kann das Signal für einen Teil der Dauer eines Impulses oder die gesamte Dauer des Impulses gemittelt werden. Insbesondere wird ein VCD-Spektrum anhand der aufgezeichneten Impulse bestimmt, wobei die Modulatoramplitude, die Modulatorphase und/oder die durch den Modulator induzierte Verzögerung berücksichtigt werden. Wahlweise kann dies unter Verwendung eines Lock-in-Detektors oder digitaler Signalverarbeitung oder eines feldprogrammierbaren Gate-Arrays (FPGA) umgesetzt werden.

**[0023]** Wahlweise umfasst jede Periode der periodisch oszillierenden Veränderung der Polarisierung (d. h. optische Verzögerung), die durch den Modulator bewirkt wird, ein Maximum und ein Minimum einer bewirkten Veränderung der Polarisierung (d. h. Verzögerung), wobei die Impulse des Laserstrahls zu spezifischen Zeitpunkten während der periodischen Oszillation des Modulators (d. h. zu spezifischen Zeitpunkten während des Modulationszyklus) erzeugt werden. Wahlweise werden die spezifischen Zeitpunkte derart gewählt, dass sie mit dem Maximum und dem Minimum einer bewirkten Veränderung der Polarisierung zusammenfallen. Wahlweise werden die

spezifischen Zeitpunkte derart gewählt, dass sie mit einer bewirkten maximalzirkularen Polarisation und/oder einer bewirkten maximallinearen Polarisation zusammenfallen. Wahlweise wird ein Impuls des Laserstrahls für jedes Maximum einer bewirkten Verzögerung erzeugt und wird ein Impuls des Laserstrahls für jedes Minimum einer bewirkten Verzögerung erzeugt. Wahlweise wird die Laserfolgefrequenz mit der Modulatorfrequenz synchronisiert, so dass der Laser bei der zweiten Harmonischen der Modulatorfrequenz arbeitet. Eine zeitliche Verschiebung zwischen den Laserimpulsen und den Modulatorzyklen wird danach derart angepasst, dass die Laserimpulse durch den Modulator übertragen werden, wenn dessen Veränderung der Polarisation (d. h. Verzögerung) einem maximalzirkular polarisierten Licht entspricht. Dies ermöglicht die Verwendung der gesamten Laserleistung für jeden "perfekten" zirkularen Polarisationszustand (wobei sich "perfekt" auf einen Zustand der vollständig rechts- und linkszirkularen Polarisation bezieht). Darüber hinaus ist dieses Schema auch hilfreich, wenn keine 100%ige zirkulare Polarisation erreicht wird. Außerdem ist dieses Schema nützlich, wenn eine Anpassung der Modulatoramplitude vermieden werden sollte, die lineare Polarisation jedoch immer noch minimiert werden sollte. In diesem Fall wird die maximale Verzögerung (d. h. die Modulatoramplitude) derart eingestellt (ausreichend hoch), dass die zirkulare Polarisation für jede zu messende Wellenlänge erreicht wird. Dies bedeutet, dass die maximale Verzögerung bei einigen Wellenlängen bereits über die zirkulare Polarisation hinaus zurück zu einer linearen Polarisation in die andere Richtung verlaufen kann. In diesem Fall können die Impulse verschoben werden, so dass sie nicht mit dem Maximum und dem Minimum einer bewirkten Veränderung der Polarisation zusammenfallen, sondern mit einem Bruchteil (z. B. mehr als 50 %, aber weniger als 100 %) des Maximums und des Minimums zusammenfallen. Wahlweise wird das Referenzsignal bei dem Zweifachen der Modulatorfrequenz (d. h. bei einer Variante der Laserfolgefrequenz) erfasst und wird das Differenzsignal bei der Modulatorfrequenz und bei dem Zweifachen der Modulatorfrequenz erfasst. Dies ist vorteilhaft, da das Differenzsignal insbesondere die in dem Probenkanal vorhandenen Informationen beinhaltet, d. h. in diesem Fall das VCD-Signal, während das Referenzsignal nur bei der Laserfrequenz erfasst werden muss, da es insbesondere nur Informationen zu der Intensität des Lasers beinhaltet.

**[0024]** Wahlweise umfasst das Verfahren darüber hinaus den Schritt:

j) Übertragen des Referenzsignals und des Differenzsignals an eine Datenerfassungseinheit und Referenzieren des Referenzsignals und des Differenzsignals auf die Laserfolgefrequenz und/oder die Modulatorfrequenz. Das Referenzieren des Referenzsignals und des Differenzsignals auf die Laserfolgefrequenz und/oder die Modulatorfrequenz bezieht sich auf das Demodulieren des Referenzsignals und des Differenzsignals bei der Laserfolgefrequenz und/oder der Modulatorfrequenz. Wahlweise werden die Intensität des Probenstrahls und die Intensität des Referenzstrahls wiederholt gemessen und mit der Laserfolgefrequenz und/oder der Modulatorfrequenz synchronisiert.

**[0025]** Wahlweise umfasst das Verfahren vor dem Wechselwirkenlassen des Probenstrahls mit der Probe und vorzugsweise vor dem Modulieren des Probenstrahls das Verringern des Strahldurchmessers des Probenstrahls mit einem Teleskopsystem. Das Teleskopsystem umfasst wahlweise ein galiläisches Teleskop. Unter einem galiläischen Teleskop wird verstanden, dass das System eine Sammellinse (insbesondere Plankonvex-Linse oder eine Konvexkonvex-Linse) und eine Zerstreuungslinse (insbesondere eine Plankonkav-Linse) umfasst. Wahlweise wird der Strahldurchmesser des Probenstrahls auf weniger als 5 mm, ferner wahlweise auf weniger als 2 mm, ferner wahlweise auf weniger als 1 mm, (an dem Probedetektor) verringert. Der verringerte Strahl wird insbesondere zu einem geneigten spannungsoptischen Modulator gelenkt, wobei durch den verringerten Strahldurchmesser eine erfolgreiche Trennung des übertragenen und des reflektierten Strahls gewährleistet ist. Der reflektierte Strahl stammt aus Teilreflexionen auf den optischen Oberflächen des Modulators und durch seine Trennung können Interferenzstreifen vermieden werden.

**[0026]** Das Teleskopsystem ermöglicht es, das Vorhandensein von Interferenzstreifen auf dem Modulator zu verringern: Interferenzstreifen treten immer dann auf, wenn der Strahl an einer Oberfläche reflektiert wird und sich selbst interferiert. Macht man den Strahl schmaler und plat-

ziert man optische Elemente in einem Winkel, trifft die Reflexion in Bezug auf den einfallenden Strahl etwas versetzt auf. Wenn der Strahldurchmesser ausreichend klein gemacht wird, kann insbesondere eine Blende oder eine Rasierklinge derart platziert werden, dass sie zwar den reflektierten Strahl blockiert, der ursprüngliche Strahl jedoch ungehindert hindurchlaufen kann. Auf diese Weise wird eine Interferenz verhindert.

**[0027]** Wahlweise umfasst das Verfahren den Schritt:

k) Abschwächen des Probenstrahls und/oder des Referenzstrahls, so dass deren Intensitäten näher aneinander liegen und/oder so dass deren Intensitäten innerhalb eines dynamischen Bereichs eines Probedetektors, der die Intensität des Probenstrahls misst, und eines Referenzdetektors, der die Intensität des Referenzstrahls misst, liegen. Wahlweise werden der Probenstrahl und/oder der Referenzstrahl vor dem Wechselwirkenlassen mit der Probe/Referenz und/oder vor dem Modulator und/oder vor dem Teleskopsystem abgeschwächt. Wahlweise werden der Probenstrahl und/oder der Referenzstrahl derart abgeschwächt, dass ihre Intensitäten an dem jeweiligen Detektor näher aneinander liegen. Vorzugsweise werden der Probenstrahl und/oder der Referenzstrahl derart abgeschwächt, dass sich ihre Intensitäten an dem jeweiligen Detektor um weniger als 5 %, wahlweise um weniger als 3 %, der gesamten Laserleistung unterscheiden, wenn sie den jeweiligen Detektor erreichen. Eine kleinere Intensitätsdifferenz des Lasers wird bevorzugt. Vorzugsweise werden der Probenstrahl und/oder der Referenzstrahl durch reflektierende optische Elemente in ihren jeweiligen Strahlenwegen abgeschwächt. Die reflektierenden optischen Elemente können insbesondere mit Metall (z. B. Gold) gesputterte gekeilte (z. B.  $0,5^\circ$ ) Fenster (z. B.  $\text{BaF}_2$ ,  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{ZnSe}$ ,  $\text{ZnS}$ ) sein. Wahlweise ist die Abschwächung nicht über das gesamte Spektrum konstant. Vorzugsweise ist sie in Teilen des Spektrum, in denen die Probe eine schwache Absorption zeigt und/oder der Laser eine höhere Intensität aufweist, höher.

**[0028]** Wahlweise werden die oben erwähnten Schritte für weitere Wellenlängen wiederholt, um ein (VCD-)Spektrum des Analyten aufzuzeichnen. Insbesondere werden wahlweise die Schritte a) bis h) und wahlweise i), j) und/oder k) wiederholt, wobei der Laserstrahl bei weiteren Wellenlängen erzeugt wird, um ein Spektrum des Analyten aufzuzeichnen. Beispielsweise können Spektren durch Abstimmen des Lasers auf spezifische Wellenlängen oder in einem Sweep-Modus, z. B. zwischen  $1780$  und  $1550 \text{ cm}^{-1}$ , z. B. mit einer Abtastgeschwindigkeit von  $640 \text{ cm}^{-1}/\text{s}$ , erfasst werden, wobei die Laserwellenlänge über einen Bereich von Wellenlängen kontinuierlich abgestimmt wird. Wahlweise wird die Ansteuerspannung des Modulators (insbesondere ein EOM) während der Spektrumserfassung kontinuierlich angepasst (d. h., die Ansteuerspannung des Modulators wird gemäß der aktuellen Wellenlänge angepasst). Dadurch ist es möglich, den Modulator über den gesamten Spektrumsbereich in einem Zustand der konstanten (perfekten) Viertelwelle zu halten. Da die für den Modulator (insbesondere den EOM) nach jedem Spannungswechsel erforderliche Ausregelungszeit kurz ist, wird die Messzeit durch diesen Schritt nur marginal verlängert. Gleichzeitig kann der Einfluss von polarisationsabhängigen Artefakten verringert werden, da die Phasenverzögerung über den Wellenlängenbereich kontinuierlich angepasst wird. Wahlweise kann der Spannungswechsel gemäß einer ermittelten Beziehung zwischen Spannung, Wellenlänge und Verzögerung durchgeführt werden. Diese Beziehung kann auf Basis theoretischer Überlegungen oder durch eine experimentelle Charakterisierung des Modulators bestimmt werden.

**[0029]** Wahlweise wird die Modulation der Polarisation des Probenstrahls derart angepasst, dass eine spezifische Modulation der Polarisation erzielt wird, vorzugsweise für jede Wellenlänge innerhalb des Spektrums.

**[0030]** Unter erneuter Bezugnahme auf die Vorrichtung wird bevorzugt, dass die Vorrichtung eine Zurückgewinnungseinheit umfasst, die so konfiguriert ist, dass sie eine probenstrahlpolarisationsabhängige Intensitätsveränderung aus dem Differenzsignal zurückgewinnt.

**[0031]** Wahlweise umfasst die Vorrichtung einen Probenstrahlabschwächer zum Abschwächen des Probenstrahls und einen Referenzstrahlabschwächer zum Abschwächen des Referenzstrahls, insbesondere derart, dass der jeweilige Strahl innerhalb eines dynamischen Bereichs des jeweiligen Detektors liegt, wobei der Probenstrahlabschwächer und der Referenzstrahlabschwä-

cher wahlweise reflektierende Abschwächer sind. Wahlweise kann ein zusätzlicher Abschwächer zwischen dem Laser und dem Strahlenteiler eingefügt werden.

**[0032]** Wahlweise umfasst die Vorrichtung ein Teleskopsystem in einem Strahlengang des Probenstrahls vor der Probenzelle zum Verringern eines Strahldurchmessers des Probenstrahls, wobei das Teleskopsystem wahlweise ein galiläisches Teleskop umfasst.

**[0033]** Wahlweise sind die Probenzelle und die Referenzzelle durch eine Übertragungszelle mit zwei Wegen bereitgestellt.

**[0034]** Wahlweise entspricht eine Weglänge des Probenstrahls in der Probenzelle einer Weglänge des Referenzstrahls in der Referenzzelle. Wahlweise unterscheidet sich eine Weglänge des Probenstrahls in der Probenzelle um weniger als 2 % von einer Weglänge des Referenzstrahls in der Referenzzelle.

**[0035]** Wahlweise sind eine Probenstrahlfokussierlinse zum Fokussieren des Probenstrahls durch den Modulator und durch die Probenzelle auf den Probendetektor und Referenzstrahlfokussierlinse zum Fokussieren des Referenzstrahls durch die Referenzzelle auf den Referenzdetektor bereitgestellt.

**[0036]** Wahlweise umfasst der Modulator einen spannungsoptischen Modulator (PEM). Wahlweise kann der PEM ZnSe umfassen.

**[0037]** Wahlweise ist der Modulator in dem Strahlengang des Probenstrahls angeordnet, der in einer Neigung zu einer Ebene normal zu einem optischen Strahlenweg des Probenstrahls platziert ist, vorzugsweise um zwischen  $5^\circ$  und  $20^\circ$ , insbesondere  $15^\circ$ , relativ zu der normalen Ebene geneigt. Der Modulator ist um zwischen  $5^\circ$  und  $20^\circ$ , insbesondere  $15^\circ$ , entlang der vertikalen Achse geneigt. Wahlweise ist der Modulator um seine optische Achse geneigt, die  $45^\circ$  zu der Vertikalen ausgerichtet ist. (Bei der vorliegenden Offenbarung wird insbesondere davon ausgegangen, dass die lineare Polarisierung des Probenstrahls vertikal ist. Diese Wahl wurde willkürlich getroffen und Veränderungen auf eine andere Ausrichtung der Polarisierung, die bei dem optischen Aufbau erforderlich ist, sind einfach.) Dadurch ist eine Trennung des reflektierten (d. h. Referenz-)Strahls möglich, wodurch Interferenzeffekte bei der Modulationsfrequenz verringert werden. Der reflektierte Strahl kann danach durch eine Blockade oder eine Blende blockiert werden.

**[0038]** Wahlweise umfasst der Modulator einen elektrooptischen Modulator (EOM). Vorzugsweise ist der EOM orthogonal zu dem Laserstrahl angeordnet. Wahlweise wird dieser EOM bei Frequenzen betrieben, die zumindest eine Größenordnung höher als die in der Regel verwendeten PEM-Modulatorfrequenzen sind. Dadurch ist es möglich, die Abtastrate zu erhöhen (und somit das Rauschen aufgrund des 1/Frequenz-Vorteils zu verringern), während gleichzeitig Wechselwirkungen zwischen der Abtastrate und der Modulatorfrequenz vermieden werden. Dies erhöht die Spektren pro Zeitauflösung. Die Ausregelungszeit nach Veränderungen der Spannung (d. h. Modulationstiefe/Amplitude) ist bei EOMs signifikant kürzer als bei PEMs. Dadurch ist es möglich, die Modulationstiefe über die Wellenlänge anzupassen, ohne dabei die Messzeit zu erhöhen.

**[0039]** Wahlweise ist eine optische Achse des Modulators (d. h. bei einem spannungsoptischen Modulator die Spannungsachse)  $45^\circ$  zu einer intrinsisch linearen Polarisierung der Laserlichtquelle ausgerichtet.

**[0040]** Wahlweise ist eine Steuereinheit bereitgestellt, die eine Datenerfassungseinheit umfasst, die mit dem Subtrahierer verbunden ist, die mit dem Modulator verbunden ist und die mit einem Wellenformgenerator verbunden ist, wobei der Wellenformgenerator mit einem Lasertreiber der Laserlichtquelle verbunden ist. Alternativ kann die Datenerfassungseinheit (direkt) mit dem Lasertreiber verbunden sein, anstatt mit einem Wellenformgenerator verbunden zu sein. Wahlweise ist die Steuereinheit so konfiguriert, dass sie das Verfahren gemäß einer beliebigen der in dieser Offenbarung beschriebenen Varianten durchführt. Die Datenerfassungseinheit kann einen Lock-in-Verstärker und/oder einen Hochgeschwindigkeits-Analog-zu-Digital-Wandler und/oder ein Analog-Abtast-Halte-Glied umfassen. Die Datenerfassungseinheit kann auf die Modulatorfrequenz



und/oder die Laserfolgefrequenz referenziert werden. Dies kann entweder direkt über den Modulator bzw. den Lasertreiber oder indirekt unter Verwendung des Wellenformgenerators erfolgen. Bei einer Ausführungsform (einer "freilaufenden" Ausführungsform) wird der Laser nicht auf den Modulator referenziert. Bei einer weiteren Ausführungsform (der "referenzierten" Laserkonfiguration) wird der Laser auf den Modulator referenziert, z. B. unter Verwendung eines Wellenformgenerators, der auf den Modulator referenziert ist. Danach steuert der Wellenformgenerator die Laserimpulse gemäß einem Impulsschema, z. B. so dass die Laserimpulse an den Punkten der maximalen Amplitude (d. h. Maximal- und Minimumverzögerung) durch den Modulator laufen. In dieser Offenbarung bezieht sich "Referenz" insbesondere auf die Synchronisation des Wellenformgenerators und des Modulators, wobei die Phase und Frequenz zwischen den beiden konstant gehalten wird. Dies kann z. B. durch ein Signal auf Transistor-Transistor-Logik-Pegel (TTL-Pegel) realisiert werden, das in die Phasenregelschleife des Wellenformgenerators eingespeist wird. Wahlweise kann dies dadurch realisiert werden, dass sowohl der Laser als auch der Modulator mit dem Wellenformgenerator gesteuert werden. Die zeitliche Verschiebung des Wellenformgenerators kann so eingestellt werden, dass die Impulse den Maximalwerten/Minimalwerten des sinusförmigen Modulationszyklus oder einer anderen definierten Verzögerung entsprechen. Ein Detektormodul kann den Probedetektor, den Referenzdetektor und den Subtrahierer umfassen. Das Differenzsignal und/oder das Referenzsignal können aus dem Detektormodul unter Referenz auf die Laserfolgefrequenz und die Modulatorfrequenz ausgelesen werden. Wahlweise umfasst die Steuereinheit die Zurückgewinneinheit.

**[0041]** Wahlweise ist die Steuereinheit so konfiguriert, dass die Datenerfassungseinheit Daten aus dem Subtrahierer und/oder dem Referenzdetektor und/oder dem Probedetektor unter Synchronisation mit einer Laserfolgefrequenz der Laserlichtquelle und/oder mit einer Modulatorfrequenz des Modulators (und insbesondere unter Synchronisation mit sowohl der Laserfolgefrequenz als auch der Modulatorfrequenz) erfasst.

**[0042]** Wahlweise ist der Modulator mit dem Wellenformgenerator verbunden und ist die Steuereinheit ferner so konfiguriert, dass der Wellenformgenerator die Laserlichtquelle in Abhängigkeit von einem Zustand des Modulators zum Aussenden von Laserimpulsen steuert. Auf diese Weise kann die Laserlichtquelle zum Aussenden der Laserimpulse gesteuert werden, so dass diese den Modulator während eines bestimmten Modulationszustands, z. B. bei maximaler Amplitude, durchlaufen.

**[0043]** Das VCD-Spektrum ist als die Differenz einer Absorption für linkszirkular (LHC) und rechtszirkular (RHC) polarisiertes Licht definiert (siehe: Nafie, L. A. *Vibrational Optical Activity*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2011). Für den vorliegenden Aufbau werden insbesondere die nachstehenden Schritte zur Bestimmung des VCD-Spektrums durchgeführt:

- Die Probenzelle und die Referenzzelle werden mit dem Lösungsmittel gefüllt.
- Das Referenzsignal wird bei der Laserfrequenz erfasst (als "einzelner Referenzkanal" bezeichnet)
- Das Differenzsignal wird bei der Laserfrequenz und der Modulatorfrequenz erfasst.
- Die Probenzelle wird mit der Probe (d. h. dem Lösungsmittel und dem Analyten) gefüllt
- Das Differenzsignal wird bei der Laserfrequenz und der Modulatorfrequenz erfasst.
- Die Berechnungen sehen wie folgt aus:
  - Das bei der Modulatorfrequenz erfasste Differenzsignal wird durch die Summe des bei der Laserfolgefrequenz und dem einzelnen Referenzkanal erfassten Differenzsignals dividiert.
  - Dies wird sowohl für das Lösungsmittel als auch die Probe durchgeführt.
  - Danach wird das Ergebnis für das Lösungsmittel von dem Ergebnis der Probe subtrahiert, wobei die VCD-Spektren der Probe erhalten werden.
  - Wahlweise können einige Korrekturen durchgeführt werden, um ein genaueres VCD-Spektrum zu erzielen:
    - "Enantiomere Korrektur": Zwei Enantiomere werden gemessen (nacheinander). Eine Basislinienkorrektur wird als Mittelwert der Enantiomeren-VCD-Spektren berechnet, anstatt das Lösungsmittel zu verwenden.

- "Racemische Korrektur": Basislinienkorrektur unter Verwendung eines VCD-Spektrums eines racemischen Gemischs des Probenmoleküls

**[0044]** Im Folgenden wird die Offenbarung unter Bezugnahme auf die Figuren weiter erläutert, die vorteilhafte Ausführungsformen und Varianten zeigen und in keinster Weise als die Erfindung einschränkend auszulegen sind:

- [0045]** Fig. 1 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der Vorrichtung zur Zirkulardichroismusanalyse eines Analyten schematisch.
- [0046]** Fig. 2A zeigt ein Beispiel für eine Steuereinheit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung schematisch.
- [0047]** Fig. 2B zeigt ein weiteres Beispiel für eine Steuereinheit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung schematisch.
- [0048]** Fig. 3 zeigt ein VCD-Spektrum, das von der Vorrichtung von Fig. 1 erfasst wurde, und einen Vergleich der Rauschpegel gemäß dem Stand der Technik und gemäß der vorliegenden Erfindung.
- [0049]** Fig. 4 zeigt die Ergebnisse von Langzeitmessungen gemäß dem Stand der Technik und gemäß der vorliegenden Erfindung.
- [0050]** Fig. 5 veranschaulicht eine Anpassung der Ansteuerspannung des Modulators in Abhängigkeit von der Wellenlänge.
- [0051]** Fig. 6A zeigt das Probensignal, das Referenzsignal und das Differenzsignal, die bei der Laserfolgefrequenz demoduliert wurden.
- [0052]** Fig. 6B zeigt das Probensignal von Fig. 6A vergrößert.
- [0053]** Fig. 6C zeigt das Probensignal und das Differenzsignal, die bei der Modulatorfrequenz demoduliert wurden.
- [0054]** Fig. 7A zeigt Spektren, die bei der Laserfrequenz aus dem Differenzsignal für das Lösungsmittel und den Analyten erfasst wurden.
- [0055]** Fig. 7B zeigt Spektren für das Lösungsmittel und den Analyten nach der Versatzkorrektur.
- [0056]** Fig. 7C zeigt die klassischen Absorbanzspektren des Analyten.
- [0057]** Fig. 8A zeigt Spektren, die aus dem bei der Modulatorfrequenz demodulierten Differenzsignal für das Lösungsmittel und den Analyten erfasst wurden.
- [0058]** Fig. 8B zeigt Roh-VCD-Spektren für den Analyten und das Lösungsmittel.
- [0059]** Fig. 8C zeigt lösungsmittelkorrigierte VCD-Spektren des Analyten.
- [0060]** Fig. 9 zeigt Abbildungen der bei der Laserfrequenz erfassten Intensität und der bei der Modulatorfrequenz erfassten Differenz in der Absorbanz für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht.
- [0061]** Fig. 10A zeigt eine Abbildung einer "freilaufenden" Konfiguration.
- [0062]** Fig. 10B zeigt eine Abbildung einer "referenzierten" Laserkonfiguration.
- [0063]** Fig. 11 zeigt einen Ablaufplan, der einen beispielhaften Arbeitsablauf für eine VCD-Messung mit einem beispielhaften Aufbau, z. B. wie in Fig. 1 gezeigt, darstellt.

**[0064]** Fig. 1 zeigt schematisch eine bevorzugte Ausführungsform der Vorrichtung 1 zur Zirkulardichroismusanalyse eines Analyten. Die Vorrichtung 1 umfasst eine Laserlichtquelle 2 zum Bereitstellen eines Laserstrahls 3. Vorzugsweise ist die Laserlichtquelle 2 ein abstimmbarer Halbleiterlaser. Der Laserstrahl 3 wird über einen Spiegel 4 auf einen Strahlenteiler 5, insbesondere einen 50/50-Strahlenteiler, gelenkt. Der Strahlenteiler 5 teilt den Laserstrahl 3 in einen Proben-

strahl 6a (in diesem Fall den an dem Strahlenteiler 5 übertragenen Strahl) und einen Referenzstrahl 6b (in diesem Fall den an dem Strahlenteiler 5 reflektierten Strahl). Der Probenstrahl 6a wird an einem weiteren Spiegel 7 reflektiert. In dem Strahlengang des Probenstrahls 6a ist ein Probenstrahlabschwächer 8a zum Abschwächen des Probenstrahls 6a bereitgestellt, und in einem Strahlengang des Referenzstrahls 6b ist ein Referenzstrahlabschwächer 8b bereitgestellt. Die Abschwächer 8a, 8b werden verwendet, um die Intensitäten beider Strahlen 6a, 6b derart anzupassen, dass sie ähnlich sind und innerhalb eines dynamischen Bereichs ihrer Detektoren liegen.

**[0065]** In dem Strahlengang des Probenstrahls 6a ist ein Teleskopsystem 10 zum Verringern eines Strahldurchmessers des Probenstrahls 6a bereitgestellt, insbesondere zum Verringern des Probenstrahldurchmessers auf unter 1 mm. Das Teleskopsystem 10 umfasst ein galiläisches Teleskop mit einer Sammellinse 10a und einer Zerstreuungslinse 10b. Ein Modulator 11 zum Modulieren der Polarisation des Probenstrahls 6a ist bereitgestellt. Der Modulator 11 ist so angeordnet, dass seine optische Achse  $45^\circ$  zu einer intrinsisch linearen Polarisation der Laserlichtquelle 2 ausgerichtet ist.

**[0066]** Die Einfügung A von Fig. 1 zeigt zwei bevorzugte Ausführungsformen des Modulators 11. Gemäß Ausführungsform I umfasst der Modulator 11 einen PEM 12. Der PEM 12 ist in dem Strahlengang des Probenstrahls 6a angeordnet, wobei er um  $15^\circ$  zu einer Ebene orthogonal zu dem Probenstrahl 6a geneigt ist. Dadurch ist es möglich, den reflektierten Strahl abzutrennen, wodurch der Einfluss von Interferenzeffekten verringert wird. Der reflektierte Strahl kann danach durch eine Blockade oder eine Blende blockiert werden. Gemäß einer rechts dargestellten Ausführungsform II umfasst der Modulator 11 einen EOM 13. Der EOM 13 ist orthogonal zu dem Probenstrahl 6a angeordnet.

**[0067]** Nach dem Modulator 11 ist eine Probenzelle 14a bereitgestellt, um den Probenstrahl 6a mit einer einen Analyten umfassenden Probe wechselwirken zu lassen. Darüber hinaus ist eine Referenzzelle 14b bereitgestellt, um den Referenzstrahl 6b mit einer Referenz wechselwirken zu lassen. Die Probenzelle 14a und die Referenzzelle 14b sind durch eine Übertragungszelle 15 mit zwei Wegen bereitgestellt. Eine Weglänge des Probenstrahls 6a in der Probenzelle 14a entspricht einer Weglänge des Referenzstrahls 6b in der Referenzzelle 14b.

**[0068]** Ein Probendetektor 15a detektiert den Probenstrahl 6a nach der Wechselwirkung mit der Probe in der Probenzelle 14a, um ein Probenstrahlsignal zu erhalten, das einer Intensität des Probenstrahls 6a entspricht. Ein Referenzdetektor 15b detektiert den Referenzstrahl 6b nach der Wechselwirkung mit der Referenz in der Referenzzelle 14b, um ein Referenzstrahlsignal zu erhalten, das einer Intensität des Referenzstrahls 6b entspricht. Ein Subtrahierer 16 bildet ein Differenzsignal des Probensignals und des Referenzsignals. Ein symmetrisches Modul 17 umfasst den Probendetektor 15a, den Referenzdetektor 15b und den Subtrahierer 16.

**[0069]** Eine Probenstrahlfokussierlinse 9a ist in dem Strahlengang des Probenstrahls 6a zwischen dem Teleskopsystem 10 und dem Modulator 11 bereitgestellt und fokussiert den Probenstrahl 6a durch den Modulator 11 und die Probenzelle 14a an dem Probendetektor 15. Eine Referenzstrahlfokussierlinse 9b ist in dem Strahlengang des Referenzstrahls 6b zwischen dem Referenzstrahlabschwächer 8b und der Referenzzelle 14b bereitgestellt und fokussiert den Referenzstrahl 6b durch die Referenzzelle 14b an dem Referenzdetektor 15b.

**[0070]** Die Vorrichtung 1 umfasst eine Steuereinheit. Zwei Ausführungsbeispiele der Steuereinheit (oder des elektronischen Aufbaus und der Verbindungen der Vorrichtung 1) sind in Fig. 2A bzw. in Fig. 2B gezeigt. Diese können jeweils in Verbindung mit der Ausführungsform von Fig. 1 verwendet werden.

**[0071]** Bei den beiden Ausführungsformen umfasst die Steuereinheit eine Datenerfassungseinheit 18, die mit dem symmetrischen Modul 17, dem Modulator 11 und einem Wellenformgenerator 19 verbunden ist, der wiederum mit einem Lasertreiber 20 der Laserlichtquelle 2 verbunden ist. Alternativ kann die Datenerfassungseinheit 18 direkt mit dem Lasertreiber 20 verbunden sein. Der Lasertreiber 20 steuert ein Pulsschema der Laserlichtquelle 2. Die Datenerfassungseinheit

18 kann ein Lock-in-Verstärker, ein Hochgeschwindigkeits-Analog-zu-Digital-Wandler oder ein Analog- Abtast-Halte-Glied sein.

**[0072]** Bei der in Fig. 2A gezeigten Ausführungsform (die auch als "freilaufende" Laserkonfiguration bezeichnet wird) wird die Datenerfassungseinheit 18 auf eine Modulatorfrequenz und eine Laserfolgefrequenz referenziert. Die Datenerfassungseinheit 18 erfasst demnach Daten aus dem symmetrischen Modul 17, insbesondere aus dem Subtrahierer 16 und dem Referenzdetektor 15b, unter Synchronisation mit einer Laserfolgefrequenz der Laserlichtquelle 2 und unter Synchronisation mit einer Modulatorfrequenz des Modulators 11. Die Datenerfassungseinheit 18 kann demnach Daten für jeden Laserimpuls der Laserlichtquelle 2 und für jeden Modulationszyklus des Modulators 11 aus dem symmetrischen Modul 17 erfassen. Bei dieser Ausführungsform wird der Laser nicht auf den Modulator referenziert. Vorzugsweise ist die Laserfolgefrequenz höher als die Modulatorfrequenz.

**[0073]** Bei der in Fig. 2B gezeigten Ausführungsform (die auch als "referenzierte" Laserkonfiguration bezeichnet wird) ist der Wellenformgenerator 19 mit dem Modulator 11 verbunden und wird der Wellenformgenerator 19 (und somit das Pulsschema der Laserlichtquelle 2) auf den Modulator 11 referenziert. Der Wellenformgenerator 19 wird demnach durch den Modulator 11 gesteuert oder empfängt Steuersignale von dem Modulator 11, so dass der Wellenformgenerator 19 das Pulsschema gemäß der Modulatorfrequenz steuern kann. Der Wellenformgenerator 19 steuert sodann die Laserimpulse gemäß dem in der Einfügung I von Fig. 2B gezeigten Pulsschema. Die zeitliche Verschiebung des Wellenformgenerators 19 wird derart eingestellt, dass die Laserimpulse (als Linien 21 gezeigt) den Maximalwerten und den Minimalwerten des sinusförmigen Modulationszyklus (als Linie 22 gezeigt) entsprechen. Die Laserfolgefrequenz ist demnach das Zweifache der Modulationsfrequenz. Wie bei der Ausführungsform von Fig. 2A erfasst die Datenerfassungseinheit 18 das Differenzsignal und das Referenzsignal aus dem symmetrischen Modul 17 unter Referenzierung auf die Laserfolgefrequenz und die Modulatorfrequenz.

**[0074]** Für die Messung der VCD-Spektren wird zunächst ein Referenzspektrum erfasst, wobei die beiden Zellen 14a, 14b mit dem Lösungsmittel gefüllt sind (d. h., das Lösungsmittel wird als Probe und als Referenz verwendet). Danach wird ein Hintergrundspektrum erfasst, wobei wiederum die beiden Zellen 14a, 14b mit dem Lösungsmittel gefüllt sind (d. h., das Lösungsmittel wird als Probe und als Referenz verwendet). Danach wird die Probenzelle 14a mit dem Analyten gefüllt und wird das Analytenspektrum erfasst. Das Referenzspektrum bei der Laserfolgefrequenz wird zu den Spektren des symmetrischen Kanals sowohl des Lösungsmittels als auch des Analyten addiert. Danach werden die jeweiligen VCD-Spektren für das Lösungsmittel und den Analyten berechnet, indem das Spektrum bei der Modulatorfrequenz durch das Spektrum bei der Laserfolgefrequenz dividiert wird. Die entstehenden VCD-Spektren des Lösungsmittels werden danach von den VCD-Spektren des Analyten subtrahiert, wobei die basislinienkorrigierten VCD-Spektren des Analyten erhalten werden.

**[0075]** Fig. 3 zeigt typische VCD-Spektren, die mit dem in Fig. 1 gezeigten Aufbau erfasst werden, wobei ein PEM 12 als Modulator 11 verwendet wird, der mit 42 kHz und in der in Zusammenhang mit Fig. 2A beschriebenen "freilaufenden" Laserkonfiguration betrieben wird. Das untere Spektrum, das für einen symmetrischen Betrieb mit "B" bezeichnet ist, entspricht 0,1 mol S-1,1'-Bi-2-naphthol (S-BINOL) (d. h. dem Analyten), das in  $\text{CHCl}_3$  (d. h. dem Lösungsmittel) gelöst ist, erfasst für 4:50 min (Durchschnittswert aus 700 Abtastungen) und mit einer Weglänge der Probenzelle 14a bzw. der Referenzzelle 14b von 160  $\mu\text{m}$ . Die Probe umfasste demnach den Analyten und das Lösungsmittel, die Referenz umfasste hingegen nur das Lösungsmittel und nicht den Analyten. Die entsprechenden Rauschpegel sind versetzt und oben dargestellt. "S" bezeichnet den Rauschpegel für  $\text{CHCl}_3$  in der Zelle mit einer Weglänge von 160  $\mu\text{m}$  für einen Durchschnitt von 700 Abtastungen, wobei nur das Probensignal erfasst wurde. Dies ist mit einem klassischen Quanten-Kaskaden-Laser-Messaufbau vergleichbar. "B" bezeichnet den Rauschpegel für  $\text{CHCl}_3$  in der Zelle mit einer Weglänge von 160  $\mu\text{m}$  für einen Durchschnitt von 700 Abtastungen, der gemäß der vorliegenden Erfindung erfasst wurde. Es liegen eine Verringerung des Rauschens um einen Faktor 3,5 und geringere Schwankungen zwischen verschiedenen Wiederholungen vor. Im Vergleich zu der Literatur ist der Room-Mean-Square-Fehler (RMS-Fehler) um

einen Faktor 4 (bei 1/6 der Messzeit) besser. Der Rauschpegelhöhe, also die maximale Abweichung von der 0-Linie, ist um einen Faktor 13 (bei 1/6 der Messzeit) besser.

**[0076]** In der Literatur (United States Pharmacopeia und National Formulary (USP 41-NF36)) betrug der Signalrauschpegel  $5 \times 10^{-5}$  (bei 60 Minuten), während sich der Signalrauschpegel bei der vorliegenden Erfindung auf  $3,8 \times 10^{-6}$  (bei 10 Minuten) belief. Ferner betrug der RMS-Fehler der Basislinie in der Literatur (M. Bonmarin und J. Helbing, Opt. Lett., 2008, 33, 2086)  $8 \times 10^{-6}$  (bei 60 Minuten), während sich der RMS-Fehler der Basislinie bei der vorliegenden Erfindung auf  $1,9 \times 10^{-6}$  (bei 10 Minuten) belief.

**[0077]** In Figur 4 sind die Ergebnisse für Langzeitmessungen gezeigt. Sowohl für den "klassischen" Aufbau, der einen einzelnen Detektor („S“) beinhaltet, als auch für den "symmetrischen" Aufbau gemäß der vorliegenden Erfindung, bei dem zwei übereinstimmende MCT-Detektoren („B“) verwendet werden, wurden 100 % der Linien von  $\text{CHCl}_3$  in den 160- $\mu\text{m}$ -Zelle 5-mal für Durchschnittswerte von bis zu 1500 Abtastungen (10 Minuten) erfasst. Für jedes Spektrum wurden der Root-Mean-Square-Fehler (RMS-Fehler) und die maximale Abweichung von 0 für die Spektren in dem Spektrumsbereich zwischen 1730 und 1600  $\text{cm}^{-1}$  berechnet. Die Abweichung ist eine Gütezahl, die VCD-Spektren gemäß dem US-Arzneibuch (The United States Pharmacopeia. The National Formulary) charakterisiert. Die gezeigte Kurve vergleicht die Leistung von S und B als Durchschnitt aus den 5 Messungen, wobei Fehlerbalken die Standardabweichung darstellen. Die obere Graphik zeigt das RMS-Rauschen relativ zu den gemittelten Abtastungen/der Messzeit und in der unteren Graphik ist die Abweichung von 0 gegen die gemittelten Abtastungen/die Messzeit aufgetragen.

**[0078]** Fig. 5 veranschaulicht eine Anpassung der Ansteuerspannung des Modulators 11 in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Zirkular polarisiertes Licht wird durch eine  $\lambda/4$ -Verzögerung erzielt. Bei einer einzelnen definierten Modulatoransteuerspannung wird eine exakte  $\lambda/4$ -Verzögerung jedoch nur bei einer einzigen Wellenlänge erzielt. Dies würde jedoch für die restlichen Wellenlängen zu einer elliptischen Polarisierung führen, wenn ein Spektrum aufgezeichnet wird. QCLs senden monochromatisches Licht aus, dessen Wellenlänge zeitabhängig ist. Die Verzögerung, die der Modulator 11 bei dem Probenstrahl 6a bewirkt, ist zu der Ansteuerspannung des Modulators 11 proportional. Es wird bevorzugt, dass eine Ansteuerspannung des Modulators 11 während der Spektrumserfassung angepasst wird (d. h., die Ansteuerspannung des Modulators 11 wird gemäß der aktuellen Wellenlänge angepasst). Dadurch ist es möglich, den Modulator 11 über den gesamten Spektrumsbereich in einem Zustand der konstanten (perfekten) Viertelwelle der Verzögerung des Probenstrahls 6a zu halten. Fig. 5 zeigt die bewirkte Verzögerung mit und ohne diese Korrektur sowie die Ansteuerspannung.

**[0079]** Beispielhafte Spektren und der Ansatz, mit dem diese erhalten werden, sind im Folgenden beschrieben.

#### FUNKTIONSPRINZIP:

**[0080]** Ein symmetrisches Detektionsmodul (das den Probendetektor 15a, den Referenzdetektor 15b und den Subtrahierer 16 umfasst) gibt die Spannung sowohl aus dem Referenzdetektor 15b als auch aus dem Probendetektor 15a (bzw. die invertierte Spannung aus dem Probendetektor 15a) aus. Außerdem gibt das symmetrische Detektionsmodul auch das Differenzsignal zwischen den beiden aus, was als symmetrischer Kanal bezeichnet wird. Diese Spannung beinhaltet die Informationen zu der klassischen Absorbanz des Analyten bei der Laserfolgefrequenz und die Informationen zu den Differenzen in der zirkularen Absorbanz bei der Modulatorfrequenz. Die erhaltenden Spektren sind in den FIG. 6A bis 6C gezeigt.

**[0081]** Insbesondere zeigt Fig. 6A das Referenzsignal, das Probensignal (durch die bestimmte elektronische Konfiguration invertiert) und den symmetrischen Kanal (d. h. das Differenzsignal). Fig. 6B zeigt den symmetrischen Kanal von Fig. 6A vergrößert. Man beachte die Einheit der Spannung in Fig. 6B im Vergleich zu Fig. 6A. Die Fig. 6A und 6B sind bei der Laserfolgefrequenz demoduliert. Fig. 6C zeigt die VCD-Spektren, die bei der Modulatorfrequenz für das Probensignal und den symmetrischen Kanal erfasst wurden.

**LOCK-IN-VERSTÄRKER ALS DATENERFASSUNG:**

**[0082]** Um die klassische Absorbanz zu berechnen, werden die Intensität der Hintergrunds und die Intensität des Analyten bei der Laserfrequenz erfasst (Gleichung 1):

$$\text{Absorbanz} = -\log\left(\frac{I_{\text{Analyt}}}{I_{\text{Lösungsmittel}}}\right)$$

**[0083]** Da die bei der Laserfrequenz für den symmetrischen Kanal erfasste Spannung nur die Differenz in der Intensität enthält, sollte sie mit einem Versatz angepasst werden. Dieser Versatz ist die bei der Laserfrequenz für das Referenzsignal erfasste Spannung (Fig. 6A), die einmal erfasst wird und zu jedem symmetrischen Ausgang addiert wird, wobei sowohl in der Probenzelle 14a als auch in der Referenzzelle 14b nur das Lösungsmittel vorhanden ist (Gleichung 2):

$$\text{Absorbanz} = -\log\left(\frac{I_{\text{Symmetrie,Analyt}}^{\text{Laser}} + I_{\text{Referenz}}^{\text{Laser}}}{I_{\text{Symmetrie,Lösungsmittel}}^{\text{Laser}} + I_{\text{Referenz}}^{\text{Laser}}}\right)$$

**[0084]** Diese Gleichung ist in den Fig. 7A bis 7C visuell dargestellt, wobei die bei der Laserfrequenz erfassten Spektren in Fig. 7A gezeigt sind, die versatzkorrigierten Lösungsmittel- und Analytenspektren in Fig. 7B gezeigt sind und die berechnete Absorbanz des Analyten in Fig. 7C gezeigt ist.

**[0085]** Insbesondere zeigt Fig. 7A die Spektren, die bei der Laserfrequenz aus dem symmetrischen Kanal für das Lösungsmittel und den Analyten erfasst wurden. Der bei der Laserfrequenz erfasste Referenzkanal ist ebenfalls gezeigt, da dieser als Versatz für die Spektren des symmetrischen Kanals verwendet wird. Fig. 7B zeigt die Spektren für das Lösungsmittel und den Analyten nach der Versatzkorrektur. Fig. 7C zeigt die klassischen Absorbanzspektren des Analyten, die anhand der Spektren in Fig. 7B gemäß  $-\log_{10}(\text{Analyt}/\text{Lösungsmittel})$  berechnet wurden.

**[0086]** Für die VCD-Spektren ist die allgemeine Gleichung wie folgt (Gleichung 3):

$$\text{VCD} = \text{Abs}_l - \text{Abs}_r \approx \frac{1}{2 * J_1[\alpha_M^0(\bar{\nu})] * 1.1513} * \left( \frac{I_{AC}^{\text{Analyt}}}{I_{DC}^{\text{Analyt}}} - \frac{I_{AC}^{\text{Lösungsmittel}}}{I_{DC}^{\text{Lösungsmittel}}} \right)$$

wobei  $\text{Abs}_l$  und  $\text{Abs}_r$  der Absorbanz für links- bzw. rechtszirkular polarisiertes Licht entsprechen. Bei der Messung des VCD mit einem Modulator 11 kann dieser zu der rechten Gleichung transformiert werden, wobei  $I_{AC}$  dem bei der Frequenz des Modulators (z. B. PEM) demodulierten Signal entspricht und  $I_{DC}$  der klassischen IR-Intensität entspricht und  $J_1[\alpha_M^0(\bar{\nu})]$  der Bessel-Funktion der ersten Ordnung der Modulatorverzögerung bei jeder Wellenzahl  $\bar{\nu}$  entspricht. Diese Transformation kann aufgrund eines kleinen VCD-bedingten Signals durchgeführt werden, wodurch es sich als zweckmäßig erweist, den in normalen Absorbanzmessungen vorhandenen Logarithmus durch Divisionen zu ersetzen (dies trifft zu, wenn die VCD-Intensität unter 10 % im Vergleich zu der Absorbanz liegt).

**[0087]** Während im Allgemeinen nichtchirale Lösungsmittel gewählt werden, kann sich das VCD-Spektrum des Lösungsmittels immer noch von 0 unterscheiden. Dies ist auf die Doppelbrechung zurückzuführen, die in dem optischen Aufbau auftritt und in den Linsen, den Fenstern des Detektors und den Zellen und in jedem anderen optischen Element nach dem Modulator vorhanden sein kann. Durch Subtraktion der Lösungsmittel-VCD-Spektren wird der Einfluss dieser Artefakte beseitigt. Manchmal können Absorbanzartefakte, die sich aus der Probe selbst ergeben, das VCD-Spektrum verzerren, wobei in diesem Fall eine Basislinienkorrektur durch Subtrahieren der für das Racemat oder das andere Enantiomer gemessenen Spektren durchgeführt werden kann.

**[0088]** Bei diesem beispielhaften Aufbau entspricht  $I_{AC}$  der Intensität, die aus dem Symmetriekanal erfasst und bei der Modulatorfrequenz demoduliert wurde. Da  $I_{DC}$  der klassischen IR-Intensität entspricht, kann sie bei diesem Aufbau als der symmetrische Kanal definiert werden, der bei der Laserfrequenz demoduliert und versatzkorrigiert wurde (vgl. Gleichung 2, Fig. 7A bis 7C). Aus diesem Grund kann Gleichung 3 für diesen Aufbau wie folgt umformuliert werden (Gleichung 4):

$$VCD = \frac{I_{Symmetrie,Analyt}^{Modulator}}{I_{Symmetrie,Analyt}^{Laser} + I_{Referenz}^{Laser}} - \frac{I_{Symmetrie,Lösungsmittel}^{Modulator}}{I_{Symmetrie,Lösungsmittel}^{Laser} + I_{Referenz}^{Laser}}$$

**[0089]** Die beiden Brüche werden die Roh-VCD-Spektren des Analyten bzw. des Lösungsmittels genannt.

**[0090]** Dies ist in den Fig. 8A bis 8C visuell dargestellt. In Fig. 8A sind die Spektren gezeigt, die aus dem symmetrischen Kanal erfasst wurden, der bei der Frequenz des Modulators (insbesondere PEM) demoduliert worden war. Damit können die Roh-VCD-Spektren in Fig. 8B gemäß Gleichung 4 berechnet werden. Wenngleich das Lösungsmittel (in diesem Fall  $\text{CHCl}_3$ ) achiral ist, weichen die VCD-Spektren von 0 ab und enthalten die Artefakte, die in der Optikbaugruppe vorhanden sind. Aus diesem Grund ist es notwendig, die VCD-Spektren des Analyten durch Subtrahieren der VCD-Spektren des Lösungsmittels zu korrigieren, um diese Artefakte zu berücksichtigen. Die Ergebnisse sind in Fig. 8C gezeigt.

**[0091]** Insbesondere zeigt Fig. 8A die Spektren, die aus dem bei der Modulatorfrequenz demodulierten, symmetrischen Kanal für das Lösungsmittel und den Analyten erfasst wurden. Fig. 8B zeigt Roh-VCD-Spektren ( $\frac{I_{AC}}{I_{DC}}$ ) für den Analyten und das Lösungsmittel. Fig. 8C zeigt das lösungsmittelkorrigierte VCD-Spektrum des Analyten; berechnet durch Subtrahieren der Spektren in Fig. 8B.

**[0092]** Fig. 9 zeigt Abbildungen von  $I$  und  $\Delta I$ .  $I$  entspricht der bei der Laserfrequenz erfassten Intensität.  $\Delta I$  entspricht der Differenz in der Absorbanz für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht, erfasst bei der Modulatorfrequenz.

**[0093]** Die obigen Gleichungen sind zutreffend, wenn der Laser in der "freilaufenden" Konfiguration oder der "referenzierten" Konfiguration verwendet wird. Beide Konfigurationen sind in den Fig. 10A und 10B dargestellt. Die Differenz in der Datenerfassung zwischen der "referenzierten" und der "freilaufenden" Laserkonfiguration liegt zur Gänze in der Laserfrequenz. Bei der "freilaufenden" Konfiguration ist diese Frequenz signifikant höher als die Modulatorfrequenz (z. B. auf 1 MHz eingestellt), während sie bei der "referenzierten" Laserkonfiguration die zweite Harmonische der Modulatorfrequenz ist.

**[0094]** Insbesondere zeigt Fig. 10A eine Darstellung einer "freilaufenden" Konfiguration. Der Laser wird nicht auf den Modulator referenziert und auf eine höhere Pulsfrequenz als der Modulator eingestellt, wodurch Laserimpulse für die meisten Minimalwerte/Maximalwerte des Modulatorzyklus bereitgestellt werden. Fig. 10B zeigt die "referenzierte" Laserkonfiguration, wobei der Laser bei der zweiten Harmonischen des Modulators arbeitet. Jeweils ein Impuls wird für die Minimalwerte und die Maximalwerte jedes Modulatorzyklus produziert. Vorzugsweise (jedoch in Fig. 9B nicht gezeigt, sind sie von den tatsächlichen Maximalwerten und Minimalwerten des Modulationszyklus versetzt, um eine maximale zirkulare Polarisation zu gewährleisten).

#### HOCHGESCHWINDIGKEITS-DAC ODER ABTAST-HALTE-SCHALTUNG:

**[0095]** Die "referenzierte" Laserkonfiguration bietet eine weitere Option, um die Datenerfassung zu organisieren. Da die Impulse mit der "perfekten" Verzögerung ausgerichtet sind, was in unserem Fall einer zirkularen Polarisation entspricht, können sie getrennt digitalisiert und verwendet werden, um die Absorbanz für links- bzw. rechtszirkular polarisiertes Licht zu berechnen. Somit kann Gleichung 1 derart modifiziert werden, dass sie  $\Delta A = A_{links} - A_{rechts}$  widerspiegelt:

$$VCD_{korrigiert} = -\log\left(\frac{I_{Analyt}^{linker}}{I_{Lösungsmittel}^{linkes}}\right) + \log\left(\frac{I_{Analyt}^{rechter}}{I_{Lösungsmittel}^{rechtes}}\right)$$

**[0096]** Die entstehenden VCD-Spektren sind in diesem Fall bereits mit dem Lösungsmittel basislinienkorrigiert.

**MODULATOREINSTELLUNG:**

**[0097]** Unabhängig von der Konfiguration kann die durch den Modulator bewirkte Verzögerung parallel zu dem Wellenlängen-Sweep angepasst werden. Dies gewährleistet die korrekte Polarisation bei jeder Wellenlänge.

**[0098]** Der Ablaufplan in Figur 11 zeigt einen allgemeinen Ablauf für eine VCD-Messung mit symmetrischem Detektionsaufbau. Es sei darauf hingewiesen, dass der "Referenz"-Teil nur dann, wenn das Lösungsmittel geändert wird, oder zu Beginn einer Messreihe durchgeführt werden muss.



## Patentansprüche

1. Verfahren zur Vibrationszirkulardichroismusanalyse eines Analyten, das die Schritte umfasst:
  - a) Erzeugen eines Laserstrahls (3) bei einer Wellenlänge, vorzugsweise im Infrarotbereich;
  - b) Teilen des Laserstrahls (3) in einen Probenstrahl (6a) und einen Referenzstrahl (6b);
  - c) Modulieren der Polarisation des Probenstrahls (6a);
  - d) Wechselwirkenlassen des Probenstrahls mit einer Probe, die den Analyten umfasst;  
**gekennzeichnet durch** die Schritte:
    - e) Wechselwirkenlassen des Referenzstrahls (6b) mit einer Referenz;
    - f) Messen der Intensität des Probenstrahls (6a), um ein Probensignal zu erhalten;
    - g) Messen der Intensität des Referenzstrahls (6b), um ein Referenzsignal zu erhalten;
    - h) Subtrahieren des Probensignals und des Referenzsignals, um ein Differenzsignal zu erhalten;
    - i) Zurückgewinnen einer polarisationsabhängigen Intensitätsveränderung, die durch den Analyten eingebracht wird, aus dem Differenzsignal.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die polarisationsabhängige Intensitätsveränderung auf eine Differenz in der Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht in der Probe oder in dem Analyten zurückzuführen ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei ein Intensitätssignal aus dem Differenzsignal und dem Referenzsignal und/oder dem Probensignal berechnet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Intensitätssignal verwendet wird, um die polarisationsabhängige Intensitätsveränderung zu skalieren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Laserstrahl (3) in Impulsen mit einer Laserfolgefrequenz erzeugt wird und wobei der Probenstrahl (6a) durch einen Modulator (11) moduliert wird, der eine Veränderung der Polarisation gemäß einer Modulatorfrequenz bewirkt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Laserfolgefrequenz gleich oder größer als die Modulatorfrequenz ist.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, wobei jede Periode der periodisch oszillierenden Veränderung der Polarisation, die durch den Modulator (11) bewirkt wird, ein Maximum und ein Minimum einer bewirkten Veränderung der Polarisation umfasst, und wobei die Impulse des Laserstrahls (3) zu spezifischen Zeitpunkten während der periodischen Oszillation des Modulators (11) erzeugt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die spezifischen Zeitpunkte derart gewählt werden, dass sie mit dem Maximum und dem Minimum einer bewirkten Veränderung der Polarisation zusammenfallen.
9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die spezifischen Zeitpunkte derart gewählt werden, dass sie mit einer bewirkten maximalzirkularen Polarisation und/oder einer bewirkten maximalliniaren Polarisation zusammenfallen.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9, das ferner den Schritt umfasst:
  - j) Übertragen des Referenzsignals und des Differenzsignals an eine Datenerfassungseinheit (18) und Referenzieren des Referenzsignals und des Differenzsignals auf die Laserfolgefrequenz und/oder die Modulatorfrequenz.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, das vor dem Wechselwirkenlassen des Probenstrahls (6a) mit der Probe das Verringern des Strahldurchmessers des Probenstrahls (6a) mit einem Teleskopsystem (10) umfasst.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, das den Schritt umfasst:
  - k) Abschwächen des Probenstrahls (6a) und/oder des Referenzstrahls (6b), so dass deren Intensitäten näher aneinander liegen und/oder so, dass deren Intensitäten innerhalb eines

dynamischen Bereichs eines Probedetektors (15a), der die Intensität des Probenstrahls (6a) misst, und eines Referenzdetektors (15b), der die Intensität des Referenzstrahls (6b) misst, liegen.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Schritte a) bis h) und fakultativ i), j) und/oder k) wiederholt werden, während der Laserstrahl (3) in weiteren Wellenlängen erzeugt wird, um ein Spektrum des Analyten aufzuzeichnen.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Modulation der Polarisation des Probenstrahls angepasst wird, um eine spezifische Modulation der Polarisation zu erzielen, vorzugsweise für jede Wellenlänge innerhalb des Spektrums.
15. Vorrichtung (1) zur Vibrationszirkulardichroismusanalyse eines Analyten, die umfasst:
  - eine Laserlichtquelle (2) zum Bereitstellen eines Laserstrahls (3);
  - einen Strahlenteiler (5) zum Teilen des Laserstrahls (3) in einen Probenstrahl (6a) und einen Referenzstrahl (6b);
  - einen Modulator (11) zum Modulieren der Polarisation des Probenstrahls (6a);
  - eine Probenzelle (14a), um den Probenstrahl mit einer Probe (6a), die den Analyten aufweist, wechselwirken zu lassen;**gekennzeichnet durch**
  - eine Referenzzelle (14b), um den Referenzstrahl (6b) mit einer Referenz wechselwirken zu lassen;
  - einen Probedetektor (15a) zum Detektieren des Probenstrahls (6a) und Erhalten eines Probenstrahlsignals, das einer Intensität des Probenstrahls (6a) entspricht;
  - einen Referenzdetektor (15b) zum Detektieren des Referenzstrahls (6b) und Erhalten eines Referenzsignals, das einer Intensität des Referenzstrahls (6b) entspricht;
  - einen Subtrahierer (16) zum Bilden eines Differenzsignals des Probenstrahlsignals und des Referenzsignals.
16. Vorrichtung (1) nach Anspruch 15, die einen Probenstrahlabschwächer (8a) zum Abschwächen des Probenstrahls (6a) und einen Referenzstrahlabschwächer (8b) zum Abschwächen des Referenzstrahls (6b) umfasst, insbesondere derart, dass der jeweilige Strahl innerhalb eines dynamischen Bereichs des jeweiligen Detektors liegt, wobei der Probenstrahlabschwächer (8a) und der Referenzstrahlabschwächer (8b) wahlweise reflektierende Abschwächer sind.
17. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 15 und 16, umfassend ein Teleskopsystem (10) in einem Strahlengang des Probenstrahls (6a) vor der Probenzelle (14a) zum Verringern eines Strahldurchmessers des Probenstrahls (6a), wobei das Teleskopsystem (10) wahlweise ein galiläisches Teleskop umfasst.
18. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei die Probenzelle (14a) und die Referenzzelle (14b) durch eine Doppelpfad-Transmissionszelle bereitgestellt sind.
19. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei eine Weglänge des Probenstrahls (6a) in der Probenzelle (14a) gleich einer Weglänge des Referenzstrahls (6b) in der Referenzzelle (14b) ist.
20. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 15 bis 19, umfassend eine Probenstrahlfokussierlinse (9a) zum Fokussieren des Probenstrahls (6a) durch den Modulator (11) und durch die Probenzelle (14a) auf den Probedetektor (15a) und eine Referenzstrahlfokussierlinse (9b) zum Fokussieren des Referenzstrahls (6b) durch die Referenzzelle (14b) auf den Referenzdetektor (15b).
21. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 15 bis 20, wobei der Modulator (11) einen photoelastischen Modulator (12) umfasst.
22. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 15 bis 20, wobei der Modulator (11) einen elektrooptischen Modulator (13) umfasst.

23. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 15 bis 22, wobei der Modulator (11) in einem Strahlengang des Probenstrahls (6a) angeordnet ist, der geneigt zu einer Ebene normal zu einem optischen Strahlenweg des Probenstrahls (6a) platziert ist, vorzugsweise um zwischen  $5^\circ$  und  $20^\circ$ , insbesondere  $15^\circ$ , relativ zu der Ebene normal zu dem optischen Strahlenweg des Probenstrahls (6a) geneigt ist.
24. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 15 bis 23, wobei eine optische Achse des Modulators (11) unter  $45^\circ$  zu einer intrinsischen linearen Polarisation der Laserlichtquelle (2) ausgerichtet ist.
25. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 15 bis 24, die eine Steuereinheit umfasst, die eine Datenerfassungseinheit (18) umfasst, die mit dem Subtrahierer (16) verbunden ist, die mit dem Modulator (11) verbunden ist und die mit einem Wellenformgenerator (19) verbunden ist, wobei der Wellenformgenerator (19) mit einem Lasertreiber (20) der Laserlichtquelle (2) verbunden ist.
26. Vorrichtung (1) nach Anspruch 25, wobei die Steuereinheit so konfiguriert ist, dass die Datenerfassungseinheit (18) Daten aus dem Subtrahierer (16) und/oder dem Referenzdetektor (15b) und/oder dem Probedetektor (15a) unter Synchronisation mit einer Laserfolgefrequenz der Laserlichtquelle (2) und/oder mit einer Modulatorfrequenz des Modulators (11) erfasst.
27. Vorrichtung (1) nach Anspruch 26, wobei der Modulator (11) mit dem Wellenformgenerator (19) verbunden ist und die Steuereinheit ferner so konfiguriert ist, dass der Wellenformgenerator (19) die Laserlichtquelle (2) steuert, um Laserimpulse in Abhängigkeit von einem Zustand des Modulators (11) auszusenden.

**Hierzu 6 Blatt Zeichnungen**

1/6

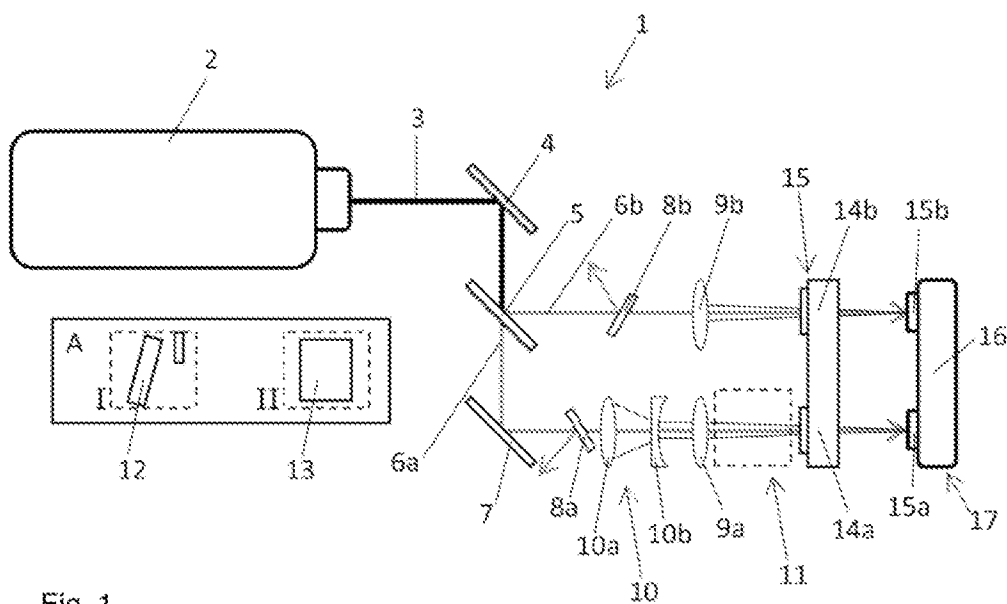


Fig. 1

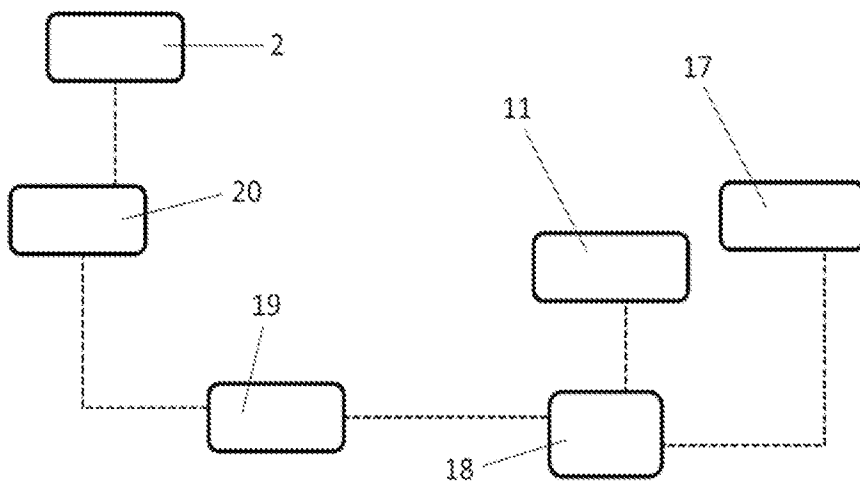


Fig. 2A

2/6

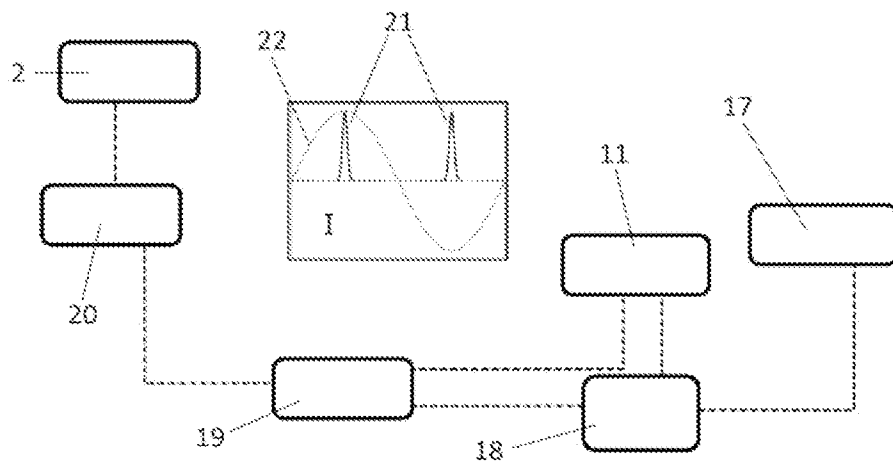


Fig. 2B

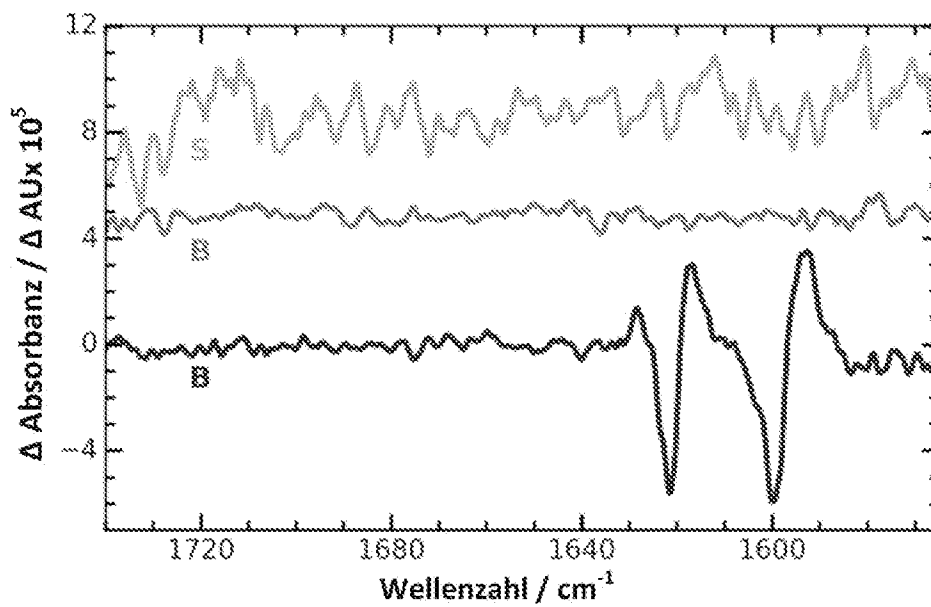


Fig. 3

3/6

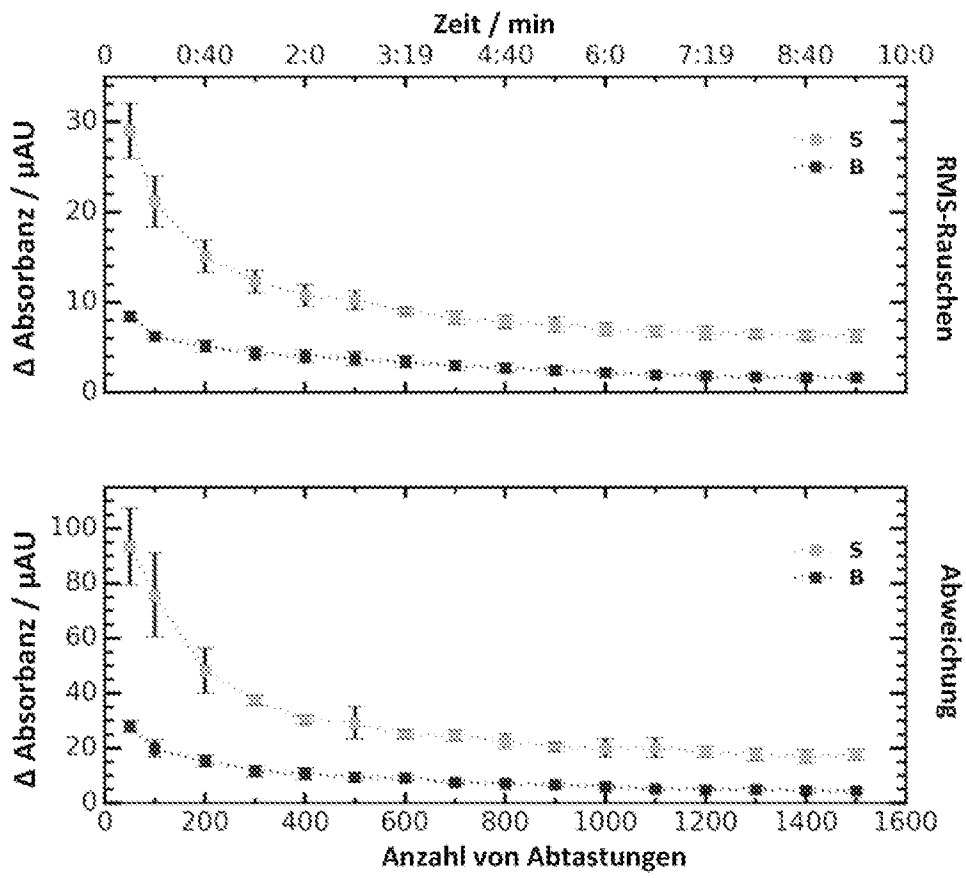


Fig. 4

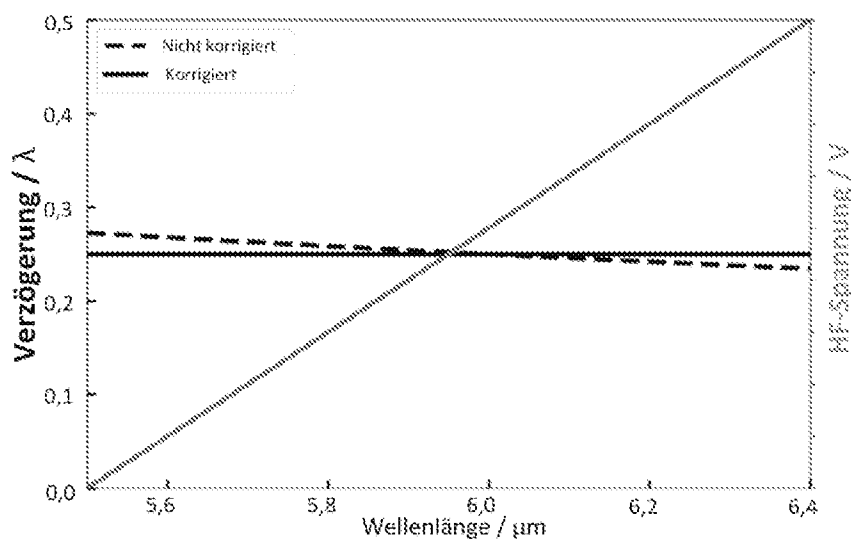


Fig. 5

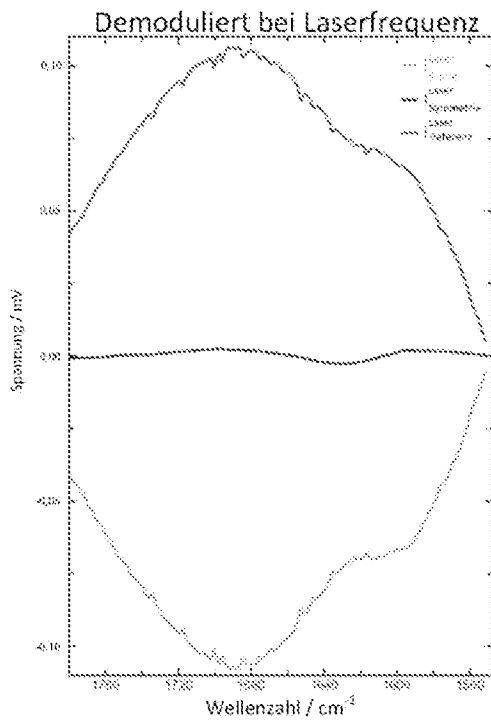


Fig. 6A

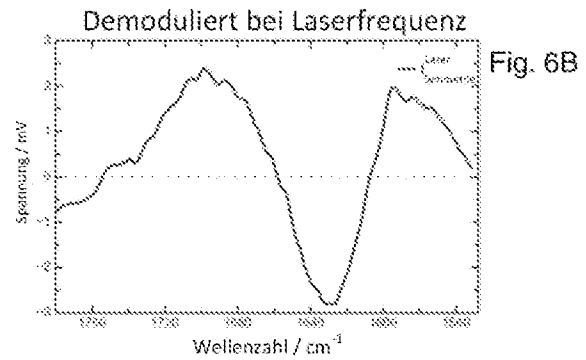


Fig. 6B

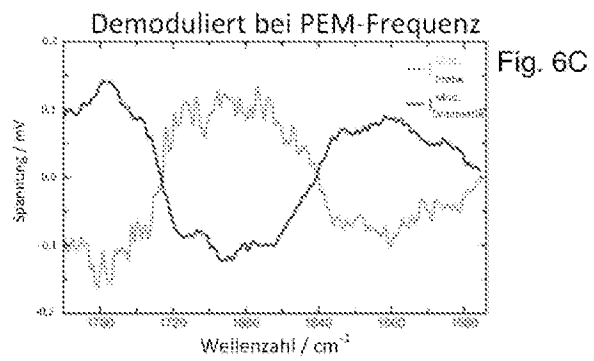


Fig. 6C

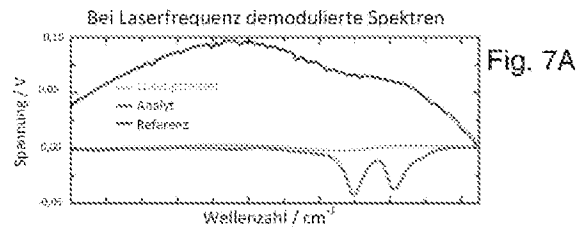


Fig. 7A

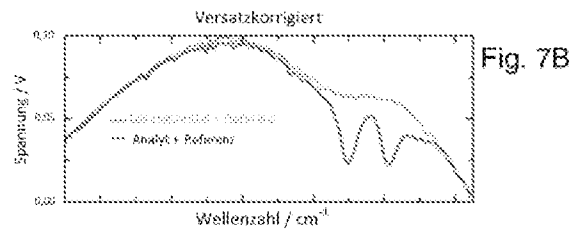


Fig. 7B

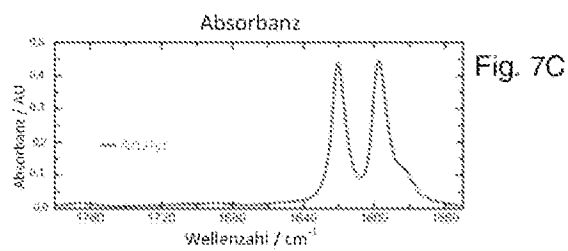
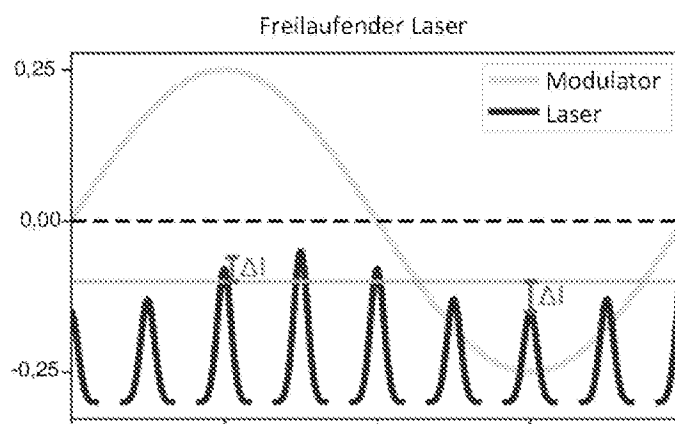
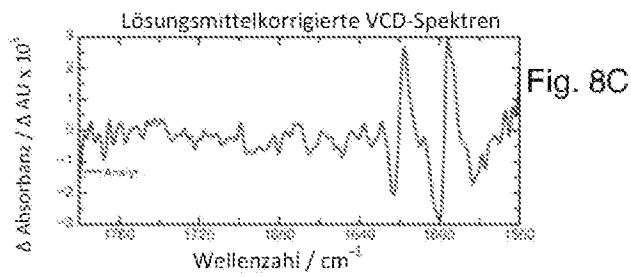
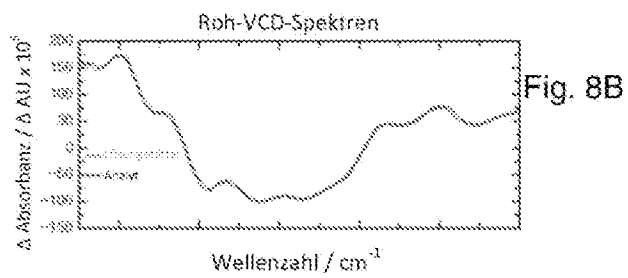
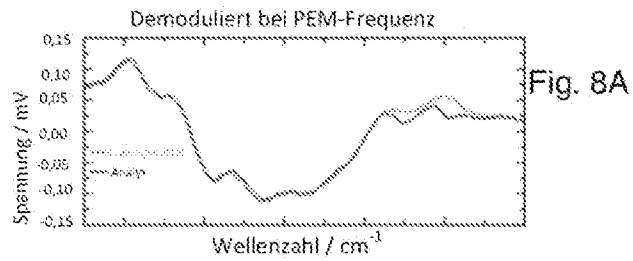


Fig. 7C

5/6





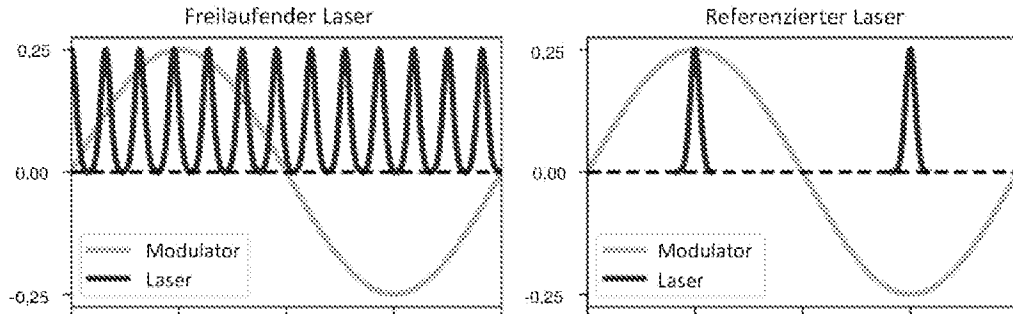


Fig. 10A

Fig. 10B

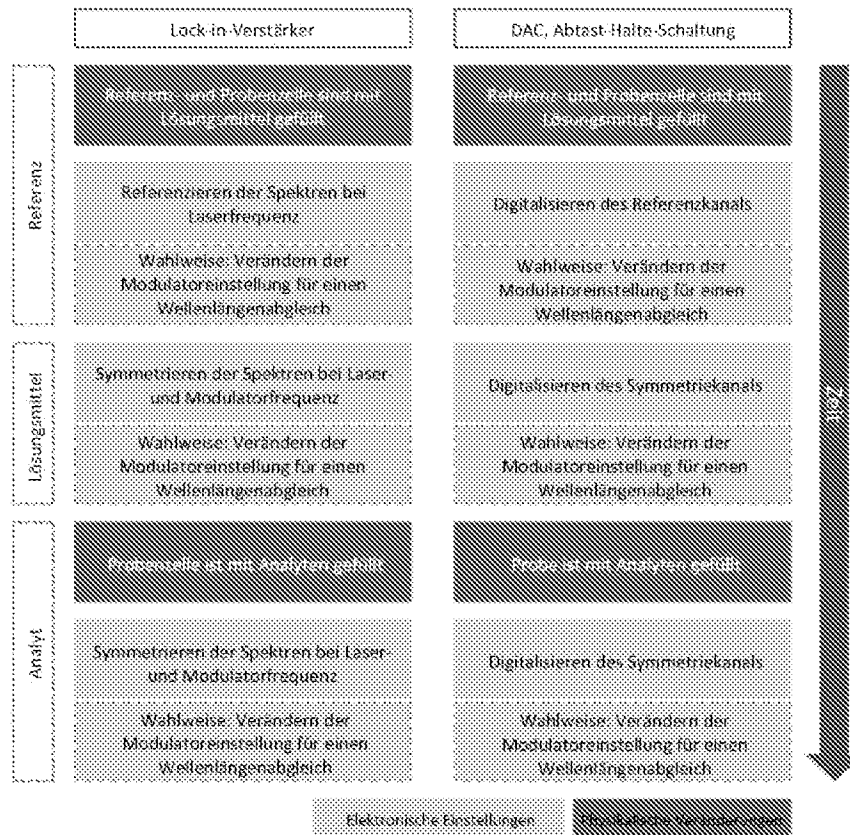


Fig. 11